A postcondicionálás szerepe a vékonybél ischaemiás-reperfúziós károsodásának modulálásában

Doktori értekezés

Dr. Rosero Olivér

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

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

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

Szigorlati bizottság elnöke: Prof. Wéber György Ph.D. egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Glasz Tibor Ph.D. egyetemi docens
Dr. Kaszaki József Ph.D. egyetemi docens

Budapest
2015

Bevezetés

Az akut mesenterialis ischaemia (AMI) „akut has” formájában jelentkező sürgősségi kórkép. Jelentőségét mutatja, hogy igen gyakran halálos kimenetelű, kórházi mortalitása a javuló szupportív terápiás lehetőségek ellenére sem csökkent az elmúlt 20 év során, irodalmi adatok alapján ma is meghaladja a 60-80%-ot. Bár a gastrointestinalis betegségek hátterében csak 1-2%-ban áll AMI, incidenciája a társadalom öregedésével párhuzamosan növekszik.

Az AMI patogenezisének kiindulópontja a magas metabolikus aktivitású bélnyálkahártyasejtek oxigénellátásának zavara. A perfúzió romlása jelentkezhet érelzáródás (thrombus, embolus) következtében, vagy szisztémás okok (keringési redisztribúció, sokk) miatt. A vérellátás megszűnése rövid latenciával ischaemiás károsodást eredményez, melyet paradox módon a véráramlás megindulása tovább súlyosbít. A reperfúzió ugyan egyértelműen a túlélés záloga, mégis olyan sejtkárosító folyamatokat is aktivál, melyek ártalmas hatása gyakorta meghaladja az eredeti ischaemiás inzultusét.

Mesenterialis ischaemia-reperfúzió (I-R) során a bélnyálkahártya epithelsejtjei által alkotott barrier réteg sérül. Az epithelsejtek közti szoros kapcsolatot felépítő fehérjék expressziója és lokalizációja változik, ami fokozott bélpermeabilitást eredményez. Az intestinalis flórát körülhatároló, unicelluláris epithelsejtréteg károsodása esetén baktériumok kerülhetnek a véráramba, azaz bakteriális transzlokáció jön létre. A lokális folyamat progressziója, valamint a baktériumok (akár haematogen, akár lymphogen) disszeminációja ugyanakkor intenzív stimulust jelent az immunrendszer számára, amely a szervezet gyulladásos egyensúlyának eltolódásához vezet. Az így fellépő, szisztémás gyulladásos válasz szindróma, a potenciálisan társuló bacteriamiaval (szepszis) egy túlzott proinflammatorikus reakciót idéz elő, amely hosszú fennállása esetén a többszervi működészavar (MODS – multiple organ dysfunction syndrome), illetve többszervi elégtelenség (MOF – multiple organ failure) állapotához vezethet.

A toll-like receptorok (TLR) mint a veleszületett immunrendszer egyik fontos alkotói, képesek különböző mikrobiális antigén-mintázatot (PAMP-pathogen associated molecular pattern) felismerni. Ezen felül a TLR-2 és -4 a gyulladásban és az ischaemia-reperfúzióban betöltött szerepét az a felismerés is erősíti, mely szerint a károsodott szövetekből felszabaduló endogén molekulák (DAMP-damage associated molecular pattern) képesek megindítani a TLR-2 és -4 keresztül zajló szignáltranszdukciót. A gastrointestinalis traktus kommenzális flórának TLR-aktiváló hatása révén állandó „kontrollált” TLR-expresszió van jelen, ami nélkülözhetetlen a bélrendszer védelmében a külső károsító hatásokkal szemben. Mesenterialis

I-R-t követően felborul az egyensúly az intraluminális pathogének és a lokális védekező rendszer között, ami fokozott TLR-expressziót eredményez. A túlzott TLR-expresszió már nem a béllumenben lévő patogénekkel elleni védekezést szolgálja, hanem egy lokális gyulladásos választ indukál. A bél I-R károsodása jellemzően az egész szervezetre is jelentős hatást gyakorol: a nagy mennyiségben képződő és felszabaduló szabad gyökök, valamint gyulladásos citokinek távoli szerveket is képesek károsítani.

Figyelembe véve a belek rossz ischaemia-toleranciáját, az akut ischaemiás esemény még sikeres érsebészeti reconstructio után is az érintett bélszakasz súlyos I-R károsodásához vezet. Műtéti megoldás szükséges a mesenterialis keringés helyreállításához és az elhalt bélszakaszok rezekálására. A sebészi ellátás során a postcondicionálás, mint egyszerűen alkalmazható sebészeti manőver, ideális eszköz lehet az I-R károsodás mérséklésére. A postcondicionálás az ischaemia-t követő szöveti véráramlás több, rövid ciklusban végzett megszakítása a reperfúzió kezdetén, mely közvetlenül megelőzi az érintett szerv szabad reperfúzióját. A postcondicionálás hatásai nagyban függnek az alkalmazott kezelési algoritmustól, ezen belül a ciklusok számától és azok hosszától.

Célkitűzés

I. kísérlet: A maximális védő hatást biztosító postcondicionálási algoritmus meghatározása vékonybél I-R esetén.

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

II. kísérlet: Bélbarrier funkció változás vizsgálata postcondicionálás alkalmazását követően.

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

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

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

IV. kísérlet: Távoli szervek vizsgálata postcondicionálás alkalmazását követően.

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

Módszerek

Kísérletünket a Semmelweis Egyetem EÁB által kiállított 1858/000/2004 és 22.1/2408/3/2011 számú engedély alapján végeztük.

Állatmodell:
A műtéteket 250-300 gramm súlyú hím Wistar patkányokon végeztük, az I. kísérlethez 50 állatot, a II. kísérlethez 45 állatot, a III. kísérlethez 30 állatot és a IV. kísérlethez 30 állatot használtunk. A beavatkozásokat ketamin xylasin iv. narkózisban végeztük. Medián laparotomiát követően izoláltuk az arteria mesenterica superiort (AMS) közvetlenül az aortából történő eredésénél, majd atraumaticus microvascularis klip felhelyezésével 60 percre kirekesztettük a keringésből. Az egy órás ischaemiát követően, a mikroklippet eltávolítva biztosítottuk a reperfúziót. A kísérletnek megfelelő időtartamú reperfúziót követően vér és szövettani mintavétellel egybekötve termináltuk az állatokat.

Csoportbeosztás:
-Áloperált csoport (SHAM): A csoport létrehozásának célja a műtéti traumának, valamint a műtét önálló hatásainak regisztrálása. A hasüreg megnyitása történt; azonban az AMS izolálását nem követte keringésből való kirekesztése.
-I-R kontroll csoport (I-R): Az adaptív sebészi kezelés hiányában kialakuló I-R károsodás megfigyelésére alkalmazott csoport.
-Postcondicionált csoport (PC): Az adaptív keringésmoduláló manőver hatásainak felmérésére, valamint a kifejlődő károsodások az I-R csoporttal történő összehasonlítására alkalmas csoport. A postcondicionálást a csoportnak megfelelő algoritmus szerint végeztük a reperfúzió kezdetén. (1. táblázat)

	Áloperált	**I-R**	**PC**
Ischaemia	–	X	X
Reperfúzió	–	X	X
Postcondicionálás	–	–	X

1. táblázat. Általános kísérleti csoportbeosztás

I. kísérlet: Az általános műtéti modell szerint végeztük a kísérletet 60 perces reperfúziós időintervallummal. Az állatokat 5 csoportra osztottuk (n=10/csoport): áloperált-, I-R- és három postcondicionált-csoportra PC10: 6x10 másodperces reperfúziós-reocclusiós váltakozó ciklusok alkalmazása, ami összesen 2 percig tartott; PC30: 3x30 másodperces reperfúziós-reocclusiós váltakozó ciklusok alkalmazása, ami összesen 3 percig tartott;

PC60: 3x60 reperfúziós-reocclusiós váltakozó ciklusok alkalmazása, ami összesen 6 percig tartott. A reperfúzió végén vett minták: azonos anatómiai helyből vett vékonybélminták (duodenum, jejunum, ileum) szövettani feldolgozásra; vékonybélnyálkahártya kaparék - részletes redox státusz vizsgálatára; vena mesenterica superior-ból vett vérminta - pH mérésére; jobb szívfélből vett vérminta - necroenzimek és gyulladásos citokinek meghatározására.

II. kísérlet: A műtétet megelőzően 12 órával a kísérleti állatokat, oro-duodenális katéteren keresztül, 1 ml 1×10^{10} CFU/ ml- zölden fluoreszkáló fehérje-termelő (GFP: green fluorescent protein) Escherichia coli baktérium szuszpenzióval inokuláltuk. Az általános műtéti modell szerint végeztük a kísérletet 6 órás reperfúziós periódussal. Az állatokat 3 csoportra osztottuk (n=15/csoport): áloperált-, I-R- és PC-csoportra (6x10 másodperces reperfúziós-reocclusiós ciklusok). A reperfúzió végén vett minták: azonos anatómiai helyből vett vékonybélminták (duodenum, jejunum, ileum) - szövettani feldolgozásra; vékonybélnyálkahártya kaparék - részletes redox státusz vizsgálatára; mesenterialis nyirokcsomó-, lép-, máj-, tüdő-, vese-minták – mikrobiológiai analízisre; jobb szív félből vett vérminta – intestinalis zsírsavkötő fehérje (i-FABP), D-laktát és gyulladásos citokinek meghatározására.

III. kísérlet: Az általános műtéti modell szerint végeztük a kísérletet 6 órás reperfúziós időintervallummal. Az állatokat 3 csoportra osztottuk (n=10/csoport): áloperált-, I-R- és PC-csoportra (6x10 másodperces reperfúziós-reocclusiós ciklusok). A reperfúzió végén vett minták: azonos anatómiai helyből vett vékonybélminták (jejunum, ileum) - szövettani feldolgozásra; vékonybélnyálkahártya kaparék - részletes redox státusz, gyulladásos citokinek és TLR-2,TLR-4 mRNS meghatározására.

IV.kísérlet: Az általános műtéti modell szerint végeztük a kísérletet 6 órás reperfúziós időintervallummal. Az állatokat 3 csoportra osztottuk (n=10/csoport): áloperált-, I-R- és PC-csoportra (6x10 másodperces reperfúziós-reocclusiós ciklusok). A reperfúzió végén vett minták: azonos anatómiai helyből vett vékonybél (duodenum, jejunum, ileum)-, máj-, tüdő-, veseminták - szövettani feldolgozásra; jobb szívfélből vett vérminta - gyulladásos citokinek meghatározására.

Vizsgáló módszerek:

-*Hemodinamikai monitorozás:* az állatok artériás vérnyomását és szívfrekvenciáját az arteria carotisba vezetett invazív vérnyomás-mérővel regisztráltuk.

-*A bélnyálkahártya mikrokeringésének vizsgálata:* a jejunum-ileum határán intraluminalisan elhelyezett laser Doppler flowméterrel monitoroztuk. A reperfúziós változások az alábbi paraméterek alapján jellemeztük:
1. Plató maximum (PM): a reperfúzió utolsó 10 perchez tartozó, stabil áramlást mutató szakasz értékeit átlagoltuk.
2. Reperfúziós terület (RT): a reperfúzióhoz tartozó görbe alatti terület integráltja.

-*Szövettani elemzés:* A formalinban fixált, paraffinba ágyazott, azonos anatómiai helyről vett mintákat haematoxylineosin- (HE) festést követően konvencionális fénymikroszkópos elemzését végeztük.

-*Laboratóriumi vizsgálatok:* A haemolysismentes, centrifugált vérminták plazmájából, spektrofotometrián alapuló laboratóriumi automatával, rutintesztek felhasználásával LDH (laktát-dehidrogenáz), CK (kreatin-kináz), ASAT (aszpartát-aminotranszferáz), ALAT (alanin-aminotranszferáz) enzimaktivitás szintjeit, valamint kreatinin koncentrációját határoztunk meg.

-*Oxidatív-stressz vizsgálata:* a bélnyálkahártya homogenizátumából történt az alábbi módszerek segítségével:
1. A luminometriás össz-scavanger kapacitás mérés során a hidrogénperoxidot, luminolt és mikroperoxidázt tartalmazó reakcióelegyben a szabadgyökök jelenlétében a luminol gerjesztett állapotba kerül és fényt bocsát ki, melyet luminométerrel detektáltunk. A mért fényintenzitás arányos a mintában található szabadgyökök koncentrációjával. A Relative Light Unit (RLU) egységben megjelenő eredmények a háttér aktivitás százalékában is kifejezhetők (háttér %).
2. A fehérjékhez köthető redukáló képesség becslése a szabad –SH csoportok Ellmann-reakción alapuló Sedlak- módszerrel (mmol/l).
3. A H-donor kapacitás a fehérjéktől független antioxidáns tulajdonságra utal. Mérését Blois módszerrel végeztük 1,1-difenil-2-pikril-hidrasil gyök abszorbancia csökkenésének kimutatásán keresztül 517 nm-en. Az eredményt gátlás %-ban fejeztük ki.
4. Az össz-redukálóképesség a minta globális redukáló tulajdonságát jellemzi. A mérések Oyaizu-módszer szerint végeztük. A mintát az aszkorbinsavhoz mint referenciavegyülethez hasonlítva, az eredményt aszkorbinsav ekvivalensben (*ASE*) fejeztük ki.

-*Vér pH-meghatározása:* A vena mesenterica superior-ból a reperfúzió 0., 30., 60. és 120. mp-ében kapilláriscsőbe vett vérmintákból történt pH-meghatározás klinikai vérgázanalizátor gép segítségével.

-*Enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálatok:* a szérum és bélnyálkahártya TNF-α, IL-6, i-FABP, D-laktát szinteket szendvics ELISA módszerrel

mértük kereskedelmi forgalomban elérhető kit segítségével a gyártó ajánlása szerint.

-*Microbiologiai vizsgálatok:* a szövetminták homogenizátumát szélesztettünk L-arabinózt és ampicillint tartalmazó Luria-Bertani agarlemezekre, melyeket aerob módon 37°C-on, 24-48 órán át inkubáltunk. A kifejlődött fluoreszcens telepek számlálása 312 nm hullámhosszú UV-fény alatt történt. A GFP-termelő E.coli baktériumok egy gramm szövetmintára vonatkozó csíraszámát CFU/g szövet értékekként tüntettük fel.

-*Immunhisztokémiai vizsgálatok:* a formalinban fixált, majd paraffinban ágyazott duodenum, jejunum és ileum szövetminták aktív kaszpáz-3, claudin-2, claudin-3, claudin-4, zonula occludens-1 immunfestését végeztük poliklonális antitestek felhasználásával a gyártó ajánlásának megfelelően. Negatív kontrollként a metszeteket primer antitest kihagyásával festettük meg, pozitív kontrollként az antitestet gyártó cég által ajánlott szövetmintákat használtuk. Immunhisztokémia kiértékelése szemi-kvantitatív és kvantitatív (Leica Qwin Pro morfometriás szoftver) módszerekkel végeztük.

-*TLR-2 és TLR-4 mRNS meghatározása:* A szövetminták teljes RNS izolálást végeztünk, majd mennyiségét és minőségét fotometrálással ellenőriztük. Ezt követően az RNS-t reverz transzkripcióval cDNS-sé konvertáltunk, majd RT-PCR reakció során a TLR-2 és TLR-4 mRNS expressziót határoztuk meg. A vizsgálatokhoz a GAPDH referencia gént alkalmaztunk

-*Tüdő oedema index:* a tüdő jobb középső lebenyének tömegének (nedves tömeg) lemérése követően, szárításra került állandó 80°C-on (száraz tömeg), a súlyállandóság eléréséig. Az oedema becslése a nedves/száraz tömegek százalékos arányának meghatározásával történt.

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

Eredmények

I. Kísérlet eredményei

Haemodinamikai paraméterek: Az áloperált csoport esetében az artériás középnyomása (MAP- mean arterial pressure) nem mutatott ingadozást a vizsgált időszakban. A mesenterialis ischaemiának kitett kísérleti csoportok MAP-értéke az AMS occlusioját követően emelkedett, majd az ischaemia végére közeledve csökkent. Az I-R csoportban szignifikáns MAP esés volt tapasztalható a reperfúzió kezdetén, ami nem változott a reperfúzió ideje alatt. A reperfúzió 60. percében mind a három postcondicionált csoport artériás középnyomása emelkedett és megközelítette az ischaemia előtti értéket. A PC-10 és PC-30 csoportok tekintetében az MAP szignifikánsan magasabb értéken stabilizálódott a reperfúzió végére az I-R csoporthoz képest. A három postcondicionált csoport artériás középnyomás értékei között nem volt statisztikailag kimutatható különbség.

Mikrocirkuláció: A kezdeti alapáramlás során nem mutatkozik jelentős különbség a kísérleti csoportok között, majd az ischaemia következtében az áramlás fokozatosan a nulla-pontra csökken. Az áloperált csoportban, az állatok áramlási görbéje az alapáramláshoz képest a vizsgálat időtartama alatt nem változott. A reperfúzió kezdetén mind a négy AMS kirekesztésen átesett csoportban hirtelen áramlás-emelkedés figyelhető meg, mely kezdetben eléri a 100%-ot, majd az első 5-10 percet követően, a görbék szétválnak. Az I-R csoportban az áramlás fokozatos csökkenése figyelhető meg, a PM a reperfúzió kezdeti értékhez képest körülbelül 70%-ra csökken, ami szignifikánsan alacsonyabb ($p<0,01$) a három postcondicionált csoporthoz képest. A PM tekintetében a PC-30 és PC-60 csoportok között nem volt szignifikáns különbség ($p=0,317$). A PC-10 csoportban az áramlás hyperaemiával stabilizálódik, mely a vizsgálat egész időtartama alatt fennáll. A PC-10 PM-értéke szignifikánsan magasabb ($p<0,05$) a PC-30 és PC-60 csoportokhoz képest. Az RT tekintetében mind a három postcondicionált csoport értéke szignifikánsan magasabb ($p<0,01$) az I-R csoporthoz képest. A postcondicionált csoportok között a PC-10 RT-értéke a legnagyobb és szignifikánsan magasabb ($p<0,01$) a másik két postcondicionált csoporthoz képest. Nem volt szignifikáns különbség az RT paraméter tekintetében a PC-30 és PC-60 csoportok között ($p=0,657$).

Vékonybél szövettan: A HE festett szövettani metszeteken az áloperált csoportban közel ép szöveti szerkezet volt látható. A duodenum metszetek tekintetében nem volt statisztikailag kimutatható különbség az I-R- és a postcondicionált csoportok között. A három bélszakasz közül az ileum szenvedte a legjelentősebb károsodást. Az I-R csoportban a jejunum és ileum metszetek denudált oedemás villusokat ábrázoltak. Ehhez képest a mesenterialis ischaemia végén alkalmazott postcondicionálás jelentősen

csökkentette az I-R csoportban látott vékonybél szöveti károsodást. A három postcondicionált csoportban megtartottabb szöveti szerkezet volt megfigyelhető. A PC-60 csoportban erős subepithelialis fellazulást, a hámréteg különböző mértékű elemelkedését láttuk elsősorban. A PC-30 és PC-10 csoportokban a szöveti kép ennél is kedvezőbbnek mutatkozott. A subepithelialis fellazulások kisebb mértékűek voltak és a villusok oedemája is enyhébb fokban alakult ki. A kiértékelés során az irodalomban széles körben használt Chiu-féle klasszifikáció alkalmaztuk a számszerű összehasonlíthatóság biztosítása érdekében. A jejunum és ileum bélszakaszok pontértékei alapján a PC-10 és a PC-30 csoportok szignifikánsan kisebb mértékű (PC-10 jejunum: $p=0,015$ vs. I-R; ileum: $p<0,01$ vs. I-R; PC-30 jejunum: $p=0,02$ vs. I-R; ileum: $p=0,044$ vs. I-R) károsodást mutattak az I-R csoporthoz képest. A PC-60 csoportban tapasztalt jejunum és ileum szöveti károsodás mértéke nem mutatott statisztikai különbséget az I-R csoporthoz képest (Jejunum: $p=0,165$ vs. I-R; Ileum: $p=0,054$ vs. I-R).

Plazma LDH és CK változások: A mesenterialis ischaemia-reperfúzióra kitett csoportokban jelentős emelkedés ($p<0,05$ vs. SHAM) volt tapasztalható mind az LDH, mind a CK tekintetében. Az I-R csoporthoz képest a PC-10 és PC-30 csoportban mért LDH és CK emelkedéshez szignifikánsan alacsonyabb ($p<0,01$) volt. Míg a PC-60 csoportban az LDH nem mutatott szignifikáns csökkenést ($p=0,21$). A postcondicionált csoportok között a plazma LDH koncentráció szignifikánsan magasabb volt a PC-30 ($p<0,05$ vs. PC-10) és PC-60 ($p<0,01$ vs. PC-10) csoportokban.

Bélnyálkahártya antioxidáns státusz:

-Luminometriás össz-scavanger kapacitás: A mesenterialis ischaemia-reperfúzió során szignifikánsan emelkedett a vizsgált bélszakaszok mucosa homogenizátumban lévő szabadgyök koncentráció az áloperált csoporthoz képest. Mind a három vizsgálat postcondicionálási algoritmus szignifikánsan csökkentette ($p<0,01$) az I-R csoporthoz képest a szabadgyök koncentrációt mind a három vizsgált bélszegmes tekintetében.

-Redukálóképesség: A duodenum redukáló képesség értéke nem mutatott szignifikáns különbséget a kísérleti csoportok között. A jejunum esetén mind a három postcondicionálási algoritmus szignifikánsan mérsékelte ($p<0,01$) az I-R csoportba tapasztalt antioxidáns képesség csökkenést. Az ileum esetén csak a PC-10 csoport mutatott szignifikánsan magasabb ($p=0,01$ vs. I-R) mucosa redukálóképességet.

-Szabad szulfhidril (SH)–csoportok: A mesenterialis ischaemia-reperfúzió szignifikánsan csökkentette a szabad szulfhidril csoport koncentrációt mindhárom bélszegmens esetén. Az I-R csoporthoz képest csak a PC-10

csoport mutatott szignifikánsan magasabb ($p<0,05$) szabad szulfhidril koncentrációt.

-Hidrogén-donor aktivitás: Mesenterialis ischaemia-reperfúzió során szignifikánsan csökken a bélnyálkahártya hidrogén-donor aktivitása. Mind a három vizsgált postcondicionálási algoritmus szignifikánsan magasabb hidrogén-donor aktivitást mutatott az I-R csoporthoz képest a duodenum és a jejunum tekintetében. Az ileum esetén ez a különbség nem volt statisztikailag kimutatható.

A mesenterialis vér korai pH-változásai: Az AMS kirekesztésen átesett csoportok vénás pH értékei szignifikánsan alacsonyabbak az áloperált csoport értékeihez képest. Az áloperált csoport pH értékeiben nem figyeltünk meg jelentős változást a mért időpontokban. A kezdeti (0.) időpontban mért vénás pH nem mutatott különbséget az ischaemián átesett csoportok között. A 30. másodpercben szignifikáns különbség ($p<0,01$) mutatkozott a PC-10 és a többi kísérleti csoport között. Az reperfúzió első percének végén, a PC-10 csoport szignifikánsan alacsonyabb ($p<0,01$) pH-értékei továbbra is fenn állt. Az I-R- és PC-60 csoportok pH értékei szignifikánsan gyorsabban ($p<0,01$) emelkedtek a PC-10 és PC-30 csoportokhoz képest. A reperfúzió második percében megfigyelt változások alapján elmondható, hogy csak a PC-10 és PC-30 csoportokban alkalmazott postcondicionálási algoritmusok voltak képesek lassítani a véna mesenterica pH normalizálódását az I-R csoporthoz képest. Az utolsó mérésben a PC-10 csoport szignifikánsan alacsonyabb ($p<0,01$) pH értékeket mutatott a PC-30 csoporthoz képest. Szembetűnő, hogy 6x10 másodperces postcondicionálást követően, a pH emelkedés jóval lassabb ütemű, annak ellenére, hogy a reperfúzió elején az I-R csoporttal közel azonos értékről indul. Az I-R- és a PC-60 csoport között nem volt statisztikailag kimutatható különbség a pH értékek tekintetében ($p=0,057$).

Korai szérum IL-6 és TNF-α szintek: Az ischaemia-reperfúzióra kitett csoportok szérum IL-6 és TNF-α szintje jelentősen emelkedet az áloperált csoporthoz képest. Mind a három vizsgált postcondicionálási algoritmus szignifikánsan csökkentette ($p<0,01$) mindkét gyulladásos citokin koncentrációját az I-R csoporthoz képest. A szérum TNF-α tekintetében a PC-10 csoport szignifikánsan alacsonyabb ($p<0,01$) szintet mutatott a PC-30- és PC-60- csoportokhoz képest.

II. Kísérlet eredményei

Vékonybél szövettan: A vizsgált három vékonybél szakasz tekintetében az áloperált csoport HE festett metszetein ép szöveti szerkezet volt látható. A duodenum, mely a vizsgált három vékonybél szakasz közül a legenyhébben károsodott, minimális subepithelialis fellazulásokat mutatott mindkét ischaemia-reperfúziónak kitett kísérleti csoport mintáin. Az I-R- és PC-

csoport között nem volt statisztikailag kimutatható különbség a duodenum elváltozások tekintetében (p=0,71). Ezzel szemben az I-R csoportban kifejezet szövettani változások voltak megfigyelhetők a jejunum és ileum esetén, ahol sok helyen denudált bolyhok valamint a villusok oldalára is kiterjedő súlyos epithelialis fellazulások jellemezték a szövettani képet. A PC-csoport enyhébb képet mutatott kis- és középfokú subepithelialis fellazulásokkal. A metszetek kiértékelése során használt Chiu-féle klasszifikáció alapján, a PC-csoportban látott szövettani elváltozások szignifikánsan enyhébbek voltak mind a jejunum (p<0,01 vs. I-R), mind az ileum (p<0,05 vs. I-R) tekintetében az I-R csoporthoz képest.

Aktív kaszpáz-3 immunhisztokémia: Az áloperált csoport vékonybél metszetein minimális számú aktív kaszpáz-3 pozitivitást mutató intestinalis epithelialis sejt volt megfigyelhető. Ezzel szemben szignifikánsan magasabb (p<0,01) számban voltak láthatóak aktív kaszpáz-3 pozitív festődésű sejtek a mesenterialis ischaemia-reperfúzióra kitett csoportokban. A PC csoport jejunum és ileum metszetein szignifikánsan csökkent (p<0,01) az aktív kaszpáz-3 festődés az I-R csoporthoz képest.

Tight junction sejtkapcsoló fehérjék immunhisztokémia: Az áloperált csoportban gyenge reakciót figyeltünk mind a három vizsgált vékonybél szegmens claudin-2 festődés tekintetében. Claudin-2 pozitivitást főleg a bélbolyhok cryptáiban lokalizálódott és inkább cytoplasmaticusan helyezkedett el granuláris jelleggel. Az ischaemia-reperfúzióra kitett csoportokban magasabb claudin-2 festődés volt látható. Az I-R csoport jejunum és ileum metszetei szignifikánsan erősebb (p=0,018; p=0,016) immunpozitivitást mutattak a PC-csoporthoz képest. A claudin-3 reakció az áloperált csoportban erős lineáris membrán pozitivitást adott, nem volt jelentős különbség a három vizsgált vékonybél szakasz között. A mesenterialis I-R jelentős claudin-3 expresszió csökkenést okozott a jejunum és ileum epithelialis sejtekben. A postcondicionálás szignifikánsan enyhítette (p<0,01 vs. I-R) a claudin-3 festődés csökkenés mind a jejunum, mind az ileum tekintetében. Az áloperált csoportban gyenge claudin-4 immunpozitivitás detektáltunk a három vizsgált bél szegmensen, a reakció főleg a villusok csúcsán található epithelialis sejtek citoplazmajában volt látható. A mesenterialis I-R számottevő claudin-4 expresszió emelkedést okozott a duodenum, jejunum és ileum bolyhok csúcsán található epithelialis sejtekben. Az I-R- és PC-csoport között nem volt statisztikailag kimutatható különbség az epithelialis sejtek claudin-4 membrán expressziója tekintetében (duodenum p=0,11; jejunum p=0,62; ileum p=0,62). A zonula occludens-1 az intestinalis epithelialis sejtek apikális és laterális membránokon volt látható. Az áloperált csoport epithelialis sejtek zonula occludens-1 membrán expressziója nem mutatott különbséget a három vizsgált vékonybél szegmens között. A mesenterialis I-R végén vett jejunum és ileum

mintákban jelentősen alacsonyabb zonula occludens-1 expresszió volt megfigyelhető. Azonban a postcondicionált csoport jejunum és ileum metszeteiben szignifikánsan erősebb ($p<0,01$ vs. I-R) immunpozitivitás.

Bélnyálkahártya antioxidáns státusz

-Luminometriás össz-scavanger kapacitás: Az ischaemia-reperfúzió során szignifikánsan emelkedett a vizsgált bélszakaszok nyálkahártya homogenizátumában lévő szabadgyök koncentráció az áloperált csoporthoz képest. A postcondicionálás szignifikánsan csökkentette ($p<0,01$) az I-R csoporthoz képest a szabadgyök koncentrációt a jejunum és ileum esetén. A duodenum esetén ez a különbség nem volt szignifikáns ($p=0,09$).

-Redukálóképesség: A globális antioxidáns státuszra utaló redukáló képesség értéke csökkent a mesenterialis ischaemia-reperfúzió során. Azonban a PC-csoportban szignifikánsan magasabb ($p<0,05$) értékeket mértünk mindhárom vizsgált vékonybél szakasz tekintetében az I-R csoporthoz képest. A duodenum és ileum esetében a postcondicionált és az áloperált csoport redukáló képessége nem mutatott statisztikai különbséget.

-Szabad szulfhidril (SH) –csoportok: A fehérjékhez kötött antioxidáns tulajdonság vizsgálatnál a postcondicionálás szignifikánsan mérsékelte a mesenterialis ischaemia-reperfúzió okozta szabad szulfhidril csoport csökkenést ($p<0,01$ vs. I-R). Továbbá a postcondicionált és az áloperált csoport között nem detektáltunk szignifikáns különbséget.

-Hidrogén-donor aktivitás: A fehérjéhez nem kötött antioxidáns tulajdonság meghatározás során kimutatható mindhárom vizsgált bélszegmens esetében az ischaemia-reperfúzió antioxidáns kapacitás csökkentő hatása. A változás a jejunum és az ileum tekintetében a legerőteljesebb. A postcondicionálás azonban szignifikánsan mérsékelte a hidrogén-donor aktivitás csökkenést a duodenum ($p<0,01$ vs. I-R), jejunum ($p<0,01$ vs. I-R) és ileum ($p=0,03$ vs. I-R) esetében is.

Microbiologiai vizsgálatok: Az áloperált csoport nyirokcsomó, lép, máj, tüdő és vese szöveti homogenizátumok nem mutattak GFP-termelő E.coli baktérium kolonizációt. Azonban a mesenterialis ischaemia-reperfúzión átesett csoportokban GFP-termelő E.coli változó mértékben volt tenyészhető a különböző szöveti mintákban. A postcondicionálás szignifikánsan csökkentette a távoli szervekbe (nyirokcsomó, lép, máj, tüdő és vese) való bakteriális transzlokáció megjelenését, valamint jelentősen csökkentette a pozitív minták átlagos csíraszámát is. (2. táblázat)

Kísérleti csoport	Ny.cs.	Lép	Máj	Tüdő	Vese
Áloperált	–	–	–	–	–
I-R	**93%**	**86%**	**80%**	**67%**	**60%**
PC	**40%****	**33%****	**33%***	**20%***	**20%***

2. táblázat. GFP-termelő E.coli bakteriális transzlokáció incidenciája. (∗): p<0,05 vs.I-R csoport; (∗∗): p<0,01 vs. I-R csoport

Szérum I-FABP és D-laktát: A szérum I-FABP koncentráció szignifikánsan emelkedet (p<0,01 vs. SHAM) a reperfúzió hatodik órájában az I-R- és PC-csoportban. Azonban a PC-csoport szérum I-FABP koncentrációja szignifikánsan alacsonyabb (p<0,01) értéket mutatott az I-R csoporthoz képest. A mesenterialis ischaemia-reperfúzió jelentős szérum D-laktát koncentráció emelkedést okozott az I-R- (p<0,01vs. SHAM) és PC-csoportokban (p=0,02 vs. SHAM). A postcondicionálás szignifikánsan mérsékelte (p<0,01) az I-R csoportban mért D-laktát koncentráció emelkedést.

III. Kísérlet eredményei

Szöveti TLR-2 és TLR-4 mRNS expressziós mintázat: A mesenterialis I-R szignifikáns (p<0,05 vs. SHAM) TLR-2 és TLR-4 mRNS expresszió emelkedést okozott az I-R- és PC-csoportok vékonybél mintáin, kivéve a PC-csoport jejunum TLR-2 mRNS expresszió esetében (p=0,11 vs. SHAM). A postcondicionálás alkalmazása szignifikánsan csökkentette (p<0,01) a jejunum és ileum TLR-2 és TLR-4 mRNS expresszióját az I-R csoporthoz képest.

Mucosalis IL-6 és TNF-α koncentrációk: A jejunum és ileum nyálkahártya homogenizátumban meghatározott proinflammatorikus citokinek hasonló változásokat mutatott mindkét vizsgált vékonybél szegmensen. Az áloperált csoporthoz képest a mesenterialis I-R szignifikánsan emelkedett (p<0,01) IL-6 és TNF-α szinteket okozott. Az I-R csoporthoz képest az ischaemia végén alkalmazott postcondicionálási algoritmus szignifikánsan csökkentett (p<0,01) a jejunum és ileum IL-6 és TNF-α koncentrációkat.

IV. Kísérlet eredményei

Távoli szervek szövettana: A távoli szervek tekintetében a tüdő esetében diffúz alveoláris károsodás, az alveoláris szeptumok megvastagodása, helyenként parciális atelectasia valamint oedema volt megfigyelhető az I-R csoport metszetein. Ezzel szemben, jóval enyhébb falvastagodásával, mérsékeltebb gyulladásával a postcondicionált csoport szövettani metszetei sokkal jobban emlékeztettek az áloperált csoport ép szövettani képére.

Az I-R csoportból származó máj metszetein főként periportális-midzonális necrosis, periportális bevérzések, gyulladásos infiltráció és szinuszoidális tágulat ábrázolódott, mely sérülések a postcondicionált csoportban jóval enyhébben jelentkeztek.

A vese tekintetében a fiziológiás képet mutató áloperált csoport metszeteivel szemben az I-R csoportban fokozódott a sejtek eosinofiliája, valamint kismértékű szöveti dezorganizáció alakult ki, mely elváltozások jelei a postcondicionált csoport esetében nem mutatkoztak.

Szöveti károsodást jelző szérum paraméterek: Az egyes csoportok szérummintáinak necroenzim-aktivitás értékei jellegzetes különbséget mutattak amik a szövettani elváltozásokkal jól korrelálnak. Az LDH, CK, ALAT és ASAT necroenzimek jelentősen emelkedtek az ischaemia-reperfúzióra kitett csoportokban. Az I-R csoporthoz képest a postcondicionálás szignifikánsan csökkentette (LDH: $p=0,03$, CK: $p=0,04$, ASAT: $p=0,04$) a vizsgált szérum necroenzim szinteket, kivéve a szérum ALAT koncentráció ($p=0,24$). Az I-R csoport szérum kreatinin szintje az áloperált csoporthoz képest szignifikánsan emelkedet ($p<0,01$). Ezzel szemben a postcondiciotnált csoportnál nem volt kimutatható szérum kreatintin koncentráció emelkedés ($p=0,48$).

Tüdő oedema index vizsgálata: A tüdő nedvességtartalmának kiszámítása során az áloperált csoporthoz képest az I-R csoportban szignifikánsan magasabb ($p<0,01$) értékeket mértünk. A postcondicionálás alkalmazása szignifikánsan csökkentette a tüdő nedvességtartalmát az I-R csoporthoz képest ($p=0,013$).

Szérum IL-6 és TNF-α szintek: A szisztémás gyulladást jellemző markerek IL-6 és TNF-α koncentrációja az áloperált csoporthoz képest szignifikánsan emelkedett ($p<0,01$) a mesenterialis ischaemia-reperfúziónak kitett csoportok szérumában. Azonban, mindkét proinflammatorikus citokin tekintetében az I-R csoporthoz képest a postcondicionálás szignifikánsan csökkentette ($p<0,01$) plazma koncentrációjukat.

Következtetések

A vizsgálatok tervezésénél feltett kérdésekre az alábbi válaszok adhatók:

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

Saját publikációk jegyzéke

Kongresszusi absztraktok és előadások mellőzésével

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények jegyzéke

1. **Rosero O**, Onody P, Stangl R, Turoczi Z, Fulop A, Garbaisz D, Lotz G, Harsanyi L, Szijarto A. (2014) Postconditioning of the small intestine: which is the most effective algorithm in a rat model?. J Surg Res, 187: 427-37. **IF: 2,121**
2. **Rosero O**, Onody P, Kovacs T, Molnar D, Lotz G, Toth S, Turoczi Z, Fulop A, Garbaisz D, Harsanyi L, Szijarto A. (2014) Impaired intestinal mucosal barrier upon ischemia-reperfusion: "patching holes in the shield with a simple surgical method". Biomed Res Int, 2014: 210901. **IF: 2,706**
3. Onody P, **Rosero O**, Kovacs T, Garbaisz D, Hegedus V, Lotz G, Harsanyi L, Szijarto A. (2012) Postconditioning -- effective method against distant organ dysfunction? Magy Seb, 65: 222-9.
4. **Rosero O**, Onody P, Stangl R, Hegedus V, Lotz G, Blazovics A, Kupcsulik P, Szijarto A. (2011) Posztkondicionálás kísérletes vizsgálata vékonybél ischaemiás-reperfúziós modellben. Magy Seb, 64: 28-36.
5. Szijarto A., **Rosero O.**, Onody P., Harsanyi L. (2013) Kritikus Mesenterialis Ischaemia. Adaptív Mechanizmusok. Távoli szervi diszfunkciók. Magy Belorv Arch. 66: 13-19.
6. **Rosero O**, Kovacs T., Onody P., Harsanyi L., Szijarto A. (2014) Bakteriális transzlokáció: rés a pajzson. Orv Hetil, 155: 304–312.
7. **Rosero O**, Harsanyi L., Szijarto A. (2014) Akut mesenterialis ischaemia: biomarker egyenlő diagnózis?. Orv Hetil, 155: 1615–1623.

Egyéb - nem az értekezés témájában megjelent - eredeti közlemények:

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

2. Modis K, Gero D, Stangl R, **Rosero O**, Szijarto A, Lotz G, Mohacsik P, Szoleczky P, Coletta C, Szabo C. (2013) Adenosine and inosine exert cytoprotective effects in an in vitro model of liver ischemia-reperfusion injury. Int J Mol Med, 31:437-46. **IF: 1,880**
3. Garbaisz D, Turoczi Z, Fulop A, **Rosero O**, Aranyi P, Onody P, Lotz G, Rakonczay Z, Balla Z, Harsanyi L, Szijarto A. (2013) Therapeutic option for managing lung injury induced by infrarenal aortic cross-clamping. J Surg Res, 185: 469-76. **IF: 2,121**
4. Onody P, Stangl R, Fulop A, **Rosero O**, Garbaisz D, Turoczi Z, Lotz G, Rakonczay Z Jr, Balla Z, Hegedus V, Harsanyi L, Szijarto A. (2013) Levosimendan: a cardiovascular drug to prevent liver ischemia-reperfusion injury?. PLoS One, 8:e73758. **IF: 3,534**
5. **Rosero O**, Németh K, Turoczi Z, Fulop A, Garbaisz D, Gyorffy A, Szuak A, Dorogi B, Kiss M, Nemeskeri A, Harsanyi L, Szijarto A. (2014) Collateral circulation of the rat lower limb and its significance in ischemia–reperfusion studies. Surg Today, 44: 2345-53. **IF: 1,208**
6. Garbaisz D, Turoczi Z, Aranyi P, Fulop A, **Rosero O**, Hermesz E, Ferencz A, Lotz G, Harsanyi L, Szijarto A. (2014) Attenuation of Skeletal Muscle and Renal Injury to the Lower Limb following Ischemia-Reperfusion Using mPTP Inhibitor NIM-811. PLoS One, 9:e101067. **IF: 3,534**
7. Turoczi Z, Fulop A, Czigany Z, Varga G, **Rosero O**, Tokes T, Kaszaki J, Lotz G, Harsanyi L, Szijarto A. (2015) Improvement of small intestinal microcirculation by postconditioning after lower limb ischemia. Microvasc Res, 98:119-25. **IF: 2,432**

Megjelent, illetve elfogadott közlemények impakt faktora összesen: 19,536