

# A végtagi távoli szervi iszkémiás perkondicionálás hepatoprotektív hatásainak vizsgálata

Doktori tézisek

**Dr. Czigány Zoltán**

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola  
Semmelweis Egyetem



Témavezető:

Dr. Szijártó Attila, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók:

Dr. Németh Norbert, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Kiss Levente, Ph.D., egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Máthé Zoltán, Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Ferencz Andrea, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Dede Kristóf, Ph.D., egyetemi adjunktus

Budapest  
2016

## Bevezetés

Az utóbbi néhány évtized során progresszív csökkenés volt megfigyelhető a major májreszekciókat, transzplantációkat és más kirekesztés mellett végrehajtott májsebészeti beavatkozásokat követő morbiditási és mortalitási mutatók tekintetében. A major reszekciókkal kapcsolatos mortalitás az 1990-es évekhez képest a felére csökkent, így ma mintegy 3-7% os mortalitásról beszélhetünk tanulmányoktól függően.

Megjegyzendő ugyanakkor, hogy a cirrózis vagy egyéb krónikus máj- vagy kísérőbetegségek mellett végrehajtott major reszekciók még ma is szignifikáns mortalitással járhatnak (akár 16%). A májkirekesztés időtartama az egyik legmeghatározóbb faktor lehet a major májsebészeti beavatkozásban részesülő betegpopulációban. Ebből következően számtalan sebészeti és gyógyszeres módszer került kidolgozásra a máj iszkémiás-reperfúziós (IR) károsodásának mérséklésére.

A klasszikus lokális kondicionálási eljárások, úgymint az iszkémiás pre- és poszt-kondicionálás, hatékonyságát számtalan közlemény bizonyította különböző szervek, így a máj esetében is. 1993-ban egy új elmélet jelent meg a sebészeti kondicionálás terén: a távoli szervi kondicionálás gondolata. Az elképzelés alapját a megfigyelés adta, miszerint a célszervi protektív hatás elérhető nem csak lokálisan, de egy távoli szerven létrehozott rövid IR ciklusok alkalmazásával is.

*A távoli szervi iszkémiás perkondicionálás (RIPER) egy távoli szerven, a célszervi iszkémia kezdete után, de még a reperfúzió előtt létrehozott rövid iszkémiás-reperfúziós ciklusok alkalmazását jelenti.*

Több kísérletes és klinikai vizsgálat tanúsága szerint ezen újszerű technika képes a miokardiális és agyi IR károsodás csökkentésére. Ugyan a perkondicionálás több vizsgálatban hatékonynak bizonyult, mindazonáltal a módszer háttérben álló mechanizmusok egyelőre nagyrészt feltáratlanok.

A jelent doktori munka során két kísérleti modellt terveztünk a RIPER patkánymáj iszkémiás-reperfúziós károsodásra kifejített hatásainak, továbbá a távoli szervi kondicionálás háttérben álló neurális mechanizmusok jelenlétének vizsgálatára.

## Célkitűzés

Vizsgálataink fő célja egy újszerű technika patkánymáj károsodásra kifejtett hatásainak elemzése volt. A perkondicionálás hepatoprotektív hatásait igazoló kísérletek után célul tűztük ki a RIPER indukálta védő hatás háttérében álló idegelemek szerepének vizsgálatát.

A jelen doktori munka során az alábbi kérdésekre kerestünk választ:

1. Alkalmas-e az általunk használt patkánymáj iszkémiás-reperfúzió és távoli szervi iszkémiás perkondicionálás modell a távoli szervi iszkémiás perkondicionálás hatásainak vizsgálatára?
2. Képes-e a használt távoli szervi iszkémiás perkondicionálási protokoll hatást kifejteni
  - a, a májszöveti károsodás
  - b, a szisztémás hemodinamika valamint a máj és végtagi mikrocirkuláció
  - c, továbbá a redox-homeosztázis és szisztémás gyulladás tekintetében?
3. Képes-e a bal femorális artérián alkalmazott perkondicionálás ugyancsak hepatoprotektív hatást kifejteni, és ha igen, milyen hatást gyakorol a perkondicionálás indukálta hepatoprotekcióra a távoli szerv denerválása?
4. Alkalmas-e a csempe alapú (“tile-based”) automatizált szövettani analízis egy valós kísérleti elrendezés keretében történő alkalmazásra?

## Anyagok és módszerek

A vizsgálat a Semmelweis Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottság engedélyével történt. Az állatkísérletek a 40/2013. (II. 14.) kormányrendelet előírásainak megfelelően zajlottak.

A vizsgálatban 200-250g tömegű hím Wistar patkányok ( $\Sigma n=114$ ) kerültek felhasználásra (Semmelweis Egyetem Központi Állatház, Budapest, Magyarország). Az állatok elhelyezése az előírt kísérletes állattartási körülményeknek megfelelően történt.

Kísérletes beavatkozásainkat általános anesztéziában végeztük ketamin (Calypsol<sup>®</sup>) és xylazin (Xylasin<sup>®</sup>) felhasználásával.

### Műtéti protokoll

Az intraperitoneális anesztézia indukcióját követően a jobb vena jugularis (anesztézia) és a jobb arteria carotis (hemodinamikai mérés) kanülálására került sor 22-G polyethylene kanül felhasználásával.

Medián laparotómiát követően a májat mobilizáltuk. A kísérlet során a középsős és a bal laterális lebenyek biliovaszkuláris nyelére atraumatikus mikroklippet helyezve a májban 60 perc időtartamú iszkémiát hoztunk létre. A munkacsoportunk által kifejlesztett modellben a máj mintegy kétharmadát érintő iszkémiát indukáltunk, mialatt a jobb laterális és kaudális lebenyek vérellátása intakt maradt. Az iszkémia és reperfúzió periódusa alatt a hasi metszés műanyag fóliával került fedésre az evaporáció útján történő folyadékvesztés megakadályozására.

A söntölő lebenyek (jobb laterális és caudális lebenyek) eltávolítását (30% májreszekció) az iszkémia utolsó 10 percére időzítettük. Az iszkémia végeztével a májról a mikroklipp eltávolításra került.

### Vizsgálatok és kísérleti csoportok

#### *I. vizsgálat*

Az állatokat ( $\Sigma n=72$ ) három kísérleti csoportba randomizáltuk: Áloperált, IR, IR-RIPER (n=24/csoport). 20 perc, az anesztézia indukcióját és a laparotómiát követő felépülési szak után minden állatban 60 perces részleges májiskémiát vagy annak megfelelő obszervációs periódust hoztunk létre. Ezt a csoportbeosztástól függően 1, 6 vagy 24 óra reperfúzió

követte. A RIPER kezelést az infrarenális aorta kirekesztésével hoztuk létre (5 perc iszkémia és 5 perc reperfúzió 4 ciklusban a máj iszkémia utolsó 40 perce alatt). Az első posztiszkémiás óra során az állatokat folyamatosan megfigyeltük, vérnyomás és a mikrocirkulációs változások kerültek regisztrálásra. 1, 6 vagy 24 óra reperfúziót követően az állatokat túlaltatásos anesztéziában termináltuk vér és szövetminták gyűjtése céljából (n=8/időpontonként).

## *II. vizsgálat*

A kísérleti állatokat hat csoportba osztottuk ( $\Sigma n=42$ ): Áloperált, Áloperált-N, IR, IR-N, IR-RIPER, IR-RIPER-N (n=7/csoport). Minden állat esetében elvégeztük a bal nervus femoralis és ischiadicus reszekcióját, vagy a femoralis és ischiadicus anatómiai képletek preparálását (áloperált). Ezt 20 perc, az iszkémiát megelőző felépülési szak követte. Az állatokban 60 perc parciális máj iszkémiát, vagy az Áloperált és Áloperált-N csoportokban 60 percnél megfelelő megfigyelési szakot hoztunk létre, melyet 24 óra reperfúzió követett. A perkondicionálási kezelést a bal arteria femoralison alkalmaztuk (5 perc iszkémia és 5 perc reperfúziós 4 ciklusban a máj iszkémia utolsó 40 perce alatt). A reperfúzió első 60 percében az állatokat szorosan követtük a vérnyomás és mikrocirkulációs értékeket regisztráltuk. A 24 óra reperfúziós időtartam végén az állatokat túlaltatásos anesztéziában termináltuk vér és szövettani mintavétel céljából.

## Szisztémás hemodinamikai változások és mikrocirkuláció

A hemodinamikai és mikrocirkulációs mérések 125 perces időtartamban folytak a laparotómiát és 20 perces felépülési szakot követően (5 perc alapáramlás, 60 perc iszkémia, 60 perc reperfúzió).

### *Hemodinamika*

A vérnyomás változások regisztrálására egy invazív vérnyomásmérő rendszer segítségével került sor (Kent Scientific Corporation, Torrington, CT).

I. Vizsgálat: A csoportok közötti különbségek vizsgálatára a reperfúziós artériás középnyomásértékek (mean arterial pressure – MAP) platófázisra eső 20 percnél átlagát számoltuk.

II. Vizsgálat: A második vizsgálatban a korai reperfúzió legkritikusabb időpontjai kerültek összehasonlításra (Reperfúzió 0., 30., 60. perc).

### *Mikrocirkuláció*

A mikrocirkuláció mérését lézer Doppler áramlásmérő és felszíni mérőfej segítségével végeztük (DRT4 device with DP1T surface probe; Moor Instruments Ltd, London, Egyesült Királyság).

A lézer Doppler mérőfej a máj bal laterális lebenyén került elhelyezésre és rögzítésre. Az I. Vizsgálatban egy másik mérőfejet a bal musculus biceps femoris felszínén rögzítettünk, a máj IR és a perkondicionálási kezelés alsó végtagi mikrocirkulációra gyakorolt hatásának vizsgálatára. Az adatok matematikai transzformációjára a feldolgozás kapcsán került sor. A reperfúziós mikrocirkulációt jellemző számolt paraméterekként a reperfúziós görbe alatti terület integráltja (reperfúziós terület: RT) és a plató maximum (PM) került bevezetésre.

### Fénymikroszkópia és automatizált képanalízis

#### *Szövetteni analízis – I. Vizsgálat*

A szövetteni minták minden állatban identikus anatómiai helyről történtek kimetszésre. A májszövetet paraffinba ágyaztuk, majd a 3 µm vastagságú metszetek hematoxillin-eosinnal kerültek megfestésre. A vizsgáló patológus a kezelés típusa és a csoportbeosztás ismerete nélkül végezte a minták szövetteni értékelését. A metszetek szemikvantitatív értékeléséhez a Suzuki pontrendszert használtuk. A mintákon a szinuszoidális pangás, hepatocytá nekrózis, illetve hepatocytá degeneráció jelenlétét értékeltük 0-4 ig terjedő skálán. Ezen összetett pontrendszer egyszerűsítésére egy összpontszám (az előbb említett paraméterek eredményeinek összege) került bevezetésre. Így minden állat esetében maximálisan 12 pont volt adható. Metszetenként 10 random látótér került vizsgálatra.

#### *Szövetteni analízis – II. Vizsgálat*

Az első vizsgálattal kapcsolatban részletezett mintafeldolgozást követően a metszetek Panoramic 250 metszet digitalizáló berendezés (3DHISTECH Ltd, Budapest, Magyarország) segítségével kerültek

szkennelésre. Kísérleti állatonként két metszet került digitalizálásra. A nekrozis kvantifikálást egy a kollaborációs partnerünk (Fraunhofer Mevis Institute, Bréma, Németország) által biztosított kísérleti képanalizáló szoftver segítségével végeztük.

Egy szükséges tanulási fázist követően a jelen vizsgálat metszeteit a program automatikus analízis funkciója segítségével vizsgáltuk. Az automatikus kvantifikáció eredményeinek validálását és a további patológiai elváltozások értékelését két független vizsgáló végezte. A metszeteken látható nekrozis kiterjedése százalékban került megadásra (nekrozis% = nekrotikus terület / [nekrotikus terület + ép terület] \* 100%)

### Biokémiai vizsgálatok

A kísérletek végén az állatok a jobb kamra punkciójának útján kerültek kivézetetésre. Ezt követően a vérmintákat centrifugáltuk (3000 rpm, 2x10 perc, szobahőmérséklet). A minták folyékony nitrogénben történő gyorsfagyasztást követően kerültek tárolásra (-80°C). A plazma aszpartát aminotranszferáz (AST), alanin aminotranszferáz (ALT) és összbilirubin (tBi) szintjeinek meghatározása laboratóriumi autómátán történt (Beckman Coulter AU480/2011; Beckman Coulter Inc, Brea, CA, USA).

### Redox-homeosztázis vizsgálatok

A reziduális májszövet 4°C került homogenizálásra Potter-Elvehjem készülék segítségével. A minták fehérjetartalmát (10 mg/mL) Lowry módszere szerint standardizáltuk.

### *Szöveti szabadgyök koncentráció és antioxidáns kapacitás mérése*

A szöveti reaktív oxigén gyökök mérése chemi-lumineszcenz módszerrel történt. A méréseket Blázovics és mtsai. módszere szerint végeztük Lumat LB 9051 luminométer felhasználásával (Berthold Technologies Kft., Bad Wildbad, Németország). A fényintenzitás, mely a háttérhez viszonyított relatív intenzitás százalékban került kifejezésre, egyenesen arányos a minta szabadgyöktartalmával.

Az antioxidáns kapacitás mérésére három további spektrofotometriás mérési protokoll került felhasználásra. A méréseket

Hitachi U-2000 (Hitachi High- Technologies Corporation, Tokio, Japán) berendezés segítségével végeztük. A minta globális antioxidáns képessége aszkorbinsav ekvivalensben került kifejezésre (mgAS/mL). A Hidrogén donor kapacitás mérését Blois Blázovics által módosított módszere szerint végeztük. A gátlás százalékban kifejezett eredmények a minta nem fehérjefüggő antioxidáns kapacitást tükrözik. Szöveti Tiol (SH) csoportok meghatározása Sedlak és Lindsay módszerének megfelelően történt. Az eredmények a fehérje kötött szöveti antioxidáns kapacitást jellemzik ( $\mu\text{mol/L}$ ).

### Szérum TNF- $\alpha$ szintek

A szérum TNF- $\alpha$  szinteket kereskedelmi forgalomban kapható ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) kiték segítségével végeztük a gyártó által biztosított protokoll alapján (Quantikine Rat TNF- $\alpha$  Immunoassay kit; R&D Systems Inc, Mineapolis, MN, USA). Minden minta duplán került meghatározásra. A TNF- $\alpha$  koncentrációk számítása pg/mL mértékegységben, a gyártó által biztosított standard görbék alapján történt.

### Statisztikai analízis

Az értékeket átlag  $\pm$  standard deviáció formában fejeztük ki. A statisztikai értékelés egyutas ANOVA teszt és Scheffe post-hoc test segítségével történt. A hisztologiai értékes eredményei esetében Kruskal-Wallis H test került felhasználásra.  $p < 0.05$  különbség esetén a csoportok közti különbségeket szignifikánsnak értékeltük. A számításokat IBM SPSS Statistics 20 szoftver segítségével végeztük (IBM Corporation, Armonk, NY, USA).

## **Eredmények – I. Vizsgálat**

### Szisztémás hemodinamika és mikrocirkuláció

#### *Hemodinamika*

Az iszkémiát megelőző artériás középnyomás (MAP) értékekben nem volt szignifikáns különbség a csoportok között. A reperfúzió kezdetén mindegyik IR károsodott csoportban jelentős MAP csökkenés volt



megfigyelhető. A késői reperfúzió tekintetében, ahol az artériás középnyomás platófázist ért el (a 60 perces reperfúzió utolsó 20 perce), szignifikáns különbség volt felfedezhető az Áloperált és IR-RIPER csoportok és az IR csoport között (Áloperált vs. IR:  $80,6 \pm 1,9$  Hgmm vs.  $67,8 \pm 7,6$  Hgmm,  $p=0,026$ ; IR-RIPER vs. IR:  $80,9 \pm 6,2$  Hgmm vs.  $67,8 \pm 7,6$  Hgmm,  $p=0,012$ ).

### *Mikrocirkuláció*

Az áloperált csoport állatainak máj mikrocirkulációja a kísérlet teljes időtartama alatt az alapáramlás értéke körül maradt. A reperfúziós terület és plató maximum szignifikáns javulása volt tapasztalható az IR-RIPER csoportban összehasonlítva az IR csoporttal (RT:  $p=0,005$ ; PM:  $p=0,0002$ ).

Az alsó végtagi reperfúziós mikrocirkulációt illetően szignifikánsan magasabb PM értéket regisztráltunk az IR-RIPER csoportban az IR csoporthoz képest (PM:  $p=0,038$ ).

### Szövetteni analízis

Az áloperált csoport metszetein említésre méltó patológiai elváltozások nem voltak fellelhetőek. Egy óra reperfúziót követően az IR<sub>1óra</sub> csoportban jelentős szinuszoidális pangás volt látható. Ezzel szemben kifejezetten kedvezőbb szövetteni képet találtunk az IR-RIPER<sub>1óra</sub> csoportban. Hat óra reperfúzió jelentős összefolyó centrilobuláris nekrotikus zónák megjelenését eredményezte az IR<sub>6óra</sub> csoport metszetein, míg az IR-RIPER<sub>6óra</sub> csoportban csupán kisebb nekrotikus területek voltak észlelhetőek. A 24 óra reperfúzióknak kitett állatok metszetei esetében kifejezett nekrotikus zónákat detektáltunk az IR<sub>24óra</sub> csoportban. Hasonló patológiai eltéréseket láttunk az IR-RIPER<sub>24óra</sub> csoportban. Mindazonáltal elmondható, hogy a teljes károsodás tekintetében a kezelt csoport elmaradt az IR<sub>24óra</sub> csoporthoz képest. Ennek megfelelően a szövetteni összpontszám értéke szignifikánsan alacsonyabb volt az IR-RIPER csoportban az IR csoporthoz képest, minden vizsgált reperfúziós időtartamot követően.

## Biokémiai mérések

A mért AST és ALT értékek szignifikánsan alacsonyabbnak mutatkoztak az IR-RIPER csoportban az IR csoporthoz képest minden vizsgált időtartamot követően, csökkent hepatocita károsodást jelezve a perkondicionált csoport esetében.

## Redox homeosztázis

Hat és 24 óra reperfúziót követően a májhomogenizátum chemilumineszcensz intenzitás szignifikánsan csökkent az IR-RIPER csoportban az IR csoporthoz képest, ugyanakkor az 1 órás reperfúziós csoportban mindez nem volt megfigyelhető (IR-RIPER<sub>6óra</sub> vs. IR<sub>6óra</sub> p=0,046; IR-RIPER<sub>24óra</sub> vs. IR<sub>24óra</sub> p=0,049).

### 1. TÁBLÁZAT

Redox státusz mérések eredményei				
		Áloperált	IR	IR-RIPER
Szabadgyök (RLU%)	1 h	0,05±0,02	0,14±0,02 a	0,16±0,05 a
	6 h	123,8±16,6	162,3±10,9 b	133,5±11,0 c
	24 h	137,3±23,6	182,0±14,0 a	141,7±18,7 c
Redukálóképesség (µgAA/ml)	1 h	144,9±39,0	106,4±14,2 a	116,6±17,5
	6 h	102,9±5,4	76,4±8,0 a	86,4±4,6 a
	24 h	90,6±6,8	55,2±11,8 b	76,1±11,9 c
SH-csoportok (µmol/L)	1 h	815,9±138,2	493,4±100,4 b	622,7±40,4 a
	6 h	456,1±97,7	249,7±82,6 a	455,1±101,4 c
	24 h	523,1±25,4	349,2±54,9 a	499,9±112,4 c
H-donor kapacitás (gátlás%)	1 h	84,6±8,8	68,8±10,3	84,1±11,8
	6 h	43,6±3,0	29,5±4,8 a	41,8±6,4 c
	24 h	46,4±19,7	16,4±7,3 a	37,9±5,1 c

<sup>a</sup>p<0,05 vs. Áloper; <sup>b</sup>p<0,01 vs. Áloper; <sup>c</sup>p<0,05 vs. IR; (átlag±standard deviáció, n=8/csoport)

A májszöveti globális antioxidáns kapacitást jellemző redukáló képesség megőrzöttnek bizonyult az IR-RIPER<sub>24óra</sub> csoportban összehasonlítva az IR<sub>24óra</sub> csoporttal (IR-RIPER<sub>24óra</sub> vs. IR<sub>24óra</sub> p=0,025). Az 1 órás reperfúziós időtartam kivételével minden időpontban szignifikánsan magasabb proteinhez kötött (SH-csoportok) és protein független (H-donor

kapacitás) antioxidáns kapacitás értékeket mértünk az IR-RIPER csoportban az IR csoporthoz képest (1. Táblázat).

### Szérum TNF- $\alpha$ szintek

A TNF- $\alpha$  szintek meghatározására végzett szendvics ELISA mérések szembetűnő különbségeket mutattak. Szignifikáns csökkenés volt megfigyelhető a TNF- $\alpha$  szintjében az IR-RIPER<sub>1óra</sub> csoportban az IR<sub>1óra</sub> csoporthoz képest ( $p < 0,001$ ). Ugyancsak statisztikai szignifikanciát elérő eltérést láttunk a két IR károsodott csoport (IR-RIPER<sub>6óra</sub> vs. IR<sub>6óra</sub>) értékei között 6 óra reperfüziót követően ( $p < 0,05$ ). Egy nappal a máj reperfúziója után nagymértékben lecsökkent TNF- $\alpha$  szinteket mértünk mindegyik kísérleti csoportban.

## Eredmények – II. Vizsgálat

### Szisztémás hemodinamika és mikrocirkuláció

#### *Hemodinamika*

Az iszkémiát megelőző artériás középnyomásértékek tekintetében nem volt szignifikáns különbség a kísérleti csoportok között. Az iszkémiás szakasz alatt nem találtunk érdemi eltéréseket a csoportok között, az állatok középnyomás értékei 76-86 Hgmm közötti enyhe fluktuációt mutattak. A reperfüziót követően egy jelentős vérnyomásesés (~35-40 Hgmm) volt látható mindegyik IR károsodott csoport esetében ( $p < 0,001$  IR, IR-N, IR-RIPER, IR-RIPER-N vs. Áloperált and Áloperált-N), a csoportok közötti feltűnő különbségek nélkül.

A reperfüzió alatt az artériás középnyomás ugyan emelkedett az IR csoportokban, de a 60 perces megfigyelés alatt nem érte el az Áloperált és Áloperált-N csoport értékeit. A reperfüzió kezdete után 30 perccel a perkondicionált csoport (IR-RIPER) középnyomás értékei szignifikánsan ( $p < 0,05$ ) magasabbak voltak az IR és IR-N csoporttal történő összehasonlításban.

Egy órával a reperfüziót követően az IR-RIPER csoport artériás középnyomása szignifikánsan magasabbnak mutatkozott a további három

IR károsodott csoport értékeihez képest ( $p < 0,05$  IR-RIPER vs. IR-RIPER-N;  $p < 0,01$  IR-RIPER vs. IR and IR-N).

### *Mikrocirkuláció*

A kísérletek során nem találtunk szignifikáns különbséget az áloperált csoportok (Áloperált, Áloperált-N) mikrocirkulációjának tekintetében.

A négy IR csoport vonatkozásában szignifikánsan csökkent mikrokeringési paramétereket detektáltunk az áloperált csoportokhoz képest. Mindazonáltal a perkondicionálási kezelés képes volt a reperfüziós terület és a plató maximum értékek szignifikáns javítására az IR csoporttal történő összehasonlításban ( $p = 0,034$ ,  $p = 0,041$ ; IR-RIPER vs. IR).

Ezen előnyös változás nem volt megfigyelhető az IR-RIPER-N csoportban. A perkondicionált csoport állatainak mikrokeringése a kontroll csoport értékeinek környékén maradt. Az IR, IR-N, és IR-RIPER-N csoportok között nem találtunk szignifikáns különbségeket.

### Szöveti analízis

Feltűnő szöveti eltérések az áloperált csoport (Sham, Sham-N) állatainak metszetein nem voltak megfigyelhetőek. A nekrosis morphometria tanúsága szerint a perkondicionálás képes volt csökkenteni a szöveti nekrosis mértékét az IR és IR-N csoportokkal összehasonlítva ( $p < 0,01$ ). A kondicionálást megelőző idegátmetszés (IR-RIPER-N) szignifikánsan magasabb májszöveti károsodást eredményezett az IR-RIPER csoporttal összehasonlítva ( $p < 0,01$  IR-RIPER vs. IR-RIPER-N). Ezen csoport (IR-RIPER-N) és az IR, IR-N csoportok között nem volt szignifikáns különbség.

### Biokémiai mérések

24 óra reperfüziót követően az IR károsodott csoportok szérum transzamináz értékei szignifikánsan emelkedettek voltak. Az ALT vonatkozásában szignifikánsan magasabb ( $p < 0,01$ ) szinteket mértünk az IR, IR-N, és IR-RIPER-N csoportban a Sham és Sham-N csoportokkal összehasonlítva. Az IR-RIPER csoport tekintetében a szérum ALT emelkedése szignifikánsan enyhébb volt mint a további három IR károsodott csoport esetében ( $p < 0,05$  IR-RIPER vs. IR, IR-N, IR-RIPER-N).

Az AST felszabadulási karakterisztikája mindettől eltérőnek bizonyult. Az aszpartát aminotranszferáz tekintetében egy szignifikáns emelkedés ( $p < 0,01$ ) volt látható mindegyik IR károsodott csoportban az áloperált csoportokhoz képest. Mindazonáltal a perkondicionálási kezelésnek nem volt hatása az AST szintekre.

Az összbilirubin vonatkozásában 60 perc iszkémia és 24 óra reperfúzió után nem találtunk jelentősebb eltérést egyik kísérleti csoportban sem. Enyhe, de szignifikáns tBi emelkedés volt megfigyelhető az IR, IR-N, IR-RIPER-N csoportokban az Áloperált csoportokkal összehasonlítva.

### Redox homeosztázis

A chemi-lumineszcenz intenzitás és ezzel arányosan a szöveti szabadgyök tartalom 24 óra reperfúziót követően szignifikánsan emelkedettnek bizonyult mindegyik IR-ben részesült csoportban az áloperált csoportokhoz képest ( $p < 0,001$  IR, IR-N, IR-RIPER, IR-RIPER-N vs. Áloperált and Áloperált-N), mindazonáltal a perkondicionálási kezelés képes volt erőteljes csökkenést elérni a májhomogenizátumban mért szabadgyök szintek tekintetében a további három IR csoporthoz képest ( $p < 0,01$  IR-RIPER vs. IR, IR-N, IR-RIPER-N) (2. Táblázat).

Egy bonyolultabb mintázat volt látható a különböző szöveti antioxidáns kapacitásról tájékoztató paraméterek tekintetében. A globális redukálóképesség értéke szignifikánsan lecsökkent az IR, IR-N, IR-RIPER-N csoportokban az áloperált állatok értékeihez képest ( $p < 0,01$  IR, IR-N, IR-RIPER-N vs. Áloperált and Áloperált-N) (Táblázat 2.). Az IR-RIPER csoportban egy megőrzöttebb globális antioxidáns védelmi vonal volt megfigyelhető a további három IR csoporttal összehasonlítva ( $p < 0,01$  IR-RIPER vs. IR and IR-RIPER-N;  $p < 0,05$  IR-RIPER vs. IR-N). Megjegyzendő, hogy a szöveti redox-homeosztázisról globálisan tájékoztató paraméterek (luminometria, redukálóképesség) tekintetében nem találtunk szignifikáns különbséget az IR-RIPER-N és az IR, IR-N csoportok között (Táblázat 2.).

A fehérjétől független antioxidánsok szintjén egy szignifikáns ( $p < 0,01$ ) H-donor kapacitás csökkenés volt látható az IR és IR-N csoportokban az Áloperált és Áloperált-N csoportokhoz képest (Táblázat 2.). Az IR-RIPER csoportra jellemző H-donor kapacitás értékek szignifikánsan ( $p < 0,05$ ) magasabbak voltak az IR-N csoporthoz képest, az

IR csoporttal összevetve viszont nem volt szignifikáns az eltérés ( $p=0,062$  IR-RIPER vs. IR). Az IR-RIPER és IR-RIPER-N csoportokra jellemző H-donor kapacitás értékek nem különböztek szignifikánsan sem egymástól, sem pedig az áloperált csoportok értékeitől. Részben hasonló mintázat volt látható a thiol-csoportok mérése kapcsán is. A végtagi denerválás nem eredményezett szignifikáns csökkenést a thiol-csoportok értékeiben ( $p=0,079$ , IR-RIPER vs. IR-RIPER-N). Mindazonáltal elmondható, hogy az IR-RIPER-N csoport értékei nem tértek el jelentősen ( $p>0,05$ ) az IR és IR-N csoportra jellemző átlagtól (Táblázat 2.).

A kísérletek során nem igazoltunk szignifikáns különbséget az Áloperált és Áloperált-N vagy az IR és IR-N csoportok között egyik redox-státuszról tájékoztató paraméter vonatkozásában sem

**2. TÁBLÁZAT**

**Redox homeosztázis**

	Áloperált	Áloperált-N	IR	IR-N	IR-RIPER	IR-RIPER-N
<b>Szabadgyök (RLU%)</b>	6,4±10,5	6,9±11,7	229,2±16,1 a	202,3±20,3 a	131,8±20,8 ab	194,9±16,7 ac
<b>Redukálóképesség (µgAA/ml)</b>	181,3±20,3	171,6±9,2	128,8±11,9 d	134,6±9,0 d	163,4±12,8 ef	131,3±13,6 d
<b>SH-csoportok (µmol/L)</b>	964,6±108,3	927,9±89,7	480,9±80,9 a	486,8±138,5 a	768,8±92,8 gh	594,3±74,9 a
<b>H-donor kapacitás (gátlás%)</b>	65,7±5,2	63,9±9,4	47,4±6,5 d	45,7±9,6 d	59,8±7,5 f	56,4±6,7

<sup>a</sup> $p<0,001$  vs. Áloperált, Áloperált-N; <sup>b</sup> $p<0,01$  vs. IR, IR-N, IR-RIPER-N; <sup>c</sup> $p<0,05$  vs. IR, <sup>d</sup> $p<0,01$  vs. Áloperált, Áloperált-N; <sup>e</sup> $p<0,01$  vs. IR, IR-RIPER-N; <sup>f</sup> $p<0,05$  vs. IR-N; <sup>g</sup> $p<0,05$  vs. Áloperált; <sup>h</sup> $p<0,01$  vs. IR, IR-N (átlag±standard deviáció, n=6-7/csoport)

## Következtetések

1. Hatvan perc időtartamú paciális májiszkémia (70%) patkányban alkalmas modell a máj iszkémiás-reperfúziós károsodás következményeinek és karakterisztikájának, továbbá a távoli szervi iszkémiás perkondicionálás hatásainak vizsgálatára. Ebben a közepes súlyosságú máj iszkémás-reperfúziós modellben a perkondicionálás alkalmazásra jelentő eltéréseket okozott számos paraméter vonatkozásában.
2. a, Hatvan perc parciális májiszkémiát követően a 4 ciklusban 5 perc iszkémia és 5 perc reperfúziós formájában alkalmazott iszkémiás perkondicionálás erőteljesen csökkentette a májkárosodást, a poszt-reperfúziós transzamináz szintek és a szemikvantitatív szövettani értékelés alapján.  
  
b, A perkondicionálás pozitívan befolyásolta az állatok szisztémás hemodinamikáját (artériás középnyomás) és a mikrocirkulációt (máj és alsó végtag), mely pozitív hatás szignifikáns különbségként mutatkozott meg a kezelt és nem kezelt csoportok makró- és mikrocirkulációs paramétereiben.  
  
c, Hat és 24 óra reperfúziót követően szignifikánsan megőrzött szöveti antioxidáns szinteket találtunk a perkondicionálás alkalmazásának köszönhetően. Ezzel párhuzamosan a reperfúzió korai szakaszában feltűnő csökkenés volt tapasztalható a pro-inflammatorikus citokin, TNF- $\alpha$ , szérumszintjében.
3. A második vizsgálatban a bal arteria femoralison alkalmazott perkondicionálás ugyancsak képest volt erőteljes protektív hatást kifejteni a májkirekesztés és reperfúzió károsító hatásával szemben. A kísérlet során szignifikáns eltéréseket találtunk a kezelt és nem kezelt csoportok között a szöveti károsodás (ALT, nekrozis%), a máj mikrocirkuláció és szisztémás hemodinamika, továbbá a májszöveti redox-státusz tekintetében.

A perkondicionálás indukálta hepatoprotekció nem volt megfigyelhető a kondicionált érágy előzetes denerválását követően.

4. Az alkalmazott automatizált képanalízis pontos és hasznos eszköz egy valós kísérlet szövettani mintáinak értékelésére. Az algoritmus tanítása könnyen kivitelezhető, a metszetek értékelése gyors és megbízható.

## Saját publikációk jegyzéke

### A dolgozat alapjául szolgáló közlemények:

1. **Czigány Z**, Turóczy Zs, Bulhardt O, Hegedüs V, Lotz G, Rakonczay Z, Balla Z, Harsányi L, Szijártó A. (2012) Távoli szervi kondicionálás: rövid távú hepatoprotektív hatások patkánymodellben. [Remote ischemic preconditioning: short term effects on rat liver ischemic-reperfusion injury.] Orvosi Hetilap [Hungarian Medical Journal], 153 (40): 1579-1587.
2. **Czigány Z**, Turóczy Zs, Onódy P, Harsányi L, Hegedüs V, Szijártó A. (2013) Remote ischemic preconditioning protects the liver from ischemia-reperfusion injury. Journal of Surgical Research, 185: 605-613.
3. **Czigány Z**, Turóczy Zs, Kleiner D, Lotz G, Homeyer A, Harsányi L, Szijártó A. (2015) Neural elements behind the hepatoprotection of remote preconditioning. Journal of Surgical Research, 193: 642-651.

### További közlemények:

1. Szijártó A, **Czigány Z**, Turóczy Zs, Harsányi L. (2012) Remote ischemic preconditioning – a simple, low risk method to decrease ischemic-reperfusion injury: Models, protocols, and the mechanistic background. Journal of Surgical Research, 178 (2): 797-806.
2. Turóczy Zs, Fülöp A, **Czigány Z**, Varga G, Rosero O, Tőkés T, Kaszaki J, Lotz G, Harsányi L, Szijártó A. (2015) Improvements of small intestinal



microcirculation by postconditioning after lower limb ischemia. *Microvascular Research*, 98: 119-125.

3. Fülöp A, Budai A, **Czigány Z**, Lotz G, Dezső K, Paku S, Harsányi L, Szijártó A. (2015) Alterations in hepatic lobar function in regenerating rat liver. *Journal of Surgical Research*, 197 (2): 307-317.

4. **Czigány Z**, Iwasaki J, Yagi S, Nagai K, Szijártó A, Uemoto S, Tolba RH. (2015) Improving research practice in rat orthotopic and partial orthotopic liver transplantation: a review, recommendation and publication guide. Invited Review. *European Surgical Research*, 55: 119-138.

5. Lauber DT, Tihanyi DK, **Czigány Z**, Fülöp A, Budai A, Drozgyik D, Lotz G, Harsányi L, Szijártó A. (2016) Liver regeneration after different degrees of portal vein ligation. *Journal of Surgical Research*, 203 (2): 451-458.