

A postcondicionálás szerepe a vékonybél ischaemiás-reperfúziós károsodásának modulálásában

Doktori értekezés

Dr. Rosero Olivér

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók: Dr. Jancsó Gábor Ph.D. egyetemi docens
Dr. Kiss Levente Ph.D. egyetemi adjunktus

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	5
1. Bevezetés	8
1.1. Mesenterialis ischaemia	8
1.1.1. A mesenterialis ischaemia osztályozása	8
1.1.2. Az akut mesenterialis ischaemia patofiziológiája	9
1.1.3. Az akut mesenterialis ischaemia etiológiája	12
1.1.4. A mesenterialis ischaemia diagnózisa	14
1.1.5. A mesenterialis ischaemia ellátása	17
1.3. A bél ischaemiás-reperfúziós károsodása	18
1.3.1. A bél ischaemiás-reperfúziós károsodásában résztvevő mediátorok	19
1.3.2. Bakteriális transzlokáció	22
1.3.3. Toll-like receptorok szerepe mesenterialis ischaemia kapcsán	24
1.3.4. Szisztémás szövődmények	26
1.4. Postcondicionálás	28
1.4.1. Definíció – Történet	28
1.4.2. Időfaktor	30
1.4.3. Algoritmus	30
1.4.4. Mediátorok, triggerek és jelátviteli utak	31
1.5. A bél ischaemia-reperfúzió modellezése	36
1.5.1. In vitro modellek	37
1.5.2. In vivo modellek	37
2. Célkitűzés	39
3. Módszerek	41
3.1. Kísérleti elrendezés, műtéttechnika	41
3.1.1. Törvényi háttér	41
3.1.2. Állatok	41
3.1.3. Anaesthesia	41
3.1.4. Általános műtéti modell	41

3.1.5. Csoportbeosztás.....	42
3.1.6. Kísérletek részletezése	42
3.2. Vizsgálóeljárások.....	45
3.2.1. Hemodinamikai monitorozás	45
3.2.2. A bélnyálkahártya mikrocirkulációjának vizsgálata	45
3.2.3. Szövetteni elemzés	46
3.2.4. Necroenzimek.....	47
3.2.5. Mucosalis oxidatív stressz vizsgálata.....	48
3.2.6. Vena mesenterica superior pH mérés.....	49
3.2.7. Immunhisztokémiai vizsgálatok.....	49
3.2.8. Mikrobiológiai vizsgálatok	50
3.2.9. TLR-2 és TLR-4 mRNS meghatározása valós idejű (real-time) reverz transzkripció-polimeráz láncreakcióval (RT-PCR).....	50
3.2.10. Tüdő oedema index	52
3.2.11. Konfokális mikroszkópia	52
3.2.12. Enzimhez kapcsolt immunszorbens (ELISA) vizsgálatok	52
3.2.13. Statisztikai elemzés	53
4. Eredmények	54
4.1. I. Kísérlet eredményei.....	54
4.1.1. Haemodinamikai paraméterek.....	54
4.1.2. Mikrocirkuláció	55
4.1.3. Vékonybél szövettan	56
4.1.4. Plazma LDH és CK változások.....	58
4.1.5. Bélnyálkahártya antioxidáns státusz	58
4.1.6. A mesenterialis vér korai pH-változásai	62
4.1.7. Korai szérum IL-6 és TNF- α szintek	63
4.2. II. Kísérlet eredményei.....	64
4.2.1. Vékonybél szövettan	64
4.2.2. Aktív kaszpáz-3 immunhisztokémia	66
4.2.3. Tight junction sejtkepcsoló fehérjék immunhisztokémia.....	67
4.2.4. Bélnyálkahártya antioxidáns státusz	69
4.2.5. Mikrobiológiai vizsgálatok	70

4.2.6. Szérum I-FABP és d-laktát	71
4.3. III. Kísérlet eredményei	72
4.3.1. Mucosalis TLR-2 és TLR-4 mRNS expressziós mintázat	72
4.3.2. Vékonybél TLR-2 és TLR-4 fehérje expressziós változások vizsgálata konfokális mikroszkópiával	72
4.3.3. Mucosalis IL-6 és TNF- α koncentrációk	74
4.4. IV. Kísérlet eredményei	75
4.4.1. Távoli szervek szövettana	75
4.4.2. Szöveti károsodást jelző szérum paraméterek.....	76
4.4.3. Tüdő oedema index vizsgálata	77
4.4.4. Szérum IL-6 és TNF- α szintek.....	78
5. Megbeszélés	79
6. Következtetések.....	95
7. Új megállapítások	96
8. Összefoglalás	97
9. Summary.....	98
10. Irodalomjegyzék	99
11. Saját publikációk jegyzéke	126
12. Köszönetnyilvánítás	128

Rövidítések jegyzéke

ALAT:	alanin aminotranszferáz
AMI:	akut mesenterialis ischaemia
AP-1:	aktivátor fehérje-1
ARDS:	akut respirációs distressz szindróma
ASAT:	aszpartát aminotranszferáz
ATP:	adenozin-trifoszfát
CK:	kreatinin-kináz
CpG:	citozin-guanin dinukleotid
DAMP:	damage-associated molecular pattern, veszély-asszociált molekuláris mintázat
DNS:	dezoxiribonukleinsav
ECM:	extracelluláris mátrix
eNOS:	endothelialis nitrogén-monoxid szintáz
ERK:	extracelluláris szignál-regulált kinázok
ET:	endothelinek
GALT:	gut-associated lymphoid tissue, bélhez kapcsolódó limfoid szövet
GSK:	glikogén-szintáz-kináz
H ₂ O ₂ :	hidrogén peroxid
HE:	hematoxilyn-eosin
HMGB:	high-mobility group box, nagy mobilitású csoport
HSP:	hőszokkfehérje
ICAM:	intercelluláris sejt adhéziós molekula
IgA:	immunglobulin-A

IL:	interleukin
iNOS:	indukálható nitrogén-monoxid szintáz
IP3:	inozitol-triszfoszfát
LAD:	left anterior descending coronary, bal elülső leszálló koronária
LDH:	laktát-dehidrogenáz
LPS:	lipopoliszacharid
LT:	leukotriének
MEK:	MAPK/ERK kináz
MODS:	multiple organ dysfunction syndrome, több szervi működészavar szindróma
MOFS:	multiple organ failure syndrome, több szervi elégtelenség szindróma
MPO:	mieloperoxidáz
mPTP:	mitochondriális permeabilitási tranzíciós pórus
NADH:	nikotinamid adenin dinukleotid
NF- κ B:	nukleáris faktor-kappa B
NOMI:	non-occlusiv mesenterialis ischaemia
O ²⁻ :	szuperoxid anion
OH [·] :	hidroxilgyök
PAF:	thrombocytá aktivátor faktor
PAMP:	pathogen-associated molecular patterns, patogén-asszociált molekuláris mintázat
PI3K:	foszfatidil-inozitol-3-kináz
PKC:	protein kináz C
PMN:	polymorfonuklearis neutrophilek

RNS:	ribonukleinsav
ROS:	reaktív oxigéngyök
SERCA:	szarko-endoplazmatikus retikulum Ca ²⁺ -ATPáz
SIRS:	systemic inflammatory response syndrome, szisztémás gyulladásos válaszreakció szindróma
SOD:	szuperoxid dizmutáz
TLR:	toll-like receptor
TNF- α :	tumor nekrosis faktor alfa
XDH:	xantin dehidrogenáz
XO:	xantin oxidáz

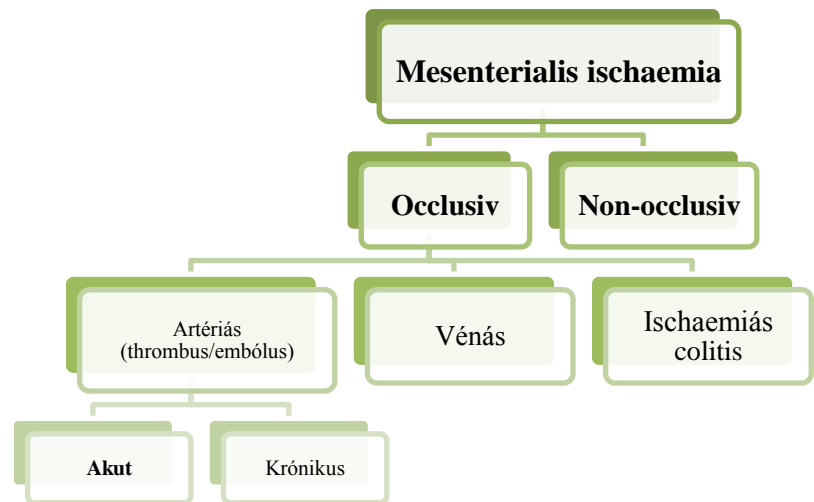
1. Bevezetés

1.1. Mesenterialis ischaemia

Az akut mesenterialis ischaemia (AMI) olyan sürgősségi sebészeti kórkép, amely „akut has” formájában jelentkezik és elkülönítendő más életveszélyes állapotoktól, például az emésztőtraktus perforációját követő peritonitistól. Jelentőségét mutatja, hogy igen gyakran halálos kimenetelű, kórházi mortalitása a javuló szupportív terápiás lehetőségek ellenére sem csökkent az elmúlt 20 év során, irodalmi adatok alapján ma is meghaladja a 60-80%-ot.[1-7] Bár a gastrointestinalis betegségek háttérében csak 1-2%-ban áll AMI[1], incidenciája a társadalom öregedésével párhuzamosan növekszik.[7,8]

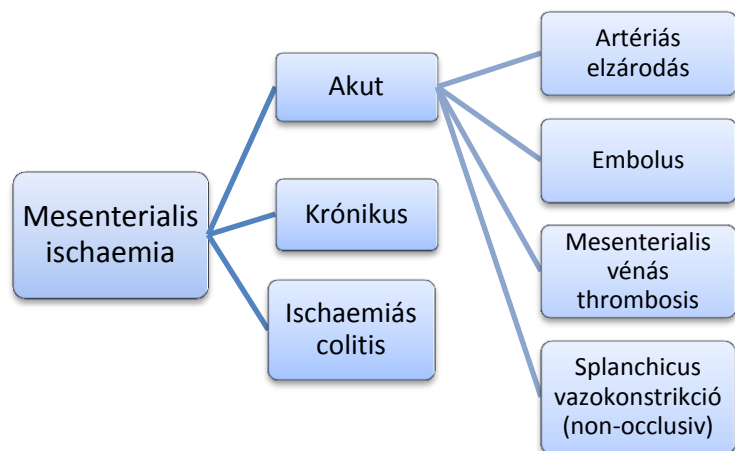
1.1.1. A mesenterialis ischaemia osztályozása

A bélischaemia nevezéktana a mai napig nem egységes. Az osztályozások egy része az érelzáródás típusa alapján állít fel csoportokat (1. ábra) [9], míg mások kizárólag a kórkép patogenezisére koncentrálnak, és nem veszik számításba az időbeli lefolyást. Ebben az esetben nem derül ki, hogy klinikailag akut, vagy krónikus kórlefojással állunk szemben. [10]



1. ábra Az intestinalis ischaemia osztályozása az obstrukció mechanizmusa szerint. Forrás: Lock G, Acta Gastroenterol Belg, 2002. [9]

Etiológiai szempontból fontos megkülönböztetni az érelzáródásra visszavezethető (occlusiv) és az elsősorban keringési redisztribúció talaján kialakuló (non-occlusiv) formákat. Az occlusiv formán belül is alapvetően más betegcsoportban növekszik az artériás és a vénás elzáródás valószínűsége, tekintve, hogy az előbbi gyakran atherosclerosis talaján alakul ki, míg az utóbbi jellemzően coagulopathiákhoz társul. Tekintve,



2. ábra Az Amerikai Gastroenterológiai Társaság javaslata az intestinalis ischaemia osztályozására. Forrás: Brandt LJ és Boley SJ, Gastroenterology, 2000. [1]

hogyan az AMI a sürgősségi hasi kórképek közé tartozik, így az Amerikai Gastroenterológiai Társaság saját ajánlásában a klinikai tünetekre fókuszálva osztotta az intestinalis ischaemiát három fő kategóriára: (1) akut mesenterialis ischaemia, (2) krónikus mesenterialis ischaemia, más néven intestinalis angina és (3) vastagbél ischaemia, más néven ischaemiás colitis (2.ábra)[1]. Eszerint a klasszifikáció szerint, az akut mesenterialis ischaemiának számos típusa van, többek között artériás thromboembolia vénás thrombosis és splanchnicus vazokonstrikció, más néven non-occlusiv mesenterialis ischaemia (NOMI).

1.1.2. Az akut mesenterialis ischaemia patofiziológiája

Az artériás középnyomás változása, a splanchnicus keringésre gyakorolt hatása jól ismert jelenség a patofiziológiában. Enyhe véráramlási zavar esetén az ischaemiás szövetek megnövekedett oxigén extractiója még képes kompenzálni a csökkent oxigén kínálatot, amint azonban a véráramlás 30 ml/perc/100 g szövet alá esik, vagy az artériás középnyomás 40-70 Hgmm alá csökken, az oxigén felvétel áramlás-dependenssé válik.[11,12] A jelentős mikrocirkulációs tartalék-kapacitásnak köszönhetően azonban az elégséges mesenterialis keringés néhány órán keresztül fennálló alacsony véráramlás és perfúziós nyomás mellett is biztosított lehet. Oxigénszegény körülmények között a mesenterialis kapillárisok jelentős része megnyílik (mindössze 20-25%-a marad zárva), ezért jelentős károsodás csak később alakul ki.[13,14]

Az intestinalis keringést a szisztémás vérnyomás direkt hatásán kívül autonóm idegrendszeri, endokrin és parakrin szabályozó mechanizmusok modulálják a szervezet mindenkori igényeinek megfelelően. Az autonóm idegrendszer egymással ellentétes hatású stimulusokat közvetít, vazokonstrikciót és vazodilatációt is képes kiváltani. A keringő endogén és exogén catecholaminok elsődlegesen a mesenterium postcapillaris venuláin fejtik ki hatásukat; azok constrictióján keresztül regulálják a splanchnicus területek térfogatát. A renin, az angiotensin, a vasopressin, a thromboxánok és a leukotriének (LT) képesek olyan erős, folyamatos vazokonstrikciót fenntartani, mely NOMI-hoz és intestinalis necrosishoz vezethet.[15]

Az intestinalis ischaemia során fellépő csökkent lokális oxigéntenzio az oxigén felhasználás és kínálat közötti aránytalansághoz vezet. Kísérletesen igazolt, hogy ischaemiás-reperfúziós károsodás következtében kialakult instabil oxigenizáció mellett, lipidek enterális adásával az intestinalis ischaemia súlyosbítható. Ennek oka, hogy a lipidek más táplálék összetevőknél jobban növelik a metabolikus igényt, és fokozzák a nyálkahártya oxigén szükségletét.[16]

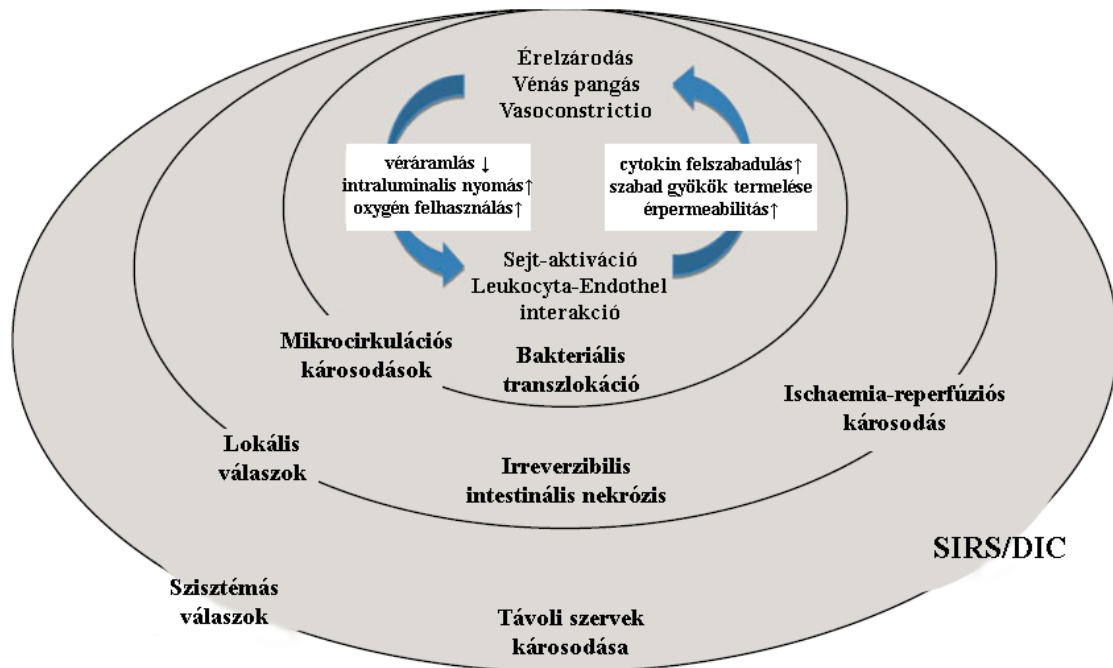
Az akut mesenterialis ischaemia esetében – hasonlóan más szervek/szövetek ischaemiás károsodásához – elsődleges és meghatározó szerepet tölt be a mikrocirkuláció elégtelen működése. A károsodó endothelsejtek, valamint aktiválódó monocyták, leukocyták és vérlemezkék egyaránt fontos szerepet játszanak a szervi specificitásnak megfelelő lokális és szisztémás reakciók elindításában.

A folyamat legsúlyosabb következménye egyrészt az érintett bélszakasz irreverzibilis károsodása, elhalása lehet, másrészt az egész szervezetet érintő súlyos szisztémás gyulladós válaszreakció (SIRS) alakulhat ki, mivel rövid idő alatt igen jelentős mennyiségű fehérvérsejt aktivációja következhet be.[15,17]

Az ischaemiás bélben aktiválódó neutrophilek, endothelsejtek, monocyták és thrombocyták, gyulladós citokineket termelnek (pl.: tumor necrosis faktor alfa (TNF- α), interleukinek (IL), thrombocyta aktivátor faktor (PAF), leukotriének). Ezek következtében az E-selectin és a hozzá hasonló endothelialis adhézios molekulák up-regulációja jön létre.[18] Ez az alapja a mikrothrombusok lokális kialakulásának, melyek a leukocyta adhézio és a thrombocyta aggregáció következtében tovább károsítják a bél mikrocirkulációját, és – adott esetben az ischaemiát prolongálva – késleltetik a reperfüziót.[19] Továbbá a károsodott endothelsejtek csökkent NO termelése a vazodilatációt károsítja, a fellépő vazokonstrikcio miatt további szervkárosodást okozhat.[20,21]

A reperfüzió során is más szövetekhez hasonló folyamatokkal találkozunk. Az ischaemiás bél reoxigenizációját követően az endothelsejteken belül hatalmas mennyiségű szabadgyök képződik. Ennek hátterében az áll, hogy az ischaemia során a xantin dehidrogenáz enzim – mely nagy mennyiségben fordul elő a nem- ischaemiás sejtekben – irreverzibilisen xantin oxidázzá alakul, és a reperfüzió alatt a hypoxantin metabolizmusát katalizálva nagy mennyiségű szabadgyököt szabadít fel.[22] Feltételezik, hogy a bél reperfüziós károsodásra való rendkívüli fogékonyságának egyik oka a xantin dehidrogenáz mesenterialis endotheliumban lévő magas koncentrációja lehet.[23]

Akut Mesenterialis Ischaemia

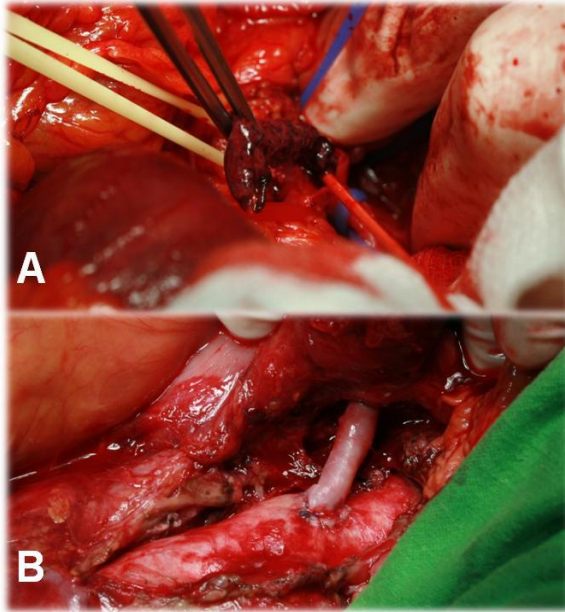


3. ábra Mesenterialis ischaemiát követő lokális- és szisztémás károsodások kifejlődésének patogenezise.
Forrás: Vollmar B et al, Arch Surg, 2011. [34]

A reperfundált szövetben található aktivált neutrophilekből szuperoxid szabadul fel (a NADPH oxidáz, valamint az elasztáz és kollagenáz által katalizált reakciókból), valamint a myeloperoxidáz a peroxidokból hypochlorid iont állít elő.[24,25] Ezek a reakciók toxikus oxigén gyököket eredményeznek (pl.: szuperoxid, peroxid és hidroxil gyökök), melyek lipid peroxidáció útján károsítják a sejtmembránt.[26] A szabadabbá váló toxikus oxigén metabolitok és enzimek a szomszédos sejteket és szöveteket tovább károsítják. A reperfúzió során, károsodott endothelium következtében megnő a kapilláris-permeabilitás, ami intestinalis oedemát és intraluminális folyadék-akkumulációt eredményez.[27] A sérült intestinalis mikrocirkuláció és barrier-rendszer nem képes eliminálni a nyálkahártya károsodás következtében transzlokálódó baktériumokat, ezért a folyamat endotoxaemiához, bakteriemiához vezet.[28,29] A lokális károsodás generalizálódása következtében kialakuló SIRS és a bakteriális transzlokáció fontos szerepet játszanak a további akut respirációs distressz szindróma (ARDS) és a szívelégtelenség kifejlődésében is.[30-32] A SIRS/szepszis által okozott sokszervi elégtelenség (multi organ failure: MOF) bizonyítottan hozzájárul az akut intestinalis ischaemia rossz prognózisához.[33,34] (3.ábra)

1.1.3. Az akut mesenterialis ischaemia etiológiája

1.1.3.1. Emboliás eredetű mesenterialis ischaemia



4. ábra (A) arteria mesenterica superioron végzett embolectomia; **(B)** Aorto-mesenterialis bypass.
 Forrás: dr. Kaliszky Péter és dr. Gyurkovics Endre képanyagából. SE I. sz. Sebészeti Klinika.

A zsigeri erek embolisatiója a mesenterialis ischaemia leggyakoribb oka, az esetek 30-50%-áért felelős.[35,36] (4.ábra) A visceralis embolia rizikófaktora a pitvarfibrilláció, a falmozgászavarhoz vezető myocardialis infarctus és a strukturális szívbetegségek (pl. jobb-bal shunt). Az akutan bekövetkező embolia tünetei gyors progressziót mutatnak, mivel heveny kialakulás esetén a kollaterális vérrellátás lehetősége korlátozott. A hirtelen kezdet és a gyakori diagnosztikus késedelem egyaránt hozzájárul a kórkép magas halálozásához, amely egyes közlemények szerint a 70%-ot is elérheti.[37] Érdekes megfigyelés, hogy az arteria mesenterica superior ellátási

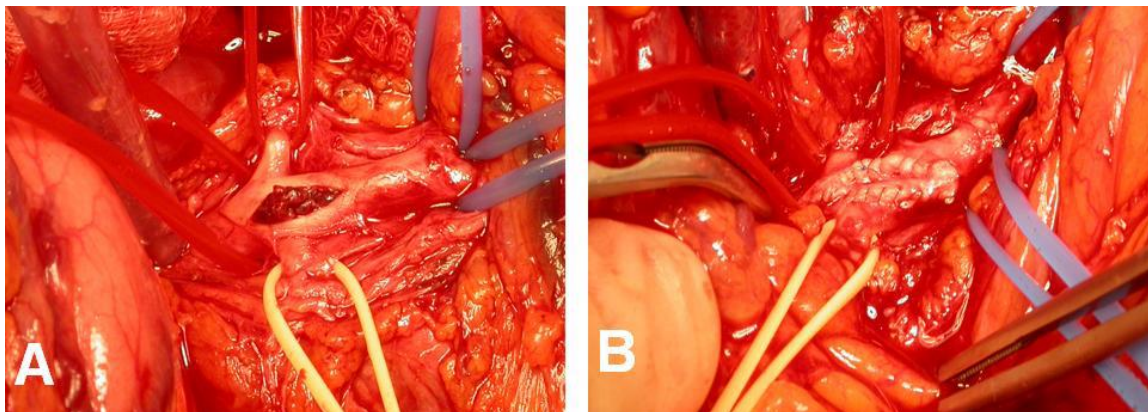
területe gyakrabban van kitéve embolisatióknak, mint a truncus coeliacusé vagy az arteria mesenterica inferioré, mivel ez utóbbiak eredése kevésbé hegyes szöveget zár be az aortával.

Az embolus típusosan az artéria colica media eredésétől distalisan akad el, megkímélve az ischaemiától a duodenumot és a colon transversumot. A distal felé elsodródó embolus a bélrendszeren foltos jellegű necrosist eredményez.[38,39] Az embolisatióra visszavezethető visceralis ischaemia miatt jelentkező betegek általában hirtelen fellépő, igen erős fájdalmat panasznak. A fizikális vizsgálat során gyakran nem találunk peritoneális izgalmi jeleket és izomvédekezést. Ezek általában csak később, a bélinfarctus kialakulása után észlelhetők, ezért meglétük rosszabb prognózist jelez. A klasszikus leírás ellenére csupán a betegek egyharmada jelentkezik a típusos triásszal: hasi fájdalommal, véres széklettel és lázzal.[36,40] A mesenterialis ischaemia gyanúja időben fel kell hogy merüljön, kiváltképpen azon páciensek esetében, akiknél fennállnak az atherosclerosis rizikófaktora. A gyanú esetén mindenképpen szoros observatio és szükség esetén gyors beavatkozás indokolt.

1.1.3.2. *Thromboticus eredetű mesenterialis ischaemia*

A mesenterialis ischaemia hátterében az embolia után az artériás thrombosis a második leggyakoribb kóroki tényező. (5. ábra) A kettő közül mégis ez számít veszélyesebbnek, mivel egyes szerzők szerint mortalitása akár a 90%-ot is elérheti.[37] Ennek hátterében az állhat, hogy thrombosis esetén az elzáródás jellemzően proximálisabban jön létre, ezért általában hosszabb bélszakasz érintett, bár az érintett bélszakasz hossza és az arteria mesenterica superior occlusio magassága közötti összefüggés igen nagy egyéni variabilitást mutat.[39] A betegek anamnézisére jellemző, hogy gyakran krónikus mesenterialis ischaemiában szenvednek, illetve fellépett már náluk korábban mesenterialis angina.[35,41] Ezek hátterében általában az arteria mesenterica superiorot beszűkítő atherosclerotikus plakkok állnak. Figyelemfelkeltő tünet a súlycsökkenés, a hasi fájdalom és az étel-undor, melyek nem-specifikus előjelei lehetnek a mesenterialis ischaemia akut epizódjának.

A vénás thrombosis ritkábban fordul elő és halálozási rátája is alacsonyabb (20-50%). [42,43] Legtöbbször májcirrhosishoz, vagy portális hipertenzióhoz társultan alakul ki, de az etiológiai tényezők között számos hypercoagulabilitásra hajlamosító tényező is szerepel, mint például malignus kórképek, pancreatitis, orális fogamzásgátlók szedése, Leiden mutáció és egyéb öröklött thrombophilias állapotok (protein C deficiencia, prothrombin mutáció, stb.), valamint a postoperatív időszak/állapot.[36,42,44,45] A mesenterialis vénás thrombosisal jelentkező betegek mintegy felének szerepel az anamnézisében mélyvénás thrombosis, vagy pulmonalis embolia.[40,42] A felsorolt etiológiai faktorok, valamint anamnesztikus adatok jelenléte esetén feltétlenül gondolni kell a mesenterialis vénás thrombosis lehetőségére a hasi fájdalommal jelentkező betegnél.



5. ábra (A) Thrombendarterectomia és **(B)** foltplasztika az arteria mesenterica superioron.
Forrás: dr. Kaliszky Péter és dr. Gyurkovics Endre képanyagából. SE I. sz. Sebészeti Klinika.

A vérrög kialakulási sebességétől függően a vénás mesenterialis thrombosisra vonatkozóan is megkülönböztetünk akut és krónikus formát. Akut thrombosisban a fájdalom kifejezettebb és sokkal gyakrabban alakul ki manifeszt bélinfarctus. Krónikus thrombosisban szenvedő betegek ritkán panaszkodnak jelentős fájdalomról. A hosszabb

kórlefolyásra való tekintettel, náluk jóval gyakrabban alakulnak ki nyelőcső- vagy gyomor varixok.[44]

1.1.3.3. *Non-occlusiv ischaemia*

Artériás, vagy vénás occlusio hiányában is felléphet mesenterialis ischaemia ún. low-flow állapotokban. Az AMI etiológiái között a NOMI diagnózisa kizáró alapon nyugszik, amiről akkor beszélhetünk, ha mesenterialis ischaemia áll fenn és nem mutatható ki az ereket elzáró egyéb akadály (embolus, thrombus). A NOMI patogenezisében szerepet játszanak azon mechanizmusok, melyek a zsigeri és perifériás keringés rovására képesek a vitális szervek állandó perfúzióját biztosítani hipotenzió esetén.[12,46] A NOMI rizikófaktorai között (szívelégtelenség, shock, dialízis) fontos megemlíteni az atherosclerosist is. Tekintve, hogy az atherosclerosis szisztémás betegség, gyakran találhatóak az a. mesenterica superior, inferior és a truncus coeliacust szűkítő plakkok, melyek már minimális vérnyomáscsökkenés esetén gátolják az intestinalis rendszer megfelelő vérellátását. Boncolási leletek alapján az érlemeszesedés mintegy 30-50%-ban ezeket az ereket is érinti.[47] A plakkok jelenléte általában nem okoz panaszt vagy klinikai tüneteket, és a boncolási adatok alapján is a populáció mindössze 0,01%-ban szerepel a halálokok között.[48,49] Az atherosclerosis talaján kialakuló krónikus mesenterialis ischaemia mellett különböző gyógyszerek is okozhatnak eltérő latenciával kialakuló NOMI-t. Ilyen készítmények például a vasopressorok, a digitális és a kokain, amelyek elsősorban előzetesen meglévő léziók esetén vezetnek az ischaemia manifesztációjához.[35]

Az intenzív osztályokon széles körben elterjedt invazív hemodinamikai monitorozás és a jobb mellékhatásprofilal rendelkező vazoaktív szerek együttes alkalmazásának eredménye, hogy a NOMI incidenciája mintegy 50%-kal csökkent az elmúlt 40 évben.[50] Az alacsonyabb incidenciára ellenére a NOMI magas mortalitással jár a diagnosztikus nehézségek és a már kialakult NOMI kezelésének gyakori kudarca miatt.[51]

1.1.4. A mesenterialis ischaemia diagnózisa

A mesenterialis ischaemia felismerése nehéz feladatot jelent. A gyors diagnózis fontos, hiszen a kórisme felállításának elhúzódása, és a terápia megkezdésének késedelme rohamosan romló kilátásokhoz vezethet. Az azonnali beavatkozás szerepét hangsúlyozza az a megfigyelés, miszerint a tünetek kevesebb, mint 12 órai fennállása esetén a bél életképessége megőrzésének az esélye 100%, azonban 12 és 24 óra elteltével ez már csak 56%, míg 24 órán túl csupán 18%. [52,53] A CT-angiográfia diagnosztikai pontossága felülmúlja a mesenterialis angiográfiáét, ezért jelenleg ez az első választandó módszer az akut mesenterialis ischaemia diagnózisában. Érzékenysége 82-96% között van; specificitása 94%. [54-57] Ezen diagnosztikus módszerek legfőbb hátránya azonban, hogy időigényesek, magas sugárterheléssel járnak és a kontrasztanyag használata miatt renovascularis társbetegségek esetén kontraindikáltak

lehetnek. Ezért egy egyszerűbb, gyorsabb és kevésbé invazív eljárás az akut mesenterialis ischaemia diagnosztikájának egyik fontos kutatási területe lehet. A mesenterialis ischaemia felismerési nehézsége ellenére biztató előrelépések történtek a közelmúltban az AMI leendő biomarkereinek keresésében.[58,59]

→**I-FABP (Intestinal fatty acid binding protein, intestinalis zsírsav kötő fehérje):** az I-FABP egy kisméretű (15kD), vízdoldékony, cytoplasmában található fehérje, amely a vékony- és vastagbél érett enterocytáit felépítő proteinek jelentős részét (2%-át) alkotja. Az enterocyták a FABP 3 izoformáját expresszálják: intestinalis FABP (I-FABP), ileum epesav kötő fehérje (I-BABP) és máj FABP (IL-FABP). Az I-FABP egyedül a vékonybélbolyhok villusainak csúcsán fordul elő, és normálisan nem mutatható ki a perifériás keringésben.[60] Az I-FABP részt vesz az intracelluláris puffer rendszer működésében, valamint a hosszú szénláncú zsírsavaknak az enterocytá apikális membránjáról az endoplazmatikus retikulumba történő transzportjában, ahol az összetett zsírsavak bioszintézise történik.[61] Pelsers és mtsai.[60] arról számoltak be, hogy legnagyobb számban a jejunumban és a colon alsó részeiben található. Az I-FABP mellett, hogy magas koncentrációban van jelen az enterocytákban, igen érzékeny a korai ischaemiára. Mesenterialis ischaemiában, amikor a bélhámsejtek membránjának integritása megszűnik, az I-FABP a keringésbe kerül, majd a vizeletben koncentrálódik.[62] Ennélfogva az I-FABP egy jól mérhető, mind a perifériás vérből, mind a vizeletből kimutatható szenzitív markere a bélischaemiának. Több humán vizsgálat igazolta, hogy a szérumban I-FABP szintje megemelkedik a mesenterica superior occlusioja esetén.[62-66] Klinikai gyakorlatban történő alkalmazhatóságát limitálja, hogy szérumban I-FABP emelkedéséről nem csak a vékonybél ischaemiás károsodása kapcsán számoltak be, hanem a bélrendszer mucosáját érintő non-ischaemiás megbetegedések kapcsán is.[67] Azt is figyelembe kell venni, hogy az I-FABP vizeletbe történő gyors kiválasztása (plazmafelezési ideje mindössze 11 perc) és koncentrálódása következtében a vizelet I-FABP tartalmának meghatározása alkalmasabb lehet a diagnosztika során, mint a plazmakoncentráció.[62]

→**d-laktát:** a laktát minden izoformája a piroszőlősav lebomlása során keletkezik specifikus laktát dehidrogenázok hatására. Az l-laktát dehidrogenáz működése l-laktátot, a d-laktát dehidrogenáz működése d-laktátot eredményez. Az emlősök szövetei nem termelnek d-laktátot, az exogén forrásból keringésbe kerülő molekulát pedig a szervezet csak nagyon lassan képes metabolizálni. A laktát d-sztereoizomere bakteriális fermentáció eredménye. Kimutatták, hogy a d-laktát termelésében a gastrointestinalis traktust kolonizáló, normál flórához tartozó *Escherichia coli*, *Lactobacillus*, *Klebsiella* és *Bacteroides* specíesek vesznek részt.[68] Alacsony koncentrációban egészséges személyek vérében is kimutatható kevés keringő d-laktát, azonban a bélnyálkahártya-barrier sérülése, ezáltal átteresztőképességének megnövekedése esetén a molekula szérumszintje jelentősen megemelkedhet. A zsigeri ischaemia egyik legkorábbi jelének a permeabilitás fokozódását tartják, ennélfogva a plazma d-laktát szintjének emelkedése alkalmas lehet a bélrendszer károsodott vérrellátásának monitorozására. Ischaemia

hatására a szervezet elveszíti védekezőképességét a bakteriális túlszaporodással szemben, így a mesenterialis ischaemiának kitett bélszakasz lumenében a baktériumok száma jelentősen emelkedik. A baktériumok proliferációja az anyagcseréjük fokozódásával, ezáltal növekvő d-laktát termeléssel jár együtt. Az emlősök nem rendelkeznek a d-laktát gyors lebontásához szükséges enzimrendszerrel, így a molekula gyakorlatilag változatlan koncentrációban kerül a portális érrendszeren keresztül a perifériás vérbe, melyből ezáltal már a betegség korai stádiumában kimutatható. Általánosságban tehát a d-laktát felszaporodása a szisztémás keringésben intestinalis ischaemia következtében fellépő fokozott bélfal permeabilitásra és a vastagbél baktériumflórájának túlszaporodására utal. A d-laktát a klinikai gyakorlatban hasznos marker lehet a bélrendszert érintő inzultusok korai diagnosztikájában.[69,70] Az eredmények értékelését nehezítheti, hogy malabszorpciós szindrómák esetében az emésztetlen, vagy részlegesen emésztett szénhidrátok megnövekedett mennyisége miatt a vastagbelet kolonizáló baktériumok fermentációja során is d-laktát termelődik, mely a vérbe kerülve emelkedett plazmakoncentrációt, ezáltal fals pozitív eredményt adhat.[71]

→**claudin-3**: az egy sejtrétegből felépülő intestinalis epithelium biztosítja a határt az intraluminalis béltartalom és a steril vérkeringés között. Ezért a barrier funkcióért az intracelluláris tight junction struktúrák és alkotórészei felelősek. A claudinokról bebizonyosodott, hogy a legfontosabb tight junction-t alkotó molekulák közé tartoznak, és egészséges bélhám esetén nagy számban találhatóak a szomszédos epithelsejtek között.[72] A claudin család 24 ismert tagból áll, melyek feloszthatók pórusképző és barrierképző alcsoportokra. Az epithelsejtek szövetspecifikus módon többféle claudint expresszálnak, jellegzetes féligáteresztő barrierrel hozva létre. A barrierképző claudinok alcsoportjába tartozó claudin-3 erősen expresszálódik az intestinalis epithelsejtek membránján.[73] Vizsgálattal igazolták, hogy a vékonybél integritásának sérülése esetén a vizeletben kiválasztott claudin-3 szintje megemelkedik. Ez az erős korreláció teszi lehetővé a claudin-3 vizeletben mért koncentrációjának alkalmazhatóságát a mesenterialis ischaemia következtében kialakult intestinalis tight junction károsodás detektálására. A vékonybélbolyhok csúcán elhelyezkedő epithelsejtek a mesenterialis ischaemiára fokozottan érzékenyek. Az általuk expresszált, tight junction-ök felépítésében részt vevő claudin-3 kiemelt szerepe abban rejlik, hogy rendkívül szenzitív mutatója lehet az akut mesenterialis ischaemiának már a korai stádiumban is, amikor a bélfal többi rétege még nem érintett. Az eredmények értékelésekor figyelembe kell azonban venni, hogy a módszer specificitása alacsony, számos egyéb gastroenterológiai betegség (gyulladásos bélbetegségeket, necrotizáló enterocolitis) is járhat tight junction vesztéssel, ezáltal a vizelet claudin-3 koncentrációjának emelkedésével.

1.1.5. A mesenterialis ischaemia ellátása

Mesenterialis ischaemiára gyanús esetekben első lépés a betegek adekvát volumen terápiaja, mivel a visceralis ischaemiát követő reperfüzió esetén tapasztalható „capillary leak” igen jelentős folyadék deficithez vezet. A kialakuló hypovolaemiás, majd szeptikus shock miatt a betegek egy része keringéstámogatást is igényelhet, mely során a visceralis ischaemia súlyosbodásának elkerülése érdekében, a β -agonista adrenerg szerek (pl. dopamin) részesítendőek előnyben.[35] Figyelembe véve, hogy az ischaemia gyakran vezet bakteriális transzlokációhoz, széles spektrumú antibiotikumok (pl. imipenem) empirikus adása, valamint szelektív digestiv decontamináció (nem felszívódó antibiotikumok – mint például rifaximin, neomycin, vancomycin vagy polymixin E – alkalmazása a patogén mikroorganizmusok szelektív eradikálására) javasolt.[74] A thrombus további propagációjának megelőzésére fontos a terápiás dózisú anticoagulatio beállítása.[35,75]

A sebészi beavatkozás mindazon betegek esetében indikált, akiknél bizonyítottan fennáll bélischaemia – függetlenül annak etiológiájától. Az artériát érintő betegségek megoldására számos technika létezik, köztük nyitott sebészi ellátás, valamint endovascularis manipulációk. Manapság a tendencia a stentbeültetéssel járó percutan transluminaris angioplastica irányába mutat, bár ennek hatékonyabb volta egyértelműen nem bizonyított a stentbeültetés nélkül végzett angioplasticával szemben.[76-78]

Artériás keringési elégtelenség fellépése esetén szóba jön az embolectomia, az angioplastica (PTA), trombandarteriectomia (TEA) foltplastica mellett és a mesenterialis bypass műtét is. A bypass kialakítható anterográd módon, a truncus coeliacus feletti aortaszakaszról (amely az atherosclerosistól általában megkímélt) kiindulón, de megoldható az iliacalis erek felől is, retrográd módon. Néhány centrum az előbbi technikát javasolja, mivel a retrográd graftok hajlamosabbak az elzáródásra.[79,80] Akut feltáráskor – hacsak a bél nem súlyosan necrotikus – érdemes a resectio előtt elvégezni a revascularisatiót, és ezt követően újra megvizsgálni a belek vérellátottságát és életképességét. A bypass graftok típusát tekintve különböző lehetőségek állnak rendelkezésre. A megfordított vena saphena graftok megfelelőbbek az elhalt bélből származó contaminatio fellépése esetén [81], mivel kevésbé hajlamosak az infekcióra, a szintetikus a. mesenterica graftok azonban időtállóbbak. Bár nem készült még randomizált vizsgálat a szintetikus és az endogén graftok összehasonlítására, a legmodernebb szintetikus graftok kedvezőbb eredményeket hozhatnak.[82-84] A szintetikus graftok alkalmazása azt az előnyt is magában rejti, hogy elágazó graftok használatával lehetővé válik a truncus coeliacus és az arteria mesenterica superior szimultán revascularizatioja egyszeri aortotomia keresztül.

A konzervatív kezelés zászlóshajója a szisztémás anticoagulatio maradt. Az irodalmi adatok alapján a heparin korai alkalmazása javítja a túlélési esélyeket.[43,85] A heparin készítmények adása a postoperativ szakban is folytatandó, a vérzésveszély elmúltával.

A hosszútávú anticoagulálás mind az embolia, mind a thrombosis talaján kialakult mesenterialis ischaemiát követően ajánlott az ismétlődés rizikójának mérséklésére.[35,86] Továbbá minden beteget ki kell vizsgálni hypercoagulabilitással járó állapotok, mint a beteg további életvitelét befolyásoló etiológiai tényezők irányába.

1.3. A bél ischaemiás-reperfúziós károsodása

Nyugalomban a gastrointestinalis traktushoz a perctérfogat 10-15%-a jut és ennek a vérmennyiségnek a 70-90%-át a mucosa és a submucosa használja fel. Normál körülmények között a splanchnicus perfúziót lokális mediátorok szabályozzák, például az adozin, a nitrogén monoxid, a prosztaglandin- E_2 és $-I_2$, valamint a hisztamin. A szisztémás keringésben jelen lévő mediátorok szintén jelentős hatást gyakorolnak a perfúzióra. A szimpatikus idegrendszer stimulálása aktiválja a splanchnicus keringésben található adrenerg receptorokat, amely vazokonstriktióhoz vezet. A keringő mediátorok, például a gastrointestinalis hormonok (gastrin, cholecystokinin, glucagon) fokozzák a gastrointestinalis véráramlást, ezzel szemben az angiotenzin II potens vazokonstriktorként ismert.

A vérellátás megszűnése ischaemias károsodást eredményez, amely a metabolicusan aktív szövetek esetén gyorsan kialakul. A hasi szervek közül a bélrendszert tartják leginkább érzékenynek az ischaemiás-reperfúziós (IR) károsodásra.[87,88] Ennek egyik oka, hogy a mikrovillusok csúcsán elhelyezkedő enterocyták rendkívül érzékenyek az ischaemiára. Eredetileg azt feltételezték, hogy ennek hátterében az áll, hogy ezek a sejtek a centralis arteriola oszlásának végénél helyezkednek el, amely a kriptákhoz képest alacsonyabb oxigén tenziójú vért tartalmaz.[89,90] Egy újabb vizsgálat azonban kimutatta, hogy az enterocytá ischaemiás érzékenysége annak differenciáltsági állapotától függ.[91]

Paradox módon a véráramlás újbóli megindulása olyan eseménysort indít el, amely további sejt-károsodást eredményez, ezt nevezzük reperfúziós károsodásnak. A reperfúziós károsodás mértéke gyakran meghaladja az eredeti ischaemiás inzultusét. Az ischaemia során lezajlott molekuláris és biokémiai változások szabadgyökök képződéséhez vezetnek, amelyek a véráramlás újbóli megindulásakor mediálják a további károsodásokat.[17,92] A reperfúzió során a gyulladós folyamatok direkt módon rontják a splanchnicus területen a microvascularis perfúziót azáltal, hogy a kapillárisokban mechanikus akadály kialakulását segítik (pl. a neutrophil-kitapadás és thrombocytáaggregatio serkentése révén), vagy módosítják a parakrin vazokonstriktor és vazodilatátor mediátorok felszabadulását, lokális vazokonstriktió irányába terelve a folyamatot.

A mitochondriumok sérülése, a csökkent ATP termelés következtében meghatározó az IR károsodás kiterjedése és a regenerációs potenciál szempontjából.[93] A károsodás mértékét alapvetően befolyásolják továbbá az oxigén tartalmú szabadgyökök, a vasraktárak felszabadulása, a mikrocirkulációs elégtelenség mértéke, a gyulladós

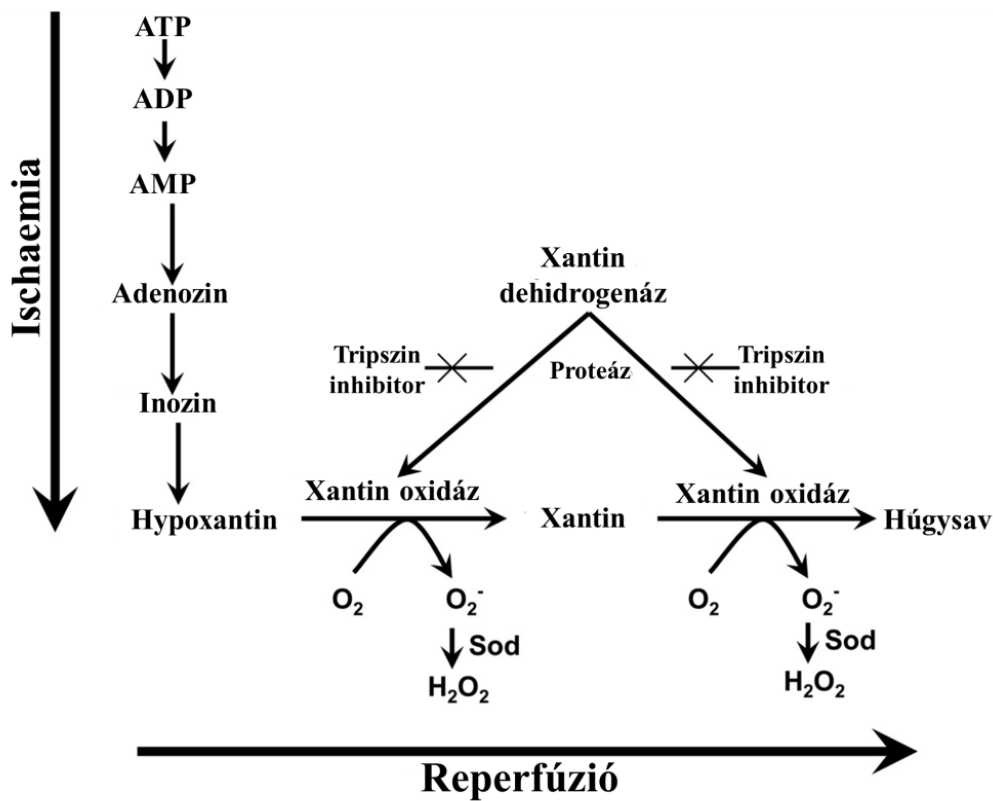
citokinek, a complement aktiváció és a sérülés helyén tapasztalható neutrophil granulocytás infiltráció.[94,95] Az enterocytákról kimutatták, hogy főképpen szepszis, endotoxémia, haemorrhagias shock és trauma esetén termelnek nagy mennyiségű citokint.[23,96-100] Bizonyított, hogy az ischaemiás-reperfúziós károsodásnak kitett bél mucosalis rétege számos akutfázis-fehérje, gastrointestinalis hormon és citokin termelődési helyévé válik, melyek távoli szervek funkciójára és integritására is hatással vannak.[101-104]

1.3.1. A bél ischaemiás-reperfúziós károsodásában résztvevő mediátorok

Xantin oxidáz és oxigén tartalmú szabadgyökök

A xantin oxidáz (XO) egy nagyon sokoldalú enzim, amely fontos szerepet tölt be a purin nukleotidok katabolizmusában. Emlősökben a xantin dehidrogenáz (XDH) XO-zá reverzibilis és irreverzibilis módon is átalakulhat.[22] Az ischaemiás periódus alatt a sejtek ATP készlete felhasználódik és hipoxantin halmozódik fel. Emellett a hypoxia triggerként hat a XDH szabadgyök termelő XO-zá való alakulásában.[105] Az ATP hiány az ATP dependens ioncsatornák regulációjának zavarát okozza, a sejt-membránon keresztüli passzív ionáramlást eredményezve. K^+ és Mg^{2+} áramlik ki a sejtekből, Na^+ , Ca^{2+} és víz beáramlással egyidejűleg, ami a sejtek duzzadásához vezet. A megnövekedett intracelluláris Ca^{2+} -szint egyik fontos következménye egy calcium-dependens proteáz aktiválódása, amely a XDH-t XO-zá hasítja. A reperfúzió alatt a molekuláris oxigén újból bejut a sejtekbe, ahol a hipoxantinnal és a XO-zal reakcióba lépve óriási mértékű szabadgyök termeléshez vezet, például szuperoxid anion (O^{2-}), hidrogén peroxid (H_2O_2) keletkezik.[106] (6.ábra)

Fiziológiás körülmények között a szuperoxid anion károsító hatásait a szuperoxid dizmutáz (SOD) kivédi, mivel a O^{2-} -t, H_2O_2 -dá alakítja.[107] Az IR károsodás során azonban ezek a természetes védelmi mechanizmusok csődöt mondanak. A O^{2-} önmagában egy relatíve alacsony energiájú szabadgyök, de ez a molekula a felelős a rendkívül reakcióképes hidroxilgyök ($OH\cdot$) képződéséért. A $OH\cdot$ a sejtmembrán foszfolipidjeinek zsírsav oldalláncát megtámadva lipid peroxidáción keresztül jelentős károsodást okoz, mely a sejtorganelumok, illetve az egész sejt degenerációját eredményezheti.[108,109]



6. ábra A xantin-oxidáz által termelt szabadgyökök kialakulásának lépései.
 Forrás: Pacher P et al, Pharmacol Rev, 2006. [106]

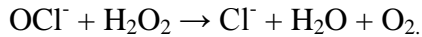
Endothelinek

Az endothelinek (ET) vascularis endothel eredetű, peptid szerkezetű, potens vazokonstriktorok.[110] A három aktív isoforma (ET-1, ET-2 és ET-3) közül az ET-1 a ma ismert legerősebb endogén vazokonstriktor anyag.[111,112] Kísérletesen az ET-receptor antagonisták számottevő védelmet biztosítanak a bél ischaemiás-reperfúziós károsodása ellen.[113,114] Hatásukra csökken a mucosalis laesiók kiterjedése, nő a vérátáramlás és a mucosalis ATP-szint, valamint a csökken a leukocytá-adhézió.[115-117]

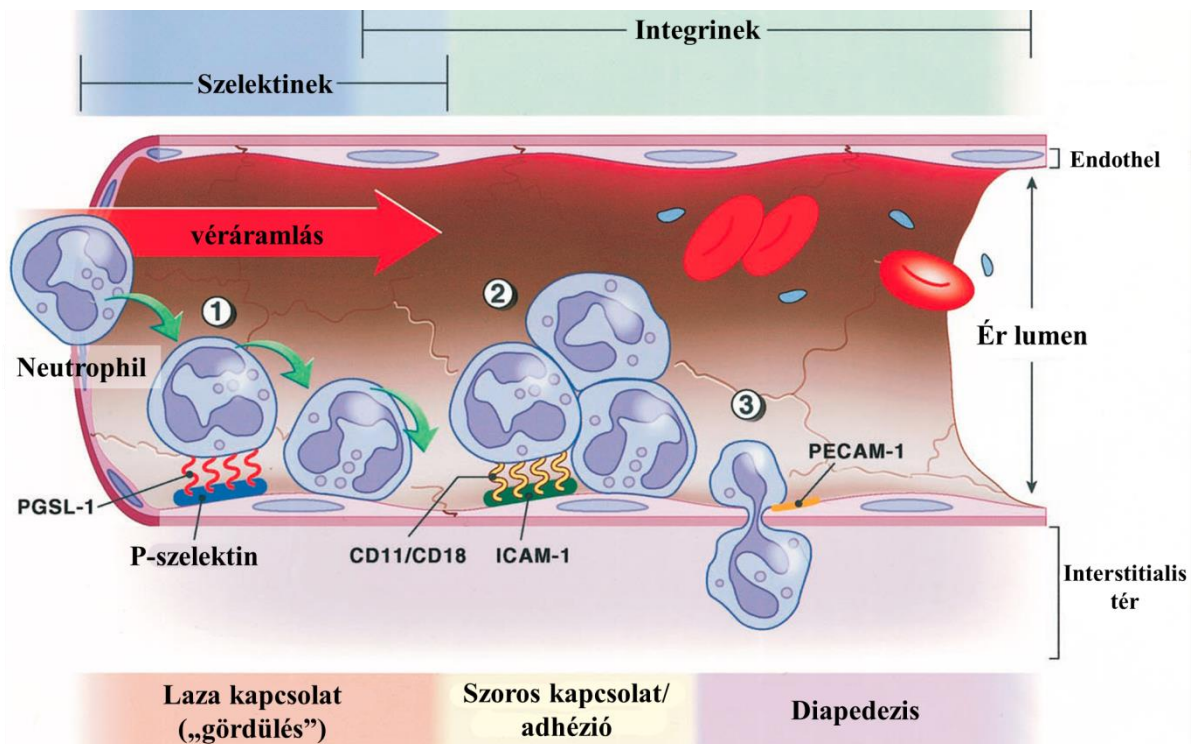
Polymorfonuklearis neutrophilek (PMN)

A PMN-ek jelentős szerepe az ischaemiás-reperfúziós károsodás patomechanizmusában széles körben elfogadott.[23,24,118] Egy vékonybél-transzplantációs modellben kimutatták, hogy az átültetett bélben az IR károsodás manifesztációjáért elsősorban a submucosus venulákban lezajló leukocytá-endothelium interakció volt felelős.[119] A PMN által kiváltott hatások és a belőlük felszabaduló mediátorok, illetve enzimek a gyulladási reakció szerves részét képezik. A leukocytákat számos chemotacticus anyag vonzza a károsodás területére. Közülük a sejtes eredetű LT-B4, PAF, IL-1, TNF- α és IL-8, valamint különböző sejtvonalak növekedési faktorai, illetve a plazma eredetű komplement kaskád elemei (C3a, C4a és C5a) emelendők ki.

Az említett vegyületek hatására az aktivált neutrophilek szuperoxidot és hidrogénperoxidot termelnek, illetve myeloperoxidázt szekretálnak:



Az endothelsejt-adhéziót több lépéses folyamat teszi lehetővé: az L-selectin hatására a neutrophilek megtapadnak, majd a sejtadhéziós β 2-integrin receptorai upregulálódnak és lassan gördülnek („rolling”) az érfalon. A β 2-integrin ligandja az endothelialis ICAM-1 (intercelluláris adhéziós molekula-1), mely molekulák kapcsolódásával a neutrophilek kitapadnak és a szövetbe migrálnak.[95,120,121](7.ábra)



7. ábra A neutrophil granulocyták kitapadása és szöveti migrációja 1. endothelialis selectinek upregulációja és kapcsolódása a leukocyták felszínén található oligoszacharidokkal; 2. integrinek aktivációja és endothelialis receptorukhoz (ICAM-1) való kötődése; 3. kilépés az érpályából.

Forrás: Collard CD et al, Anesthesiology, 2001. [121]

Az ICAM-1 emelkedett expresszióját epithelialis és endothelialis citokinek (TNF- α , IL-1) indukálják, melyek termelődése IR során fokozódik.[120,122] A folyamat eredménye: leukostasis és „fehérvérsejt-dugók” kialakulása, mely akadályozza a mikrokeringést. A kitapadó fehérvérsejtek komoly áramlási akadályt képeznek a kapillárisokban, mely hozzájárul a reperfüzió utáni mikrokeringési elégtelenség, a no-reflow jelenség kialakulásához.[123,124]

Complement rendszer

Számos állatkísérlet és humán vizsgálat foglalkozik a complement rendszer vékonybél IR károsodásban betöltött szerepével.[125-130] A P-selectinről kimutatták, hogy az intestinalis nyálkahártyán complement (C5b-9) lerakódást okoz, és ezen keresztül vesz részt az IR károsodás mediálásában.[131,132]

A complement kaszkád aktiválódása potens gyulladáshoz vezető események sorozatához vezet. Fokozódik többek között az ICAM-1, a TNF- α és az IL-1 gén expressziója, valamint további gyulladáshoz vezető citokinek is upregulálódnak.[125] Továbbá kimutatták, hogy a complement rendszer mediálja az intestinalis iNOS enzim upregulációját és csökkenti a mitochondriális SOD szintjét, valamint a Cu/Zn SOD aktivitását.[133]

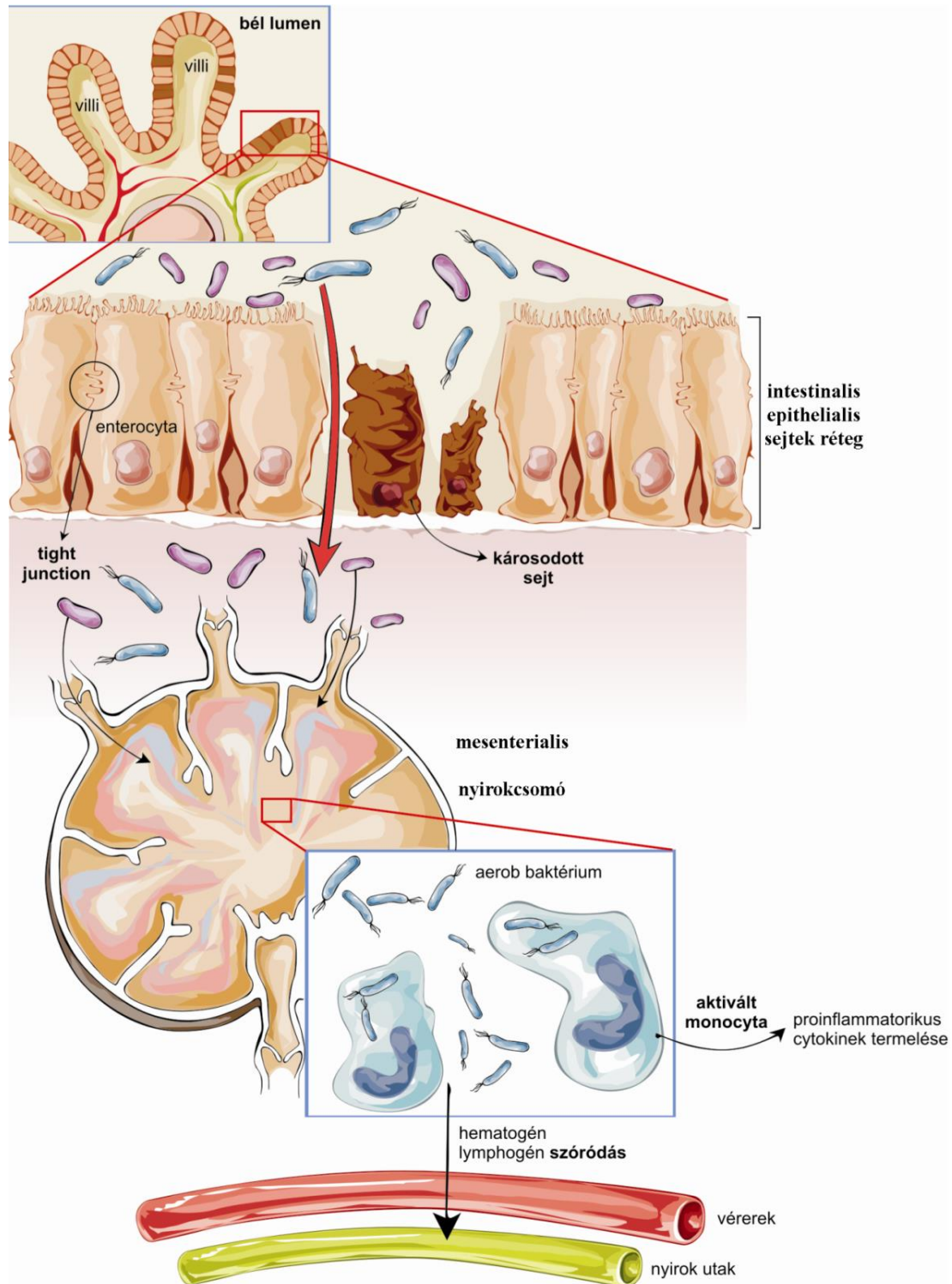
1.3.2. Bakteriális transzlokáció

A gastrointestinalis traktus a tápanyagok felszívódásán túl alapvető szerepet játszik az endokrin, az anyagcsere és az immunológiai homeosztázis biztosításában. Továbbá a bélnyálkahártya jelenti az egyetlen határt az intraluminális patogének és a szervezet „belső” steril miliője között. A barrierfunkció háromszintű fenntartásához nagyban hozzájárul a normál flóra („ökológiai” barrier), az epithelréteg integritása (mechanikai barrier) és a szekretoros IgA, illetve bélhez kapcsolódó limfoid szövet (GALT, mint immunbarrier).[134,135]

Mesenterialis ischaemia-reperfúzió során a bélnyálkahártya epithelsejtjei által alkotott barrier réteg sérül. Az epithelsejtek közti szoros kapcsolatot (tight junction) felépítő fehérjék (claudinok, zonula occludens) [128,136-138] expressziója és lokalizációja változik, ami fokozott bélpermeabilitást eredményez. A csökkent bélbarrier funkciót a lokálisan felszabadult nagy mennyiségű gyulladáshoz vezető citokinek (IL-1 β , IL-6, TNF- α) tovább rontják.[128,139] Az intestinalis flórát körülhatároló, unicelluláris epithelsejtréteg károsodása esetén baktériumok kerülhetnek a véráramba, amelyek később súlyos szepszishez és sokszervi elégtelenséghez vezethetnek.[140-144] A klasszikus definíció szerint bakteriális transzlokációnak nevezzük az életképes baktériumok bélnyálkahártya-barrieren való átjutását akár a mucosába, akár egyéb, extraintestinalis szövetekbe. A megfigyelés, miszerint a bélfalban olyan gyulladáshoz vezető vagy toxikus vegyületek képződnek, amelyek képesek a baktériumokhoz hasonló szisztémás gyulladáshoz vezető választ kiváltani, szélesítette a bakteriális transzlokáció definícióját. Az újabb felfogás szerint bakteriális transzlokáció az életképes vagy élettelen baktériumok, illetve azok alkotóelemeinek (LPS) vagy toxikus termékeinek epithelsejtrétegen történő átjutása.[145,146] (8. ábra)

A mai napig nem tisztázott a baktériumok szóródásának útja. Abban megegyezik az irodalom álláspontja, hogy első lépésben a mesenterialis nyirokcsomók kolonizációja történik meg. Egyes szerzők főként haematogen szóródásról beszélnek,[142,147] míg mások a lymphaticus rendszeren keresztül történő terjedést tartják elsődlegesnek.[143] Bár a bakteriális transzlokáció patogenezisének lépéseit illetően eltérő hipotézisek merültek fel, az ezt követő események sorozata jól körülhatárolható klinikai kórlefolyást követ. A mucosa kolonizációja kezdetben a nyálkahártya helyi gyulladáshoz vezet, amely limitált, lokális immunválaszt eredményez a bélhez kapcsolódó lymphoid szövet immunsejtjei révén. A lokális folyamat progressziója, valamint a baktériumok (akár haematogen, akár lymphogen) disszeminációja ugyanakkor intenzív stimulust jelent az

immunrendszer számára, amely a szervezet gyulladásos egyensúlyának eltolódásához vezet. Az így fellépő szisztémás gyulladásos válasz szindróma, a potenciálisan párosuló bacteriaemiával (szepszis) egy túlzott proinflammatorikus reakciót idéz elő, amely hosszú fennállása esetén a többszervi működészavar (MODS – multiple organ dysfunction syndrome), illetve többszervi elégtelenség (MOF – multiple organ failure) állapotához vezethet.



8. ábra Bakteriális transzlokáció patogenezeise. Forrás: Rosero O és mtsai., Orv Hetil, 2014. [74]

1.3.3. Toll-like receptorok szerepe mesenterialis ischaemia kapcsán

Az IR károsodás patofiziológiájában fontos szerepet játszó toll-like receptorok (TLR) a veleszületett immunitás részét képező, transzmembrán fehérjék. Feladatuk a sztereotíp, mikrobiális antigénmintázatok – azaz Pathogen Associated Molecular Pattern (PAMP) - szelektív felismerése.[148] Egyes, evolúciósan konzervált mikrobiális, valamint újabban felismert endogén ligandjaik szelektív megkötését követően aktív állapotba kerülnek. Ezzel olyan jelátviteli utakat indítanak el, amelyek eredményeképpen aktivált transzkripciós faktorok kapcsolódnak a sejt DNS-éhez, befolyásolva a célgének transzkripcióját. Az érintett gének expressziójának változása proinflammatorikus hatású fehérjék fokozott termeléséhez vezet, amely a szövet/szervezet gyulladással egyensúlyának eltolódását okozza.[149]

A TLR-ek különböző immunsejtek mellett sok más sejttípus felszínén is kimutathatók.[148,150] Megtalálhatók neutrophil granulocyták [151], makrofágok [152], dendritikus sejtek [153], B-limfocyták [154], membránjában; ugyanakkor epithelialis sejtek [155], fibroblastok [156], keratinocyták [157], sima-[158] és vázizmok [159], valamint bizonyos neuronok[160] is expresszálnak TLR-okat felszínükön.

Jelen ismereteink szerint az összesen 11 humán-, valamint 13 féle egér TLR-receptor specifikus ligandjaik alapján három csoportba sorolhatók.[161,162] (1.táblázat)

TLR-1 + TLR-2	triacilált lipopeptidek	LIPID
TLR-4	lipopoliszacharid	
TLR-6 + TLR2	diacilált lipopeptidek, gomba eredetű zymosan mycoplasma lipopeptid, lipoteicholsav	FEHÉRJE
TLR-5	baktériumok csilló alkotó fehérje (flagellin)	
TLR-11	"profilin-szerű" fehérje	NUKLEINSAV
TLR-3	kettős szálú virális eredetű DNS	
TLR-7	egyszálú virális RNS	
TLR-8	egyszálú virális RNS	
TLR-9	nem-metilált CpG DNS	

1. táblázat A humán toll-like receptor altípusai és exogén ligandjai. Forrás: Athina S, Front. Immunol, 2013. [162]

Újabb kutatások során felfedezték azonban, hogy a TLR-ek jól ismert exogén ligandjain kívül specifikus endogén vegyületek is rendelkeznek agonista hatással, ezeket DAMP-ként (damage-associated molecular patterns vagyis veszély-asszociált molekuláris mintázatok) ismeri az irodalom.[163] Ezek között szerepel a kis molekulású hialuronsav, mely az extracelluláris mátrix (ECM) fontos alkotóelemeként szereplő hialuronsavból hasad le UV fény-, illetve hialuronidáz enzimaktivitás hatására. Továbbá a fibrinogén, fibronectin, heparán-szulfát, HMGB-1, valamint egyes hő sokkfehérjék (HSP) is képesek a TLR-ek, legfőképpen a TLR-4 receptor aktiválására. (2.táblázat)

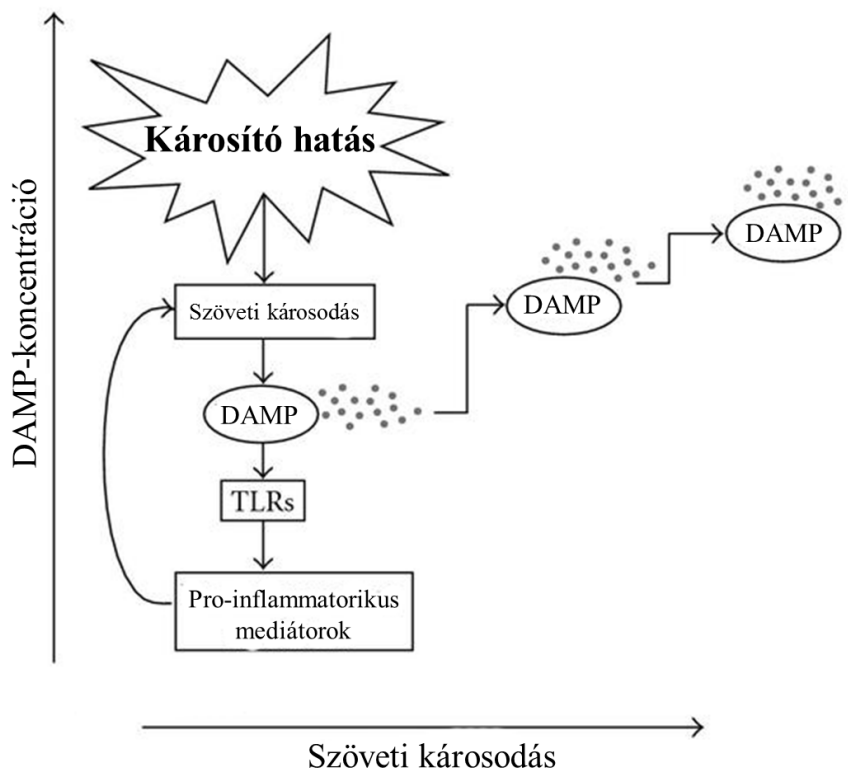
TLR-2	Hősokkfehérje-60/-70 [164,165], HMGB-1 [166], Endoplasmin[167], Hyaluronsav[168]
TLR-3	Saját RNS[169]
TLR-4	Hősokkfehérje-22/-60/-70/-72 [164,165,170,171], HMGB-1 [172], Endoplasmin [167], Fribrinogén [173], Heparán-szulfát [174], Fibronectin [175], Hyaluronsav [176], Felületaktív fehérje-A[177]
TLR-7/-8	Saját RNS[178]
TLR-9	Saját DNS[178]

2. táblázat A humán toll-like receptor altípusai és endogén ligandjai. Forrás: Yu L et al, J Cell Mol Med, 2010. [163]

Ez figyelemre méltó tény abból a szempontból, hogy szöveti sérülés, proteolízis, valamint IR károsodás során az ECM sérül, alkotói – így a hialuronsav, fibronectin, heparán-szulfát – hasadnak, illetve a szövetközi térbe kerülnek. Továbbá a sejtkárosító hatás – főként IR során – a HSP-k intracelluláris mennyiségét növeli, így a károsodott sejtekből a HSP-k szintén a szövetközi térbe juthatnak, mint a vérből származó fibrinogén és heparán-szulfát. Ezen folyamatok során az ECM-be kerülő említett vegyületek pedig a TLR-ok endogén ligandjaként funkcionálva képesek megindítani az ezeken keresztül zajló szignáltranszdukciót. A TLR-ról induló jelpályák eredménye az NF- κ B és AP-1 transzkripciós faktorok magi transzlokációja, aminek következtében megnő egyes proinflammatorikus hatású vegyületek – így például az IL-6, IL-1 és TNF- α – szintézise.[179-181] A mechanizmus eredményeképpen a sérült szövetekben steril, antitest-independens gyulladás, illetve a TLR-mediált szignáltranszdukció fokozódása jöhet létre mikrobiális fertőzöttség hiányában is.[161]

A különböző szervek IR károsodásának mértéke, valamint az adott szerv TLR-receptor expressziója szoros összefüggést mutat. A legtöbb szerv – úgy, mint, máj, agy, szív, vese – esetében pozitív korreláció igazolható az IR károsodás és a TLR-kifejeződés között.[161,182-184] Ennek lehetséges magyarázata, hogy az IR károsodás során, főként az ECM sérülése következtében, annak károsodott alkotói a TLR-receptorok endogén agonistáiként működve aktiválják a TLR-jelpályát.[185] A TLR-szignáltranszdukció eredményeként termelődő proinflammatorikus vegyületek, valamint immunfolyamatokban létrejövő változások a szerv gyulladásának fokozódását eredményezik. Így a TLR-jelpálya képes lehet erősíteni az IR során kialakuló kezdeti károsodást, ami mint egy *circulus vitiosus* további szervkárosodást hoz létre.[182,186] Meglepő azonban, hogy a bél esetében más a helyzet. A bélrendszerben egy állandó „steady state” TLR-expresszió van jelen, amit az irodalomban, mint „kontrollált” gyulladáshoz vezető állapotot említenek.[187-189] Ennek a – más szerveknél tapasztaltaktól eltérő – megfigyelésnek a hátterében a fiziológiás viszonyok különbözősége állhat. Míg az agy, a szív, a máj, valamint a vesék állományában fiziológiás körülmények között minimális a TLR-ek kifejeződése, addig a bél esetében ezen receptorok konstitutívan expresszálódnak. A béllumen kommenzális flórájának állandó TLR-aktiváló hatása

ugyanis nélkülözhetetlen szerepet játszik a szerv védelmében a külső károsító hatásokkal szemben.[188] Mesenterialis IR-t követően azonban felborul az egyensúly az intraluminális patogének és a lokális védekező rendszer között, ami fokozott TLR-expresszióban mutatkozik meg. A túlzott TLR-expresszió már nem a bélumenben lévő patogének elleni védekezést szolgálja, hanem egy gyulladós választ indukálva az előbb említett *circulus vitiosus* kialakulását eredményezheti.[190,191] (9.ábra)



9. ábra A károsító láncreakció patogenezise.

Az ártalmas inger (kórokozók, sérülés, hő, autoantigének) szöveti károsodást okoznak, ami DAMP molekulák felszabadulásához és a TLR szignál aktivációjához vezet. Ennek következtében a proinflammatorikus mediátorok koncentrációja emelkedik, ami további szöveti károsodást és DAMP molekulák fokozódó képződését eredményezi (DAMP: veszély-asszociált molekuláris mintázat). Forrás: Piccinini AM et al., Mediators Inflamm, 2010. [401]

1.3.4. Szisztémás szövődmények

Az ischaemiás-reperfúziós károsodásnak kitett bél mucosalis rétege számos citokin termelődési helyévé válik, melyek távoli szervek funkciójára és integritására is hatással vannak. A szabadgyökök robbanásszerű képződése, a PAF és leukotriének szintjének jelentős növekedése, az NF- κ B transzkripciós faktor magi transzlokációját és génexpresszióját eredményezi számos sejttípusban.[23,192,193] Ez egy sor proinflammatorikus citokin (IL-6, IL-1, TNF- α) és adhéziós fehérje (ICAM, VCAM, E-selectin, P-selectin) termeléséhez vezet.[194,195] A reperfúzió során visszatérő vérárammal ezen mediátorok szisztémás disszeminációja következik be az IR által károsított szervből való kimosódásuk miatt. Ennek következtében súlyos szisztémás

szövődmények léphetnek fel.[15] Az egyik ezek közül a szabadgyökök távoli szervi károsító hatása, mely a lokális hatások esetében tapasztaltakhoz hasonló mechanizmusokkal valósul meg. Így a disszeminált ROS-ok adduktképzésük révén DNS-mutációkat, lipidperoxidációt, enzimaktivitás módosítást, valamint strukturális membránkárosodásokat hozhatnak létre a távoli szervek szöveteiben is.[196,197] Ennél sokkal fontosabb a lokálisan termelt citokinek és a PAF szisztémás hatása, ugyanis a keringésben való fokozott megjelenésükkel az immunrendszer szuprafiziológiás stimulusához vezetnek.[198-200] Az immunrendszer túlzott aktivációja a szisztémás gyulladással járó válaszi szindróma (SIRS) megjelenésével a gyulladással egyensúly jelentős eltolódását eredményezi. A SIRS egy súlyos állapot, mely az IR sérülés következtében károsodott bélrendszeri epithelialis barrier elégtelensége folytán fellépő bakteriális transzlokációval párosulva szepszisbe progrediálhat.[147] A SIRS akár önmagában, akár az említett endogén infekció következtében szepszisként, prolongált fennállásával többszervi elégtelenséghez (MODS/MOFS) vezethet.[201]

A MOFS egy magas mortalitású (40-100%), rendkívül súlyos és nehezen visszafordítható állapot, melyet többlépcsős, progresszív lefolyása során a különböző szervrendszerek egymást követő elégtelensége jellemez. [15,202] Lefolyása során általában a tüdő károsodása lép fel elsőként, ami akut respirációs distressz szindrómához (ARDS) és akut légzési elégtelenséghez vezet. Ezt követi az akut tubuláris necrosissal járó veseelégtelenség, majd a májelégtelenség. Mindez az elektrolit-háztartás és a metabolikus egyensúly megbillenését okozza. Az utolsó lépésben, mintegy az előző hatások következményeként fellépő myocardialis elégtelenség cardiogen shockhoz vezethet.[15,203] Ettől némileg eltér a „korai MOF” lefolyása, amely esetében az elsődleges trauma olyan drasztikus mértékű inzultus a szervezet számára, hogy a fellépő többszervi elégtelenség sokkal fulminánsabb kórlefoyást mutat. Ebben az esetben a különböző stádiumok összemosódhatnak, egyszerre-, vagy fordított sorrendben jelentkezhettek és a myocardialis elégtelenség sokkal hamarabb következik be.[15,203,204]

A MOFS patogenezisét az úgy nevezett „két csapás modell” („two-hit hypothesis of MOF”) jellemzi. Ez megkülönbözteti az eredeti inzultust, amely lehet trauma, shock, de akár dialysis is. Etiológiától függetlenül, a különböző kiváltó okok hatására egy megnövekedett perctérfogat iránti igény jelentkezik keringési centralizáció mellett, melynek következtében aktiválódik a szimpatikus idegrendszer és a renin-angiotenzin-aldoszteron tengely.[205] Így a keringésregulációs szempontból vett „rezervoár” szerepű gyomor-bél rendszeri területen egy potens vazokonstrikció lép fel, amely mesenterialis ischaemiahoz-, majd a beteg stabilizálódásával egyidejűleg mesenterialis IR-hoz vezet.[205-207] Ennek keretében, a már ismertetett mechanizmusokon keresztül hatalmas mennyiségű szabadgyök-, citokin és más proinflammatorikus mediátor szintetizálódik lokálisan a bélben, majd kerül a szisztémás keringésbe a reperfüziót követően. Tömeges disszeminációjuk következtében túlzottan aktiválják, mintegy érzékenyítik („priming”) az immunrendszert és a különböző fehérvérsejteket, melynek

eredményeként kialakul a SIRS. [199,200,208-211] A teljes test gyulladáshoz vezető szindróma állapotában az immunrendszer a szervezetet érő újabb inzultusra (infekció, újabb trauma), egy túlzott intenzitású immunválasszal reagál, melynek következménye a MOFS kialakulása.[15] A MOFS kifejlődéséhez nem feltétlenül szükséges egy hagyományos értelemben vett második inzultus; a SIRS- vagy szepszis tartós fennállása önállóan is „második csapás”-ként tud funkcionálni.[15,212] Másrésztől nem kizárólag a keringési centralizációhoz vezető kezdeti inzultusok okozhatnak MOFS-ot; hiszen a mesenterialis IR-t eredményezheti mesenterialis ércclusió is, amely így felfogható a kórlefoyas „első csapása”-ként.[213-215]

Intenzív kutatások tárgyát képezik az immunrendszer érzékenyítés (priming) molekuláris háttérben álló mechanizmusok. A legfontosabb szerepet két molekulának, a PAF és az IL-6-nak tulajdonítják.[15,216,217] A mesenterialis IR során nagy mennyiségben szintetizálódó szabadgyökök serkentik a PAF előállítását és IL-6 expresszióját.[218-221] Hatásukat tekintve mindkét molekula elősegíti az endothelsejtek és neutrophil granulocyták különböző adhéziós fehérjéinek kifejezését, ezáltal a két sejt interakcióját és a neutrophilek kitapadását.[222,223] Emellett a PAF hatásosan aktiválja a fehérvérsejteket, amit az IL-6 szignifikánsan potenciál.[224] Így a PAF és az IL-6 feltehetően egymással szinergizálva képesek kialakítani az immunrendszer túlérzékenyítésével (priming) és az aktivált, extravazált neutrophilek fokozott szövetkárosító hatásával járó SIRS-t.[225,226] A molekuláris háttér és az immunológiai vonatkozások minden részlete azonban maradéktalanul még nem ismert, így további vizsgálatok szükségesek ezek felderítésére.

1.4. Postcondicionálás

A vékonybéliszövet esetén kevés irodalmi adat áll rendelkezésünkre a postcondicionálás (PC) hatásmechanizmusát illetően. Ismereteink javarészt a myocardium postcondicionálás során nyert információkon alapulnak, ezért az alábbi fejezet jellemzően a szíven végzett vizsgálatokat foglalja össze.

1.4.1. Definíció – Történet

A postcondicionálás alatt a szöveti véráramlás ismételt, rövid, több ciklusban végzett megszakítását értjük a reperfüzió kezdetén. Ezen ismételt ischaemiás-reperfüziós epizódokat követően jön létre a szerv szabad reperfüziója.

A reperfüzió viszonyainak változtatásával manipuláló, kezdetben cardioprotectio céljából alkalmazott sebésztechnikai manőverek közül az első módszer a fokozatos reperfüzió volt. 1986-ban Okamoto és mtsai számoltak be arról, hogy ezen eljárással csökkenteni lehet a postischaemiás szívműködés mértékét.[227] 1989-ben Peng és mtsai a kontrollált reperfüzió sikeres alkalmazásáról publikálták az első beszámolót,[228] de az ígéretes kísérletes eredmények ellenére, a klinikai gyakorlatban ez a módszer nem váltotta be a hozzá fűzött reményeket.[229]

A postcondicionálás koncepcióját először Vinten-Johansen fogalmazta meg a Hatter Institute Cardioprotection témában tartott III. nemzetközi konferencián, 2002. A témában született első közleményeket, melyekben a postcondicionálást az ischaemiás preconditionálás jól bevált cardioprotectiv hatásával hasonlították össze, ugyanez a munkacsoport publikálta.[230,231] Kísérletükben kutyák bal arteria coronariájának elülső leszálló ágán (LAD: left anterior descencing coronary artery) létrehozott 1 órás kirekesztését 3 órás reperfúzió követte, az egyik csoportban hirtelen felengedéssel, a másik csoportban pedig postcondicionálással. Az alkalmazott postcondicionálási algoritmus 30 másodperces reperfúziós epizódokból és 30 másodperces reocclusiókból állt, 3 ciklusban ismételve, tehát 3 perc össz-időtartamban. Egy harmadik csoport preconditionálásban részesült, ahol az 1 órás kirekesztést egy ciklusban 5 perces LAD-lekötés, ill. 10 perces reperfúzió előzött meg. A várakozásnak megfelelően, az ischaemiás preconditionálás kb. 40%-kal csökkentette az infarctus méretét a kontroll csoporthoz képest. A kísérlet áttörő eredménye az volt, hogy a postcondicionálás ezzel összehasonlítható mértékben volt képes csökkenteni a plazma kreatin-kináz aktivitásával jellemzett infarctus méretét. A protektív hatást függetlennek találták a kollaterális véráramlás mértékétől, mely hasonló volt a három csoportban. A szöveti mieloperoxidáz (MPO) mérésen alapuló neutrophil granulocytáknak az ischaemiának kitett területen mind a preconditionált, mind a postcondicionált csoportban szignifikánsan csökkent a kezeletlen csoporthoz viszonyítva. Ezzel a technikával a szöveti neutrophil-akkumuláció pontosan meghatározható ugyan, de nem ad információt ezen belül a granulocyták pontos lokalizációjáról. Az sem derül ki ebből a megfigyelésből, hogy postcondicionálás neutrophil-aktivációt csökkentő hatás következtében mérsékl-e a szöveti károsodást (neutrophil granulocytáknak eredeti oxidánsok ill. citokinek által), vagy a kisebb leukocytáknak az egyenesen az infarctusméret csökkenésének a következménye.

Zhao és munkatársai beszámoltak továbbá arról is, hogy a postcondicionálás, a preconditionáláshoz hasonlóan jótékony hatással van a koszorúerek endothelfunkciójára (endothelium-dependens faktorok hatására NO-szintézis működése fokozódik, ezáltal vazorelaxáció jön létre).[230] A pre- és postcondicionálás egyaránt csökkenti a P-selectin expressziót a koszorúerek vasculáris endothelsejtjeinek felszínén, mely indikátora a proinflammatorikus reakció enyhülésének. Ezen felül a közvetlenül reperfundált csoporttal összehasonlítva, a szuperoxid-gyökök képződését és ezzel együtt az oxidatív stresszt is kisebbnek találták a postcondicionált csoportban. A vasculáris endothelium aktivációjának és dysfúnciójának csökkenésével arányosan csökkent a szöveti oedema mértéke mind a pre- mind a postcondicionált állatokban.

További érdekes felfedezés, hogy a postcondicionálás a reperfúziós arrythmiák előfordulását is képes volt csökkenteni.[232] Ezen első tanulmányok potenciális cardioprotectiv mechanizmusokat vázolnak fel, melyek a postcondicionálás utáni csökkent oxidatív stressznek tudhatók be. Ennek pontos sejtszintű mechanizmusa egyelőre csak részben tisztázott.

Feltételezhető ugyanakkor, hogy más mechanizmusok is állnak a postcondicionálás cardioprotectiv hatásának hátterében, mivel izolált, perfundált szívben,[233] ill. neutrophil-mentes sejtkultúrákban is megjelenik.[234] Ezen neutrophil-mentes rendszerekben szerzett tapasztalatok alátámasztják, hogy gyulladásosejt-dependens, ill. -independens folyamatok párhuzamos aktivációjával állunk szemben.

1.4.2. Időfaktor

Egyik igen fontos és sokat vizsgált kérdés, hogy milyen időintervallumon belül alkalmazva képes a postcondicionálás (cardio-)protectiv hatását kifejteni. Kísérletes eredmények arra utalnak, hogy a reperfüzió első pillanatai kritikusak ebből a szempontból. In vivo patkány modellben, ahol 30 perces bal elülső leszálló (LAD) koszorúér lefogatást 3 órás reperfüzió követett, 3 ill. 6 ciklusú 10 másodperces reperfüziós/reocclusiós postcondicionálás (1 ill. 2 perces teljes intervenció idő) csökkentette az infarctus méretét. Viszont az 1 perccel a reperfüzió kezdete után- tehát kis késlekedéssel- megkezdett postcondicionálás már nem eredményez infarctus-csökkenést.[235] Ezt a megfigyelést támasztja alá az is, hogy késve elkezdett postcondicionálás esetén nagyobb szabadgyök- ill. malondialdehid-szint mérhető. Ugyanakkor a neutrophil granulocyták akkumuláció csökkenésére nincsen hatással a beavatkozás késése, ami vitatja a granulocyták oki szerepét a postcondicionálás cardioprotectiv hatásában.[236]

Ezen eredmények alapján a reperfüzió első néhány perce döntő a myocardialis reperfüziós károsodás patogenezisében. A fent idézett tanulmányok alátámasztják azon koncepciót is, hogy a reperfüzió kezdeti, rövid, ámde annál kritikusabb időszakára irányuló intervenciók eredményesen enyhíthetik a károsodást, mely a reperfüzió későbbi szakaszában manifesztálódik.

1.4.3. Algoritmus

A postcondicionálási algoritmus időbeli jellemzői közül további két fontos szempontot kell figyelembe venni: a ciklusok számát és a reocclusiós ill. reperfüziós szakaszok hosszát.

Úgy tűnik, a ciklusok számának jelentősége kisebb, mint a beavatkozás azonnali megkezdése. Kin és munkatársai beszámoltak arról, hogy patkányokban 3 ciklus ugyanolyan hatást ért el az infarctus-méretének csökkentésében, mint 6 ciklus alkalmazása.[237] Ennél fontosabb a cardio- és vasculoprotectiv hatás szempontjából a ciklusok időtartama. A 30 + 30 másodperces algoritmus hatékonyabbnak bizonyult kutyákban ill. nyulakban.[231,236,238] Cohen és munkacsoportja viszont szignifikánsan nagyobb védelmet észlelt rövidebb (10 + 10 másodperces) ciklusokkal izolált nyúl szívben.[239] Egy 1996-os tanulmányban, ahol in vivo nyúl modell alkalmazásával arra a kérdésre keresték a választ, hogy koszorúér-occlusiót követően az ismételt occlusiók hogyan befolyásolják az infarctus méretét, nem találtak szignifikáns

csökkenést.[240] Ebben a kísérletben a reperfúziós ciklusok hossza 1 perc volt. Valószínűleg ez az 1 perces reperfúzió suboptimális volt a nyúl számára a 10, vagy 30 másodperchez képest. Patkány esetében a 30 másodperces technika cardioprotectio szempontjából inefektívnek tűnik, csak a 10 ill. 15 másodperces képes csökkenteni az infarctus méretét.[241] In vivo sertés modellben szintén inefektív a 30 másodperces algoritmus, de nem ismert, hogy az ennél rövidebb vagy hosszabb ciklus lenne-e hatásos.[242] Az előbbieket alapján úgy tűnik, hogy a kisebb állatok esetében (és így gyorsabb keringésdinamika) rövidebb ciklushossz, míg nagyobb testű állatok és az ember esetén hosszabb ciklushossz az eredményesebb. Ennek hátterében a szív méretével fordítottan arányos myocardialis metabolikus ráta állhat, de a komplex hatásmechanizmusban valószínűleg további faji különbségek is szerepet játszhatnak (például eltérő szignál transzdukció, a triggerek, mediátorok különböző időbeli viszonyai és a kollaterális hálózat faji különbségei [243,244]). A szívizom metabolikus rátája (melyet a szívfrekvencia, vérnyomás, és falfeszülés befolyásol) meghatározója az infarctus kiterjedésének, és feltehetően a reperfúzió alatt felszabaduló humorális faktorok, hormonok, citokinek és szabadgyökök mennyiségének is, ezért kiemelt jelentőséggel bírhat.[245]

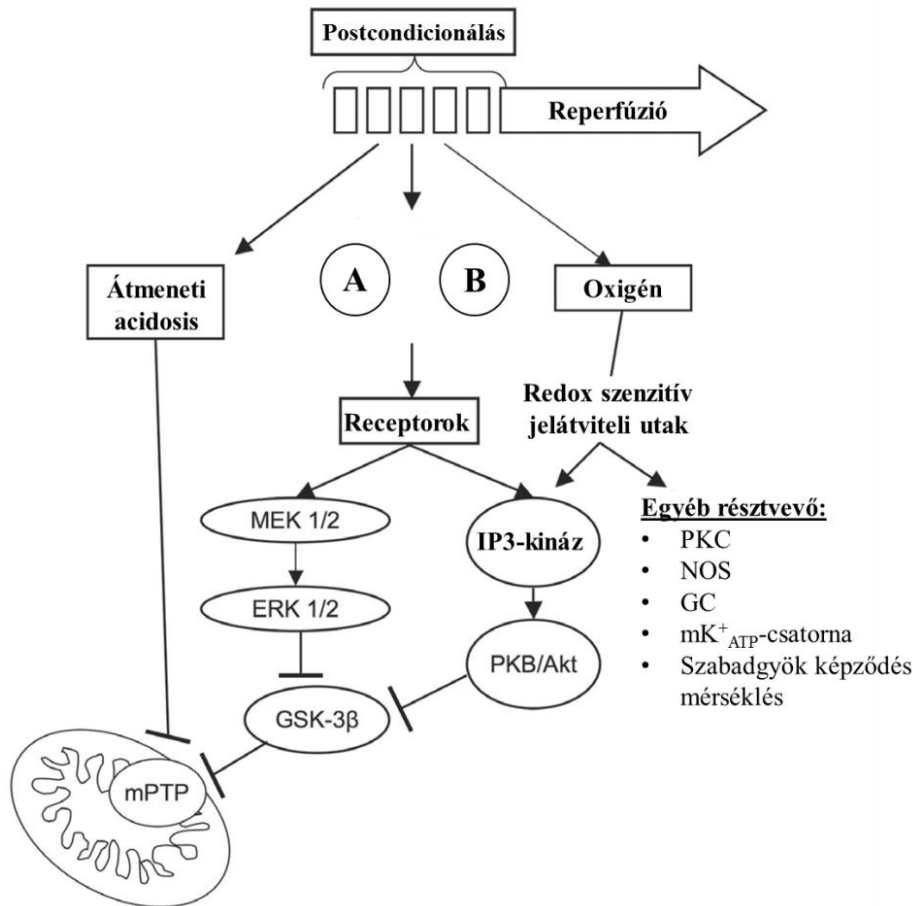
1.4.4. Mediátorok, triggerek és jelátviteli utak

1.4.4.1. Adenozin

Az alapbetegség okozta „index”-ischaemiát követően alkalmazott addicionális reocclusiók, melyek részei a postcondicionálásnak, megváltoztathatják bizonyos parakrin mediátorok (pl. adenozin, egyéb purin intermedierek, bradykinin, opioid peptidek) felszabadulását, vagy a reperfúzió megszakítása miatt késleltethetik ezen endogén vegyületek kimosódását.[237,246] (10.ábra)

Az ischaemia alatt az ATP bomlásából jelentős mennyiségű adenozin képződik, melynek multifaktoriális hatást tulajdonítanak. Bár ezek részletei egyelőre nem pontosan ismertek, úgy tűnik, hogy szerepet játszhat a post-condicionálás protektív hatásának kialakulásában is. Erre utal az is, hogy mind az adenozin receptorok nem szelektív gátlószere, a 8-szulfenil-teofillin, mind az A_{2A}-receptor altípus anta-gonista ZM241385 korlátozza az infarctus csökkenését, azaz gátolja a postcondicionálás cardioprotectiv hatását. Philip és mtsai. arról számoltak be, hogy az adenozin cardioprotectiv hatása valószínűleg az A_{2A}- és az A₃-receptorokhoz kötött, és nincs köze az A₁ receptor altípushoz.[237,238,247]

Az adenozinreceptorokon keresztül a későbbiekben részletezendő protektív kináz-útvonalak (Akt, extracellular signal-regulated kinase) aktiválódhatnak, melyek a további folyamatokat mediálják.[248] Az endogén adenozin csökkenti a reaktív oxigén gyökök és citokinek felszabadulását is az aktivált koszorúér endotheliumból és a myocytákból.



10. ábra Postcondicionálás intracellularis jelátviteli utak.

A: adenosin, B: bradykinin, PKC: protein kináz-C, NOS: nitrogen monoxid szintáz, GC: guanilil-cikláz, mPTP: mitochondrial permeability transition pore.

Forrás: van Vuuren D., Cardiovasc J Afr, 2008. [246]

Ezen hatásához járul hozzá a neutrophil granulocytá aktiváció- és adhézió-gátlás. Az előbbieket mellett az adenosin vazodilatátor hatása révén is fontos szerepet játszik az IR károsodások kivédésében.[232,234,249]

Ezen adatokat összegezve, az endogén adenosin magasabb koncentrációja a cardioprotectio triggerként hathat. PC során az endogén adenosin kimosódása késleltetett, így lokális koncentrációja hosszabb ideig marad magas, és eredményesebben tudja kifejteni jótékony hatását.

1.4.4.2. Nitrogén-monoxid

Ismert, hogy a NO szerepet játszik a gyulladási válaszreakció gátlásában és az ischaemia-reperfúzióra adott molekuláris válaszban.[245] Kisállat-kísérletben figyelték meg, hogy a nitrogén-monoxid-szintáz enzim endothelialis (eNOS) szintje már 7 perccel a PC-al kombinált reperfúzió kezdete után megemelkedik. Az enzim L-NAME-mel (N-nitro-L-arginin-metil-észter), ill. a guanil-cikláz ODQ-val (1H-(1,2,4)-oxadiazolo-(4,3-a) quinoxaline-1) történő gátlása pedig képes blokkolni a PC kedvező hatásának kifejlődését.[250]

Fiziológias körülmények között a NO a vascularis endothelium sejtjeiből szabadul fel az eNOS aktivitásának köszönhetően. A felszabadulás mértéke az IR károsodás következtében csökken.[251] Közvetlen bizonyíték nem áll rendelkezésre ugyan, de úgy tűnik, hogy a postcondicionálás hatására a bazális NO-termelés megtartott marad. Ezt bizonyítja közvetetten, hogy PC után csökken a felszíni P-selectinek expressziója és a neutrophil-adhézió, valamint fokozott acetilcholin érzékenység figyelhető meg.[252] Mindezen reakciók a magasabb bazális NO szintre adott fiziológias válasznak tekinthetők.

Az NO egyrészt feltételezhetően triggerként jelenik meg a PC hatásmechanizmusában, és ciklikus guanozin-monofoszfáton keresztül hoz létre cardioprotektívot. Másrésztől mediátor szerepet is betölt, mivel az endothelsejtekben és a cardiomyocytákban is expresszálandó eNOS enzim célpontja a PC során aktiválódó PI3-kináz-Akt és egyéb „reperfusion injury survival kinase” (lásd később) jelátviteli utaknak, tehát visszacsatoló funkciója is van.

1.4.4.3. K^+_{ATP} csatorna

Yang és munkacsoportja az adenosin-trifoszfát szenzitív K^+ csatorna (K^+_{ATP}) szerepét tanulmányozta a postcondicionálásban.[236] Ezen ioncsatorna nem szelektív inhibitora, az orális antidiabeticum glibenclamid (Gilemal®) megakadályozta a postcondicionálás infarctus-csökkentő hatását. Ennél is fontosabb megfigyelés, hogy ugyanezt a hatást a mitochondriális K^+_{ATP} csatornák szelektív gátlószere, az 5-hydroxydecanoate is létrehozza, ami a mitochondriumok – preconditionálásból is ismert – fontos szerepére utal. A sejtmembrán K^+_{ATP} csatornájának szerepe (parallel, vagy synergista) mindazonáltal még kérdéses. Az sem tisztázott még egyelőre, hogy ez a csatorna csak a reperfüzió első perceiben, vagy annak későbbi szakaszában is aktív-e.[245]

A mitochondriális K^+_{ATP} csatornák nyílásával egyrészt csökken a mitochondriális Ca^{2+} -többlet, így kevésbé sérül ezen sejtorganellumok integritása,[253] másrészt a csatorna feltételezhetően ezen sejtorganellumok alakját is megváltoztatja, ami az elektrontranszport javulását eredményezi.[254,255]

1.4.4.4. „Reperfusion injury survival kinases”

Jelentős számú vizsgálat irányul ezen kinázok, illetve a hozzájuk kapcsolódó komplex jelátviteli mechanizmusok tisztázására, szerepük megismerésére. Ebbe a csoportba soroljuk a PI3 kinázt, az Akt-t, a MEK-t (mitogen-aktivált protein), továbbá az ERK (extracellular signal regulated kinase)-1 és -2-t.[256]

Az irodalom nem egységes e tekintetben, de a legvalószínűbb, hogy a postcondicionálás cardioprotektív hatása a PI3 kináz – Akt, ún. „pro-survival” jelátviteli utak által mediált.[233,238]

A PI3 kináz antagonisták, a wortmannin (irreverzibilis) és a LY294002 (reverzibilis) csökkentik a myocardialis p-Akt szinteket (markere az enzim működésének), ill. megsemmisíti a postcondicionálás infarctus-csökkentő potenciálját.[233,257]

Ezen útvonal további tagjai még az eNOS illetve a p70s6K.[257] Az adenzin valószínűleg nem triggere a PI3 kináz útvonalnak, egyéb molekulák (pl. a bradykinin) viszont felelősek lehetnek ezen útvonal aktiválásáért.[258]

1.4.4.5. PKC ϵ

Már régóta ismert a PKC ϵ -izoformájának szerepe az intracelluláris Ca²⁺-koncentrációk regulálásában.^[259] Az enzim foszforilálja a Ca²⁺-érzékelő receptort, amely G-fehérjéhez kapcsoltn az IP₃ felszabadulást serkenti. A foszforilálás inaktíválja a receptort, így megszűnik a Ca²⁺ felszabadulását indukáló szignál. Emellett a phospholamban fehérje foszforilálásával aktiválja a SERCA-pumpát, így gyorsítva az intracelluláris Ca²⁺ visszavételét a sarcoplazmatikus reticulumba. A Ca²⁺ szint csökkentése megóvjja a sejteket a már említett Ca²⁺ által mediált károsodásoktól.

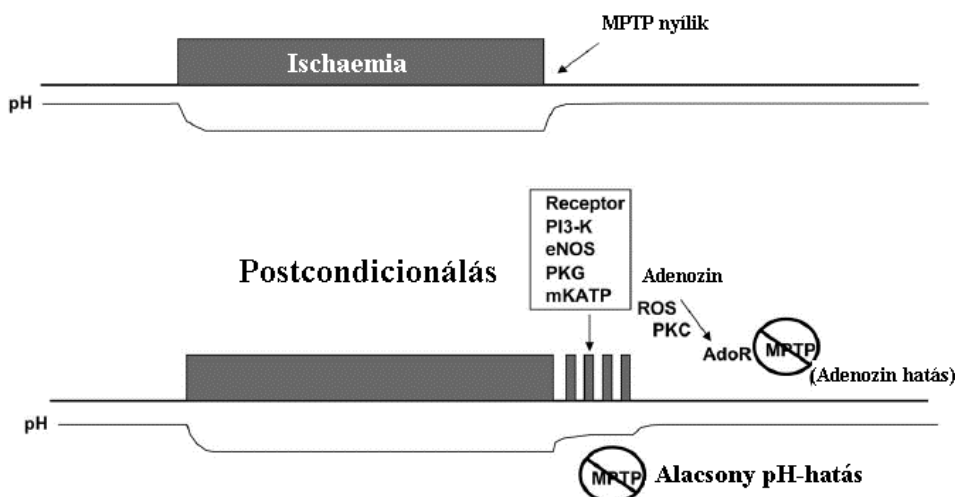
A PKC ϵ aktiválódik mind preconditionálás,[260] mind postcondicionálás[261] során, azonban ennek pontos mechanizmusát még nem ismert. A fent bemutatott hatása alapján, ez az enzim is hozzájárulhat a postcondicionálás védő hatásához a „reperfusion injury survival kinase”-ok mellett.

1.4.4.6. „Mitochondrial permeability transition pore” (mPTP)

A K⁺_{ATP} csatornák mellett a postcondicionálás másik valószínű effektora a mitochondrium óriási, non-szelektív csatornája. Ischaemia alatt a csatornák zárva vannak, majd a reperfüzió első perceiben megnyílnak. Pontosan ez az a rövid időablak a reperfüzió első perceiben, amelyben a postcondicionálással beavatkozhatunk a subcelluláris szintű biokémiai folyamatokba.

Az mPTP csatornák jelentőségét az adja, hogy nyitásuk az egyik kulcslépés minden, a sejt halálával végződő folyamatban, legyen szó akár necrosisról, akár apoptosiról. Egyrészt felborítják a sejt belső homeosztázisát, másrészt az egész mitochondrium károsodását okozzák, és ezáltal pro-apoptoticus faktorok (pl. citokróóm C), cytoplasmába kerüléséért felelősek.[262,263] Számos faktor képes nyitni a csatornákat, pontosabban növelni a csatornák nyitásának valószínűségét. Legfontosabb trigger a mitochondriális mátrix megnövekedett Ca²⁺-szintje, mely valószínűleg a csatorna mátrix felőli oldalához képes kötődni. Ugyancsak nyitási trigger a belső membrán normális membránpotenciáljának megingása (az angol irodalom ezt „permeability transition”-nek nevezi), valamint számos további molekula, mint például szabadgyökök, bizonyos zsírsavak, a szervetlen foszfát, melyek hatásukat Ca²⁺ jelenlétében fejtik ki.

Léteznek a pórus megnyílását gátló tényezők is, mint a sejt-szintű acidosis, továbbá megfelelően magas ATP-, ADP- és NADH-koncentrációk. A bivalens kationok is a nyitást gátolják, mivel versengenek a Ca^{2+} -mal az mPTP Ca^{2+} -kötő helyéért.[264] (11. ábra)



11. ábra Postcondicionálás hatása az mPTP-csatornákra.

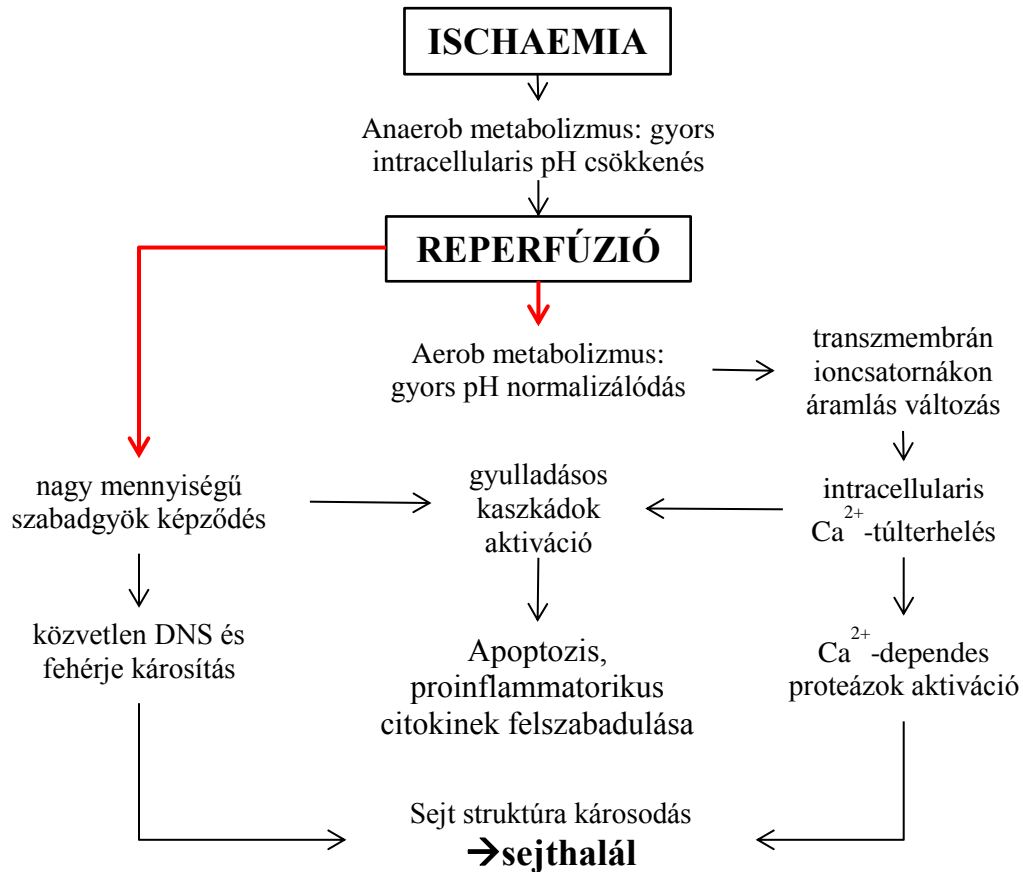
AdoR: adenosin receptor; eNOS, endothelialis nitrogén-monoxid-szintáz;
 mK_{ATP}, mitochondriális ATP-szenzitív kálium-csatornájának; MPTP, mitochondrial permeability transition pore;
 PI3-K, foszfatidil-inozitol-3-kináz; and PKC, protein kináz C.
 Forrás: Michael V., Circulation, 2007. [239]

Egyre több ismeretanyag halmozódik fel azzal kapcsolatban, hogy a PC milyen módon képes gátolni a mPTP-csatornák nyílását. A megfigyelések szerint mind a pórusok nyitását elősegítő reaktív szabadgyökök mennyisége, mind az intracelluláris és mitochondriális magas Ca^{2+} -szint csökkenthető.[235] A PC hatására emelkedő NO-szint szintén gátló hatást fejt ki az mPTP-k megnyílásával szemben.[265]

1.4.4.7. A pH-hipotézis

Egy szerv reperfüziója esetén a szöveti pH kb. 40 másodperc alatt rendeződik.[239] A postcondicionálás során ezzel szemben a lokális acidosis hosszabb ideig áll fenn, mivel a reperfüzió ismételt megszakításaival korlátozzuk a protonok, a tejsav és a ketonsavak kimosódását az ischaemizált szövetből. A savas pH gátolni képes az mPTP-k megnyílását.[266,267] Ezzel párhuzamosan a szövetek oxigén-ellátása már postcondicionálás mellett is kellő mértékben helyreáll ahhoz, hogy a ROS-termelés megindulhasson. A szabadgyökök másodlagos messenger-ként aktiválják a PKC-t, mely egy újabb kaszkádszerű eseménysorral fokozza a sejt szenzitivitását az adenosin receptor agonistákra, így pl. az ischaemia alatti anaerob metabolizmus következtében felhalmozódó adenosin számára.[255,268] Az adenosin receptorok a korábban ismertetett mechanizmus szerint protektív kinázokat aktiválnak, melyek valószínűleg a glikogén-szintáz-kináz-3 β -t (GSK-3 β) inaktíválják és ez végeredményben megakadályozza az mPTP-k formációját és megnyílását a reperfüzió hátralevő részében, immáron véglegesen.[269]

Ez a folyamat néhány perc alatt végbemegy. Amennyiben a pH már ebben az időintervallumban normalizálódik, a mPTP csatornák megnyílása a továbbiakban nem akadályozható meg. Azért van tehát nagy jelentősége annak, hogy a postcondicionálást már a reperfúzió kezdetén, késedelem nélkül, ill. kellően rövid ciklushosszúsággal végezzük, hogy a savas pH ebben a kritikus időszakban fennmaradjon.[270] (12.ábra)



12. ábra Ischemia-reperfúzió okozta sejt károsodás patomechanizmusa és lehetséges beavatkozási pontok postcondicionálás alkalmazásával (piros nyíl).
Forrás: Shoji S et al, Am. J. Physiol, 2011. [270]

1.5. A bél ischaemia-reperfúzió modellezése

Az intestinalis ischaemiás-reperfúziós károsodás patofiziológiáját kutató állatkísérletek között megkülönböztetünk globális ischaemiás-reperfúziós modelleket (pl. haemorrhagias shock és resuscitatio), visceralis és sceletalis izom ischaemiás-reperfúziós modelleket (pl. az abdominalis aorta lefogás során több zsigeri szerv valamint az alsó végtag is érintettek) és izolált intestinalis ischaemiás-reperfúziós modelleket (pl. az a. mesenterica superior occlusioja). Az alábbiakban ezen utóbbiak kerülnek röviden bemutatásra.

1.5.1. In vitro modellek

Egy egész szerv, illetve az in vivo modellek komplexitásának az egyszerűsítése érdekében sejt kultúrákat is használnak az ischaemia-reperfúzió szövetekre gyakorolt hatásának vizsgálatához. A vékonybél ischaemia-reperfúziós károsodásának in vitro vizsgálatához leggyakrabban vékonybél epithelsejteket használnak. A vékonybél egyedülálló funkciójának sajátosságait leginkább meghatározó epithelsejtek különösen érzékenyek az ischaemiára, emiatt a bélrendszert érő károsodások kísérletes modellezéséhez is ezek a sejtek a leginkább alkalmasak. Az ischaemias-reperfúziós sérülés modellezésére többféle módszert dolgoztak ki:

1. Xu és mtsai.[271] a sejttenyészetet először hypoxiás kamrába zárják, amelyben az oxigén legnagyobb részét egy másik gázzal, leggyakrabban nitrogénnel helyettesítik. Ezt követően a sejteket oxigéndús környezetbe helyezik vissza.
2. Matthews és mtsai.[272] az ATP szintézisét gátló, ún. kémiai hypoxiát alkalmaznak. Az oxidatív foszforiláció blokkolása történhet kémiai gátlószer által direkt módon, valamint hamis szubsztrát hozzáadásával, amely kompetitív antagonistaként egyidejűleg gátolhatja az anaerob glikolízist is. A használt inhibitorok mennyiségétől függően változik az ATP depléció mértéke, ezáltal különböző fokú ischaemias károsodás érhető el. A reperfúzió szimulálása céljából ennél a módszernél a sejteket az ischaemias inzultust követően inhibitor mentes, glükóz tartalmú puffer közegbe helyezik.
3. Facundo és mtsai.[273] a sejteket hidrogén peroxiddal kezelik, a felszabaduló oxigén szabadgyökök által pedig direkt módon utánozzák a reperfúziós károsodást.

1.5.2. In vivo modellek

1.5.2.1. Az *a. mesenterica superior* occlusio patkánymodellje

A mesenterialis ischaemia leggyakrabban használt modellje, mely a patkány *a. mesenterica superior* microvascularis klippel történő occlusioján alapul. A protokoll számos változata ismert, ezek az ischaemia és a reperfúzió időtartamában, a választott anaestheticum típusában, a heparin használat vonatkozásában és a kollaterális erek esetleges ligációjában különböznek egymástól. A legalkalmasabb modell egy adott kísérletben attól függ, hogy a feltett kérdés mely patofiziológiai folyamatra irányul. A rövidebb ischaemiás epizódok például a lokális intestinalis sérülés tanulmányozására a legmegfelelőbbek, míg a hosszabb IR periódusok alkalmazása a szisztémás gyulladással válasz és a távoli szervkárosodás megfigyelését teszi lehetővé.

1.5.2.2. A truncus coeliacus feletti aorta-occlusio egérmodellje

Ez kísérletes modell, melyben a supracoeliacus aorta cross-clamping-et alkalmaznak, a visceralis és sceletalis izomzat IR károsodását és az ehhez társuló szisztémás gyulladásos választ próbálják reprodukálni.[274,275] Az egérmodell előnye, hogy egyszerre több jelátviteli út pontos vizsgálatára alkalmas, továbbá génmanipulált állat is bevonható a kísérletbe.[276] Az állatok kis mérete ugyanakkor jelentős technikai korlátot jelent, amellyel a nagyobb állatok – például a patkány – esetében nem kell számolni.

1.5.2.3. A vérzés és a resuscitatio patkánymodellje

Az intestinalis IR károsodás hozzájárulása a shockban fellépő globális ischaemiás-reperfúziós károsodáshoz társuló szisztémás gyulladásos állapothoz jelentős figyelmet kapott.[277-279] Ezen modellekben haemorrhagiás shockhoz kapcsolódóan hoznak létre és tartanak fenn hipotenziót különböző ideig, majd ezt követően értékelik az intestinalis károsodás hozzájárulását a szisztémás gyulladásos válaszhoz.

2. Célkitűzés

A mesenterialis ischaemia ma is jelentős mortalitással járó kórkép, mely sokszor állítja nehezen uralható helyzet elé a klinikusokat. Figyelembe véve a belek rossz ischaemia-toleranciáját, az akut ischaemiás esemény még sikeres érsebészeti reconstructio után is az érintett bélszakasz súlyos IR károsodásához vezet, annak minden lokális és szisztémás következményével. A műtéti megoldás szükséges a mesenterialis keringés helyreállításához és az elhalt bélszakaszok rezekálására, ezért a postcondicionálás ideálisan alkalmazható sebésztechnikai manőver, mely képes lehet az életképesnek ítélt bélszakaszok IR károsodásának mérséklésére, és a bél túlélési esélyeinek javítására. Igaz ez különösképpen az akut artériás elzáródásra, ezért kísérletünkben - patkány a. mesenterica superior occlusioját létrehozva - ennek modellezésére törekedtünk.

I. Kísérlet: Patkány vékonybél ischaemia-reperfúzió esetén az optimális postcondicionálási algoritmus tekintetében nincs egyértelmű irodalmi adat. Ezért kísérletünk során az optimális postcondicionálási algoritmus meghatározása céljából összehasonlítottunk három különböző algoritmust.

1. Hogyan befolyásolják a különböző postcondicionálási algoritmusok a vékonybélnyálkahártya mikrocirculációját?
2. Milyen hatása van a különböző postcondicionálási algoritmusoknak a vékonybélnyálkahártya antioxidáns státuszának alakulására?
3. Mennyiben képes a postcondicionálás mérsékelni az egyes vékonybél szakaszok lokális károsodását szövettani minták alapján, valamint visszatükröződik-e a hatása a szerológiai markerek alakulásában?
4. Kimutatható-e a v. mesenterica superiorban mért lokális pH változás a postcondicionált állatokban?
5. Melyik bél-postcondicionálási algoritmus biztosítja a legerőteljesebb védő hatást?

II. Kísérlet: Vékonybél ischaemia-reperfúzió során a bélbarrier funkció károsodik és bakteriális transzlokáció jön létre. A kísérlet célja a postcondicionálás vékonybél barrier integritására kifejtett hatásának vizsgálata volt.

1. Hogyan befolyásolja a postcondicionálás alkalmazása a bél barrier funkciót meghatározó különböző tight junction fehérjék expresszióját mesenterialis ischaemiát követően?
2. Képes-e a mesenterialis ischaemiát követően alkalmazott postcondicionálás mérsékelni a bakteriális transzlokáció mértékét a mesenterialis nyirokcsomókban, lépben, májban, tüdőben és vesében?

III. Kísérlet: A vékonybél ischaemia-reperfúziót egy intenzív lokális gyulladással válasz jellemzi. Ezért kísérletünk célja a postcondicionálás vékonybél nyálkahártya gyulladással válasz alakulására kifejtett hatásának vizsgálata volt.

1. Milyen hatással rendelkezik a vékonybél ischaemiát követően alkalmazott postcondicionálás a bélnyálkahártya helyi Toll-like receptorok expressziójára?

IV. Kísérlet: A vékonybél ischaemia-reperfúzió során a gyulladás generalizálódásának következtében a távoli szervek másodlagos károsodása jön létre. Kísérletünk célja a távoli szervek állapotának vizsgálata vékonybél postcondicionálást követően.

1. Milyen hatása van a mesenterialis ischaemiát követő postcondicionálás alkalmazásának a máj, tüdő és vese integritására?
2. Képes-e a bél-postcondicionálás mérsékelni a mesenterialis ischaemiát követően kifejlődő szisztémás gyulladással válaszreakciót?

3. Módszerek

3.1. Kísérleti elrendezés, műtétechnika

3.1.1. Törvényi háttér

Az állatkísérletek során követtük az 1998. évi XXVIII. sz. állatvédelmi törvény előírásait, valamint betartottuk a 243/1998 (XII. 31) Kormányrendelet szerint elvárt követelményeket. Kísérleteinket a 1858/000/2004 és 22.1/2408/3/2011 számú engedélyek alapján, a Semmelweis Egyetem EÁB által kiállított, állatkísérletek végzésre feljogosító 27/2000 sz. bizonyítvány birtokában végeztük.

3.1.2. Állatok

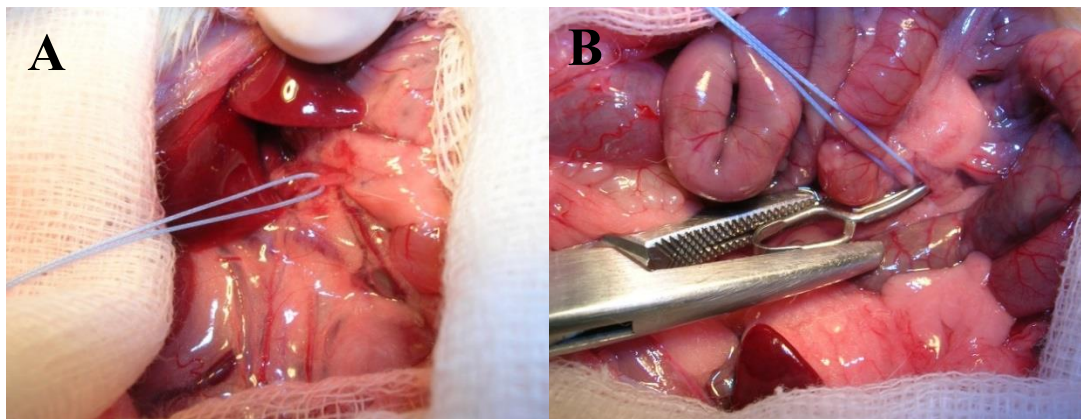
Kísérleteinkhez 250-300 gramm súlyú, hím Wistar patkányokat használtunk (n=155) (Semmelweis Egyetem, Központi Állatház, Budapest). Elhelyezésük 22-24°C-os hőmérsékleten történt, táplálékhoz és vízhez való szabad hozzáférés biztosítása mellett, melyet a műtét előtti 12 órában táplálékmevönás követett. A műtétet mindig azonos időben végeztük, hogy elkerüljük a cirkadián ritmus esetleges zavaró hatásait.

3.1.3. Anaesthesia

Az anaesthesia indukcióját intraperitoneálisan adott 75 mg/ttkg ketaminnal (Calypsol®), valamint 7,5 mg/ttkg xylasinnal (Sedaxilan®) végeztük, majd 25 mg/ttkg/h ketamin és 2,5 mg/ttkg/h xylasin intravénás infúziós adagolásával tartottuk fenn.

3.1.4. Általános műtéti modell

Az állatokat hanyatt fekvő helyzetben helyeztük el a műtőasztalon. Testhőmérsékletüket fűthető alátét segítségével tartottuk 37,5-38,5 °C között a műtét időtartama alatt.



13. ábra (A) Az arteria mesenterica superior kiperarálása és occlusiója (B) atraumatikus microvascularis klip alkalmazásával.

Az intraperitonealis anaesthesia-indukciót követően tompán kipreparáltuk a jobb véna jugularist és egy polietilén kanült vezetünk bele. A továbbiakban ezen keresztül végeztük az anaesthesia fenntartását és a folyadékpótlást. Medián laparotomiából megnyitottuk a hasüreget, izoláltuk az arteria mesenterica superior közvetlenül az aortából történő eredésénél, majd atraumaticus microvascularis klip felhelyezésével 60 percre kirekesztettük a keringésből. Az egy órás ischaemiát követően, a mikroklippet eltávolítva biztosítottuk a reperfúziót. (13.ábra) A csoportnak megfelelő időtartamú reperfúziót követően vér és szövettani mintavétellel egybekötve termináltuk az állatokat.

3.1.5. Csoportbeosztás

Áloperált állat csoport (SHAM)

A csoport létrehozásának célja a műtéti traumának, valamint a műtét önálló hatásainak regisztrálása, valamint elkülönítése a más csoportban látott IR okozta ártalmaktól. Nyaki kanül behelyezése, valamint a hasüreg megnyitása történt; azonban az AMS izolálását nem követte keringésből való kirekesztése.

IR kontroll állat csoport (IR)

Az adaptív sebészi kezelés hiányában kialakuló IR károsodás megfigyelésére alkalmazott csoport.

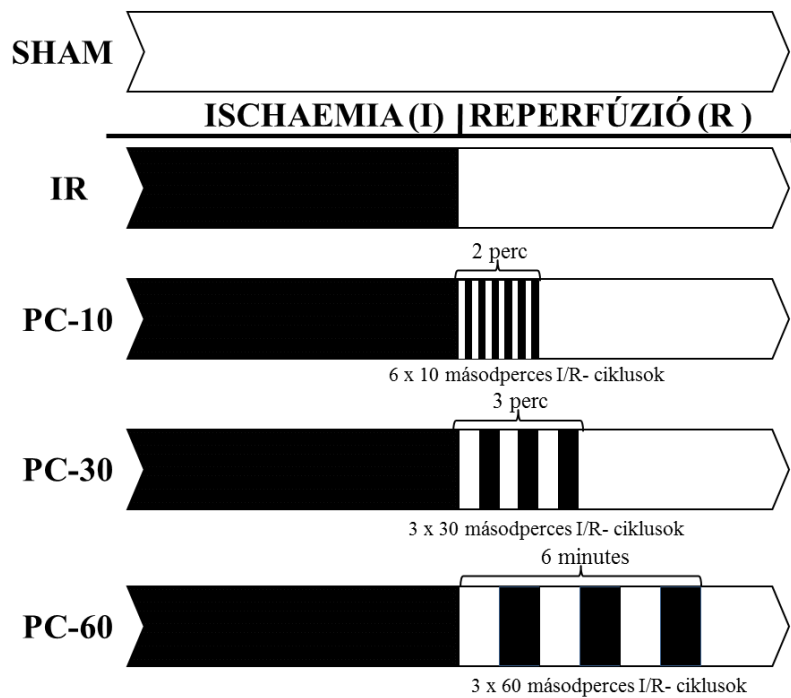
Postcondicionált állat csoport (PC)

Az adaptív keringésmoduláló manőver hatásainak felmérésére, valamint a kifejlődő károsodások az IR kontroll csoportban megfigyeltékhez összehasonlítására alkalmas csoport. A postcondicionálást a csoportnak megfelelő algoritmus szerint végeztük a reperfúzió kezdetén.

3.1.6. Kísérletek részletezése

3.1.6.1. I. Kísérlet: A maximális védő hatást biztosító postcondicionálási algoritmus meghatározása vékonybél IR esetén.

Az általános műtéti modell szerint végeztük a kísérletet 60 perces reperfúziós időintervallummal. Az 50 kísérleti állatot 5 csoportba osztottuk. (n=10/csoport). Három postcondicionálási algoritmust hasonlítottunk össze: PC10: hatszor 10 másodperces reperfúziós-reocclusiós váltakozó ciklusok alkalmazása, ami összesen 2 percig tartott; PC30: háromszor 30 másodperces reperfúziós-reocclusiós váltakozó ciklusok alkalmazása, ami összesen 3 percig tartott; PC60: háromszor 60 reperfúziós-reocclusiós váltakozó ciklusok alkalmazása, ami összesen 6 percig tartott. (14. ábra; 3.táblázat)



14. ábra Kísérleti csoportok és postcondicionálási algoritmusok jellemzése

Csoport	Ischaemia	Postcondicionálás	Reperfúzió	
Áloperált	–	–	–	(n=10)
IR	60 perc	–	60 perc	(n=10)
PC-10	60 perc	6 x 10 mp	60 perc	(n=10)
PC-30	60 perc	3 x 30 mp	60 perc	(n=10)
PC-60	60 perc	3 x 60 mp	60 perc	(n=10)

3. táblázat Az I. kísérlet elrendezése

I. Kísérletben vett minták: azonos anatómiai helyből vett vékonybélminták (duodenum, jejunum, ileum) - szövettani feldolgozásra; vékonybélnyálkahártya kaparék - részletes redox státusz vizsgálatára; vena mesenterica superior-ból vett vérminta - pH mérésére; jobb szívfélből vett vérminta - necroenzimek és gyulladásos citokinek meghatározására.

3.1.6.2. II. Kísérlet: Bélbarrier funkció változás vizsgálata postcondicionálás alkalmazását követően.

GFP-transzfektált Escherichia coli tenyésztés készítése: A kísérletet pGLO plazmidot tartalmazó zölden fluoreszkáló fehérje-termelő (GFP: green fluorescent protein) Escherichia coli HB101 baktériumtörzsszel (NCAIM B01992; Mezőgazdasági és Ipari

Mikroorganizmusok Magyar Nemzeti Gyűjteménye, Budapest) végeztük. A baktérium előtenyésztése 0,2% L-arabinóz (Sigma-Aldrich Inc.) és 100mg/L ampicillin (Sigma-Aldrich Inc.) tartalmú Luria-Bertani agar táptalajon (LB, Difco), aerob körülmények között 37 °C-on, 24-48 órán át történt. A kísérlethez a szelektív táptalajon tenyésztett baktériumot L-arabinóz és ampicillin-tartalmú Luria-Bertani levesben (LB, Difco) 1×10^{10} /ml csíraszám eléréséig szaporítottuk (1×10^{10} CFU/ml = 1×10^{10} telepkező egység [colony forming unit]/ml), a tenyészet csíraszámát spektrofotométer segítségével, 600 nm-en mért optikai denzitás mérésével határoztuk meg. Ennek ellenőrzése három párhuzamos hígítási sor tagjaiból leoltott lemeztáptalajon, csíraszámolással történt.

A műtétet megelőzően 12 órával minden kísérleti állatot, oro-duodenális katéteren keresztül, 1 ml 1×10^{10} CFU/ml- GFP-termelő E.coli baktérium szuszpenzióval inokuláltuk. Az általános műtéti modell szerint végeztük a kísérletet 6 órás reperfúziós időintervallummal. 45 kísérleti állatot 3 csoportba osztottuk. (n=15/csoport).(4.táblázat)

Csoport	Ischaemia	Postcondicionálás	Reperfúzió	
Áloperált	–	–	–	(n=15)
IR	60 perc	–	6 óra	(n=15)
PC-10	60 perc	6 x 10 mp	6 óra	(n=15)

4. táblázat Az II. kísérlet elrendezése

II. Kísérletben vett minták: azonos anatómiai helyből vett vékonybélminták (duodenum, jejunum, ileum) - szövettani feldolgozásra; vékonybélnyálkahártya kaparék - részletes redox státusz vizsgálatára; mesenterialis nyirokcsomó-, lép-, máj-, tüdő-, vese-minták – mikrobiológiai analízisre; jobb szívfélből vett vérminta – i-FABP, d-laktát és gyulladáscitokinek meghatározására.

3.1.6.3. III. Kísérlet: Vékonybél epithelialis sejtek felszíni immunológiai receptor expressziós változása postcondicionálás alkalmazását követően.

Az általános műtéti modell szerint végeztük a kísérletet 6 órás reperfúziós időintervallummal. 30 kísérleti állatot 3 csoportba osztottuk. (n=10/csoport).(5.táblázat)

Csoport	Ischaemia	Postcondicionálás	Reperfúzió	
Áloperált	–	–	–	(n=10)
IR	60 perc	–	6 óra	(n=10)
PC-10	60 perc	6 x 10	6 óra	(n=10)

5. táblázat Az III. kísérlet elrendezése

III. Kísérletben vett minták: azonos anatómiai helyből vett vékonybélminták (duodenum, jejunum, ileum) - szövettani feldolgozásra; vékonybélnyálkahártya kaparék - részletes redox státusz, gyulladásos citokinek és TLR-2, TLR-4 mRNS meghatározására.

3.1.6.3. IV. Kísérlet: Távoli szervek vizsgálata postcondicionálás alkalmazását követően.

Az általános műtéti modell szerint végeztük a kísérletet 6 órás reperfüziós időintervallummal. 30 kísérleti állatot 3 csoportba osztottuk. (n=10/csoport).(6.táblázat)

Csoport	Ischaemia	Postcondicionálás	Reperfüzió	
Áloperált	–	–	–	(n=10)
IR	60 perc	–	6 óra	(n=10)
PC-10	60 perc	6 x 10 mp	6 óra	(n=10)

6. táblázat Az IV. kísérlet elrendezése

IV. Kísérletben vett minták: azonos anatómiai helyből vett vékonybél (duodenum, jejunum, ileum)-, máj-, tüdő-, veseminták - szövettani feldolgozásra; jobb szívfélből vett vérminta - gyulladásos citokinek meghatározására.

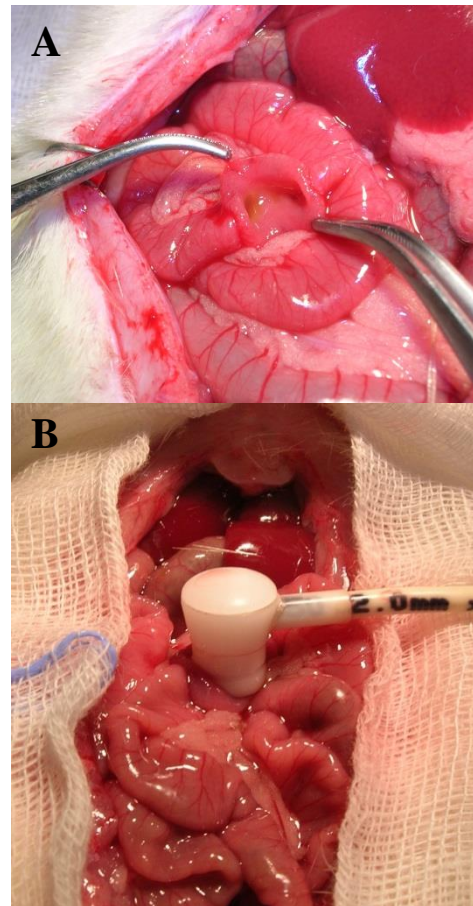
3.2. Vizsgálóeljárások

3.2.1. Hemodinamikai monitorozás

Az állatok artériás vérnyomását és szívfrekvenciáját a jobb oldali a. carotisba vezetett invazív vérnyomás mérővel regisztráltuk (Dasy Lab V9.00.02., National Instruments Corporation).

3.2.2. A bélnyálkahártya mikrocirkulációjának vizsgálata

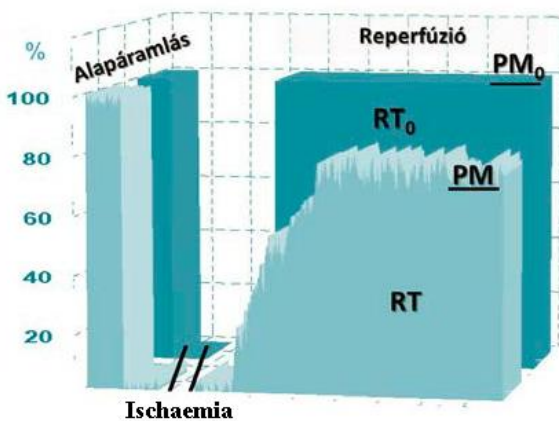
A klinikai vizsgálatok és állatkísérletes kutatások során a szöveti vizsgálatára rutinszerűen alkalmaznak lézer Doppler vizsgálati technikákat. A Doppler elven alapuló módszer, rendkívül érzékenyen jelzi a mikrokeringésben bekövetkező akut változásokat, könnyen kivitelezhető és objektív.



15. ábra (A) A vékonybél antimesenterialis oldalon ejtet metszés (B) a lézer Doppler áramlásmérő detektor elhelyezésére.

A vékonybél mikrokeringését a kirekesztés előtt 5 percen keresztül, majd az ischaemia első és utolsó 5 percében, valamint a reperfúzió teljes időtartama alatt felszíni mérőfejjel ellátott lézer Doppler monitor (MOOR Instruments Ltd. DRT4; kétsatornás; $\lambda=632.8\text{nm}$; monochromaticus 2mW Helium-Neon laser) segítségével végeztük. Az eszköz által mért flux függ a mérőfej által vizsgált szövetvolumenben mozgó vörösvértestek mennyiségétől és átlagsebességétől. A 0,5 cm átmérőjű felszíni mérőfejet a Treitz szalagtól aborális irányban mért 3 cm távolságra, a bél antimesenterialis oldalán ejtett 0,6 cm-es hosszanti metszést követően közvetlenül a bélnyálkahártya felszínére helyeztük. (15.ábra) Méréseink eredménye a hőmérsékletre, a vörösvértest koncentrációra és szövetvastagságra korrigált flux. Mindezen adatok a mérés során folyamatosan követhetők. További feldolgozás céljából 4 másodpercenként mért flux-ot mentettünk el. A mért értékek regisztrálása, grafikus ábrázolása GraphPad Software (GraphPad Software Inc) alkalmazásával történt.

Az áramlási görbék összehasonlíthatósága érdekében a munkacsoportunk által korábban már publikált matematikai korrekciót végeztük el,[280] mely az adott görbére vonatkozó átlag ischaemiás flux (tehát az ú.n. „biological zero” érték) minden flux-értékből történő kivonásán alapul. A továbbiakban a kapott értékeket egy relatív skálán ábrázoljuk, ahol az ischaemia előtt regisztrált áramlási alapérték (baseline) felel meg 100%-nak, az ischaemia alatti érték pedig 0%-nak. [**Tflux = (flux-bz)/(baseline-bz) x 100**]. Ezen matematikai korrekciónak köszönhetően a különböző állatoknál mért áramlási görbék összehasonlíthatóvá válnak.



16. ábra Az áramlási görbék értelmezése. A különböző reperfúziós görbék összehasonlítása a reperfúziós terület (RT) és plató maximum (PM) alapján egy hipotetikus 100% reperfúziós görbével összevetve (RT_0 , PM_0) területarányokkal végezhető el. Forrás: Szijarto A et al, J Surg Res, 2006. [280]

A reperfúziós áramlási görbék összehasonlítása a görbe alatti terület integráljára (RT, reperfúziós terület) és a maximális áramlási plató (PM, plató maximum – a reperfúzió utolsó 10 perce) alapján történt. Az egyes görbék esetében számított két értéket egy hipotetikus ideális reperfúziós görbe százalékában fejeztük ki, ahol feltételezzük, hogy a reperfúzió már az első pillanatban 100%-os. Ez a transzformáció könnyen, átlátható összehasonlítást és statisztikai analízist tesz lehetővé.[280] (16.ábra)

3.2.3. Szövetteni elemzés

Az állatok identikus anatómiai helyről vett mintáit 10 %-os formalinban fixáltuk 24 órán át, majd alkoholban tároltuk és paraffinba ágyasztuk. A szövettani vizsgálatokat

hagyományos fénymikroszkópos elemzéssel végeztük 3-5 µm vastag metszeteken, hematoxylin-eosin (HE) festést követően.

A bélből vett szövettani minták kiértékelése szemikvantitatív módon, az irodalomban gyakran idézett Chiu-féle klasszifikáció[281] alapján történt, ami az alábbi szempontokat veszi figyelembe:

Grade 0: nincs látható elváltozás

Grade 1: a villusok tetején kis subepithelialis fellazulás (Grunhagen subepithelialis tér)

Grade 2: fellazulások magasabb foka, elemeli az epithel réteget a lamina propria-ról

Grade 3: epithel réteg elemelése a villusok hosszában követhető, néhány denudált boholy, tágult kapillárisok és gyulladós sejtek jelenléte

Grade 4: denudált villusok, tágult kapillárisok, necrotikus területek

Grade 5: lamina propria teljes destrukciója, bevérzés, fekélyek

A távoli szervek károsodásainak szövettani analizésénél az alábbi szempontokat vettük figyelembe:

Tüdő: diffúz alveoláris károsodás szöveti jellemzői, úgymint: 1. alveolusok falának vastagsága, 2. alveolusok lumenének tágassága, 3. alveolusok beltartalma (oedema, lelökődött sejtek, törmelék, hyalinmembrán), 4. gyulladós sejtes beszűrtség, 5. pneumococyták-károsodás, 6. pangás.

Vese: tubuláris, interstitialis károsodás jellemzői, úgymint: 1. glomerulusok állapota, 2. a tubulussejtek integritása, 3. csapadék a tubulus lumenben, 4. felszívódott csapadék a hámsejtekben, 5. levált hámsejtek, 6. erek tágassága (pangás).

Máj: 1. necrosis jelenléte, 2. gyulladós sejtes beszűrtség, 3. májlobulus struktúrájának épsége, 4. szinuszoidok tágassága (pangás).

A vizsgáló patológusok a minták jelzését, a csoportbeosztást, ill. a beavatkozás módját és idejét nem ismerték.

3.2.4. Necroenzimek

Az alvadástól vérmintákat centrifugáltuk (3000 rpm, 2x10 percig szobahőmérsékleten), majd a hemolízismentes, sejtmentes felülúszót, szérumot elválasztottuk a sejtes elemektől. A mintákat folyékony nitrogénben lefagyasztottuk és feldolgozásig -80 °C-on tároltuk. A spektrofotometrián alapuló enzim meghatározásokat 24 órán belül, standard laboratóriumi automatán (Hitachi 747) végeztük. Rutin

laboratóriumi tesztek felhasználásával szérumban laktát-dehidrogenáz (LDH), kreatininkináz (CK), aszpartát aminotranszferáz (ASAT) és alanin aminotranszferáz (ALAT) szintet mértünk.

3.2.5. Mucosalis oxidatív stressz vizsgálata

3.2.5.1. Bélmucosa-homogenizátum készítése

A patkányok egyes bélszakaszainak azonosítása után a duodenumot, a jejunumot és az ileumot eltávolítottuk, majd a hossz mérés alapján elkülönített bélszakaszokból a béltartalmat óvatosan kimostuk izotóniás sóoldattal. A tiszta bélmucosát a bél külső felszíne felől kifejtett erőteljes nyomással kiperéselve távolítottuk el. Az így nyert nyálkahártya kaparékot lefagyasztottuk és a mérésig $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A méréseket megelőzően a felolvasztott mucosa mintákból homogenizátumot készítettünk.

3.2.5.2. Luminometriás össz-scavenger kapacitás mérés

A reakcióelegy hidrogénperoxidot, luminolt és mikroperoxidáz (SIGMA) tartalmaz. A mérés során a luminol szabadgyökök hatására gerjesztett állapotba kerül és fényt bocsát ki, amelyet luminométerrel (Lumat LB9051; Lumat Bertold) detektálni lehet.[282,283] A fényintenzitást a gyökfogó vegyületek csökkentik. Az eredményeket Relative Light Unit (RLU) egységben kifejezve adtuk meg. A fényintenzitás (RLU) arányos a mintában található szabadgyökök koncentrációjával. Az alkalmazott eljárások közül ez a legérzékenyebb a redox-státusz meghatározásában, mivel a mintában lévő szabadgyökök mennyiségét nmol/l-es nagyságrendben képes kimutatni.

3.2.5.3. Redukálóképesség meghatározása

A redukálóképességet Oyaizu[284] szerint határoztuk meg. 200 μl mintát használtunk és bidesztillált vízzel 1 ml-re egészítettük ki a térfogatot, majd 2,5 ml pH 6,6 foszfátpufferrel (0,2M) és 2,5 ml 1 %-os $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ -oldattal elegyítettük, ezután 20 percig $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on inkubáltuk. 2,5 ml 10 %-os triklórecetsav-oldat hozzáadása után a reakcióelegyet 10 percig centrifugáltuk 2500 rpm-mel. A felülúszó 2,5 ml-ét 2,5 ml bidesztillált vízzel összekeverve, majd 0,5 ml 0,1 %-os FeCl_3 -oldatot hozzáadva, a kialakult szín intenzitása 700 nm-en spektrophotométerrel (Jasco V-550) mérhető, és arányos a minta redukálóképességével. Referencia vegyületként aszkorbinsavat használtunk. A minta redukálóképességét aszkorbinsav ekvivalensben (ASE) adtuk meg. 1 aszkorbinsav ekvivalens az egységnyi térfogatú minta (1 ml) redukálóképessége, ha hatása egyenértékű 1 μmol aszkorbinsavval. A kapott eredmény a fehérjéhez (SH-csoport) és a nem fehérjéhez kötött proton donor (H-donor) szummációjaként tekinthető, ezért a szervezet össz-antioxidáns státuszáról tájékoztat.

3.2.5.4. Szabad szulfhidril (SH)-csoportok meghatározása

A szabad szulfhidril SH-csoporttal rendelkező anyagok kifejezett antioxidáns tulajdonsággal bírnak. Példaként említhető a fehérje láncok SH-csoport tartalma (cisztein aminosav) és a glutation (GSH) antioxidáns hatása. A szabad SH-csoportok mennyiségének meghatározása Sedlak módszer [285] alapján történt, a fehérjékhez

kötött antioxidáns paramétereikről informál. Méréseinket spektrofotométerrel végeztük bélmucosa homogenizátumból, Ellman reagenssel (5,5-ditiobisz-nitrobenzoészav, SERVA) pH 7,4 Na-foszfát pufferben 512 nm-en.

3.2.5.5. H-donor kapacitás meghatározása

A mintákban található fehérjéket metanol (MERCK) hozzáadásával kicsaptuk, így antioxidáns tulajdonságukat megszüntettük. Éppen ezért ez a módszer a fehérjéhez nem kötött antioxidáns kapacitás mértékéről informál. A méréseket Blois és Hatano módszer [282,283,286] szerint 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil stabil gyök jelenlétében végeztük. Az aktivitás mérésének alapját az 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) gyök 517 nm-en történő detektálása képezi. A DPPH viszonylagos stabilitása révén megbízhatóan fotometrálnak molekulagyök, melynek abszorbancia maximuma 517 nm-nél mérhető. Az analitikai reakcióban a molekula H-atomok jelenlétében (melyet a vizsgálandó H-donor aktivitással rendelkező vegyületek szolgáltatnak) könnyen regenerálódik, mely folyamat eredményeként az abszorbancia csökken. Az eredményt gátlás %-ban adjuk meg.

$$[\text{Gátlás \%} = [\text{Abs(kontroll)} - \text{Abs(minta)}] / \text{Abs(kontroll)} \times 100]$$

3.2.6. Vena mesenterica superior pH mérés

A pH mérést a reperfüzió első 2 percében (0.,30.,60.és 120. másodpercben), kapillárisba vett vena mesenterica superior vérmintákból határoztuk meg (Radiometer ABL 80).

3.2.7. Immunhisztokémiai vizsgálatok

Duodenumból, jejunumból és ileumból vett mintákat fixáltuk neutrál pufferolt formalinban, majd paraffinba ágyasztuk és 3 µm vastag metszetet készítettünk. A deparaffinált szövetet rehidráltuk, az endogén peroxidáz aktivitást 0,6% -os hidrogén peroxidban blokkoltuk, majd 10 mM-os citrát pufferben (pH 6,0) végeztünk antigén feltárást mikrohullámú sütővel (20 perc). Mosást követően - az aspecifikus kötődés megakadályozására - a szövetet 1,5%-os kecske szérummal blokkoltuk (30 perc, szobahőmérsékleten), majd aktív kaszpáz-3 (1:200; CST 9661S, Cell Signaling Technology), claudin-2 (1:50; 51-6100, Invitrogen), claudin-3 (1:100; 34-1700, Invitrogen), claudin-4 (1:100; 36-4800, Invitrogen), zonula occludens-1 (1:125; 40-2300, Invitrogen) poliklonális antitestekkel inkubáltuk a szöveteket egy éjszakán át 4 °C-on. PBS-sel való bőséges mosást követően, biotinizált anti-nyúl szekunder antitesttel (1:200) és avidin-biotin-peroxidáz komplexszel (Vector ABC Elite kit, Vector Laboratories) végeztünk kezelést. A peroxidáz aktivitást DAB (3,3'-diaminobenzidine-tetrahydrochloride) kromogénnel és H₂O₂ detektáltuk, majd háttérfestést Gill féle hematoxylinnal (Accustain, Sigma-Aldrich) végeztünk. Egyidejűleg negatív kontrollként a metszeteket primer antitest kihagyásával festettük meg, pozitív kontrollként az antitestet gyártó cég által ajánlott szövetmintákat használtuk. Az aktív kaszpáz-3 aktivitást kvantitatív kiértékelésével, Leica Qwin Pro morfometriás szoftver

(Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd) segítségével történt, mely egy adott szintartomány terület-nagyságának meghatározására képes. Ezt az értéket a teljes bél nyálkahártya területére vonatkoztatjuk. Ezen hányados kiküszöböli az egyes minták között fellépő egyéni területi különbségeket, így az egyéni értékek objektíven összehasonlíthatóvá válnak. A jejunum és ileum metszeteket 600x nagyításon kerültek mikrofényképezésre, és minden látóteret külön-külön értékeltük. A teljes mintára jellemző pozitivitás az egyes látóterek átlagolását követően kaptuk. A claudin-2, claudin-3, claudin-4 és zonula occludens-1 immunreakciókat szemikvantitatív módon elemeztük. Minden állat duodenum, jejunum és ileum mintájából 10-10 egy mást nem fedő, véletlenszerűen kiválasztott nagy látótérben (HPF-high power field) lévő villusok kerültek külön-külön jellemzésre. A reakciót lineáris membrán-pozitivitás esetén pozitívként értékeltük. A immunhisztokémiai reakció eredményét a lineáris membrán festődést mutató vékonybél epithelialis sejtek százaléka alapján kapott értékben fejeztük ki az alábbi kritérium szerint: 0: nincs membrán festődés, 1: az intestinalis epithelialis sejtek kevesebb mint 20% pozitívak, 2: az intestinalis epithelialis sejtek 21%-40% pozitívak, 3: az intestinalis epithelialis sejtek 41%-60% pozitívak, 4: az intestinalis epithelialis sejtek 61%-80% pozitívak, 5: az intestinalis epithelialis sejtek több mint 81%-ka pozitív.[287]

3.2.8. Mikrobiológiai vizsgálatok

A GFP-termelő *E. coli* baktérium távoli szervekbe (mesenterialis nyirokcsomó, lép, máj, tüdő és vese) történő transzlokációjának kvantitatív kiértékeléséhez 0,1g tömegű szövetmintákat 1ml steril fiziológiás sóoldattal homogenizáltunk, és azokból tízes alapú hígítási sorokat készítettünk. Ezek tagjaiból, és az eredeti homogenizátumokból 200 μ L szélesztettünk L-arabinózt és ampicillint tartalmazó Luria-Bertani agarlemezre, melyeket aerob módon 37°C-on, 24-48 órán át inkubáltunk. A kifejlődött fluoreszcens telepek számlálása 312 nm hullámhosszú UV-fény segítségével történt. A GFP-termelő *E. coli* baktériumoknak egy gramm szövetmintákra vonatkozó csíraszámát az egyes hígításokból leoltott lemezeken számolható baktériumtelepek mennyiségéből - a hígítási fokok figyelembevételével - számítottuk. A kapott eredményeket CFU/g szövet értékeként tüntettük fel.

3.2.9. TLR-2 és TLR-4 mRNS meghatározása valós idejű (real-time) reverz transzkripció-polimeráz láncreakcióval (RT-PCR)

3.2.9.1. RNS izolálás

A szövetminták egy részét a mintagyűjtést követően azonnal folyékony nitrogénben lefagyasztottuk és feldolgozásig -80°C-on tároltuk. A mintákból RNeasy™ Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden) segítségével RNS-t izoláltunk a gyártó protokollja szerint. A kinyert RNS mennyiségét és minőségét NanoDrop készülékkel végzett fotometrállással határoztuk meg, az RNS mintákat felhasználásig -80°C-on tároltuk.

3.2.9.2. Komplementer DNS szintézis

A reverz transzkripció során 1 µg RNS-t komplementer (c)DNS-sé konvertáltunk 20 µl reakció-végtérfogatban, 200 egység (U) SuperScript II RNase H- reverz transzkriptáz, 40 U RNaseOUT inhibitor és 0,5 µg oligo-(dT) primer jelenlétében (Gibco, Life Technologies). A reakcióelegyet 20°C-on 10 percig, majd 42°C-on 45 percig és végül 99°C-on 5 percig inkubáltuk, ezután 4°C-ra lehűtöttük és felhasználásig -20°C-on tároltuk az így előállított cDNS mintákat.

3.2.9.3. Valós idejű PCR

A SYBR Green alapú valós idejű PCR-eket 20 µl végtérfogatú reakcióelegyben végeztük, mely 10µl LightCycler 480 SYBR Green I Master mixet (Roche Diagnostics GmbH), 10 pmol/µl molekula-specifikus szensz és antiszensz primert és 1 µl cDNS mintát tartalmazott. A mérést Roche LC480 PCR készüléken, 96 well platen hajtottuk végre. A TLR-2, TLR-4 és GAPDH specifikus primerek szekvenciáit, anellációs hőmérsékletüket és a képződő termékek hosszát a 7. táblázat tartalmazza. A kezdeti 5 perces 95°C-on végzett denaturáció után a cDNS templátokat 50 cikluson [95°C, 10 mp (denaturáció), 60°C (TLR-2 és TLR-4), 59°C (GAPDH), 10 mp (anelláció), 72°C 10 mp (extenzió)] keresztül szaporítottuk fel. A detektálás 72°C-on történt. A PCR termékek minőségét pozitív és negatív kontrollok felhasználásával ellenőriztük. A PCR termékeink olvadáspont analízisét a következő paraméterek szerint végeztük: 95°C 10 mp, majd 20°C/mp sebességű hűtés után 15 mp-ig 40°C-on tartottuk a mintákat. Ezt követően 20°C/mp sebességű fűtéssel 85°C-ra melegítettük fel azokat.

Gén	Primer szekvencia	T_{an}	Termék-hossz
TLR-2	S: 5'- GCT AGG TAA AGT AGA AAC GGT AAC -3'	60 °C	110 bp
	AS: 5'- TGA TTC GCT TCA CTT TCT CCA -3'		
TLR-4	S: 5'- AAA TGG CAA TCC TTA TCA ATC ATT AG -3'	60 °C	107 bp
	AS: 5'- CTG ATA TCC TCT CTG TTG GTA GTT A -3'		
GAPDH	S: 5'- CAC CAC CAT GGA GAA GGC TG -3'	59 °C	240 bp
	AS: 5'- GTG ATG GCA TGG ACT GTG -3'		

7. táblázat A valós idejű polimeráz láncreakciók (RT-PCR) során használt primerek szekvenciái, anellációs hőmérsékleteik és a keletkezett PCR termékek hossza. Tan: anellációs hőmérséklet, S: szensz, AS: antiszensz, bp: bázispár, TLR: toll-like receptor, GAPDH: gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz.

Az eredményeket Light-Cycler 4801.5.0.3 verziószámú szoftverrel (Roche Diagnostics GmbH) értékeltük ki. A TLR-2 és TLR-4 mRNS expresszióját GAPDH-ra, mint belső kontrollra normalizálva adtuk meg minden egyes minta esetében.[288]

3.2.10. Tüdő oedema index

A szöveti mintavétel során a jobb tüdő középső lebenyének eltávolítása, majd tömegének lemérése történt (nedves tömeg). Ezt követően a lebeny 48 órán keresztül szárításra került állandó 80°C-on (száraz tömeg), a súlyállandóság eléréséig. Az oedema becslése a nedves/száraz tömegek százalékos arányának meghatározásával történt a következő képlet szerint:

$$\text{W/D arány} = (\text{nedves tömeg} - \text{száraz tömeg}) / \text{nedves tömeg} \times 100$$

3.2.11. Konfokális mikroszkópia

Kísérleteinkhez a patkányok jejunumból és ileumból vettünk mintákat. A bélszakaszokat Shandon Cryomatrixba ágyasztuk (Thermo Fisher Scientific), és 10-12 µm vastagságú fagyasztott metszetet készítettünk. A metszeteket poli-L-lizinnel (Sigma-Aldrich) bevont tárgylemezre vettük fel. A mintákat 4% pufferelt formalinban 5 percig fixáltuk. A metszeteket foszfát pufferelt sóoldatban (PBS) rehidráltuk, majd az aspecifikus antitest kapcsolatok megakadályozására 20 percig 5% kecske szérum, 0,1% marha szérum albumin (BSA) és 0,1% Tween-20 elegyével inkubáltuk. A tárgylemezeket az anti-TLR-2 és anti-TLR-4 (1:100; SC-10739 és SC-30002, Santa Cruz Biotechnology) primer antitestekkel 60 percig inkubáltuk, amit további 60 perces Alexa-Fluor 488 kapcsolt, nyúl specifikus másodlagos antitest (1:200; A-11008, Life Technologies) követett. Az epithelialis sejtek vizualizálására anti-citokeratin antitestet (1:200; MAB3224, Merck) és biotinizált kecske anti-egér IgG másodlagos antitestet (1:200; BA-1000, Vector Labs) alkalmaztunk. A kötőhelyeket detektálására Alexa-Fluor 555 Streptavidin (1:200; S-32355, Life Technologies) használtunk. Az ellenanyagokat 1% BSA és 0,1% Tween-20 tartalmú PBS-sel hígítottuk. A sejtmagokat 4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI) festettük. A metszetekre vízdékony Aqua-Poly/Mount-tal (Polysciences Inc) fedtük, majd 4°C-on tároltuk. A metszetekről Bio-Rad Radiance 2100 Rainbow (Bio-Rad Laboratories) konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal több síkban felvételeket készítettünk. A képeket ImageJ-vel dolgoztuk fel, az illusztrációkat Adobe Photoshop CS5.1 (Adobe) szoftverrel állítottuk össze.

3.2.12. Enzimhez kapcsolt immunszorbens (ELISA) vizsgálatok

A bélnyálkahártya mintákat homogenizáltuk homogenizációs puffer (0,05% nátrium azid, 0,5% Triton X-100 és proteáz inhibitorokat tartalmazó PBS) segítségével pH 7.2 és 4°C. A homogenizátumot 12000 g 10 percen át 4°C centrifugáltuk. A felülúszót használtuk IL-6 és TNF-α méréshez. A fehérje koncentrációt Bradford módszer szerint, Protein Assay kit (Bio-Rad Protein Assay Kit I 500-0001) felhasználásával történt. A nyálkahártya minták IL-6, TNF-α, a szérum minták IL-6, TNF-α, I-FABP szinteket patkány specifikus szendvics ELISA módszerrel mértük kereskedelmi forgalomban kapható kit segítségével (Quantikine® Rat IL-6 és TNF-α Immunoassay kit, R&D

Systems; R6570 TSZ Scientific). A szérumban a d-laktát koncentrációt egy kolorimetriás reakció elven alapuló kit használatával végeztük (MAK058, Sigma-Aldrich).

3.2.13. Statisztikai elemzés

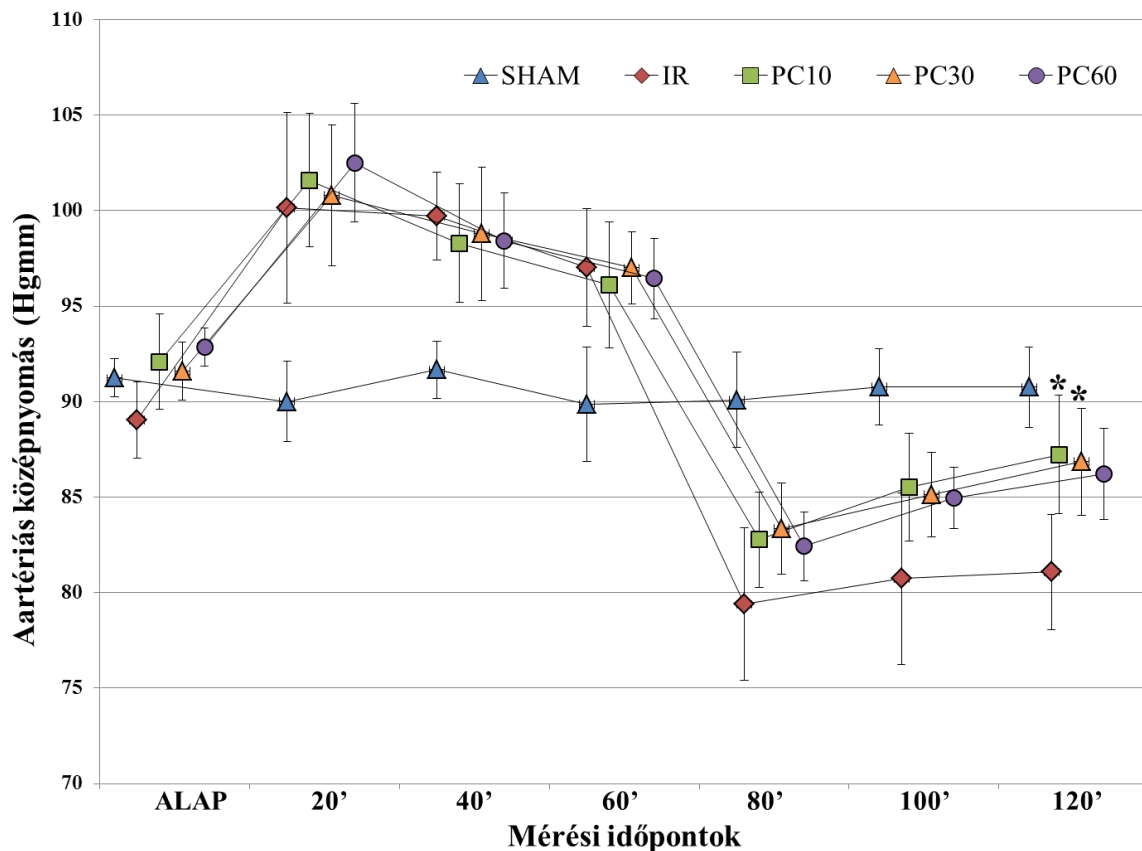
Az eredményeket átlag \pm standard deviáció (SD) –ként fejeztük ki. Az adatok normális eloszlását Kolmogorov-Smirnov teszttel ellenőriztük. A csoportok közötti variációt Levene-féle statisztikai analízissel végeztük. A csoportok közötti statisztikai különbség meghatározásához egy utas ANOVA-t használtunk és Scheffe *post hoc* tesztet. A szövettani és immunhisztokémiai vizsgálatok során kapott pontszámok statisztikai elemzését non-parametrikus Kruskal-Wallis tesztel végeztük, továbbá a csoportok páronként *post hoc* analízishez Mann-Whitney U tesztet alkalmaztunk. A különböző csoportok szövettani eredményét Chi-négyzet próbával hasonlítottuk össze. $p < 0,05$ valószínűségi értéket fogadtunk el szignifikánsnak (SPSS Statistics 20.0 software, IBM Corporation).

4. Eredmények

4.1. I. Kísérlet eredményei

4.1.1. Haemodinamikai paraméterek

A kísérlet kezdetén (baseline) az állatok artériás középnyomása (mean arterial pressure; MAP) 90 és 95 Hgmm között ingadozott. Az áloperált csoport esetében a MAP nem mutatott szignifikáns ingadozást a vizsgált időszakban, tehát konstansnak mondható. A mesenterialis ischaemiának kitett kísérleti csoportok artériás középnyomása az arteria mesenterica superior occlusióját követően emelkedett 10-15 Hgmm-rel, ami az ischaemia vége felé közeledve folyamatosan csökkent. Az IR csoportban szignifikáns MAP esés volt tapasztalható a reperfúzió kezdetén, ami nem változott szignifikánsan a reperfúzió ideje alatt. A reperfúzió 60. percében mind a három postcondicionált csoport artériás középnyomása emelkedett és megközelítette az ischaemia előtti értéket. A PC-10 és PC-30 csoportok tekintetében az MAP szignifikánsan magasabb értéken stabilizálódott a reperfúzió végére az IR-csoporthoz képest. A három postcondicionált csoport artériás középnyomás értékei között nem volt statisztikailag kimutatható különbség. (17.ábra)

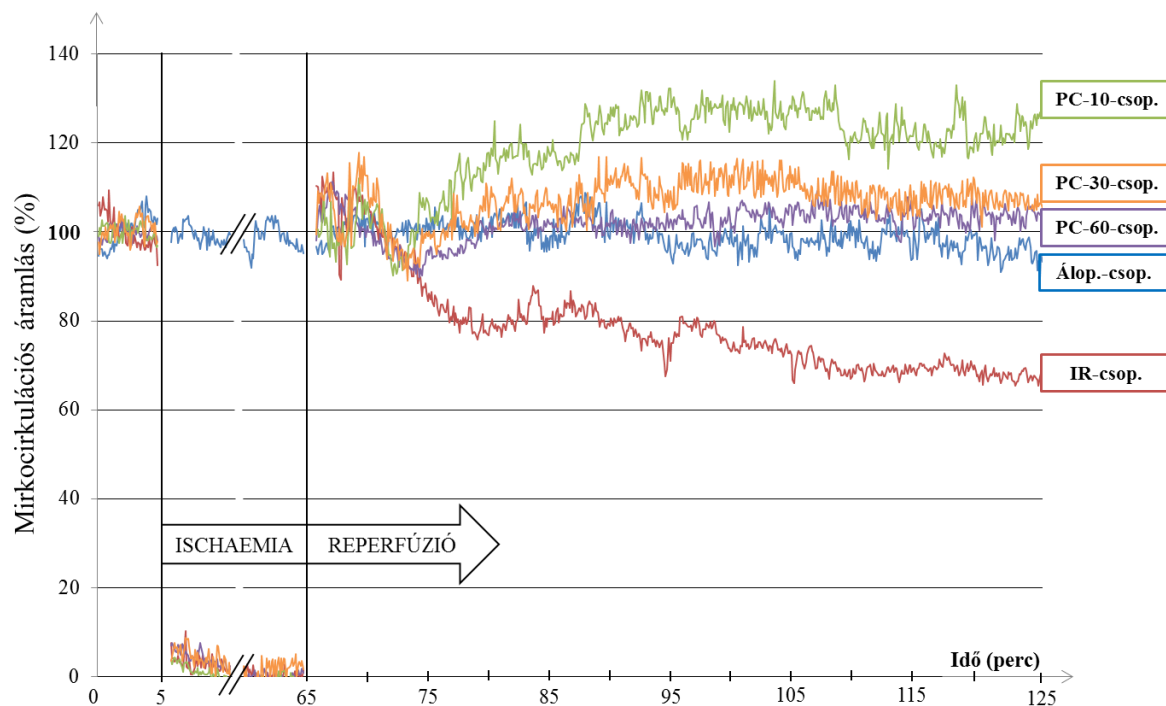


17. ábra Artériás középnyomás változások az öt kísérleti csoportban. *: $p < 0,05$ vs. IR-csoport.

Forrás: Rosero O et al, J Surg Res, 2014. [334]

4.1.2. Mikrocirkuláció

A csoportok összehasonlítása során a reperfúziós görbe alatti terület integrálját (reperfúziós terület: RT) és az áramlás utolsó 10 percében mért áramlási plató maximumot (PM) értékeltük. A korábban említetteknek megfelelően, a matematikai transzformáción átesett áramlási adatokat egy képzeletbeli ideális, maximális reperfúziós görbe százalékában tüntettük fel a táblázatban.(8.táblázat)



18. ábra Vékonybél nyálkahártya mikrocirkuláció mérés. Forrás: Rosero O et al, J Surg Res,2014. [334]

A diagramon látható, hogy a kezdeti alapáramlás során nem mutatkozik jelentős különbség a kísérleti csoportok között, majd az ischaemia következtében az áramlás fokozatosan a biológiai zéró szintjére, azaz az elérhető nulla-pontra csökken. (18.ábra) Az áloperált csoportban, az állatok áramlási görbéje az alapáramláshoz képest a vizsgálat időtartama alatt nem változott. A reperfúzió kezdetén mind a négy AMS kirekesztésen átesett csoportban hirtelen áramlás-emelkedés figyelhető meg, mely kezdetben eléri a 100%-ot, majd az első 5-10 percet követően, a görbék szétválnak. Az IR csoportban az áramlás fokozatos csökkenése figyelhető meg, a PM a reperfúzió kezdeti értékhez képest körülbelül 70%-ra csökken, ami szignifikánsan alacsonyabb ($p < 0,01$) a három postcondicionált csoporthoz képest. A PM tekintetében a PC-30 és PC-60 csoportok között nem volt szignifikáns különbség ($p = 0,317$). A PC-10 csoportban az áramlás hyperaemiával stabilizálódik, mely a vizsgálat egész időtartama alatt fennáll. A PC-10 PM értéke szignifikánsan magasabb a PC-30 és PC-60 csoportokhoz képest. Az RT tekintetében mind a három postcondicionált csoport értéke szignifikánsan magasabb az IR-csoporthoz képest. A postcondicionált csoportok között a PC-10 RT értéke a legnagyobb és szignifikánsan magasabb a másik két

postcondicionált csoporthoz képest. Viszont nem volt szignifikáns különbség az RT paraméter tekintetében a PC-30 és PC-60 csoportok között ($p=0,657$).

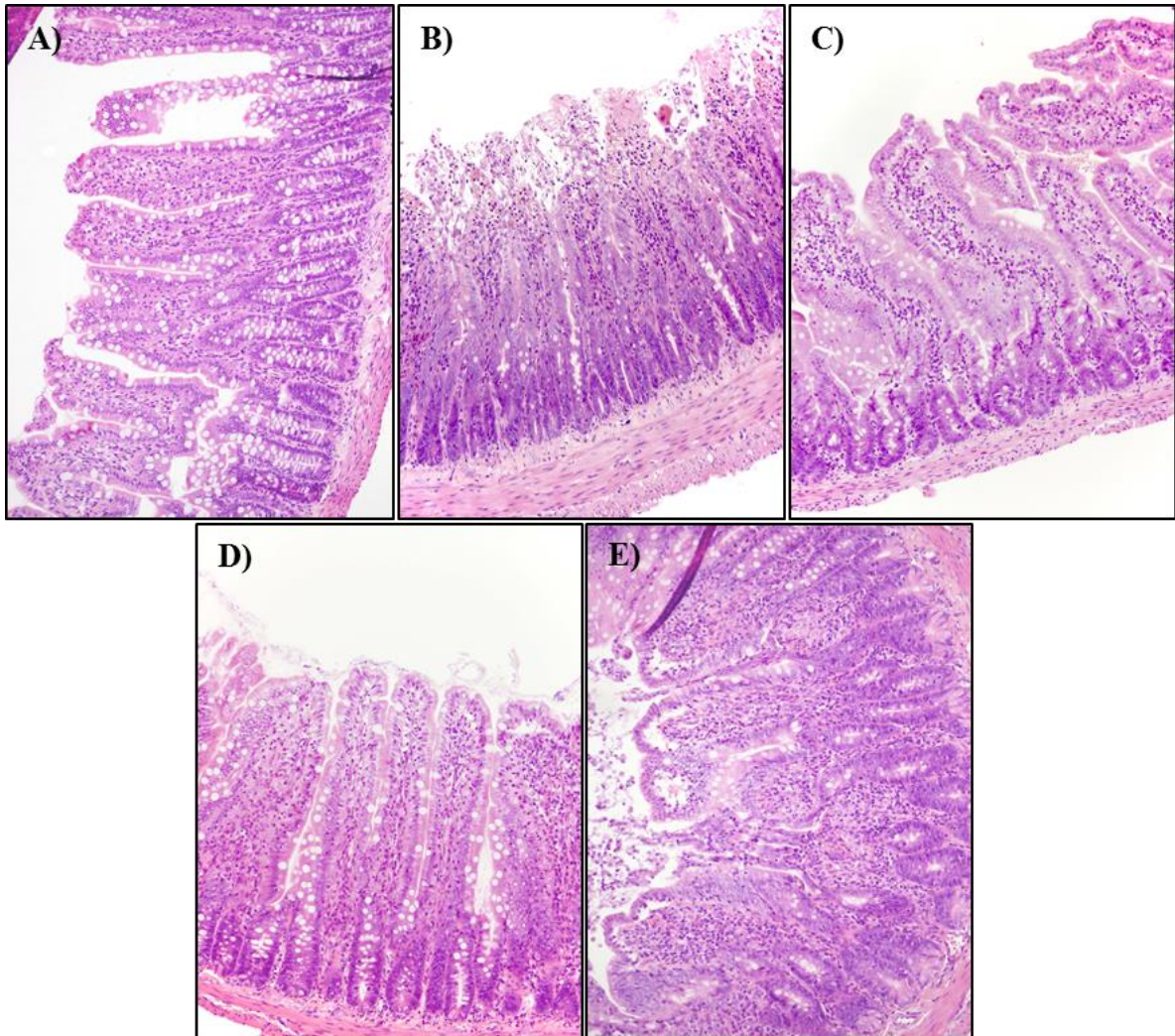
Vizsgált paraméter	Áloperált csoport	IR-csoport	PC-10 csoport	PC-30 csoport	PC-60 csoport
RT (%)	99,7 ± 3,5	76,8 ± 5,1 ††	115,9 ± 4,7 ††,**	103,9 ± 3,4 **,§§	100,3 ± 2,7 **,§§
PM (%)	96,3 ± 3,2	68,5 ± 10,9 ††	120,3 ± 7,6 ††,**	107,8 ± 5,1 ††,**,§	103,6 ± 5,5 ††,**,§

8. táblázat Mikrocirkulációs vizsgált paraméterek.

RT=reperfüziós terület; PM=plató maximum; ††: $p<0,01$ vs. Áloperált csoport;
 **: $p<0,01$ vs. IR-csoport; §: $p<0,05$ vs. PC-10 csoport; §§: $p<0,01$ vs. PC-10 csoport

4.1.3. Vékonybél szövettan

A HE festett szövettani metszeteken az áloperált csoportban közel ép szöveti szerkezet volt látható mindhárom vizsgált bélszakasz esetében. Az ischaemia-reperfüciónak kitett csoportok szövettani képe jelentős különbséget mutat az áloperált csoporthoz képest.



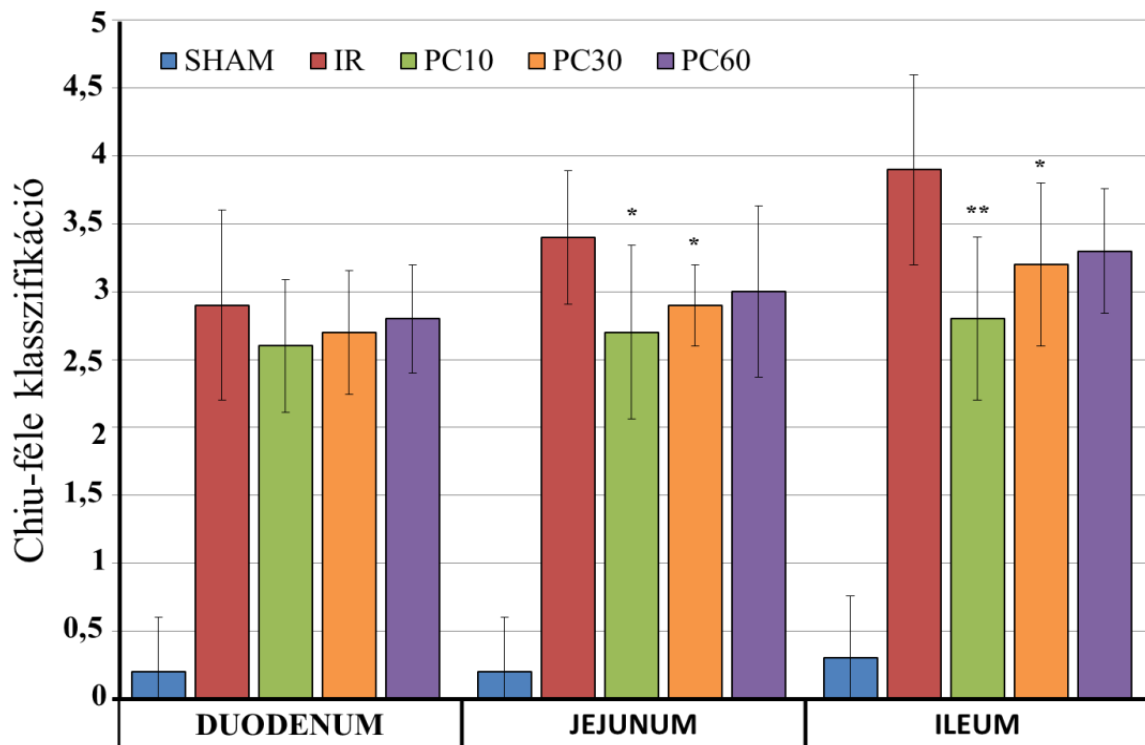
19. ábra Reprezentatív H-E festett jejunum metszetek, 20x nagyítás.

A) Áloperált csoport; B) IR-csoport; C) PC-10 csoport; D) PC-30 csoport; E) PC-60 csoport.

Forrás: Rosero O et al, J Surg Res, 2014. [334]

A duodenum metszetek tekintetében nem volt statisztikailag kimutatható különbség az IR- és a postcondicionált csoportok között. A három bélszakasz közül az ileum szenvedte a legjelentősebb károsodást. Az IR-csoportban a jejunum és ileum metszetek denudált oedemás villusokat ábrázoltak, elsősorban a bolyhok felső harmadát érintő teljes destructioval és necrotikus területekkel, melyet kapilláristágulat is kísért. Ehhez képest a mesenterialis ischaemia végén alkalmazott postcondicionálás jelentősen csökkentette az IR-csoportban látott vékonybél szöveti károsodást. A három postcondicionált csoportban megtartottabb szöveti szerkezet volt megfigyelhető. A PC-60 csoportban erős subepithelialis fellazulást, a hámréteg különböző mértékű elemelkedését láttuk elsősorban, valamint kisebb fokú kapilláristágulatot jóval kevesebb necrosis mellett. A PC-30 és PC-10 csoportokban a szöveti kép ennél is kedvezőbbnek mutatkozott. A subepithelialis fellazulások kisebb mértékűek voltak – a PC-10 csoportban ritkán volt megfigyelhető- és a villusok oedemája is enyhébb fokban alakult ki. (19.ábra)

A kiértékelés során az irodalomban széles körben használt Chiu-féle klasszifikáció[281] alapján pontoztuk a károsodás mértékét a számszerű összehasonlíthatóság biztosítása érdekében. A jejunum és ileum bélszakaszok pontértékei alapján a PC-10 ($p < 0,01$) és a PC-30 ($p < 0,05$) csoportok szignifikánsan kisebb mértékű szöveti károsodást mutattak az IR kontroll csoporthoz képest. A PC-60 csoportban tapasztalt jejunum és ileum szöveti károsodás mértéke nem mutatott statisztikai különbséget az IR-csoporthoz képest ($p = 0,165$; $p = 0,054$). (20.ábra)

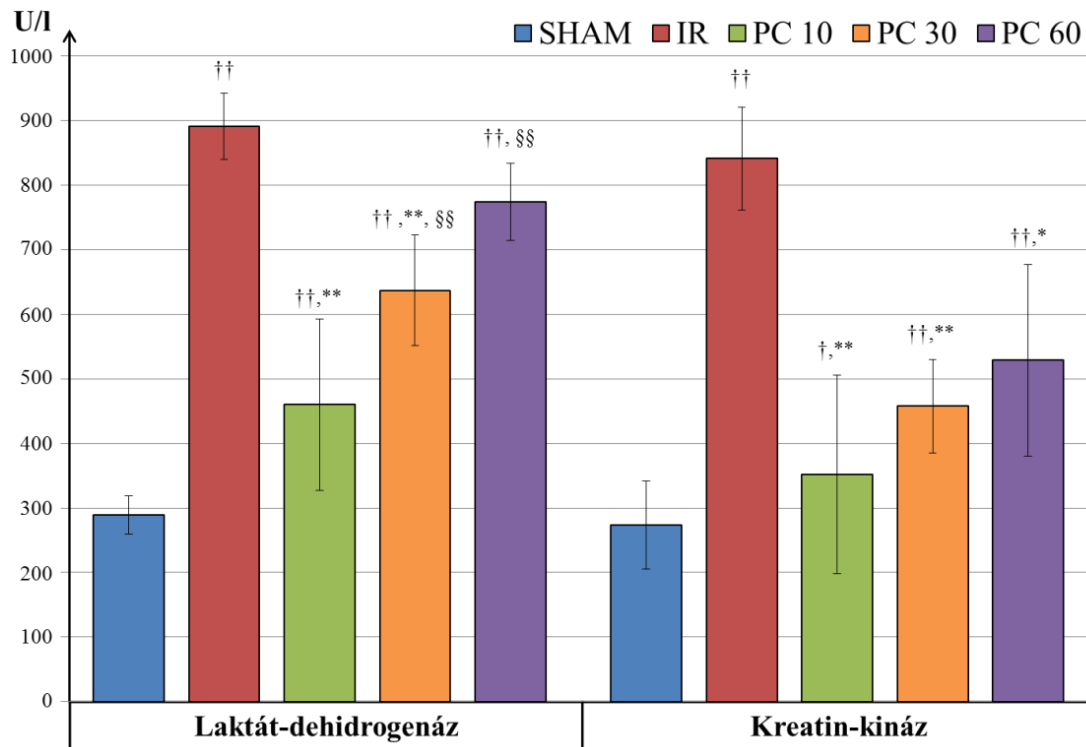


20. ábra A Chiu-féle klasszifikáció pontértékei bélszakaszok szerint.

*: $p < 0,05$ vs. IR-csoport; **: $p < 0,01$ vs. IR-csoport. Forrás: Rosero O et al, J Surg Res, 2014. [334]

4.1.4. Plazma LDH és CK változások

A 60 perces mesenterialis ischaemiára és 60 perces reperfúzióra kitett csoportokban jelentős emelkedés volt tapasztalható mind az LDH mind a CK tekintetében, az áloperált csoporthoz képest ($p < 0,05$). Az IR-csoporthoz képest a PC-10 és PC-30 csoportban mért LDH és CK emelkedéshez szignifikánsan alacsonyabb volt. Míg a PC-60 csoportban csak a CK esetében láttunk szignifikáns csökkenést. A postcondicionált csoportok között a plazma LDH koncentráció szignifikánsan magasabb volt a PC-30 ($p < 0,05$) és PC-60 ($p < 0,01$) csoportokban a PC-10 csoporthoz képest. (21. ábra)



21. ábra Szérumban mért laktát-dehidrogenáz-, kreatinin-kináz szintek.

†: $p < 0,05$ vs. Áloperált csoport; ††: $p < 0,01$ vs. Áloperált csoport;

*: $p < 0,05$ vs. IR-csoport; **: $p < 0,01$ vs. IR-csoport; §§: $p < 0,01$ vs. PC-10 csoport.

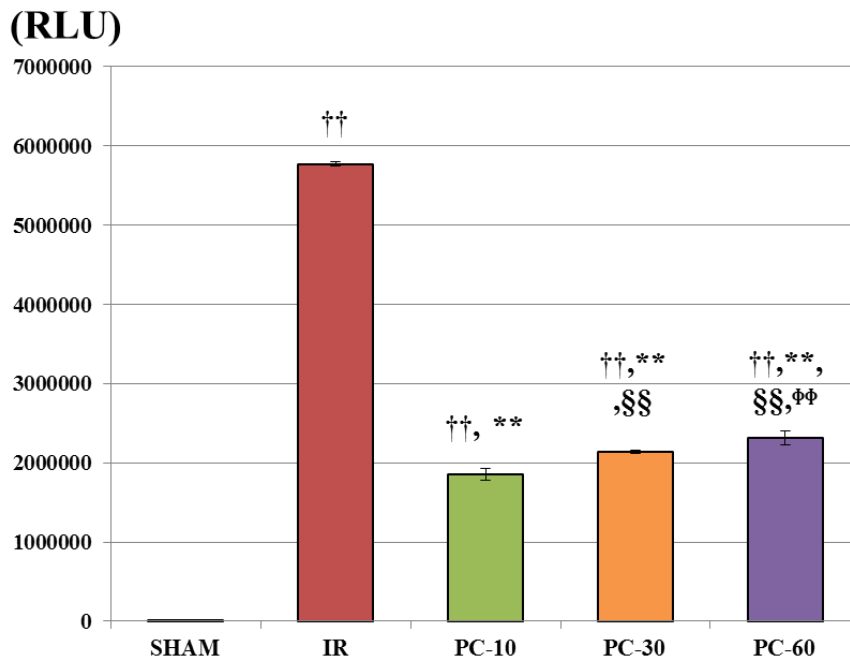
Forrás: Rosero O et al, J Surg Res, 2014. [334]

4.1.5. Bélyákhártya antioxidáns státusz

A nyákhártya-kaparékból végzett antioxidáns vizsgálatok arról szolgáltatnak pillanatnyi információt, hogy milyen az antioxidáns-prooxidáns egyensúly a vizsgált rendszerben, esetünkben az egyes bélszegmensek nyákhártyájában. 60 perces ischaemia és 60 perces reperfúzió hatására mindhárom vizsgált bélszakaszban jelentős oxidatív stressz alakult ki. A következőkben az ileum nyákhártya-kaparékban mért antioxidáns szinteket mutatjuk be részletesen, mivel ezen bélszakasz károsodása bizonyult legsúlyosabbnak. A duodenumban és jejunumban mért értékek a kísérő táblázatban kerültek feltüntetésre. (9.táblázat)

4.1.5.1. Luminometriás össz-scavenger kapacitás

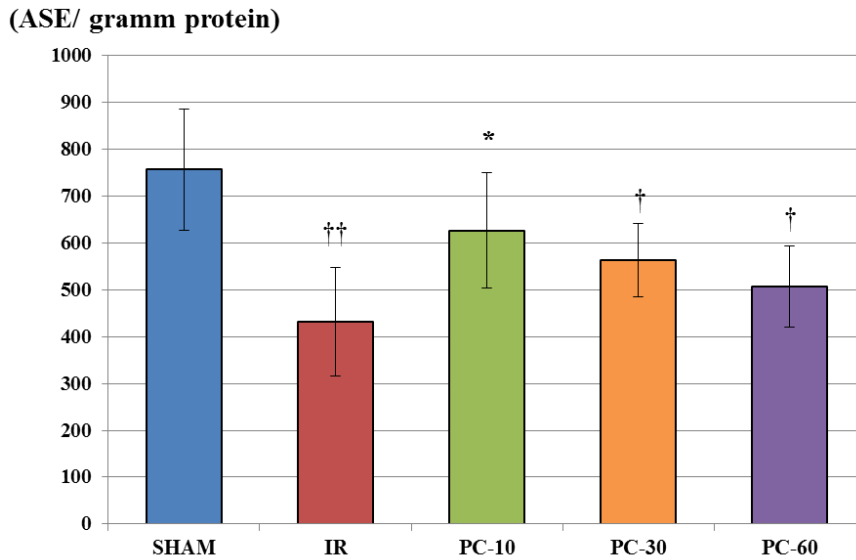
A relative light unit (RLU)-ban kifejezett luminometriás össz-scavenger kapacitás fordítottan arányos a mintában jelenlévő antioxidánsok mennyiségével. Az ileum luminometriás vizsgálata alapján, mindhárom PC csoportban szignifikánsan csökkent a szabadgyökök mennyisége az IR-csoporthoz képest. A 6x10 másodperces postcondicionálási algoritmus kifejezettebb csökkenést eredményezett, ami a másik két postcondicionálási algoritmus alkalmazásához képest statisztikailag szignifikánsnak bizonyult. Továbbá a PC-60 csoportból származó ileum nyálkahártya kaparékba mért szabadgyök koncentráció szignifikánsan magasabb volt a PC-30-csoportban mértékhez képest. (22.ábra)



22. ábra Vékonybél nyálkahártya – luminometriás össz-scavenger kapacitás (ileum).
 ††: $p < 0,01$ vs. Áloperált csoport; **: $p < 0,01$ vs. IR-csoport;
 §§: $p < 0,01$ vs. PC-10 csoport; ††: $p < 0,01$ vs. PC-30 csoport

4.1.5.2. Redukálóképesség

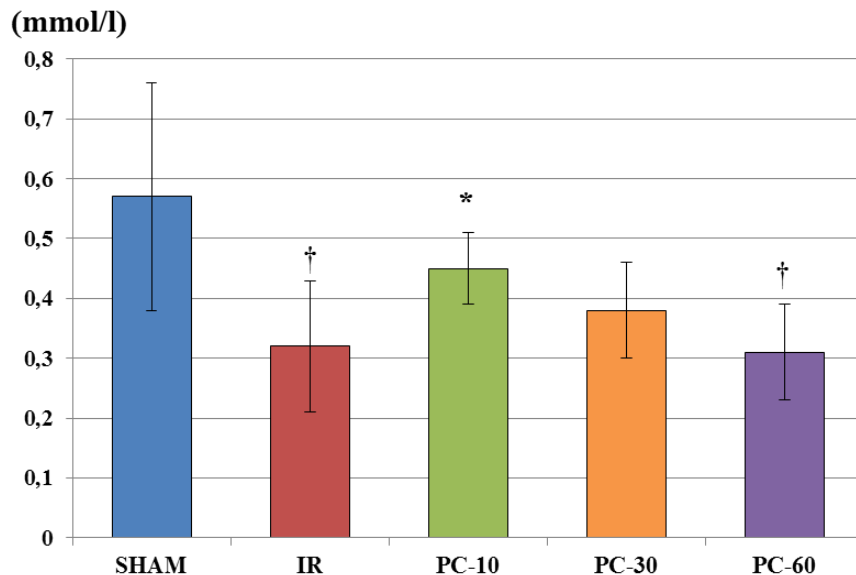
A redukáló képesség, mely a szövet teljes antioxidáns képességéről informál és arányos a minta antioxidáns tartalmával, aszkorbinsav ekvivalensben (ASE) került megadásra. Az áloperált csoportban mutatkozik legmagasabbnak a redukáló képesség. Az IR-csoportban kifejezett csökkenés látható, mely PC segítségével mérsékelhető. Ebben az esetben számottevő különbség mutatható ki a három postcondicionálási algoritmus közt: míg az 60 és 30 másodperces ciklusok nem javították jelentősen az ileum nyálkahártya redukáló képességét az IR-csoporthoz képest, a 10 másodperces ciklusok hatására szignifikáns javulás jött létre. (23.ábra)



23. ábra Vékonybél nyálkahártya – redukáló képesség (ileum).
 †: $p < 0,05$ vs. Áloperált csoport; ††: $p < 0,01$ vs. Áloperált csoport; *: $p < 0,05$ vs. IR-csoport

4.1.5.3. Szabad szulfhidril (SH) –csoportok

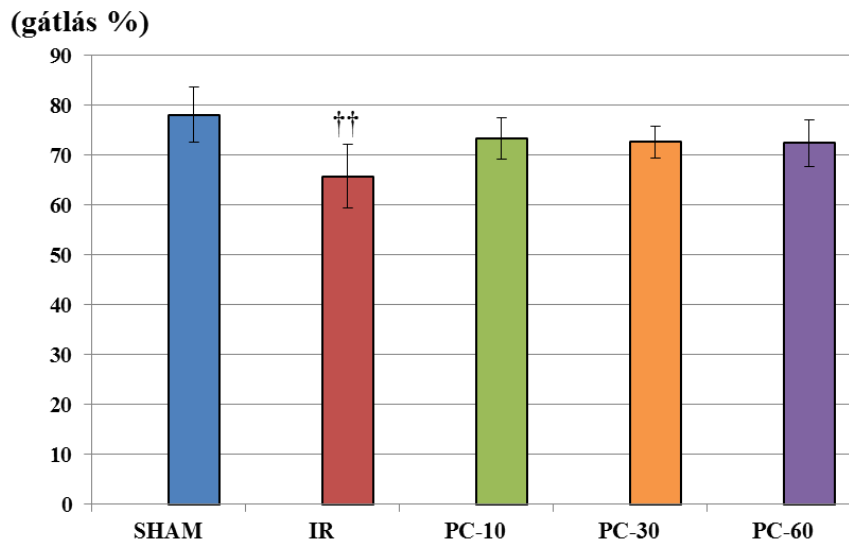
A fehérjékhez kötött antioxidáns tulajdonság vizsgálatnál csak a 10 másodperces postcondicionálási algoritmus eredményezett szignifikáns javulást az IR-csoporthoz képest. A PC-30 és PC-60 csoportokban alkalmazott postcondicionálási algoritmus nem mérsékelte az ischaemia-reperfúzió indukálta szabad szulfhidril csoporttal rendelkező fehérjék csökkenését. (24.ábra)



24. ábra Vékonybél nyálkahártya – szabad SH-csoportok (ileum).
 †: $p < 0,05$ vs. Áloperált csoport; *: $p < 0,05$ vs. IR-csoport

4.1.5.4. Hidrogén-donor aktivitás

A módszer a fehérvérhez nem kötött antioxidáns kapacitás mértékéről informál. Bár az IR-csoporthoz képest statisztikailag szignifikáns javulás nem mutatható ki egyik postcondicionálási technika alkalmazásával sem, egyfajta javuló tendencia megfigyelhető mindhárom csoport esetében. (25.ábra)



25. ábra Vékonybél nyálkahártya H-donor kapacitás (ileum).
††: $p < 0,01$ vs. Áloperált csoport

Összefoglalva az antioxidáns vizsgálatok eredményét, azt tapasztaltuk, hogy 60 perces ischaemia és 60 perces reperfüzió hatására mindhárom vizsgált bélszakaszban jelentős – bár különböző mértékű – oxidatív stressz alakult ki. Mind a három vizsgált postcondicionálási protokoll képes volt az oxidatív stresszt szignifikáns módon csökkenteni az igen érzékeny luminometriás mérések alapján, de a 10 másodperces ciklusok alkalmazása csökkentette legkifejezettebben. A spektrofotometriás paraméterek tekintetében mutatkozik bizonyos mértékű eltérés az egyes bélszakaszokban kifejtett hatás tekintetében. A 10 másodperces ciklusokat alkalmazó postcondicionálásról elmondható, hogy védő hatása összességében itt is statisztikailag szignifikánsan jelenik meg a kontroll csoporttal szemben. A 30- és 60-másodperces ciklusok esetében, a legsúlyosabb károsodásnak kitett ileum esetében szignifikáns javulás nem volt kimutatható, bár a javuló tendencia itt is megfigyelhető és a másik két bélszakasz esetében helyenként statisztikailag is szignifikáns.

	Luminometriás össz-scavenger kapacitás (RLU%)			Redukáló képesség (ASE/ gramm fehérje)		
	Duodenum	Jejunum	Ileum	Duodenum	Jejunum	Ileum
SHAM	1491 ± 264	6167 ± 344	4905 ± 249	838 ± 127	968 ± 100	757 ± 130
IR	171830 ± 4353 ††	175868 ± 4187 ††	5772379 ± 21347 ††	659 ± 165	523 ± 86 ††	432 ± 115 ††
PC-10	7632 ± 232 ††,**	37399 ± 1663 ††,**	1853117 ± 71617 ††,**	780 ± 92	886 ± 188 **	627 ± 124 *
PC-30	19563 ± 654 ††,**,§§	45120 ± 1303 ††,**,§§	2139374 ± 23804 ††,**,§§	712 ± 68	729 ± 75 ††,**	563 ± 79 †
PC-60	26983 ± 1746 ††,**,§§,ϕϕ	50346 ± 3226 ††,**,§§,ϕϕ	2317532 ± 89743 ††,**,§§,ϕϕ	682 ± 87	687 ± 78 ††,**	507 ± 86 †

	Szabad szulfhidril csoport (mmol/l)			Hidrogén-donor aktivitás (gátlás %)		
	Duodenum	Jejunum	Ileum	Duodenum	Jejunum	Ileum
SHAM	1,162 ± 0,46	0,83 ± 0,01	0,57 ± 0,19	74,9 ± 5,82	80,1 ± 1,91	78,11 ± 5,56
IR	0,583 ± 0,15 †	0,59 ± 0,15 ††	0,32 ± 0,11 †	68,2 ± 8,88	67,4 ± 6,83 ††	65,8 ± 6,41 ††
PC-10	1,03 ± 0,21 **	0,8 ± 0,17 *	0,45 ± 0,06 *	80,4 ± 2,42 *	79,7 ± 1,29 **	73,36 ± 4,13
PC-30	0,825 ± 0,11 **	0,731 ± 0,12	0,38 ± 0,08	80,34 ± 2,05 *	79,45 ± 1,58 **	72,68 ± 3,15
PC-60	0,703 ± 0,16 §	0,671 ± 0,18 †	0,31 ± 0,08 †	80,3 ± 1,12 *	77,91 ± 3,11 **	72,5 ± 4,69

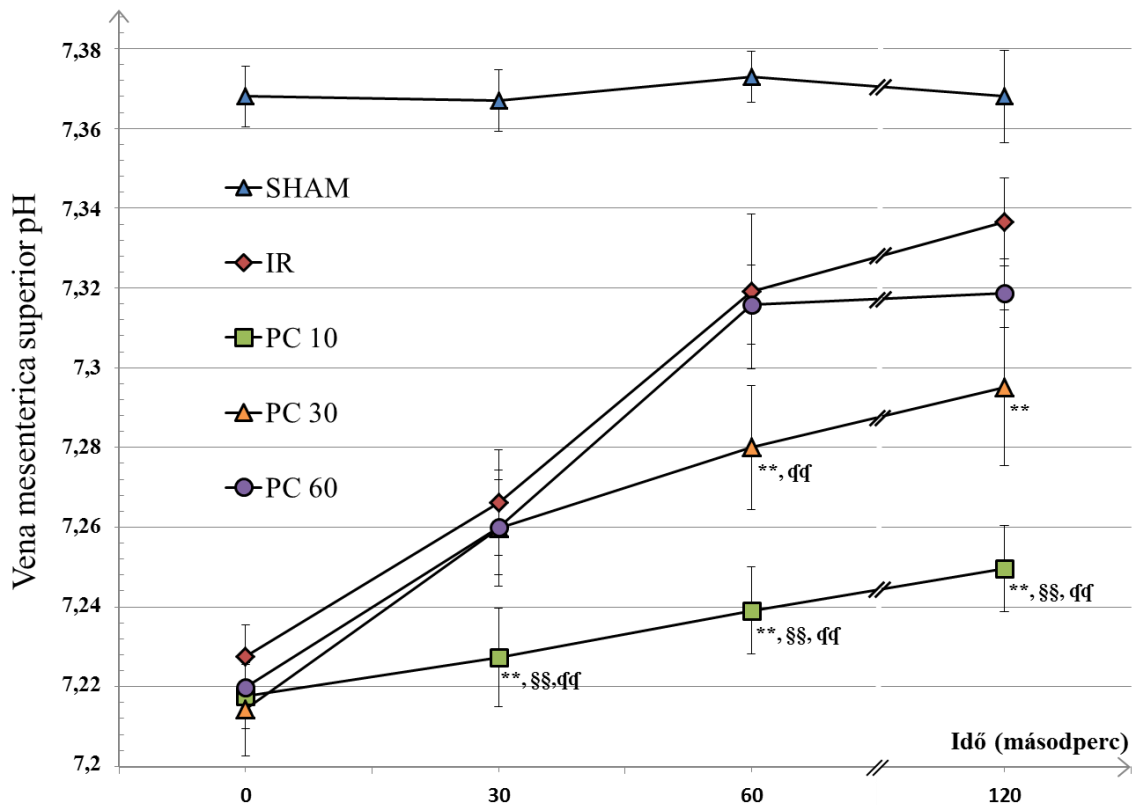
9. táblázat Vékonybél nyálkahártya antioxidáns státusz.

†: p<0,05 vs. Áloperált csoport; ††: p<0,01 vs. Áloperált csoport; *: p<0,05 vs. IR-csoport;
**: p<0,01 vs. IR-csoport; §§: p<0,01 vs. PC-10 csoport; ϕϕ: p<0,01 vs. PC-30 csoport

4.1.6. A mesenterialis vér korai pH-változásai

A v. mesenterica superiorból vett vérmintákból végeztünk pH-meghatározást a reperfüzió korai fázisában (0., 30., 60., és 120. másodpercében). Az arteria mesenterica superior ideiglenes kirekesztésen átesett csoportok vénás pH értékei szignifikánsan alacsonyabbak az áloperált csoport értékeihez képest. Az áloperált csoport pH értékeiben nem figyeltünk meg jelentős változást a mért időpontokban.

A kezdeti (0.) időpontban mért vénás pH nem mutatott különbséget az ischaemián átesett csoportok között. A 30. másodpercben szignifikáns különbség mutatkozott a PC-10 és a többi kísérleti csoport között. Az reperfúzió első percének végén, a PC-10 csoport szignifikánsan alacsonyabb pH értékei továbbra is fenn állt. Továbbá az IR- és PC-60 csoportok pH értékei szignifikánsan gyorsabban emelkedtek a PC-10 és PC-30 csoportokhoz képest. A reperfúzió második percében megfigyelt változások alapján elmondható, hogy csak a PC-10 és PC-30 csoportokban alkalmazott postcondicionálási algoritmusok voltak képesek lassítani a véna mesenterica pH normalizálódását az IR-csoporthoz képest. Az utolsó mérésben a PC-10 csoport szignifikánsan alacsonyabb pH értékeket mutatott a PC-30 csoporthoz képest. Szembetűnő, hogy 6x10sec postcondicionálást követően, a pH emelkedés jóval lassabb ütemű, annak ellenére, hogy a reperfúzió elején az IR-csoporttal közel azonos értékről indul. Az IR- és a PC-60 csoport között nem volt statisztikailag kimutatható különbség a pH értékek tekintetében ($p=0,057$). (26.ábra)

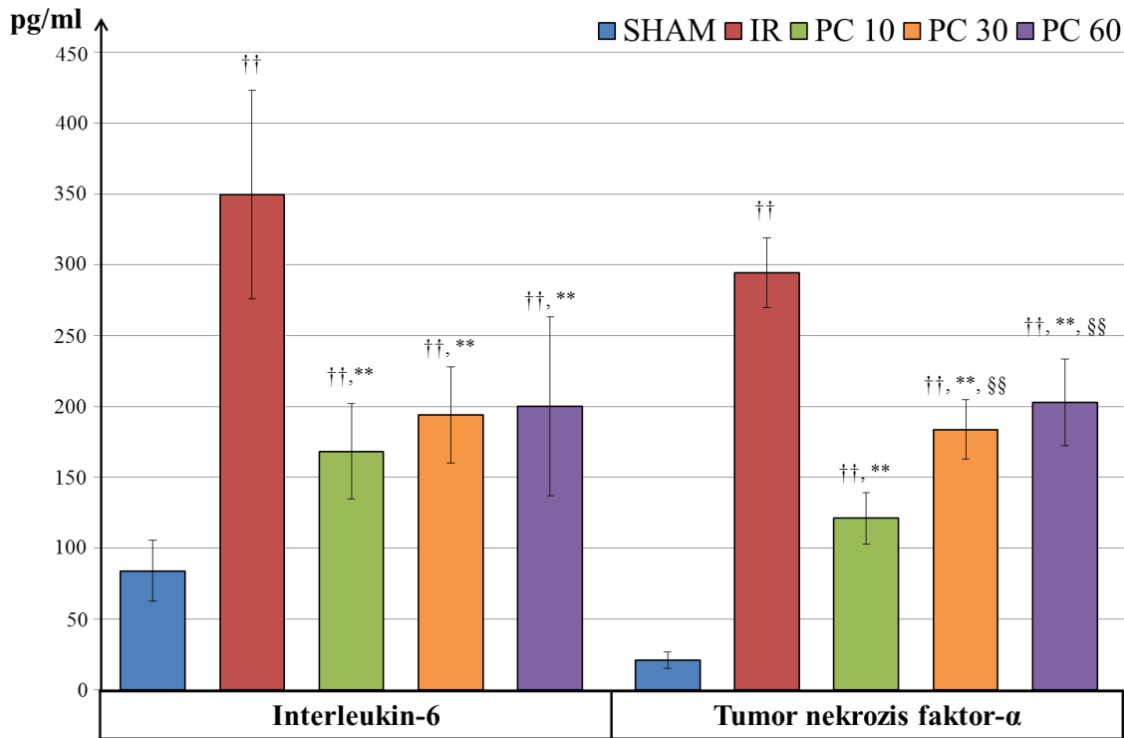


26. ábra Vena mesenterica superior pH-jának alakulása a reperfúzió kezdetén.
 **: $p<0,01$ vs. IR-csoport; §§: $p<0,01$ vs. PC-10 csoport; ¶¶: $p<0,01$ vs. PC-60.
 Forrás: Rosero O et al, J Surg Res, 2014. [334]

4.1.7. Korai szérums IL-6 és TNF- α szintek

Az interleukin-6 (IL-6) és tumor necrosis faktor- α (TNF- α) szérums koncentrációk meghatározását, mint a szisztémás gyulladós válasz korai markereinek és a távoli szervi hatások előkészítő-vizsgálataként végeztük el. A diagramon látható, hogy az

ischaemia-reperfúzióra kitett csoportok szérumban IL-6 és TNF- α szintje jelentősen emelkedett az áloperált csoporthoz képest. Mind a három vizsgált postcondicionálási algoritmus szignifikánsan csökkentette mindkét gyulladáscsökkentő citokin koncentrációját az IR-csoporthoz képest. A szérumban TNF- α tekintetében a PC-10 csoport szignifikánsan alacsonyabb szintet mutatott a PC-30- és PC-60- csoportokhoz képest. (27.ábra)

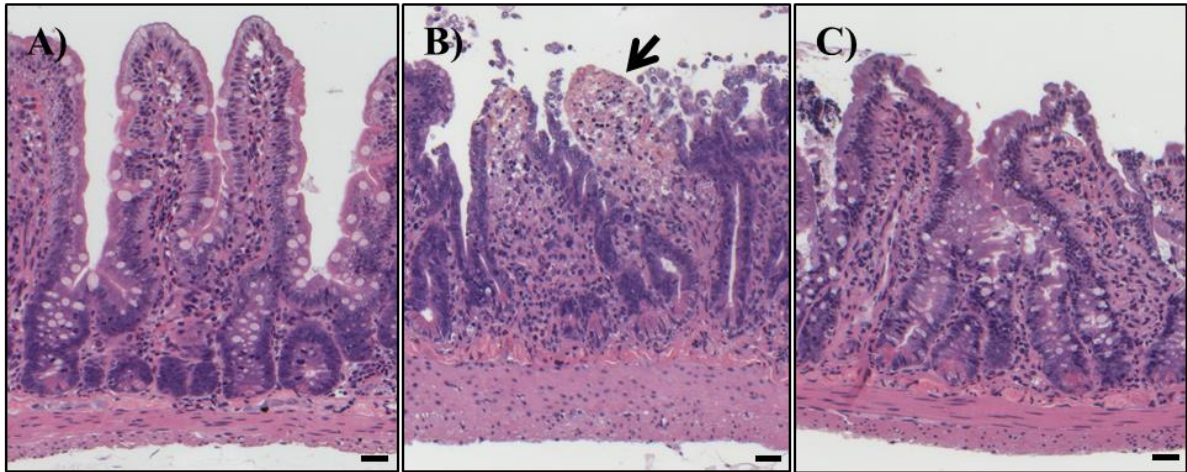


27. ábra Szérumban Interleukin-6 és Tumor necrosis faktor- α változások.
 ††: $p < 0,01$ vs. Áloperált csoport; **: $p < 0,01$ vs. IR-csoport; §§: $p < 0,01$ vs. PC-10 csoport.
 Forrás: Rosero O et al, J Surg Res, 2014. [334]

4.2. II. Kísérlet eredményei

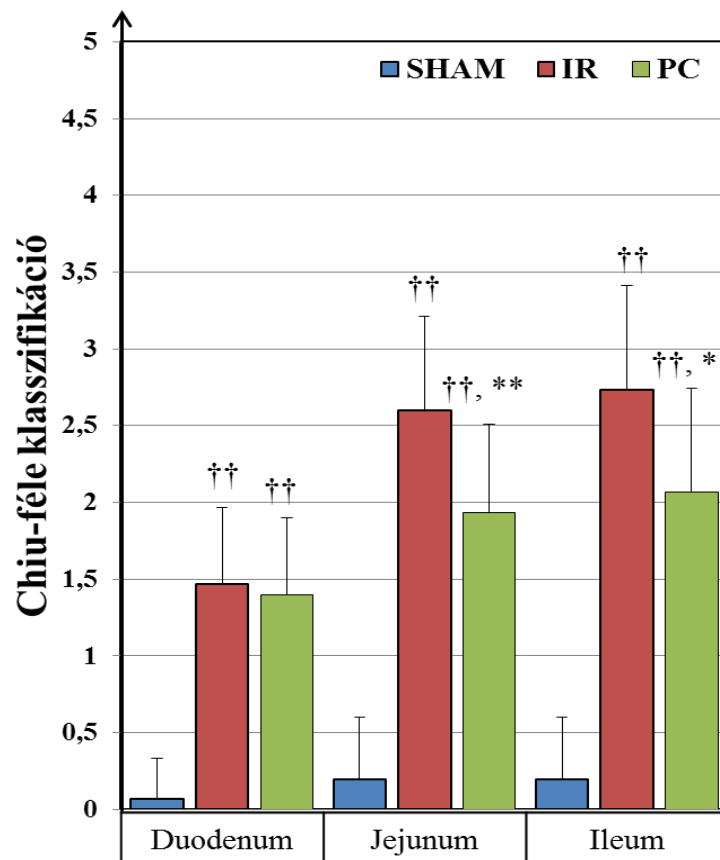
4.2.1. Vékonybél szövettan

A vizsgált három vékonybél szakasz tekintetében az áloperált csoport HE festett metszetein ép szöveti szerkezet volt látható. A duodenum, mely a vizsgált három vékonybél szakasz közül a legenyhébben károsodott, minimális subepithelialis fellazulásokat mutatott mindkét ischaemia-reperfúzióra kitett kísérleti csoport mintáin. Az IR- és PC-csoport között nem volt statisztikailag kimutatható különbség a duodenum elváltozások tekintetében. Ezzel szemben az IR-csoportban kifejezetten szövettani változások voltak megfigyelhetők a jejunum és ileum esetén, ahol sok helyen denudált bolyhok valamint a villusok oldalára is kiterjedő súlyos epithelialis fellazulások külön-külön mértékben jellemezték a szövettani képet. A postcondicionált csoport jóval enyhébb képet mutatott kis- és középfokú subepithelialis fellazulásokkal. (28.ábra)



28. ábra Reprezentatív H-E festett jejunum metszetek (scale bar: 50µm).
 A) Áloperált csoport; B) IR-csoport, nyíl mutatja a denudált villus-t; C) PC-csoport.
 Forrás: Rosero O et al, Biomed Res Int, 2014. [73]

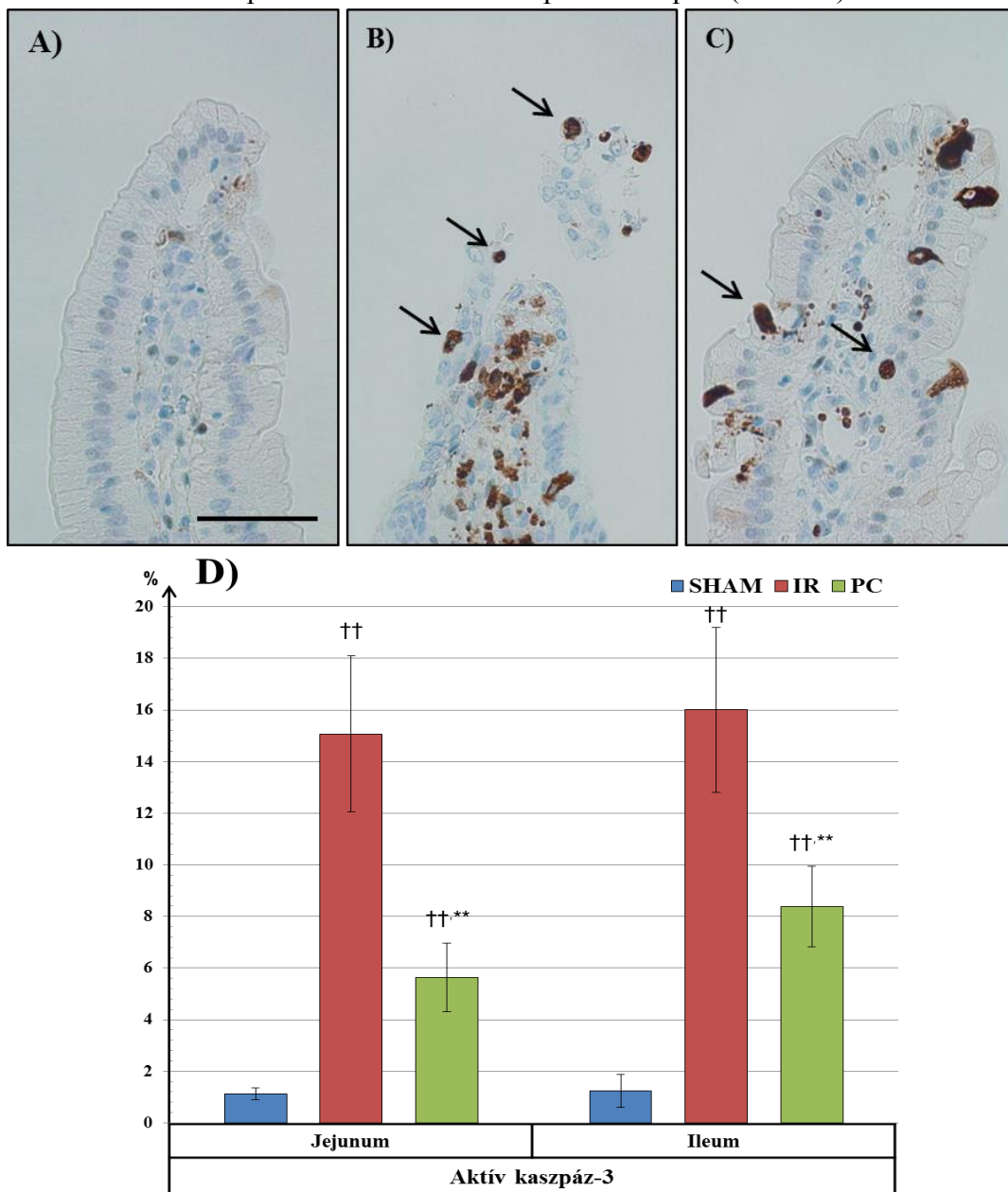
A metszetek kiértékelése során használt Chiu-féle klasszifikáció [281] alapján, a postcondicionált csoportban látott szövettani elváltozások szignifikánsan enyhébbek voltak mind a jejunum ($p < 0,01$ vs. IR), mind az ileum ($p < 0,05$ vs. IR) tekintetében az IR-csoportéhoz képest. (29. ábra)



29. ábra A Chiu-féle klasszifikáció pontértékei bélszakaszok szerint.
 ††: $p < 0,01$ vs. Áloperált csoport; **: $p < 0,01$ vs. IR-csoport.
 Forrás: Rosero O et al, Biomed Res Int, 2014. [73]

4.2.2. Aktív kaszpáz-3 immunhisztokémia

Az apoptózis egyik jellegzetes markerének kimutatására aktív kaszpáz-3 festés végeztünk. Az aktív kaszpáz-3 reakció értékelését digitális morfometria segítségével határoztuk meg. Az áloperált csoport vékonybél metszetein minimális számú aktív kaszpáz-3 pozitivitást (nuclearis és/vagy cytoplasmaticus) mutató intestinalis epithelialis sejt volt megfigyelhető. Ezzel szemben szignifikánsan magasabb számban voltak láthatóak aktív kaszpáz-3 pozitív festődésű sejtek a mesenterialis IR kitétt csoportokban. A postcondicionált csoport jejunum és ileum metszetein szignifikánsan csökkent az aktív kaszpáz-3 festődés az IR-csoporthoz képest.(30. ábra)



30. ábra Aktív kaszpáz-3 immunhisztokémia: A) Áloperált csoport, B) IR-csoport, C) PC-csoport (nyilak mutatják az apoptotikus sejteket, scale bar: 50 μ m). D) Aktív kaszpáz-3 kvantitatív kiértékelés morfometriás software használatával. ††: $p < 0,01$ vs. Áloperált csoport; **: $p < 0,01$ vs. IR-csoport.

Forrás: Rosero O et al, Biomed Res Int, 2014.

4.2.3. Tight junction sejtkapcsoló fehérjék immunhisztokémia

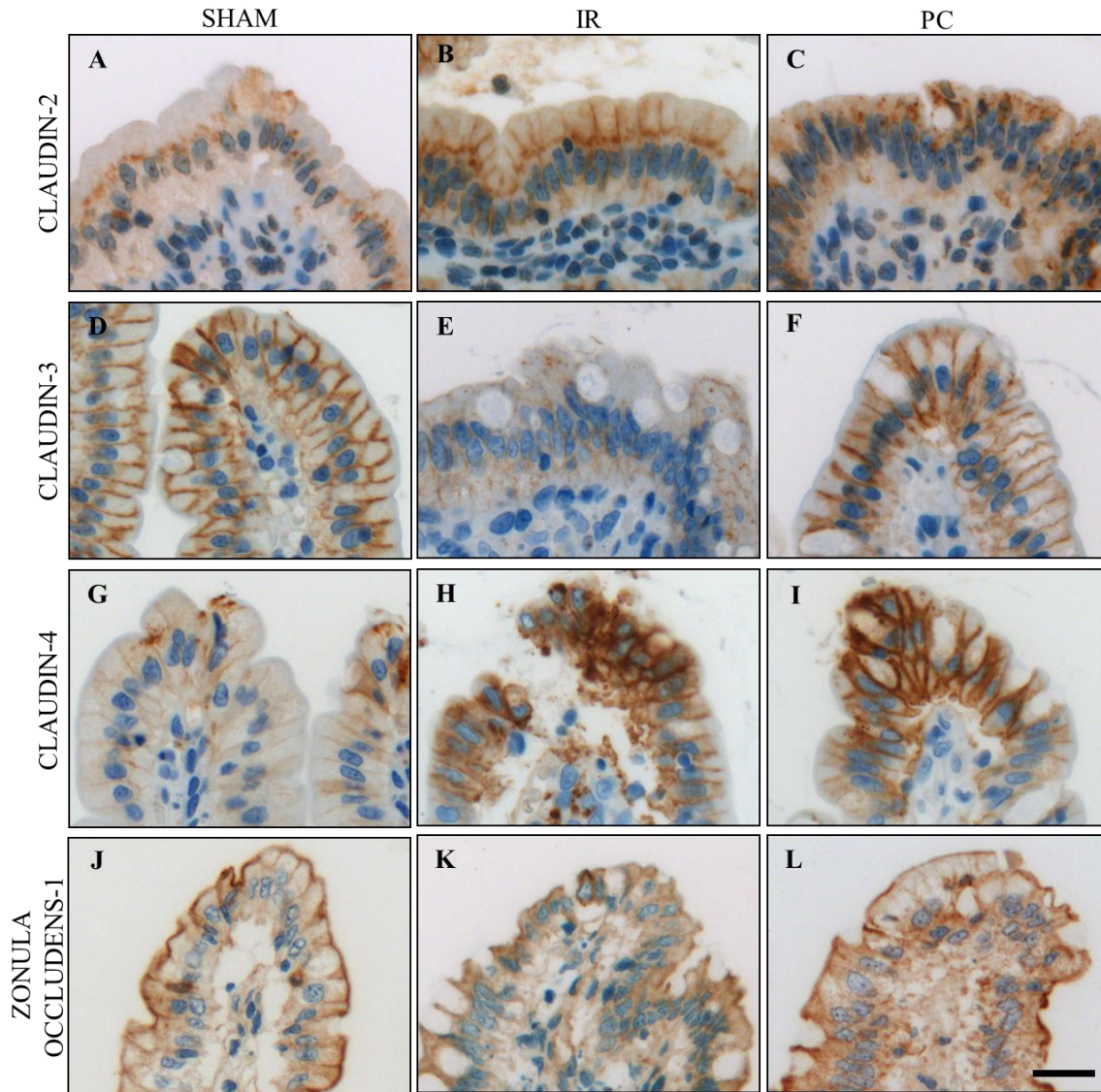
A claudin-3, -4 és zonula occludens-1 expressziója lineáris membranosus reakciót mutatott. A claudin-2 fehérje expressziója részben lineáris membranosus, részben granuláris intracytoplasmaticus reakciót adott. Az áloperált csoportban gyenge reakciót figyeltünk mind a három vizsgált vékonybél szegmens claudin-2 festődés tekintetében. Claudin-2 pozitivitást főleg a bélbolyhok cryptáiban lokalizálódott és inkább a cytoplasmában helyezkedett el granuláris jelleggel (A). Az ischaemia-reperfúzióra kitett csoportokban magasabb claudin-2 festődés volt látható (B, C). Az IR-csoport jejunum és ileum metszetei szignifikánsan erősebb immunpozitivitást mutattak a postcondicionált csoporthoz képest.

A claudin-3 reakció az áloperált csoportban erős lineáris membrán pozitivitást adott a crypta-villus tengely mentén található epithelialis sejtekben, nem volt jelentős különbség a három vizsgált vékonybél szakasz között (D). A mesenterialis ischaemia-reperfúzió jelentős claudin-3 expresszió csökkenést okozott a jejunum és ileum epithelialis sejtekben (E, F). A postcondicionálás szignifikánsan enyhítette a claudin-3 festődés csökkenés mind a jejunum mind az ileum tekintetében.

Az áloperált csoportban gyenge claudin-4 immunpozitivitás detektáltunk a három vizsgált bél szegmensen, a reakció főleg a villusok csúcsán található epithelialis sejtek cytoplasmájában volt látható (G). A 60 perces ischaemia és 6 óra repurfúzió számottevő claudin-4 expresszió emelkedést okozott a duodenum, jejunum és ileum bolyhok csúcsán található epithelialis sejtekben (H, I). Az IR- és PC-csoport között nem volt statisztikailag kimutatható különbség az epithelialis sejtek claudin-4 membrán expressziója tekintetében.

A zonula occludens-1 az intestinalis epithelialis sejtek apikális és laterális membránokon volt látható. Az áloperált csoport epithelialis sejtek zonula occludens-1 membrán expressziója nem mutatott különbséget a duodenum-, és jejunum- és ileum-vékonybél szakaszok között (J). Az ischaemia-reperfúzió végén vett jejunum és ileum mintákban jelentősen alacsonyabb zonula occludens-1 expresszió volt megfigyelhető (K). Azonban a postcondicionált csoport jejunum és ileum metszeteiben (L) szignifikánsan erősebb immunpozitivitás volt látható az IR-csoportéhoz képest.

(31.ábra, 10.táblázat)



31. ábra Claudin-2, claudin-3, claudin-4 és zonula occludens-1 immunfestett jejunum metszet reprezentatív képei. (scale bar: 20 μ m). Forrás: Rosero O et al, Biomed Res Int, 2014. [73]

Vékonybél szakasz	Kísérleti csoport	Claudin-2	Claudin-3	Claudin-4	Zonula occludens-1
DUODENUM	SHAM	0,06 \pm 0,2	5	0,2 \pm 0,4	3,73 \pm 0,4
	IR	2,27 \pm 0,4 ††	4,67 \pm 0,4 †	1,4 \pm 0,5 ††	3,47 \pm 0,5
	PC	2,06 \pm 0,2 ††	4,7 \pm 0,4 †	1,13 \pm 0,3 ††	3,4 \pm 0,5
JEJUNUM	SHAM	0,2 \pm 0,4	4,87 \pm 0,3	0,2 \pm 0,4	3,53 \pm 0,5
	IR	3,47 \pm 0,5 ††	1,33 \pm 0,5 ††	2,2 \pm 0,4 ††	1,33 \pm 0,6 ††
	PC	2,93 \pm 0,6 ††,*	4,6 \pm 0,5 **	1,8 \pm 0,6 ††	3 \pm 0,5 †,**
ILEUM	SHAM	0,13 \pm 0,3	4,93 \pm 0,2	0,27 \pm 0,4	3,73 \pm 0,4
	IR	3,6 \pm 0,5 ††	1,2 \pm 0,4 ††	2,53 \pm 0,5 ††	1,13 \pm 0,3 ††
	PC	3,06 \pm 0,5 ††,*	4 \pm 0,7 ††,**	2,2 \pm 0,4 ††	2,4 \pm 0,5 ††,**

10. táblázat Intestinalis epithelialis sejtek közötti különböző tight junction fehérjék expressziója szemikvantitatív kiértékelése. ††: p<0,01 vs. Áloperált csoport; *: p<0,05 vs. IR-csoport; **: p<0,01 vs. IR-csoport

4.2.4. Bélnyálkahártya antioxidáns státusz

4.2.4.1. Luminometriás össz-scavanger kapacitás

A kemilumineszcencia intenzitása arányos a vizsgált mintában lévő szabadgyökök koncentrációjával. Az ischaemia-reperfúzió során szignifikánsan emelkedett a vizsgált bélszakaszok nyálkahártya homogenizátumban lévő szabadgyök koncentráció az áloperált csoporthoz képest. A mesenterialis ischaemia végén alkalmazott postcondicionálás szignifikánsan csökkentette az IR-csoporthoz képest a szabadgyök koncentrációt a jejunumból és ileumból származó minták tekintetében. A duodenum esetén ez a különbség nem volt szignifikáns ($p=0,091$). (11.táblázat)

4.2.4.2. Redukálóképesség

A globális antioxidáns státuszra utaló redukáló képesség értéke csökken az ischaemia-reperfúzió során. Azonban a postcondicionált csoport szignifikánsan magasabb értékeket mértünk az IR-csoporthoz képest mindhárom vizsgált vékonybél szakasz tekintetében. A duodenum és ileum esetében a postcondicionált és az áloperált csoport redukáló képessége nem mutatott statisztikai különbséget. (11.táblázat)

4.2.4.3. Szabad szulfhidril (SH) –csoportok

A fehérjékhez kötött antioxidáns tulajdonság vizsgálatnál a postcondicionálás szignifikánsan mérsékelte a mesenterialis ischaemia-reperfúzió okozta szabad szulfhidril csoport csökkenést. Továbbá a postcondicionált és az áloperált csoport között nem detektáltunk szignifikáns különbséget. (11.táblázat)

4.2.4.4. Hidrogén-donor aktivitás

A fehérjéhez nem kötött antioxidáns tulajdonság meghatározás során is kimutatható mindhárom vizsgált bélszegmens esetében az ischaemia-reperfúzió antioxidáns kapacitás csökkenő hatása. A változás a jejunum és az ileum tekintetében a legerőteljesebb. A postcondicionálás azonban szignifikánsan mérsékelte a hidrogén-donor aktivitás csökkenést a duodenum, jejunum és ileum esetében is. (11.táblázat)

Vizsgált paraméter		SHAM	IR	PC
Luminometriás össz-scavenger kapacitás (RLU%)	Duodenum	243 ± 9	288 ± 10 ††	280 ± 9 ††
	Jejunum	259 ± 12	325 ± 14 ††	302 ± 93 ††,**
	Ileum	290 ± 13	357 ± 12 ††	332 ± 92 ††,*
Redukáló képesség (ASE/ gramm fehérje)	Duodenum	274 ± 20	267 ± 25	306 ± 29*
	Jejunum	284 ± 27	250 ± 13 †	318 ± 18 †,**
	Ileum	280 ± 22	245 ± 22 †	292 ± 25 **
Szabad szulfhidril csoport (mmol/l)	Duodenum	1,68 ± 0,1	1,48 ± 0,1†	1,82 ± 0,1**
	Jejunum	1,81 ± 0,1	1,40 ± 0,1 ††	2,04 ± 0,3 **
	Ileum	1,37 ± 0,1	1,17 ± 0,2 ††	1,57 ± 0,1 **
Hidrogén-donor aktivitás (gátlás %)	Duodenum	89 ± 6,1	81 ± 7,2	95 ± 4,9**
	Jejunum	99 ± 4,7	71 ± 6,6	86 ± 8,1 ††,**
	Ileum	78 ± 6,8	58 ± 9,4 ††	69 ± 7,7 *

11. táblázat Vékonybél nyálkahártya antioxidáns státusz. †: p< 0,05 vs. Áloperált csoport; ††: p<0,01 vs. Áloperált csoport; *: p< 0,05 vs. IR-csoport; **: p<0,01 vs. IR-csoport

4.2.5. Mikrobiológiai vizsgálatok

Az áloperált csoport nyirokcsomó, lép, máj, tüdő és vese szöveti homogenizátumok nem mutattak GFP-termelő E.coli baktérium kolonizációt. Azonban a mesenterialis ischaemia-reperfúzió átesett csoportokban GFP-termelő E.coli változó mértékben volt tenyészhető a különböző szöveti mintákban. A postcondicionálás szignifikánsan csökkentette a távoli szervekbe (nyirokcsomó, lép, máj, tüdő és vese) való bakteriális transzlokáció megjelenését, valamint jelentősen csökkentette a pozitív minták átlagos csíraszámát is. (12., 13. táblázat)

Kísérleti csoport	mncs	lép	máj	tüdő	vese
SHAM	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15
IR	14/15 (93 %)	13/15 (86 %)	12/15 (80 %)	10/15 (67 %)	9/15 (60 %)
PC	6/15 ** (40 %)	5/15 ** (33 %)	5/15 * (33 %)	3/15 * (20%)	3/15 * (20 %)

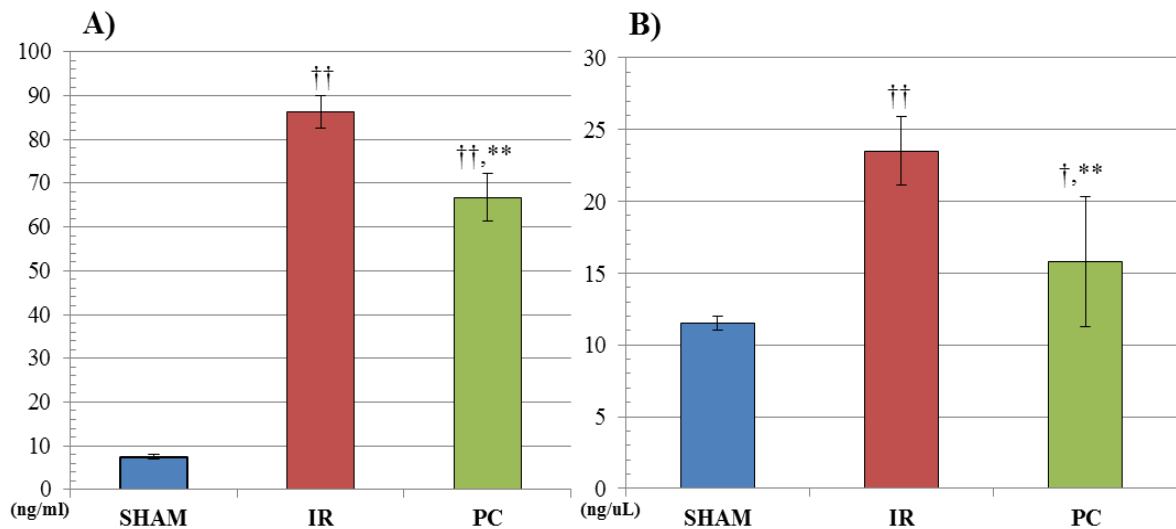
12. táblázat GFP-termelő E.coli baktérium távoli szervekbe való transzlokációs incidenciája.
*: p< 0,05 vs. IR-csoport; **: p<0,01 vs. IR-csoport (mncs=mesenterialis nyirokcsomó)

Kísérleti csoport	mncs	lép	máj	tüdő	vese
SHAM	–	–	–	–	–
IR	1498 ± 76	1362 ± 92	1306 ± 89	1113 ± 128	1080 ± 101
PC	1197 ± 60 **	1140 ± 77 **	1068 ± 71 **	930 ± 25 *	910 ± 33 *

13. táblázat Távoli szervekből izolált GFP-termelő E.coli baktérium átlagos csíraszama. Az eredményeket telepképző egység (CFU)/gramm szövet koncentrációba tüntették fel. *: p<0,05 vs. IR-csoport; **: p<0,01 vs. IR-csoport (mncs=mesenterialis nyirokcsomó)

4.2.6. Szérum I-FABP és d-laktát

A szérum I-FABP koncentráció szignifikánsan emelkedet a reperfüzió hatodik órájában az IR- és PC-csoportban az áloperált csoporthoz képest. Azonban a postcondicionált csoport szérum I-FABP koncentrációja statisztikailag alacsonyabb értéket mutatott az IR-csoporthoz képest. A mesenterialis ischaemia-reperfüzió jelentős szérum d-laktát koncentráció emelkedést okozott, az áloperált csoporthoz képest az IR- és PC-csoportokban. A postcondicionálás szignifikánsan mérsékelte az IR-csoportban mért d-laktát koncentráció emelkedést. (32. ábra)

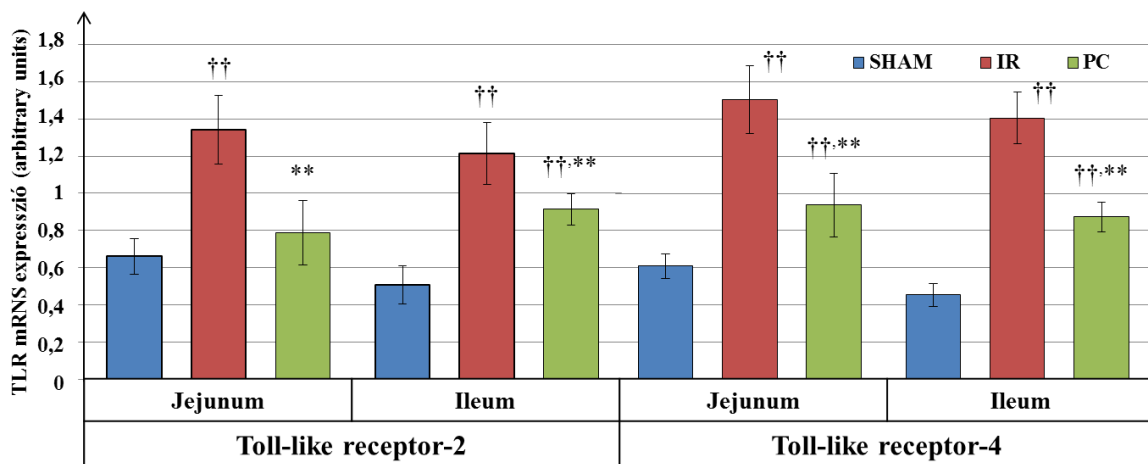


32. ábra Szérum I-FABP (A) és d-laktát (B) koncentráció változások mesenterialis ischaemia-reperfüziót követően. †: p<0,05 vs. Áloperált csoport; ††: p<0,01 vs. Áloperált csoport; **: p<0,01 vs. IR-csoport

4.3. III. Kísérlet eredményei

4.3.1. Mucosalis TLR-2 és TLR-4 mRNS expressziós mintázat

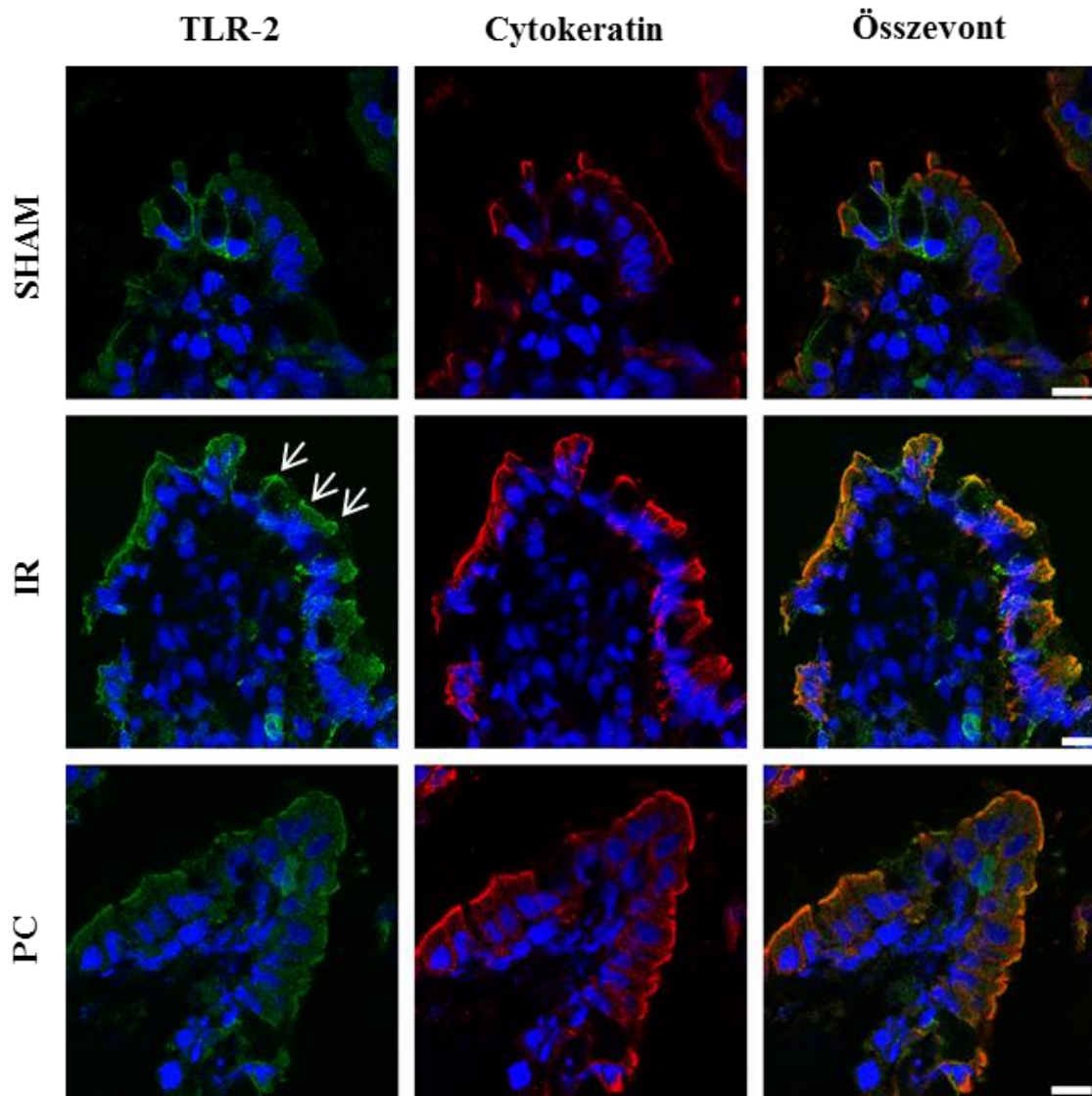
A 60 perces mesenterialis ischaemia és 6 órás reperfúzió jelentős TLR-2 és TLR-4 mRNS expresszió emelkedést okozott az IR- és postcondicionált csoportok vékonybél mintáin, az áloperált csoporthoz képest ez a különbség szignifikánsnak bizonyult, kivéve a jejunum TLR-2 mRNS expresszió esetében ahol a különbség csak tendenciában figyelhető meg. A postcondicionálás alkalmazása szignifikánsan csökkentette a jejunum és ileum TLR-2 és TLR-4 mRNS expresszióját az IR-csoporthoz képest. (33.ábra)



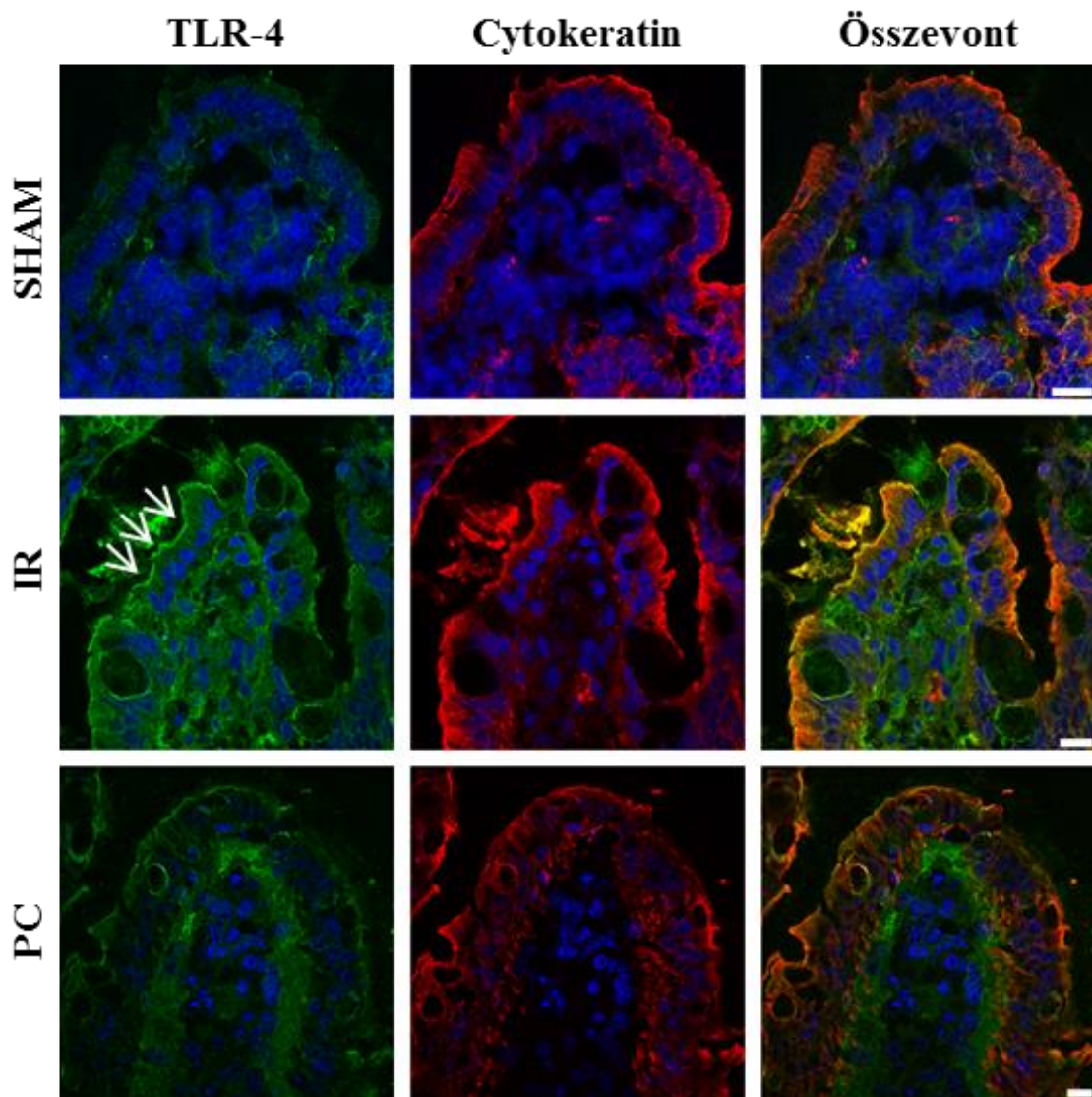
33. ábra Bélnyálkahártya homogenizátumból meghatározott Toll-like receptor-2,-4 mRNS változás.
^{††}: p<0,01 vs. Áloperált csoport; ^{**}: p<0,01 vs. IR-csoport

4.3.2. Vékonybél TLR-2 és TLR-4 fehérje expressziós változások vizsgálata konfokális mikroszkópiával

A további TLR-2 és TLR-4 expressziós változások jellemzésére dupla immunfluoreszcencia módszerrel jelöltük a jejunum és ileum minták TLR-2 vagy TLR-4 és citokeratin fehérjéit. Az intestinalis epithelialis sejtek szelektív jelölésére használtuk a citokeratin fehérje festését. Az áloperált csoportban minimális TLR-2 és TLR-4 fehérje expressziót detektáltunk. Ezzel szemben intenzívebb TLR-2 és TLR-4 expresszió volt látható az ischaemia-reperfúzióra kitett csoportokban, ezen fehérjék főleg az intestinalis epithelialis sejtek apikális részen voltak megfigyelhetők. Az ischaemia-reperfúziónak kitett csoportok összehasonlítása során, a postcondicionált csoport TLR-2 és TLR-4 immunpozitivitása jelentősen alacsonyabb volt az IR-csoportban detektálthoz képest. (34. ábra, 35. ábra)



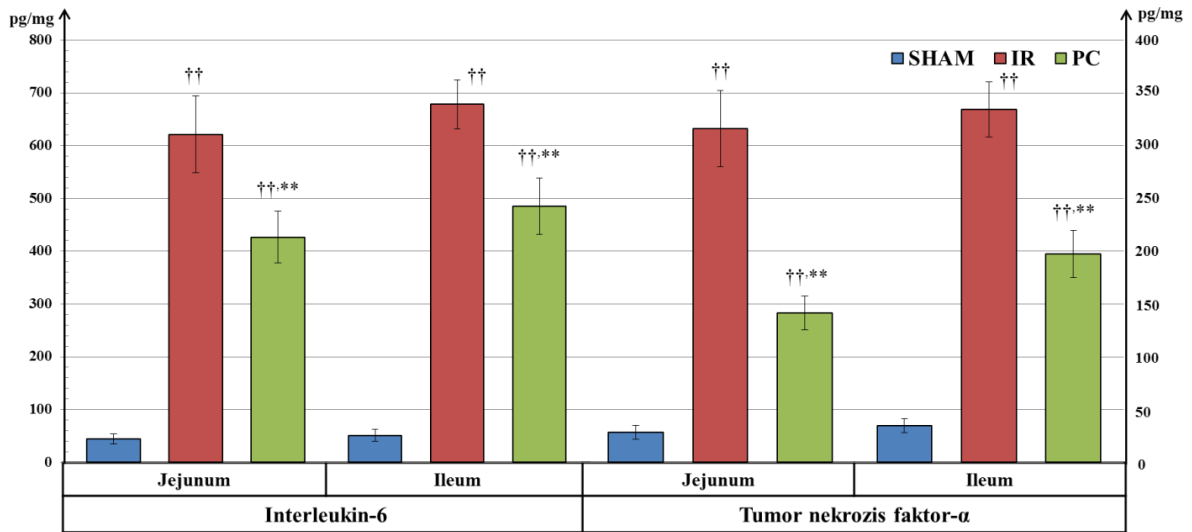
34. ábra Reprezentatív jejunum TLR-2 (zöld) és Cytokeratin (piros) konfokális mikroszkópos kép, a nyilak az IR-csoport erős immunpozitivitását mutatják, az összevont képen a TLR-2 és a citokeratin egyszerre jelenik meg. (scale bar: 10 μ m)



35. ábra Reprezentatív jejunum TLR-4 (zöld) és Citokeratin (piros) konfokális mikroszkópos kép, nyilak az IR-csoport erős immunpozitivitást mutatják, az összevont képen a TLR-4 és a citokeratin egyszerre jelennek meg. (scale bar: 10 μ m)

4.3.3. Mucosalis IL-6 és TNF- α koncentrációk

A jejunum és ileum nyálkahártya homogenizátumban meghatározott proinflammatorikus citokinek hasonló változásokat mutatott mindkét vizsgált vékonybél szegmensben. Az áloperált csoporthoz képest a mesenterialis ischaemia-reperfúzió szignifikánsan emelkedett IL-6 és TNF- α szinteket okozott. Az IR-csoporthoz képest az ischaemia végén alkalmazott postcondicionálási algoritmus szignifikánsan csökkentett a jejunum és ileum IL-6 és TNF- α koncentrációkat. (36.ábra)

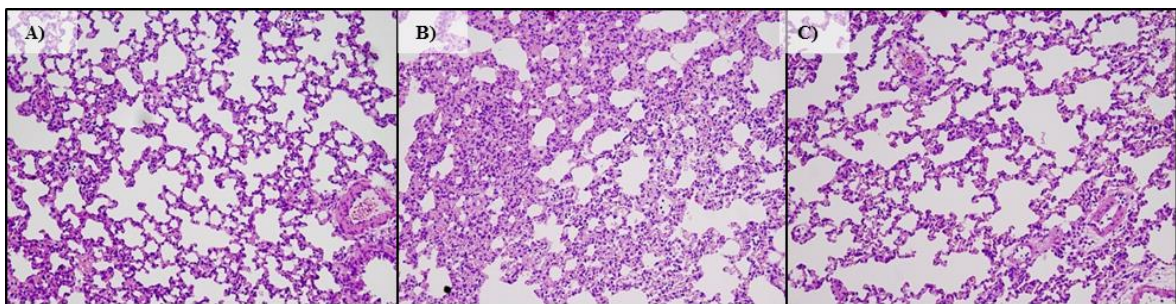


36. ábra Jejunum és ileum nyálkahártya interleukin-6 és tumor necrosis faktor-α koncentrációk.
 ††: p<0,01 vs. Áloperált csoport; **: p<0,01 vs. IR-csoport

4.4. IV. Kísérlet eredményei

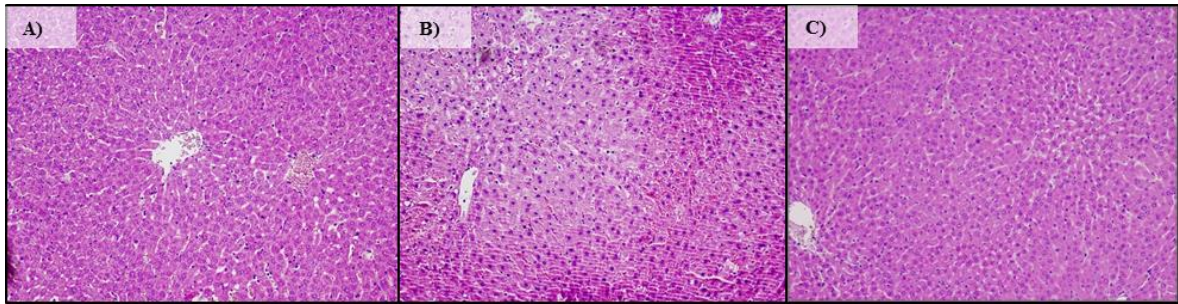
4.4.1. Távoli szervek szövettana

A távoli szervek tekintetében a *tüdő* esetében diffúz alveoláris károsodás, az alveoláris szeptumok megvastagodása, helyenként parciális atelectasia valamint oedema volt megfigyelhető a IR-csoport metszetein. Ezzel szemben, jóval enyhébb falvastagodásával, mérsékelt gyulladással a postcondicionált csoport szövettani metszetei sokkal jobban emlékeztettek az áloperált csoport ép szövettani képére.(37.ábra)



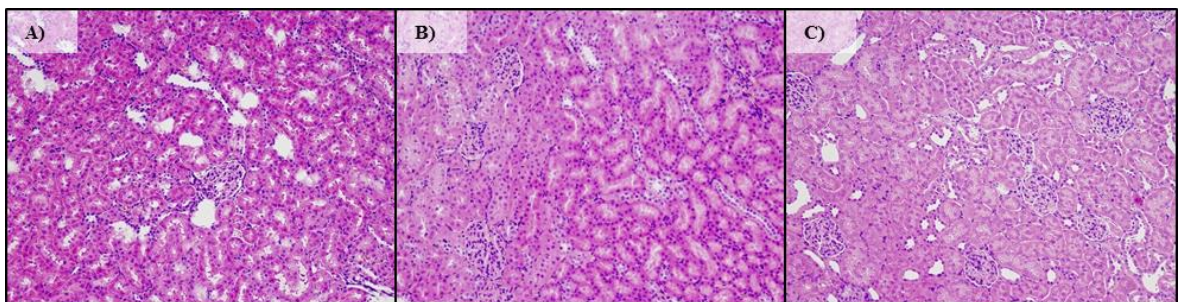
37. ábra Kísérletes csoportok reprezentatív tüdő szövettani képe. A) Áloperált csoport, B) IR-csoport, C) PC-csoport.
 Forrás: Ónody P et al, Magy Seb, 2012. [437]

Az IR-csoportból származó *máj* metszetein kiterjedt elváltozások mutatkoztak. Itt extenzív, főként periportális-midzonális necrosis, periportális bevérzések, gyulladással infiltráció és szinusoidális tágulat ábrázolódt, mely sérülések a postcondicionált csoportban jóval enyhébben jelentkeztek.(38.ábra)



38. ábra Kísérletes csoportok reprezentatív máj szövettani képe. A) Áloperált csoport, B) IR-csoport, C) PC-csoport.
Forrás: Ónody P et al, Magy Seb, 2012. [437]

A vese tekintetében csupán kismértékű szöveti károsodásra utaló jeleket találtunk. A fiziológias képet mutató áloperált csoport metszeteivel szemben az IR-csoportban fokozódott a sejtek eosinofíliája, valamint kismértékű szöveti dezorganizáció alakult ki, mely elváltozások jelei a postcondicionált csoport esetében nem mutatkoztak. (39.ábra)



39. ábra Kísérletes csoportok reprezentatív vese szövettani képe. A) Áloperált csoport, B) IR-csoport, C) PC-csoport.
Forrás: Ónody P et al, Magy Seb, 2012. [437]

4.4.2. Szöveti károsodást jelző szérumban paraméterek

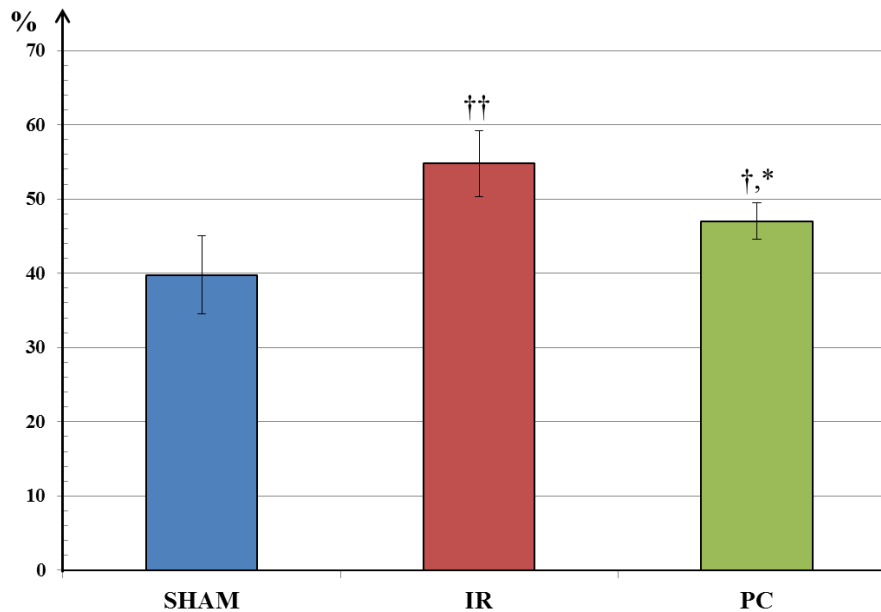
Az egyes csoportok szérumban paramétereinek necroenzim-aktivitásértékei jellegzetes különbséget mutattak amik a szövettani elváltozásokkal jól korrelálnak. A laktát-dehidrogenáz, kreatin-kináz, alanin-aminotranszferáz és aszpartát-aminotranszferáz necroenzimek jelentősen emelkedtek az ischaemia-reperfúzióra kitett csoportokban. Az IR-csoportban képest a postcondicionálás szignifikánsan csökkentette a vizsgált szérumban necroenzim szinteket, kivéve a szérumban alanin-aminotranszferáz koncentráció tekintetében ahol a különbség csak tendenciában volt megfigyelhető ($p=0,24$). Az IR-csoport szérumban kreatinin szintje az áloperált-csoportban képest szignifikánsan emelkedett. Ezzel szemben a postcondicionált csoportban nem volt kimutatható szérumban kreatinin koncentráció emelkedés. (14. táblázat)

Vizsgált paraméter	Áloperált	IR-csoport	PC-csoport
LDH (U/l)	364 ± 72	799 ± 407	445 ± 168*
CK (U/l)	521 ± 139	1093 ± 740	534 ± 176 *
ASAT (U/l)	78 ± 19	270 ± 76	164 ± 124*
ALAT (U/l)	34 ± 5	194 ± 116	148 ± 121
Kreatinin (µmol/l)	31 ± 5	51 ± 12	31 ± 16*

14. táblázat Vizsgált kísérleti csoportok szérumban necroenzim és kreatinin koncentráció változások.
*: p<0,05 vs. IR-csoport

4.4.3. Tüdő oedema index vizsgálata

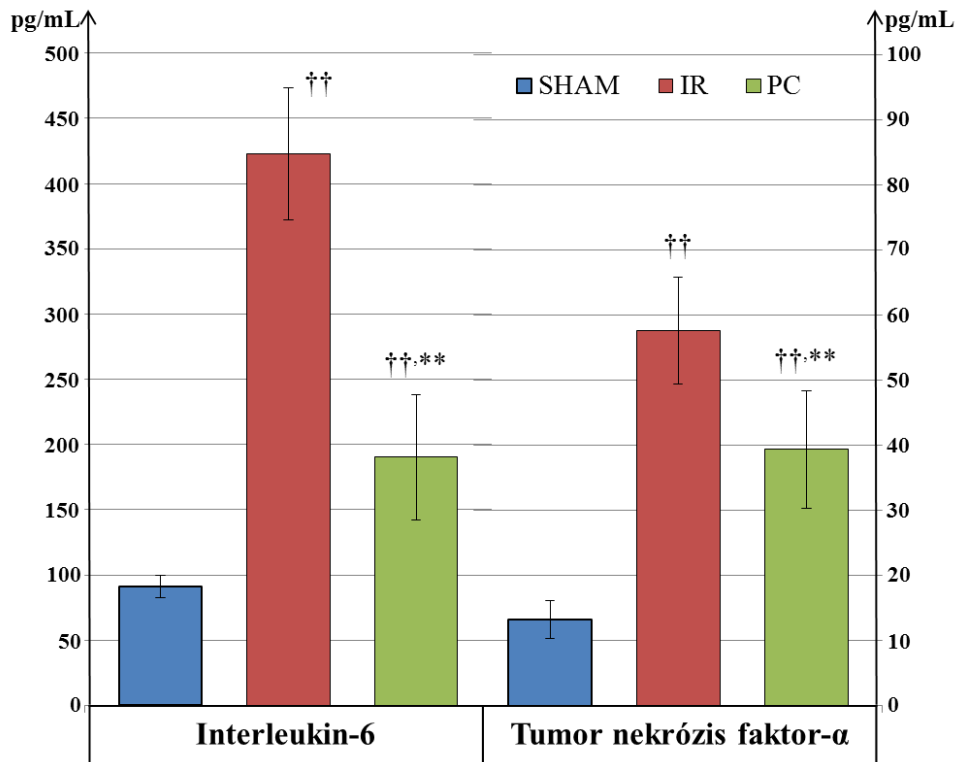
A tüdő nedvességtartalmának kiszámítása során az áloperált csoport eredményeihez képest az IR-csoportban szignifikánsan magasabb ($p<0,01$) értékeket mértünk. A postcondicionálás alkalmazása szignifikánsan csökkentette a tüdő nedvességtartalmát az IR-csoporthoz képest ($p=0,013$). (40. ábra)



40. ábra Kísérleti csoportok tüdő interstitialis szövetének nedvességtartalma.
†: p<0,05 vs. Áloperált csoport; ††: p<0,01 vs. Áloperált csoport; *: p<0,05 vs. IR-csoport

4.4.4. Szérum IL-6 és TNF- α szintek

A szisztémás gyulladást jellemző markerek IL-6 és TNF- α koncentrációja az áloperált csoporthoz képest szignifikánsan emelkedett a mesenterialis ischaemia-reperfúzióknak kitett csoportok szérumban. Mindkét proinflammatorikus citokin tekintetében az IR-csoporthoz képest a postcondicionálás szignifikánsan csökkentette plazma koncentrációjukat.(41.ábra)



41. ábra Szérum Interleukin-6 és Tumor necrosis faktor- α változások.

††: $p < 0,01$ vs. Áloperált csoport; **: $p < 0,01$ vs. IR-csoport.

Forrás: Ónody P et al, Magy Seb, 2012. [437]

5. Megbeszélés

A vékonybél mesenterialis ischaemia talaján kialakuló ischaemiás-reperfúziós károsodása napjainkban is életveszélyes, sürgősségi kórkép.[37] A kimenetelt alapvetően a gyors felismerés és megfelelő kezelés határozza meg. Az akut artériás occlusio (embolisatio vagy thrombosis) visszavezethető – és egyben a leggyakrabban előforduló [35,36]– vékonybél keringészavarok esetében a kezelés döntően sebészi. A bizonytalan és szegényes tünetek miatt a mesenterialis infarctus diagnózisa gyakran késik, ami fokozódó bélkárosodást von maga után. Az elhalt bélszakaszok resectióját, az embolus vagy thrombus eltávolítását és az érpalya reconstructióját követően meginduló véráramlás (reperfúzió) - bár kétségtelenül elengedhetetlen a túlélés szempontjából - az ischaemia következtében károsodott bél állapotát paradox módon tovább rontja.[92,289-291] Az így létrejövő ischaemiás-reperfúziós károsodás ismételt bélresectiókat tehet szükségessé, ami tovább rontja a beteg túlélési esélyeit.[292,293] Az IR károsodás mérséklése jelentős és egyelőre nem megoldott klinikai problémát okoz.

Az IR károsodás mérséklésére számos módszert teszteltek jelentősebb siker nélkül, [294-300] míg érdemi változást a Murry által közölt preconditionálás[301] hozott. Ezt követően szerteágazó kutatómunka indult és hatalmas előrelépés történt mind az ischaemiás-reperfúziós kórállapotok patomechanizmusának megértésében, mind a potenciális kezelési lehetőségek vizsgálatában. Ennek ellenére igazán hatékony módszerek csak korlátozott számban ismertek és ennél is kevesebb alkalmazható a mindennapi klinikai gyakorlatban.

A preconditionálás leírását követően mintegy 10 évnek kellett eltelnie, míg Hotter és mtsai ezen kezelésnek a vékonybél IR károsodására gyakorolt hatásait feltérképezték.[302] Azóta más tanulmányok is születtek, melyek szintén a preconditionálás hatásos voltát igazolták.[303-306] A preconditionálás IR károsodásokat mérséklő hatékonysága vetette fel ezen kórképekben a postcondicionálás esetleges védő hatásának lehetőségét. Az eddig ismert összehasonlító vizsgálatok a postcondicionálás hatékonyságát alátámasztották, de igen kevés tanulmány született a módszer alkalmazhatóságáról a mesenterialis területet érintő IR károsodások esetében.[307-309]

Figyelembe véve, hogy arteria mesenterica superior occlusio esetén csak kis százalékban tervezett, döntő többségében azonban nem tervezett, akut műtéti beavatkozással (embolectomia, trombectomia) és kontrollált körülmények között létrehozott ischaemiával állunk szemben, az IR károsodás mérséklésére csak olyan beavatkozások jöhetnek szóba, melyek a reperfúzió kezdetén alkalmazva képesek védőhatásukat kifejteni. Az ischaemiás preconditionálás ennek megfelelően nem alkalmazható [310], bár a vizsgálatából nyert ismeretek hozzájárulnak az egész kérdéskör teljesebb megértéséhez.

A postcondicionálás, melyet Vinten-Johansen írt le 2002-ben [230], talán az egyik legtöbbet vizsgált és legígéretesebbnek tűnő protektív stratégia vékonybél esetében. Már az első vizsgálatok fényt derítettek arra, hogy a reperfúzió kezdetén alkalmazott sebésztechnikai manőver akár a preconditionálással egyenértékű károsodás-csökkenést képes biztosítani.[231] Sebészi megoldást igénylő kórképekről lévén szó, a postcondicionálás invazivitása nem jelent problémát, tehát ideálisan alkalmazható. A postcondicionálást szív esetében vizsgálták legtöbbet, de számos más szervben is alkalmasnak találták az IR károsodás mérséklésére.[311-316] Maga a hatásmechanizmus csak részben tisztázott és nem kellően ismertek az esetleges szervi specificitások sem.

Bár az alapmechanizmus azonos, maga az IR károsodás igen eltérő megjelenésű lehet az egyes szervekben, szövetekben. A bélrendszer érintettsége esetén például jellemző az igen kifejezett oxidatív stressz és a barrier funkció károsodása következtében kialakuló, csak ezen szervrendszerre jellemző, bakteriális transzlokáció.[23,29] Vékonybél károsodás esetén, a hatalmas szekréción felületet jelentő mucosa gyorsan képes a szervezet számára kritikus mennyiségű gyulladáshoz citokinek termelésére.[23,317,318] Ezen molekulák a szisztémás keringésbe kerülve rövid időn belül generalizált gyulladást idéznek elő, melynek tartós fennállása távoli szervek károsodását okozhatja.[28,196,319] E hatások mérséklése érdekében a postcondicionálás jótékony hatású lehet, mivel a bélre vonatkozóan is igaz, hogy a sejtszintű károsodások szempontjából a reperfúzió első percei bírnak döntő jelentőséggel.[266,269]

Tekintve, hogy a postcondicionálás a vékonybél ischaemiás-reperfúziós károsodására gyakorolt hatásával egyelőre igen kevés közlemény foglalkozik, célul tűztük ki e hatásmechanizmus vizsgálatát patkány *arteria mesenterica superior* occlusiós modellben. Az előzőekben bemutatott kísérletek a postcondicionálás a reperfúzió korai szakaszában manifesztálódó lokális és a késői szakaszában jelentkező távoli szervi károsodásokra kifejtett hatását vizsgálták.

Ismert, hogy a postcondicionálás hatásosságát alapvetően három tényező határozza meg: 1) az ischaemia vége és az első reocclusió között eltelt idő, 2) a reocclusiós ciklusok száma, valamint 3) az egyes reocclusiók és az intermittáló reperfúziók időtartama.[235,240]

Bár a rendelkezésre álló irodalmi adatok különbözőek, konszenzus látszik a tekintetben, hogy az ischaemia vége és az első reocclusió közti időintervallumnak rövidnek kell lennie. In vivo patkánymodellben leírták, hogy a postcondicionálás infarctust csökkentő hatása nem érvényesül abban az esetben, ha az első reocclusió 10 másodperc helyett, csak 1 perc elteltével szakítja meg a reperfúziót. Ebben az esetben a szöveti szabadgyök terhelése és plazma malondialdehid koncentráció nem mutatott különbséget a kontroll csoporthoz képest.[235] Nyulaknál a postcondicionálás védő hatása abban az esetben fejlődik ki, ha a manővert a reperfúzió kezdetétől számítva 30 másodpercen belül

kezdik, de nem hatásos a PC sem akkor, ha 60 másodperces, sem akkor, ha 10 perces reperfúzió után kezdik az első ciklust.[236,238] A legtöbb tanulmányban 60 másodpercen belül megkezdett PC-t tartanak hatásosnak, azonban néhány közlemény beszámol az infarcterült területek csökkenéséről abban az esetben is, ha a postcondicionálás első reocclusiós ciklusát a reperfúzió 60. másodperce helyett csak 180 másodperc elteltével kezdték.[266,320-322] Az első postcondicionálási kísérletek kudarca valószínűleg annak tudható be, hogy a PC-t még ennél is sokkal hosszabb idő múlva, 5 perces reperfúziót követően kezdték meg.[323]

Vékonybél IR modellben, az index ischaemiát követő 3 perccel kezdett postcondicionálás esetében a bélnyálkahártya károsodás nem mérséklődik, a manőver szabadgyök csökkentő hatása nem érvényesült, és jelentősen magasabb plazma malondialdehid és proinflammatorikus citokin koncentrációt mértek, mint abban a csoportban ahol a postcondicionálást az ischaemiát követően 30 másodperccel kezdték meg.[307,324] A postcondicionálási ciklusok száma úgy tűnik, hogy tág határok között változtatható anélkül, hogy befolyásolná a manőver eredményességét. Kin és mtsai.[235] leírták patkány myocardialis IR modellben, hogy 3 postcondicionálási ciklus alkalmazásával azonos infarctus csökkentő hatás érhető el mint 6 ciklussal. Hasonló modellben, de nyulak esetében Yang és mtsai.[236] 4 és 6 postcondicionálási ciklus alkalmazásával azonos védő hatást értek el. Izolált egér szív modellben is bizonyították a 3 és 6 postcondicionálási ciklus hasonló védő hatását.[237] Mindazonáltal nem teljesen indifferens a postcondicionálási „stimulus” erőssége sem: túl kevés ciklus és/vagy az ischaemia/reperfúzió túl rövid időtartama a ciklusokon belül, meghiúsíthatja a necrosis-csökkentő hatás kifejlődését. Sertéseknél a bal koszorúér 60 perces occlusiója esetén a 30 másodperces postcondicionálási ciklusok számának 4-ről 8-ra [325] emelését találták szükségesnek ahhoz, hogy a védelem kialakulhasson. Patkány bőrlebeny 6 órás ischaemiát követően alkalmazott 6x15 másodperces postcondicionálása nem okozott jelentős különbséget a kontroll csoporthoz képest, viszont a ciklus időtartamát megnövelve (6x30 másodperc) jelentősen csökkent a bőr necrotikus területe. A postcondicionálási ciklus további növelése (6x1 perc) nem fokozta a manőver védő hatását, ellenkezőleg: a 6x30 másodperces ciklusokhoz képest kisebb védelmet biztosított.[315] Tehát a túl sok ciklus és/vagy túl hosszú ischaemiás/reperfúziós epizódok is rontják a manőver hatékonyságát. Túl hosszú reocclusiós ciklusok alkalmazásakor a PC során elszenvedett „extra vagy additív” ischaemia limitálja a protektív hatást.[323]A felsoroltak csak kiragadott példák annak bemutatására, hogy még nem alakult ki egységes vélemény a megfelelő postcondicionálási algoritmust illetően, és az ellentmondások feloldása különböző kísérleti elrendezésben végzett vizsgálatoktól aligha várható.

Az eddig publikált tanulmányok vékonybél IR esetében is igazolták a postcondicionálás hatékonyságát. Elsőként Santos és mtsai. írták le patkány modellben a postcondicionálás vékonybél IR-t mérséklő hatását. Vizsgálatuk során 30 perces mesenterialis ischaemiát hoztak létre az arteria mesenterica superior occlusiójával, ezt

relatíve hosszú postcondicionálási ciklusok követték (3x2 perc) amik képesek voltak jelentősen enyhíteni a szövettani elváltozásokat.[309] Később, Liu és mtsai. hosszabb - 60 perces - index ischaemiát követő rövidebb (3x30 másodperces) postcondicionálási ciklusok alkalmazásával számoltak be a postcondicionálás szabadgyök csökkentő hatásáról.[307,324] Sertés vékonybél autotranszplantációs modellben 6 óra hideg ischaemiát követően alkalmazott 3x30 másodperces postcondicionálási ciklusok fokozták az endogén szöveti scavenger funkciót és csökkenték a lipidperoxidáció során keletkezett malondialdehid szöveti koncentrációját.[326] Azonban Bretz és mtsai. [327] nyúl modellt használó vizsgálatában a 45 perces jejunum szegmentális ischaemiát követően alkalmazott 4x30 másodperces postcondicionálás nem csökkentette a 2 órás reperfúzió végén a bélnyálkahártya necrosisát, sem a szöveti oedema mértéket. Ezzel szemben Chu és mtsai.[328] tanulmányában a 45 perces patkány mesenterialis ischaemia után végzett 3x30 másodperces postcondicionálás csökkentette a 60 perces reperfúzió végén a bélnyálkahártya apoptózis intenzitását. (15.táblázat)

Hivatkozás	Kísérleti állat	Kísérleti modell	Ischaemias idő (perc)	Reperfúziós idő (perc)	Algoritmus	Publ. éve
Santos et al.[309]	patkány	AMS occlusio	30	60	3x120	2007
Liu et al.[307,324]	patkány	AMS occlusio	60	60	3x30	2009
Bretz et al.[327]	nyúl	Jejunum szeg. ischaemia	45	120	4x30	2010
Chu W et al.[328]	patkány	AMS occlusio	45	60	3x30	2010
Li YS et al.[329]	patkány	AMS occlusio	60	60	3x30	2010
Ferencz et al.[326]	sertés	Vékonybél autotranszplantáció	60-360 perc hideg ischaemia	180	3x30	2010
Wen et al.[330]	patkány	AMS occlusio	60	120	3x30	2012
Cheng et al.[331]	patkány	AMS occlusio	30	60	3x30	2013
Sengul I et al.[332]	patkány	AMS occlusio	30	120	3x10 6x10	2013
Saját munka [333,334]	patkány	AMS occlusio	60	60	6x10 3x30 3x60	2011 2014

15. táblázat Mesenterialis ischaemiát követően alkalmazott postcondicionálás hatásosságát vizsgáló kísérleti tanulmányok

Az irodalomban található vékonybél postcondicionálást vizsgáló tanulmányok, igen eltérő algoritmusok alkalmazásával tudtak védő hatását igazolni, továbbá a használt kísérleti állatok, alkalmazott kísérleti modellek és az ischaemias valamint a reperfúziós

idő periódusok sem mindig azonosak, ezért nem lehetséges a különböző postcondicionálási algoritmusok hatásosságának közvetlen összehasonlítása.

Ezt áthidalva jelen kísérletünkben azonos körülmények között vizsgáltunk három postcondicionálási algoritmust: egy rövid dinamikus (6x10 másodperces), egy közepes (3x30 másodperces) és egy hosszabb ciklusút (3x1 perces), annak érdekében, hogy megállapítsuk, hogy melyik a legalkalmasabb a vékonybél IR károsodásának mérséklésére patkány modell esetén.

Az ischaemiás-reperfúziós károsodás súlyosságát meghatározó egyik igen jelentős faktor a mikrocirkuláció alakulása. A reperfúzió kezdetén képződő nagymennyiségű szabadgyök aktiválja a leukocytákat és részben indukálja az endothel sejtek adhéziós molekuláinak (CD11b, CD18, ICAM, VCAM, E-selectin, P-selectin) expresszióját, ami fokozott leukocytá kitapadáshoz vezet.[335,336] A reperfundált szövet postcapillaris venuláiban a fehérvérsejtek keringése lelassul, helyenként teljes áramlási akadályt képezve. A jelenség „no-reflow”-ként illetve „reflow-paradox”-ként vált ismertté az irodalomban.[337,338] A mikrocirkulációs elégtelenség képes prolongálni az ischaemiás időt és növelni az irreverzibilisen károsodó területek kiterjedését, valamint fontos kiindulási pontja a szisztémás választ generáló sejtreakcióknak is. Számos, az IR patomechanizmusában résztvevő faktor, az érintett érszakaszra hatva fejti ki károsító hatását, ezért a mikrocirkuláció alakulása a károsodás súlyosságának, illetve a vizsgált beavatkozás hatékonyságának fokmérője lehet.

Kísérletünkben 60 perc mesenterialis ischaemiát választottunk, tekintve, hogy ezen idő periódus elég hosszúnak bizonyult jól mérhető és reprodukálható bél nyálkahártya károsodás létrehozására.[339] Az első kísérletsorozatban az egy óra ischaemiát egy rövid - egy órás - reperfúziós idő követte, hogy a postcondicionálás elsősorban lokális hatásait vizsgáljuk.[340] Ez az első tanulmány mely lézer Doppler flowmeter segítségével vizsgálta a mucosalis keringés alakulását ischaemia-reperfúziót és különböző postcondicionálási algoritmusokat követően. Az eredmények alapján az arteria mesenterica superior 60 perces occlusióját követően mind a három postcondicionált csoportban szignifikánsan javult a nyálkahártya mikrocirkulációja az IR-kontroll csoporthoz képest. A három postcondicionálási algoritmus hatásában mégis jelentős különbség mutatkozott: a 3x1 perces- és a 3x30 másodperces ciklusú postcondicionálás mintegy helyreállította a vékonybél nyálkahártya mikrocirkulációját oly módon, hogy már a reperfúzió kezdetén elérte a kirekesztést megelőző kiindulási értéket és a vizsgált reperfúzió ideje alatt ezen érték 100%-a környékén stabilizálódott. A 6x10 másodperces postcondicionálási ciklusokat követően ehhez képest a mikrocirkuláció hyperaemiás státuszban stabilizálódott.

Humán alkar IR modellben kimutatták, hogy 20 perces ischaemia végén alkalmazott 3x10 másodperces postcondicionálási ciklusok képesek a reperfúzió alatt az endothelialis funkciót megőrizni és a kontroll csoporthoz képest magasabb áramlási

rátát biztosítani az alkaron.[341] Gyurkovics és mtsai. patkány alsó végtagi IR modellben is leírták a postcondicionálás hatására létrejövő keringés javulást a reperfúzió alatt. Tanulmányukban az alkalmazott 6x10 másodperces postcondicionálási algoritmus a reperfúzió alatt az alapáramláshoz képest is magasabb keringési értékeket eredményezett, ami a postcondicionálásnak az endothelialis funkcióra kifejtett protektív hatásával és a „no-reflow” jelenség kivédésével magyarázható.[311]

A mikrocirkuláció mellett követtük az állatok szisztémás keringési paramétereit is, mely a gastrointestinalis traktus esetében meghatározó lehet a lokális keringés alakulása szempontjából. Az SMA leszorítása minden vizsgálati csoportban mintegy 10-15 Hgmm-el emeli meg az artériás középnyomást, mely a kontroll csoportban hirtelen csökkent a reperfúzió kezdetén és a reperfúzió ideje alatt számottevően nem változott. A postcondicionált csoportokban a reperfúzió által okozott csökkenés lassabb, majd a MAP az ischaemia előtti érték közelében stabilizálódott. Ez részben magyarázhatja az IR kontroll csoporthoz képest kedvezőbb mikrocirkulációs értékeket, de nem ad magyarázatot a három postcondicionált csoport közötti különbségre, mivel ezek vérnyomásgörbéi gyakorlatilag együtt mozognak.

Patkány vékonybél ischaemia-reperfúziós modellben Wen és mtsai. leírták az IR indukált bélmucosa JAK/STAT szignál transzdukciós útvonal aktiválódását, ami végső soron fokozott vazokonstriktor molekula (endothelin-1 és tromboxán-A₂) szintézist indukált. Kísérletükben a 60 perces arteria mesenterica superior occlusióját követően alkalmazott 3x30 másodperces postcondicionálás csökkentette a 2 órás reperfúzió végén a plazma ET-1 és TX-A₂ koncentrációkat, és ezáltal mérsékelte a kontroll csoportban tapasztalt vazokonstriktiót.[330] Izolált patkány szív ischaemia-reperfúziós modellben leírták az eNOS expressziójának fokozódását és a bazális NO-termelés emelkedését postcondicionálást követően.[233,250] Ezek a változások szintén felelősek lehetnek a kedvezőbb lokális mikrocirkulációért, mivel képesek az NO/ET aránytalanság helyreállítására, illetve a fehérvérsejtek kitapadásának csökkentésére.[251] A NO trigger és effector szerepet egyaránt betölthet a postcondicionálás során. Mint effector, a „reperfusion injury survival kinase” útvonal célpontjaként szerepel, mely a PC mediálásában résztvevő fő jelátviteli út. [235] A postcondicionálási algoritmusok hatásában megfigyelt mikrokeringési különbségek megértéséhez figyelembe kell vennünk, hogy mivel az L-argininből történő NO szintézise egy oxigén függő folyamat ezért valószínűtlen, hogy a postcondicionálás alatt létrejövő additív ischaemia serkentené az NO szintézist. Kostic és mtsai. izolált tengerimalac szív modellben azt figyelték meg, hogy rövid ischaemiás periódusokat követően jelentősen emelkedet a plazma NO koncentrációja.[342] Ezt a jelenséget endothel dependens áramlás indukálta NO felszabadulásnak nevezték.[343] A vazokonstriktorok csökkent expressziója és a több rövid ciklus során felszabaduló magasabb NO koncentráció a kapillárisokban kialakuló stasis ellen hat, ami a magasabb szisztémás vérnyomás mellett részben magyarázhatja a három PC csoport közötti különbséget.

Az NO-val szinergista hatást fejt ki a postischaemiás szövetekben jelenlévő adenzin, mely PC hatására késleltetetten mosódik ki a szövetekből. Kézenfekvőnek tűnik, hogy ez a késleltető hatás rövidebb ciklushosszak alkalmazásával hatékonyabb és a kritikusnak számító első percekben több aktív metabolit jelenlétét biztosítja.

Az adenzin, receptorához kötődve egyrészt protektív kináz-utak aktiválásában vesz részt,[248,344] másrészt csökkenti a neutrophilek kitapadását és aktiválódását[345,346] valamint a citokin- és szabadgyök termelést, és vazodilatációt is létrehoz.[232,234,249,255]

A hyperaemia természetesen nem feltétlenül számít kedvező jelenségnek, mivel a túlzott oxigénkínálat még több lehetőséget teremt a reaktív szabadgyökök kialakulására, melyek a károsodás potencírozására képesek. A bélnyálkahártya esetében ez a kérdés különösen fontos, mivel igen nagy mennyiségben tartalmaz xantin dehidrogenáz enzimet, mely az ischaemiás szövetben irreverzibilisen xantin oxidázzá alakul és molekuláris oxigén jelenlétében a hipoxantinnal reagálva óriási mennyiségű szabadgyök termelésre képes a reperfúzió kezdetén.[22,105] Ez magyarázhatja a bélnyálkahártya fokozott esendőségét az IR károsodással szemben.

A reperfúzió iniciális fázisban tapasztalható nagy mennyiségű ROS felszabadulást tartják többek között a szövetkárosodásért felelős egyik legfontosabb faktornak. A ROS termelés csúcsát a reperfúzió kezdetétől számított első és a hetedik perc közé teszik, bár a szabadgyök-asszociált károsító hatások jóval később is detektálhatók.[347,348] Kin és mtsai. kimutatták patkány szív IR modellben, hogy az ischaemiát követően azonnal elkezdett postcondicionálás (6x10 másodperces ciklusokkal) képes csökkenteni ezen korai szabadgyök-termelés mértékét, azáltal, hogy fokozatosan juttatja oxigénhez a szöveteket a reperfúzió első perceiben, valamint mérsékli az infarcterált területeken a neutrophil sejtek kitapadását és akkumulációját.[235]

A vékonybél egyes szegmenseiből származó nyálkahártya kaparékából végzett fehérjéhez kötött (szabad szulfhidril SH-csoportok) és fehérjéhez nem kötött (H-donor kapacitás) antioxidáns tulajdonságú molekulák koncentrációjának meghatározása, valamint a minta teljes redukálóképességének mérése során azt tapasztaltuk, hogy az oxidatív stressz mérséklődött a postcondicionálás hatására, az IR-kontroll csoporthoz képest a postcondicionált csoportok magasabb antioxidáns kapacitást mutattak.

Li és mtsai. tanulmányukban hasonló irányú antioxidáns változást tapasztaltak a postcondicionált csoportban. Kísérletükben 1 óra mesenterialis ischaemiát követően alkalmazott 3x30 másodperces postcondicionálási algoritmus fokozta különböző mucosalis antioxidáns hatású fehérjék expresszióját. Az aldóz-reduktáz enzim expressziója 3,2-szeresére, az aldehyd-dehidrogenáz expresszója 4,6-szorosára emelkedett az IR-kontroll csoporthoz képest.[329] Spectrofotometriás méréseink során jelentős különbséget figyeltünk a három postcondicionálási algoritmus között. A vékonybél ileum szegmense esetén csak a 6x10 másodperces postcondicionálási

ciklusok javították szignifikáns módon az antioxidáns státuszt. Ezt a megfigyelést egyrészt az ileum duodenumhoz és jejunumhoz képest korlátozottabb kollaterális rendszere miatti súlyosabb károsodása magyarázhatja.[297,349] Másrészt amennyiben feltételezzük, hogy a reperfúzió első perceiben a kisebb „oxigén-terhelés” határozza meg a későbbi szabadgyökös károsodás mértékét, ez szintén magyarázatot adhat a hosszabb postcondicionálási ciklusok mérsékeltebb hatásosságára.[235] Az érzékenyebb luminometriás mérések ugyanakkor igazolják mind a három postcondicionálási protokoll protektivitását, mely a duodenumban és a jejunumban még kisebb különbséget mutat az antioxidáns kapacitás tekintetében. A bélnyálkahártya redox státuszt jellemző eredményeink jól korrelálnak azon tanulmányokkal, melyek a malondialdehid koncentráció, valamint a lipidperoxidáció mértékének szignifikáns csökkenését tapasztalták postcondicionálás hatására és ebből következtettek a ROS termelődés csökkenésére.[307,326,330]

A reperfúzió első perceiben létrehozott mérsékeltebb oxigén ellátás a nagy mennyiségű xantin-ozidáz jelenlétét és az ebből eredő korai szabadgyök-termelést képes csökkenteni. Ez természetesen direkt és indirekt módon is kedvezően hat a másodlagos szabadgyök-termelő folyamatokra, de nem feltétlenül az egyetlen mechanizmus, mely képes ellensúlyozni a mikrocirkulációban tapasztalt, tartósan fennálló hyperaemia kedvezőtlen hatását. Valószínűnek látszik, hogy a postcondicionálás olyan molekuláris mechanizmusokat is aktivál, melyek több támadásponton képesek visszaszorítani a szabadgyökök képződését. Egyik lehetséges effector ebben az esetben is a NO, mely a korábban említetteknek megfelelően képes csökkenteni a neutrophilek adhézióját a P-selectinek down-regulációján keresztül.[350] Ez azt eredményezi, hogy a lokális leukocita infiltratio és gyulladáshoz vezető reakció mérséklődik, és az ebből eredő, exponenciálisan fokozódó szabadgyök termelés is számottevően csökken. A reperfúzió első órájának végén vett minták már a különböző hatások összegződéséeként megjelenő állapotot tükrözik. A korábban említettek alapján az adenzin ebben a vonatkozásban is a NO-hoz hasonló hatást fejthet ki a gyulladáshoz vezető folyamatokra, gátló hatásának köszönhetően. Úgy tűnik, hogy ezen subcellularis protektív mechanizmusok aktiválásában a 6x10 másodperces PC ciklusok hatékonyabbak, mivel ebben a csoportban mérhető a legkedvezőbb antioxidáns státusz 1 óras reperfúziót követően.

A postcondicionált állatokban szignifikánsan csökkent a szöveti destrukció mértéke, mely hozzájárul a leukocita infiltratio, illetve lokális gyulladás mérséklődéséhez is. Kísérletünk eredményei közül ezt mind a szövettani metszetek, mind a szérumban mért CK- és LDH-aktivitás szignifikáns csökkenésével. Tendenciájában itt is megfigyelhető a 6x10 és a 3x30 másodperces postcondicionálás kedvezőbb volta, de csak az LDH esetén volt kimutatható szignifikáns különbség a három csoport között.

A kisebb szöveti károsodás szorosan összefügg a károsító szabadgyökök csökkentésével, az antioxidáns védelmi vonal megőrzésével, valamint a protektív jelátviteli utak postcondicionálás általi aktiválásával. A postcondicionálás – a hatásmechanizmusával kapcsolatos kezdeti elképzelések szerint- egy „mentő kinázokból” (reperfusion injury salvage kinases – RISK) álló útvonalat aktivál, mely képes az IR károsodás során fellépő necrosis kivédésére. Mára ez az elképzelés túlhaladottá vált, mivel nem sikerült egy specifikus kináz-sor jelenlétét igazolni.[233,258,351,352] Sokkal valószínűbbnek tűnik, hogy a preconditionáláshoz hasonlóan, a postcondicionálás esetében is a mitochondriumok a protektív hatás végső effektorai.

A kapcsolat egyik láncszeme az ischaemiás szövetben kialakuló savas pH, mely az egész útvonal szempontjából döntő jelentőségű. Az irodalmi adatok alapján a szöveti acidosis megszűnéséhez mintegy 40 másodperces reperfüzió szükséges.[239] Kellően rövid postcondicionálási ciklusok alkalmazásával a pH normalizálódása késleltethető azáltal, hogy lassítjuk a felhalmozódott tejsav, ketonsav és protonok kimosódását. A károsodott szövetben ennek a minimális késleltetésnek is igen komoly jelentősége lehet, mert a leginkább meghatározó korai percekben képes a teljes sejtdestructionhoz vezető molekuláris utak kezdeti lépéseit gátolni.[266] A PC által fenntartott savas pH gátolja az mPTP csatornák megnyílását arra a néhány másodpercre, míg a szabadgyökök által aktivált PKC útvonal és a késleltetetlen kimosódó adenoszin receptorialis hatása végleges gátlást nem eredményez.[269] Izolált nyúlszív preparátumon mutatták ki először, hogy a postcondicionálás elhúzódóvá teszi a szöveti pH normalizálódását és amennyiben ezt alkalizálással rendezték, az egyben a PC protektív hatását is gátolta.[239] Sertésben igazolták ugyanezt az elméletet – fordított elrendezésben: a reperfüzió során acidoticus oldat hozzáadásával mesterségesen fenntartott savas pH segítségével a postcondicionáláshoz hasonló védelem indukálható.[353] Az mPTP-csatornák nyitásának gátlása számos fajban az egyik lényeges összetevője a postcondicionálás által nyújtott védelmi mechanizmusnak.[354,355] Az mPTP-csatornát gátló cyclosporin-A-val végzett humán vizsgálatban arról számoltak be, hogy a reperfüzió során adva képes védő hatást indukálni.[356,357] Ez arra enged következtetni, hogy az mPTP-csatornák megnyílása emberben is fontos eleme – és potenciális gátlási pontja – az IR károsodás kialakulásának.[358]

A vena mesenterica superior vérének pH-ját illetően méréseink igazolták, hogy a PC képes számottevően lassítani a pH normalizálódását a kontroll csoporthoz képest, ahol szembetűnő volt az egy perc alatt bekövetkező jelentős pH-emelkedés. Ez arra utal, hogy a 3x1 perces ciklusok nem lehetnek képesek a rövidebb ciklusokhoz hasonló alacsony pH fenntartására, mely magyarázhatja a három protokoll hatásosságában tapasztalt különbségeket. Figyelembe véve azonban, hogy a 3x1 perces postcondicionálási ciklusok is számottevően csökkentették az IR károsodást, az is kézenfekvőnek tűnik, hogy a védő hatás nem kizárólag a pH hipotézisen alapul.

Több szerző pozitív korrelációt talált a bélnyálkahártya károsodás súlyosságának foka és a plazma IL-6 és TNF- α szintje között, ezért megvizsgáltuk, hogy milyen hatással van a postcondicionálás ezen fontos korai gyulladási citokinek szérumszintjeire.[359] Ebben a vonatkozásban minden vizsgált PC algoritmus esetében szignifikánsan kisebb volt a szérumszint a kontroll csoportéhoz képest, közülük azonban a rövidebb ciklushosszakkal végzett PC esetében volt az IL-6 és TNF- α szérumszint emelkedése a legkisebb mértékű. A szövettani elváltozásokat és a szérumszinteket figyelembe véve a hosszabb postcondicionálási ciklusok alkalmazása nem feltétlenül csökkentette kellő mértékben a lokális károsodást ahhoz, hogy az igen jelentős citokin termelésre képes vékonybél mucosa ne indítson el mégis súlyos generalizált gyulladási válaszreakciót. Ez a kérdéskör csak hosszabb reperfüziós periódusok bevezetésével és a távoli szervhatások részletes elemzésével tisztázható.

Kísérletünk eredményei összességében arra utalnak, hogy ebben a modellben a dinamikusabb, rövidebb periódusokból álló, 6x10 másodperces postcondicionálás hatására alakult ki erőteljesebb védelem az ischaemiás-reperfüziós károsodással szemben. Erre alapozva a további vizsgálatoknál ezt az algoritmust használtuk.

A mesenterialis ischaemia-reperfüzió által okozott károsodások jellemzésére egy hosszabb reperfüziós időablakot követően is végeztünk méréseket, ezzel lehetővé téve a lokális és szisztémás válaszreakciók kifejlődését. Az intestinalis flórát körülhatároló, unicelluláris epithelsejtréteg sejtközi kapcsoló struktúráin keresztül gátolja a különböző patogéneknek a bél lumenéből a szervezetbe történő migrációját, ugyanakkor lehetővé teszi a tápanyagok felszívódását. Ez a kettősség az enterocyták funkciójában a paracelluláris tér tight junction struktúrákon keresztül történő szabályozásával érhető el. A claudinok olyan transzmembrán fehérjék, melyeket zonula occludens horgonyzó fehérjék kapcsolnak a cytoskeleton aktin filamentumaihoz.[360] A szervezet epithelialis sejteit képesek szervspecifikusan többfajta pórus- és/vagy barrier-képző tulajdonsággal rendelkező claudin fehérjét expresszálni, ezzel egyedülálló féligáteresztő határokat képezve.[361] Humán vizsgálatok eddig 24 fajta claudint térképeztek fel, ezek közül a claudin-1, -2, -3, -4, -5 és -7 típusokat írták le a bélrendszerben.[362-366] A gastrointestinalis epithelsejtek claudin expressziós mintázata, és ezzel egyidejűleg a paracelluláris tér permeabilitása egy dinamikus változó folyamat, amit több fajta stimulus képes befolyásolni, ezek közül fontos megemlíteni a citokinek, a szabadgyökök, valamint a lumenális baktériumok és metabolikus termékek szerepét.[136,137,367]

Jelen vizsgálatban a claudin-2, claudin-3, claudin-4 és zonula occludens-1 fehérjéket immunfestettük a vékonybél epithelialis tight junction struktúrák integritásának jellemzése céljából. Több tanulmány is összefüggésbe hozta a claudin-2-es expresszióját a paracelluláris permeabilitás fokozódásával, ami az általa képzett kation és víz csatornáknak köszönhető.[368-370] Ezzel szemben a claudin-3-at és claudin-4-et

inkább barrier képző fehérjeként jellemzik, mivel jelenlétük a paracelluláris rezisztencia növekedésével van összefüggésben.[137,371,372] Továbbá egy patkány ileum ischaemia-reperfúzió modellben kimutatták hogy a claudin-4 fontos szerepet játszik az intestinalis epithelialis réteg fiziológias helyreállításához szükséges epithelsejtek apikális irányú migrációjában.[136] A tight junction struktúrák cytoskeletális szabályozása a transzmembrán fehérjék és az aktin cytoskeleton kapcsolatán keresztül zajlik, ami zonula occludens horgonyzó fehérjék közvetítésével történik.[373] Madara és mtsai.[373] kimutatták, hogy a zonula occludens-1 fehérje down-regulációja a bélpermeabilitás fokozódásával hozható összefüggésbe. Kísérletünkben a mesenterialis ischaemia-reperfúzió jelentős tight junction fehérje expresszió változásokat okozott. Az immunhisztokémiai analízis eredményei alapján a claudin-2 és claudin-4 jelenléte fokozódik, míg a claudin-3 és zonula occludens-1 fehérjék expressziója csökken az ischaemia-reperfúzió következtében. Ezen változások összecsengenek az irodalomban leírtakkal, ahol több tanulmány is kiemelte a pórusképző fehérjék fokozott expresszióját ischaemia-reperfúziót követően. [136,374,375] Grootjans és mtsai.[128] beszámoltak az intestinalis epithelialis zonula occludens-1 expresszió csökkenéséről egy human ischaemia-reperfúzió modellben. Az ischaemia-reperfúzió során képződött jelentős mennyiségű szabadgyök, valamint proinflammatorikus citokin szolgálhat magyarázatként a tapasztalt sejtközötti kapcsolat változására. A szabadgyökök okozta membránlipid peroxidáció befolyásolja a claudinok elhelyezkedését a tight junction felépülése során, továbbá a claudinok extracelluláris térszerkezetét biztosító diszulfidhidak érzékenyek a környezet redox állapotára.[137,376,377] Mindemellett a mesenterialis ischaemia-reperfúzió során képződött szabadgyökök aktiválják az NF- κ B dependens proinflammatorikus citokin termelést.[378] A proinflammatorikus citokinek képesek a különböző tight junction fehérjék génexpresszióját megváltoztatni, ezzel a tight junction struktúrák permeabilitásának fokozódását okozva.[367] In vitro vizsgálatok alapján a TNF- α és IL-6 hatására emelkedik a claudin-2 és csökken a zonula occludens-1 membrán kifejeződése.[379-381] A kísérletünk IR-csoportjában megfigyelt változások (claudin-2 expresszió fokozódás és claudin-3, zonula occludens-1 csökkenés) a postcondicionálás hatására mérséklődik, aminek hátterében a kedvezőbb nyálkahártya redox állapot, valamint a kisebb mucosalis és plazma TNF- α és IL-6 koncentráció állhat.

Az intestinalis nyálkahártya állapotának további jellemzésére meghatároztuk a plazma I-FABP és d-laktát koncentrációkat. Az I-FABP egy cytoplasmaticus fehérje mely kizárólag a gastrointestinalis traktust bélelő enterocytákban szintetizálódik és ezen belül a vékonybél villus csúcsán lévő enterocytákban található a legmagasabb koncentrációban.[60,61,382] A vékonybél károsodása esetén az I-FABP a szisztémás keringésbe kerül, emelve ennek plazma koncentrációját.[62-66] Derikx és mtsai. valamint Grootjans és mtsai. human jejunum IR modellje alapján látható, hogy az ischaemia időtartam 30 percről 45 percre emelésével a hisztopatológiai elváltozások súlyossága nő és ezzel párhuzamosan a plazma I-FABP koncentráció is

emelkedik.[128,383] Kísérletünkben a mesenterialis IR okozta vékonybél károsodás jelentős plazma I-FABP koncentráció emelkedést eredményezett. Az ischaemia végén alkalmazott postcondicionálás alacsonyabb plazma I-FABP koncentrációval és kedvezőbb szövettani képpel párosult.

A plazma d-laktát koncentrációt is meghatároztuk mint a vékonybél integritás fokának leírására alkalmas paramétert.[58] A d-laktát a gastrointestinalis traktusban található baktériumok metabolizációs terméke. A bél IR károsodása során a luminális baktériumok elszaporodása elleni védekezés csökkenése, és a nyálkahártya barrier funkció károsodása, lehetővé teszi a megnövekedett baktérium volumen és anyagcsere termékek keringésbe való bejutását, ami emelkedett plazma d-laktát koncentrációt eredményez.[384] Guzmán és mtsai. patkány vékonybél IR modelljében is jelentősen emelkedett a plazma d-laktát koncentrációja 30 perces arteria mesenterica superior occlusiót követően.[359] Kísérletünk során jelentősen emelkedik a plazma d-laktát koncentrációja az IR-csoportban, viszont a postcondicionált csoportban szignifikánsan alacsonyabb d-laktát koncentrációt detektáltunk, ami jól korrelál a bél permeabilitását meghatározó tight junction fehérjék expressziós mintázatával. Sun és mtsai. egy patkány cardiopulmonaris bypass modellben számottevő vékonybél károsodást írtak le, ami a cardiopulmonaris bypass fennállás idejét növelve tovább súlyosbodott. Tanulmányukban a plazma d-laktát koncentrációja a vékonybél károsodással párhuzamosan emelkedett, továbbá negatív korrelációt figyeltek a plazma d-laktát koncentráció és az ileum nyálkahártya ZO-1 és occludin tight junction fehérjék expressziója között.[385]

A bélnyálkahártya károsodásával párhuzamosan kifejlődő barrier permeabilitás fokozódás esetén nagy mennyiségű baktérium kerülhet a véráramba, azaz a baktériumok transzlokálódhatnak. Ennek vizsgálata egy specifikus GFP-termelő E.coli baktériumtenyészet oro-duodenális inokulálását követően történt. A jelölt baktériumok újratenyésztése a reperfüzió végén vett mintákból kizárja a véletlen kontamináció lehetőségét, és bizonyítja a bakteriális transzlokáció gastrointestinalis eredetét. Az kísérletünkben használt GFP-termelő E.coli baktériumtörzset egyéb bakteriális transzlokációs vizsgálatokban is alkalmazták, mivel könnyű a mintákból szelektíven visszatenyészteni és kvantifikálni, továbbá intravitális mikroszkóp segítségével in vivo is követhető. [386-389] Az inokulált baktérium enteroinvazív tulajdonságának hiányát a SHAM operált csoportból származó minták negatív tenyésztési eredményei bizonyítják. A mesenterialis ischaemia-reperfüzió jelentős bakteriális transzlokációt eredményezett, főleg a mesenterialis nyirokcsomókban és a lépben volt nagy csíraszámban tenyészthető a jelölt baktérium. Berg RD.[390] szerint ezek a szervek a gastrointestinalis traktusból transzlokálódott baktériumok első „állomása” a szisztémás továbbterjedés előtt, ami magyarázhatja a magasabb baktérium koncentrációt.[387,391,392] A postcondicionált csoportban alacsonyabb bakteriális transzlokációs ráta volt megfigyelhető, valamint a pozitív minták átlagos csíraszámja is alacsonyabb volt az IR-csoportban tapasztalhoz

képest. Ezen eredmények is megerősítik a postcondicionálás bélnyálkahártya integritására kifejtett protektív hatását.

Annak dacára, hogy az ischaemia-reperfúziós károsodás összetett és multifaktoriális eredetű, a veleszületett immunrendszer fontos szerepet játszik a gyulladással „lavina” elindításában.[186] A Toll-like receptorok (TLR-2 és TLR-4) a legfőbb Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumérzékelők, ami egy erősen konzervált sztereotip mikrobiális antigénmintázat (PAMP) felismerésével történik.[393,394] A legújabb kutatások szerint endogén molekulák (úgynevezett károsodással összefüggő molekuláris mintázatok /DAMP/) is képesek TLR-mediált választ indukálni.

Fiziológiás körülmények között a DAMP-molekulák nincsenek közvetlen érintkezésben az immunrendszerrel. Sejtkárosodás esetén képződnek és szabadulnak fel, (például HMGB-1[395-397], HSP-60[398], HSP-70[399]) vagy az extracelluláris mátrix bomlástermékei (például hyaluronsav fragmentumok, heparán-szulfát, biglycan [174]). De nem csak a sérült vagy apoptotikus sejtekből szabadulnak fel DAMP-molekulák. Irodalmi adatok alátámasztják, hogy apoptotikus sejtek környezetében a makrofágókból is HMGB-1 szabadul fel, ami fontos TLR-2 és TLR-4 aktiváló hatással rendelkezik.[400] A TLR-2 és TLR-4 aktiválása egy olyan szignál transzdukciós jelátviteli utat indít el, mely az NF- κ B nukleáris transzlokációján keresztül több proinflammatorikus citokin indukcióját eredményezi, ezzel fontos szerepet játszva a gyulladással reakciók elindításában.[401,402] Az ischaemia-reperfúzió során keletkező nagy mennyiségű szabadgyök, a növekvő koncentrációban kialakuló DAMP-molekulákkal együtt aktiválja a TLR-2-t és TLR-4-et, aminek hatására további DAMP-molekulák szabadulnak fel, ezzel egy pozitív visszacsatolási hurkot képezve, melynek eredménye egy túlzott gyulladással válaszreakció kialakulása.[402-406] Olyan szervekben mint a máj [407], a szív [408], a vese [409] vagy az agy [410], ahol a TLR-2 és TLR-4 expressziója minimális, a TLR-antagonisták használata alkalmas terápiás módszernek bizonyult az IR-károsodás mérséklésére. Azonban a felsorolt szervekkel ellentétben, a bélben folyamatos „steady-state” TLR-2 és TLR-4 expresszió van jelen, ami létfontosságú az intestinalis epithelialis sejtek homeosztázisában.[188] A bélrendszerben az alacsony DAMP koncentráció és következményes TLR szignalizáció döntő szerepet játszik a sejtek proliferációjában, a sérült szövetek regenerációs folyamataiban és a normális immunválaszban. Cairo és mtsai. leírták, hogy TLR-2 stimulus szükséges az intestinalis epithelialis sejtek fiziológiás barrier funkciójához, a tight junction struktúrák működésében részt vevő zonula occludens-1 indukciója révén.[411] TLR-2 -/- és TLR-4 -/- knockout egereken kimutatták, hogy ezen receptorok hiánya csökkentette a bél ischaemiás toleranciáját, valamint ezekben az állapotokban súlyosabb bélkárosodás és magasabb fokú bakteriális transzlokáció volt megfigyelhető.[188,411-416] Ungaro és mtsai. tanulmánya szerint a TLR-4 antagonisták alkalmazása egér colitises modellben csökkentette a bél gyulladást, ugyanakkor károsította a vastagbél nyálkahártya regenerálódását, valamint a baktériumok elleni lokális immunválaszt. A TLR-4 antagonisták alkalmazása továbbá mérsékelte a

bélproliferációt és regenerációt elősegítő prosztoglandin E2, ciklo-oxigenáz-2 és amfipregulin szinteket.[417] Ezek az eredmények azt támasztják alá, hogy egy teljes TLR-2 és/vagy TLR-4 blokádnak alkalmazása nem célravezető módszer a bél ischaemia-reperfüzió károsodásának mérséklésére, inkább felveti annak a terápiás módszernek a fontosságát, mely a helyi TLR-2 és TLR-4 expressziós egyensúly megőrzésére törekszik, és nem a receptorok gátlására.

Sok tanulmány támasztja alá az ischaemia-reperfüzió kapcsolatát a fokozott TLR-2 és TLR-4 expresszióval, az NF- κ B nukleáris transzlokációval és végső soron az IL-6 és TNF- α szintek emelkedésével.[190,191,417] Kísérletsorozatunkban a 60 perces mesenterialis ischaemia és a 6 óra reperfüzió jelentős TLR-2 és TLR-4 mRNS expresszió emelkedést okozott. Az immunhisztokémiai eredmények is erős TLR-2 és TLR-4 immunpozitivitást mutattak az ischaemia-reperfüzióknak kitett csoportok intestinalis epithelialis (citokeratin pozitív) sejtjeiben. Mindemellett a nyálkahártya IL-6 és TNF- α koncentrációja is jelentősen emelkedett, ami irodalmi adatok alapján szoros kapcsolatban van a TLR-2 és TLR-4 aktivációval.[190,418] Az ischaemiát követően alkalmazott postcondicionálás megfelelő sebésztechnikai módszer lehet a mesenterialis IR során kialakuló öngerjesztő gyulladásos parakrin hurok kialakulásának gátlására. Erre enged következtetni, hogy a postcondicionált csoport kevesebb apoptotikus epithel sejtet és összességében enyhébb hisztopatológiai eltéréseket mutatott, valamint alacsonyabb szabadgyök koncentráció és jobb antioxidáns állapot jellemezte a csoportot. Ezek a változások biztosítják a kedvezőbb szöveti környezetet a postcondicionálást követően, ami képes közvetlenül befolyásolni a TLR-ok aktivitását.[403,404] Ezzel összhangban az RT-PCR és a konfokális mikroszkópia alacsonyabb TLR-2 és TLR-4 expressziót mutatnak a postcondicionált csoportban az IR-csoportéhoz képest. A mesenterialis IR-károsodásra adott kedvezőbb választ az alacsonyabb proinflammatorikus citokinek is megerősítik, melyek szintje Grotz és mtsai.[33] alapján jól tükrözi az IR károsodás lokális intenzitását.

A helyi gyulladásos válasz generalizált gyulladásos válasszá fejlődhet, és állandósíthatja a másodlagos szöveti károsodást. A többszervi elégtelenséget (MOF) megelőző szisztémás gyulladásos válasz (SIRS) jellemzésére a plazma IL-6 és TNF- α koncentrációit használtuk, tekintettel arra, hogy ezen proinflammatorikus hatású citokinek fontos szerepet játszanak a gyulladás fenntartásában. Irodalmi adatok szerint az IL-6 szérumszintje jelentősen emelkedik mesenterialis IR károsodást[128,217], hasi műtétet[419], valamint traumát[420] követően, és az IL-6 szérumszintje a MOF súlyosságával egyenesen-, míg a prognózissal fordítottan korrelált.[421] Rosenbloom és mtsai.[422] májtranszplantációt követően mutatták ki a plazma IL-6 szintjének pozitív korrelációját a fellépő szervelégtelenség súlyosságával. Az IL-6 átmeneti koncentrációemelkedése kulcsszerepet játszik az akut fázis regulációjában [423], azonban tartósan emelkedett szintje a szisztémás gyulladásos válasz fokozódását váltja ki.[15] Ebben jelentős szerepet játszik, hogy képes a PMN- és endothelsejtek aktivációjára, valamint sejtadhéziós fehérjék (E-selectin, P-selectin, ICAM-1, CD 18, CD 11b)

expressziójának fokozására, melynek következtében jelentősen növekszik a keringésből kilépett aktivált neutrophil granulocyták száma.[223,424] A PMN-sejtek szövetkárosító hatásához az IL-6 azzal is hozzájárul, hogy a neutrophil granulocytákban antiapoptotikus jelátviteli utakat aktivál, minek következtében a túlélési szignálban részesülő sejtek hosszabb ideig vannak jelen a szövetekben.[425] Az IL-6 citokin szisztémás gyulladással marker szerepének széleskörű elfogadottságával szemben a TNF- α esetében nem teljesen egybehangzóak az adatok. Rosenbloom és mtsai. [422] szerint a TNF- α nem alkalmas a kialakuló MOF súlyosságának becslésére, míg más, korábbi tanulmányok sem azonosították emelkedett koncentrációját műtét-, illetve IR károsodást követően.[426,427] Ezzel ellentétben más közlemények a TNF- α etiológiai és biomarker szerepéről számolnak be mesenterialis IR-t követő lokális-, valamint szisztémás károsodások, illetve MOF létrejöttében.[290,428] Yamamoto és mtsai.[290] patkánykísérletük során a TNF- α -nak főként a lokális bélkárosodások előidézésében betöltött szerepét vizsgálták mesenterialis ischaemiát követően. Kísérletükben a magas plazma- és szöveti TNF- α koncentrációhoz kifejezett endotoxémia, magasabb ASAT szérumszint, enzimaktivitás értékek, súlyosabb szöveti károsodások, valamint - a bélnyálkahártya barrierjének sérüléséből adódóan - lumenális exsudátum társult. Ezek az elváltozások TNF- α inhibitor alkalmazásakor jelentősen mérséklődtek. Hasonló eredményekre jutottak Yao és mtsai., akik enyhébb távoli szervkárosodást tapasztaltak a TNF- α inhibitor kezelés hatására. Ennek hátterében a TNF- α további proinflammatorikus citokin indukciós hatása és a PMN sejtek aktivációja áll. Kísérletünkben az ischaemiát követően alkalmazott postcondicionálás sikeresen mérsékelte a plazma IL-6 és TNF- α koncentrációkat.

A szisztémás gyulladással válasz hosszú ideig történő fennállása során kialakuló többszervi elégtelenség első „áldozata” általában a tüdő. A károsodás jelei az alveoláris- és interstitialis oedema [429], a tüdőszövet PMN-infiltrációja [319], valamint a vasculáris ellenállás növekedése [32]. A károsodás létrejötte a proinflammatorikus citokinek hatására kialakult fokozott PMN- és endothel sejtek közti interakcióra, valamint az aktivált neutrophilek által termelt szabadgyökök indukálta stresszre vezethető vissza.[429,430] Kísérletünk tüdő szövettani képei is ezt a fajta károsodást tükrözik, továbbá a fokozott tüdőoedemát jellemző „Wet/dry-ratio” is jól mutatja a mesenterialis IR-károsodás okozta másodlagos tüdő elváltozást. A többszervi elégtelenség szindróma folyamatoként veseelégtelenség is kialakul. Aldenir és mtsai.[431] a mesenterialis ischaemia-reperfúzió során kialakult vesekárosodás hátterében fokozott oxidatív stresszt találtak. Kísérletük során 1 óra a. mesenterica superior kirekesztést és 6 óra reperfúziót követően a vese redukált glutation tartalma 40%-kal csökkent, valamint emelkedett a malondialdehid koncentráció, amely tükrözi a fokozódó lipidperoxidációt. Továbbá a proximális tubulussejtek argináz aktivitásának drasztikus visszaeséséről számoltak be. Kísérletünkben a mesenterialis ischaemia-reperfúzió hatására jelentős hisztopatológiai elváltozások voltak megfigyelhetők, emellett a szérumkreatinin koncentráció is emelkedett. A vékonybél postcondicionálás a vesére, mint távoli szervekre kifejtett

kedvező hatása a kevésbé súlyos szövettani elváltozások és az alacsonyabb szérumban kreatinin koncentráció alapján kijelenthető. A mesenterialis ischaemia-reperfúzió okozta májkárosodást a szövettani elváltozások és az emelkedett necroenzim szintek jól tükrözik. Horie és mtsai.[432] vizsgálata alapján ezen elváltozások a máj NO-produkciójának zavara talaján alakulnak ki, tekintve hogy az NO csökkenti az endothel és PMN-sejtek interakcióját[433], és gátolja a leukociták aktivációját[434]. Továbbá leírták, hogy az IR során keletkező nagy mennyiségű szabadgyök a konstitutív NO-szintézis zavarát okozza, aminek következtében az NO hatásai nem tudnak megfelelő mértékben érvényesülni, így fokozott PMN-infiltráció, valamint gyulladás alakulhat ki, melynek következtében a neutrophilek kifejtetik szövetkárosító hatásaikat.[435,436] A postcondicionált csoportban tapasztalt kedvezőbb kép háttérében a kisebb mértékű szabadgyök képződés, valamint alacsonyabb proinflammatorikus citokin szintek állhatnak.[437]

Kísérletsorozatunk során három postcondicionálási protokollt hasonlítottunk közvetlenül össze. Vizsgáltuk a postcondicionálás vékonybél nyálkahártya mikrocirkulációjára, az egyes vékonybélszakaszok antioxidáns és gyulladásos státuszára gyakorolt hatását arteria mesenterica superior oclusio talaján kialakuló ischaemiás-reperfúziós károsodás esetén. Az optimális postcondicionálási algoritmus megtalálását követően, egy hosszabb reperfúziós periódust választva, vizsgáltuk ennek az egyszerű sebésztechnikai manővernek a lokális immunitás és nyálkahártya barrier funkcióra kifejtett hatását. Továbbá vizsgáltuk a vékonybél ischaemiát követően alkalmazott postcondicionálás szerepét a szisztémás gyulladásos válaszreakció és a távoli szervek károsodásának mérséklésében. Ezzel megerősítve és magyarázva azt a szemléletet, mely szerint a reperfúzió kezdeti fázisában történő eredményes közbelépéssel befolyásolható/mérsékelhető a későbbi folyamatok súlyossága.

6. Következtetések

A vizsgálatok tervezésénél feltett kérdésekre az alábbi válaszok adhatók:

1. A vizsgált postcondicionálási algoritmusok hatására a bélnyálkahártya mikrocirkulációja jelentősen javul a reperfüzió ideje alatt. A 6x10 másodperces algoritmus hatására a legkifejezettebb a mikrocirkuláció fokozódása.
2. A vizsgált postcondicionálási algoritmusok különböző mértékben képesek javítani a vékonybél nyálkahártya antioxidáns státuszát. A 3x30- és a 3x60 másodperces algoritmusok hatására a vizsgált antioxidáns paraméterek közül az össz-scavenger kapacitás és a hidrogén-donor aktivitás javulnak. Viszont az ischaemiát követően alkalmazott 6x10 másodperces algoritmus minden vizsgált antioxidáns paraméter szignifikáns javulását eredményezte.
3. A szövettani minták elemzése alapján mind a három vizsgált postcondicionálási algoritmus csökkentette az IR során létrejövő intestinalis morfológiai károsodást. A szérumban a laktát-dehidrogenáz és kreatin-kináz koncentrációk jól tükrözik a postcondicionálás szövetkárosodást mérséklő hatását.
4. A vizsgált postcondicionálási algoritmusok közül csak a 6x10 másodperces és a 3x30 másodperces algoritmusok mérsékeltek a reperfüzió első perceiben a lokális pH normalizálódás sebességét. A 3x60 másodperces ciklusok nem befolyásolták a lokális pH alakulását a vizsgált időpontokban.
5. A három vizsgált postcondicionálási algoritmus közül a 6x10 másodperces ciklusok biztosították a legerőteljesebb védő hatást patkány arteria mesenterica superior occlusiója esetén.
6. A vékonybél ischaemia-reperfüziót követően alkalmazott postcondicionálás hatására a bél barrier funkciót biztosító tight junction fehérjék expressziója megtartott, és a bél permeabilitását fokozó claudin-2 expressziója mérséklődik.
7. A postcondicionálás csökkentette a bakteriális transzlokációt és a pozitív minták átlagos csíraszámát.
8. A vékonybél ischaemiát követően alkalmazott postcondicionálás mérsékli az IR-kontroll csoportban tapasztalt TLR-2 és TLR-4 fokozott expresszióját, és az alapállapothoz közeli TLR-2 és TLR-4 expressziót eredményez.
9. A postcondicionálás képes a mesenterialis IR károsodás következtében létrejövő máj-, tüdő- és vesekárosodást mérsékelni.
10. A mesenterialis ischaemiát követően alkalmazott postcondicionálás jelentősen csökkentette a vizsgált plazma proinflammatorikus citokinek koncentrációját, és ezáltal képes lehet a szisztémás gyulladáshoz vezető válaszreakció kialakulását gátolni.

7. Új megállapítások

1. Kísérletünk eredményei arra utalnak, hogy kisállat mesenterialis IR modellben a dinamikusabb, rövidebb periódusokból álló, 6×10 mp-es postcondicionálás hatására alakult ki erőteljesebb védelem az IR károsodással szemben.
2. Mesenterialis IR során alkalmazott postcondicionálás mérsékli a bél barrier-funkció vesztesét és csökkenti a bakteriális transzlokáció mértékét.
3. A vékonybél IR során végzet postcondicionálás mérsékli az intestinalis epithelialis sejtek TLR-2 és TLR-4 overexpresszióját, ami fontos szerepet játszik a lokális gyulladáshoz vezető válaszreakció kialakulásában.
4. Mesenterialis ischaemia esetén, a postcondicionálás alkalmas sebésztechnikai manőver a vékonybél IR okozta másodlagos tüdő, máj és vese károsodás mérséklésére.

8. Összefoglalás

Bevezetés: A vékonybél ischaemiás-reperfúziós (IR) károsodása napjainkban is magas mortalitással járó kórkép, mely az arteria mesenterica superior occlusiója vagy keringési redistribúció során jelentkezik leggyakrabban. Az ischaemia során a bélfal permeabilitása fokozódik, emiatt, valamint a következményes bakteriális transzlokáció révén nagy mennyiségű endotoxin kerül a szisztémás keringésbe. Az ischaemiás károsodást a reperfúzió tovább súlyosbítja lokális és távoli szervi szövődeményeket okozva. Ebben a folyamatban a toll-like receptorok, mint a természetes immunválasz részei, fontos szerepet játszanak. A postcondicionálás, mely a reperfúzió kezdetén alkalmazott rövid alternáló reperfúziós-reocclusiós ciklusokat jelent, megfelelő sebésztechnikai manőver lehet a mesenterialis IR károsodás mérséklésére. **Célkitűzés:** A kísérletsorozat célja a leghatékonyabb postcondicionálási algoritmus meghatározása volt patkányvékonybél IR modellben. Továbbá vizsgáltuk a postcondicionálás lokális, valamint távoli szervekre kifejtett hatását. **Anyagok és módszerek:** Négy külön kísérlet során vizsgáltuk a postcondicionálás hatásait hím Wistar patkányokon, az arteria mesenterica superior leszorításával létrehozott vékonybél IR- modellben. A postcondicionálás hatását áloperált és IR-kontroll csoportokkal szemben vizsgáltuk. Az első kísérletben három postcondicionálási algoritmust (6x10-; 3x30-; 3x60-másodperc) hasonlítottunk össze 60 perc ischaemia és 60 perc reperfúziót követően. Vizsgáltuk a bél mucosa mikrocirkulációs és redox változásait, a vena mesenterica superior pH alakulását valamint a necroenzimek és gyulladásos citokinek plazma koncentrációját. A következő három kísérletben a 60 perc ischaemiát 6 óra reperfúzió követte, a postcondicionálást 6x10 másodperces ciklusokkal végeztük. Vizsgáltuk az intestinalis epithelialis sejtek közötti tight junction struktúrákat, a preoperatívan inokulált specifikus E.coli baktérium transzlokációját, a Toll-like receptor-2,-4 mucosalis expressziót és a távoli szervek másodlagos károsodását. **Eredmények:** A három vizsgált postcondicionálási algoritmus közül a rövidebb 6x10 másodperces alternáló ciklusokkal értük el a legnagyobb protektív hatást. Ez az algoritmus szignifikánsan javította a mucosalis mikrocirkulációt, mérsékelte az oxidatív stresszt, javította az antioxidáns státuszt, lassította a pH normalizálódási sebességét a reperfúzió korai fázisában, továbbá szignifikánsan csökkentette a necroenzimek és proinflammatorikus citokinek szérumszintjét. Javította az IR során létrejövő bélfal barrier-funkció csökkenését, mérsékelte a Toll-like receptorok overexpresszióját ezáltal csökkentve a proinflammatorikus citokinek koncentrációját, valamint mérsékelve a távoli szervek (máj, tüdő és vese) másodlagos károsodását. **Megbeszélés:** A postcondicionálás alkalmas sebésztechnikai módszer lehet a vékonybél túlélési esélyének javítására arteria mesenterica superior occlusiója során kialakuló ischaemiás-reperfúziós károsodás esetén. A lokális strukturális károsodás mérséklésével párhuzamosan csökkenteni a gyulladásos folyamat generalizálódását és a távoli szervek károsodását.

9. Summary

Introduction: The ischemia-reperfusion (IR) injury of the small intestine is still nowadays associated with high mortality rates. It occurs most commonly as the result of circulatory redistribution failure or occlusion of the superior mesenteric artery. During ischemia the intestinal barrier function decreases leading to bacterial translocation and to the permeation of great amounts of endotoxin into the systemic circulation. The ischemic injury is furthermore aggravated by the reperfusion causing the failure of local and distant organs. In this process the toll-like receptors, as part of the innate immune response, play a pivotal role. Postconditioning (PC), which is the application of short alternating cycles of reperfusion and reocclusion at the onset of the reperfusion, may be a suitable surgical method to reduce mesenteric IR-injury. **Aim:** The experiment series were aimed to identify the most effective PC algorithm in rat small intestine IR. Further aims of the study were to examine the effects of PC on local and distal organs integrity. **Materials & Methods:** We investigated the effects of PC in four separate experiments, using a rat small intestine IR-model. This consisted of the dissection and the atraumatic occlusion of the superior mesenteric artery. The effects of PC were compared to the results of the SHAM-operated- and IR-control experimental groups. In the first experiment three different PC algorithms (6x10-, 3x30-, 3x60-seconds) were compared following 60 minutes of ischemia and reperfusion. We characterized the intestinal mucosa redox state, described the changes in the mucosal microcirculation and measured the pH of blood samples taken from the superior mesenteric vein. Furthermore inflammatory cytokines and necroenzyme concentrations were evaluated. In the following three experiments 60 minutes of ischemia were followed by 6 hours of reperfusion, the applied PC algorithm consisted of 6 alternating cycles of 10-10 seconds reperfusion/reocclusion. We examined the tight junction of intestinal epithelial cells, the translocation rates of a previously inoculated specific E.coli bacteria, the expression changes of mucosal Toll-like receptor-2,-4 and the secondary injury of distant organs. **Results:** Among the examined PC protocols, the shorter algorithm of 10-10 seconds cycles, provided the greatest protective effects. It improved the mucosal microcirculation, reduced the free radical stress, enhanced the antioxidant status, slowed the pH normalization rate during the early phase of the reperfusion and significantly reduced the serum proinflammatory and necroenzyme concentrations. The use of PC significantly reduced the IR induced intestinal barrier function failure, the overexpression of Toll-like receptors-2,-4 and the concomitant increase of proinflammatory cytokines. Finally the application of PC at the onset of the reperfusion significantly decreased the injury of distant organs like liver, lung and kidney. **Conclusion:** PC may be a suitable method to improve the overall survival of the small intestine following mesenteric arterial occlusion and concomitant ischemia-reperfusion injury. PC reduces the local structural damage, while simultaneously attenuating the generalization of the inflammatory processes and the injury of the distant organs.

10. Irodalomjegyzék

1. Brandt LJ, Boley SJ. (2000) AGA technical review on intestinal ischemia. *Gastroenterology*, 118: 954-68.
2. Batellier J, Kieny R. (1990) Superior mesenteric artery embolism: eighty-two cases. *Ann Vasc Surg*, 4: 112-6.
3. Levy PJ, Krausz MM, Manny J. (1990) Acute mesenteric ischemia: improved results—a retrospective analysis of ninety-two patients. *Surgery*, 107: 372-80.
4. Inderbitzi R, Wagner HE, Seiler C, Stirnemann P, Gertsch P. (1992) Acute mesenteric ischaemia. *Eur J Surg*, 158: 123-6.
5. Corcos O, Nuzzo A. (2013) Gastro-intestinal vascular emergencies. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 27: 709-25.
6. Kalra M, Ryer EJ, Oderich GS, Duncan AA, Bower TC, Gloviczki P. (2012) Contemporary results of treatment of acute arterial mesenteric thrombosis: has endovascular treatment improved outcomes? *Perspect Vasc Surg Endovasc Ther*, 24: 171-6.
7. Park WM, Gloviczki P, Cherry KJ, Jr., Hallett JW, Jr., Bower TC, Panneton JM, Schleck C, Ilstrup D, Harmsen WS, Noel AA. (2002) Contemporary management of acute mesenteric ischemia: Factors associated with survival. *J Vasc Surgery*, 35: 445-52.
8. Szabone Revesz E. (2012) Acute mesenteric ischemia: analysis of cases over a ten-years period (2001-2010). *Orv Hetil*, 153: 1424-32.
9. Lock G. (2002) Acute mesenteric ischemia: classification, evaluation and therapy. *Acta Gastroenterol Belg*, 65: 220-5.
10. Yasuhara H. (2005) Acute mesenteric ischemia: the challenge of gastroenterology. *Surg Today*, 35: 185-95.
11. Bulkley GB, Kvietys PR, Perry MA, Granger DN. (1983) Effects of cardiac tamponade on colonic hemodynamics and oxygen uptake. *Am J Physiol*, 244: G604-12.
12. Wilcox MG, Howard TJ, Plaskon LA, Unthank JL, Madura JA. (1995) Current theories of pathogenesis and treatment of nonocclusive mesenteric ischemia. *Dig Dis Sci*, 40: 709-16.
13. Boley SJ, Brandt LJ, Veith FJ. (1978) Ischemic disorders of the intestines. *Curr Probl Surg*, 15: 1-85.
14. Reinus JF, Brandt LJ, Boley SJ. (1990) Ischemic diseases of the bowel. *Gastroenterol Clin North Am*, 19: 319-43.
15. Biffl WL, Moore EE. (1996) Splanchnic ischaemia/reperfusion and multiple organ failure. *Br J Anaesth*, 77: 59-70.
16. Crissinger KD, Tso P. (1992) The role of lipids in ischemia/reperfusion-induced changes in mucosal permeability in developing piglets. *Gastroenterology*, 102: 1693-9.
17. Eltzschig HK, Collard CD. (2004) Vascular ischaemia and reperfusion injury. *Br Med Bull*, 70: 71-86.
18. Russell J, Epstein CJ, Grisham MB, Alexander JS, Yeh KY, Granger DN. (2000) Regulation of E-selectin expression in postischemic intestinal microvasculature. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 278: G878-85.
19. Harward TR, Brooks DL, Flynn TC, Seeger JM. (1993) Multiple organ dysfunction after mesenteric artery revascularization. *J Vasc Surg*, 18: 459-67; discussion 67-9.

20. Ma XL, Johnson G, 3rd, Lefer AM. (1991) Mechanisms of inhibition of nitric oxide production in a murine model of splanchnic artery occlusion shock. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 311: 89-103.
21. Carey C, Siegfried MR, Ma XL, Weyrich AS, Lefer AM. (1992) Antishock and endothelial protective actions of a NO donor in mesenteric ischemia and reperfusion. *Circ Shock*, 38: 209-16.
22. Meneshian A, Bulkley GB. (2002) The physiology of endothelial xanthine oxidase: from urate catabolism to reperfusion injury to inflammatory signal transduction. *Microcirculation*, 9: 161-75.
23. Mallick IH, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM. (2004) Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. *Dig Dis Sci*, 49: 1359-77.
24. Schoenberg MH, Poch B, Younes M, Schwarz A, Baczako K, Lundberg C, Haglund U, Beger HG. (1991) Involvement of neutrophils in postischaemic damage to the small intestine. *Gut*, 32: 905-12.
25. Simpson R, Alon R, Kobzik L, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. (1993) Neutrophil and nonneutrophil-mediated injury in intestinal ischemia-reperfusion. *Ann Surg*, 218: 444-53; discussion 53-4.
26. McCord JM, Roy RS. (1982) The pathophysiology of superoxide: roles in inflammation and ischemia. *Can J Physiol Pharmacol*, 60: 1346-52.
27. Granger DN, McCord JM, Parks DA, Hollwarth ME. (1986) Xanthine oxidase inhibitors attenuate ischemia-induced vascular permeability changes in the cat intestine. *Gastroenterology*, 90: 80-4.
28. Turnage RH, Guice KS, Oldham KT. (1994) Endotoxemia and remote organ injury following intestinal reperfusion. *J Surg Res*, 56: 571-8.
29. Cerqueira NF, Hussni CA, Yoshida WB. (2005) Pathophysiology of mesenteric ischemia/reperfusion: a review. *Acta Cir Bras*, 20: 336-43.
30. Fullerton DA, Hahn AR, Koike K, Banerjee A, Harken AH. (1993) Intracellular mechanisms of pulmonary vasomotor dysfunction in acute lung injury caused by mesenteric ischemia-reperfusion. *Surgery*, 114: 360-6; discussion 6-7.
31. Nakagawa H, Tsunooka N, Yamamoto Y, Yoshida M, Nakata T, Kawachi K. (2009) Intestinal ischemia/reperfusion-induced bacterial translocation and lung injury in atherosclerotic rats with hypoadiponectinemia. *Surgery*, 145: 48-56.
32. Koksoy C, Kuzu MA, Ergun H, Demirpence E, Zulfikaroglu B. (2000) Intestinal ischemia and reperfusion impairs vasomotor functions of pulmonary vascular bed. *Ann Surg*, 231: 105-11.
33. Grotz MR, Deitch EA, Ding J, Xu D, Huang Q, Regel G. (1999) Intestinal cytokine response after gut ischemia: role of gut barrier failure. *Ann Surg*, 229: 478-86.
34. Vollmar B, Menger MD. (2011) Intestinal ischemia/reperfusion: microcirculatory pathology and functional consequences. *Langenbecks Arch Surg*, 396: 13-29.
35. Falkensammer J, Oldenburg WA. (2006) Surgical and medical management of mesenteric ischemia. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*, 8: 137-43.
36. Chang RW, Chang JB, Longo WE. (2006) Update in management of mesenteric ischemia. *World J Gastroenterol*, 12: 3243-7.
37. Schoots IG, Koffeman GI, Legemate DA, Levi M, van Gulik TM. (2004) Systematic review of survival after acute mesenteric ischaemia according to disease aetiology. *Br J Surg*, 91: 17-27.
38. Oldenburg WA, Lau LL, Rodenberg TJ, Edmonds HJ, Burger CD. (2004) Acute mesenteric ischemia: a clinical review. *Arch Intern Med*, 164: 1054-62.

39. Ottinger LW. (1978) The surgical management of acute occlusion of the superior mesenteric artery. *Ann Surg*, 188: 721-31.
40. Herbert GS, Steele SR. (2007) Acute and chronic mesenteric ischemia. *Surg Clin North Am*, 87: 1115-34.
41. Kazmers A. (1998) Operative management of chronic mesenteric ischemia. *Ann Vasc Surg*, 12: 299-308.
42. Rhee RY, Gloviczki P, Mendonca CT, Petterson TM, Serry RD, Sarr MG, Johnson CM, Bower TC, Hallett JW, Jr., Cherry KJ, Jr. (1994) Mesenteric venous thrombosis: still a lethal disease in the 1990s. *J Vasc Surg*, 20: 688-97.
43. Morasch MD, Ebaugh JL, Chiou AC, Matsumura JS, Pearce WH, Yao JS. (2001) Mesenteric venous thrombosis: a changing clinical entity. *J Vasc Surg*, 34: 680-4.
44. Kumar S, Sarr MG, Kamath PS. (2001) Mesenteric venous thrombosis. *N Engl J Med*, 345: 1683-8.
45. Steele SR, Martin MJ, Garafalo T, Ko TM, Place RJ. (2003) Superior mesenteric vein thrombosis following laparoscopic Nissen fundoplication. *J Soc Laparoend*, 7: 159-63.
46. Bobadilla JL. (2013) Mesenteric ischemia. *Surg Clin North Am*, 93: 925-40, ix.
47. Moawad J, Gewertz BL. (1997) Chronic mesenteric ischemia. Clinical presentation and diagnosis. *Surg Clin North Am*, 77: 357-69.
48. Acosta S, Ogren M, Sternby NH, Bergqvist D, Bjorck M. (2005) Clinical implications for the management of acute thromboembolic occlusion of the superior mesenteric artery: autopsy findings in 213 patients. *Ann Surg*, 241: 516-22.
49. Acosta S, Ogren M, Sternby NH, Bergqvist D, Bjorck M. (2006) Fatal nonocclusive mesenteric ischaemia: population-based incidence and risk factors. *J Intern Med*, 259: 305-13.
50. Boley SJ, Brandt LJ, Sammartano RJ. (1997) History of mesenteric ischemia. The evolution of a diagnosis and management. *Surg Clin North Am*, 77: 275-88.
51. Bassiouny HS. (1997) Nonocclusive mesenteric ischemia. *Surg Clin North Am*, 77: 319-26.
52. Wadman M, Syk I, Elmstahl S. (2000) Survival after operations for ischaemic bowel disease. *Eur J Surg*, 166: 872-7.
53. Boley SJ, Feinstein FR, Sammartano R, Brandt LJ, Sprayregen S. (1981) New concepts in the management of emboli of the superior mesenteric artery. *Surg Gynecol Obstet*, 153: 561-9.
54. Furukawa A, Kanasaki S, Kono N, Wakamiya M, Tanaka T, Takahashi M, Murata K. (2009) CT diagnosis of acute mesenteric ischemia from various causes. *Am J Roentgenol*, 192: 408-16.
55. Wasnik A, Kaza RK, Al-Hawary MM, Liu PS, Platt JF. (2011) Multidetector CT imaging in mesenteric ischemia--pearls and pitfalls. *Emerg Radiol*, 18: 145-56.
56. Reginelli A, Iacobellis F, Berritto D, Gagliardi G, Di Grezia G, Rossi M, Fonio P, Grassi R. (2013) Mesenteric ischemia: the importance of differential diagnosis for the surgeon. *BMC Surg*, 13 Suppl 2: S51.
57. Blachar A, Barnes S, Adam SZ, Levy G, Weinstein I, Precel R, Federle MP, Sosna J. (2011) Radiologists' performance in the diagnosis of acute intestinal ischemia, using MDCT and specific CT findings, using a variety of CT protocols. *Emerg Radiol*, 18: 385-94.

- 58.** Evennett NJ, Petrov MS, Mittal A, Windsor JA. (2009) Systematic review and pooled estimates for the diagnostic accuracy of serological markers for intestinal ischemia. *World J Surg*, 33: 1374-83.
- 59.** van den Heijkant TC, Aerts BA, Teijink JA, Buurman WA, Luyer MD. (2013) Challenges in diagnosing mesenteric ischemia. *World J Gastroenterol*, 19: 1338-41.
- 60.** Pelsers MM, Namiot Z, Kisielewski W, Namiot A, Januszkiewicz M, Hermens WT, Glatz JF. (2003) Intestinal-type and liver-type fatty acid-binding protein in the intestine. Tissue distribution and clinical utility. *Clin Biochem*, 36: 529-35.
- 61.** Ockner RK, Manning JA. (1974) Fatty acid-binding protein in small intestine. Identification, isolation, and evidence for its role in cellular fatty acid transport. *J Clin Invest*, 54: 326-38.
- 62.** Thuijls G, van Wijck K, Grootjans J, Derikx JP, van Bijnen AA, Heineman E, Dejong CH, Buurman WA, Poeze M. (2011) Early diagnosis of intestinal ischemia using urinary and plasma fatty acid binding proteins. *Ann Surg*, 253: 303-8.
- 63.** Matsumoto S, Sekine K, Funaoka H, Yamazaki M, Shimizu M, Hayashida K, Kitano M. (2014) Diagnostic performance of plasma biomarkers in patients with acute intestinal ischaemia. *Br J Surg*, 101: 232-8.
- 64.** Guzel M, Sozuer EM, Salt O, Ikizceli I, Akdur O, Yazici C. (2013) The value of the serum I-FABP level for diagnosing acute mesenteric ischemia. *Surg Today*.
- 65.** Kanda T, Fujii H, Tani T, Murakami H, Suda T, Sakai Y, Ono T, Hatakeyama K. (1996) Intestinal fatty acid-binding protein is a useful diagnostic marker for mesenteric infarction in humans. *Gastroenterology*, 110: 339-43.
- 66.** Kanda T, Tsukahara A, Ueki K, Sakai Y, Tani T, Nishimura A, Yamazaki T, Tamiya Y, Tada T, Hirota M, Hasegawa J, Funaoka H, et al. (2011) Diagnosis of ischemic small bowel disease by measurement of serum intestinal fatty acid-binding protein in patients with acute abdomen: a multicenter, observer-blinded validation study. *J Gastroenterol*, 46: 492-500.
- 67.** Wiercinska-Drapalo A, Jaroszewicz J, Siwak E, Pogorzelska J, Prokopowicz D. (2008) Intestinal fatty acid binding protein (I-FABP) as a possible biomarker of ileitis in patients with ulcerative colitis. *Regul Pept*, 147: 25-8.
- 68.** Stolberg L, Rolfe R, Gitlin N, Merritt J, Mann L, Jr., Linder J, Finegold S. (1982) d-Lactic acidosis due to abnormal gut flora: diagnosis and treatment of two cases. *N Engl J Med*, 306: 1344-8.
- 69.** Murray MJ, Gonze MD, Nowak LR, Cobb CF. (1994) Serum D(-)-lactate levels as an aid to diagnosing acute intestinal ischemia. *Am J Surg*, 167: 575-8.
- 70.** Block T, Nilsson TK, Bjorck M, Acosta S. (2008) Diagnostic accuracy of plasma biomarkers for intestinal ischaemia. *Scand J Clin Lab Invest*, 68: 242-8.
- 71.** Kang KP, Lee S, Kang SK. (2006) D-Lactic Acidosis in Humans: Review of Update. *Electrolyte Blood Press*, 4: 53-6.
- 72.** Turksen K, Troy TC. (2004) Barriers built on claudins. *J Cell Sci*, 117: 2435-47.
- 73.** Rosero O, Onody P, Kovacs T, Molnar D, Lotz G, Toth S, Turoczi Z, Fulop A, Garbaisz D, Harsanyi L, Szijarto A. (2014) Impaired Intestinal Mucosal Barrier upon Ischemia-Reperfusion: "Patching Holes in the Shield with a Simple Surgical Method". *Biomed Res Int*, 2014: 11.
- 74.** Rosero O, Kovacs T, Onody P, Harsanyi L, Szijarto A. (2014) Bacterial translocation: gap in the shield. *Orv Hetil*, 155: 304-12.

- 75.** Endean ED, Barnes SL, Kwolek CJ, Minion DJ, Schwarcz TH, Mentzer RM, Jr. (2001) Surgical management of thrombotic acute intestinal ischemia. *Ann Surg*, 233: 801-8.
- 76.** Beaulieu RJ, Arnaoutakis KD, Abularrage CJ, Efron DT, Schneider E, Black JH, 3rd. (2014) Comparison of open and endovascular treatment of acute mesenteric ischemia. *J Vasc Surg*, 59: 159-64.
- 77.** Atkins MD, Kwolek CJ, LaMuraglia GM, Brewster DC, Chung TK, Cambria RP. (2007) Surgical revascularization versus endovascular therapy for chronic mesenteric ischemia: a comparative experience. *J Vasc Surg*, 45: 1162-71.
- 78.** Schermerhorn ML, Giles KA, Hamdan AD, Wyers MC, Pomposelli FB. (2009) Mesenteric revascularization: management and outcomes in the United States, 1988-2006. *J Vasc Surg*, 50: 341-8.e1.
- 79.** Moawad J, McKinsey JF, Wyble CW, Bassiouny HS, Schwartz LB, Gewertz BL. (1997) Current results of surgical therapy for chronic mesenteric ischemia. *Arch Surg*, 132: 613-8; discussion 8-9.
- 80.** Johnston KW, Lindsay TF, Walker PM, Kalman PG. (1995) Mesenteric arterial bypass grafts: early and late results and suggested surgical approach for chronic and acute mesenteric ischemia. *Surgery*, 118: 1-7.
- 81.** Shanley CJ, Ozaki CK, Zelenock GB. (1997) Bypass grafting for chronic mesenteric ischemia. *Surg Clin North Am*, 77: 381-95.
- 82.** Rose SC, Quigley TM, Raker EJ. (1995) Revascularization for chronic mesenteric ischemia: comparison of operative arterial bypass grafting and percutaneous transluminal angioplasty. *J Vasc Interv Radiol*, 6: 339-49.
- 83.** Park WM, Cherry KJ, Jr., Chua HK, Clark RC, Jenkins G, Harmsen WS, Noel AA, Panneton JM, Bower TC, Hallett JW, Jr., Gloviczki P. (2002) Current results of open revascularization for chronic mesenteric ischemia: a standard for comparison. *J Vasc Surg*, 35: 853-9.
- 84.** Jimenez JG, Huber TS, Ozaki CK, Flynn TC, Berceli SA, Lee WA, Seeger JM. (2002) Durability of antegrade synthetic aortomesenteric bypass for chronic mesenteric ischemia. *J Vasc Surg*, 35: 1078-84.
- 85.** Kim HK, Chun JM, Huh S. (2013) Anticoagulation and delayed bowel resection in the management of mesenteric venous thrombosis. *World J Gastroenterol*, 19: 5025-8.
- 86.** Bradbury AW, Brittenden J, McBride K, Ruckley CV. (1995) Mesenteric ischaemia: a multidisciplinary approach. *Br J Surg*, 82: 1446-59.
- 87.** Stringa P, Lausada N, Romanin D, Machuca M, Cabanne A, Rumbo M, Gondolesi G. (2012) Defining the nonreturn time for intestinal ischemia reperfusion injury in mice. *Transplant Proc*, 44: 1214-7.
- 88.** Taha MO, Miranda-Ferreira R, Paez RP, Simoes RS, Boin HC, Martins IA, Versage PF, Silva HF, Penzo LD, Fagundes AL, Oliveira I, Jr., Caricati-Neto A, et al. (2010) Role of L-arginine, a substrate of nitric oxide biosynthesis, on intestinal ischemia-reperfusion in rabbits. *Transplant Proc*, 42: 448-50.
- 89.** Kong SE, Blennerhassett LR, Heel KA, McCauley RD, Hall JC. (1998) Ischaemia-reperfusion injury to the intestine. *Aust N Z J Surg*, 68: 554-61.
- 90.** Takeyoshi I, Zhang S, Nakamura K, Ikoma A, Zhu Y, Starzl TE, Todo S. (1996) Effect of ischemia on the canine large bowel: a comparison with the small intestine. *J Surg Res*, 62: 41-8.

- 91.** Hinnebusch BF, Ma Q, Henderson JW, Siddique A, Archer SY, Hodin RA. (2002) Enterocyte response to ischemia is dependent on differentiation state. *J Gastrointest Surg*, 6: 403-9.
- 92.** Parks DA, Granger DN. (1986) Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol*, 250: 749-53.
- 93.** Honda HM, Korge P, Weiss JN. (2005) Mitochondria and ischemia/reperfusion injury. *Ann N Y Acad Sci*, 1047: 248-58.
- 94.** Madesh M, Ramachandran A, Pulimood A, Vadranam M, Balasubramanian KA. (2000) Attenuation of intestinal ischemia/reperfusion injury with sodium nitroprusside: studies on mitochondrial function and lipid changes. *Acta Biochim Biophys*, 1500: 204-16.
- 95.** Carden DL, Granger DN. (2000) Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol*, 190: 255-66.
- 96.** Julian MW, Bao S, Knoell DL, Fahy RJ, Shao G, Crouser ED. (2011) Intestinal epithelium is more susceptible to cytopathic injury and altered permeability than the lung epithelium in the context of acute sepsis. *Int J Exp Pathol*, 92: 366-76.
- 97.** Ogle CK, Mao JX, Wu JZ, Ogle JD, Alexander JW. (1994) The production of tumor necrosis factor, interleukin-1, interleukin-6, and prostaglandin E2 by isolated enterocytes and gut macrophages: effect of lipopolysaccharide and thermal injury. *J Burn Care Rehabil*, 15: 470-7.
- 98.** Pritts T, Hungness E, Wang Q, Robb B, Hershko D, Hasselgren PO. (2002) Mucosal and enterocyte IL-6 production during sepsis and endotoxemia--role of transcription factors and regulation by the stress response. *Am J Surg*, 183: 372-83.
- 99.** Ogle CK, Mao JX, Hasselgren PO, Ogle JD, Alexander JW. (1996) Production of cytokines and prostaglandin E2 by subpopulations of guinea pig enterocytes: effect of endotoxin and thermal injury. *J Trauma*, 41: 298-305.
- 100.** Kadry Z, Roux-Lombard P, Dayer JM, Lieberman J, Marks WH, Dafoe D, Cretin N, Cighetti G, Buhler L, Charbonnet P, Morel P. (2000) Impact of intestinal ischemia-reperfusion on cytokine profile and enterocyte viability in human syngeneic intestinal transplantation. *Transplant Proc*, 32: 1292-3.
- 101.** Molmenti EP, Ziambaras T, Perlmutter DH. (1993) Evidence for an acute phase response in human intestinal epithelial cells. *J Biol Chem*, 268: 14116-24.
- 102.** Wang Q, Meyer TA, Boyce ST, Wang JJ, Sun X, Tiao G, Fischer JE, Hasselgren PO. (1998) Endotoxemia in mice stimulates production of complement C3 and serum amyloid A in mucosa of small intestine. *Am J Physiol*, 275: R1584-92.
- 103.** Zamir O, Hasselgren PO, Higashiguchi T, Frederick JA, Fischer JE. (1992) Effect of sepsis or cytokine administration on release of gut peptides. *Am J Surg*, 163: 181-4; discussion 4-5.
- 104.** Bouadma L, Schortgen F, Ricard JD, Martet G, Dreyfuss D, Saumon G. (2004) Ventilation strategy affects cytokine release after mesenteric ischemia-reperfusion in rats. *Crit Care Med*, 32: 1563-9.
- 105.** Younes M, Schoenberg MH, Jung H, Fredholm BB, Haglund U, Schildberg FW. (1984) Oxidative tissue damage following regional intestinal ischemia and reperfusion in the cat. *Res Exp Med*, 184: 259-64.
- 106.** Pacher P, Nivorozhkin A, Szabo C. (2006) Therapeutic Effects of Xanthine Oxidase Inhibitors: Renaissance Half a Century after the Discovery of Allopurinol. *Pharmacol Rev*, 58: 87-114.

- 107.** Harrison R. (2002) Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic Biol Med*, 33: 774-97.
- 108.** Schoenberg MH, Beger HG. (1993) Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit Care Med*, 21: 1376-86.
- 109.** Schoenberg MH, Beger HG. (1990) Oxygen radicals in intestinal ischemia and reperfusion. *Chem Biol Interact*, 76: 141-61.
- 110.** Ozel SK, Yuksel M, Haklar G, Durakbasa CU, Dagli TE, Aktan AO. (2001) Nitric oxide and endothelin relationship in intestinal ischemia/reperfusion injury (II). *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 64: 253-7.
- 111.** Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, Masaki T. (1989) The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct iso-peptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86: 2863-7.
- 112.** Böhm F, Pernow J. (2007) The importance of endothelin-1 for vascular dysfunction in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res*, 76: 8-18.
- 113.** Oktar BK, Gulpinar MA, Bozkurt A, Ghandour S, Cetinel S, Moini H, Yegen BC, Bilsel S, Granger DN, Kurtel H. (2002) Endothelin receptor blockers reduce I/R-induced intestinal mucosal injury: role of blood flow. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 282: 647-55.
- 114.** Anadol AZ, Bayram O, Dursun A, Ercan S. (1998) Role of endogenous endothelin peptides in intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 59: 279-83.
- 115.** Oktar BK, Coskun T, Bozkurt A, Yegen BC, Yuksel M, Haklar G, Bilsel S, Aksungar FB, Cetinel U, Granger DN, Kurtel H. (2000) Endothelin-1-induced PMN infiltration and mucosal dysfunction in the rat small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 279: 483-91.
- 116.** Martinez-Revelles S, Caracuel L, Marquez-Martin A, Dantas A, Oliver E, D'Ocon P, Vila E. (2012) Increased endothelin-1 vasoconstriction in mesenteric resistance arteries after superior mesenteric ischaemia-reperfusion. *Br J Pharmacol*, 165: 937-50.
- 117.** Caracuel L, Jimenez-Altayo F, Romo M, Marquez-Martin A, Dantas AP, Vila E. (2011) Transient mesenteric ischemia leads to remodeling of rat mesenteric resistance arteries. *Front Physiol*, 2: 118.
- 118.** Hayward R, Lefer AM. (1998) Time course of endothelial-neutrophil interaction in splanchnic artery ischemia-reperfusion. *Am J Physiol*, 275: 2080-6.
- 119.** Massberg S, Gonzalez AP, Leiderer R, Menger MD, Messmer K. (1998) In vivo assessment of the influence of cold preservation time on microvascular reperfusion injury after experimental small bowel transplantation. *Br J Surg*, 85: 127-33.
- 120.** David Filho R, Moraes MRdS, Silva JCCB, Gabriel Júnior A, Ulian M, Miranda Júnior F, Burihan E. (2004) Blockage of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the prevention of reperfusion lesion in the skeletal musculature of EPM-1 Wistar rats. *Acta Cir Bras*, 19: 590-6.
- 121.** Collard CD, Gelman S. (2001) Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology*, 94: 1133-8.
- 122.** Marubayashi S, Oshiro Y, Fukuma A, Okada K, Maeda T, Dohi K. (1999) Protective effect of monoclonal antibodies to adhesion molecules on rat liver ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc*, 31: 1054.
- 123.** Menger MD, Rucker M, Vollmar B. (1997) Capillary dysfunction in striated muscle ischemia/reperfusion: on the mechanisms of capillary "no-reflow". *Shock*, 8: 2-7.

- 124.** Romson JL, Hook BG, Kunkel SL, Abrams GD, Schork MA, Lucchesi BR. (1983) Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog. *Circulation*, 67: 1016-23.
- 125.** Wada K, Montalto MC, Stahl GL. (2001) Inhibition of complement C5 reduces local and remote organ injury after intestinal ischemia/reperfusion in the rat. *Gastroenterology*, 120: 126-33.
- 126.** Austen WG, Jr., Kobzik L, Carroll MC, Hechtman HB, Moore FD, Jr. (2003) The role of complement and natural antibody in intestinal ischemia-reperfusion injury. *Inter J Immunopathol Pharmacol*, 16: 1-8.
- 127.** Hart ML, Ceonzo KA, Shaffer LA, Takahashi K, Rother RP, Reenstra WR, Buras JA, Stahl GL. (2005) Gastrointestinal ischemia-reperfusion injury is lectin complement pathway dependent without involving C1q. *J Immunol*, 174: 6373-80.
- 128.** Grootjans J, Lenaerts K, Derikx JP, Matthijsen RA, de Bruine AP, van Bijnen AA, van Dam RM, Dejong CH, Buurman WA. (2010) Human intestinal ischemia-reperfusion-induced inflammation characterized: experiences from a new translational model. *Am J Pathol*, 176: 2283-91.
- 129.** Tofferi J, Peng S, Moratz CM. (2012) C3b-Independent Complement Activation in Ischemia/Reperfusion Mesenteric Tissue Injury in Autoimmune Prone (B6.MRL/lpr) Mice. *ISRN Immunology*, 2012: 9.
- 130.** Wu MC, Brennan FH, Lynch JP, Mantovani S, Phipps S, Wetsel RA, Ruitenberg MJ, Taylor SM, Woodruff TM. (2013) The receptor for complement component C3a mediates protection from intestinal ischemia-reperfusion injuries by inhibiting neutrophil mobilization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110: 9439-44.
- 131.** Fleming SD, Mastellos D, Karpel-Massler G, Shea-Donohue T, Lambris JD, Tsokos GC. (2003) C5a causes limited, polymorphonuclear cell-independent, mesenteric ischemia/reperfusion-induced injury. *Clinic Immunol*, 108: 263-73.
- 132.** Gibbs SA, Weiser MR, Kobzik L, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. (1996) P-selectin mediates intestinal ischemic injury by enhancing complement deposition. *Surgery*, 119: 652-6.
- 133.** Montalto MC, Hart ML, Jordan JE, Wada K, Stahl GL. (2003) Role for complement in mediating intestinal nitric oxide synthase-2 and superoxide dismutase expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 285: 197-206.
- 134.** Madara JL. (1990) Pathobiology of the intestinal epithelial barrier. *Am J Pathol*, 137: 1273-81.
- 135.** Madara JL, Nash S, Moore R, Atisook K. (1990) Structure and function of the intestinal epithelial barrier in health and disease. *Monogr Pathol*, 306-24.
- 136.** Inoue K, Oyamada M, Mitsufuji S, Okanoue T, Takamatsu T. (2006) Different changes in the expression of multiple kinds of tight-junction proteins during ischemia-reperfusion injury of the rat ileum. *Acta Histochem Cytochem*, 39: 35-45.
- 137.** Overgaard CE, Daugherty BL, Mitchell LA, Koval M. (2011) Claudins: control of barrier function and regulation in response to oxidant stress. *Antioxid Redox Signal*, 15: 1179-93.
- 138.** Takizawa Y, Kishimoto H, Kitazato T, Tomita M, Hayashi M. (2012) Changes in protein and mRNA expression levels of claudin family after mucosal lesion by intestinal ischemia/reperfusion. *Int J Pharm*, 426: 82-9.
- 139.** Leng YF, Zhang Y, Zhang Y, Xue X, Wang T, Kang YQ. (2011) Ischemic post-conditioning attenuates the intestinal injury induced by limb ischemia/reperfusion in rats. *Braz J Med Biol Res*, 44: 411-7.

- 140.** Van Leeuwen PA, Boermeester MA, Houdijk AP, Ferwerda CC, Cuesta MA, Meyer S, Westdorp RI. (1994) Clinical significance of translocation. *Gut*, 35: S28-34.
- 141.** Lemaire LC, van Lanschot JJ, Stoutenbeek CP, van Deventer SJ, Wells CL, Gouma DJ. (1997) Bacterial translocation in multiple organ failure: cause or epiphenomenon still unproven. *Br J Surg*, 84: 1340-50.
- 142.** Deitch EA. (2002) Bacterial translocation or lymphatic drainage of toxic products from the gut: what is important in human beings? *Surgery*, 131: 241-4.
- 143.** Deitch EA, Xu D, Kaise VL. (2006) Role of the gut in the development of injury- and shock induced SIRS and MODS: the gut-lymph hypothesis, a review. *Front Biosci*, 11: 520-8.
- 144.** Gatt M, Reddy BS, MacFie J. (2007) Review article: bacterial translocation in the critically ill--evidence and methods of prevention. *Aliment Pharmacol Ther*, 25: 741-57.
- 145.** D'Ettoire G, Douek D, Paiardini M, Ceccarelli G, Vullo V. (2012) Microbial Translocation and Infectious Diseases: What Is the Link? *Int J Microbiol*, 2012: 2.
- 146.** Bellot P, Frances R, Such J. (2013) Pathological bacterial translocation in cirrhosis: pathophysiology, diagnosis and clinical implications. *Liver Int*, 33: 31-9.
- 147.** Berg RD. (1999) Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Adv Exp Med Biol*, 473: 11-30.
- 148.** Kawai T, Akira S. (2007) Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med*, 13: 460-9.
- 149.** Frangogiannis NG. (2007) Chemokines in ischemia and reperfusion. *Thromb Haemost*, 97: 738-47.
- 150.** Kaisho T, Akira S. (2006) Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol*, 117: 979-87.
- 151.** Hadley JS, Wang JE, Michaels LC, Dempsey CM, Foster SJ, Thiernemann C, Hinds CJ. (2007) Alterations in inflammatory capacity and TLR expression on monocytes and neutrophils after cardiopulmonary bypass. *Shock*, 27: 466-73.
- 152.** Yu M, Wang H, Ding A, Golenbock DT, Latz E, Czura CJ, Fenton MJ, Tracey KJ, Yang H. (2006) HMGB1 signals through toll-like receptor (TLR) 4 and TLR2. *Shock*, 26: 174-9.
- 153.** Gilliet M, Cao W, Liu YJ. (2008) Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol*, 8: 594-606.
- 154.** Gerondakis S, Grumont RJ, Banerjee A. (2007) Regulating B-cell activation and survival in response to TLR signals. *Immunol Cell Biol*, 85: 471-5.
- 155.** Breslin JW, Wu MH, Guo M, Reynoso R, Yuan SY. (2008) Toll-like receptor 4 contributes to microvascular inflammation and barrier dysfunction in thermal injury. *Shock*, 29: 349-55.
- 156.** Raymond T, Schaller M, Hogaboam CM, Lukacs NW, Rochford R, Kunkel SL. (2007) Toll-like receptors, Notch ligands, and cytokines drive the chronicity of lung inflammation. *Proc Am Thorac Soc*, 4: 635-41.
- 157.** Wu C, Li C, Wei L, Zheng Z. (2008) Innate immune modulation of keratinocytes by antikeratin 16 antibodies. *Exp Dermatol*, 17: 645-52.
- 158.** Frantz S, Kelly RA, Bourcier T. (2001) Role of TLR-2 in the activation of nuclear factor kappaB by oxidative stress in cardiac myocytes. *J Biol Chem*, 276: 5197-203.
- 159.** Frost RA, Nystrom GJ, Lang CH. (2006) Multiple Toll-like receptor ligands induce an IL-6 transcriptional response in skeletal myocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 290: 773-84.

- 160.** Tang SC, Arumugam TV, Xu X, Cheng A, Mughal MR, Jo DG, Lathia JD, Siler DA, Chigurupati S, Ouyang X, Magnus T, Camandola S, et al. (2007) Pivotal role for neuronal Toll-like receptors in ischemic brain injury and functional deficits. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104: 13798-803.
- 161.** Arumugam TV, Okun E, Tang SC, Thundyil J, Taylor SM, Woodruff TM. (2009) Toll-like receptors in ischemia-reperfusion injury. *Shock*, 32: 4-16.
- 162.** Savva A, Roger T. (2013) Targeting Toll-Like Receptors: Promising Therapeutic Strategies for the Management of Sepsis-Associated Pathology and Infectious Diseases. *Front Immunol*, 4: 387.
- 163.** Yu L, Wang L, Chen S. (2010) Endogenous toll-like receptor ligands and their biological significance. *J Cell Mol Med*, 14: 2592-603.
- 164.** Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, da Costa C, Miethke T, Kirschning CJ, Hacker H, Wagner H. (2001) Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *J Biol Chem*, 276: 31332-9.
- 165.** Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, Ghose S, Kirschning CJ, Issels RD, Wagner H. (2002) HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J Biol Chem*, 277: 15107-12.
- 166.** Curtin JF, Liu N, Candolfi M, Xiong W, Assi H, Yagiz K, Edwards MR, Michelsen KS, Kroeger KM, Liu C, Muhammad AK, Clark MC, et al. (2009) HMGB1 mediates endogenous TLR2 activation and brain tumor regression. *PLoS Med*, 6: e10.
- 167.** Vabulas RM, Braedel S, Hilf N, Singh-Jasuja H, Herter S, Ahmad-Nejad P, Kirschning CJ, Da Costa C, Rammensee HG, Wagner H, Schild H. (2002) The endoplasmic reticulum-resident heat shock protein Gp96 activates dendritic cells via the Toll-like receptor 2/4 pathway. *J Biol Chem*, 277: 20847-53.
- 168.** Scheibner KA, Lutz MA, Boodoo S, Fenton MJ, Powell JD, Horton MR. (2006) Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2. *J Immunol*, 177: 1272-81.
- 169.** Cavassani KA, Ishii M, Wen H, Schaller MA, Lincoln PM, Lukacs NW, Hogaboam CM, Kunkel SL. (2008) TLR3 is an endogenous sensor of tissue necrosis during acute inflammatory events. *J Exp Med*, 205: 2609-21.
- 170.** Roelofs MF, Boelens WC, Joosten LA, Abdollahi-Roodsaz S, Geurts J, Wunderink LU, Schreurs BW, van den Berg WB, Radstake TR. (2006) Identification of small heat shock protein B8 (HSP22) as a novel TLR4 ligand and potential involvement in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Immunol*, 176: 7021-7.
- 171.** Wheeler DS, Chase MA, Senft AP, Poynter SE, Wong HR, Page K. (2009) Extracellular Hsp72, an endogenous DAMP, is released by virally infected airway epithelial cells and activates neutrophils via Toll-like receptor (TLR)-4. *Respir Res*, 10: 31.
- 172.** Tang AH, Brunn GJ, Cascalho M, Platt JL. (2007) Pivotal advance: endogenous pathway to SIRS, sepsis, and related conditions. *J Leukoc Biol*, 82: 282-5.
- 173.** Smiley ST, King JA, Hancock WW. (2001) Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J Immunol*, 167: 2887-94.
- 174.** Johnson GB, Brunn GJ, Kodaira Y, Platt JL. (2002) Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4. *J Immunol*, 168: 5233-9.

- 175.** Okamura Y, Watari M, Jerud ES, Young DW, Ishizaka ST, Rose J, Chow JC, Strauss JF, 3rd. (2001) The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem*, 276: 10229-33.
- 176.** Iwata Y, Yoshizaki A, Komura K, Shimizu K, Ogawa F, Hara T, Muroi E, Bae S, Takenaka M, Yukami T, Hasegawa M, Fujimoto M, et al. (2009) CD19, a response regulator of B lymphocytes, regulates wound healing through hyaluronan-induced TLR4 signaling. *Am J Pathol*, 175: 649-60.
- 177.** Guillot L, Balloy V, McCormack FX, Golenbock DT, Chignard M, Si-Tahar M. (2002) Cutting edge: the immunostimulatory activity of the lung surfactant protein-A involves Toll-like receptor 4. *J Immunol*, 168: 5989-92.
- 178.** Pollanen R, Sillat T, Pajarinen J, Levon J, Kaivosoja E, Kontinen YT. (2009) Microbial antigens mediate HLA-B27 diseases via TLRs. *J Autoimmun*, 32: 172-7.
- 179.** Fan H, Peck OM, Tempel GE, Halushka PV, Cook JA. (2004) Toll-like receptor 4 coupled GI protein signaling pathways regulate extracellular signal-regulated kinase phosphorylation and AP-1 activation independent of NFkappaB activation. *Shock*, 22: 57-62.
- 180.** Meyer T, Stockfleth E. (2008) Clinical investigations of Toll-like receptor agonists. *Expert Opin Inv Drug*, 17: 1051-65.
- 181.** Lin WJ, Yeh WC. (2005) Implication of Toll-like receptor and tumor necrosis factor alpha signaling in septic shock. *Shock*, 24: 206-9.
- 182.** Arslan F, Keogh B, McGuirk P, Parker AE. (2010) TLR2 and TLR4 in Ischemia Reperfusion Injury. *Mediators Inflamm*, 2010.
- 183.** Katsargyris A, Klonaris C, Alexandrou A, Giakoustidis AE, Vasileiou I, Theocharis S. (2009) Toll-like receptors in liver ischemia reperfusion injury: a novel target for therapeutic modulation? *Expert Opin Ther Targets*, 13: 427-42.
- 184.** Wu H, Chen G, Wyburn KR, Yin J, Bertolino P, Eris JM, Alexander SI, Sharland AF, Chadban SJ. (2007) TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest*, 117: 2847-59.
- 185.** Wagner H. (2006) Endogenous TLR ligands and autoimmunity. *Adv Immunology*, 91: 159-73.
- 186.** Arslan F, de Kleijn DP, Timmers L, Doevendans PA, Pasterkamp G. (2008) Bridging innate immunity and myocardial ischemia/reperfusion injury: the search for therapeutic targets. *Curr Pharm Des*, 14: 1205-16.
- 187.** Abreu MT, Fukata M, Arditi M. (2005) TLR Signaling in the Gut in Health and Disease. *J Immunology*, 174: 4453-60.
- 188.** Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. (2004) Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*, 118: 229-41.
- 189.** Kamdar K, Nguyen V, DePaolo RW. (2013) Toll-like receptor signaling and regulation of intestinal immunity. *Virulence*, 4: 207-12.
- 190.** Watson MJ, Ke B, Shen XD, Gao F, Busuttill RW, Kupiec-Weglinski JW, Farmer DG. (2008) Intestinal ischemia/reperfusion injury triggers activation of innate toll-like receptor 4 and adaptive chemokine programs. *Transplant Proc*, 40: 3339-41.
- 191.** Vasileiou I, Kostopanagiotou G, Katsargyris A, Klonaris C, Perrea D, Theocharis S. (2010) Toll-like receptors: a novel target for therapeutic intervention in intestinal and hepatic ischemia-reperfusion injury? *Expert Opin Ther Targets*, 14: 839-53.
- 192.** Siebenlist U, Franzoso G, Brown K. (1994) Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol*, 10: 405-55.

- 193.** Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T. (1995) Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *Faseb J*, 9: 899-909.
- 194.** Barnes PJ. (1997) Nuclear factor-kappa B. *Inter J Biochem Cell Biol*, 29: 867-70.
- 195.** Blackwell TS, Christman JW. (1997) The role of nuclear factor-kappa B in cytokine gene regulation. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 17: 3-9.
- 196.** Weinbroum AA, Hochhauser E, Rudick V, Kluger Y, Karchevsky E, Graf E, Vidne BA. (1999) Multiple organ dysfunction after remote circulatory arrest: common pathway of radical oxygen species? *J Trauma*, 47: 691-8.
- 197.** Liu W, Shan LP, Dong XS, Liu XW, Ma T, Liu Z. (2013) Combined early fluid resuscitation and hydrogen inhalation attenuates lung and intestine injury. *World J Gastroenterol*, 19: 492-502.
- 198.** Filep J, Braquet P, Mozes T. (1991) Significance of platelet-activating factor in mesenteric ischemia-reperfusion. *Lipids*, 26: 1336-9.
- 199.** Anderson BO, Poggetti RS, Shanley PF, Bensard DD, Pitman JM, Nelson DW, Whitman GJ, Banerjee A, Harken AH. (1991) Primed neutrophils injure rat lung through a platelet-activating factor-dependent mechanism. *J Surg Res*, 50: 510-4.
- 200.** Biffl WL, Moore EE, Moore FA, Barnett CC, Jr. (1996) Interleukin-6 delays neutrophil apoptosis via a mechanism involving platelet-activating factor. *J Trauma*, 40: 575-8; discussion 8-9.
- 201.** Baue AE. (1992) The horror autotoxicus and multiple-organ failure. *Arch Surg*, 127: 1451-62.
- 202.** Knaus WA, Wagner DP. (1989) Multiple systems organ failure: epidemiology and prognosis. *Crit Care Clin*, 5: 221-32.
- 203.** Moore FA, Sauaia A, Moore EE, Haenel JB, Burch JM, Lezotte DC. (1996) Postinjury multiple organ failure: a bimodal phenomenon. *J Trauma*, 40: 501-10; discussion 10-2.
- 204.** Lefering R, Goris RJ, van Nieuwenhoven EJ, Neugebauer E. (2002) Revision of the multiple organ failure score. *Arch Surg*, 387: 14-20.
- 205.** Bailey RW, Bulkley GB, Hamilton SR, Morris JB, Haglund UH. (1987) Protection of the small intestine from nonocclusive mesenteric ischemic injury due to cardiogenic shock. *Am J Surg*, 153: 108-16.
- 206.** McNeill JR, Stark RD, Greenway CV. (1970) Intestinal vasoconstriction after hemorrhage: roles of vasopressin and angiotensin. *Am J Physiol*, 219: 1342-7.
- 207.** Adar R, Franklin A, Spark RF, Rosoff CB, Salzman EW. (1976) Effect of dehydration and cardiac tamponade on superior mesenteric artery flow: role of vasoactive substances. *Surgery*, 79: 534-43.
- 208.** Anderson BO, Harken AH. (1990) Multiple organ failure: inflammatory priming and activation sequences promote autologous tissue injury. *J Trauma*, 30: S44-9.
- 209.** Partrick DA, Moore FA, Moore EE, Barnett CC, Jr., Silliman CC. (1996) Neutrophil priming and activation in the pathogenesis of postinjury multiple organ failure. *New Horiz*, 4: 194-210.
- 210.** Fan J, Li Y, Levy RM, Fan JJ, Hackam DJ, Vodovotz Y, Yang H, Tracey KJ, Billiar TR, Wilson MA. (2007) Hemorrhagic shock induces NAD(P)H oxidase activation in neutrophils: role of HMGB1-TLR4 signaling. *J Immunol*, 178: 6573-80.
- 211.** Xiang M, Fan J, Fan J. (2010) Association of Toll-Like Receptor Signaling and Reactive Oxygen Species: A Potential Therapeutic Target for Posttrauma Acute Lung Injury. *Mediators Inflamm*, 2010: 8.

- 212.** Moore FA, Moore EE. (1995) Evolving concepts in the pathogenesis of postinjury multiple organ failure. *Surg Clin North Am*, 75: 257-77.
- 213.** Moore FA. (1999) The role of the gastrointestinal tract in postinjury multiple organ failure. *Am J Surg*, 178: 449-53.
- 214.** Ackland G, Grocott MP, Mythen MG. (2000) Understanding gastrointestinal perfusion in critical care: so near, and yet so far. *Crit Care*, 4: 269-81.
- 215.** Moore EE, Moore FA, Franciose RJ, Kim FJ, Biffl WL, Banerjee A. (1994) The postischemic gut serves as a priming bed for circulating neutrophils that provoke multiple organ failure. *J Trauma*, 37: 881-7.
- 216.** Maier B, Lefering R, Lehnert M, Laurer HL, Steudel WI, Neugebauer EA, Marzi I. (2007) Early versus late onset of multiple organ failure is associated with differing patterns of plasma cytokine biomarker expression and outcome after severe trauma. *Shock*, 28: 668-74.
- 217.** Nathan N, Denizot Y, Feiss P. (1997) Eicosanoid and cytokine levels in plasma of patients during mesenteric infarction. *Mediators Inflamm*, 6: 75-7.
- 218.** Ambrosio G, Oriente A, Napoli C, Palumbo G, Chiariello P, Marone G, Condorelli M, Chiariello M, Triggiani M. (1994) Oxygen radicals inhibit human plasma acetylhydrolase, the enzyme that catabolizes platelet-activating factor. *J Clin Invest*, 93: 2408-16.
- 219.** Penna C, Bassino E, Alloatti G. (2011) Platelet activating factor: the good and the bad in the ischemic/reperfused heart. *Exp Biol Med*, 236: 390-401.
- 220.** Remick DG, Villarete L. (1996) Regulation of cytokine gene expression by reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates. *J Leukoc Biol*, 59: 471-5.
- 221.** Yoshida Y, Maruyama M, Fujita T, Arai N, Hayashi R, Araya J, Matsui S, Yamashita N, Sugiyama E, Kobayashi M. (1999) Reactive oxygen intermediates stimulate interleukin-6 production in human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol*, 276: L900-8.
- 222.** Chihara J, Maruyama I, Yasuba H, Yasukawa A, Yamamoto T, Kurachi D, Mouri T, Seguchi M, Nakajima S. (1992) Possible induction of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression on endothelial cells by platelet-activating factor (PAF). *J Lipid Mediat*, 5: 159-62.
- 223.** Kukielka GL, Youker KA, Hawkins HK, Perrard JL, Michael LH, Ballantyne CM, Smith CW, Entman ML. (1994) Regulation of ICAM-1 and IL-6 in myocardial ischemia: effect of reperfusion. *Ann NY Acad Sci*, 723: 258-70.
- 224.** Biffl WL, Moore EE, Moore FA, Carl VS, Kim FJ, Franciose RJ. (1994) Interleukin-6 potentiates neutrophil priming with platelet-activating factor. *Arch Surg*, 129: 1131-6.
- 225.** Biffl WL, Moore EE, Moore FA. (1995) Gut-derived mediators of multiple organ failure: platelet-activating factor and interleukin-6. *Br J Hosp Med*, 54: 134-8.
- 226.** Botha AJ, Moore FA, Moore EE, Fontes B, Banerjee A, Peterson VM. (1995) Postinjury neutrophil priming and activation states: therapeutic challenges. *Shock*, 3: 157-66.
- 227.** 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: 613-20.
- 228.** Peng CF, Murphy ML, Colwell K, Straub KD. (1989) Controlled versus hyperemic flow during reperfusion of jeopardized ischemic myocardium. *Am Heart J*, 117: 515-22.

- 229.** Heilmann C, Schmoor C, Siepe M, Schlensak C, Hoh A, Fraedrich G, Beyersdorf F. (2013) Controlled reperfusion versus conventional treatment of the acutely ischemic limb: results of a randomized, open-label, multicenter trial. *Circ Cardiovasc Interv*, 6: 417-27.
- 230.** Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, Vinten-Johansen J. (2003) Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 285: H579-88.
- 231.** 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: 961-9; discussion 9.
- 232.** 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 Cardiothoracic Surg*, 25: 1006-10.
- 233.** 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: 230-2.
- 234.** 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: H1900-8.
- 235.** 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: 74-85.
- 236.** Yang XM, Proctor JB, Cui L, Krieg T, Downey JM, Cohen MV. (2004) Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways. *J Am Coll Cardiol*, 44: 1103-10.
- 237.** 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: 124-33.
- 238.** Philipp SD, Downey JM, Cohen MV. (2004) Postconditioning must be initiated in less than 1 minute following reperfusion and is dependent on adenosine receptors and PI3-kinase (Abstract). *Circulation*, 110 (Suppl.III): 804.
- 239.** Cohen MV, Yang X-M, Downey JM. (2007) The pH Hypothesis of Postconditioning: Staccato Reperfusion Reintroduces Oxygen and Perpetuates Myocardial Acidosis. *Circulation*, 115: 1895-903.
- 240.** Alker KJ, Bellows SD, Kloner RA. (1996) Stuttering Reperfusion of Ischemic Myocardium Does Not Exacerbate Myocardial Infarction: Evidence Against Lethal Cell Reperfusion Injury in the Rabbit. *J Thromb Thrombolysis*, 3: 185-8.
- 241.** Tang XL, Sato H, Tiwari S, Dawn B, Bi Q, Li Q, Shirk G, Bolli R. (2006) Cardioprotection by postconditioning in conscious rats is limited to coronary occlusions <45 min. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 291: H2308-17.
- 242.** Schwartz LM. (2004) Ischemic postconditioning during reperfusion fails to protect against lethal myocardial ischemia-reperfusion injury in pigs. *Circulation*, 110 (Suppl.III): 106.

- 243.** Klocke R, Tian W, Kuhlmann MT, Nikol S. (2007) Surgical animal models of heart failure related to coronary heart disease. *Cardiovasc Res*, 74: 29-38.
- 244.** Somers S, Lacerda L, Suleman N, Opie L, Lecour S. (2007) Critical role of age, strain and number of cycles in ischemic postconditioning. *J Mol Cell Cardiol*, 42: S186-S7.
- 245.** 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: 295-310.
- 246.** Van Vuuren D, Lochner A. (2008) Review Article. *Cardiovasc J Afr*, 19: 311-20.
- 247.** Kin H, Lofye MT, Amerson BS, Zatta AJ, Kerendi F, Halkos ME, Zhao ZQ, 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(Suppl.III): 168.
- 248.** Hausenloy DJ, Mocanu MM, Yellon DM. (2004) Cross-talk between the survival kinases during early reperfusion: its contribution to ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res*, 63: 305-12.
- 249.** 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: H1618-26.
- 250.** Pagliaro PR, Rastaldo R, Penna C, Mancardi D, Cappello S, Losano GA. (2004) Nitric oxide (NO)-cyclic guanosine monophosphate (cGMP) pathway is involved in ischemic postconditioning in the isolated rat heart. *Circulation*, 110(Suppl.III): 136.
- 251.** Ma XL, Weyrich AS, Lefer DJ, Lefer AM. (1993) Diminished basal nitric oxide release after myocardial ischemia and reperfusion promotes neutrophil adherence to coronary endothelium. *Circ Res*, 72: 403-12.
- 252.** Zhao ZQ, Corvera JS, Wang NP, Guyton RA, Vinten-Johansen J. (2002) Diminished basal nitric oxide release after myocardial ischemia and reperfusion promotes neutrophil adherence to coronary endothelium. *Circulation*, 106(Suppl.II): 314.
- 253.** Sanada S, Kitakaze M, Asanuma H, Harada K, Ogita H, Node K, Takashima S, Sakata Y, Asakura M, Shinozaki Y, Mori H, Kuzuya T, et al. (2001) Role of mitochondrial and sarcolemmal K(ATP) channels in ischemic preconditioning of the canine heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 280: H256-63.
- 254.** Steenbergen C, Perlman ME, London RE, Murphy E. (1993) Mechanism of preconditioning. Ionic alterations. *Circ Res*, 72: 112-25.
- 255.** Philipp S, Yang XM, Cui L, Davis AM, Downey JM, Cohen MV. (2006) Postconditioning protects rabbit hearts through a protein kinase C-adenosine A2b receptor cascade. *Cardiovasc Res*, 70: 308-14.
- 256.** Tamarelle S, Mateus V, Ghaboura N, Jeanneteau J, Croue A, Henrion D, Furber A, Prunier F. (2011) RISK and SAFE signaling pathway interactions in remote limb ischemic preconditioning in combination with local ischemic postconditioning. *Basic Res Cardiol*, 106: 1329-39.
- 257.** Wagner C, Tillack D, Simonis G, Strasser RH, Weinbrenner C. (2010) Ischemic post-conditioning reduces infarct size of the in vivo rat heart: role of PI3-K, mTOR, GSK-3beta, and apoptosis. *Mol Cell Biochem*, 339: 135-47.
- 258.** Yang XM, Philipp S, Downey JM, Cohen MV. (2005) Postconditioning's protection is not dependent on circulating blood factors or cells but involves adenosine

receptors and requires PI3-kinase and guanylyl cyclase activation. *Basic Res Cardiol*, 100: 57-63.

259. Jiang YF, Zhang Z, Kifor O, Lane CR, Quinn SJ, Bai M. (2002) Protein kinase C (PKC) phosphorylation of the Ca²⁺ o-sensing receptor (CaR) modulates functional interaction of G proteins with the CaR cytoplasmic tail. *J Biol Chem*, 277: 50543-9.

260. Inagaki K, Churchill E, Mochly-Rosen D. (2006) Epsilon protein kinase C as a potential therapeutic target for the ischemic heart. *Cardiovasc Res*, 70: 222-30.

261. Zhang WH, Lu FH, Zhao YJ, Wang LN, Tian Y, Pan ZW, Lv YJ, Wang YL, Du LJ, Sun ZR, Yang BF, Wang R, et al. (2007) Post-conditioning protects rat cardiomyocytes via PKCepsilon-mediated calcium-sensing receptors. *Biochem Biophys Res Commun*, 361: 659-64.

262. Gateau-Roesch O, Argaud L, Ovize M. (2006) Mitochondrial permeability transition pore and postconditioning. *Cardiovasc Res*, 70: 264-73.

263. Hausenloy DJ, Yellon DM. (2003) The mitochondrial permeability transition pore: its fundamental role in mediating cell death during ischaemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*, 35: 339-41.

264. Crompton M. (1999) The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J*, 341 (Pt 2): 233-49.

265. 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: 448-60.

266. Argaud L, Gateau-Roesch O, Raitsky O, Loufouat J, Robert D, Ovize M. (2005) Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition. *Circulation*, 111: 194-7.

267. Meier JM, Urban P, Goy JJ. (2005) Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition. *Future Cardiol*, 1: 457-60.

268. Cohen MV, Yang XM, Downey JM. (2008) Acidosis, oxygen, and interference with mitochondrial permeability transition pore formation in the early minutes of reperfusion are critical to postconditioning's success. *Basic Res Cardiol*, 103: 464-71.

269. Juhaszova M, Zorov DB, Kim SH, Pepe S, Fu Q, Fishbein KW, Ziman BD, Wang S, Ytrehus K, Antos CL, Olson EN, Sollott SJ. (2004) Glycogen synthase kinase-3beta mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *J Clin Invest*, 113: 1535-49.

270. 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: H1723-41.

271. Xu DZ, Lu Q, Kubicka R, Deitch EA. (1999) The effect of hypoxia/reoxygenation on the cellular function of intestinal epithelial cells. *J Trauma*, 46: 280-5.

272. Matthews JB, Smith JA, Tally KJ, Menconi MJ, Nguyen H, Fink MP. (1994) Chemical hypoxia increases junctional permeability and activates electrogenic ion transport in human intestinal epithelial monolayers. *Surgery*, 116: 150-7; discussion 7-8.

273. Facundo HT, de Paula JG, Kowaltowski AJ. (2007) Mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels are redox-sensitive pathways that control reactive oxygen species production. *Free Radic Biol Med*, 42: 1039-48.

274. Welborn MB, 3rd, Douglas WG, Abouhamze Z, Auffenburg T, Abouhamze AS, Baumhofer J, Seeger JM, Pruitt JH, Edwards PD, Chizzonite R, Martin D, Moldawer LL, et al. (1996) Visceral ischemia-reperfusion injury promotes tumor necrosis factor (TNF) and interleukin-1 (IL-1) dependent organ injury in the mouse. *Shock*, 6: 171-6.

- 275.** Huber TS, Harward TR, Flynn TC, Albright JL, Seeger JM. (1995) Operative mortality rates after elective infrarenal aortic reconstructions. *J Vasc Surg*, 22: 287-93; discussion 93-4.
- 276.** Hess PJ, Seeger JM, Huber TS, Welborn MB, Martin TD, Harward TR, Duschek S, Edwards PD, Solorzano CC, Copeland EM, Moldawer LL. (1997) Exogenously administered interleukin-10 decreases pulmonary neutrophil infiltration in a tumor necrosis factor-dependent murine model of acute visceral ischemia. *J Vasc Surg*, 26: 113-8.
- 277.** Chang R, Wang Y, Chang J, Wen L, Jiang Z, Yang T, Yu K. (2014) LPS preconditioning ameliorates intestinal injury in a rat model of hemorrhagic shock. *Inflamm Res*, 8: 675-82.
- 278.** Myers SI, Hernandez R, Miller TA. (1994) Differing effects of anesthetics on splanchnic arterial blood flow during hemorrhagic shock. *J Appl Physiol*, 76: 2304-9.
- 279.** Myers SI, Hernandez R. (1992) Oxygen free radical regulation of rat splanchnic blood flow. *Surgery*, 112: 347-54.
- 280.** 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: 150-7.
- 281.** Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, Scott HJ, Gurd FN. (1970) Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. *Arch Surg*, 101: 478-83.
- 282.** Hatano T, Kagawa H, Yasuhara T, Okuda T. (1988) Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects. *Chem Pharm Bull*, 36: 2090-7.
- 283.** 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: 895-6.
- 284.** M. O. (1987) Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn J Nutr*, 44: 307-15.
- 285.** Sedlak J, Lindsay RH. (1968) Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem*, 25: 192-205.
- 286.** Blois MS. (1958) Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*, 181: 1199-200.
- 287.** Borka K, Kaliszky P, Szabo E, Lotz G, Kupcsulik P, Schaff Z, Kiss A. (2007) Claudin expression in pancreatic endocrine tumors as compared with ductal adenocarcinomas. *Virchows Arch*, 450: 549-57.
- 288.** Jiang H, Qu L, Dou R, Lu L, Bian S, Zhu W. (2013) Potential role of mesenchymal stem cells in alleviating intestinal ischemia/reperfusion impairment. *PLoS One*, 8: e74468.
- 289.** Granger DN, Hollwarth ME, Parks DA. (1986) Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals. *Acta Physiol Scand*, 548: 47-63.
- 290.** Yamamoto S, Tanabe M, Wakabayashi G, Shimazu M, Matsumoto K, Kitajima M. (2001) The role of tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β in ischemia-reperfusion injury of the rat small intestine. *J Surg Res*, 99: 134-41.
- 291.** Prasad A, Stone GW, Holmes DR, Gersh B. (2009) Reperfusion injury, microvascular dysfunction, and cardioprotection: the "dark side" of reperfusion. *Circulation*, 120: 2105-12.

- 292.** Corcos O, Castier Y, Sibert A, Gaujoux S, Ronot M, Joly F, Paugam C, Bretagnol F, Abdel-Rehim M, Francis F, Bondjemah V, Ferron M, et al. (2013) Effects of a Multimodal Management Strategy for Acute Mesenteric Ischemia on Survival and Intestinal Failure. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 11: 158-65.e2.
- 293.** Park WM, Gloviczki P, Cherry Jr KJ, Hallett Jr JW, Bower TC, Panneton JM, Schleck C, Ilstrup D, Harmsen WS, Noel AA. (2002) Contemporary management of acute mesenteric ischemia: Factors associated with survival. *J Vasc Surgery*, 35: 445-52.
- 294.** Kacmaz M, Ozturk HS, Karaayvaz M, Guven C, Durak I. (1999) Enzymatic antioxidant defence mechanism in rat intestinal tissue is changed after ischemia-reperfusion. Effects of an allopurinol plus antioxidant combination. *Can J Surg*, 42: 427-31.
- 295.** Papparella A, DeLuca FG, Oyer CE, Pinar H, Stonestreet BS. (1997) Ischemia-reperfusion injury in the intestines of newborn pigs. *Pediatr Res*, 42: 180-8.
- 296.** Tanaka H, Zhu Y, Zhang S, Ishizaki N, Jin MB, Azuma T, Lee R, Starzl TE, Todo S. (1997) Lazaroid U-74500A for warm ischemia and reperfusion injury of the canine small intestine. *J Am Coll Surg*, 184: 389-96.
- 297.** Sukhotnik I, Helou H, Mogilner J, Lurie M, Bernsteyn A, Coran AG, Shiloni E. (2005) Oral arginine improves intestinal recovery following ischemia-reperfusion injury in rat. *Pediatr Surg Int*, 21: 191-6.
- 298.** Vejchapipat P, Proctor E, Ramsay A, Petros A, Gadian DG, Spitz L, Pierro A. (2002) Intestinal energy metabolism after ischemia-reperfusion: Effects of moderate hypothermia and perfluorocarbons. *J Pediatr Surg*, 37: 786-90.
- 299.** Stallion A, Kou TD, Miller KA, Dahms BB, Dudgeon DL, Levine AD. (2002) IL-10 is not protective in intestinal ischemia reperfusion injury. *J Surg Res*, 105: 145-52.
- 300.** Santos CHMd, Pontes JCDV, Gomes OM. (2006) Terapêutica medicamentosa na isquemia e reperfusão mesentérica: revisão da literatura. *Rev bras colo-proctol*, 26: 28-33.
- 301.** Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. (1986) Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 74: 1124-36.
- 302.** Hotter G, Closa D, Prados M, Fernandez-Cruz L, Prats N, Gelpi E, Rosello-Catafau J. (1996) Intestinal preconditioning is mediated by a transient increase in nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun*, 222: 27-32.
- 303.** Sola A, Hotter G, Prats N, Xaus C, Gelpi E, Rosello-Catafau J. (2000) Modification of oxidative stress in response to intestinal preconditioning. *Transplantation*, 69: 767-72.
- 304.** Mallick IH, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM. (2005) Ischaemic preconditioning improves microvascular perfusion and oxygenation following reperfusion injury of the intestine. *Br J Surg*, 92: 1169-76.
- 305.** Wu B, Ootani A, Iwakiri R, Fujise T, Tsunada S, Toda S, Fujimoto K. (2004) Ischemic preconditioning attenuates ischemia-reperfusion-induced mucosal apoptosis by inhibiting the mitochondria-dependent pathway in rat small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 286: G580-7.
- 306.** Sola A, Alfaro V, Hotter G. (2004) Intestinal ischemic preconditioning: less xanthine accumulation relates with less apoptosis. *Apoptosis*, 9: 353-61.
- 307.** Liu KX, Li YS, Huang WQ, Li C, Liu JX, Li Y. (2009) Immediate but not delayed postconditioning during reperfusion attenuates acute lung injury induced by intestinal

ischemia/reperfusion in rats: comparison with ischemic preconditioning. *J Surg Res*, 157: e55-62.

308. Santos CH, Gomes OM, Pontes JC, Mijji LN, Bispo MA. (2008) The ischemic preconditioning and postconditioning effect on the intestinal mucosa of rats undergoing mesenteric ischemia/reperfusion procedure. *Acta Cir Bras*, 23: 22-8.

309. Santos C, Gomes O, Pontes J, Mijji L, Bispo M. (2007) Post-conditioning: Preliminary results of this new option in the treatment of mesenteric ischemia and reperfusion. *Cardiovasc Sci Forum*, 2: 13-24.

310. Santos C. (2006) Evolution and challenges in the pathophysiology of the ischemia and reperfusion. *Cardiovasc Sci Forum*, 1: 6-8.

311. 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: 139-47.

312. Jiang B, Chen Q, Liu X, Kong D, Kuang Y, Weng X, Chen H. (2012) Ischemic postconditioning protects renal function after 24 hours of cold preservation in a canine autotransplantation model. *Transplant Proc*, 44: 1776-81.

313. Xia ZY, Gao J, Ancharaz AK. (2009) Protective effect of ischemic postconditioning on lung ischemia-reperfusion injury in rats and the role of heme oxygenase-1. *Chin J Traumatol*, 12: 162-6.

314. 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: 265-71.

315. Coskunfirat OK, Cinpolat A, Bektas G, Ogan O, Taner T. (2014) Comparing different postconditioning cycles after ischemia reperfusion injury in the rat skin flap. *Ann Plast Surg*, 72: 104-7.

316. Joo SP, Xie W, Xiong X, Xu B, Zhao H. (2013) Ischemic postconditioning protects against focal cerebral ischemia by inhibiting brain inflammation while attenuating peripheral lymphopenia in mice. *Neuroscience*, 243: 149-57.

317. Meyer TA, Wang J, Tiao GM, Ogle CK, Fischer JE, Hasselgren PO. (1995) Sepsis and endotoxemia stimulate intestinal interleukin-6 production. *Surgery*, 118: 336-42.

318. Mester M, Tompkins RG, Gelfand JA, Dinarello CA, Burke JF, Clark BD. (1993) Intestinal production of interleukin-1 alpha during endotoxemia in the mouse. *J Surg Res*, 54: 584-91.

319. Xiao F, Eppihimer MJ, Young JA, Nguyen K, Carden DL. (1997) Lung neutrophil retention and injury after intestinal ischemia/reperfusion. *Microcirculation*, 4: 359-67.

320. Gomez L, Paillard M, Thibault H, Derumeaux G, Ovize M. (2008) Inhibition of GSK3beta by postconditioning is required to prevent opening of the mitochondrial permeability transition pore during reperfusion. *Circulation*, 117: 2761-8.

321. Laskey WK, Yoon S, Calzada N, Ricciardi MJ. (2008) Concordant improvements in coronary flow reserve and ST-segment resolution during percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction: a benefit of postconditioning. *Catheter Cardiovasc Interv*, 72: 212-20.

322. Ma XJ, Zhang XH, Li CM, Luo M. (2006) Effect of postconditioning on coronary blood flow velocity and endothelial function in patients with acute myocardial infarction. *Scand Cardiovasc J*, 40: 327-33.

323. Vinten-Johansen J, Yellon DM, Opie LH. (2005) Postconditioning: a simple, clinically applicable procedure to improve revascularization in acute myocardial infarction. *Circulation*, 112: 2085-8.

- 324.** Liu KX, Li YS, Huang WQ, Chen SQ, Wang ZX, Liu JX, Xia Z. (2009) Immediate postconditioning during reperfusion attenuates intestinal injury. *Intensive Care Med*, 35: 933-42.
- 325.** Iliodromitis EK, Georgiadis M, Cohen MV, Downey JM, Bofilis E, Kremastinos DT. (2006) Protection from post-conditioning depends on the number of short ischemic insults in anesthetized pigs. *Basic Res Cardiol*, 101: 502-7.
- 326.** 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: 2287-9.
- 327.** Bretz B, Blaze C, Parry N, Kudej RK. (2010) Ischemic postconditioning does not attenuate ischemia-reperfusion injury of rabbit small intestine. *Vet Surg*, 39: 216-23.
- 328.** Chu WW, Nie L, He XY, Yan AL, Zhou Y, Wu GL, Wang DH. (2010) Change of cytochrome c in postconditioning attenuating ischemia-reperfusion-induced mucosal apoptosis in rat intestine. *Acta Physiol Sin*, 62: 143-8.
- 329.** Li YS, Wang ZX, Li C, Xu M, Li Y, Huang WQ, Xia Z, Liu KX. (2010) Proteomics of ischemia/reperfusion injury in rat intestine with and without ischemic postconditioning. *J Surg Res*, 164: e173-80.
- 330.** Wen SH, Li Y, Li C, Xia ZQ, Liu WF, Zhang XY, Lei WL, Huang WQ, Liu KX. (2012) Ischemic postconditioning during reperfusion attenuates intestinal injury and mucosal cell apoptosis by inhibiting JAK/STAT signaling activation. *Shock*, 38: 411-9.
- 331.** Cheng CH, Lin HC, Lai IR, Lai HS. (2013) Ischemic postconditioning attenuate reperfusion injury of small intestine: impact of mitochondrial permeability transition. *Transplantation*, 95: 559-65.
- 332.** Sengul I, Sengul D, Guler O, Hasanoglu A, Urhan MK, Taner AS, Vinten-Johansen J. (2013) Postconditioning attenuates acute intestinal ischemia-reperfusion injury. *Kaouhsiung J Med Sci*, 29: 119-27.
- 333.** Rosero O, Onody P, Stangl R, Hegedus V, Lotz G, Blazovics A, Kupcsulik P, Szijarto A. (2011) Investigation of postconditioning in intestinal ischemia-reperfusion experimental models. *Magy Seb*, 64: 28-36.
- 334.** Rosero O, Onody P, Stangl R, Turoczi Z, 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: 427-37.
- 335.** Chiu JJ, Wung BS, Shyy JY, Hsieh HJ, Wang DL. (1997) Reactive oxygen species are involved in shear stress-induced intercellular adhesion molecule-1 expression in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17: 3570-7.
- 336.** Foncea R, Carvajal C, Almarza C, Leighton F. (2000) Endothelial cell oxidative stress and signal transduction. *Biol Res*, 33: 86-96.
- 337.** Bagge U, Amundson B, Lauritzen C. (1980) White blood cell deformability and plugging of skeletal muscle capillaries in hemorrhagic shock. *Acta Physiol Scand*, 108: 159-63.
- 338.** Kozhura VL, Basarab DA, Timkina MI, Golubev AM, Reshetnyak VI, Moroz VV. (2005) Reperfusion injury after critical intestinal ischemia and its correction with perfluorochemical emulsion "perftoran". *World J Gastroenterol*, 11: 7084-90.
- 339.** Puglisi RN, Whalen TV, Doolin EJ. (1995) Computer analyzed histology of ischemic injury to the gut. *J Pediatr Surg*, 30: 839-44.
- 340.** Beuk RJ, Heineman E, Tangelder GJ, Quaedackers JS, Marks WH, Lieberman JM, oude Egbrink MG. (2000) Total warm ischemia and reperfusion impairs flow in all

rat gut layers but increases leukocyte-vessel wall interactions in the submucosa only. *Ann Surg*, 231: 96-104.

341. Okorie MI, Bhavsar DD, Ridout D, Charakida M, Deanfield JE, Loukogeorgakis SP, MacAllister RJ. (2011) Postconditioning protects against human endothelial ischaemia-reperfusion injury via subtype-specific KATP channel activation and is mimicked by inhibition of the mitochondrial permeability transition pore. *Eur Heart J*, 32: 1266-74.

342. Kostic MM, Schrader J. (1992) Role of nitric oxide in reactive hyperemia of the guinea pig heart. *Circ Res*, 70: 208-12.

343. Kuo L, Davis MJ, Chilian WM. (1990) Endothelium-dependent, flow-induced dilation of isolated coronary arterioles. *Am J Physiol*, 259: H1063-70.

344. Eldaif SM, Deneve JA, Wang N-P, Jiang R, Mosunjac M, Mutrie CJ, Guyton RA, Zhao Z-Q, Vinten-Johansen J. (2010) Attenuation of renal ischemia-reperfusion injury by postconditioning involves adenosine receptor and protein kinase C activation. *Transplant Int*, 23: 217-26.

345. Jordan JE, Thourani VH, Auchampach JA, Robinson JA, Wang NP, Vinten-Johansen J. (1999) A(3) adenosine receptor activation attenuates neutrophil function and neutrophil-mediated reperfusion injury. *Am J Physiol*, 277: H1895-905.

346. Budde JM, Morris CD, Velez DA, Muraki S, Wang NP, Guyton RA, Zhao ZQ. (2004) Reduction of infarct size and preservation of endothelial function by multidose intravenous adenosine during extended reperfusion. *J Surg Res*, 116: 104-15.

347. Bolli R, Patel BS, Jeroudi MO, Lai EK, McCay PB. (1988) Demonstration of free radical generation in "stunned" myocardium of intact dogs with the use of the spin trap alpha-phenyl N-tert-butyl nitron. *J Clin Invest*, 82: 476-85.

348. Duilio C, Ambrosio G, Kuppusamy P, DiPaula A, Becker LC, Zweier JL. (2001) Neutrophils are primary source of O₂ radicals during reperfusion after prolonged myocardial ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 280: H2649-57.

349. Picazo M, Cuxart M, Sans R, Sarda C, Exposito E. (2008) Mesenteric ischemia in hemodialysis patients. *Nefrologia*, 28: 198-202.

350. Ahluwalia A, Foster P, Scotland RS, McLean PG, Mathur A, Perretti M, Moncada S, Hobbs AJ. (2004) Antiinflammatory activity of soluble guanylate cyclase: cGMP-dependent down-regulation of P-selectin expression and leukocyte recruitment. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 1386-91.

351. Schwartz LM, Lagranha CJ. (2006) Ischemic postconditioning during reperfusion activates Akt and ERK without protecting against lethal myocardial ischemia-reperfusion injury in pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 290: H1011-8.

352. Skyschally A, van Caster P, Boengler K, Gres P, Musiolik J, Schilawa D, Schulz R, Heusch G. (2009) Ischemic postconditioning in pigs: no causal role for RISK activation. *Circ Res*, 104: 15-8.

353. Rodriguez-Sinovas A, Cabestrero A, Garcia del Blanco B, Inserte J, Garcia A, Garcia-Dorado D. (2009) Intracoronary acid infusion as an alternative to ischemic postconditioning in pigs. *Basic Res Cardiol*, 104: 761-71.

354. 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: H1654-61.

- 355.** Lim SY, Davidson SM, Hausenloy DJ, Yellon DM. (2007) Preconditioning and postconditioning: the essential role of the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovasc Res*, 75: 530-5.
- 356.** Piot C, Croisille P, Staat P, Thibault H, Rioufol G, Mewton N, Elbelghiti R, Cung TT, Bonnefoy E, Angoulvant D, Macia C, Raczka F, et al. (2008) Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*, 359: 473-81.
- 357.** Hausenloy D, Kunst G, Boston-Griffiths E, Kolvekar S, Chaubey S, John L, Desai J, Yellon D. (2014) The effect of cyclosporin-A on peri-operative myocardial injury in adult patients undergoing coronary artery bypass graft surgery: a randomised controlled clinical trial. *Heart*, 100: 544-9.
- 358.** Hausenloy DJ, Boston-Griffiths EA, Yellon DM. (2012) Cyclosporin A and cardioprotection: from investigative tool to therapeutic agent. *Br J Pharmacol*, 165: 1235-45.
- 359.** Guzman-de la Garza FJ, Ibarra-Hernandez JM, Cordero-Perez P, Villegas-Quintero P, Villarreal-Ovalle CI, Torres-Gonzalez L, Oliva-Sosa NE, Alarcon-Galvan G, Fernandez-Garza NE, Munoz-Espinosa LE, Camara-Lemarroy CR, Carrillo-Arriaga JG. (2013) Temporal relationship of serum markers and tissue damage during acute intestinal ischemia/reperfusion. *Clinics*, 68: 1034-8.
- 360.** Ding L, Lu Z, Lu Q, Chen YH. (2013) The claudin family of proteins in human malignancy: a clinical perspective. *Cancer Manag Res*, 5: 367-75.
- 361.** Morita K, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S. (1999) Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 511-6.
- 362.** Furuse M, Fujita K, Hiiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S. (1998) Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol*, 141: 1539-50.
- 363.** Mineta K, Yamamoto Y, Yamazaki Y, Tanaka H, Tada Y, Saito K, Tamura A, Igarashi M, Endo T, Takeuchi K, Tsukita S. (2011) Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS Lett*, 585: 606-12.
- 364.** Kinugasa T, Sakaguchi T, Gu X, Reinecker HC. (2000) Claudins regulate the intestinal barrier in response to immune mediators. *Gastroenterology*, 118: 1001-11.
- 365.** Rahner C, Mitic LL, Anderson JM. (2001) Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut. *Gastroenterology*, 120: 411-22.
- 366.** Burgel N, Bojarski C, Mankertz J, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. (2002) Mechanisms of diarrhea in collagenous colitis. *Gastroenterology*, 123: 433-43.
- 367.** Suzuki T. (2013) Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell Mol Life Sci*, 70: 631-59.
- 368.** Amasheh S, Meiri N, Gitter AH, Schoneberg T, Mankertz J, Schulzke JD, Fromm M. (2002) Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J Cell Sci*, 115: 4969-76.
- 369.** Rosenthal R, Milatz S, Krug SM, Oelrich B, Schulzke JD, Amasheh S, Gunzel D, Fromm M. (2010) Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel. *J Cell Sci*, 123: 1913-21.
- 370.** Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S. (2001) Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells. *J Cell Biol*, 153: 263-72.

- 371.** Milatz S, Krug SM, Rosenthal R, Gunzel D, Muller D, Schulzke JD, Amasheh S, Fromm M. (2010) Claudin-3 acts as a sealing component of the tight junction for ions of either charge and uncharged solutes. *Biochim Biophys Acta*, 1798: 2048-57.
- 372.** Van Itallie C, Rahner C, Anderson JM. (2001) Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *J Clin Invest*, 107: 1319-27.
- 373.** Madara JL, Moore R, Carlson S. (1987) Alteration of intestinal tight junction structure and permeability by cytoskeletal contraction. *Am J Physiol*, 253: C854-61.
- 374.** Li C, Li Q, Liu Y-Y, Wang M-X, Pan C-S, Yan L, Chen Y-Y, Fan J-Y, Han J-Y. (2014) Protective effects of Notoginsenoside R1 on intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 306: G111-G22.
- 375.** Li Q, Zhang Q, Wang C, Liu X, Qu L, Gu L, Li N, Li J. (2009) Altered distribution of tight junction proteins after intestinal ischaemia/reperfusion injury in rats. *J Cell Mol Med*, 13: 4061-76.
- 376.** Chen-Quay SC, Eiting KT, Li AW, Lamharzi N, Quay SC. (2009) Identification of tight junction modulating lipids. *J Pharm Sci*, 98: 606-19.
- 377.** Musch MW, Walsh-Reitz MM, Chang EB. (2006) Roles of ZO-1, occludin, and actin in oxidant-induced barrier disruption. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 290: G222-31.
- 378.** Spehlmann ME, Eckmann L. (2009) Nuclear factor-kappa B in intestinal protection and destruction. *Curr Opin Gastroenterol*, 25: 92-9.
- 379.** Ma TY, Iwamoto GK, Hoa NT, Akotia V, Pedram A, Boivin MA, Said HM. (2004) TNF-alpha-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF-kappa B activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 286: G367-76.
- 380.** Suzuki T, Yoshinaga N, Tanabe S. (2011) Interleukin-6 (IL-6) regulates claudin-2 expression and tight junction permeability in intestinal epithelium. *J Biol Chem*, 286: 31263-71.
- 381.** Mankertz J, Amasheh M, Krug SM, Fromm A, Amasheh S, Hillenbrand B, Tavalali S, Fromm M, Schulzke JD. (2009) TNFalpha up-regulates claudin-2 expression in epithelial HT-29/B6 cells via phosphatidylinositol-3-kinase signaling. *Cell Tissue Res*, 336: 67-77.
- 382.** Shields HM, Bates ML, Bass NM, Best CJ, Alpers DH, Ockner RK. (1986) Light microscopic immunocytochemical localization of hepatic and intestinal types of fatty acid-binding proteins in rat small intestine. *J Lipid Res*, 27: 549-57.
- 383.** Derikx JP, Matthijsen RA, de Bruine AP, van Bijnen AA, Heineman E, van Dam RM, Dejong CH, Buurman WA. (2008) Rapid reversal of human intestinal ischemia-reperfusion induced damage by shedding of injured enterocytes and reepithelialisation. *PLoS One*, 3: e3428.
- 384.** Murray MJ, Barbose JJ, Cobb CF. (1993) Serum D(-)-lactate levels as a predictor of acute intestinal ischemia in a rat model. *J Surg Res*, 54: 507-9.
- 385.** Sun YJ, Chen WM, Zhang TZ, Cao HJ, Zhou J. (2008) Effects of cardiopulmonary bypass on tight junction protein expressions in intestinal mucosa of rats. *World J Gastroenterol*, 14: 5868-75.
- 386.** Samel S, Keese M, Kleczka M, Lanig S, Gretz N, Hafner M, Sturm J, Post S. (2002) Microscopy of bacterial translocation during small bowel obstruction and ischemia in vivo - a new animal model. *BMC Surg*, 2: 6.

- 387.** Yuan Y, Guo H, Zhang Y, Zhou D, Gan P, Liang DM, Chen JY. (2011) Protective effects of L-carnitine on intestinal ischemia/reperfusion injury in a rat model. *J Clin Med Res*, 3: 78-84.
- 388.** Xue H, Song D, Shi B, Li Y, Li J. (2007) Tracking of green fluorescent protein labeled *Escherichia coli* confirms bacterial translocation in blind loop rat. *J Surg Res*, 143: 206-10.
- 389.** Song D, Shi B, Xue H, Li Y, Yu B, Xu Z, Liu F, Li J. (2006) Green fluorescent protein labeling *Escherichia coli* TG1 confirms intestinal bacterial translocation in a rat model of chemotherapy. *Curr Microbiol*, 52: 69-73.
- 390.** Berg RD. (1985) Bacterial translocation from the intestines. *Jikken Dobutsu*, 34: 1-16.
- 391.** Ozturk C, Avlan D, Cinel I, Cinel L, Unlu A, Camdeviren H, Atik U, Oral U. (2002) Selenium pretreatment prevents bacterial translocation in rat intestinal ischemia/reperfusion model. *Pharmacol Res*, 46: 171-5.
- 392.** Aksoyek S, Cinel I, Avlan D, Cinel L, Ozturk C, Gurbuz P, Nayci A, Oral U. (2002) Intestinal ischemic preconditioning protects the intestine and reduces bacterial translocation. *Shock*, 18: 476-80.
- 393.** Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S. (1999) Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*, 11: 443-51.
- 394.** Akira S, Takeda K. (2004) Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, 4: 499-511.
- 395.** Park JS, Svetkauskaite D, He Q, Kim JY, Strassheim D, Ishizaka A, Abraham E. (2004) Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J Biol Chem*, 279: 7370-7.
- 396.** Bell CW, Jiang W, Reich CF, 3rd, Pisetsky DS. (2006) The extracellular release of HMGB1 during apoptotic cell death. *Am J Physiol Cell Physiol*, 291: C1318-25.
- 397.** Yamada Y, Fujii T, Ishijima R, Tachibana H, Yokoue N, Takasawa R, Tanuma S. (2011) The release of high mobility group box 1 in apoptosis is triggered by nucleosomal DNA fragmentation. *Arch Biochem Biophys*, 506: 188-93.
- 398.** Ohashi K, Burkart V, Flohe S, Kolb H. (2000) Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol*, 164: 558-61.
- 399.** Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, Auron PE, Stevenson MA, Calderwood SK. (2002) Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem*, 277: 15028-34.
- 400.** Qin S, Wang H, Yuan R, Li H, Ochani M, Ochani K, Rosas-Ballina M, Czura CJ, Huston JM, Miller E, Lin X, Sherry B, et al. (2006) Role of HMGB1 in apoptosis-mediated sepsis lethality. *J Exp Med*, 203: 1637-42.
- 401.** Mirlashari MR, Lyberg T. (2003) Expression and involvement of Toll-like receptors (TLR)2, TLR4, and CD14 in monocyte TNF-alpha production induced by lipopolysaccharides from *Neisseria meningitidis*. *Med Sci Monit*, 9: BR316-24.
- 402.** Asehnoune K, Strassheim D, Mitra S, Kim JY, Abraham E. (2004) Involvement of reactive oxygen species in Toll-like receptor 4-dependent activation of NF-kappa B. *J Immunol*, 172: 2522-9.
- 403.** Piccinini AM, Midwood KS. (2010) DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. *Mediators Inflamm*, 2010: 1-21.

- 404.** Gill R, Tsung A, Billiar T. (2010) Linking oxidative stress to inflammation: Toll-like receptors. *Free Radic Biol Med*, 48: 1121-32.
- 405.** Leventhal JS, Schroppel B. (2012) Toll-like receptors in transplantation: sensing and reacting to injury. *Kidney Int*, 81: 826-32.
- 406.** Eltzschig HK, Eckle T. (2011) Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nat Med*, 17: 1391-401.
- 407.** Jiang W, Tang W, Geng Q, Xu X. (2011) Inhibition of Toll-like receptor 4 with vasoactive intestinal peptide attenuates liver ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc*, 43: 1462-7.
- 408.** Arslan F, Smeets MB, O'Neill LA, Keogh B, McGuirk P, Timmers L, Tersteeg C, Hofer IE, Doevendans PA, Pasterkamp G, de Kleijn DP. (2010) Myocardial ischemia/reperfusion injury is mediated by leukocytic toll-like receptor-2 and reduced by systemic administration of a novel anti-toll-like receptor-2 antibody. *Circulation*, 121: 80-90.
- 409.** Liu M, Gu M, Xu D, Lv Q, Zhang W, Wu Y. (2010) Protective effects of Toll-like receptor 4 inhibitor eritoran on renal ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc*, 42: 1539-44.
- 410.** Suzuki Y, Hattori K, Hamanaka J, Murase T, Egashira Y, Mishiro K, Ishiguro M, Tsuruma K, Hirose Y, Tanaka H, Yoshimura S, Shimazawa M, et al. (2012) Pharmacological inhibition of TLR4-NOX4 signal protects against neuronal death in transient focal ischemia. *Sci Rep*, 2.
- 411.** Cario E. (2008) Barrier-protective function of intestinal epithelial Toll-like receptor 2. *Mucosal Immunol*, 1 Suppl 1: S62-6.
- 412.** Aprahamian CJ, Lorenz RG, Harmon CM, Dimmit RA. (2008) Toll-like receptor 2 is protective of ischemia-reperfusion-mediated small-bowel injury in a murine model. *Pediatr Crit Care Med*, 9: 105-9.
- 413.** Tatum PM, Jr., Harmon CM, Lorenz RG, Dimmitt RA. (2010) Toll-like receptor 4 is protective against neonatal murine ischemia-reperfusion intestinal injury. *J Pediatr Surg*, 45: 1246-55.
- 414.** Fukata M, Chen A, Klepper A, Krishnareddy S, Vamadevan AS, Thomas LS, Xu R, Inoue H, Arditi M, Dannenberg AJ, Abreu MT. (2006) Cox-2 is regulated by Toll-like receptor-4 (TLR4) signaling: Role in proliferation and apoptosis in the intestine. *Gastroenterology*, 131: 862-77.
- 415.** Fukata M, Michelsen KS, Eri R, Thomas LS, Hu B, Lukasek K, Nast CC, Lechago J, Xu R, Naiki Y, Soliman A, Arditi M, et al. (2005) Toll-like receptor-4 is required for intestinal response to epithelial injury and limiting bacterial translocation in a murine model of acute colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 288: G1055-65.
- 416.** Cario E, Gerken G, Podolsky DK. (2007) Toll-like receptor 2 controls mucosal inflammation by regulating epithelial barrier function. *Gastroenterology*, 132: 1359-74.
- 417.** Ungaro R, Fukata M, Hsu D, Hernandez Y, Breglio K, Chen A, Xu R, Sotolongo J, Espana C, Zaias J, Elson G, Mayer L, et al. (2009) A novel Toll-like receptor 4 antagonist antibody ameliorates inflammation but impairs mucosal healing in murine colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 296: G1167-79.
- 418.** Patel H, Shaw SG, Shi-Wen X, Abraham D, Baker DM, Tsui JCS. (2012) Toll-Like Receptors in Ischaemia and Its Potential Role in the Pathophysiology of Muscle Damage in Critical Limb Ischaemia. *Cardiol Res Pract*, 2012: 1-13.

- 419.** Barbic J, Ivic D, Alkhamis T, Drenjancevic D, Ivic J, Harsanji-Drenjancevic I, Turina I, Vcev A. (2013) Kinetics of changes in serum concentrations of procalcitonin, interleukin-6, and C- reactive protein after elective abdominal surgery. Can it be used to detect postoperative complications? *Coll Antropol*, 37: 195-201.
- 420.** Hoch RC, Rodriguez R, Manning T, Bishop M, Mead P, Shoemaker WC, Abraham E. (1993) Effects of accidental trauma on cytokine and endotoxin production. *Crit Care Med*, 21: 839-45.
- 421.** Biffl WL, Moore EE, Moore FA, Peterson VM. (1996) Interleukin-6 in the injured patient. Marker of injury or mediator of inflammation? *Ann Surg*, 224: 647-64.
- 422.** Rosenbloom AJ, Pinsky MR, Bryant JL, Shin A, Tran T, Whiteside T. (1995) Leukocyte activation in the peripheral blood of patients with cirrhosis of the liver and SIRS. Correlation with serum interleukin-6 levels and organ dysfunction. *Jama*, 274: 58-65.
- 423.** Castell JV, Gomez-Lechon MJ, David M, Andus T, Geiger T, Trullenque R, Fabra R, Heinrich PC. (1989) Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes. *FEBS Lett*, 242: 237-9.
- 424.** Caldenhoven E, Coffey P, Yuan J, Van de Stolpe A, Horn F, Kruijer W, Van der Saag PT. (1994) Stimulation of the human intercellular adhesion molecule-1 promoter by interleukin-6 and interferon-gamma involves binding of distinct factors to a palindromic response element. *J Biol Chem*, 269: 21146-54.
- 425.** Guo RF, Sun L, Gao H, Shi KX, Rittirsch D, Sarma VJ, Zetoune FS, Ward PA. (2006) In vivo regulation of neutrophil apoptosis by C5a during sepsis. *J Leukoc Biol*, 80: 1575-83.
- 426.** Cipolle MD, Pasquale MD, Shearer J, Caldwell M, Cerra F. (1994) Blunt injury augments interleukin-6 but not tumor necrosis factor in isolated, perfused rat hindlimbs. *J Trauma*, 37: 91-8; discussion 8-9.
- 427.** Di Padova F, Pozzi C, Tondre MJ, Tritapepe R. (1991) Selective and early increase of IL-1 inhibitors, IL-6 and cortisol after elective surgery. *Clin Exp Immunol*, 85: 137-42.
- 428.** Yao YM, Sheng ZY, Yu Y, Tian HM, Wang YP, Lu LR, Xu SH. (1995) The potential etiologic role of tumor necrosis factor in mediating multiple organ dysfunction in rats following intestinal ischemia-reperfusion injury. *Resuscitation*, 29: 157-68.
- 429.** Koksoy C, Kuzu MA, Kuzu I, Ergun H, Gurhan I. (2001) Role of tumour necrosis factor in lung injury caused by intestinal ischaemia-reperfusion. *Brit J Surg*, 88: 464-8.
- 430.** Matsuo S, Yang WL, Aziz M, Jacob A, Wang P. (2013) Cyclic arginine-glycine-aspartate attenuates acute lung injury in mice after intestinal ischemia/reperfusion. *Crit Care*, 17: R19.
- 431.** Aldemir D, Tecder-Unal M, Tufan H, Ogus E, Turkoglu S, Kayhan Z. (2002) Effect of intestinal ischemia-reperfusion on rat kidney. *Transplant Proc*, 34: 2023-6.
- 432.** Horie Y, Wolf R, Granger DN. (1997) Role of nitric oxide in gut ischemia-reperfusion-induced hepatic microvascular dysfunction. *Am J Physiol*, 273: G1007-13.
- 433.** Gauthier TW, Davenpeck KL, Lefer AM. (1994) Nitric oxide attenuates leukocyte-endothelial interaction via P-selectin in splanchnic ischemia-reperfusion. *Am J Physiol*, 267: G562-8.
- 434.** Lefer AM. (1997) Nitric Oxide: Nature's Naturally Occurring Leukocyte Inhibitor. *Circulation*, 95: 553-4.

- 435.** Kurose I, Wolf R, Grisham MB, Granger DN. (1994) Modulation of ischemia/reperfusion-induced microvascular dysfunction by nitric oxide. *Circ Res*, 74: 376-82.
- 436.** Rubanyi GM, Vanhoutte PM. (1986) Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol*, 250: H822-7.
- 437.** Onody P, Rosero O, Kovacs T, Garbaisz D, Hegedus V, Lotz G, Harsanyi L, Szijarto A. (2012) Postconditioning -- effective method against distant organ dysfunction? *Magy Seb*, 65: 222-9.

11. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények jegyzéke

1. **Rosero O**, Onody P, Stangl R, Hegedus V, Lotz G, Blazovics A, Kupcsulik P, Szijarto A. (2011) Posztkondicionálás kísérletes vizsgálata vékonybél ischaemiás-reperfüziós modellben. *Magy Seb*, 64: 28-36.
2. Onody P, **Rosero O**, Kovacs T, Garbaisz D, Hegedus V, Lotz G, Harsanyi L, Szijarto A. (2012) Postconditioning -- effective method against distant organ dysfunction? *Magy Seb*, 65: 222-9.
3. Szijarto A., **Rosero O.**, Onody P., Harsanyi L. (2013) Kritikus Mesenterialis Ischaemia. Adaptív Mechanizmusok. Távoli szervi diszfunkciók. *Magy Belorv Arch.* 66: 13-19.
4. **Rosero O**, Onody P, Stangl R, Turoczi Z, 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: 427-37.
IF: 2.121
5. **Rosero O**, Onody P, Kovacs T, Molnar D, Lotz G, Toth S, Turoczi Z, Fulop A, Garbaisz D, Harsanyi L, Szijarto A. (2014) Impaired intestinal mucosal barrier upon ischemia-reperfusion: "patching holes in the shield with a simple surgical method". *Biomed Res Int*, 2014: 210901.
IF: 2.706
6. **Rosero O**, Kovacs T., Onody P., Harsanyi L., Szijarto A. (2014) Bakteriális transzlokáció: rés a pajzson. *Orv Hetil*, 155: 304–312.
7. **Rosero O**, Harsanyi L., Szijarto A. (2014) Akut mesenterialis ischaemia: biomarker egyenlő diagnózis?. *Orv Hetil*, 155: 1615–1623.

Nem az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

Magyar nyelvű:

1. Garbaisz D, Turoczi Z, Fulop A, **Rosero O**, Aranyi P, Onody P, Lotz G, Rakonczay Z, Balla Z, Harsanyi L, Szijarto A. (2013) Alsó végtagi ischaemiás-reperfüziós károsodás hosszú távú tüdőszövődményeinek megelőzése posztkondicionálással. *Magy Seb*, 66: 146–154.

Idegen nyelvű:

1. Modis K, Gero D, Stangl R, **Rosero O**, Szijarto A, Lotz G, Mohacsik P, Szoleczky P, Coletta C, Szabo C. (2013) Adenosine and inosine exert cytoprotective effects in an in vitro model of liver ischemia-reperfusion injury. *Int J Mol Med*, 31:437-46.
IF: 1.880
2. Garbaisz D, Turoczi Z, Fulop A, **Rosero O**, Aranyi P, Onody P, Lotz G, Rakonczay Z, Balla Z, Harsanyi L, Szijarto A. (2013) Therapeutic option for

- managing lung injury induced by infrarenal aortic cross-clamping. *J Surg Res*, 185: 469-76. **IF: 2.121**
3. Onody P, Stangl R, Fulop A, **Rosero O**, Garbaisz D, Turoczi Z, Lotz G, Rakonczay Z Jr, Balla Z, Hegedus V, Harsanyi L, Szijarto A. (2013) Levosimendan: a cardiovascular drug to prevent liver ischemia-reperfusion injury?. *PLoS One*, 8:e73758. **IF: 3.534**
 4. **Rosero O**, Nemeth K, Turoczi Z, Fulop A, Garbaisz D, Gyorffy A, Szuak A, Dorogi B, Kiss M, Nemeskeri A, Harsanyi L, Szijarto A. (2014) Collateral circulation of the rat lower limb and its significance in ischemia–reperfusion studies. *Surg Today*, 44: 2345-53. **IF: 1.208**
 5. Garbaisz D, Turoczi Z, Aranyi P, Fulop A, **Rosero O**, Hermes E, Ferencz A, 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*, 9:e101067. **IF: 3.534**
 6. Turoczi Z, Fulop A, Czigany Z, Varga G, **Rosero O**, Tokes T, Kaszaki J, Lotz G, Harsanyi L, Szijarto A. (2015) Improvement of small intestinal microcirculation by postconditioning after lower limb ischemia. *Microvasc Res*, 98:119-25. **IF: 2.432**

12. Köszönetnyilvánítás

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

Külön köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek *Dr. Szijártó Attilának* tanácsaiért és kitartó biztatásáért, támogatásáért és megértéséért.

A patológiai minták előkészítése, feldolgozása és értékelése *Dr. Lotz Gábor* munkája. Köszönöm neki áldozatos segítségét.

A teljesség igénye nélkül, köszönet illeti a *Kísérleti Műtő* munkatársait: *Dr. Stangl Rita*, *Dr. Garbaisz Dávid*, *Dr. Turóczy Zsolt*, *Dr. Fülöp András*, *Dr. Ónody Péter*, *Dr. Hegedüs Viktor*, *Dr. Arányi Péter*, *Dr. Czigány Zoltán*, *Kovács Tibor*, *Dr. Dániel Ádám*, *Dr. Pomizs István*, akik nélkül ez a dolgozat nem készülhetett volna el. Köszönöm a kísérleti munka során felvetődött gyakorlati problémák megoldásában nyújtott segítségüket, köszönet a barátságért és jó hangulatban eltöltött munkanapokért, a közös sikerekért.

Köszönetet mondok *Dr. Kristóf Katalinnak*, *Dr. Molnár Dávidnak*, *Tóth Szilárdnak* és *Dr. Weltner János* hasznos szakmai tanácsaikért és segítőkészségükért.

Végezetül szeretnék köszönetet mondani az egész *Családomnak*, hálás vagyok megértő türelmükért és folyamatos támogatásukért.