

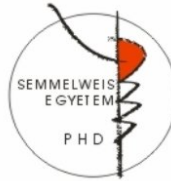
Semmelweis Egyetem

Általános Orvostudományi Kar

Perioperatív farmakológiai kezelések szerepe a máj iszkémiás-reperfúziós károsodásának mérséklésében

Ph.D. Tézisfüzet

Dr. Stangl Rita



Témavezető:

Dr. Szijártó Attila egyetemi adjunktus, Ph.D.

Hivatalos bírálók:

Dr. Jancsó Gábor egyetemi docens, Ph.D.

Dr. Hauser Balázs egyetemi docens, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke:

Prof. Dr. Weber György intézetvezető egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Csomós Ákos egyetemi docens, Ph.D.

Dr. Csapó Zsolt osztályvezető főorvos, Ph.D.

Budapest, 2013

BEVEZETÉS

A máj iszkémiás-reperfúziós károsodása

A máj szerteágazó metabolikus funkciói nagy energia- és oxigénigényű folyamatok, ezért a májszövet érzékeny minden hipoxiával és szöveti perfúzió csökkenéssel járó állapottal szemben. A műtéti vérvesztés minimalizálása érdekében szükséges érkirekesztések, illetve májtranszplantációk kapcsán számolni kell a máj iszkémiás-reperfúziós (I-R) károsodásával. Iszkémia alatt anaerob folyamatok indulnak el a sejtekben, szöveti acidózis alakul ki, kiürülnek a nagy energiájú foszfátraktárok, sérülnek a membránfunkciók és az energiaigényes enzimszisztemek működése zavart szenved. A revaszkularizáció során újra induló szöveti perfúzió oxidatív stresszhez vezet, felborul a májszövet redox homeosztázisa, további membránkárosodás lép fel, súlyos ioneloszlási zavar alakul ki, aktiválódnak a Kupffer-sejtek és lokális gyulladási válasz bontakozik ki, mely az egész szervezetre is hatást gyakorolhat.

Az iszkémiás-reperfúziós károsodás mérséklésének lehetőségei

Az I-R kérdésköre az elmúlt két évtized intenzíven kutatott területe. Számos próbálkozás történt a reperfúziós károsodás direkt csökkentésére, illetve az iszkémiával szembeni tolerancia fokozására egyaránt. Az utóbbi alapja az úgynevezett prekondicionálás, mely az iszkémiás eseményt megelőzően alkalmazott olyan kezelést takar, ami képes endogén adaptív védelmi mechanizmusok aktiválására a sejtekben. Az elsőként leírt iszkémiás prekondicionálás rövid iszkémiás-reperfúziós epizódokat alkalmaz triggerként, de lehetőség kínálkozik ezen adaptációs útvonal aktiválására kémiai úton is. A károsodás fő effektorának számító MPTP-csatornának (mitochondrial permeability transition pore) gátlása a farmakológiai kezelések talán legígéretesebb támadási pontja. Ezen a mechanizmuson keresztül fejtik ki hatásukat a reperfúziós pH-emelkedés lassítására irányuló kezelések is, mint például a posztkondicionálás. Számos ponton nyújt lehetőséget beavatkozásra az I-R károsodás másodlagos hatásait, gyulladási szövődményeit meghatározó immunválasz és oxidatív stresszválasz is. A dolgozatban vizsgált vegyületek jelentőségét az adja, hogy a klinikai gyakorlatban más indikációs területen eredményesen használt gyógyszerekről van szó. Mint farmakológiai kezelések, magukban hordozzák annak lehetőségét, hogy olyan műtétek esetében is növeljék a máj iszkémia-toleranciáját, amikor más szervet végzett operáció kapcsán áll fenn károsodás veszélye fokozott kockázatú betegeket esetében.

Glutamin

A glutamin egy kondicionálisan esszenciális aminosav. Fontos szerepet játszik a szervezet nitrogén-egyensúlyának fenntartásában, részt vesz a nukleotid- és DNS-szintézisben, továbbá a mitokondriális ATP-szintézist is stimulálja. A sejtek szignáltranszdukciós útvonalaikat modulálva alapvető tényező a sejtproliferációban és differenciációban, valamint intracelluláris szintjének csökkenése apoptózist indukálhat. A glutamin a redox homeosztázisnak szintén fontos résztvevője, mivel a glutation bioszintéziséhez szolgál alapanyagként, mely a szervezet egyik elsődleges antioxidáns molekulája. Gátolja továbbá az indukálható nitrogén-monoxid szintáz expresszióját, csökkentve ezáltal toxikus nitrozaktív gyökök keletkezését. A HSP70 hő sokk protein termelődésének fokozásán keresztül részt vesz proinflammatorikus transzkripciós faktorok gátlásában is. A táplálásterápia részeként alkalmazva számos tanulmány igazolta antiinflammatorikus hatását kritikus állapotú betegekben, szepszisben, gyulladásos bélbetegségekben, pankreatitiszben, iszkémiás szívbetegségben. Állatkísérletes eredmények utalnak májregenerációt elősegítő képességére. Máj I-R modelljében emeli a glutation koncentrációját, csökkenti a májsejtkárosodásra utaló enzimek szérumszintjét, valamint feltehetően antiapoptotikus hatást is kifejt.

Levosimendan

A levosimendan egy inodilatátor hatású vegyület, melynek elsődleges indikációs területe az akut és krónikus szívelégtelenség különböző formáinak kezelése. Pozitív inotróp hatását a Troponin C Ca^{2+} -kötött formájához kapcsolódva fejt ki, az aktin-miozin interakcióhoz szükséges Troponin C – Troponin I kötést stabilizálva ezáltal. A szívizom kontrakciós erejét tehát, Ca^{2+} -dependens módon növeli, és nem befolyásolja a relaxáció folyamatát. Így az intracelluláris cAMP-szint és Ca^{2+} -szint emelésén keresztül ható más pozitív inotróp szerekre jellemző proaritmogenitás és a szívizom oxigénigényének nem kívánatos növelése elkerülhető. Vazodilatátor hatásának hátterében különböző szarkolemmális K^+ -csatornák (többek között ATP-függő K^+ -csatornák) nyitása áll. Újabb vizsgálatok igazolták, hogy mitokondriális K^+_{ATP} -csatornák nyitására is képes, mely hatás az iszkémiás prekondicionálás ismert effektor molekulái, a fent említett MPTP-csatornák gátlását idézi elő. Ez a felismerés kiindulási pontot jelentett a vegyület anti-iskémiás hatásának vizsgálata számára, melynek alapján ma a levosimendant kardioprotektívnek tartják.

CÉLKITŰZÉS

Az I. sz. Sebészeti Klinika kísérletes munkacsoportja évek óta foglalkozik az iszkémiás-reperfúziós májkárosodás témakörével, illetve ennek mérséklésére irányuló technikák vizsgálatával. Jelen munka alapvetően ezen kutatások folytatását képezi.

Első kísérlet: Hosszú latenciájú glutamin előkezelés

Ez a kísérlet munkacsoportunk egy korábbi vizsgálatának továbbvitele, ahol a közvetlenül műtét előtt adott glutamin előkezelés protektív hatását sikerült igazolni. Az első kísérlet célkitűzései az alábbi kérdések formájában fogalmazhatók meg:

- 1/ Képes-e a 24 órával korábban adott glutamin előkezelés a definitív májszöveti iszkémiás-reperfúziós károsodás csökkentésére?
- 2/ Javul-e hosszú latenciájú glutamin előkezelést követően a máj korai reperfúziós mikrocirkulációja?
- 3/ Milyen hatással van a hosszú latenciájú glutamin előkezelés az antioxidáns státusz (elsősorban lokális) alakulására?

Második kísérlet: Rövid és hosszú latenciájú levosimendan előkezelés

Jelen kísérleti elrendezés egy közvetlenül műtét előtti és egy 24 órával korábban alkalmazott levosimendan előkezelést tartalmaz, mely a prekondicionálás két időablakának vizsgálatára is alkalmas. A direkt hepatoprotektív hatásra vonatkozóan ez a vizsgálat azonban csak tájékoztató jellegűnek mondható.

A második kísérletben az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

- 1/ Csökken-e levosimendan kezelés hatására a 60 perces iszkémia talaján kialakuló definitív májszöveti károsodás mértéke?
- 2/ Javul-e a máj korai reperfúziós mikrocirkulációja levosimendan kezelés hatására?
- 3/ Van-e hatással a levosimendan előkezelés a májszöveti antioxidáns státusz alakulására reperfúziót követően?
- 4/ Valószínűsíthető-e direkt hepatoprotektív hatás szerepe jelen kísérleti elrendezésben?
- 5/ Mutatkozik-e különbség közvetlenül műtét előtt, illetve 24 órával korábban alkalmazott levosimendan kezelés hatásai tekintetében?

MÓDSZEREK

Kísérleti elrendezés

A kísérleteket 12 órás táplálékmegevonásban részesített 250g súlyú hím Wistar patkányokon végeztük, reggelente azonos időben.

Intraperitoneális bólus injekcióval végzett indukciót követően, az anesztézia fenntartása ketamin-xylasin folyamatos perfúzoros adagolásával intravénás formában történt. A vérnyomás a jobb oldali artéria karotiszban, invazív módszerrel került monitorozásra. A testhőmérséklet követésére a májáramlás vizsgálatához kapcsoltn a laser Doppler áramlásmérő készülék (LDF) nyújtott lehetőséget.

A máj iszkémiás-reperfüziós károsodásának vizsgálatát munkacsoportunk standardizált műtéti modelljén végeztük. Medián laparotómiát követően a III-as, IV-es, V-ös lebenyekhez futó biliovaszkuláris nyélre helyezett atraumatikus mikroklipp segítségével ezek 60 perces iszkémiáját hoztuk létre. A zsigerek keringését ezen idő alatt az I-, II-es, VI-os és VII-es kis májlebenyek tartották fenn, melyek közvetlenül a reperfüzió előtt eltávolításra kerültek. A reperfüzió így csak a máj korábban iszkémizált – körülbelül 65-70%-át kitevő – területét érintette. Ily módon elkerülhető a teljes anhepatikus fázis által okozott multiviszcerális pangás, melyet a patkányok csak igen rövid ideig tolerálnának.

A máj mikrocirkulációjának követése az V-ös lebenyre helyezett LDF mérőfej segítségével történt. Az iszkémiát megelőzően 5 perces alapáramlást mértünk, majd folytattuk a regisztrálást a kirekesztés időtartama alatt és a reperfüzió első órájában.

Előkezelések:

Kísérlet I: Hosszú latenciájú glutamin előkezelés

A jelen dolgozatban bemutatott glutamin előkezelés korábbi kísérleteink folytatásának tekinthető, ezért az alább következő levisimendan előkezeléssel ellentétben itt csak egy időablakot vizsgáltunk. A kezelt csoportban 24 órával a máj iszkémiát megelőzően 500 mg/kg Dipeptiven® infúzióban részesültek az állatok, melyből hidrolizációt követően ekvimoláris mennyiségű alanin és glutamin válik szabaddá. A választott dózis megegyezik a jelenleg ajánlott klinikai dózissal, viszont az ajánlás változását követve eltér a korábbi vizsgálatában alkalmazott mennyiségtől.

Az áloperált és az I-R kontroll csoportban kevert aminosav (Aminoven®) oldatot infundáltunk az iszkémia előtt 24 órával.

Kísérlet II: Rövid és hosszú latenciájú levosimendan előkezelés

Az intravénás levosimendan előkezelést vagy közvetlenül a műtét előtt, vagy az iszkémia előtt 24 órával végeztük 5 ciklusban. A 75 perc alatt adható levosimendan (Simdax®) testtömegre számított dózisértékét (kalkulációs séma: 24 µg/kg bólus + 0,4µg/kg/h infúzió) 5x5 perc alatt infundáltuk perfúzor segítségével. Az infúziós ciklusok között 10-10 perc szünetet tartottunk, a sebészi iszkémiás prekondicionáláshoz hasonló kezelési mintázat létrehozása érdekében. A választott dózis ebben az esetben megfelel a gyógyszer bevezetése során közölt legmagasabb humán dózishoz. A két időablak az iszkémiás prekondicionálás kapcsán leírt első és második védelmi időzónát modellezi.

Az I-R kontroll és az egyszerű áloperált csoportban a vegyület oldószereként használt 5%-os glukóz oldatot kapták az állatok azonos volumenben és módszerrel.

Kísérleti csoportok:

Kísérlet I: Hosszú latenciájú glutamin előkezelés

A kísérletet csoportonként 10-10 állaton végeztük, 3 vizsgálati csoportban.

A műtét stressz modellezésére szolgáló áloperált („*Sham*”) csoportban a máj I-R károsodásának létrehozásán kívül ugyanazon műtét beavatkozásokat hajtottunk végre, mint a másik két csoportban. Az első napi aminosav infúziót követően, a kísérlet második napján összesen 120 percen keresztül mértük a máj mikrocirkulációját, majd további 23 órával később mintagyűjtéssel egybekötve termináltuk a kísérletet.

Az I-R kontroll („*I-R*”) csoportban, 24 órával az aminosav infúziót követően hoztunk létre 60 perces részleges máj iszkémiát, valamint teljes reperfüziót. Ennek 24 órás időtartamából az első órában végeztünk áramlásmérést.

Az L-alanyl-L-glutamin (*glutamin*) előkezelésben részesülő („*Gln*”) csoport az I-R csoporthoz képest csak az előkezelés aminosav összetételében tért el.

Kísérlet II: Rövid és hosszú latenciájú levosimendan előkezelés

Ebben a kísérleti elrendezésben a kettős kezelési időablakot párhuzamosan vizsgáltuk. 55 állatot osztottunk összesen hét vizsgálati csoportra, melyeket a közvetlenül műtétet megelőző, valamint a 24 órával korábban alkalmazott előkezelésnek megfelelően rövid latenciájú (*A*), illetve hosszú latenciájú (*B*) kategóriába soroltunk.

A műtét stressz modellezését biztosító egyszerű áloperált (*I*) csoportban (n=5) az előző kísérlethez hasonlóan iszkémiát nem hoztunk létre. Továbbá minden tekintetben úgy jártunk el, mint a közvetlenül műtét előtt előkezelt (rövid latenciájú)

csoportokban. Preoperatív glükóz infúziót követően a májáramlás 2x60 perces mérése következett, melyet a kis májlebenyek rezekciója szakított meg.

Az *áloperált + levosimendan (A/1 és B/1)* csoportokban (n=5-5) a levosimendan adott időkategóriának megfelelő adagolását követően végeztük a műtéti stressz modellezését az egyszerű áloperált csoporthoz hasonlóan. E csoportok a vegyület hemodinamikai hatásainak izolált vizsgálatára szolgáltak.

Az *I-R kontroll (A/2 és B/2)* és a *levosimendan (A/3 és B/3)* csoportokban (n=10-10) a csoportnak megfelelő, fent részletezett sémájú előkezelést követően 60 perces máj iszkémiát és 24 órás reperfúziót hoztunk létre időkategóriánként külön-külön.

Mintavétel:

Az LDF-fel monitorozott első reperfúziós óra elteltével zártuk a hasüreget és felfüggesztettük a narkózist. A kísérletek mintavétellel egybekötött terminálását 24 órás reperfúziót követően altatott állatokon végeztük. Szérummintákat, formalinban fixált és fagyasztott májszövetmintákat és májhomogénizátum mintákat vettünk minden esetben, standardizált eljárás szerint.

Vizsgálóeljárások

Hemodinamikai monitorozás: Az állatok artériás vérnyomását és szívfrekvenciáját a jobb oldali artéria karotisban invazív vérnyomásmérővel regisztráltuk.

A máj mikrokeringésének vizsgálata: A felszíni LDF-mérőfejet az egyes állatoknál az V-ös lebeny azonos pontjára helyeztük. Méréseink eredménye a hőmérsékletre, vörösvértest koncentrációra és szövetvastagságra korrigált flux, melynek folyamatosan regisztrált adatsorából 4 másodpercenként vett minták kerültek további feldolgozásra. Az egyedi áramlási görbék összehasonlíthatósága érdekében elvégeztük a munkacsoportunk által korábban publikált matematikai korrekciót, mely az adott görbére vonatkozó átlag iszkémiás flux minden egyes flux-értékből történő kivonásából és az individuális áramlási görbék relatív skálába való átszámításából áll. Ezen skála maximumához (100%) az iszkémia előtt regisztrált áramlási alapérték (baseline) közelít legjobban, míg az iszkémia alatti érték (biological zero - bz) az elérhető minimum és 0%-nak felel meg. A korrigált áramlási érték (T_{flux}) számítása a következő képlet szerint történik: $T_{flux} = (flux-bz)/(baseline-bz) \times 100$.

Az áramlási görbék elemzése: A reperfúziós áramlási görbék összehasonlítására a görbe alatti terület integrálja (*RT, reperfúziós terület*) és a maximális áramlási plató (*PM, plató maximum* – a reperfúzió utolsó 10 perce) szolgált. Az egyes görbék

esetében számított két értéket szintén egy relatív skálán fejeztük ki. Ez a transzformáció könnyen átlátható összehasonlítást és statisztikai analízist tesz lehetővé egyes állatok, illetve állatcsoportok között.

Szövetani elemzés: A májlebenyenként azonos anatómiai helyről vett mintákból elsőként hematoxilin-eozin festett metszeteket készítettünk. Fénymikroszkóp alatt sejtduzzadás, lipoid degeneráció, szinuszoidális pangás, szöveti bevezés, leukocita infiltráció, nekrozis és apoptózis előfordulási gyakoriságát vizsgáltuk. Ezen elváltozások az alábbiak szerint kerültek pontozásra: 0: nincs változás, +: a látótér sejteinek kevesebb, mint 10%-a érintett, ++: 10-50 %, +++: több mint 50% érintett (maximum 21 pont). 7 pont alatt a károsodás mértékét enyhének, 7-14 között középsúlyosnak, 14 pont felett súlyosnak véleményeztük.

A lipoid degeneráció vizsgálata Sudan IV-gyel festett fagyasztott májmintákon történt, szemikvantitatív fénymikroszkópos értékeléssel.

Immunhisztokémiai vizsgálatok: A *TUNEL* (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End Labeling) *assay*-t a DNS-fragmentáció detektálására kereskedelmi forgalomban lévő kit-tel végeztük a gyártó protokollját követve. A szöveti struktúra megjelenítésére hematoxilin-es háttérfestést alkalmaztunk. Fénymikroszkóp alatt először a demarkált területek százalékos arányát határoztuk meg egy adott metszetben, majd 100x-os nagyításon tíz egymást át nem fedő látótérben, 1000 sejtet számoltunk meg, a TUNEL-pozitív sejtek számát ezek ezrelékében fejezve ki. Az első arányszám az irreverzibilis szöveti károsodás mértékének mutatója, míg a különálló TUNEL-pozitivitás apoptózis jelenlétére utalhat.

A *PARP* (Poly(ADP-Ribose) Polymerase) *enzim aktivitását* a termék poly(ADP-Ribose) (PAR) molekulák kimutatásával végeztük az irodalomban közölt módszer alapján. Célunk a DNS-károsodás jelenlétének egy további módszerrel való számszerűsítése volt a repair-mechanizmus megjelenítésén keresztül. Poliklonális egér PAR-ellenes antitestet használtunk, melyet biotinizált ló anti-egér szekunder antitesttel és advin-biotin-peroxidáz komplex-szel, majd 3,3'-diaminobenzidin-tetrahidroklorid kromogénnel kezelve tettünk detektálhatóvá. Hematoxilines háttérfestést követően fénymikroszkóp alatt vizsgálva számszerűsítettük az összefüggő PAR-pozitivitást mutató területek arányát, majd 1000 különálló sejtet megszámolva, a környező területek PAR-pozitivitását fejeztük ki százalék formájában.

Szérum nekroenzim mérések: A centrifugálással nyert szérummintákból 24 órán belül végeztünk spektrofometrián alapuló enzim meghatározásokat. Rutin laboratóriumi tesztek felhasználásával szérum alanin-aminotranszferáz (ALAT, a májkárosodás specifikus markere) és aszpartát-aminotranszferáz (ASAT, nem-specifikus markere a májkárosodásnak) szintet mértünk.

Az antioxidáns státusz vizsgálata: A *luminometriás össz-scavenger kapacitás* nmol/l-es nagyságrendben képes a mintában lévő szabadgyökök mennyiségét kimutatni, így a többi alkalmazott eljárásnál érzékenyebb. Meghatározását mind a szérum, mind a májhomogenizátum mintákban elvégeztük. Szabadgyökök jelenlétében a reakcióelegyben található luminol gerjesztett állapotba kerül és fényt bocsát ki, melyet luminométerrel detektáltunk. A mért fényintenzitás arányos a mintában található szabadgyökök koncentrációjával és gyökfogó vegyületek jelenlétében csökken. A Relative Light Unit (*RLU*) egységben megjelenő eredmények a háttér aktivitás százalékában is kifejezhetők (*háttér %*). Májhomogenizátum minták esetében, a minták fehérjetartalmát 10 mg/ml-re állítottuk be.

Az alkalmazott három spektrofotometriás módszer közül a *redukáló képesség* szintén a minta globális antioxidáns tulajdonságát vizsgálja. Oyaizu szerint a mérés során a reakcióelegyben lévő Fe^{3+} - Fe^{2+} -átalakulást kísérő abszorbancia változást detektáltuk 700 nm-en. A redukáló képességet aszkorbinsav ekvivalensben (*ASE*) fejeztük ki. A fehérjékhez kapcsolódó antioxidáns tulajdonságot reprezentáló *szabad SH-csoportok* kimutatására a Sedlack-módszert használtuk és az eredményeket *mmol/l*-ben adtuk meg. A *H-donor kapacitás* a fehérjétől független antioxidáns tulajdonságra utal. Mérését a Blázovics és mtsai. által módosított Blois módszerrel végeztük 1,1-difenil-2-pikril-hidrasil gyök abszorbancia csökkenésének kimutatásán keresztül 517 nm-en. Az eredményt gátlás %-ban fejeztük ki.

NADH-tetrazolium enzimhisztokémiai reakció: A mitokondriumban található NADH-dehidrogenáz enzimkomplex által katalizált reakcióban egy H^+ -ion kerül az akceptor nitroblue-tetrazolium-kloridra (NBT), mely a redukció következtében kék színű formazán terméket képez. Ennek abszolút szöveti mennyisége a jelenlévő mitokondriumok funkcionáló enzimeinek számával hozható egyenes arányba.

A fagyasztott májmetszetek forgalomban lévő nitroblue-tetrazolium (NBT) és NADH TRIS pufferes oldatában kerültek inkubálásra. A fel nem használt reagenst aceton-oldat felszálló, majd leszálló koncentrációiban távolítottuk el a metszetekből.

A *szöveti életképesség meghatározása* morfometriás szoftver segítségével történt, mely egy adott színtartomány terület-nagyságának meghatározására képes. Az így kapott érték és a szövetrészlet teljes területének hányadosa jól korrelál a reakcióval pozitívnak ábrázolódó mitokondriumok számával. Mintánként 10 különböző látótér került véletlenszerűen kifényképezésre, melyekből meghatározásra kerültek a fent ismertetett terület-hányadosok. Ezek állatonkénti, majd vizsgálati csoportonkénti átlaga adja a vizsgálati csoportra jellemző pozitívítási értéket, melyet az egészséges állatok értékének százalékában fejeztünk ki. Ez a hányados a szöveti viabilitásra utal.

HSP72 expresszió (Western blot analízis): Fagyasztott májminták szonikátoros homogenizálását követően mintánként 40 µg fehérje elektroforézisét végeztük Laemmli szerint. Polyakrilamid gélen 100 V feszültség mellett vittük át a fehérjéket nitrocellulóz membránra, melyet nyúl anti-HSP72 antitesttel inkubáltunk. Ennek kimutatása torna-peroxidázhoz kapcsolt anti-nyúl szekunder antitest segítségével történt kemilumineszcenciás módszerrel. A fehérjetartalom kontrolljaként a gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) expresszióját vizsgáltuk egyazon membránon, egér anti-GAPDH antitest és torna-peroxidázhoz kapcsolt anti-egér szekunder antitest segítségével.

Statistikai elemzés: Az adatok elemzését kétmintás t-próbával végeztük. Az átlagértékek közötti különbségeket $p < 0,05$ konfidencia intervallum esetén szignifikánsnak, $p < 0,01$ konfidencia intervallum esetén erősen szignifikánsnak tekintettük.

EREDMÉNYEK

Előkísérlet: Rövid latenciájú glutamin előkezelés

Az előzőekben említésre került, hogy a műtét előtt 24 órával végzett glutamin előkezelés egy korábbi vizsgálat közvetlen folytatását képezi. E témakört érintő első kísérletben a máj I-R károsodását közvetlenül megelőzően („rövid latenciával”) végeztünk parenterális glutamin előkezelést. Tekintve, hogy a két vizsgálati protokoll jelentős eltéréseket mutat, eredményeik nem vethetők össze közvetlenül, mint a levosimendan esetében. A kísérlet összefoglalása és a felismerések rövid bemutatása ugyanakkor ide kívánczok, mivel hozzásegít ahhoz, hogy teljesebb kép alakulhasson ki a glutamin előkezelés hatásairól a két kezelési időablak ismeretében.

A műtéti modell, valamint az iszkémia időtartama a fent ismertetettel megegyezett. Az előkezeléshez szintén Dipeptiven® oldatot használtunk, az akkor érvényben lévő ajánláshoz igazodva 400 mg/kg dózisban, melyet 3 óra alatt infundáltunk. Az áloperált és az I-R-kontroll csoportban fiziológias sóoldatot kaptak az állatok azonos térfogatban. 60 perces iszkémiás időt 6 óra reperfüzió követett, melynek első órájában követtük a máj mikrocirkulációjának alakulását. Az altatást a reperfüzió teljes ideje alatt fenntartottuk, majd mintavétellel egybekötte termináltuk a kísérletet.

A reperfüzió első 60 percében detektált májáramlás tekintetében, a glutamin előkezelt csoport szignifikáns javulást mutatott az I-R kontroll csoporttal szemben. Ez elsősorban a vizsgált időtartam második felében tapasztalható folyamatos lassú áramlásjavulásnak volt tulajdonítható, mely kezelés hiányában elmaradt. A szövettani metszetek alapján a Gln csoportban kisebb mértékű szöveti destrukció és periportális neutrofil infiltráció jött létre az I-R csoporthoz képest. A károsodott területeken nagyobb arányban mutatkoztak apoptózis jelei, nekrosis ugyanakkor nem volt valószínűsíthető. Ezen a vonalon TUNEL-reakció segítségével vizsgáltunk tovább, mely különálló pozitívítás tekintetében az I-R károsodáson átesett csoportok közül glutamin kezelést követően jelent meg nagyobb arányban. Ezt támasztja alá az apoptózis specifikus markereként használt aktív kaszpáz-3 immunhisztokémia eredménye is, mely alapján a különbség még kifejezettebb. A szérum TNF- α -szint ezzel párhuzamosan Gln-kezelést követően alacsonyabb, mely az apoptózis nagyobb arányával járó kisebb gyulladásos válaszra utal. Az antioxidáns státuszról összefoglalóan elmondható, hogy glutamin kezelést követően (részben szignifikáns) javulást tapasztaltunk az I-R kontroll csoporthoz képest. Mindezen eredmények biztatóak a témakör további vizsgálata szempontjából.

Kísérlet I: Hosszú latenciájú glutamin előkezelés

Hemodinamika: Az áloperált csoport esetében az állatok vérnyomását és szívfrekvenciáját a vizsgált időtartama alatt konstansnak találtuk. Az I-R kontroll és a Gln csoportban az iszkémia előtti szisztémás hemodinamikai paraméterek az áloperálthoz hasonlóak voltak. Az iszkémia során nem jött létre szignifikáns változás, azonban a reperfüzió kezdetén mindkét csoportban szignifikáns vérnyomásesés volt tapasztalható ($p_{I-R}=0,035$; $p_{Gln}=0,039$). 5-10 perces reperfüziót követően, az artériás középnyomás folyamatos lassú emelkedésnek indult és az első óra végére a kiindulási értéket majdnem elérte. A két csoport között számottevő eltérés nem mutatkozott.

Mikrocirkulációs változások: Az iszkémia előtti alapáramlás tekintetében nem tapasztaltunk különbséget az egyes csoportok között. Ugyanez mondható el az iszkémiás áramlásról az I-R kontroll és a Gln csoport esetében. Az áloperált állatok májának mikrocirkulációja a vizsgálat egész időtartama alatt konstansnak mutatkozott. Az iszkémia-reperfúzió átesett csoportok reperfúziós görbéit összehasonlítva, a Gln csoport javuló tendenciát mutatott az I-R-kontroll csoporthoz képest (RT: $p=0,096$; PM_{10} : $p=0,084$). A reperfúzió első órájának végére bekövetkezett a mikrocirkuláció stabilizálódása, melynek szintje az áloperált csoport 100%-ot közelítő értékéhez képest mindkét csoportban erősen szignifikánsan alacsonyabb volt ($p < 0,01$).

Szövetteni értékelés: Az áloperált csoport szövetteni metszetei károsodást nem, vagy csak igen enyhe szinusoidális tágulat formájában mutattak. Az I-R kontroll csoportban jelentős mértékű szöveti degeneráció volt megfigyelhető, melyek fő jellemzőiként intracelluláris vakuolizációt, periportális neutrofil infiltrációt, szöveti bevérvést, valamint nekrozist figyeltünk meg. A legsúlyosabb nekrozis centrlobularisan jelent meg, mely lokalizációban az enyhébben károsodott területek esetében lipoid degeneráció volt valószínűsíthető. A számszerűsítés alapján a csoport átlaga 12,4 pont volt, tehát a károsodás középsúlyosnak véleményezhető. A glutamin előkezelt csoport esetében az elváltozások egyes elemei hasonlóak, de kevésbé súlyosak voltak. A szöveti kép integritása megtartottabbnak mutatkozott, szöveti bevérvést nem tapasztaltunk és csökkent a gyulladásosejtes beszűrődés mértéke. A csoport átlaga 10,2 pontnak adódott, mely szintén középsúlyos károsodásnak felel meg, de szignifikánsan alacsonyabb, mint a kontroll csoport esetében ($p=0,047$).

A súlyos hepatocita károsodásra utaló zsíros degeneráció kimutatására Sudan IV festést végeztünk. A Gln csoportban jelentősen kisebb területek mutattak érintettséget az I-R kontroll csoporthoz képest, míg az áloperált csoportban csak elszórtan láttunk pozitív festődést.

24 órás reperfúziót követően, mindkét I-R károsodott csoportban megjelent a nekrotikus területek demarkációja, míg apoptózis egyik csoportra sem volt jellemző. Ezen a vonalon a TUNEL immunhisztokémia segítségével vizsgáldtunk tovább.

Immunhisztokémiai vizsgálatok: A TUNEL-reakció a DNS lánctörések kimutatására alkalmas és ennek megfelelően mutat pozitívítást májszöveti I-R károsodás esetében is, ahol számos átmeneti sejtahálforma is megjelenik. Itt a TUNEL-pozitivitás utalhat ugyan apoptózis jelenlétére, de specifikusnak nem mondható és egyedüli

immunhisztokémiai módszerként alkalmazva nem kellően megbízható. A pozitív festődést mutató, jól elkülönülő demarkált területek kiterjedését a vizsgált teljes lebenyterület százalékos arányában fejeztük ki. Míg az áloperált csoportban nem láttunk demarkációt, az I-R kontroll csoport és a Gln csoport között szignifikáns különbség mutatkozott, az utóbbi javára ($p=0,023$). A különálló sejtekben megjelenő pozitív festődés tekintetében nem találtunk szignifikáns különbséget az egyes csoportok között.

A *PARP-immunhisztokémia* az esetben mutat pozitív festődést, ha a károsodott DNS-t javító enzimatis rendszer aktiválódik. A PARP-túlaktiválódás jellemzően súlyos DNS-károsodás következménye, ezért I-R károsodás során is létrejehet. Ilyenkor a fokozott lokális ATP-felhasználás és romló energetikai állapot következtében további szövetkárosodás kialakulásával lehet számolni. A TUNEL-reakcióhoz hasonlóan, itt is különbséget tehetünk demarkálódott területeken, illetve különálló sejtekben megjelenő pozitív festődés között, mely a „javításra” szoruló DNS-állomány jelenlétét igen érzékenyen mutatja. A *PAR-pozitív demarkálódott területek* mérete jól korrelál a TUNEL-reakcióval kapott eredményekkel. Százalékos aránya szignifikánsan kisebb volt a Gln-kezelt csoportban az I-R kontroll csoporthoz képest ($p=0,027$). Az áloperált csoportban a különálló sejtekben is igen ritkán jelent meg PAR-pozitivitás, míg az I-R károsodáson átesett két csoport esetében nagyobb gyakorisággal mutatkozott. A Gln csoport esetében előfordulása alacsonyabb arányú volt az I-R kontroll csoporthoz képest ($p=0,166$). A vizsgált teljes szövetrészt százalékosan kifejezett összes szöveti PARP-aktivitás mindazonáltal szignifikánsan csökkent a Gln csoportban ($p=0,013$).

Nekroenzimek: Az ALAT szérumszintje a Gln és az I-R kontroll csoportban egyaránt erősen szignifikáns emelkedést mutatott az áloperált csoporthoz képest ($p=0,0004$, illetve $p=0,00009$). A Gln csoportban azonban szignifikánsan alacsonyabb ALAT szint volt detektálható, mint az I-R kontroll csoport esetében ($p=0,042$).

Az ASAT szérumszintje szintén szignifikánsan alacsonyabbnak mutatkozott glutamin előkezelést követően, mint az I-R kontroll csoportban ($p=0,044$). Figyelemre méltó, hogy amennyiben a Gln és az áloperált csoportot vetjük össze, nem jelent meg szignifikánsan magasabb ASAT aktivitás a Gln csoportban ($p=0,112$).

Antioxidáns státusz: A *luminometriás össz-scavenger kapacitás* vizsgálata során a kibocsátott fényintenzitás, Gln előkezelést követően mind a szérum-, mind a májhomogenizátum mintákban szignifikánsan alacsonyabbnak adódott az I-R kontroll

csoporthoz képest. Az RLU értékek közötti különbség mértéke szérumban szignifikánsnak ($p=0,0496$), míg a májhomogenizátumban mérve erősen szignifikánsnak ($p=0,0003$) mutatkozott.

A máj antioxidáns státuszát homogenizátum mintákban tovább vizsgáló spektrofotometriás mérések alapján összefoglalóan elmondható, hogy Gln előkezelés hatására szignifikánsan javult a szöveti redox homeosztázis. Az I-R kontroll csoporthoz képest a Gln csoportban erősen szignifikáns emelkedés volt megfigyelhető a *szabad SH-csoportok* koncentrációjában ($p=0,0001$). A *H-donor kapacitás* itt az áloperált csoportban mért értéket közelítette ($p=0,7675$) és szignifikánsan magasabb volt, mint az I-R kontroll csoport esetében ($p=0,0205$). A májszöveti *redukáló képesség* nem mutatott ugyan szignifikáns javulást az I-R kontroll csoporthoz képest ($p=0,0878$), de szintén az áloperált csoportban mért értéket közelítette ($p=0,9082$), míg előkezelés nélkül a Sham-hez képest csökkent.

Kísérlet II: Rövid és hosszú latenciájú levosimandan előkezelés

Hemodinamika: Az egyszerű áloperált csoportban az artériás középnyomás nem változott számottevően a monitorozott időszakban. Levosimandan adagolás során az előkezelés végére szignifikánssá váló fokozatos vérnyomáscsökkenés volt megfigyelhető a glukóz infúzióban részesülő csoportokhoz képest ($p_{RR}=0,044$), mely az A/1 csoportban az ezt közvetlenül követő laparotómia alatt megmaradt.

A 60 perces iszkémia során a vizsgált hemodinamikai paraméterek egyik csoportban sem változtak szignifikánsan a kiindulási értékhez képest. A reperfúzió kezdetén az I-R kontroll csoportokban szignifikáns vérnyomásesés ($p_A=0,047$; $p_B=0,033$) volt megfigyelhető, mely lassú normalizálódásnak indult és 1 óra alatt az iszkémia előtti értékeket közelítette. A B/2 csoport hemodinamikai paraméterei valamelyest rosszabbak, mint az A/2 csoportban mért értékek.

A levosimandan kezelt csoportokban a reperfúzió kezdetén tapasztalható vérnyomásesés nem volt szignifikáns a kiindulási értékekhez képest és az első óra végére ismét stabilan elérte azt. Ezen dinamikát illetően nem figyelhető meg különbség a rövid és hosszú latenciával előkezelt csoportok között, de fontos megemlíteni, hogy a B/3 csoport esetében a közvetlenül iszkémia előtt mért értékek megközelítették az állatok kiindulási vérnyomását, tehát magasabbak voltak, mint az A/3 csoport esetében ($p=0,11$). Mindez korrelál a két előkezelési ablak áloperált csoportjai között mutatkozó vérnyomáskülönbséggel.

Mikrocirkulációs változások: A reperfüzió első órájának végére mind a rövid, mind a hosszú latenciával adott levosimendan előkezelés erősen szignifikáns javulást eredményezett a májszövet mikrocirkulációjában (RT: $p_A=0,0012$; $p_B=0,0010$; PM: $p_A=0,0019$; $p_B=0,0007$) a megfelelő I-R kontroll csoporthoz képest.

A B/1 csoport esetében a mikrocirkuláció a másik két áloperált csoporttal összevetve romlott. Az áramlás csökkenése statisztikailag egyik paraméter tekintetében sem volt szignifikáns, mindazonáltal utalhat az egész kategóriára vonatkozó nagyobb műtéti megterhelésre. Ezzel korrelál, hogy a B/2 csoportban alacsonyabb az RT és PM értéke az A/2 csoporthoz képest. A hosszú latenciával kezelt kategóriában a levosimendan csoport mikrocirkulációja tendenciájában még kifejezettebben javult a kontroll csoporthoz képest.

Szöveti értékelés: Az A/1 csoportban, az egyszerű áloperált állatokhoz hasonlóan, normál szöveti kép volt megfigyelhető, helyenként enye szinuszoidális tágulattal. Az A/2 csoportban összefüggő területeket érintő, jelentős mértékű nekrosis jött létre, kifejezett leukocitás beszűrődése és helyenkénti bevézések kíséretében (11,6 pont). Az A/3 csoport esetében kevesebb, karakterét tekintve inkább fokális nekrotikus terület mutatkozott, szöveti bevézés nem volt jellemző és a leukocitás beszűrődés is kisebb mértékű volt (7,8 pont). A hosszú latenciával előkezelt kategóriában, a B/1 csoportban kissé fokozottabb szinuszoidális tágulat volt megfigyelhető a másik két áloperált csoporthoz képest és helyenként perivaszkuláris ödéma is megjelent (4,8 pont). A B/2 csoportban nagy összefüggő területeket érintő, számos helyen bevézett, sokszor pánlobuláris nekrosis mutatkozott, számottevő leukocitás beszűrődés kíséretében (12,3 pont). A B/3 csoportban ezzel szemben inkább fokális nekrosisok voltak jellemzőek, kisebb mértékű szöveti bevézéssel és enyhébb gyulladásos sejt beszűrődéssel kísérve (7,9 pont). Számszerűsítve iszkémia-reperfüziót követően a károsodás mind a négy csoportban középsúlyosnak értékelhető, bár az I-R kontroll csoportok ennek felső, míg a levosimendan kezelt csoportok ennek alsó határát közelítik. Statisztikailag a hosszú latenciával előkezelt csoportok között mutatkozik szignifikáns különbség a levosimendan-kezelt csoport javára ($p=0,021$), míg a rövid latenciával előkezelt kategóriában javuló tendenciát látunk ($p=0,089$).

Immunhisztokémiai vizsgálatok: TUNEL immunfestéssel az I-R károsodott csoportokban mindenütt megjelentek diffúz pozitívítást mutató területek, míg az áloperált állatok mintáiban demarkáció nem figyelhető meg. Mind a rövid, mind a

hosszú latenciájú levosimendan előkezelést követően megfigyelhető volt ezen demarkálódott területek szignifikáns méretcsökkenése az adott kategória I-R kontroll csoportjával szemben ($p_A=0,05$; $p_B=0,034$). *Különálló TUNEL-pozitivitást* mutató sejtek a másik két áloperált csoporthoz képest nagyobb arányban jelennek meg a B/1 csoport esetében és I-R károsodást követően számuk minden csoportban szignifikánsan emelkedett. Az A/3 és B/3 csoportban nagyobb arányban találtunk különálló TUNEL-pozitivitást az A/2 és B/2 csoporthoz képest, mely különbség a hosszú látenciával előkezelt csoportok esetében szignifikáns ($p_A=0,09$; $p_B=0,04$).

PARP-aktivitás szempontjából csak az I-R károsodott csoportok összehasonlítását végeztük, mivel az áloperált állapotokban aktiválódása várhatóan nem számottevő (lásd I. kísérlet). Mindkét kezelési időablak esetében az összes PAR-pozitivitás szignifikáns csökkenését láttuk a levosimendan kezelt csoportokban ($p_A=0,02$; $p_B=0,04$). A rövid látenciával előkezelt kategóriában a különálló sejtekben megjelenő PAR-pozitivitás ($p_A=0,02$; $p_B=0,15$), míg a hosszú látenciával előkezelt kategóriában a demarkálódott területek mérete csökkent szignifikáns mértékben ($p_A=0,06$; $p_B=0,04$). Ennek hátterében a 24 órával korábban előkezelt csoportokban manifesztálódó súlyosabb károsodás állhat, mely levosimendan kezelést követően kevésbé kifejezett. Míg a demarkálódott területek aránya mindkét módszerrel hasonló, a különálló pozitivitás eltérően alakul. Ennek lehetséges magyarázata, hogy jelen kísérleti elrendezésben a PAR-festés a bizonytalan kimenetelű sejtárosodást is érzékenyen kimutatja, míg TUNEL-reakcióval a már elhalt sejtek festődnek meg. Az izolált sejtekben megjelenő elhalás ugyanakkor összességében kisebb szövethárosodásra utal, tehát kedvező.

Nekroenzimek: Az ALAT aktivitása levosimendan kezelést követően mind a két kezelési időablakban szignifikánsan csökkent a megfelelő I-R kontroll csoporthoz viszonyítva ($p_A=0,02$; $p_B=0,005$). Az ASAT szérumszintje a normál értéket minden csoportban meghaladta. Feltűnő volt, hogy a B/2 és B/3 csoportok jóval magasabb szérumszinteket mutattak az A/2 és A/3 csoportokhoz képest. Az A/2 és B/2 csoport ASAT-értékében mutatkozó különbség erősen szignifikánsnak adódott ($p_2=0,009$), ami a hosszú latenciával előkezelt csoportok nagyobb szisztémás károsodására utalhat. Ezzel korrelál, hogy az A/3 és B/3 csoport között is szignifikáns különbség mutatkozott ($p_3=0,02$). A B/3 csoportban detektált ASAT-szint ennek ellenére szignifikánsan alacsonyabb volt a B/2 csoporthoz képest ($p_B=0,04$).

Antioxidáns státusz: A *luminometriás össz-scavanger kapacitás*, mint globális vizsgálati paraméter alapján, levosimendan adását követően a szérumban mérhető szabadgyökök mennyisége mind a két kezelési időablakban csökkenő tendenciát mutatott az adott I-R kontroll csoporthoz képest ($p_A=0,06$; $p_B=0,07$). Májhomogenizátum mintákban a B/3 csoport esetében szintén csökkenő tendenciát láttunk ($p_B=0,06$), míg az A/3 csoportban az antioxidáns kapacitás szignifikánsan javult A/2 csoporthoz képest ($p_A=0,03$).

A *redukáló képesség* értéke a szérumban levosimendan kezelést követően szignifikánsan javult a megfelelő I-R kontroll csoporthoz képest mindkét időablakban, míg májhomogenizátum vonatkozásában a javulás szintén csak a rövid latenciával adott előkezelés esetében mutatkozott szignifikánsnak. *Szabad SH-csoportok* vizsgálatával a májhomogenizátum mintákban mindkét kezelési időablakban szignifikáns javulást tapasztaltunk a levosimendan-kezelt csoportokban az I-R kontroll csoportokhoz képest, míg a szérummintákban javuló tendenciát láttunk. A *H-donor aktivitás* az A/3 csoport esetében a szérumban mutatott szignifikáns javulást az A/2 csoporthoz képest, míg májhomogenizátumban, illetve hosszú látenciájú kezelés esetében javuló tendenciát láttunk.

NADH-tetrazolium enzimhisztokémiai reakció: Az egyszerű áloperált állatokban megjelenő NBT-pozitívias nem különbözött az egészséges állatok értékeitől. A B/1 csoportban szignifikánsan alacsonyabb arányban voltak jelen funkcionáló mitokondriumok, mint az egyszerű áloperált állatok esetében ($p=0,024$), míg az A/1 csoportban csökkenő tendenciát láttunk ($p=0,104$). Ezen túlmenően, minden hosszú latenciájú I-R károsodott csoport szignifikánsan alacsonyabb pozitivitást mutatott a megfelelő rövid latenciájú csoporthoz képest ($p_2=0,0001$; $p_3=0,015$), ami direkt módon utal a csökkent májszöveti viabilitásra ezen kategóriában. Az I-R károsodott csoportokat összehasonlítva azt találtuk, hogy a B/3 csoportban szignifikánsan nőtt az NBT-pozitív területek aránya a B/2 csoporthoz képest ($p_B=0,003$), míg az A/3 csoport esetében javuló tendencia volt megfigyelhető ($p_A=0,14$).

HSP72 expresszió: Az iszkémia-reperfúzió átesett csoportok mindegyikében az áloperált csoportokhoz képest 2-3x-os, szignifikáns emelkedését tapasztaltuk a HSP72 expresszió mértékében. A levosimendan kezelés sem önmagában, sem I-R károsodás előtt alkalmazva nem eredményezett változást az I-R kontroll csoportokhoz képest.

KÖVETKEZTETÉSEK

A vizsgálatok tervezésénél feltett kérdésekre az alábbi válaszok adhatók:

Első kísérlet: Hosszú latenciájú glutamin előkezelés

1/ A szövettani metszetek értékelése alapján, a 24 órával a műtét előtt adott L-alanil-L-glutamin előkezelés képes a máj I-R károsodásának csökkentésére, tervezetten kirekesztésben operált májrezekciók esetén.

2/ A máj korai reperfúziós mikrocirkulációjában, a műtét előtt közvetlenül adott L-alanil-L-glutamin előkezeléssel ellentétben, nem észlelhető szignifikáns javulás a kezelés hatására.

3/ A glutamin kezelt csoportban a májszöveti antioxidáns státusz szignifikáns – a rövid latenciájú előkezeléshez képest kifejezettebb – javulása tapasztalható, minek alapján valószínű, hogy elsősorban e hatás vezet a szövetkárosodás csökkenéséhez.

Második kísérlet: Rövid és hosszú latenciájú levosimendan előkezelés

1/ 24 órás reperfúziót követően vizsgálva a levosimendan kezelés mindkét formája markánsan képes csökkenteni az I-R talaján kialakuló májkárosodás mértékét.

2/ A korai reperfúziós májszöveti mikrocirkulációt mindkét előkezelési protokoll képes szignifikáns mértékben javítani.

3/ Az kezelt csoportokban a májszöveti antioxidáns státusz javuló tendenciát mutat.

4/ Jelen kísérleti elrendezésben direkt hepatoprotektív hatás jelenléte nem valószínű, a levosimendan kezelés pozitív hatása inkább hemodinamikai eredetű lehet.

5/ A műtét előtt 24 órával alkalmazott levosimendan előkezelés összességében kifejezettebb védőhatást képes létrehozni a májszöveti iszkémiás-reperfúziós károsodással szemben, mint a közvetlen műtét előtt végzett előkezelés.

6/ Metodikai jelentőséggel bír az a felismerés, hogy a 24 órával korábban végzett előkezelés jelentősen képes növelni a műtéti stressz mértékét patkányok esetében.

Eredményeink alapján mind a parenterális glutamin, mind a levosimendan előkezelés helyet kaphat potenciálisan máj iszkémiás-reperfúziós károsodást eredményező műtétek előkészítésében. A protekció hátterében glutamin esetében az antioxidáns státuszra gyakorolt kedvező hatás állhat, míg a levosimendan valószínűleg főleg pozitív makrohemodinamikai tulajdonságai révén másodlagosan javítja a májszövet állapotát. A különböző elsődleges támadási pontok alapján felmerül a két előkezelési stratégia kombinálásának lehetősége is.

PUBLIKÁCIÓK

A tézisek témájához kapcsolódó közlemények

1/ Stangl R, Szijártó A, Ónody P, Tamás J, Tátrai M, Hegedüs V, Blázovics A, Lotz G, Kiss A, Módis K, Gerő D, Szabó Cs, Kupcsulik P, Harsányi L. (2011) Reduction of liver ischemia-reperfusion injury via glutamine pretreatment. *Journal of Surgical Research*, 166 (1): 95-103. **IF: 2.247**

2/ Szijártó A, Hahn O, Batmunkh E, Stangl R, Kiss A, Lotz G, Schaff Zs, Váli L, Blázovics A, Gerő D, Szabó Cs, Kupcsulik P, Harsányi L. (2007) Short-term alanyl-glutamine dipeptide pretreatment in liver ischemia-reperfusion model: effects on microcirculation and antioxidant status in rats. *Clin Nutr*, (26):640-48. **IF: 2.878**

További közlemények

3/ Módis K, Gerő D, Stangl R, Rosero O, Szijártó A, Lotz G, Mohácsik P, Szoleczky P, Coletta C, Szabó Cs. (2012) Adenosine and inosine exert cytoprotective effects in an in vitro model of liver ischemia-reperfusion injury. *International Journal of Molecular Medicine*, 31 (2): 437-446. **IF: 1.573 (2011)**

4/ Rosero O, Ónody P, Stangl R, Hegedüs V, Lotz G, Blázovics A, Kupcsulik P, Szijártó A. (2011) Posztkondicionálás kísérletes vizsgálata vékonybél ischaemiás-reperfüziós modelljében. *Magyar Sebészet*, 64 (1): 28-36.

5/ Gyurkovics E, Arányi P, Stangl R, Ónody P, Ferreira G, Lotz G, Kupcsulik P, Szijártó A. (2011) Postconditioning of the lower limb - protection against the reperfusion syndrome. *Journal of Surgical Research*, 169 (1): 139-47 p. **IF: 2.247**

6/ Szijártó A, Turóczy Zs, Arányi P, Garbaisz D, Varga M, Stangl R, Lotz G, Kupcsulik P. (2010) Hosszú idejű végtagi verőér-elzáródás és izomszövet-életképesség vizsgálata kísérletes állatmodellben. *Magyar Sebészet*, 63 (6): 374-79.

7/ Szijártó A, Gyurkovics E, Arányi P, Ónody P, Stangl R, Tátrai M, Lotz G, Mihály Z, Hegedüs V, Blázovics A, Kupcsulik P. (2009) Posztkondicionálás kísérletes alkalmazása aortakirekesztés kapcsán. *Magyar Sebészet*, 62 (4): 180-87.

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

A témazár témájához kapcsolódó idézhető előadáskivonatok

- 1/ Stangl R, Rosero O, Schneider Á, Turóczy Zs, Lotz G, Szijártó A. (2010) Levosimendan pretreatment in the reduction of liver ischemia-reperfusion injury (MÉT 74. Vándorgyűlése, Szeged, 2010) Acta Physiol Hung, 97 (4): 474. **IF: 1.226**
- 2/ Stangl R, Szijártó A, Ónody P, Lotz G, Kupcsulik P, Blázovics A, Harsányi L. (2010) Reducing local and systemic consequences of liver ischemia-reperfusion injury by parenteral glutamine pretreatment in rats (45th Congress of the ESSR, Geneva, Switzerland, 2010) British Journal of Surgery, 97:(4): S18. **IF: 4.606**
- 3/ Ónody P, Stangl R, Szijártó A, Kupcsulik P, Harsányi L. (2009) Parenteral glutamine pretreatment reduces local tissue damage after ischemia-reperfusion injury of the liver in rats (31th Congress of Clinical Nutrition and Metabolism, Vienna, Austria, 2009) P-075 Clinical Nutrition Supplements, 4 (Suppl 2): 57 p.
- 4/ Stangl R, Ónody P, Szijártó A, Kupcsulik P, Harsányi L. (2009) Improving hepatic microcirculation and antioxidant state after ischemia-reperfusion injury of the liver by glutamine pretreatment in rats (31th Congress of Clinical Nutrition and Metabolism, Vienna, Austria, 2009) P-076 Clin Nutr Suppl, 4 (2): 57. **Traveller Fellowship**
- 5/ Stangl R, Szijártó A, Kiss A, Lotz G, Schaff Z, Blázovics A, Gerő D, Szabó C, Kupcsulik P, Harsányi L, Darvas K. (2009) Effects of parenteral alanyl-glutamine dipeptide pretreatments on the ischemia-reperfusion injury of the liver in rats (Abstracts from the Hungarian Society of Anesthesiology and Intensive Therapy, 36th Annual Conference) Journal of Critical Care, 24: 146 p. **IF: 1.748**
- 6/ Stangl R, Szijártó A, Ónody P, Tátrai M, Mihály Z, Lotz G, Blázovics A, Gerő D, Kupcsulik P. (2008) Levosimendan, mint kémiai preconditionáló szer a májsebészetben. (MST 59. Kongresszusa, Debrecen, 2008) Magyar Sebészet, 61(3): 188.
- 7/ Stangl R, Szijártó A, Lotz G, Harsányi L, Darvas K. (2008) Parenterális glutamin előkezelések hatása máj ischaemiás-reperfúziós modellben. (MAITT 36. Kongresszusa, Balatonfüred, 2008) Aneszteziológia és Intenzív Terápia, 38 (Suppl 1): 4-5. **Boros Mihály Pályázat**
- 8/ Szijártó A, Hahn O, Batmunkh E, Stangl R, Kiss A, Váli L, Blázovics A, Kupcsulik P, Harsányi L. (2007) Short term alanyl-glutamine dipeptide pretreatment in liver ischemia-reperfusion model: effects on microcirculation and antioxidant status in rats.

(29th Congress of Clinical Nutrition and Metabolism, Praha, Czech Republic, 2007) P-060 Clinical Nutrition Supplements, 2 (Suppl 2): 47-48. **Traveller Fellowship**

9/ Stangl R, Szijártó A, Harsányi L, Kupcsulik P, Darvas K. (2007) Glutamin előkezelés hatása máj ischaemiás-reperfúziós károsodására(MAITT 35. Kongresszusa, Debrecen, 2007) EA-11: Aneszteziológia és Intenzív Terápia, 37 (Suppl 1): 16.

További idézhető előadáskivonatok

10/ Ónody P, Stangl R, Ferreira G, Hegedüs V, Lotz G, Kupcsulik P, Szijártó A. (2010) Postconditioning of small intestine on ischemia reperfusion injury model of rats. (45th Congress of the ESSR, Geneva, Switzerland, 2010) British Journal of Surgery, 97:(4): S18. **IF: 4.606**

11/ Rosero O, Stangl R, Ónody P, Hegedüs V, Lotz G, Kupcsulik P, Szijártó A. (2010) Effect of postconditioning in ischemia-reperfusion injury of the intestine on rats. (MÉT 74. Szeged, 2010) Acta Physiol Hung, 97 (4): 471. **IF: 1.226**

12/ Stangl R, Módos K, Rosero O, Oláh D, Lotz G, Gerő D, Szijártó A. (2009) Inozin-előkezelés hatásának vizsgálata patkánymáj ischaemia-reperfúziós modellben. (MST, 22. KSK, Szeged, 2009) Abstr. No 24. Magyar Sebészet, 62 (3): 148.

13/ Szijártó A, Arányi P, Stangl R, Ónody P, Kupcsulik P, Gyurkovics E. (2008) Effect of postconditioning in major vascular operations in rats. (23rd World Congress of the International Union of Angiology, Athens, Greece, 2008) International Angiology, 27 (3): (Suppl 1) 65-66. **IF:1.418**

14/ Stangl R, Tátrai M, Ónody P, Szijártó A, Kupcsulik P. (2007) Ischaemiás preconditionálás és kémiai előkezelések hatása a patkánymáj ischaemia toleranciájára. (MST, 21. KSK, Pécs, 2007) Magyar Sebészet, 60 (3): 181.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék e helyen köszönetet mondani témavezetőmnek Dr. Szijártó Attilának tanácsaiért és kitartó biztatásáért, valamint konzulensemnek Dr. Darvas Katalin Professzorasszonynak támogatásáért és megértéséért. További köszönet illeti a Kísérleti Műtő, a II. sz. Patológiai Intézet és a CellScreen Applied Research Center mindazon munkatársait, akik nélkül ez a dolgozat nem készülhetett volna el. Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni édesanyámnak, testvéremnek és barátaimnak a belém vetett hitüket, mely mindenkor erőt adott.