

# Veseszövődmények és a megelőzés lehetőségei alsó végtagi rekonstrukciós érsebészeti beavatkozások modelljében

ATP-függő kálium csatornákon ható kondicionálási eljárások

Doktori tézisek

**Dr. Arányi Péter**

Semmelweis Egyetem  
Klinikai orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Szijártó Attila, D.Sc., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Deák György, Ph.D., osztályvezető főorvos  
Dr. Kiss Levente, Ph.D., egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Entz László, D.Sc., egyetemi tanár  
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Dósa Edit, Ph.D., egyetemi adjunktus  
Dr. Járai Zoltán, D.Sc., c. egyetemi tanár

Budapest  
2018

## 1. Bevezetés

Az akut alsó végtagi verőér-elzáródások, illetve egyéb alsó végtagi érkirekesztésben végzett verőér-rekonstrukciós sebészeti beavatkozások során elkerülhetetlen a kirekesztéstől, illetve érelzáródástól disztálisan eső szövetek, mindenekelőtt egy nagy tömegű alsó végtagi vázizomzat iszkémiás-reperfúziós károsodása. Az izomzat iszkémiás rhabdomyolízise játszódik le, akár alsó végtagi kompartment szindrómával, a revaszkularizációt követően pedig keringési redisztribúcióval, jelentős szisztémás és lokális hemodinamikai változásokkal, helyi, majd akár generalizált gyulladással válaszreakcióval. A műtétet követő időszak egyik leggyakrabban megfigyelt szövődmény lehetősége a vesefunkció akár heveny veseelégtelenségig fokozódó romlása. Ezen perioperatív vesediszfunkció kialakulásának mechanizmusa több komponensű: köthető a keringési elégtelenséghez, a károsodott izomrostokból felszabaduló nefrotoxikus anyagokhoz, neuroendokrin mechanizmusokhoz és a gyulladással való reakcióhoz. Döntő tényező az iszkémiás rhabdomyolízis során nagy mennyiségben a keringésbe kerülő mioglobin, mely a proximális tubulussejteket több mechanizmus révén károsítja, akár akut tubuláris nekrozist okozva.

Az iszkémiás poszt-kondicionálás egy iszkémiának kitett szerv reperfúziójának kezdetén a szöveti véráramlás ismételt, több rövid ciklusban való megszakítása, rövid reperfúziós-reokklúziós ciklusok alkalmazása a végleges és teljes reperfúzió előtt. Különböző trigger mediátorok az iszkémiás hatásnak kitett sejtekben intracelluláris foszforilációs kaskád jelátvitelt indítanak el, melyek során aktiválódnak és nyílnak a mitokondriális ATP-függő kálium ( $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ ) csatornák. Ennek hatására gátlódik a sejtnekrozisért végső soron felelős mitokondriális MPTP (mitochondrial permeability transition pore) óriáscsatorna megnyílása.

A levosimendan pozitív inotrop és vazodilatátor készítmény, melynek klinikai alkalmazására súlyos heveny vagy előrehaladott krónikus szívelégtelenségben kerül sor. Ismert ugyanakkor, hogy a  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  csatornáknak is agonistája, a csatorna nyitásával szintén feltehetően az MPTP csatorna nyitódását képes megakadályozni és így protektív hatású iszkémiás-reperfúziós károsodásokban.

## 2. Célkitűzés

Kísérleti modellt hoztuk létre patkányokon, melyben kétoldali alsó végtagi iszkémiás-reperfúziós károsodás lép fel annak távoli szervi és szisztémás következményeivel, reprezentálva az artériás rekonstrukciós érsebészeti beavatkozások során kialakuló legfontosabb szövődményeket. A modellben két olyan kondicionálási eljárást, és azok posztoperatív szövődményekre való hatásait vizsgáltuk, melyekben közös, hogy ismereteink alapján hatásmechanizmusukban fontos tényező a mitokondriális ATP-függő kálium ( $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ ) csatornák megnyílása az iszkémiás-reperfúziós károsodást elszenvedő izomrostokban. A kísérletek során az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

1. Patkány infrarenális hasi aorta okklúzióval létrehozott bilaterális 3 órás végtagiszkémia után alkalmazott posztkondicionálással befolyásolható-e a végtagi izomrostok károsodása?
2. A vesefunkció laboratóriumi és morfológiai markerei alapján milyen fokú vesekárosodás alakul ki a bemutatásra kerülő modellben, ennek milyen az időbeli lefolyása, és mindez hogyan befolyásolható posztkondicionálás alkalmazásával?
3. A felállított modellben kibontakozó vesekárosodás milyen mechanizmussal alakul ki, és ezen mechanizmusok vonatkozásában milyen hatás érhető el posztkondicionálás alkalmazásával?
4. Hogyan változik a modellben az artériás középnyomás és szívfrekvencia, és a számított hemodinamikai paraméterek alapján milyen hatás érhető el a posztkondicionálás alkalmazása után?
5. A posztkondicionálás módszerével hogyan befolyásolható az alsó végtagi izomzatban mérhető mikrocirkuláció, illetve milyen hatással bírhat a módszer a vesekéreg mikrokeringésének vonatkozásában?
6. Milyen változások észlelhetők a szérum TNF- $\alpha$  szintekben a műtéti modellben illetve a posztkondicionálás alkalmazásának hatására?
7. Az ugyanazon műtéti modellben felhasználásra kerülő intravénás levosimendan infúzió hatására tapasztalható-e a végtagi vázizomrostok károsodásának vonatkozásában bármilyen protektív hatás?
8. Levosimendannal milyen hatás érhető el a kialakuló vesekárosodás tekintetében?
9. Milyen hatással bír a szer alkalmazása a szisztémás hemodinamikai mutatókra?

10. Hogyan alakul a levosmendan infúzió mellett a végtagizomzat mikrokeringése, és változik-e a vesekéreg vérellátása a reperfúzió első 4 órája során?
11. Történik-e változás a levosimendan alkalmazásával a korai posztoperatív időszakban észlelhető TNF- $\alpha$  citokin felszabadulásának tekintetében?

## **2. Módszerek**

### **2.1. Kutatásetikai háttér**

Kísérleteinket a Semmelweis Egyetem Egyetemi Állatkísérleti Bizottság által kiadott 22.1/2409/3/2011. számú engedély alapján végeztük, az 1998. évi XXVIII. sz. állatvédelmi törvény, valamint a 243/1998 (XII. 31.) Kormányrendelet szerint támasztott követelményeknek megfelelően, egyetértésben a nemzetközi elvárásokkal is (US National Institute of Health guidelines, Publication No. 85–23, revised 1996; MD, USA).

### **2.2. Állatok**

250-350 g, spf (meghatározott kórokozóktól mentes), hím Wistar patkányok (Charles River Magyarország Kft, Isaszeg) száraz tápot és vizet kaptak ad libitum, a műtét előtti 12 órában csak vizet biztosítottunk számukra. Tartásuk a napszaki változásokat követő mesterséges világítás mellett, 22-24 °C-os hőmérsékleten történt. A cirkadián hatások standardizálása céljából a műtéteket mindig azonos időben végeztük.

### **2.3. Anesztézia**

Ketamin (75 mg/ttkg, Calypsol®, Richter Gedeon, Budapest) és xylazin (7,5 mg/ttkg, Xylasin®, Produlab Pharma, Raamsdonksveer, Hollandia) intraperitoneális injekcióval történő anesztézia-indukciót követően ugyanezen kombináció került alkalmazásra (25 mg/ttkg/1 ml/h ketamin és 2,5 mg/ttkg/1 ml/h xylazin) a jobb vena jugularis internába helyezett kanülön keresztül. Műtét alatti parenterális folyadék- és elektrolitpótlás ugyanezen kanülön keresztül történt 3 ml/ttkg/h dózisban.

### **2.4. Kísérleti elrendezés, műtétechnika**

Narkózisban a jobb vena jugularis interna, és arteria carotis interna kipunarálása után az erekbe polietilén kanüloket (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) vezettünk. Az artériás kanülon keresztül invazív artériás nyomásmérés történt. Középső medián

laparotomia után a peritoneum hátsó lemezének megnyitásával kipreparáltuk a hasi aortát. Ezt követően az állatok 60 IU/ttkg Na-Heparint kaptak intravénásan, bólusban. A végtagi keringési viszonyokat a bal oldali musculus biceps femoris mikrocirkulációjának változásain keresztül monitorizáltuk, lézer Doppler áramlásmérővel (LDF: laser Doppler flowmeter). Az áramlásmérő berendezés mérőfejét a lábszár külső oldalán ejtett hosszanti bőrmetszést és a fascia behasítását követően rögzítettük. Egy másik regisztráló fejet a vese cortex mikrokeringésének detektálására a bal vese egy adott felszíni pontján fixáltuk. 5 perc alapáramlást mértünk. Az aortára, közvetlenül a bifurkáció felett (infrarenálisan) atraumatikus mikroklipet (Aesculap YASARGIL FT260T; B.Braun AG, Melsungen, Németország) helyeztünk fel, mellyel 180 perces bilaterális iszkiátiát hoztunk létre mindkét alsó végtagban. Az iszkiátiá alatt az explorált hasüreget nedves lappal fedtük.

#### 2.4.1. I. kísérlet: poszt-kondicionálás vizsgálata alsó végtagi iszkiátiá-reperfúzió modelljében

180 perc iszkiátiá után a poszt-kondicionált csoportban a mikroklip ismételt kinyitásával és bezárásával poszt-kondicionálást végeztünk, 2 percen keresztül, 6 ciklusban, ciklusonként 10 másodperc reperfúzióval, 10 másodperc reokklúzióval. Ezt követően eltávolítottuk a mikroklipet, és zártuk a hasüreget. Az állatok egy csoportjánál a narkóziá és a hemodinamikai monitorozás fenntartásával 4 óra reperfúziós időszak következett. A reperfúzió utolsó 3 órája alatt az állatok spontán ürült vizeletét felfogtuk, ennek mennyiségét a termináláskor hólyagpunkcióval egészítettük ki. Az állatok további csoportjainál a 3 óra iszkiátiá után, a hasfal kétrétegű, felszívódó varratsorral való egyesítését követően a narkóziást felfüggesztettük, a nyaki vénás kanült eltávolítottuk, a vénát lekötöttük, a nyaki vágást szuturával zártuk. 24 óra, illetve 72 óra reperfúziós időszak következett az állatok konvencionális tartása mellett. Majd újabb anesztéziá indukciót követően történt a kísérlet terminálása és mintavétel. Az áloperált csoportban nem került felhelyezésre mikroklip, minden más tekintetben pontosan úgy jártunk el, mint a másik két csoportban.

#### 2.4.2. II. kísérlet: Levosimendan kezelés alkalmazása alsó végtagi iszkiátiá-reperfúzió modelljében

A műtét bevezető lépései a fentieknek megfelelően történt a mikroklip felhelyezéséig. A levosimendannal (Simdax®, Orion Pharma Corporation, Espoo, Finnország) kezelt

csoporthoz a farmakont 5 g/100 ml glükóz infúzióban oldva 10 perc alatt beadott „bólus” dózist (12 µg/ttkg) követően az iszkémia teljes ideje alatt (3 óra) és azt követően további 3 órán át adagoltuk intravénásan (0,2 µg/ttkg/min, 0,48 ml/ttkg/h, 25 µg/ml). Az áloperált (Sham<sub>LS</sub>) és a kontroll (IR<sub>LS</sub>) csoportokban 5 g/100 ml glükóz infúziót kaptak a levosimendan adagolásánál számolt mennyiségben (0,48 ml/ttkg/h). A reperfüzió 4., illetve 24. órájának végén került a kísérlet terminálásra. Az áloperált csoportban a mikroklip felhelyezését leszámítva minden más vonatkozásban ugyanaz történt az állatokkal, mint az IR<sub>LS</sub> csoportban.

#### 2.4.3. Csoportbeosztás - I. és II. kísérlet (1. táblázat)

##### 1. táblázat: Csoportbeosztás.

A kísérleti állatok csoportbeosztása és a csoportok jelölése az I. és II. kísérletben.

csoporthoz	operáció	levosimendan	poszt-kondicionálás	reperfüzió időtartama	n
sham <sub>PostC4</sub>	laparotomia	-	-	-	5
sham <sub>PostC24</sub>	laparotomia	-	-	-	5
sham <sub>PostC72</sub>	laparotomia	-	-	-	5
IR <sub>PostC4</sub>	hasi aorta mikroklip	-	-	4 h	8
IR <sub>PostC24</sub>	hasi aorta mikroklip	-	-	24 h	8
IR <sub>PostC72</sub>	hasi aorta mikroklip	-	-	72 h	8
PostC <sub>4</sub>	hasi aorta mikroklip	-	+	4 h	8
PostC <sub>24</sub>	hasi aorta mikroklip	-	+	24 h	8
PostC <sub>72</sub>	hasi aorta mikroklip	-	+	72 h	8
sham <sub>LS4</sub>	laparotomia	-	-	-	6
sham <sub>LS24</sub>	laparotomia	-	-	-	6
IR <sub>LS4</sub>	hasi aorta mikroklip	-	-	4 h	8
IR <sub>LS24</sub>	hasi aorta mikroklip	-	-	24 h	8
LS <sub>4</sub>	hasi aorta mikroklip	+	-	4 h	8
LS <sub>24</sub>	hasi aorta mikroklip	+	-	24 h	8

#### 2.5. Módszerek

##### 2.5.1. Hemodinamikai monitorozás

Folyamatos invazív nyomásmérés (Kent Scientific Corporation, Torrington, CT, USA) történt a jobb a. carotis internába vezetett kanülön keresztül. Az aktuális vérnyomásértékeket Dasy Lab V9.00.02. program (National Instruments Corporation, Austin, TX, USA) 200 /s gyakorisággal regisztrálta, melyből 5 másodpercenként HR (szívfrekvencia), szisztolés (SBP), diasztolés (DBP) vérnyomást és artériás középnyomást (mean arterial pressure: MAP) számított. A mért paramétereket

matematikai transzformációknak vetettük alá c++ (ISO/IEC14882 standard) programozási nyelven, Code::Blocks (10.05 rev6283m Code::Blocks Team, USA) szövegszerkesztőben írt forráskóddal, melyet MinGW (2012., mingw.org) környezetben fordítottunk. A mérési hibákat a program értékeli, bizonyos adatokat nem fogad el, a helyüket a legutolsó elfogadott adattal tölti ki. Az adatok elfogadhatóságának kritériumai a következők voltak: az élettaninak megfelelő, legnagyobb és legkisebb megengedett szisztolés vérnyomás, diasztolés vérnyomás, szívfrekvencia, az adatok 5 másodpercen belüli változásának százalékos mértéke. A kapott görbét a program a konvolúció nevű matematikai módszerrel tovább transzformálja. Végül az egyes állatok mért adatsorainak elemzése céljából a következő paraméterek kerültek kiszámításra:

(a) Minden mérési pontban a HR és SBP hányadosa kerültek rögzítésre, majd átlagolásra az iszkémia 3 órás időtartama és a reperfúzió 4 órás időtartama alatt. A reperfúzió alatti átlagot elosztva az iszkémia alatti átlaggal az adott állat reperfúzió alatti keringési kompenzációs mechanizmusát jellemző arányszámot kaptuk.

(b) A reperfúzió kezdetekor tapasztalható volt az állatoknál a vérnyomás hirtelen csökkenése, majd megfigyeléseink szerint a nyomás ismételten emelkedett és egy platófázist ért el. A reperfúzió első 20 percében mérhető legalacsonyabb szisztolés vérnyomás időpontja került megállapításra, megadva azt, hogy ezen pont a reperfúzió kezdete után hány másodpercre helyezkedik el az időtengelyen, illetve, hogy ezen legalacsonyabb SBP mekkora az iszkémia utolsó mért értékének százalékában.

(c) Kiválasztásra került az az időpont, amikor a SBP eléri a platófázist. (Minden ponthoz hozzárendeltük a környező 2 min SBP értékeinek az átlagát. Az Excel program „HA” logikai függvényének használatával az az időpont lett megállapítva, ahol ez az átlag eléri a reperfúzió teljes időtartamára számított átlagos vérnyomásértéket.)

#### 2.5.2. Kórszövettan

A jobb vese és a jobb m. biceps femoris mintákat 24 órán keresztül 4 %-os formalinban fixáltuk, majd paraffinba kerültek beágyazásra. 3-5  $\mu\text{m}$  vastag metszeteket készítettünk, melyeket hematoxilín-eozin (HE) festést követően fénymikroszkóppal elemeztünk.

#### 2.5.3. Izomrost életképesség (viabilitás) vizsgálat

NADH-tetrazolium reduktáz enzimhisztokémiai vizsgálat során a mitokondriumokban jelen lévő NADH-dehidrogenáz katalizálta reakcióban a NADH molekuláról egy  $\text{H}^+$  ion

kerül nitroblue tetrazoliumra (NBT). A kék színű formazán reakciótermék detektálható és mennyisége arányos a funkcionáló mitokondriumok számával és az enzimkomplex aktivitásával. 5 µm vastag izomszövet fagyasztott metszetek NBT és NADH 0,05 M-os TRIS pufferes (pH 7,6) oldatában (Sigma-Aldrich Inc., München, Németország) kerültek inkubálásra (fénymentes körülmények, 37 °C, 30 min). Desztillált vizes és acetone-oldattal végzett (30, 60, 90 % felszálló, majd leszálló koncentrációiban) mosást követően vízbázisú fedés következett. Leica Qwin Pro morfolometriás szoftver (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Németország) segítségével, állatonként véletlenszerűen lefotózott 10 különböző látóterén festődött (színtartomány: RGB: 150-105; 175-0; 0-66) / ábrázolódott izomrészlet terület arányok kerültek meghatározásra. Az értékeket egészséges állatok metszeteiből megállapított referencia érték százalékos arányában fejeztük ki.

#### 2.5.4. Laboratóriumi vizsgálatok

A jobb kamra punkciójával nyert vérből (10 min, 3000/min fordulatszámon történt centrifugálás), a hemolízis- és sejtmentes felülúszót folyékony nitrogénben tároltuk -80 °C-on. A mintákat automatizált analizátorral (Beckman Coulter AU480/2011, Beckman Coulter Inc, Brea, CA, USA) vizsgáltuk. Szérum kreatin-kináz (CK), aszpartát-aminotranszferáz (ASAT), laktát-dehidrogenáz (LDH) aktivitások, szérum Na<sup>+</sup>, kreatinin és karbamid koncentrációk kerültek meghatározásra, vizeletmintákból pedig Na<sup>+</sup> és kreatinin koncentrációk. Meghatározásra került a szérum karbamid/kreatinin hányados, a renal failure index ( $RFI = U_{Na} * P_{kreat} / U_{kreat}$ ), és a frakcionált Na<sup>+</sup> exkréció ( $FENa = Clearance_{Na} / Clearance_{kreat} * 100 = U_{Na} * P_{kreat} * 100 / (U_{kreat} * P_{Na})$ ). ( $U_{Na}$ ,  $P_{Na}$ : vizelet és szérum Na<sup>+</sup> koncentrációja;  $U_{kreat}$ ,  $P_{kreat}$ : vizelet és szérum kreatinin koncentrációja).

#### 2.5.5. TNF-α mérések

A TNF-α szintjét mindkét kísérletben a korai reperfüziós időszakban határoztuk meg (a 4 órás reperfüzió után átesett állatcsoportokban) szendvics ELISA módszerrel (TNF-α immunoassay kit, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). A TNF-α ellenes antitesttel bevont ELISA plate-et 100 µL szérum mintával inkubáltuk, majd mosást követően poliklonális anti-TNF-α-tormaperoxidáz konjugátummal (szobahőmérséklet, 2x2 h). A hidrogén-peroxid és tetrametil-benzidin színreakciót 20 perc múlva leállítottuk kénsav hozzáadásával. 450 nm-en mért abszorbancia értékekből a rekombináns TNF-α standard segítségével készített kalibrációs görbe alapján számoltunk TNF-α koncentrációkat.



#### 2.5.6. Alsó végtagi izomzat és vesekéreg mikrocirkuláció becslése

Lézer Doppler áramlásmérő (kétsatornás eszköz;  $\lambda = 632,8$  nm; monokromatikus; 2 mW HeliumNeon Laser DRT4 device, DP1T surface probe, Moor Instruments Ltd, London, UK) hőmérsékletre, vörösvértest koncentrációra és szövetvastagságra korrigált flux értéket regisztrál (10/min). Kiszámításra kerültek a „reperfúziós terület” (RA: reperfusion area, a reperfúzió teljes időtartama alatt a görbék integrálja), és a „plató maximum” (PM, a reperfúzió végső 10 percében mért flux számtani átlaga). A mért értékek az adott állat 5 perces baseline (alapáramlás) értékeinek számtani átlagának %-ában lettek megadva.

#### 2.5.7. Sav-bázis vizsgálatok

Az I. kísérletben bázis-többlet vizsgálatok céljából 10 állatnál történt 180 perc bilaterális alsó végtagi iszkémia, a 10-ből 5 állatnál posztkonkondicionálással. A reperfúzió kezdeti, rendre 0. (iszkémia utolsó pillanata), 1., 2., 3. és 4. percében a bal a. carotis communisből nyert vérmintán artériás vérgáz analízis történt (Radiometer ABL80, Medical ApS Åkandevj 21 DK-2700, Brønshøj, Denmark). Egy ún. relatív base excess (RBE) számított értéket vezettünk be, mely az egyes időpontokban mért BE és a revaszkularizáció előtt közvetlenül mért (0. időpillanat) BE értékek hányadosa.

#### 2.5.8. Anti-mioglobin immunhisztokémia

Az I. kísérletben a vese minták 4 %-os formalinban voltak fixálva (24 h), majd foszfát pufferben kerültek mosásra. Az endogén peroxidáz aktivitás blokkolása 3 %-os hidrogén-peroxidban történt, az antigének előhívása 10 mmol/l, pH 6,0 citrát pufferben. Az aspecifikus kötődések gátlásának céljára szarvasmarha szérum albuminban lettek a minták áztatva. Az előkészített metszetek poliklonális anti-humán anti-mioglobin nyúl antitestekkel (1:50-es hígítás, Diagnostic BioSystems Inc, Pleasanton, CA, USA) voltak inkubálva (12 h, 4 °C), majd a hibridizáció 1 órán át peroxidáz-konjugált másodlagos antitestekkel zajlott (EnVision®, Dako Denmark A/S, Glostrup, Dánia). Az antigén-antitest kötődés vizualizációjára 3-diaminobenzidint alkalmaztunk.

#### 2.5.9. Heat shock protein 72 (HSP72) meghatározás

Az I. kísérletben a 4 órás reperfúzió után átesett állatcsoportokban vett jobb vese szövetmintákat szonikátor (Cole-Parmer Instrument Co., Chicago, IL, USA) segítségével homogenizáltuk puffer médiumban (10 mmol/l 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazin-etánszulfonsav (HEPES) pH=7,9, 1,5 mmol/l  $MgCl_2$ , 10 mmol/l KCl, 1 mmol/l

dithiothreitol (DTT), 1 mmol/l fenil-metil-szulfonil-fluorid (PMSF), 4 mmol/l benzamidin, 100 U/ml aprotinin, Richter Gedeon Nyrt., Budapest, ill. Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA). Nyúl anti-HSP72 antitestekkel (1:10.000) való inkubációt (1 h, szobahőmérséklet), majd tormaperoxidáz-kötött kecske anti-nyúl másodlagos antitestekkel (1:10.000, 1 h; Dako A/S, Glostrup, Dánia) való hibridizáció alkalmazásával, Western blot technikával történt meghatározás (ImageJ, NIH, Bethesda, MD, USA). A fehérjetartalom kontrolljaként a gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) gén expresszióját is vizsgáltuk (anti-GAPDH antitest, 1:10.000 hígítás, 1 h; Biodesign International, Saco, ME, USA, illetve tormaperoxidázzal kötött kecske anti-egér szekunder antitest, 1:10.000 hígítás, 1 h; Dako A/S, Glostrup, Dánia).

#### 2.5.10. Lipidperoxidáció

Az I. kísérletben a 4 órás reperfúziós csoportokban a jobb vese szövetnedves vesehomogenizátumok lipidtartalmát izo-oktánnal (1 g / 5 ml) extraháltuk, majd 20 óra elteltével a levegőtől elzárt szobahőmérsékletű minták diénkonjugátum-tartalmát 232 nm-en Lumat LB 9051 spektrofotométerrel (Lumat, Berthold, Windbad, Németország) az AOAC (Association of Official Agricultural Chemists, Official Methods of Analysis 1984; 28054 B. 14th edition, Arlington, USA) útmutatása szerint határoztuk meg.

#### 2.5.11. Statisztikai feldolgozás

Az adatok kiértékelése IBM SPSS Statistics Version 20 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) szoftverrel történt. Állatcsoportonként az adatok normál eloszlását Kolmogorov-Smirnov teszttel vizsgáltuk. A minták homogenitását Levene teszttel értékeltük. A varianciák homogenitása esetén egyutas varianciaanalízist (ANOVA, analysis of variance) és Scheffe post hoc tesztet alkalmaztunk, a varianciák heterogenitása esetén Brown-Forsythe tesztet Games-Howell post hoc analízissel. A relatív bázistöbblet (RBE) mérések eredményeinek statisztikus feldolgozása egy utas, ismétléses (repeated measures) ANOVA próbával történt. Az átlagértékek közötti különbséget  $p < 0,05$  konfidenciaszint mellett tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

### 3. Eredmények

#### 3.1. I. kísérlet

##### 3.1.1. Hemodinamikai monitorozás

(a) Az IR<sub>PostC4</sub> csoportban a reperfúzió alatt magasabb „shock-index” volt mérhető, mint az iszkémia alatt (az arányszám 1-nél nagyobb), a PostC<sub>4</sub> csoportban az index alacsonyabb volt ( $1,040 \pm 0,22$  vs.  $0,814 \pm 0,19$ ,  $p=0,044$ ).

(b) A poszt kondicionált csoportban a legnagyobb vérnyomásesés pontja később következik be, mint a kontroll csoportban (PostC<sub>4</sub>:  $9,41 \pm 7,05$  min, vs. IR<sub>PostC4</sub>:  $7,87 \pm 5,06$  min a reperfúzió kezdete után), ez a vérnyomásesés kisebb mértékű (PostC<sub>4</sub>:  $11,58 \pm 6,04$  %, IR<sub>PostC4</sub>:  $17,11 \pm 3,59$  % az iszkémia utolsó mért időpontjában tapasztalt SBP értékhez képest,  $p=0,038$ ).

(c) Tendenciaszerű különbség figyelhető meg a két csoport között a vérnyomás emelkedési sebessége tekintetében: az IR<sub>PostC4</sub> csoport állatainál a SBP  $22,92 \pm 20,42$  min alatt ért vissza a platófázisba, a PostC<sub>4</sub> csoportnál pedig  $13,90 \pm 12,93$  min alatt.

##### 3.1.2. M. rectus femoris szövetten

A HE festett metszeteken – kvalitatív értékelés során - az egyes csoportok között csupán minimális különbségeket észleltünk. A 4 órás állatokban – csoporttól függetlenül – a harántcsíkolat és magfestés többnyire megtartott, szöveti ödéma nem volt. Esetenként az izomrostokban minimális vakuolizáltságot láttunk mind az IR<sub>PostC4</sub>, mind a PostC<sub>4</sub> csoportokban. 24 óra elteltével az IR<sub>PostC24</sub> csoportban helyenként leukocitás infiltráció volt látható. Irreverzibilis patológiai elváltozást nem találtunk. A PostC<sub>24</sub> csoportokra az ödémán kívül más elváltozás nem volt jellemző. 72 h elteltével regresszió volt észlelhető.

##### 3.1.3. Vese szövetten

Az IR<sub>PostC4</sub> állatok szövettani metszetei közepes fokú akut tubuláris nekrozis képét mutatták (tubulusok lumenében hialincilinderek, a tubulussejtek duzzadtak, bennük vakuolizáltság, hidropikus degeneráció). A PostC<sub>4</sub> csoportban kedvezőbb szöveti kép ábrázolódott (kvalitatív elemzés). A 24 és 72 órás alcsoportokban a szövetkárosodás jelei kevésbé ábrázolódtak, a 4 órás metszetekhez képest javuló tendencia volt megfigyelhető, érdemi különbség nélkül a poszt kondicionált és a kezeletlen kontroll állatok között.

### 3.1.4. Izomrost életképesség vizsgálata

Az IR<sub>PostC4</sub> és IR<sub>PostC24</sub> csoportokban az egészséges állatokban mért értékekhez képest jelentősen kisebb mértékű viabilitást észleltünk (4 h: 42,93 ± 19,20 %; 24 h: 41,15 ± 16,95 %). Ezzel összehasonlítva a poszt-kondicionált csoportok esetében a 24 órás alcsoportban szignifikánsan magasabb életképességet detektáltunk (4 h: 43,27 ± 30,14 %; 24 h: 62,65 ± 27,13 %). 72 óra után mindkét csoportban javulás volt mérhető, ekkor már szignifikáns különbség nem adódott a poszt-kondicionált és a kezeletlen IR<sub>PostC72</sub> csoport között (IR<sub>PostC72</sub>: 77,64 ± 30,64; PostC<sub>72</sub>: 79,82 ± 45,11).

### 3.1.5. Laborvizsgálatok – izomsérülés

Az emelkedett szérumban kreatin-kináz, aszpartát-aminotranszferáz és laktát-dehidrogenáz enzimszintek manifeszt rhabdomyolízisre utaltak már a reperfüzió 4. órájában mind az IR<sub>PostC4</sub>, mind a PostC<sub>4</sub> csoportban. A 3. posztoperatív nap végére ezen nekroenzim aktivitások visszatértek a referencia tartományba. Egyik mért időpontban sem volt tapasztalható szignifikáns különbség a PostC és az IR<sub>PostC</sub> csoportok között.

## 2. táblázat: I. kísérlet, szérumban kreatin-kináz, aszpartát-aminotranszferáz, laktát-dehidrogenáz laboratóriumi mérések.

Szignifikáns különbség egyik esetben sem adódott az IR<sub>PostC</sub> és a megfelelő PostC alcsoportok között. A 4 órás reperfüziós csoportban az áloperált állatokban mért értékekhez viszonyítva szignifikánsan emelkedett szérumban enzimaktivitások mérhetők az IR<sub>PostC4</sub> és (az ASAT-ot leszámítva) a PostC<sub>4</sub> csoportban is (\*: p < 0,05 a megfelelő sham csoporttal való összevetésben)

	kreatin-kináz			aszpartát-aminotranszferáz			laktát-dehidrogenáz		
	Sham	IR	PostC	Sham	IR	PostC	Sham	IR	PostC
4 h	257.0 ±56.3	875.2± 206.5*	921.0± 329.5*	162.0 ±27.5	249.3 ±78.4*	167.0 ±81.9	256.7 ±64.5	1075.0± 144.3*	917.6± 217.8*
24 h	318.5 ±29.0	340.3 ±232.3	285.7 ±116.8	104.5 ±51.6	186.6 ±139.2	239.3 ±155.2	287.0 ±21.2	439.8 ±209.2	423.7 ±180.2
72 h	197.0 ±24.0	328.3 ±138.8	390.4 ±95.7	56.3 ±6.7	93.8± 84.0	90.5 ±90.4	217.0 ±127.3	284.9 ±186.6	284.9 ±106.0

### 3.1.6. Laborvizsgálatok – vesekárosodás

Az IR<sub>PostC</sub> csoport 4 órás alcsoportjában emelkedett szérumban kreatininkoncentrációt mértünk a megegyező alcsoportba tartozó áloperált állatokhoz képest. A PostC<sub>4</sub> csoportban szintén kóros, de szignifikánsan kevésbé emelkedett szérumszintet mértünk.

A 24 és 72 órás mérési pontnál minden vizsgált csoportban alacsonyabb kreatininszinteket detektáltunk – itt nem volt szignifikáns különbség a csoportok között. 4 óra reperfúzió végére a szérumban karbamid / kreatinin hányados és a frakcionált nátrium exkréció is tubuláris típusú vesekárosodást jeleztek, de csak az IR<sub>PostC4</sub> csoportban, ezen paraméterek a PostC<sub>4</sub> csoportban nem utaltak vesekárosodásra a hagyományos beosztás szerint. A renal failure index számításával továbbra is fennálló veseelégtelenséget lehetett kimutatni az IR<sub>PostC24</sub> és IR<sub>PostC72</sub> csoportban, minden időpontban szignifikánsan alacsonyabb értékeket számoltunk a posztkonficionált állatokban.

### 3. táblázat: I. kísérlet, laboratóriumi mérések:

†: p < 0,05 vs. a megfelelő IR csoport; ‡: p < 0,001 vs. a megfelelő IR csoport

		4 h	24 h	72 h
Szérumban kreatinin [μmol/l]	Sham	67,35±16,27	20,40±7,50	20,35±4,74
	IR	219,09±81,92	39,22±3,32	38,07±2,07
	PostC	96,25±28,07 ‡	26,43±6,88 †	31,10±6,79
Szérumban karbamid [mmol/l]	Sham	6,31±0,71	5,36±0,49	5,09±0,13
	IR	8,03±0,90	6,15±0,29	6,30±0,64
	PostC	6,38±0,50 †	5,55±0,07	5,32±0,29 †
Szérumban karbamid / kreatinin hányados	Sham	97,54±32,77	276,79±77,78	253,51±60,76
	IR	39,90±14,65	159,06±25,14	134,50±32,96
	PostC	68,37±24,51 †	258,40±53,02 †	199,69±39,40
FENa (frakcionált nátrium exkréció) [%]	Sham	0,24±0,26	0,34±0,09	0,87±0,12
	IR	2,19±1,31	0,94±0,29	0,98±0,25
	PostC	0,75±0,50	0,50±0,22	0,26±0,16 †
RFI (renal failure index) [mmol/l]	Sham	0,42±0,37	0,49±0,12	0,77±0,56
	IR	2,37±1,43	1,53±0,45	1,51±0,36
	PostC	0,92±0,32	0,77±0,34 †	0,43±0,28 †

#### 3.1.7. TNF-α meghatározás

A 4 órás áloperált csoportban mért értékhez (6,615 ± 1,423 ng/ml) képest szignifikánsan emelkedettek voltak a TNF-α-szintek mind az IR<sub>PostC4</sub> (44,904 ± 8,693 ng/ml), mind a PostC<sub>4</sub> (22,906 ± 4,909 ng/ml) csoportban. Az IR<sub>PostC4</sub> csoporthoz viszonyítva a PostC<sub>4</sub> csoportban a TNF-α-szint szignifikánsan alacsonyabb volt (p<0,05).

#### 3.1.8. Alsó végtagi mikrocirkuláció

Az IR<sub>PostC4</sub> állatokban a kirekesztés felhelyezése előtt mérthez képest a reperfúzió során hipoperfúzióra utaló áramlás mérhető. A PostC<sub>4</sub> csoportban a vérkeringés újraindulását követő átmeneti hiperémia után az iszkémiás periódust megelőző időszakhoz hasonló adatok mérhetők. A PostC<sub>4</sub> állatokban magasabb az RA és PM érték, mint az IR<sub>PostC4</sub> csoportban. (RA: PostC<sub>4</sub>: 96,15 ± 17,48 % vs. IR<sub>PostC4</sub>: 63,99 ± 15,73 %, p = 0,038, PM: PostC<sub>4</sub>: 82,87 ± 23,19 % vs. IR<sub>PostC4</sub>: 60,85 ± 15,33 %, p = 0,194).

#### 5.1.9. Vesekéreg mikrocirkuláció

Az alsó végtagi reperfúzió kezdetétől fogva az IR<sub>PostC4</sub> csoportban lassú csökkenés volt detektálható a vesekéreg perfúziójában. A PostC<sub>4</sub> csoportban ezzel szemben az áloperált állatokhoz hasonló szinten maradt a mikrocirkuláció. (RA: PostC<sub>4</sub>:  $99,01 \pm 2,76$  % vs. IR<sub>PostC4</sub>:  $82,31 \pm 12,23$  %,  $p = 0,024$ , PM: PostC<sub>4</sub>:  $96,81 \pm 6,14$  % vs. IR<sub>PostC4</sub>:  $77,21 \pm 14,81$  %,  $p = 0,037$ ).

#### 5.1.10. Sav-bázis háztartás

A relatív base excess (RBE) a reperfúzió 1., 2., 3. és 4. percében vett vérminta BE értéke és a revaszkularizáció előtt közvetlenül mért (0. időpillanat) BE (negatív értékek) hányadosa. Mint két negatív számnak a hányadosa, a nagyobb pozitív hányados a szisztémás keringésben megjelenő nagyobb acidotikus terhelésre utal. A 4. percben szignifikáns különbség mutatkozott a PostC<sub>4</sub> és IR<sub>PostC4</sub> csoport között, a PostC<sub>4</sub> csoportban alacsonyabb a hányados. (1. perc: PostC<sub>4</sub>:  $1,80 \pm 0,66$  vs. IR<sub>PostC4</sub>:  $3,19 \pm 0,27$ , 2. perc: PostC<sub>4</sub>:  $2,44 \pm 1,14$  vs. IR<sub>PostC4</sub>:  $3,38 \pm 0,17$ , 3. perc: PostC<sub>4</sub>:  $2,07 \pm 0,82$  vs. IR<sub>PostC4</sub>:  $5,32 \pm 2,91$ , 4. perc: PostC<sub>4</sub>:  $2,05 \pm 0,56$  vs. IR<sub>PostC4</sub>:  $3,28 \pm 0,32$ ,  $p=0,037$ .)

#### 5.1.11. Anti-mioglobin immunhisztokémia

A reperfúzió kezdete után 4 órával vett veseszöveti mintákon mioglobin epitópok voltak detektálhatók a tubulusok lumenében és a proximális kanyarulat csatornák tubuláris epitél sejteinek apikális vakuoláris képleteiben. Kisebb fokú mioglobin jelenlét volt detektálható a PostC<sub>4</sub> csoportban az IR<sub>PostC4</sub> csoporttal való összevetésben. A 24, illetve 72 óra reperfúziós időszakon átesett állatcsoportokban egyik veseszöveti metszeten sem volt detektálható mioglobin-pozitivitás (véltetően a mioglobin-epitópok ekkorra már átalakult, lebomlott szerkezetének köszönhetően).

#### 5.1.12. Heat shock protein 72 (HSP72) meghatározás

HSP72 mérések a konstansan kifejeződő GAPDH gén expressziójára lettek normalizálva. Látható volt a vese HSP72 expressziójának magasabb szintje mind az IR<sub>PostC4</sub> ( $1,78 \pm 0,45$ ), mind a PostC<sub>4</sub> ( $1,41 \pm 0,13$ ) csoportban az áloperált csoportban mért szinttel ( $0,98 \pm 0,23$ ) összehasonlítva, de szignifikáns különbség nem adódott a csoportok között.

### 5.1.13. Lipidperoxidáció

Homogenizált vesemintákból meghatározott diénkonjugátumok emelkedett szintje volt mérhető a PostC<sub>4</sub> és az IR<sub>PostC4</sub> csoportban egyaránt. Az IR<sub>PostC4</sub> csoportban a PostC<sub>4</sub> csoporténál szignifikánsan magasabb érték mutatkozott (Sham<sub>PostC4</sub>: 0,12 ± 0,01 U/ml, IR<sub>PostC4</sub>: 0,17 ± 0,04 U/ml, PostC<sub>4</sub>: 0,14 ± 0,01 U/ml, p=0,032).

## 5.2. II. kísérlet

### 5.2.1. Hemodinamikai monitorozás

(a) A reperfúzió időtartamára vonatkozóan számított „shock index” magasabb volt, mint az iszkémia időtartama alatt (hányados > 1) mind az IR<sub>LS4</sub>, mind a LS<sub>4</sub> csoportban, a két csoport között szignifikáns különbség nélkül. (1,09±0,25 vs. 1,07±0,30, p>0,05).

(b) A reperfúzió elején a legalacsonyabb szisztolés vérnyomás a reperfúzió első 20 perce alatt a levosimendannal kezelt csoportban 6,00±2,86 perc után volt mérhető, míg a IR<sub>LS4</sub> csoportban 7,37±4,97 perccel az aortakirekesztés felengedését követően (p>0,05).

(c) Ez a vérnyomásesés bár nagyobb mértékű volt az IR<sub>LS4</sub> csoportban (az iszkémia utolsó mért szisztolés vérnyomás értékének 16,61±3,61 %-a), mint a levosimendannal kezelt csoportban (8,56±8,22 %), de a különbség a két csoport között nem volt szignifikáns.

(d) A vérnyomás kezdeti esését követően a görbék a plató fázist kb. hasonló idő után érték el mindkét csoportban (IR<sub>LS4</sub>: 17,53±11,23 min, és LS<sub>4</sub>: 17,42±19,83 min a revaszkularizáció után), érdemi különbség nélkül (p>0,05).

### 5.2.2. Kórszövettan

A HE festett m. tibialis anterior mintákból készült metszetek fénymikroszkópos felvételein nem volt detektálható definitív izomkárosodás egyik csoportban sem, egyik vizsgált időpontban sem. A veseszövetteni metszeteken akut tubuláris károsodás jelei voltak láthatók az IR<sub>LS4</sub> csoport állatainál, vakuolizált tubuláris sejtekkel, hialin-cilinder precipitátumokkal a tubuláris lumenben. A 24 órás reperfúzió után átesett állatoknál (IR<sub>LS24</sub> csoport) enyhén kisebb mértékű károsodás volt látható. A levosimendannal kezelt állatok csoportjaiban (LS<sub>4</sub> és LS<sub>24</sub>) a károsodás mindkét időpontban kisebb mértékű volt (kvalitatív kiértékelés).

### 5.2.3. Izom életképesség vizsgálata

4 órás reperfüziót követően egy jelentősen csökkent viabilitás volt mérhető az IR<sub>LS4</sub> csoportban, a mért értékek nem tanúskodtak érdemi javulásról még 24 órát követően sem (IR<sub>LS24</sub> csoport). Levosimendan kezelés hatására (LS<sub>4</sub> csoport) egy kevésbé csökkent izoméletképesség volt mérhető, a 24 órás reperfüzió átesett csoportoknál a levosimendannal kezelt csoportban enyhén csökkent életképesség volt mérhető (4 h után: sham<sub>LS4</sub>: 99,2±2,6 %, IR<sub>LS4</sub>: 36,6±6,5 %, LS<sub>4</sub>: 60,7±3,9 %, p<0,05; 24 h után: sham<sub>LS24</sub>: 99,1±2,7 %, IR<sub>LS24</sub>: 39,7±4,1 %, LS<sub>24</sub>: 66,6±4,7 %, p<0,05).

### 5.2.4. Laboratóriumi vizsgálatok

A 4 órás reperfüziós időszak végére az emelkedett szérumszint alapján egyértelmű vesefunkciós károsodás volt kimutatható az IR<sub>LS4</sub> csoportban. Az IR<sub>LS4</sub> és LS<sub>4</sub> összevetésében szignifikánsan kisebb mértékű károsodás volt mérhető a levosimendan kezelés hatására. A számított klinikai vesefunkciós paraméterek (a frakcionált nátrium exkréció és a szérumszint karbamid/kreatinin hányados) tubuláris károsodásra utaltak az IR<sub>LS4</sub> csoportban, míg a LS<sub>4</sub> csoportban számított paraméterek a hagyományos beosztás szerint nem jeleztek vesekárosodást. A renal failure index számított paraméter továbbra is fennálló veseelégtelenségről tanúskodik 24 órával a reperfüzió kezdetét követően, a levosimendannal kezelt csoportban szignifikánsan alacsonyabb érték adódott. (4. táblázat)

#### 4. táblázat: Vesefunkciós laboratóriumi mérések a II. kísérletben:

†: p < 0,05 vs. a megfelelő IR csoport; ‡: p < 0,001 vs. a megfelelő IR csoport

		4 h	24 h
Szérumszint kreatinin [μmol/l]	Sham	30,91±4,45	29,68±8,78
	IR	97,85±25,02	59,04±10,67
	LS	54,03±5,51 ‡	49,29±4,85 †
Szérumszint karbamid [mmol/l]	Sham	4,46±0,67	4,97±0,60
	IR	5,91±1,22	6,46±0,89
	LS	5,52±1,00	5,84±0,40
Szérumszint karbamid / kreatinin hányados	Sham	148,03±34,80	183,49±69,42
	IR	62,60±14,50	112,82±25,92
	LS	101,84±13,11 ‡	119,57±15,41
FENa (frakcionált nátrium exkréció) [%]	Sham	0,58±0,103	0,59±0,17
	IR	2,01±0,54	1,77±0,30
	LS	1,20±0,23 ‡	1,19±0,19 ‡
RFI (renal failure index) [mmol/l]	Sham	0,80±0,08	0,80±0,24
	IR	2,62±0,39	2,33±0,20
	LS	1,66±0,17 †	1,61±0,16 ‡



#### 5.2.5. Szérum TNF- $\alpha$ mérések

Az IR<sub>LS4</sub> csoportban és az LS<sub>4</sub> csoportban szignifikáns szérum TNF- $\alpha$  koncentráció emelkedés volt mérhető az áloperált csoporthoz képest. A levosimendannal kezelt csoportban szignifikánsan alacsonyabb TNF- $\alpha$  szintet mértünk (Sham<sub>LS4</sub>: 4,96 $\pm$ 0,72 ng/mL, IR<sub>LS4</sub>: 36,79 $\pm$ 7,78 ng/mL, LS<sub>4</sub>: 14,51 $\pm$ 2,30 ng/mL, p<0,001 IR<sub>LS4</sub> és LS<sub>4</sub> között).

#### 5.2.6. Alsó végtagi izomzat és vesekéreg mikrocirkuláció becslése

Az áloperált csoportban a kísérlet teljes időtartama (a 7 órás regisztrálási időtartam) alatt végig stabil flow volt mérhető lézer Doppler áramlásmérővel, mind a vese felszínén, mind a m. biceps femorison. Az IR<sub>LS4</sub> és LS<sub>4</sub> csoportokban a vese kéreg mikrocirkulációja az alapáramlás szintjén maradt a 3 óra végtagiszkémia időtartama alatt. A végtagok revaszkularizációja után a mért áramlás értékek fokozatos csökkenést mutattak a IR<sub>LS4</sub> csoportban, míg a levosimendannal kezelt állatoknál az áramlás az iszkémia alatt mérhetőnek megfeleltethető szinten maradt. (PM: IR<sub>LS</sub>: 78,02 $\pm$ 12,63 % vs. LS<sub>4</sub>: 96,90 $\pm$ 4,67 %, p=0,009; RA: IR<sub>LS4</sub>: 82,91 $\pm$ 9,75% vs. LS<sub>4</sub>: 98,84 $\pm$ 1,85 %, p=0,004).

A végtagi izomzat (m. biceps femoris felszíni) mikrocirkulációja a hasi aorta okklúziójakor leesett az IR<sub>LS4</sub> és a LS<sub>4</sub> csoportban közel 0 szintre. Az érkirekesztés megszűntetésekor a mért értékek a levosimendannal kezelt állatoknál átmenetileg visszatértek a 100 %-nak megfelelő alapáramlás szintjére, míg az IR<sub>LS4</sub> csoportban csak kb. 80 %-os áramlás volt mérhető. Az áramlás a 4 órás reperfüziós időtartam során kis mértékben tovább csökkent mindkét csoportban, de a levosimendan kezelés mellett szignifikánsan magasabb áramlás volt mérhető. (PM: IR<sub>LS4</sub>: 62,87 $\pm$ 14,58 % vs. LS<sub>4</sub>: 89,25 $\pm$ 6,70 %, p=0,004; RA: IR<sub>LS4</sub>: 66,01 $\pm$ 14,92 % vs. LS<sub>4</sub>: 90,26 $\pm$ 6,55 %, p=0,006).

## 6. Következtetések

1. A felállított 3 órás bilaterális végtagiszkémia patkánymodelljében poszt kondicionálás alkalmazásával számottevő eredmény nem mutatkozott a végtagi izomrostok iszkémiás-reperfüziós károsodása tekintetében, a hagyományos HE kórszöveti képek, illetve szérum CK, LDH és ASAT aktivitások meghatározása alapján. Izomrost viabilitás módszerének segítségével azonban 24 órával a reperfüzió kezdete után szignifikánsan kisebb fokú károsodás volt igazolható a poszt kondicionált állatok izomrostjain.

2. A reperfüziót követő első négy óra lézer Doppler áramlásmérései alapján az iszkémián átesett állatokban egy mikrocirkulációs elégtelenség volt detektálható az alsó végtagi izomzatban, poszt kondicionálással szignifikánsan kisebb fokban károsodott mikrokeringés igazolódott. Ezzel egy időben a korai gyulladási marker szérumban TNF- $\alpha$  szintje is szignifikánsan kisebb mértékben emelkedett meg a poszt kondicionálás módszerével.
3. A modellben egy heveny vesekárosodás morfológiai és laboratóriumi jellemzői voltak észlelhetők. Ennek hátterében az izomzathoz felszabaduló mioglobinnal tubuluskárosító hatása, lipidperoxidáció, szisztémás acidózis, gyulladási folyamatok, a vese cortex mikrocirkulációs elégtelensége, illetve keringésdinamikai változások is igazolhatók voltak. A poszt kondicionálásban részesült állatcsoportokban enyhébb fokú mioglobin-indukált tubuláris károsodás volt észlelhető. Ez vélhetően független az alsó végtagi izomrostkárosodástól és inkább talán a módszer mechanikus tulajdonságainak, a mioglobin és egyes acidotikus, nefrotoxikus anyagcseretermékek a keringésbe való frakcionált és késleltetett bemosódásának tulajdonítható, kisebb részben a vese mikrocirkuláció javításának és a szisztémás keringési változások mérséklésének tudható be.
4. Vélhetően szintén a módszer mechanikus tulajdonságai folytán a reperfüzió kezdetén mutatkozó keringésmegingás a poszt kondicionált állatokban enyhébb mértékű volt, és a reperfüzió alatt mérhető alacsonyabb shock-index alapján kedvező keringésdinamikai alkalmazkodás érhető el a technika alkalmazásával.
5. Ugyanazon műtéti modellben alkalmazott levosimendan hatására már 4 órával a reperfüzió után tapasztalható volt enyhébb fokú lokális károsodás az izoméletképesség meghatározás és a végtagi mikrocirkulációs mérések alapján. Ezen eredmények valószínűsíthetően a levosimendan mitokondriális integritásra való kedvező hatásával, a  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ -csatornák nyitódásával magyarázhatók.
6. Levosimendan kezelés mellett kisebb fokban csökkent mikrokeringés mérhető az alsó végtagi vázizomzat felszínén, ezt kíséri a kisebb mértékű gyulladási TNF- $\alpha$  citokin felszabadulás.
7. Levosimendan kezelés hatására kisebb fokú heveny tubuláris vesekárosodás, a korai időszakban megtartott kortikális perfúzió volt igazolható, melyeknek hátterében a szer vázizomrostok mitokondriális integritására, a vázizomzat

perfúziójára gyakorolt kedvező hatása, a gyulladásos reakció mérséklése valószínűsíthető, továbbá ezekhez hozzájárulhatnak a szer kedvező kardiovaszkuláris hatásai.

## 8. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények

1. Aranyi P, Turoczi Zs, Garbaisz D, Lotz G, Geleji J, Hegedus V, Rakonczay Z, Balla Z, Harsanyi L, Szijarto A. (2015) Postconditioning in major vascular surgery: prevention of renal failure. *J Transl Med*, 13:(1)21.
2. Onody P, Aranyi P, Turoczi Z, Stangl R, Fulop A, Dudas E, Lotz G, Szijarto A. (2016) Levosimendan Administration in Limb Ischemia: Multicomponent Signaling Serving Kidney Protection. *PLoS One*, 11(9):e0163675.

Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent – eredeti közlemények

1. Szijártó A, Gyurkovics E, Arányi P, Ónody P, Stangl R, Tátrai M, Lotz G, Mihály Z, Hegedüs V, Blázovics A, Kupcsulik P. (2009) Postconditionálás kísérletes alkalmazása aortakirekesztés kapcsán. *Magy Seb*, 62(4):180-187.
2. E. Gyurkovics, P. Aranyi, Zs. Turóczy, D. Garbaisz, M. Varga, V. Hegedüs, G. Lotz, P. Kupcsulik, A. Szijarto. (2010) Postconditioning attenuates remote organ injury after lower limb arterial occlusion. *Interventional Medicine & Applied Science*, 2(4):169-177.
3. Szijártó A, Arányi P, Turóczy Zs, Kupcsulik P, Gyurkovics E. (2010) Ischaemiás-reperfúziós károsodás csökkentésének elvi és gyakorlati lehetőségei az érsebészetben. Irodalmi áttekintés. *Érbetegségek* 4:113-120.
4. Szijártó A, Arányi P, Turóczy Zs, Kupcsulik P, Gyurkovics E. (2010) A reperfúziós szindróma és a postconditionálás sejtszintű mechanizmusa. Irodalmi áttekintés. *Érbetegségek* 17(1):11-19.
5. Szijártó A, Turóczy Zs, Arányi P, Nagy Z, Gyurkovics E. (2010) Akut kritikus ischaemia az alsó végtagon. Irodalmi összefoglaló. *Orv Hetil*, 2;151(50):2057-66.
6. Szijártó A, Turóczy Z, Arányi P, Garbaisz D, Varga M, Stangl R, Lotz G,

- Kupcsulik P. (2010) Hosszú idejű végtagi verőér-elzáródás és izomszövet-életképesség vizsgálata kísérletes állatmodellben. *Magy Seb*, 63(6):374-9.
7. E Gyurkovics, P Aranyi, R Stangl, P Onody, G Ferreira, G Lotz, P Kupcsulik, A Szijarto. (2011) Postconditioning of the lower limb - Preconditioning against the reperfusion syndrome. *J Surg Res*, 169(1):139-47.
  8. Arányi P, Turóczy Zs, Garbaisz D, Varga M, Lotz G, Kupcsulik P, Szijártó A. (2011) Postconditionálás: érsebészeti technika posztoperatív veseelégtelenség megelőzésére – Állatkísérletes eredmények. *Hypertonia és Nephrologia*, 15(3):117-124.
  9. Szijarto A, Turoczi Z, Szabo J, Kaliszky P, Gyurkovics E, Aranyi P, Regali L, Harsanyi L, Lotz G. (2013) Rapidly progressing fatal reperfusion syndrome caused by acute critical ischemia of the lower limb. *Cardiovasc Pathol*, 22:(6)493-500.
  10. 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(1):469-76.
  11. Garbaisz D, Turóczy Z, Fülöp A, Rosero O, Arányi P, Onody P, Lotz G, Rakonczay Z, Balla Z, Harsányi L, Szijártó A. (2013) Postconditioning can reduce long-term lung injury after lower limb ischemia-reperfusion. *Magy Seb*, 66(3):146-54.
  12. Turóczy Zs, Arányi P, Lukáts Á, Garbaisz D, Lotz G, Harsányi L, Szijártó A. (2014) Muscle fiber viability, a novel method for the fast detection of ischemic muscle injury in rats. *PLoS One*, 9:(1)e84783.
  13. 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:(6) e101067.
  14. Arányi P, Tomcsányi J. (2016) Differential diagnostic dilemmas after use of an out-of-date antihypertensive medication. Case report. *Orv Hetil*, 158(11):426-431.