

**Az átmeneti alsó végtagi iszkémia lokális és távoli mikrokeringési hatásai
patkányban**

Garab Dénes, MSc

Ph.D. Tézis

**Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar
Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola
Sebészeti Műtéttani Intézet**

**Témavezető:
Dr. Szabó Andrea**

**Szeged
2014**

1. BEVEZETÉS

1.1. Az iszkémia-reperfúziós (IR) károsodás főbb lokális biokémiai és mikrokeringési következményei

A szöveti hipoxia és az azt követő reperfúzió igen sokrétű biokémiai változásokat indukál az érintett szövetekben, melyek eddig ismert legfontosabb komponense a reaktív oxigén- és nitrogén tartalmú szabadgyökök által kiváltott szövetkárosodás. A szabadgyökök révén direkt módon károsodhat szinte valamennyi sejtalkotó és módosulhatnak az alapvető jelátviteli útvonalak. IR során a mikrokeringés is jelentősen károsodik, melynek jelei az akut gyulladási reakciók valamennyi jellegzetességét mutatják, mint például a perfúziós zavar, az ödéma, vagy a sejt-sejt szintű interakciók fokozódása. Az általunk is alkalmazott intravitális mikroszkópia kiváló lehetőséget biztosít e jelenségek folyamatos és közvetlen megfigyelésére és számszerűsítésére.

1.2. Az iszkémia távoli hatásai

Az IR során károsodott szövetből a reperfúzió során a keringésbe került sejt- és mitokondrium fragmensek, aktivált leukociták és gyulladási citokinek miatt, valamint a szöveti oxigénhiányt detektáló neurogén mechanizmusok aktiválódása révén az immunrendszer fokozottan aktiválódik, mely távoli szervek endothel sejtjeiben is biokémiai és mikrokeringési gyulladási reakciókhoz vezethet.

1.3. Az alsó végtagi iszkémia klinikai aspektusai, a periosteum jelentősége

Az alsó végtagi iszkémia a legtöbb klinikai esetben valamely krónikus perifériás érbetegség szövődménye, mint a diabétesz vagy az atheroszklerózis, míg az akut esetek főként artériás trombozishoz, embóliához, traumához vagy tumorhoz köthetőek. Az ortopéd-traumatológiai sebészetben a tourniquet-vel kiváltott átmeneti végtag iszkiémiát elsősorban sürgősségi esetekben alkalmazzák, illetve olyan elektív ortopédiai beavatkozások során, ahol az adott terület vértelensége szükséges az operációhoz. Munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy az átmeneti végtag IR hatással van nemcsak a csontra és az azt körülvevő lágy szövetekre, de a periosteum mikrokeringésére is. Mivel a csontthártyának kiemelt szerepe van nemcsak a csont vérellátására, de a benne található oszteoprogenitor sejtek miatt a csont anyagcseréjére is, a csontthártya IR károsodása döntően befolyásolhatja a csontgyógyulási folyamatokat.

1.4. Az iszkémiás prekondicionálás (IPC)

1.4.1. Az IPC lokális és távoli hatásai, potenciális ortopéd-traumatológiai alkalmazási lehetőségei

Az IPC során rövid, átmeneti IR periódusok révén mérsékelhetők az ezt követő hosszabb iszkémia káros következményei. Számos endogén útvonal vesz részt az IPC nyújtotta védelemben. Kimutatták többek között, hogy csökken a szöveti reaktív oxigén szabadgyök (ROS) képződés és nő az adenzin felszabadulás, ami stimulálja az endotheliális NO szintáz aktivitást. Mindez fokozott NO felszabaduláshoz vezet, így javul a mikrokeringés és a szöveti oxigenizáció. IPC hatására intracelluláris protein kinázok is aktiválódnak (pl.: PKC, p38 MAPK), melyek védő hatású fehérjék transzkripcióját szabályozzák. A fentiek következtében csökken a leukociták kitapadásáért és transzmigrációjáért felelős adhéziós molekulák expressziója, mérséklődik az intracelluláris, a kitapadt leukocitákból, illetve a máj Kupffer sejtekből származó extracelluláris ROS mennyisége, s ezáltal csökken a szövetkárosodás.

Az IPC-nek az előbbiekhöz hasonló, kedvező hatása figyelhető meg akkor is, amikor a hosszabb IR inzultusnak kitett célszervtől távolabbi anatómiai egységen alkalmazzák. Ezt a jelenséget távoli IPC-nek nevezik. Ennek során is csökken az oxidatív stressz, mérséklődik a sejt- és mitokondriális membránok károsodása és a sejtek ATP depléciója, s ezáltal a lokális IR által kiváltott szövetkárosodás csökken a célszervben is.

A karon vagy lábon kivitelezett IPC nem-invazív módon, könnyen és különösebb szövődmények nélkül kivitelezhető eljárás és mivel viszonylag nagy szövetmennyiséget érint, ezért kiváltképp alkalmas nemcsak a lokális, de távoli védelem kiváltására is. Habár számos kísérletes és klinikai vizsgálatban alkalmazták már az eljárást, a végtagon kiváltott IPC hatása a máj IR mikrokeringési következményeire még nem ismert.

1.4.4. A NADPH-oxidázok (NOX) potenciális szerepe IR során

A NOX enzimesaládba ROS generáló enzimek tartoznak, melyek a redukált NADPH-ról történő elektron transzfer révén a molekuláris oxigénből szuperoxid gyököt generálnak. Különösen fontos szerepük van a redox szignalizációban. Az intracelluláris szuperoxid források közül ez az egyetlen ismert enzimesalád, melynek elsődleges funkciója a ROS generálás. A máj parenchymában a NOX2 és a NOX4 altípus is megtalálható, az előbbi a Kupffer sejtekben és a polimorfonukleáris neutrofil leukocitákban (PMN), az utóbbi pedig a mikroerekben és a hepatocitákban fordul elő túlnyomórészt. Specifikus NOX aktivációt vált ki több olyan stimulus is, melyről ismert, hogy endotheliális diszfunkciót okoz, mint pl. a máj

IR is. A NOX izoformák szerepe a távoli IPC által kiváltott mikrokeringési reakciókban azonban még nem ismert.

1.5. Az oszteoporózis és ösztrogén pótlás traumatológiai szempontjai

Oszteoporózisban fokozott a csonttörések rizikója a csontsűrűség csökkenése és a csontok mechanikai tulajdonságainak romlása miatt. Ennek hátterében a csontképződés és lebontás közti egyensúlyzavar áll, mely nőkben megelőzhető vagy részben helyreállítható a pre-menopauzális időszakra jellemző ösztrogén-szint helyreállításával. Az endogén ösztrogén-szint csökkenés és az ösztrogén pótlás szisztémás és lokális következményei a keringési rendszert illetően azonban ellentmondásosak. A hormonpótló terápia alkalmazásánál ugyanis mérlegelni kell, hogy a kedvező anti-inflammációs, anti-atheroscleroticus és vázrendszeri hatások mellett az ösztrogén-pótlásnak súlyos mellékhatásai is lehetnek (mint például a mélyvénás trombózis). Az ösztrogén-pótlás hatásai a csonthártya mikrokeringésre tourniquet iszkémiát követően még nem ismertek.

2. CÉLKITŰZÉSEK

- Fő célkitűzésünk az átmeneti alsó végtagi iszkémia helyi és távoli mikrokeringési hatásainak vizsgálata volt. Kísérleteinkben intravitális mikroszkópiával vizsgáltuk az alsó végtagon alkalmazott tourniquet által kiváltott reakciókat a tibialis periosteum és a máj mikrokeringésre IR során, patkányokon.
- Céljaink között szerepelt az oszteoporózis és az ösztrogén-pótló terápia következményeinek vizsgálata egy klinikailag releváns időtartamú, ovariectomián (OVX) alapuló oszteoporózis modellben patkányon. Vizsgáltuk, hogy a krónikus ösztrogén-kezelés miként befolyásolja az OVX által kiváltott, csonthártyára vonatkozó mikrokeringési reakciókat IR során. Az egyik hipotézisünk az volt, hogy az oszteoporózisos patkányok csonthártya mikrokeringése érzékenyebb az átmeneti végtag iszkémia káros következményeire, mint a velük egyidős, ösztrogénnel kezelt állatoké. További feltételezésünk az volt, hogy a végtag IPC csonthártya mikrokeringésre gyakorolt kedvező hatásai módosulnak krónikus ösztrogénhiány esetén.
- Célunk volt továbbá annak a kérdésnek a megválaszolása, hogy a máj IR károsodás mikrokeringési vonatkozásai miként csökkenthetők végtag IPC alkalmazása révén. Hipotézisünk szerint a májban a NOX izoformák expressziójában bekövetkező változásoknak fontos szerepük lehet a végtag IPC által kiváltott távoli védelem mechanizmusában.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A kísérleteket Sprague-Dawley patkányokon végeztük, a protokoll követte a National Institutes of Health (USA) előírásait és az Európai Tanács 2010/63-as Direktíváját és a Szegedi Tudományegyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága (V/144/2013) jóváhagyta.

3.1. Kísérleti protokollok és csoportok

Az első kísérletsorozatban 3 hónapos nőstény patkányokon OVX-et vagy álműtétet hajtottunk végre, majd 5 hónappal később az állatok egy részét ösztrogénnel (OVX+E2+IR csoport), a másik részét pedig hordozóanyaggal kezeltük (OVX+IR és Álműtött+IR csoport). A krónikus kezelés szubkután oltás formájában történt 17β -ösztradiollal (E2), heti 5 alkalommal 6 hónapon keresztül $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ -os dózisban. Csontdenzitás vizsgálatokat az állatok 8, 9, 12, és 14 hetes korában végeztük. A protokoll végén (a 14. héten) az állatok egyik alsó végtagján 60 perces teljes iszkémiát hoztunk létre (az a. femoralis klippelése és comb köré vezetett tourniquet alkalmazása révén), melynek következményeit az ezt követő 180 perces reperfüziós időszakban vizsgáltuk intravitális mikroszkópiával, illetve a. carotisból vett vérmintákból. Az alsó végtagi IR következményeinek vizsgálatához kontroll csoportként 3 hónapos, fiatal nőstény patkányokat vizsgáltunk (IR csoport).

A második tanulmányunkban is 3 hónapos ovariectomizált és álműtött nőstény állatokat vizsgáltunk (OVX+IR és Álműtött+IR csoport), majd az állatok 5 hónapos korában a korábbi 60 perc alsó végtagi iszkémia/180 perc reperfüziós protokollt kiegészítettük a végtag iszkémiás prekondicionálásával (OVX+IPC+IR és Álműtött+IPC+IR csoport), ahol az IPC-t két ciklusban (10 perc iszkémia/10 perc reperfüzió) alkalmaztuk az iszkémiás inzultus előtt.

A harmadik kísérletsorozatban hím patkányokon a végtag IPC májra gyakorolt távoli mikrokeringési és biokémiai hatásait vizsgáltuk parciális máj IR-t követően. A máj középső és bal lebenyének 60 perces iszkémiája után a 180 perces reperfüzió (IR csoport) alatt végeztük a mikrokeringési perfúziós méréseket és vérmintavételeket, illetve a kísérlet végén szövetmintákat vettünk. Egy további csoportban az előző tanulmányban alkalmazott végtag IPC protokollt használtuk előkezelésként (rIPC+IR csoport). A kontroll csoportban is megtörténtek a sebészei beavatkozások, de nem hoztunk létre sem máj, sem végtag iszkémiát (Álműtött csoport).

3.2. Csontsűrűség mérés

Az állatok csontsűrűségét a tibia proximális részén vizsgáltuk ultrahangos denzitométer (DBM-Sonic 1200, IGEA, Carpi, Olaszország) segítségével, ketamin (25 mg kg^{-1}) és xylazine (75 mg kg^{-1}) keverékével történő altatásban.

3.3. Sebészi beavatkozások

Az OVX-t steril körülmények között, altatásában végeztük. Az IVM vizsgálatokhoz Napentobarbitál anesztéziát (45 mg kg^{-1} ip) alkalmaztunk a periosteum esetén, a májnál pedig ketamin (25 mg ml^{-1}) és xylazine (20 mg ml^{-1}) altatást.

A tibialis periosteumot egy az intézetünkben korábban kidolgozott módszer szerint, a bőr és a m. gracilis átvágásával, valamint a kötőszövetek mikrosebészeti feltárása révén preparáltuk.

A máj mikrokeringés vizsgálatához medialis laparotomiát követően, bilaterális subcostalis bemetszést ejtettünk. A középső és a bal májlebenyeket atraumatikusan mobilizáltuk, így hozzáférhetővé váltak az ide futó a. hepatica és a vena portae ágai, melyeket mikrosebészeti klippekkel fogtunk le az iszkémia idejére. A mikroszkópos vizsgálatokhoz ideiglenesen a bal lebenyt szervlapátra helyeztük.

A tibialis periosteum és a bal májlebeny poszterior felszínének intravitalis videomikroszkóppal (IVM) történő mikrokeringés vizsgálatokor a keringés vizualizálására fluoreszcein isotiocianáttal jelzett erythrocytákat, a leukociták jelzésére rhodamine 6G-t alkalmaztunk intravénásan (Zeiss Axiotech Vario 100HD mikroszkóp, Carl Zeiss GmbH, Jena, Németország). A felvételeket offline, képanalizáló szoftver segítségével analizáltuk. Az endothelium mentén gördülő, illetve kitapadó leukociták számát a csonthártya posztkapilláris venuláiban, illetve a máj poszt-szinuszoidális venuláiban határoztuk meg.

A máj mikrokeringés vizsgálatokor a fény-spektroszkópiát és laser-Doppler véráramlásmérést kombináló „oxygen to see” rendszer („O2C” LEA Medizintechnik, Gießen, Németország) segítségével nem-invazív módon mértük a szöveti oxigén szaturációt, a szöveti hemoglobin tartalmat, a kapillárisokban az áramlást és az áramlási sebességet.

3.4. Laboratóriumi vizsgálatok

A PMN adhézions molekula CD11b expressziójának vizsgálata áramlási citometriával történt. A proinflammációs citokin TNF- α és HMGB1 meghatározásokat ELISA módszerrel, az AST, ALT és LDH szintek meghatározását pedig standard laboratóriumi fotometriás módszerrel végeztük. A XOR aktivitás méréshez fluorimetriás, az MPO meghatározáshoz fotometriás módszert alkalmaztunk. A NOX2 és NOX4 fehérje meghatározások Western blot

analízissel történtek. A szöveti ICAM-1 szinteket immunohisztokémiai módszerrel határoztuk meg.

3.5. Statisztikai analízis

A statisztikai analízis SigmaStat (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA) szoftverrel történt. A csoportokon belüli és csoportok közötti különbségek kimutatására variancia analízist végeztünk (ANOVA), melyet a Bonferroni teszt követett. A csoportokon belül és csoportok közötti különbségek egyidejű meghatározását kétszemponos ANOVA teszttel végeztük. A Western blot vizsgálat esetén a nem normális eloszlás miatt Mann-Whitney tesztet alkalmaztunk. A statisztikai szignifikancia szinteket $P < 0,05$ értéknél határoztuk meg.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Az OVX és a krónikus E2 terápia hatása a csontsűrűsége és a tibia csonthártya mikrokeringési gyulladáshoz vezető reakcióira

A proximális tibia csontsűrűség vizsgálata alapján osteoporózis volt kimutatható 21 héttel a bilaterális OVX után, amit az E2 terápia sikeresen helyreállított. A tibialis periosteum posztkapilláris venuláiban a kitapadt leukociták száma szignifikánsan megnőtt mind a 3 hónapos kontroll állatokban, mind pedig az álműtött és az OVX csoportokban a végtag iszkémiát követő reperfúzió végére (120 és 180 perc). A krónikus E2 kezelés sikeresen kivédte ezt a hatást az OVX állatokban. A CD11b sejtfelszíni adhéziós molekula expressziója fokozódott mindhárom csoportban a reperfúzió 120 és 180. percében, melyet a krónikus E2 kezelés nem befolyásolt. A TNF- α szint azonban alacsonyabb volt az E2-vel kezelt csoportban. Az immunohisztokémiai vizsgálatok alapján az ICAM-1 denzitás a csonthártya ereiben az IR inzultusnak kitett végtagon hasonló volt mindhárom csoportban.

4.2. A lokális IPC hatása a tibia csonthártya posztiszkémiás mikrokeringési gyulladáshoz vezető reakcióira ösztrogén hiányos állapotban

A tibiális csonthártya posztkapilláris venuláiban a gördülő leukociták száma jelentősen fokozódott a kontroll értékekhez képest a végtag IR inzultus hatására a reperfúzió 120. és 180. percére mindegyik kísérleti csoportban. Az IPC-vel történő előkezelés hatására szignifikánsan csökkent ez az érték, az OVX állatokban ilyen mértékű csökkenés azonban nem volt megfigyelhető. A másodlagos PMN-endohel sejt interakciók, azaz a kitapadások tekintetében is hasonló változásokat tapasztaltunk, vagyis az IPC nem volt hatékony az OVX csoportban. A PMN aktiváció vizsgálatára szolgáló CD11b expresszióban minden csoportban jelentős emelkedés volt megfigyelhető a reperfúzió során, melyet az IPC csak az álműtött csoportban

mérsékelt a reperfúzió 120. percében. Az IPC ilyen jellegű védő hatása azonban nem volt megfigyelhető az OVX csoportban.

4.3. A távoli IPC hatása a parciális máj IR gyulladással szemben

Mind az intrahepatikus véráramlás, mind a véráramlási sebesség szignifikánsan alacsonyabb volt az iszkémiát követően a reperfúzió alatt végig (IR csoport); ezeket a távoli IPC visszaállította az álműtött csoport szintjére. Hasonló jelenséget figyeltünk meg az O₂ szaturációban és hemoglobin tartalomban is. A máj poszt-szinuszoidális ereinek az IR hatására jelentősen emelkedett mind a gördülő, mind pedig a kitapadó PMN-ek száma az álműtött csoportba tartozó állatokhoz képest. A végtag IPC mindkét paramétert az álműtött csoport szintjére csökkentette. Szignifikánsan alacsonyabb HMGB-1 és TNF- α szinteket mértünk a végtag IPC-vel kezelt csoportban az IR csoporthoz képest és hasonlóan alakult a leukociták szöveti akkumulációjára jellemző MPO aktivitás és a szabadgyök generációt kiváltó xantin oxidáz aktivitás is. Hasonló hatással volt az IPC az AST, ALT és LDH szintekre is.

A NOX2 és NOX4 fehérjék expressziója is megnőtt parciális máj IR hatására. A végtag IPC-nek köszönhetően a NOX2 expresszió szignifikánsan alacsonyabb volt, míg a NOX4 expresszióját az IPC nem befolyásolta.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. Az OVX és az E2 pótlás hatása a lokális posztiszkémiás csonttörés mikroeringési károsodásra

A nők kevésbé érzékenyek a keringési shock és a gyulladással szemben, mint a férfiak, azonban ez a védelem megszűnik a menopauza alatt, illetve ovariectómiát követően, melyek osteoporózis kialakulásához vezethetnek. Ezeknek az állapotoknak a kezelésére hormonpótló terápiát, vagyis a premenopauzális időszakra jellemző ösztrogén-szint visszaállítását lehet alkalmazni. Mivel osteoporózisban fokozott a csonttörések rizikója, felmerül a kérdés, hogy az osteoporózisban szenvedő nők érzékenyebbek-e a posztoperatív és poszttraumás gyulladással szemben (azaz például a csonttörések ellátása során alkalmazott tourniquet iszkémiát követő reperfúziós szakaszban a gyulladással szemben), mint azok, akik hormonpótló kezelésben részesülnek. Ennek a kérdésnek a megválaszolására az első tanulmányunkban egy krónikus osteoporózis állatmodellt alkalmaztunk, ahol a hosszú távú ösztrogénpótló kezelés következményei megfelelően vizsgálhatók voltak. Mivel a periosteumnak kiemelt szerepe van a csont-

anyagcserében, s ezáltal a csont gyógyulásában is, megfigyeltük a periosteum mikrokeringési változásait intravitális mikroszkópiával. A hosszú távú OVX hatására jól kimutatható, súlyos oszteoporózist detektáltunk a tibiában, a periosteumban pedig gyulladással járó mikrokeringési reakciók jöttek létre az IR következtében. Megfigyeltük ugyanakkor, hogy az OVX által kiváltott endogén ösztrogén-szint csökkenés önmagában nem hoz létre eltérő leukocita-endothel sejt interakciókat vagy CD11b és ICAM-1 adhéziós molekula expresszió változásokat az álműtött állatoknál megfigyelhető képest. Ezekből egyértelműen az szűrhető le, az oszteoporózis önmagában nem fokozza a poszttraumás mikrokeringési gyulladással járó komplikációkat a csontthártyában. Ebben a tekintetben a tanulmányunk nem támasztja alá néhány javarészt rövidtávú (néhány hetes) OVX utáni megfigyelést, melyek fokozott leukocita depozícióról számolnak be más szervekben. Ennek háttérében a különböző modellek által használt eltérő időtávú megfigyelések állhatnak.

Az exogén ösztrogén hatások szakirodalma viszont sokkal gazdagabb. Szinte valamennyi tanulmány az E2 kezelés pozitív hatásáról számol be (pl. a májban, a szívben vagy a retinában) még akkor is, ha az E2-t nem hosszú távon, hanem csak az IR inzultus előtt közvetlenül alkalmazták. Az E2 kedvező reperfüziós mikrokeringési, döntően a leukocita aktivációra és szöveti akkumulációra vonatkozó hatásai háttérében a kitapadásban szerepet játszó adhéziós molekulák expresszió változásai állnak. Jelen kísérleteinkben azonban az E2 hatására mérséklődő PMN-endothel sejt interakciók ellenére a CD11b és ICAM-1 adhéziós molekula expressziókban nem tudtunk változást kimutatni. Mások nemtől függő dimorfizmusról számolnak be, azaz a nőkben kisebb mértékű gyulladással járó választ lehet megfigyelni trauma esetén. Más megfigyelések az E2-nek a PMN-ek által termelt NO mennyiségét befolyásoló szerepére utalnak. Tanulmányunkban az E2 az inflammációs citokin TNF- α szinteket is mérsékelte. Ezek alapján elmondható, hogy a hormonpótlás az oszteoporózis progressziójának mérséklése mellett nagymértékű védelmet nyújt a tourniquet iszkémia gyulladással járó mikrokeringési komplikációival szemben is.

5.2. A lokális IPC hatása a végtag IR károsodásra intakt és OVX nőstény patkányokban

Az ovariectómia következményeit rövidebb időtávlatban is vizsgáltuk, mely krónikus ösztrogén hiány kiváltásához elegendő volt, de még nem okoz oszteopéniát. Hasonlóan a hím patkányokkal végzett korábbi kísérleteink eredményéhez, a lokális IPC hatékonyan mérsékelte a 60 perces alsó végtagi iszkémia által okozott elsődleges PMN-endothel sejt interakciók fokozódását, a gördülést a periosteumban. Az IPC jótékony hatása azonban nem volt kimutatható az OVX állatokban, csökkent ugyan a gördülő leukociták mennyisége, a

kitapadások számát azonban mindez nem befolyásolta. Ugyanígy a leukociták CD11b expressziója sem változott IPC után. Tehát a csonthártyában a posztisztkémiás gyulladásos komplikációk elleni védelem nem jött létre ösztrogén hiányos állapotban. Ennek alapján feltételezhetjük, hogy az endogén ösztrogénnek fontos szerepe van az IPC által kiváltott antiinflammációs mechanizmusok működésében a periosteumban.

A kutatási eredmények meglehetősen ellentmondásosak az ösztrogén IPC-ben betöltött szerepét illetően. Az általunk megfigyelthez hasonlóan a szívben is visszaállítja az IPC védő hatását patkányban, míg ez a kedvező hatás elmarad nyúlban. Mások az IPC hatástalanságáról számolnak be egérben, ugyanakkor az E2 kezelés kedvezően hathat a szövetkárosodásra. Az E2 kezelés időbeli alkalmazásából adódó eltérések szintén befolyásolják a megfigyeléseket. Mások felvetették azt is, hogy az exogén és endogén ösztrogén hatások eltérhetnek. Felmerül az ösztrogénnek, mint transzkripciós faktornak a szerepe a szubcelluláris mechanizmusok szabályozása tekintetében is, tehát mindenképpen további, molekuláris szintű vizsgálatok szükségesek az ösztrogén IPC-ben betöltött szerepének tisztázására.

5.3. A végtag IPC távoli, a parciális máj IR következményeire gyakorolt jótékony mikrokeringési és biokémiai hatásai

A klinikai gyakorlatban a májrezekció és májtranszplantáció során óhatatlanul fellép a máj bizonyos mértékű IR károsodása. Ennek fontos mikrokeringési aspektusai vannak, hiszen a gyulladásos folyamat részeként Kupffer sejt aktiváció, inflammációs citokin felszabadulás, a ROS termelés fokozódása és következményes mikrocirkulációs zavar (pl. fokozott PMN aktiváció és kitapadás) jön létre. A károsodás egyes tényezőinek befolyásolása kulcsfontosságú lehet a szerv posztoperatív működése szempontjából. A távoli végtag IPC új és könnyen kivitelezhető metodika, mely anélkül fejt ki védő hatását, hogy közvetlen stresszt okozna a májnak. Kísérleteinkben a korábban már helyileg sikeresen alkalmazott IPC protokollt használva sikeresen mérsékeljük a máj IR által kiváltott mikrokeringési zavarát, melynek következtében jelentősen csökkent a máj funkcionális károsodása is. A távoli végtag IPC komplex mikrokeringési és biokémiai hatásainak vizsgálatokor nagy hangsúlyt fektettünk a ROS források, ezen belül az endogén NOX-ok szerepére. A két legrelevánsabb NOX izoforma a NOX2, melyet először PMN-ben írtak le, mint a ROS produkció kezdőpontja és a NOX4, ami a fő izoforma a vaszkuláris sejtekben előforduló NOX homológok közül. A távoli IPC nem befolyásolta a NOX4 expresszióját, ami döntően endotheliális eredetű konstitutív enzim, kis mennyiségű ROS-t termel és hozzájárul az értónus fenntartásához, az endothelium függő vazodilatációhoz. Emellett a NOX4-nek a redox-szenzitív szignalizációs utak, az

endotheliális NOS aktiváció, a fokozott NO produkció, és az antioxidáns rendszerek expressziójának fokozása révén vazoprotektív funkciója is van. Az IPC azonban sikeresen mérsékelte a NOX2 expresszióját.

Számos paraméter esetén igazoltuk a távoli végtag IPC védő hatását a parciális máj IR károsodásával szemben, így a szöveti perfúzióra, oxigenáltságra, a gyulladásozó sejtek interakciókra, a máj nekroenzim és a gyulladásozó citokin szintekre kifejtett jótékony hatásokat. A távoli végtag IPC mérsékelte a PMN-ek által okozott károsodást, egyrészt csökkentve PMN-endothel sejt interakciókat a poszt-szinuszoidális venulákban és az MPO aktivitást az IR által érintett területen, másrészt redukálta a NOX2 expressziót. Mindez összhangban van más tanulmányokkal, ahol a NOX-ok által termelt ROS mennyiség csökkenése az adhéziós molekula expresszió redukálásához vezetett, ezáltal mérsékelve a PMN-endothel sejt interakciókat és az ezzel összefüggő gyulladásozó reakciókat. Az IPC a szisztémás TNF- α és HMGB1 szintet is csökkentette, megelőzve ezzel a gyulladásozó válasz felerősödését és terjedését a reperfúzió alatt, mely a végül a mikrokeringés romlásához, funkcionális és strukturális sejtkárosodáshoz, szisztémás gyulladásozó komplikációkhoz vezetett volna. Felmerülhet a NOX-ok aktivitásának direkt, szelektív gátlásának a szükségessége is máj IR-ban, azonban jelenleg nem állnak rendelkezésre izoforma-specifikus gátlószerek, melyekkel a különböző NOX izoformák egyedi hozzájárulását ki lehetne mutatni *in vivo* körülmények között, máj IR során.

6. A TÉZIS FONTOSABB MEGÁLLAPÍTÁSAI

1. A tourniquet iszkémia periosteális mikrokeringési következményeit először számszerűsítettük IVM segítségével egy klinikailag releváns időtartamú, oszteoporózis modellben patkányon. Az OVX önmagában nem fokozza a végtag IR által kiváltott lokális és szisztémás komplikációkat (leukocita kitapadás, keringő leukocita aktiváció és gyulladásozó citokin felszabadulás). Az ösztrogén terápia ugyanakkor az oszteoporózisra kifejtett jótékony hatása mellett mérsékli mind a szisztémás, mind pedig PMN-függő lokális gyulladásozó reakciókat a csontthártyában.
2. A lokális végtag IPC periosteális mikrokeringésre gyakorolt jótékony hatása OVX esetén nem érvényesül, amely felveti az endogén ösztrogén potenciális szerepét az IPC által kiváltott védelemben.
3. A távoli végtag IPC helyreállítja a posztiszkémiás májban a szöveti perfúzió romlást és oxigenáltságot, csökkenti a gyulladásozó reakciókat és a proinflammációs citokin, illetve

nekroenzim szinteket. Az észlelt változások összefügghetnek a NOX2 expresszió csökkenésével, ami a végtag IPC által nyújtott védelem egyik mechanizmusa lehet.

7. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni Boros Mihály Professzornak a lehetőséget, hogy a Sebészeti Műtéttani Intézet keretein belül végezzem a kutatómunkámat, és értékes szakmai iránymutatásával elindítsam a kutatói karrieremet.

Hálával tartozom témavezetőmnek, Dr. Szabó Andreának, aki segített elsajátítani az alapvető kutatói készségeket, és külön köszönet a türelméért és a mindennapos segítségért, amit a kutatás, a konferenciákra való felkészülés, a publikációk és a doktori disszertáció megírása során kaptam.

Köszönöm Dr. Hartmann Petrának a segítséget és támogatást a kísérletek kivitelezésében és az első szerzős publikációm megírásában.

Köszönöm minden közvetlen munkatársamnak és társszerzőmnek a napi munka során és tanulmányokban való együttműködést.

Szeretném megköszönni a Sebészeti Műtéttani Intézet minden dolgozójának, asszisztensének, hogy stabil háttérrel biztosítottak a kísérletekhez és biokémiai mérésekhez.

Köszönöm barátaimnak és ismerőseimnek, akik mellettem voltak az évek alatt és átsegítettek nehezebb időszakokon.

Végezetül nagyon hálás vagyok és köszönöm a családomnak, a nagynéném családjának és a nagymamámnak a szeretetet és gondoskodást, amivel támogattak, hogy elérjem a céljaimat.

A tézis a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0035 és a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0073 pályázatok támogatásával készült.

A TÉZIS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK

- I. Hartmann P, Greksa F, **Garab D**, Varga R, Széll M, Keresztes M, Sántha P, Boros M, Szabó A. Microcirculatory consequences of osteoporosis. *Timisoara Med. Journal* 2010; 60:100-106
- II. Szabó A, Hartmann P, Varga R, Jánvári K, Lendvai Z, Szalai I, Gomez I, Varga G, Greksa F, Németh I, Rázga Z, Keresztes M, **Garab D**, Boros M. Periosteal microcirculatory action of chronic estrogen supplementation in osteoporotic rats challenged with tourniquet ischemia. *Life Sci.* 2011; 88(3-4):156-162 **IF: 2,451**
- III. **Garab D**, Fet N, Szabó A, Tolba RH, Boros M, Hartmann P. Remote ischemic preconditioning differentially affects NADPH oxidase isoforms during hepatic ischemia-reperfusion. *Life Sci.* 2014; 105(1-2):14-21 **IF: 2,555**

A TÉZIS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ ELŐADÁSKIVONAT

- I. **Garab D**, Bodnár D, Nyíri S, Pócs L, Janovszky A, Boros M, Szabó A. Periosteal microcirculatory effects of limb ischemic preconditioning in ovariectomized rats. *Eur Surg Res.* 2014; 52:130

EGYÉB, TELJES TERJEDELMŰ KÖZLEMÉNYEK

- I. Hartmann P, Varga R, Zobolyák Z, Héger J, Csosz B, Németh I, Rázga Z, Vizler C, **Garab D**, Sántha P, Jancsó G, Boros M, Szabó A. Anti-inflammatory effects of limb ischaemic preconditioning are mediated by sensory nerve activation in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2011; 383(2):179-189 **IF: 2,5**
- II. Hartmann P, Erős G, Varga R, Kaszaki J, **Garab D**, Németh I, Rázga Z, Boros M, Szabó A. Limb ischemia-reperfusion differentially affects the periosteal and synovial microcirculation. *J Surg Res.* 2012; 178(1):216-222 **IF: 2,239**
- III. Tuboly E, Szabó A, **Garab D**, Bartha G, Janovszky Á, Erős G, Szabó A, Mohácsi Á, Szabó G, Kaszaki J, Ghyczy M, Boros M. Methane biogenesis during sodium azide-induced chemical hypoxia in rats. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2013; 304(2):C207-214 **IF: 3,54**
- IV. Hartmann P, Fet N, **Garab D**, Szabó A, Kaszaki J, Srinivasan PK, Tolba RH, Boros M. L- α -glycerylphosphorylcholine reduces the microcirculatory dysfunction and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase type 4 induction after partial hepatic ischemia in rats. *J Surg Res.* 2014; 189(1):32-40 **IF: 2,018**

- V. Tőkés T, Varga G, **Garab D**, Nagy Z, Fekete G, Tuboly E, Plangár I, Mán I, Szabó RE, Szabó Z, Volford G, Ghyczy M, Kaszaki J, Boros M, Hideghéty K. Peripheral inflammatory activation after hippocampus irradiation in the rat. *Int J Radiat Biol.* 2014; 90(1):1-6 **IF: 1,895**
- VI. Janovszky A, Szabó A, Varga R, **Garab D**, Boros M, Mester C, Beretka N, Zombori T, Wiesmann HP, Bernhardt R, Ocsosvzki I, Balázs P, Piffkó J. Periosteal microcirculatory reactions in a zoledronate-induced osteonecrosis model of the jaw in rats. *Clin Oral Investig.* 2014 (nyomdában) **IF: 2,285**
- VII. Varga R, Janovszky Á, Szabó A, **Garab D**, Bodnár D, Boros M, Neunzehn J, Wiesmann HP, Piffkó J. A novel method for in vivo visualization of the microcirculation of the mandibular periosteum in rats. *Microcirculation* 2014; 21(6):524-531 **IF: 2,763**
- VIII. Varga J, Klausz B, Domokos Á, Kálmán S, Pákáski M, Szűcs S, **Garab D**, Zvara Á, Puskás L, Kálmán J, Tímár J, Bagdy G, Zelena D. Increase in Alzheimer's related markers precedes memory disturbances: studies in vasopressin-deficient Brattleboro rat. *Brain Res Bull.* 2014; 100:6-13 **IF: 2,974**