

Onkológiai helyreállító műtétek keringéspathológiai vizsgálatai

PhD dolgozat

Dr. Petrovics Laura

Doktori Iskola vezetője: Prof. Kovács L. Gábor
Programvezető: Dr. Jancsó Gábor Med. Habil
Témavezetők: Dr. Jancsó Gábor Med. Habil
Dr. Takács Ildikó PhD



Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar
Sebészeti Oktató és Kutató Intézet

Pécs
2018

1 BEVEZETÉS

A tumoros megbetegedések világszerte nagy hatással vannak a társadalomra. 2012-ben körülbelül 14,1 millió új tumoros megbetegedés fordult elő világszerte, amiből 7,4 millió esetet férfiaknál, 6.7 milliót pedig nőknél regisztráltak. A négy leggyakoribb tumorfajta: tüdő, női emlőrák, colorectalis és prostata daganatok.

Vizsgálatunkban, mi elsősorban az emlő és fej/nyak daganatokra fókuszáltunk. Az emlőtumor a leggyakrabban diagnosztizált tumor és vezető ok a tumoros megbetegedés okozta elhalálozásban nők között. A nyelöcsőtumor a nyolcadik leggyakoribb daganatos megbetegedés és a leggyakrabban a halált okozó tumoros megbetegedések közül a hatodik a sorban.

A korai diagnózis minden esetben nagy jelentőséggel bír, a további komplikációk és a metasztázisok kialakulásának megelőzése miatt. Sajnos, a legtöbb esetben a jellegzetes tünetek csak a daganat késői stádiumában jelentkeznek, emiatt a szűrőprogramok és a megfelelő tumor markerek jelentősége óriási. A tumor markerek posztoperatív jelentősége is kiemelendő a tumor recidívájának detektálásában vagy kizárásában. Számos törekvés van új markerek létrehozására, de még mindig nagyon fontos, hogy ezen a területen további kísérleteket végezzenek és sikerüljön új diagnosztikus eszközöket/markereket fejleszteni.

A korai diagnózis és megfelelő terápia mellett az onkológiai defektusok helyreállítása is kihívást jelent a sebészek számára. Egyik lehetőség a saját (autológ) szövettel végzett rekonstrukció. Ezekben az esetekben különböző lebenyeket lehet alkalmazni, amik lehetnek: lokális lebenyek, regionálisak vagy a defektus helyreállítása történhet szabad lebeny átültetéssel is. Habár a szabad lebeny átültetések sikere viszonylag magas, még mindig vannak olyan esetek, ahol az iszkémia-reperfúziós károsodás miatt kialakul elégtelen mikrocirkuláció a lebeny részleges elhalását okozza és a beteg reoperációjához vezet. Emiatt az iszkémia-reperfúzió (I/R) alatt bekövetkező biokémiai változások és mikrocirkulációs zavarok detektálása a lebenyekben különösen fontos.

1.1 ISCHEMIA-REPERFÚZIÓS KÁROSODÁS

Iszkémia-reperfúziós (I/R) károsodás egy multifaktoriális folyamat következménye, ami egy hosszabb iszkémiás periódust követő reperfúzió után jöhet létre és eredményezhet szöveti károsodást. Szabad lebenyek esetében főleg a disztális terület mikrocirkulációjának a károsodásában játszik szerepet. Metabolikus változások, mint a kapilláris szűkület, leukocytá szekvesztráció, neutrophil infiltráció, endothel és membrán diszfunkció, szabadgyök képződés, chemokinek és cytokinek aktivációja, a komplement rendszer és a mitokondrium működési állapota tudja befolyásolni az iszkémia-reperfúziós károsodás súlyosságát. Iszkémia alatt a metabolizmus az anaerob felé tolódik, ami a sejt pH csökkenéséhez vezet. A H^+ -ion felhalmozódás kompenzálására, a Na^+-H^+ kicserélőn keresztül nagy mennyiségű hidrogén ion kiáramlás történik, ami a Na^+ nagyfokú beáramlását eredményezi. Iszkémia depletálja a sejtben levő ATP-t, ami inaktiválja az ATPázokat, csökken a Ca^{2+} kiáramlás, illetve limitált lesz a Ca^{2+} felvétel az endoplazmatikus retikulum által, Ca^{2+} -túltöltődést okozva a sejtekben. Ezek a változások a mitokondriális permeabilitási

tranzíciós pórus (mPTP) megnyílásával jár, ami további ATP csökkenést, irreverzibilis DNS, fehérje oxidációt eredményez és ami aktiválhatja a sejthalált elősegítő útvonalakat. Habár a hirtelen reperfüzió helyreállítja az oxigén és szubsztrát ellátást, illetve normalizálja az extracelluláris pH-t, a reperfüzióknak is vannak káros hatásai. A reperfüziós károsodás kialakulásában szerepet játszó tényezők: 1.) Reaktív oxigén származékok termelődése 2.) Ca^{2+} -túltöltődés 3.) mPTP megnyílása 4.) endothelialis diszfunkció 5.) prothrombotikus fenotípus megjelenése és a gyulladásos válasz.

1.2 TRIMETAZIDINE

Trimetazidin (TMZ) egy jól ismert anti-iskémiás gyógyszer, amit a klinikumban stabil angina kezelésére használnak. A második és harmadik vizsgálatunkban TMZ-t használtunk az iszkémiás-reperfüziós károsodás kivédésére, mivel számos olyan tulajdonsága van, ami hatásos lehet ellene:

- csökkenti a zsírsav oxidációt és stimulálja a glükóz felhasználást
- limitálja az intracelluláris acidózist, csökkenti a Na^+ és Ca^{2+} akkumulációt a sejtekben
- gátolja a káros lipid metabolitok termelődését
- gátolja a mPTP megnyílását és védi a szöveteket az iszkémia-reperfüziós károsodástól
- csökkenti az oxigén szabadgyökök által kiváltott citolízis és membrán károsodás mértékét
- csökkenti a gyulladás és az apoptózis mértékét

Továbbá, Devynck és mtsai. vizsgálták a TMZ hatását humán trombocita membránokon és megállapították, hogy a TMZ csökkentette a cAMP tartalmat és az aggregációs választ kollagénnel és ADP-re. TMZ haemodinamikai változásokat nem okoz és leginkább csak enyhe mellékhatásokat (fejfájás) írtak le a gyógyszer használata mellett.

2 CÉLOK

Három fő vizsgálatot tervezünk. Az első vizsgálatban egy új diagnosztikus lehetőségre fókuszálunk emlőtumrok esetén. A második és harmadik kísérletben érdeklődésünk középpontjában a helyreállító szabad lebeny műtétek során kialakuló iszkémia-reperfúziós károsodás csökkentésének lehetőségei állnak.

1. Az első vizsgálatunk célja a BFSP1 fehérje szerepének a vizsgálata humán emlőrákok vonatkozásában. Szeretnénk bizonyítani, hogy a BFSP1 fehérje nem csak a szemlencsében, hanem emlőtumorokban is kimutatható. Ezenkívül vizsgáljuk, hogy van-e különbség a normál és tumoros emlőszövet BFSP1 tartalmában, illetve, hogy a BFSP1 tartalmat befolyásolja-e az, hogy a beteg milyen kezelésben részesült. (Egy megbízható diagnosztikus kit létrehozásának bevezető vizsgálata)
2. Második vizsgálatunk fő célja, annak demonstrálása, hogy az iszkémia-reperfúzió okozta mérhető károsodás már akkor előfordul amikor makroszkópos elváltozások (pl. szöveti necrosis) még nincsenek. Továbbá célunk a TMZ oxidatív stresszre, szövettani változásokra kifejtett hatását vizsgálni patkányok epigasztriális bőrlebenyeiben. A TMZ hatékonyságának meghatározásához különböző oxidatív stressz paramétereket kívánunk mérni, úgymint a malondialdehyd (MDA); redukált glutation (GSH) és a plasma thiol csoportok szintjét. A gyulladás mértékének hozzávetőleges meghatározásához szöveti TNF-alfa szint mérését tervezzük. Szövettani, immunhisztokémiai és heamorrhológiai vizsgálatokat szintén végzünk a biokémiai eredmények megerősítése céljából. Ezenkívül, két különböző gyógyszerbeadási idő hatásának összehasonlítását is tervezzük (iszkémia előtt adott és iszkémia után adott TMZ), hogy meghatározzuk melyik hatásosabb az iszkémia-reperfúziós károsodások csökkentésében.
3. A harmadik vizsgálatunkban a TMZ hatását patkány vékonybélben vizsgáljuk. A bőrhöz képest a jejunum sokkal szenzitívebb az iszkémiás hatásokra. Vizsgálatunkban ugyanazt a TMZ dózist használjuk, amit a bőrlebenynél is és ennek hatását mérjük. Továbbá célunk összehasonlítani a TMZ-el végzett kémiai pre- és poszt kondicionálás hatását az iszkémiás pre- és poszt kondicionálással. Arra is kíváncsiak vagyunk, hogy ha a módszereket kombináljuk van-e kimutatható additív hatás vagy nincs. Az oxidatív stressz nyomon követésére az MDA, GSH, -SH és a szuperoxid dizmutáz (SOD) enzim aktivitást mérjük. Gyulladásos citokinek közül a TNF-alfa és IL-6 szintek mérését tervezzük. A jejunumban kialakult elváltozások detektálására hisztopatológiai (HE, TUNEL) vizsgálatokat végzünk.

3 BFSP1 FEHÉRJE SZEREPE AZ EMLŐTUMOROK DIAGNOSZTIZÁLÁSÁBAN

3.1 BEVEZETÉS

A tumorok globális jelentősége megkérdőjelezhetetlen, figyelembe véve, hogy a második vezető halálok világszerte. Az emlőrák a második leggyakoribb daganat típus, nők között pedig a leggyakoribb.

BFSP1 (Beaded filament structural protein 1, Filensin) egy szemlencse specifikus citoszkeletális fehérje, ami intermedier filamentumokat (IF) képez a BFSP2-vel (phakinin) együtt.

Az IF fehérjék expressziós mintázata szövet specifikus és fejlődéstanilag szabályozott. Az IF fehérjék specifikus alegységeinek expressziója, klasszikusan biomarkerekként szolgál és alkalmasak különböző tumorok szöveti eredetének meghatározására. Az IF-típusok a fő tumor csoportokat képesek elkülöníteni egymástól: carcinomák esetén citokeratinok, izom eredetű sarcomák esetén desmin, nem-izom eredetű sarcomák esetén a vimentin, gliomák esetén a gliális fibrilláris sav proteinek jelenléte jellemző. Ezért, olyan esetekben, ahol a konvencionális technikákkal nehéz a diagnózis, ott olyan antitestekkel, amik specifikusak az IF-ok egy típusára, meghatározható a tumor hisztogenezise.

Tapodi Antal, Daniel M. Clemens és mtsai. vizsgálták a BFSP 1 szerepét szemlencsében és véletlen leletként felfedezték, hogy a BFSP1 váratlanul a humán emlő adenocarcinoma sejtvonalban (MCF7) és a human cervix carcinoma sejtekben (HeLa) is expresszálódott. BFSP1 fehérje jelenléte tumorsejtekben meglepő, és egy új, izgalmas lehetőséget jelenthet a tumorbiológia területén.

3.2 ANYAG ÉS MÓDSZER

Előzetes kísérletek során Tapodi Antal (PTE-ÁOK Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet) és mtsai. kimutatták, hogy a BFSP1 jelen van humán eredetű tumoros sejtvonalakban in vitro, ami felveti a kérdést, hogy vajon a fehérje tumoros szövetekben is megtalálható-e. Annak érdekében, hogy ezt kiderítsük ex vivo humán daganatos emlőszöveteket vizsgáltunk. A vizsgálatunkat a Regionális Kutatásetikai Bizottság hagyta jóvá. (6446-PTE 2018)

3.2.1 Protocol

Vizsgálatainkat 2017 áprilisában kezdtük, együttműködésben a PTE-KK Sebészeti Klinikával, a Patológiai Intézettel és a Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézettel (PTE-ÁOK). Azóta 25 emlődaganatos beteget sikerült bevonni a vizsgálatunkba. A részvételi kritériumok közé tartozott: a diagnosztizált tumor; a műtéti beavatkozás típusa (csak mastectomiából származó mintákat vizsgáltunk) és az, hogy a betegek beleegyeztek a vizsgálatba. Nem vettük figyelembe a kort, a társbetegségeket, a nemet és a carcinoma típusát sem.

Műtétet követően az eltávolításra került emlőt a Patológiai Intézetben vizsgálták, ahol először a patológus elvégezte a diagnózis és a további kezelés céljából szükséges szövettani vizsgálatokat. Ezt követően kis mennyiségű mintát vett számunkra a tumorból és tumor-mentes (emlőbimbó mögötti) területről is amit RNA oldatban a Biokémiai Intézetbe vittünk, további vizsgálatok (tömegspektrometria, RNS vizsgálat, Western blot analízis) elvégzése céljából. Western blot analízis során tumoros és nem

tumoros szövetek vizsgálata történt paralell módon, annak elkülönítése céljából, hogy a BFSP1 fehérje, melyik szövetből expresszálódik. A mintákat homogenizálás, immunprecipitálás és liofilizálást követően Western blottal vizsgáltuk. A Patológián maradt emlőszövetből Dr. Kálmán Endre patológus metszeteket készített a tumoros és tumor mentes területről is. Megfelelő előkészítés után a metszetek a primer antitestek jelenlétében 4 °C-on egy éjszakán keresztül inkubálta.

Jelenlegi vizsgálatunk csak a Western blot analysis és az immunhisztokémiai vizsgálat eredményeit foglalja magában.

3.2.2 Primer Antitestek

Két különböző primér nyúl poliklonális antitestet használtunk, amik a BFSP1 fehérje különböző részeit ismerik fel, hozzásegítve bennünket a BFSP1 különböző proteolitikus fragmentjeinek a detektálásához. Az S38 anti-BFSP1 antitest (HPA042038 Sigma) képes a fehérje mindkét proteolitikus fragmentjét felismerni, míg az S48 antitest a fehérjének csak az N-terminális fragmentjét ismeri fel.

3.3 EREDMÉNYEK

3.3.1 Western blot

Emlődaganatos betegek humán ex vivo klinikai mintáit vizsgáltuk Western blottal. Ebben a vizsgálatban immuno-blottal bizonyítottuk, hogy a BFSP1 jelen van a tumormintákban. Ugyanabból a személyből nem tumoros mintaként (kontrollként), a mellbimbó-areola komplex mögötti területről vett szövetet használtuk. Bizonyítottuk, hogy normál szövetben a filenszin hiányzik az antitestek mindkét típusával.

Ezenkívül próba kísérletként ugyanabból a betegből származó liofilizált daganat- és szérummintákból Western-blot vizsgálatot végeztünk, így bizonyítva, hogy a BFSP1, amelyet azonosítottunk, mindkét típusú mintán megegyezik. Ez jó háttérrel biztosít a további szérum vizsgálatokhoz

3.3.2 Immunhisztokémia

A BFSP1 fehérje azonosítására a szövetekből immunhisztokémiát végeztünk S38 anti-BFSP1 antitesttel. Először különböző módon kezelt betegekből származó, daganatmentes (a mellbimbó mögött) szöveti területeket vizsgáltuk meg. Ebben az esetben csak a ductusok, a ductulusok és az acinusok festődtek pozitívan az antitesttel, de a környező szövetekben nem voltak pozitív sejtek. A pozitív festődésű sejtek mennyiségét a különböző kezelések nem befolyásolták. Azokon a területeken, ahol a daganat előfordult, az eredmények a tumor jelenlététől/hiányától függően eltérőek voltak. Azokban az esetekben, amikor a páciens neoadjuváns terápiát kapott, és a daganat regrediált, a pozitív sejtek mennyisége szignifikánsan alacsonyabb volt, mint azokban az esetekben, ahol a tumor még mindig kimutatható volt (még akkor is, ha a páciens neoadjuváns terápiát kapott).

3.4 DISZKUSSZIÓ

Emlődaganatok esetén a rutin szűrővizsgálatok közé az emlő ultrahang és mammográfias vizsgálatok tartoznak, azonban vannak olyan emlőtumor markerek, amik segíthetnek a prognózis megállapításában és a megfelelő terápia kiválasztásában. A leggyakoribb markerek emlőtumorok esetén az ösztrogén és progeszteron receptorok, melyek hiányában rosszabb prognózis várható, illetve ezek alkalmasak a megfelelő hormon terápia kiválasztására is. Ezenkívül vannak serum markerek is amik a tumor kiújulásának diagnózisához segíthetnek hozzá, ilyenek: CA (cancer antigén); 15-3 (MUC-1 antigén); és a CEA (carcinoembriotikus antigén). Azonban ezek szintje nem minden betegben emelkedik meg, illetve inkább a távoli metasztázisok kimutatásában van fontosabb szerepük és limitált a kimutathatóságuk mikrometasztázisok és locoregionális kiújulás esetén. Emellett számos jóindulatú betegség és a kemoterápia is befolyásolni tudja a szintjüket, tehát ezen markerek nem tumor specifikusak.

Fent említett okok miatt, az olyan markerek identifikálása, ami segítene a daganat viselkedésének előrejelzésében különösen fontosak, a megfelelő klinikai menedzsment (stádium meghatározás, terápiás válasz megítélése, kiújulás, távoli metasztázisok kimutatásának és a prognózis) szempontjából.

A citoszkeleton három fő filamentum-rendszert tartalmaz - mikrofilamentumokat, mikrotubulusokat és intermedier filamentumokat (IF), melyek együttesen biztosítják és tartják fent a sejtek alakját és szerkezetét, és kulcsfontosságúak különböző sejtes folyamatokban, beleértve a sejtosztódást, a mozgást és a vesikuláris transzportot. A különböző IF-típusokat lehet elkülöníteni lokalizációjuk és fehérje összetételük szerint. Az intermedier filamentumok meghatározott specificitással expresszálódnak a különböző sejtekben. Ennek a jelenségnek köszönhetően az intermedier filamentumok használhatóak olyan indikátorként, ami meghatározza a fehérje eredetét a szövetspecifikus expressziós mintázat alapján az ilyen sejtekben. Az IF-ok tipizálása egy tumordiagnosztikai módszer is, a fent említett tulajdonságok miatt.

A BFSP1 fehérjék az IF-ok családjába tartoznak. A BFSP1 vagy a filenszin a lencserost sejtekben expresszálódik a sejtek differenciálódásának megkezdése után. Bár a biológiai szerepük a lencsében még nem tisztázott, ezek az IF fehérjék elengedhetetlenek a lencse optikai tulajdonságaihoz. Fontosak továbbá a lencse biomechanikai tulajdonságainak kialakításában is. Ezen fehérjék kiemelkedő szerepét bizonyítja, hogy a BFSP1 génmutáció a felelős a kortikális juvenilis szürkehályog kialakulásáért.

Tapodi Antal és munkatársai korábban vizsgálták a BFSP1 biológiai szerepét a szemlencséken. Eredetileg az endogén filenszin fehérje kaspáz hasítási helyeit kívánták meghatározni. Ennek elérése érdekében rekombináns BFSP1-et klónozták és expresszálták humán, kereskedelmi forgalomban kapható sejtvonalakban, úgymint az MCF7 és HeLa. Az eredmények Western-blottal való megjelenítésével azonban egy extra sávot észleltek a transzfektálatlan, negatív kontroll sejtvonalakban is. Ez a meglepő felfedezés számos további kérdést vetett fel, mivel eddig a BFSP1 csak szemlencse-specifikus intermedier filamentumként volt ismeretes. 2014-ben hat további kereskedelmi forgalomban kapható sejtvonalat is elemeztek Western blottal, nevezetesen: U-118 MG, U-251 MG (glioblastoma sejtvonalak), A-549 (humán tüdőrák), T24 / 83 (humán hólyag karcinóma), HeLa és a HepG2 (humán májtumor), és bebizonyították, hogy mindegyikben jelen van a BFSP1.

Jelen munkánk, egy folyamatban lévő projekt folytatásaként értékelhető, amelyben a BFSP1 fehérje váratlan jelenlétét vizsgáljuk a tumorsejtekben. Ez az első vizsgálat, ahol a BFSP1 expresszióját ex vivo tumormintákban és szérumban is sikerült kimutatnunk. Továbbá szeretném kihangsúlyozni, hogy Western-blot analízissel ez a fehérje csak a tumormintákban volt kimutatható, míg normál szövetekből hiányzott.

Immunhisztokémiai vizsgálatokkal megerősíthettük, hogy szignifikáns különbség van a BFSP1 tartalomban attól függően, hogy a tumor jelen van-e a mintában vagy nincs. Azoknál a betegeknél, akik kaptak/nem kaptak neoadjuváns terápiát, és/de a tumort makroszkóposan ki lehetett mutatni, ott a pozitívan festődő sejtek mennyisége jelentősen megnövekedett, összehasonlítva azoknak a betegeknél a szövetszövetmintáival, akik neoadjuváns terápiát kaptak, és a tumor regrediált. Eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a BFSP1 fehérje elég érzékeny lehet ahhoz, hogy ductalis emlőkarcinómák esetében kimutassa a daganatsejteket.

3.5 KÖVETKEZTETÉS

Következtetésként eddig azt mondhatjuk, hogy a BFSP1 fehérje nemcsak a szemlencsében, hanem humán emlődaganat esetén is expresszálódik. Ebben a vizsgálatban 25 ductalis carcinómában szenvedő beteget vizsgáltunk. Immunhisztokémiai módszerekkel kimutattuk, hogy a BFSP1 fehérje érzékenységet mutat a tumorsejtek irányába, függetlenül attól, hogy a betegek neoadjuváns terápiát kaptak-e vagy sem. Ezenkívül a fehérje ugyanolyan típusa jelenik meg a szérumban, mint a szövetszövetmintákban. Ez a tanulmány jó alapot nyújt a további vizsgálatokhoz, amelyek meghatározhatják a BFSP1 fehérje pontos szerepét és azt a splice variáns típust, ami részt vesz a rosszindulatú daganatos megbetegedésekben, illetve ami a BFSP1 jelenlétét vizsgálja egyéb karcinóma típusokban is. Duktális emlőkarcinóma esetén a fehérje fontos szerepet tölthet be műtét után a betegek nyomon követésében, és a betegek szérumából megfelelő információkat nyújthat a daganat ismételt megjelenésére vonatkozóan, de természetesen ezen feltételezéseink alátámasztására még további vizsgálatokra van szükség.

4 TRIMETAZIDIN, ISZKÉMIA-REPERFÚZIÓS KÁROSODÁSOK CSÖKKENTÉSÉBEN BETÖLTÖTT SZEREPE, PATKÁNY BŐRLEBENYEK ESETÉN

4.1 BEVEZETÉS

Az iszkémia-reperfúziós károsodás jelentős problémákat okozhat a sebészet számos területén, például a rekonstrukciós plasztikai sebészetben, érsebészetben, traumatológiában vagy szívsebészetben. Sajnos, ez az állapot elkerülhetetlen szabadlebeny műtétek vagy replantációk során. A szabadlebenyekkel végzett helyreállító műtétek rutinszerű eljárásá váltak az onkológiai ablatív műtétek vagy traumák kapcsán kialakuló defektusoknak a pótlására. Az elmúlt évtizedben ezen műtétek technikája sokat javult, és elérte a 90-95% -os sikerarányt. Habár, ezek a műtétek ma már többnyire sikeresek és szövődmény nélküliek, még mindig vannak olyan esetek, ahol az iszkémia-reperfúziós károsodás miatt kialakult elégtelen mikrocirkuláció részleges lebenyelhalást eredményez, és a beteg reoperációját teszi szükségessé.

Annak ellenére, hogy számos gyógyszer és módszer kísérletileg ígéretesnek bizonyult, a klinikai gyakorlatban a mai napig sincs egy általánosan elfogadott eljárás, melynek háttérében a szisztémás mellékhatások, a túlzott toxicitás, a korlátozott hatékonyság, az invazív beadás vagy az időigényes technika áll.

A trimetazidin (TMZ, vízben oldható formája: trimetazidin-dihidroklorid) világszerte alkalmazott anti-anginás gyógyszer. Hatékony anti-iszkémiás szer és szabad gyökfogó. Számos kísérletben használták már különböző szervek (szívizom, bél, máj és vese) védelmére az iszkémia-reperfúziós károsodással szemben. Többen igazolták, hogy a reperfúziós károsodást az állatokon végzett TMZ-prekondicionálással lehet csökkenteni. Ennek háttérében valószínűleg szerepet játszik, hogy a TMZ megőrzi az ATP termelést, részt vesz a sejtek homeosztázisának fenntartásában és csökkenti az intracelluláris acidózist. Ezenkívül csökkenti a mitokondriumok oxidatív károsodását és megvédi a szervet az iszkémia-reperfúzió indukálta szövetkárosodástól.

A korábbi tanulmányok alapján úgy gondoljuk, hogy a TMZ egyszeri beadása is védelmet nyújt az iszkémia-reperfúziós károsodások ellen bőrlebenyek esetén is. A vizsgálat célja a trimetazidin oxidatív stresszre, gyulladásra és hisztopatológiai elváltozásokra gyakorolt hatásának vizsgálata (látható elváltozások (pl. szöveti nekrozis) megjelenése előtt), bőrlebenyekben. A TMZ hatékonyságának megítéléséhez a malondialdehid (MDA), a redukált glutation (GSH), a plazma tiolcsoport (SH-) és a szövet TNF-alfa szintjét mértük, valamint szövettani és immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztük.

4.2 ANYAG ÉS MÓDSZER

4.2.1 Állatmodell

Vizsgálatunkban negyven hím Wistar patkányt használtunk, akik ugyanolyan korúak és 350-400 g tömegűek voltak. A patkányokat különálló ketrecekben tartottuk, standard körülmények között (hőmérséklet: 25 ± 2 ° C, levegővel szűrt szoba), 12/12 órás, világos-sötét szabályozást alkalmazva.

Táplálásuk ad libitum standard patkánykeverékkel és vízzel történt. Az állatok 12 órával a műtétet megelőzően táplálékot már nem kaptak. A vizsgálatokat a PTE-ÁOK Sebészeti OKtató és Kutató Intézetében végeztük az állatkísérletek etikai szabályainak betartásával (Engedélyszám: ZOHU0104L 16).

4.2.2 Kísérleti protokoll

Az állatokat véletlenszerűen négy csoportba osztottuk (10 patkány minden csoportban). Az első csoport a nem iszkémiás kontrollcsoport volt. A többi csoportban (2-4. Csoport) iszkémiát indukáltunk az a. és v. epigastrica superficialisra helyezett mikroklipp segítségével. A második csoportban (I / R) az erek 6 órán keresztül voltak leklippelve, amit egy 24 órás reperfüzió követett. A harmadik (Preisch.TMZ + I / R) és negyedik (I / R + Postisch.TMZ) csoportok a trimetazidin kezelt csoportok voltak. A harmadik csoportban a TMZ-t 30 perccel az iszkémiás periódus előtt adtuk be. Az utolsó csoportban az állatok a reperfüzió kezdetén kapták a gyógyszert. Kezelt csoportok esetén a gyógyszer (trimetazidin-dihidroklorid, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) beadása 10 mg/kg-os dózisban intraperitoneálisan (ip) történt, a csoportoktól függően, 30 perccel az iszkémia előtt adva (Preisch.TMZ + I / R) vagy a reperfüzió kezdetén alkalmazva (I / R + Postisch.TMZ). A hatóanyagot közvetlenül az alkalmazás előtt oldottuk fel 0,9% -os nátrium-klorid-oldatban.

4.2.3 Sebészi beavatkozás

Az állatok altatását intraperitoneálisan adott ketamin (5mg/ 100g) és diazepam (0,5mg/100g) 1:1 arányú keverékével végeztük. A hasi lebenyeknek megfelelő területet szörtelenítettük és betadinnal lemostuk. Ezután 3x6 cm-es lebenyeket képeztünk a has mindkét oldalán. Vizsgálatunkban epigasztrikus bőrlebenyekkel dolgoztunk, melyek határait felül a bordaív, alul a ligamentum inguinale, lateralra mindkét oldali hónaljvonal alkotta. A medialis határt a középvonali struktúráktól (a xiphoid és a pubis) 3-3 mm-re húztuk meg. A lebeny vérellátását az a. és v. epigastriális superficialis medialis és lateralis ágai biztosították. A 6 órás iszkémiás periódust követően a mikrovaszkuláris klippeket eltávolítottuk, majd, az áramlás helyreállítását az artériás pulzus tapintásával, a lebeny színével és vaszkuláris átjárhatósági tesztekkel vizsgáltuk. Azokat az állatokat, ahol a lebenyekben áramlást nem észleltünk, kizártuk a vizsgálatból. A véráramlás ellenőrzése után a bőrt egyszerű csomós öltésekkel zártuk (5-0, Prolene® (Ethicon), 30 öltés mindkét lebenyben). A műtétet követően az állatok nyakmervítőt kaptak, az automutiláció megelőzése céljából. A következő napon, a mintavétel előtt az állatokat újra elaltattuk. Biokémiai és hisztopatológiai vizsgálatok céljából a 24 órás reperfüziós periódust követően a lebeny disztális területéről bőrmintákat (3x1 cm) vettünk, melyek egy részét azonnal – 80 ° C-ra tettük, a másik részét pedig formaldehidbe helyeztük későbbi szövettani vizsgálat céljából.

4.2.4 Biokémiai vizsgálat

MDA, GSH, SH szinteket a vérből mértük. Az MDA a membrán lipid peroxidációjának meghatározására szolgáló marker, melynek szintjét Placer, Cushman és Johnson fotometriai módszerével detektáltuk. A

GSH és a plazma SH szinteket antikoagulált teljes vérből Ellman-reagenssel határoztuk meg Sedlak és Lindsay protokollja alapján. Mindkettő paraméter a szervezet antioxidáns állapotát jelzi.

A TNF-alfa szintek méréséhez a mintákat a lebony centrális részéről vettük. A szöveti TNF- α szint meghatározása ELISA kit segítségével történt (Rat TNF- α ELSIA kit, Abcam, Cambridge, UK), követve a gyártó utasításait.

4.2.5 Hisztopatológiai vizsgálat

A minták kórszövettani vizsgálatát minden esetben ugyanaz a patológus végezte. A szövetmintákat 4% semleges puffertolt formaldehid oldatban fixáltuk, és paraffinba ágyztuk. Majd a 3 mikron vastagságú (Microtome: Thermo Scientific Microm Hm 325) szövettani minták hematoxilin-eozinnal (HE) történő festését követően, a polimorfonukleáris és mono-nukleáris reaktív sejtek arányát fénymikroszkóp alatt vizsgáltuk. Az apoptózis kimutatására TUNEL-festés is történt.

4.2.6 Hemorrheológiai vizsgálat

4.2.6.1 Vörösvérsejt deformabilitás

Vizsgálatunkban a vvt deformabilitást, mely a mikrocirkuláció egyik fontos tényezője, LORCA ektacitóméterrel határoztuk meg 37 °C-on, mely segítségével az adott nyírófeszültséghez tartozó elongációs index (EI) határozható meg. A deformabilitás értékeket a Lineweaver-Burke féle nemlineáris regresszió alapuló egyenlettel elemeztük, és ennek segítségével kiszámoltuk a maximális EI-t (végtelen nyírófeszültséghez tartozó EI) valamint azt a nyírófeszültséget, ami ezen érték feléhez tartozik (SS1/2). A mérésekhez a vért egy magas viszkozitású (32,6 mPas) polivinilpirrolidon oldatba szuszpendáltuk fel.

A vérvételek laterális farokvénákból történtek, és a hemorrheológiai vizsgálatokat altatásban végeztük el közvetlenül a műtét előtt, valamint az első, a negyedik és a hetedik műtét utáni napon.

4.2.7 Statisztikai analízis

A csoportok varianciája közötti eltéréseket one-way ANOVA analízissel vizsgáltuk, majd szignifikáns eltérés esetén a többszörös összehasonlítások érdekében megfelelő post-hoc tesztek (Dunnett, Sidak) végeztünk. Minden értéket az átlag \pm SEM-mel fejeztünk ki. A különbséget statisztikailag szignifikánsnak tekintettük, ha a p érték kisebb volt, mint 0,05.

4.3 EREDMÉNYEK

4.3.1 Oxidatív stressz paraméterek változása

4.3.1.1 Malondiadehid

Az iszkémia előtt és után adott TMZ hatására az MDA szintek jelentősen csökkentek az I/R-s csoportban mért szinthez képest, ugyanakkor szignifikáns eltérést csak abban a csoportban láttunk, ahol a TMZ-t

iszkémia előtt adtuk. A kezelt csoportok eredményei közel azonosak voltak a kontroll csoportban mért értékekkel.

4.3.1.2 Redukált Glutation

A GSH szintek jelentősen csökkentek minden csoportban a kontrollhoz képest. Szignifikánsan magasabb GSH szinteket mértünk viszont mindkét TMZ kezelt csoportban az I/R-s csoporthoz képest.

4.3.1.3 Szulfhidril csoport

Szignifikáns eltérést nem találtunk az egyes csoportok között.

4.3.1.4 TNF-alfa szint változás (bőrmintákból)

Összehasonlítva a kontrollcsoporttal, a Preisk.TMZ + I/R-s csoport kivételével, az összes csoportban szignifikánsan magasabb TNF-alfa értékeket mértünk. A kezelt csoportokban a TNF- α szintek jelentős csökkenését figyeltük meg, összehasonlítva az I/R csoporttal.

4.3.2 Hisztopatológiai vizsgálat eredményei

4.3.2.1 Hematoxylin-eosin festés

A hisztopatológiai leletek megegyeznek a biokémiai eredményekkel. Mindegyik szövetmintában négy zónát tudunk elkülöníteni. A kontrollcsoportban az alapvető szöveti struktúrák megtartottak, ödéma, anekrózis vagy a jelentős gyulladás nem volt detektálható. Az I/R-s csoportban számos elváltozás észlelhető: szubkután (zsíros) és a szubmuszkuláris zónában ödéma látszott, ezenkívül az izom alatt számos polimorfonukleáris (PMN) sejtet tudunk kimutatni. Az izomrostok duzzadtak és szabálytalan alakúak voltak. Mindkét TMZ-vel kezelt csoportban szignifikánsan kevesebb szövetelváltozást tapasztaltunk, mint az I / R csoportban. Az izomrostok megközelítőleg normál alakúak voltak, a különböző zónákban ödéma és PMN-sejtek nem vagy csak alig voltak kimutathatóak.

4.3.2.2 TUNEL-festés

A gyógyszer jótékony hatását a TUNEL festés is alátámasztotta. A módszerrel a TUNEL-pozitív sejtmagok barna színnel festődnek. A kontroll csoportban a pozitív sejtek előfordulása fiziológiás, mivel csak a szőrtüszőben voltak kimutathatók, és mivel ezek holokrin mirigyek, itt az apoptózis normális jelenség. Az I/R csoportban a lebeny mind a négy zónájában sok apoptotikus sejtet tudunk kimutatni. Ez megerősíti, hogy az I / R elősegíti az apoptózis létrejöttét. A bőrlebenyek TMZ kezelése egyértelműen csökkentette az apoptotikus sejtek mennyiségét. Az epidermális dermális zónán kívül, ahol az apoptotikus sejtek fiziológiásan is jelen lehetnek, a kezelt csoportokban a pozitív sejtek száma lényegesen kevesebb volt az I/R-s csoporthoz képest.

4.3.3 Hemoreológiai eredmények

A vörösvérsejtek deformabilitását vizsgálva azt láttuk, hogy a műtét előtti és a 7. posztoperatív nap eredményei szinte nem különböztek egymástól; a nyírófeszültségek értékei a legtöbb esetben átfedést mutattak. Azonban az első és főleg a 4. posztoperatív napon a vörösvértetek deformálódási értékei kimutathatóan romlottak, főleg az I/R-s csoportban.

4.4 DISZKUSSZIÓ

A mikrovaszkuláris technikával történő szabadlebeny átültetés egy általánosan elfogadott, népszerű eljárás a test bármely részén kialakult defektus helyreállítására. Azonban ilyen esetekben az iszkémia-reperfúziós károsodás súlyos problémákat okozhat a mikrocirkulációban, és ez a páciens fokozott morbiditását eredményezheti és a kórházi tartózkodási idő elhúzódsához vezethet. Az iszkémiás periódus alatt bekövetkező intracelluláris biokémiai változások celluláris diszfunkciót, celluláris és intersticiális ödémát okozhatnak, és végül sejthalálhoz vezethetnek. E változások súlyossága az iszkémiás időtartam hosszától függ, hiszen jól ismert, hogy a rövid iszkémiás periódusok alkalmazása egy hosszabb iszkémia bekövetkezése előtt, védelmet nyújthat a negatív elváltozásokkal szemben. A reperfúzió során reaktív oxigén származékok képződnek, ide értve az oxigénionokat, szabad gyököket és peroxidokat, amelyek mindegyike súlyosbítja az iszkémia-reperfúziós károsodást, illetve hatással vannak a vörösvértetek mikro-reológiai paramétereire, és a véráramlás jelentős zavarát okozhatják. Az I / R patogenezésében a gyulladás kialakulásának is jelentős szerepe van.

Vizsgálatunkban a Murray és Strauch által kidolgozott epigasztriális szuperficiális modellt alkalmaztuk. Ebben az esetben a lebenyek négy jól elkülöníthető zónát tartalmaznak: az epidermális dermális zónát, a subcutan adiposus zónát, egy izmot tartalmazó zónát (panniculus carnosus) és a szubmuszkuláris zónát. A lebeny vérellátását az a. és v. epigastrica superficialis biztosítja. Ellentmondások, vannak azzal kapcsolatban, hogy a mikroklippek hova érdemes felhelyezni, használhatók egyidőben az artérián és a vénán, vagy külön-külön a vénán vagy az artérián, attól függően, hogy milyen klinikai gyakorlatban előforduló szituáció szimulációja a cél. Mivel az artéria és a véna egyidejű leklippelése nagyobb mértékű iszkémia-reperfúziós károsodással jár, és azt a klinikai szituációt ami szabadlebeny átültetéskor létrejön is jobban szemlélteti, ezért mi ezt a lehetőséget választottuk. A lebenyeket bilaterálisan hoztuk létre, melyek mérete 6,0 x 3,0 cm volt.

Az iszkémiás idő hosszát a szakirodalom alapján választottuk ki; Çetin és mtsai. a 6 és 10 órás iszkémiás időtartamot említik meg elegendőnek ahhoz, hogy egységesen kialakuljanak a biokémiai, szövettani és makroszkópos elváltozások.

A TMZ hatékony anti-iszkémiás gyógyszer, amely csökkenti a zsírsav oxidációját és stimulálja a glükóz felhasználást, a mitokondriális hosszú szénláncú 3 ketoacil-CoA tioláz gátlásán keresztül, ami kevesebb oxigén felhasználásával vezet adenosin-trifoszfát (ATP) termeléshez. Limitálja az intracelluláris acidózis mértékét, csökkenti a sejten belüli nátrium- és kalcium-felhalmozódását, sejt iszkémia során gátolja a kálium kóros extracelluláris kiszivárgását, és csökkenti a szabad gyökök által okozott citolízist és

membrán-károsodást. Ezenkívül a TMZ megőrzi a mitokondriális funkciót és az energiatranszportot, és képes meggátolni a trombocita adhéziós-aggregációs folyamatokat és a neutrofil infiltrációt is.

Korábban már vizsgálták a TMZ hatását a bőrlebenyek túlélése kapcsán, és a hatóanyag hatékonynak bizonyult. Nieto és mtsai. különböző farmakológiai hatóanyagokat vizsgáltak patkány bőrlebenyek túlélésének javítása céljából. Minden kezelt csoport szignifikánsan nagyobb lebenytúlélést mutatott, mint a kontrolles csoport. A legjobb eredményeket ott mutatták ki, ahol az állatok trimetazidint vagy hidralazint kaptak. Kara és mtsai. a trimetazidin, patkánybőr szigetlebenyek túlélésének javításában betöltött szerepét vizsgálták. Összehasonlították a gyógyszer pre-iszkémiás és poszt-iszkémiás hatását, és mindkét módszer hatékonynak bizonyult a lebeny túlélésének javításában.

Azonban ez az első olyan vizsgálat, ahol bőrlebenyekben, a látható szöveti elváltozások kialakulása előtt, a szövettani és biokémiai változások vizsgálata történt pre-és a posztiszkémiásan adott TMZ-kezelést követően. Biokémiai analízis során a vér MDA, GSH és SH-szintjeit és a szöveti TNF- α szinteket értékeltük. Az MDA a többszörösen telítetlen lipidperoxidáció stabil végterméke, amely a szabadgyökök károsító hatására keletkezik. A GSH az egyik fő endogén antioxidáns, amelyet a sejtek termelnek és ami közvetlenül részt vesz a szabadgyökök és a reaktív oxigénvegyületek semlegesítésében. A szervezetben levő fehérjék -SH szintjei az antioxidáns státuszról nyújtanak információt. A TNF- α egy polipeptid vegyület, mely fontos tagja a citokin családnak és jelentős szerepet játszik a szisztémás gyulladásos válasz szabályozásában.

Az iszkémia-reperfúzió a mikro-reológiai paramétereket, például a vörösvértestek deformabilitását is befolyásolja. A vörösvértestek deformabilitása a sejtek kulcsfontosságú képessége, mely révén a sejtek áthaladnak a kapilláris rendszeren, ami elengedhetetlen a megfelelő szöveti oxigenizációhoz. A deformabilitást a sejt belső viszkozitása, a membrán viszkoelaszticitása, a felület-térfogat arány és a vvt morfológiája határozza meg. A vörösvérsejt-deformabilitás változások, főleg az 1-4 posztoperatív napban, elsősorban a gyulladásos reakciókkal, a hemodinamikai változásokkal, a szabadgyökök és mediátorok indukciójával, az akut fázisreakciókkal és a koagulációs állapotban bekövetkező változásokkal hozhatók összefüggésbe. A reperfúzió korai óráiban az anyagcsere és a szabadgyökök által okozott változások a dominánsabb tényezők. Mindezek a tényezők tovább súlyosbíthatják a mikrovaszkuláris szöveti transzfer posztoperatív szövődeményeit. A patológiásan megváltozott vörösvérsejtek deformabilitása csökken és a kapillárisok elzáródáshoz valamint a szövetek csökkent oxigénellátáshoz vezethetnek. Valószínűsíthető, hogy a legtöbb ilyen reakció (metabolikus zavar és a szabadgyökök kialakulása) a 7. posztoperatív napra rendeződik; így ekkor már nem találtunk számottevő különbséget a kezdeti állapothoz képest.

A szakirodalomban ellentmondások vannak a TMZ beadási útvonalait és dózisát illetően. Korábbi vizsgálatok alapján kísérletünkben mi a TMZ-t 10 mg/ttkg dózisban használtuk, és a hatóanyagot intraperitoneálisan adtuk be. A szer beadásának idejére is különböző adatokat lehet találni a szakirodalomban: Khan és munkatársai szerint például a TMZ kardioprotektív (a p38 mitogén aktivált protein kináz és Akt jelátviteli út aktiválása révén), ha a reperfúziós periódus kezdetén adják be. Elimadi és mtsai a TMZ hatását máj iszkémia-reperfúziós sérülésekben vizsgálták, intramuszkuláris injekcióban beadott különböző dózisokkal (5 mg, 10 mg, 20 mg). Kimutatták, hogy az iszkémia létrehozását

megelőzően 7 napig 10 mg / kg / nap dózisban adott TMZ volt az optimális, amely mind a celluláris, mind a mitokondriális szinten maximális védőhatást eredményezett. Ezek a megfigyelt különbségek a vizsgálatok során használt különböző állatmodellek és eltérő I/R-s protokollok következményei lehetnek. További vizsgálatokra van szükség a TMZ optimális adagolásának és időtartamának meghatározására, valamint sebészeti alkalmazásának pontosabb megítélésére

4.5 KONKLÚZIÓ

Az I/R káros hatása a bőrlebenszövetekben makroszkóposan látható elváltozások (pl. szöveti nekrozis) nélkül is előfordulhat, ami később szövődmények kialakulásához is vezethet. Eredményeink alapján elmondható, hogy a TMZ védelmet nyújt az I/R-s sérülés ellen, és alkalmas a gyulladásos válasz csökkentésére is. A TMZ függetlenül a beadás idejétől, hatásosnak bizonyult: a preiszkémias és a posztiskémias TMZ-kezelés között nincs egyértelmű különbség. A posztiskémiasan adott TMZ jótékony hatása különösen fontos lehet, mivel megvédi a szöveteket az iszkémia-reperfúziós sérülésektől, egy váratlan iszkémias periódust követően is. Ezenkívül a TMZ egy klinikailag alkalmazott, nem-toxikus szer, amely növelheti a szövetek iszkémias toleranciáját, és ígéretes szer lehet, hogy csökkentse az I/R negatív következményeit a sebészeti gyakorlatban szabadlebenszövet átültetés, replantáció vagy akár revascularisációs eljárások során is.

5 TRIMETAZIDIN ISZKÉMIA REPERFÚZIÓS KÁROSODÁS CSÖKKENTŐ HATÁSÁNAK ÖSSZEHASONLÍTÓ VIZSGÁLATA AZ ISZKÉMIÁS PRE- ÉS POSZTKONDITIONÁLÁSSAL, PATKÁNY VÉKONYBÉLLEN

5.1 BEVEZETÉS

A szabad jejunum lebenyeket gyakran használják nyelőcsőrakok reszekcióját követő helyreállításoknál. Fő előnyei közé tartozik: a nyelőcsőhöz hasonló csöves szerkezet, a rendelkezésre álló hosszúság, a nyáktermelés, funkcionális gasztrointetinalis szövődmények hiánya a bélszakasz eltávolítása után, a nyelőcsőhöz hasonló perisztaltikus aktivitás és a viszonylag egyszerű preoperatív előkészítés. A nyelőcső mellett a jejunum lebeny hüvelyi rekonstrukcióra is alkalmas például veleszületett hüvely hiány esetén vagy daganatok műtéti reszekcióját követően. Ezekben az esetekben a jejunum használata elsődleges választás más bélszakaszokkal ellentétben, különösen azért, mert kevesebb defekációs problémát okoz. A jejunum lebenyek használata azonban kihívást jelent a szövet iszkémia iránti érzékenysége és az operációval kapcsolatos egyéb technikai lépések miatt. A lebeny műtétek során, a jejunum megfelelő szegmensét eltávolítják, ami a revaszkularizációig meleg iszkémiás periódusnak van kitéve. Bár a rövid iszkémia idők minimális károsodással járnak, a meleg iszkémia által okozott sérülések még a revaszkularizáció után is súlyosbodhatnak. Az I/R indukált szöveti sérülések különböző szövődményekhez vezethetnek, mint például a szegmentális szűkület, fistula kialakulása, perisztaltika zavara, az anasztomózis szivárgása és a részleges vagy teljes lebenyelhalás. A javasolt stratégiák / módszerek ellenére még mindig nincs egy általánosan elfogadott, klinikai gyakorlatban is használható módszer, ami megoldást nyújthatna erre a problémára.

Bizonyított, hogy az iszkémiás prekoncionálás (IPreC) védelmet nyújt a véráramlás csökkenésével szemben és képes a globális iszkémiának kitétt szövetek életképességét javítani. Az IPreC alatt rövid iszkémiás-reperfúziós periódusokat alkalmazunk, ami növeli a szövet iszkémiás toleranciáját így protektív szerepe van egy későbbi hosszantartó iszkémia káros hatásaival szemben. Először Murry és mtsai. írták le a módszert myocardium esetén, azóta kimutatták, hogy számos iszkémiának kitétt lebeny típusban is képes a túlélést javítani. Az IPreC mellett az iszkémiás posztkoncionálás (IPostC) is ugyanolyan hatásosnak bizonyult különböző szervek, szövetek életképességének javításában hosszantartó iszkémiát követően mint az IPreC. Ennek a módszernek a fő előnye továbbá, hogy egy váratlan iszkémiás eseményt követően is alkalmazható és lehetőséget nyújt a sérülés mértékének csökkentésére.

Célunk a TMZ-vel végzett kémiai pre- és posztkoncionálás gyulladáscsökkentő és oxidatív stresszre kifejtett hatásának összehasonlítása az iszkémiás pre- és posztkoncionálással patkány vékonybél esetén. Ezenkívül a két módszer, tehát a TMZ + IPreC vagy TMZ + IPostC, együttes hatásának vizsgálata, szintén kísérletünk célját képezte.

5.2 ANYAG ÉS MÓDSZER

5.2.1 Kísérleti protokoll

A kísérlet első részében (A) az IPreC és a TMZ-vel végzett prekondicionálás hatásait hasonlítottuk össze. Az állatokat véletlenszerűen öt csoportba osztottuk (10 patkány minden csoportban). Az első csoport (1. csoport) a non-iszkémiás kontrollcsoport volt. Ebben a csoportban iszkémiát nem hoztunk létre, de laparotomiát itt is végeztünk. A többi csoportban (2-5. Csoport) iszkémiát hoztunk létre, azáltal, hogy az a. mesenterica superior (SMA) mikroklippel leklippeltük. A második csoportban (I/R) az SMA-t 40 percre szorítottuk le, ezt pedig 1 órás reperfúziós periódus követte. A harmadik (Preisch.TMZ + I/R) csoport a trimetazidin kezelt csoport volt. Ebben a csoportban a TMZ-t 30 perccel az iszkémiás periódus előtt adtuk be. A 4. csoportban (IPreC + I / R, 4. csoport) iszkémiás prekondicionálást alkalmaztunk: 2x5 percig (2 ciklus, 5 perces ischaemia, majd 5 perces reperfúzió). Az utolsó csoportban (TMZ, IPreC + I/R) 30 perccel az iszkémia létrehozása előtt az állatok TMZ-t kaptak, majd közvetlenül az iszkémiás periódus előtt iszkémiás prekondicionálást is elvégeztük a fent leírt módon.

A vizsgálat második részében (B) az IPostC és a TMZ-vel végzett kémiai posztkondicionálás hatását hasonlítottuk össze egymással és értékeltük azt is, hogy a két módszert együtt alkalmazva kialakul-e additív hatás. Csoportonként itt is 10 állattal dolgoztunk. 1. csoport (non-iszkémiás kontroll) és a 2. csoport (I / R) az A részben leírt csoportokkal azonos volt. Különbség a többi csoport között volt: a 3. csoport (I / R + TMZ) a TMZ-kezelt csoport volt, de ebben az esetben a reperfúzió kezdetén használtuk a szert. A negyedik csoportban (I / R + IPostC) iszkémiás posztkondicionálást végeztünk 3x30 sec (3 ciklus 30 másodperces reperfúzió, majd 30 másodperces iszkémia) ciklusban. Az utolsó csoportban (I / R + TMZ, IPostC) az állatok a reperfúzió megindításakor kaptak TMZ-t is és IPostC-t is elvégeztük.

Az állatok a TMZ kezelt csoportokban 10 mg / kg trimetazidint (trimetazidin-dihidroklorid, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) kaptak intravénásan a v. jugularison keresztül. A hatóanyagot a beadás előtt frissen oldottuk fel 0,9% -os nátrium-klorid-oldatban.

5.2.2 Sebészi beavatkozás

Az állatokat intraperitoneálisan adott ketamin és diazepam 1:1 arányú keverékével altattuk, majd a has alapos betadinos lemosását követően laparotomiát végeztünk. Ezután felkerestük az a. mesenterica superior és ellátuk a kollaterális ágakat, ahogy azt Megison és mtsai. korábban leírták. Majd a kontroll csoport kivételével, minden csoportban iszkémiát hoztunk létre azáltal, hogy leklippeltük az a. mesenterialis superior 40 percre. A különböző csoportokban TMZ-t, iszkémiás pre- vagy posztkondicionálást vagy a kettő módszer kombinációját alkalmaztuk. Az iszkémiás periódus alatt a beleket visszahelyeztük a hasüregbe, és a bőrmetszést néhány öltéssel ideiglenesen zártuk. 40 perces iszkémia után

a klippet eltávolítottuk, és a véráramlás visszatérését vizsgáltuk az arteriás pulzus tapintásával, megfigyelésével, a jejunum színével és vascularis átjárhatósági tesztekkel. A jejunomot 60 percig reperfúzióztuk, majd ennek a végén az érintett szakaszon egy körülbelül 10 cm-es jejunumszegmenst (15 cm-re az ileocecalis billentyűtől) távolítottunk el. Az eltávolított jejunomot fiziológias sóval átmostuk, majd a mintát 2 részre osztottuk. Az egyik szakaszt formaldehidbe helyeztük későbbi szövettani vizsgálat

céljából, a másik részt azonnal folyékony nitrogénnel lefagyasztottuk és a minta feldolgozásáig -80 °C-on tároltuk.

5.2.3 Biokémiai vizsgálat

Az MDA, GSH, SOD és SH-szinteket a szérumból mértük. Az MDA szinteket Placer, Cushman és Johnson fotometriai módszerével detektáltuk. A GSH és a plazma SH szinteket antikuagulált teljes vérből Ellman-reagenssel határoztuk meg Sedlak és Lindsay módszerével.

A szérum szuperoxid-diszmutáz enzim (SOD) aktivitásának mérésére az OxiSelect™ Superoxide Dismutase Activity Assay-t használtuk a gyártó protokollját követve. (Cell Biolabs Inc., STA-340)

A gyulladáshoz köthető citokinek közül a TNF- α és IL-6 szinteket mértük ELISA kit segítségével. (Assay Rat TNF- α ELISA kit #AB46070, Assay Rat IL-6 ELISA kit, #AB119548, Abcam, Cambridge, UK)

5.2.4 Hisztopatológiai vizsgálat

Három mikron vastagságú (Microtome: Thermo Scientific Microm Hm, 325) szövettani metszeteket, hematoxylin-eosin (HE) festést követően fénymikroszkóp alatt vizsgáltuk, figyelve az intesztinális mucosa sérülést, gyulladást, nekrozist vagy ulcerációt jelenlétét. A nyálkahártya károsodást 0 és 5 között értékeltük, Chiu és munkatársai által meghatározott szövettani score felhasználásának segítségével.

Ezalapján: grade 0: Normális villusok

grade 1: Subepithelialis Gruenhagen tér kialakulása a bélbolygó csúcsi részén

grade 2: Az epithelialis réteg közepes fokú emelkedése a csúcsi részen / Subepithelialis úr kiszélesedése

grade 3: Az epithelialis réteg masszív emelkedése, már a villusok oldalsó részén is

grade 4: Denudált villusok és kitgult kapillárisok/ sejtdús lamina propria

grade 5: Lamina propria dezintegrációja/ Hemorrágia, ulceráció

Az apoptotikus sejtek detektálására a TUNEL festést is végeztük.

5.2.5 Statisztikai analízis

A csoportok varianciája közötti eltéréseket one-way ANOVA analízissel vizsgáltuk, majd szignifikáns eltérés esetén a többszörös összehasonlítások érdekében megfelelő post-hoc tesztek (Dunnnett, Sidak) végeztünk. Minden értéket az átlag \pm SEM-mel fejeztünk ki. A különbséget statisztikailag szignifikánsnak tekintettük, ha a p érték kisebb volt, mint 0,05.

5.3 EREDMÉNYEK

5.3.1 TMZ és IPreC összehasonlító vizsgálatának biokémiai eredményei

Redukált glutátion (GSH) és malondialdehid (MDA)

A GSH szintje szignifikánsan alacsonyabb volt minden csoportban összehasonlítva a kontroll csoporttal. Az I/R csoporthoz képest szignifikánsan magasabb értékeket figyeltünk meg minden kezelt csoportban ($p < 0,0001$ minden esetben).

Az MDA szintek szignifikánsan magasabbak voltak minden csoportban a kontrollcsoporthoz képest, legmagasabb szintet az I/R csoportban mértük. A különböző kezelt csoportok egymással való összehasonlításából látható, hogy azokban a csoportokban, ahol TMZ kezelést alkalmaztunk (csak önmagában vagy IPreC-vel együtt), az MDA szintek szignifikánsan alacsonyabbak voltak, mint az IPreC csoportban.

Szulfhidril csoportok és szuperoxid dizmutáz enzim aktivitás

Az SH-szintek minden csoportban csökkentek a kontrollhoz képest. Azokban a csoportokban, ahol a TMZ-t alkalmaztuk, az SH- szintek szignifikánsan magasabbak voltak, mint az I/R csoportban. Továbbá, az IPreC-t csoportban jelentősen alacsonyabb SH-szinteket mértünk, mint az iszkémia előtti TMZ kezelésben részesült csoportban.

A SOD enzim aktivitása szintén magasabb volt minden kezelt csoportban az I/R csoporthoz képest, bár az IPreC csoport értékei kevésbé voltak emelkedettek, mint a TMZ-kezelt csoportoké. A legjobb eredmény abban a csoportban volt, ahol a TMZ-t és az IPreC-t együttesen alkalmaztuk.

Mindkét megállapítás támogatja korábbi eredményeinket, miszerint a TMZ-nek erősebb antioxidáns tulajdonsága van, mint az IPreC-nak.

Gyulladásos citokinek: TNF-alfa; IL-6

A TNF-alfa szintek mindegyik csoportban emelkedtek a kontrollhoz képest. Az I / R csoporthoz viszonyítva szignifikánsan kisebb értékeket mértünk minden kezelt csoportban ($p < 0,0001$ minden esetben). A kezelt csoportok között jelentős eltérést csak az IPreC és a TMZ + IPreC csoportok között mértünk, utóbbiban előnyösebb eredményekkel ($p = 0,0387$).

Az IL-6 eredményei hasonlóak voltak a TNF-alfa mérésekhez, azzal a kivétellel, hogy az utolsó csoportban (kombináltan kezelt) nem volt szignifikáns emelkedés a kontrollhoz képest. A kezelt csoportok között nem figyeltünk meg szignifikáns eltéréseket, azonban az I/R csoport eredményeihez képest az összes kezelés jelentősen csökkentette az IL-6 szinteket.

Az összes általunk használt kezelés bizonyos mértékű gyulladáscsökkentő tulajdonságokkal rendelkezik, de a leghatékonyabbnak a TMZ + IPreC kombinációs kezelése tűnik.

5.3.2 TMZ ÉS IPostC összehasonlító vizsgálatának biokémiai eredményei

Redukált glutation és malondialdehid

A GSH szintek, összehasonlítva a kontroll csoporttal, szignifikánsan alacsonyabbak voltak minden csoportban, kivéve az utolsóban. Az I/R csoporthoz képest szignifikánsan magasabb értékeket mértünk az összes kezelt csoportban. A legjobb eredményeket az utolsó csoportban figyeltük meg, ahol TMZ-t és IPostC-t is alkalmaztunk.

Az MDA szintek mindegyik csoportban jelentősen magasabbak voltak a kontroll csoporthoz képest, legmagasabb az I/R csoportban volt. A különböző kezelt csoportokat egymással összehasonlítva, a legjobb eredményt az utolsó, kombináltan kezelt csoportban láttuk, ahol az MDA szintek szignifikánsan alacsonyabbak voltak, mint a másik két kezelt csoportban

Ezek az eredmények megerősítik alkalmazott módszerek antioxidáns hatását, és azt sugallják, hogy a TMZ képes javítani az IPostC hatását, és a legjobb eredmények akkor várhatóak, amikor a két módszert együttesen alkalmazzuk.

Szulfhidril csoportok és szuperoxid dizmutáz enzim aktivitás

Az SH-szintek minden csoportban alacsonyabbak voltak mint a kontrollban. Azokban a csoportokban, ahol beadtuk a TMZ-t, az SH- szintek szignifikánsan magasabbak voltak, mint az I/R csoportban. Továbbá, az IPostC csoportban az SH-szintek jelentősen alacsonyabbak voltak azokhoz a csoportokhoz képest, amelyek a TMZ-t kaptak.

A SOD enzim aktivitás szignifikánsan alacsonyabb volt minden csoportban a kontrollhoz képest, és szignifikánsan magasabb volt az összes kezelt csoportban az I/R csoporthoz képest ($p < 0,0001$ minden csoportban), bár az IPostC-csoport értékei alacsonyabbak voltak, mint a TMZ kezelt csoportoké. A legjobb eredmény abban a csoportban volt, ahol a TMZ és az IPostC is alkalmazásra került.

Mindkét megállapítás azt támasztja alá, hogy a TMZ-nek erősebb antioxidáns tulajdonsága van, mint az IPostC, azonban a TMZ és az IPostC kombinációja szolgáltatta a legjobb eredményeket.

Gyulladásos citokinek: TNF-alfa; IL-6

A TNF-alfa szintek mindegyik csoportban emelkedtek a kontrollhoz képest. Az I/R csoporthoz viszonyítva szignifikánsan kisebb értékeket mértünk minden kezelt csoportban ($p < 0,0001$ minden esetben). Jelentős különbségeket mértünk a TMZ-kezelt csoportok és az IPostC csoport között is.

Az IL-6 eredményei hasonlóak voltak a TNF-alfa eredményeihez az I/R csoporthoz képest. A kezelt csoportok között szignifikáns különbséget csak a reperfüzió kezdetén adott TMZ és az IPostC csoport között lehetett kimutatni.

Mindegyik átalunk használt kezelés bizonyos mértékig gyulladásgátló tulajdonságokkal rendelkezik, de a TMZ önmagában alkalmazva vagy az IPostC-sal kombinációban hatékonyabbnak tűnik, mint maga az IPostC.

5.3.3 Hisztopatológiai eredmények

5.3.3.1 Hematoxylin-eosin festés

A bélnyálkahártya-sérülés (gyulladás, nekrózis, fekély) meghatározásához hematoxylin-eosin (HE) festés történt. A hisztopatológiai értékeléshez Chiu-osztályozó rendszerét használtuk, amely 6 fokozatot különböztet meg egymástól, 0-tól 5-ig.

Vizsgálatunkban a nem kezelt iszkémia-reperfüziós csoport (I / R) a 4. és 5. fokozat között helyezkedett el, denudált villusokkal és a lamina propria dezintegrációjával. A TMZ beadása az iszkémia előtt hatékonyabb volt, mint a gyógyszer alkalmazása a reperfüziós periódus kezdetén. Hisztopatológiai eredményeink alapján az IPreC hatékonyabb, mint az IPostC, és hatékonysága hasonló a reperfüzió kezdetén alkalmazott TMZ kezeléshez. A kórszövettani eredmények alapján a legjobb eredmény ott volt, ahol a TMZ-t és az IPostC-t is használtuk. Továbbá megfigyelhető, hogy a TMZ az IPostC hatását jobban felerősíti mint az IPreC-sét.

5.3.3.2 TUNEL-festés

A kontroll csoportban a barna festődésű, apoptózisra pozitív sejtek alig láthatóak a kriptákban. Azonban a kontrollcsoporthoz képest az I/R csoportban, a pozitív sejtek mennyisége szignifikánsan magasabb volt. A kezelt csoportokon belül a kezelések hatékonysága alapján megfigyelhető egy tendencia: a legrosszabb eredményeket az IPostC csoportban kaptuk, ezt követi az IPreC, az iszkémia előtt adott TMZ, a reperfüzió kezdetén alkalmazott TMZ, a kombinált. TMZ + IPreC csoport és végül a TMZ + IPostC kezelt csoport. Ugyanaz a patológus, aki elvégezte a TUNEL-festést értékelte az eredményeket az alapján, hogy 8 kriptát alapul véve (egy reprezentatív területről) mennyi volt a pozitív sejtek száma. A hasonló kezelt csoportok (pl. IPreC-IPostC; TMZ iszkémia előtt adva-TMZ reperfüzió kezdetén alkalmazva, TMZ + IPreC-TMZ + IPostC) nem mutattak jelentős különbségeket. Mindazonáltal a pozitív sejtek számának csökkenése szignifikáns volt a kombináltan kezelt csoportok (TMZ + IPreC, TMZ + IPostC) és az iszkémiás pre- vagy posztkoncionált csoportok között. A kezelt csoportokban a pozitív sejtek száma jelentősen alacsonyabb volt, mint az I/R csoportban, azonban a legjelentősebb csökkenést a kombinált kezelt csoportokban figyeltük meg.

5.4 DISZKUSSZIÓ

A jejunum az egyik leggyakrabban használt szabadlebenszövet a fej-nyak régióban, a garat és a cervicalis nyelőcső helyreállításában, de emellett alkalmas a hüvely rekonstrukciójára is. A jejunum azonban az egyik legérzékenyebb szövet az iszkémia-reperfüziós károsodásokra a testben, ezért a lebeszél átültetés sikerét nagymértékben befolyásolja a vékonybél érzékenysége az iszkémia-reperfüziós károsodásokkal szemben. A jejunum-lebeszél ezen tulajdonsága egy jelentős stresszor a sebészek számára műtét során (anasztomózis) és a posztoperatív fázisban is. Az iszkémiás sérülést az egyik legfontosabb etiológiai

tényezőként tartják számon a posztoperatív szövődmények kialakulásában, mint például a fistula képződés vagy a stenosis előfordulása.

Szabad jejunum lebeny átültetés során elkerülhetetlen az iszkémiás periódus, amely az ezt követő reperfüzióval súlyos nyálkahártya-sérülésekhez vezethet. A szerkezeti károsodást mikroszkóposan már néhány perccel az iszkémiás inzultus megjelenése után meg lehet állapítani. A gyors pusztulás hátterében zajló mechanizmusok még nem teljesen egyértelműek, bár valószínűleg szerepet játszik benne a savak által kiváltott lizoszómális membrán diszrupció, a sejt energia raktárainak csökkenése és a toxikus metabolitok akkumulációja. Az iszkémiás szövetek reperfüziója során bekövetkező hirtelen oxigénbeáramlás fokozza az oxigén szabad gyökök képződését, az apoptózist és a gyulladásos mediátorok termelődését. A gyulladásos válasz magában foglalja az endotheliális sejtek adhéziós molekuláinak fokozott expresszióját, a komplement aktivációt, az endothel-barrier diszfunkciót, a leukociták és makrofágok fokozott toborzását, a nukleáris transzkripciós factor κ B aktiválását és a pro-inflammatorikus citokinek (TNF-alfa, IL-1, IL-6 és IL-8) következményes overexpresszióját. Az iszkémia-reperfüziós károsodás által okozott gyulladás a vékonybél nyálkahártyáján fokozott enterocita apoptosist, bélboly ulcerációt valamint fokozott leukocita és trombocita adhéziót eredményezhet, ami a mikrocirkuláció károsodásához vezethet.

Számos állatkísérletből származó adat igazolja az iszkémiás pre- és poszt-kondicionálás használatának biztonságosságát és hatásosságát. A két módszerben közös, hogy rövid szubletális I/R ciklusokat alkalmazva a hosszabb iszkémiát megelőzően vagy közvetlenül utána, védelmet nyújtanak, azáltal hogy a szövetek iszkémiás tűrőképességét növelik a károsodással szemben. Számos vizsgálat igazolta a két módszer hatásosságát különböző szervek és szövetek, például a szívizom, az agy, a máj, a vesék, a jejunum, a bőr és izomlebenyek iszkémiás toleranciájának növelésére.

A trimetazidin (TMZ), a 1- (2,3,4-trimetoxi-benzil) -piperazin-dihidroklorid egy hatékony, jól tolerálható gyógyszer, amelyet főként angina pectorisban alkalmaznak. A TMZ-kezelés kedvező hatása iszkémiás szívbetegségben és szívelégtelenségben szenvedő betegeknél jól dokumentált, és a gyógyszer iszkémiás, gyulladáscsökkentő hatásait más iszkémiás szervekben is leírták.

A szövetkárosodás és az oxidatív stressz szintjének meghatározásához a következő paramétereket mértük: MDA, GSH, SH, SOD. A gyulladásos válasz megítélése céljából az IL-6 és a TNF- α szinteket detektáltuk. Minden kezelt csoportban, különösen ahol a TMZ-t alkalmaztuk csökkent oxidatív stresszt észleltünk az MDA kisebb mértékű emelkedésével ($p < 0,05$) és az antioxidáns rendszerek (SOD, GSH, SH) kisebb mértékű csökkenésével.

A jelenlegi vizsgálat azt is kimutatta, hogy az I/R gyulladásos választ indukált, amelyet a proinflammatorikus citokinek szintjének, köztük a TNF- α , IL-6, szignifikáns emelkedése igazolt. Különböző kezeléseink képesek voltak csökkenteni a gyulladás mértékét.

Szövetani vizsgálataink során Chiu és munkatársai által kidolgozott pontozási rendszert használtuk, amely leírja a bélben kialakult iszkémia-reperfüziós károsodáshoz kapcsolódó morfológiai változásokat és nyálkahártya-károsodásokat. A hematoxin-eozin festést követően csoportokban TUNEL-festést alkalmaztunk. Ez a módszer képes megállapítani az apoptózis szintjét. Esetünkben a leginkább érintett terület az I/R csoportban volt, ahol a legmagasabb volt az apoptotikus sejtek száma. A legjobb

eredményeket a kontrollcsoportban találtuk, azonban a TMZ + IPreC és a TMZ + IPostC eredményei közel azonosak voltak a kontroll csoportéval.

Korábban Tetik és mtsai. szintén vizsgálták a TMZ citoprotektív hatását patkánybél iszkémia-reperfúziós sérüléseivel szemben. Intravénásan 3 mg / kg TMZ-t adtak be 10 perccel az iszkémia kiváltása előtt. Az iszkémiás periódus 60 perc volt, amelyet 120 perces reperfúzió követett. Ebben a vizsgálatban csak az MDA mérését, a myeloperoxidáz szintek értékelését, és a HE-festést végezték el. Eredményeik szerint a TMZ előkezelés a lipid peroxidáció és a neutrophil infiltráció gátlásával csökkentette, de nem akadályozta meg az I/R által okozott szöveti károsodást. Szemben ezzel a vizsgálattal, mi csak 40 perc iszkémiát alkalmaztunk, amit 60 perces reperfúzió követett és a TMZ dózisa a mi esetünkben 10 mg / kg volt a korábbi vizsgálatokra alapozva. A 40 perces iszkémiás időt azért választottuk, mivel transzplantációs modellben patkány vékonybél esetén ezt határozták meg kritikus idő határnak, annak ellenére is, hogy a károsodás már az iszkémia első 15 percén belül jelentkezik. Érdekes módon a reperfúzió során a vékonybél képes önjavító mechanizmusokat indítani, így az előző nyálkahártya-károsodás eltűnik, ha a reperfúziós periódus elég hosszú. Ezért csak 60 perces reperfúziós időt használtunk a vizsgálatban.

Egy másik tanulmányban Yalcin és mtsai. a trimetazidin hatását égés indukálta bélnyálkahártya-sérülés és vese károsodás kapcsán vizsgálta patkányokban. 3mg / kg dózisú TMZ-t használtak, és azt találták, hogy a TMZ csökkentette a mieloperoxidáz (MPO) szinteket, de nem volt hatása a GSH / GSSG és az MDA szintekre. Az MDA- és GSH-szintek eltérő eredményeinek magyarázata vizsgálatunk és az általuk végzett vizsgálat között, az lehet, hogy a gyógyszert eltérő dózisban alkalmaztuk, illetve a létrehozott iszkémia súlyossága is különböző lehetett. Kísérleteink során használt iszkémiás pre- és poszt-kondicionálás hosszát korábbi vizsgálatok alapján választottuk ki, melyek szerint az iszkémiás előkezelés legoptimálisabb időtartama a bélben 2 x 5 perc volt, és az iszkémiás poszt-kondicionálás esetében a legjobb eredményt pedig 3 x 30 másodperces ciklusok alkalmazásával lehetett elérni.

Vizsgálataink alapján a TMZ-kezelés ígéretesnek tűnik, és hasznos gyógyszer lehet a szabad jejunum lebonyolódás során, vagy minden olyan esetben, ahol a bél I/R sérülése merül fel. Kétségtelen, hogy további vizsgálatokra van szükség ahhoz, hogy megtaláljuk a gyógyszer alkalmazásának optimális körülményeit a humán műtétek során is.

5.5 KONKLÚZIÓ

Mindegyik kondicionáló eljárás önmagában vagy kombinációban csökkentette az oxidatív stressz és a gyulladás mértékét, valamint javította a szövettani megjelenést. Azonban, eredményeink alapján a TMZ-nel végzett farmakológiai pre-kondicionálás /poszt-kondicionálás hatékonyabbnak bizonyult a jejunumban, mint az iszkémiás pre- vagy poszt-kondicionálás. Ezenkívül a TMZ képes volt növelni mindkét előbb említett módszer hatékonyságát is. Következtetésként a TMZ ígéretes gyógyszer lehet a szövetek iszkémiás toleranciájának növelésére, és fontos szerepet tölthet be nemcsak a kardiológiában, hanem a sebészet területein is.

6 ÚJ EREDMÉNYEK

1.) **Első kísérletünkben** a BFSP1 fehérje szerepét vizsgáltuk humán emlődaganatokban.

Eredményeink alapján ezek a következtetések vonhatók le:

- a. A BFSP1 nem csak a szemlencsében, hanem ex vivo humán emlődaganat sejtjeiben is expresszálódik.
- b. A tumormintákban és a szérumban ugyanaz a BFSP1 fehérje mutatható ki.
- c. Különbség van a BFSP1 tartalomban attól függően, hogy a szövetminták a tumorból vagy tumormentes területről származnak.
- d. A BFSP1 fehérje új diagnosztikai marker lehet az emlődaganatok (hisztopatológiai típus: karcinóma ductális infiltránok) esetében és jelentős szerepet tölthet be a későbbiekben a diagnózis felállításában illetve a betegek műtét utáni nyomon követésében is.

2.) A **második és a harmadik vizsgálatban** igazoltuk a trimetazidin (TMZ) iszkémia-reperfúziós károsodással szembeni hatását bőrlebeny és vékonybél esetén is. Ezen kísérletek alapján megállapíthatjuk, hogy:

- a. Az iszkémia-reperfúzió káros hatása a lebenyekben makroszkóposan látható elváltozások nélkül is előfordulhat.
- b. A TMZ képes csökkenteni az oxidatív stressz paraméterek (MDA, GSH, SH-, SOD) szintjét és a gyulladási válasz (TNF-alfa, IL-6, szövettan) mértékét.
- c. A TMZ csökkentheti az apoptotikus sejtek mennyiségét.
- d. Az iszkémia előtt illetve után adott TMZ kezelések között nincs egyértelmű különbség, azonban mindkettő hatékony módszernek bizonyult az iszkémiás tolerancia növelésére bőrlebenyek disztális területein.
- e. Ugyanaz a TMZ-dózis (10 mg / kg), amelyet bőrlebenyekben használtunk, hatásos volt a jejunumban is.
- f. A TMZ önmagában hatékonyabb (függetlenül az adagolás idejétől) mint önmagában az iszkémiás pre (IPreC) vagy poszt-kondicionálás (IPostC).
- g. A TMZ képes az iszkémiás pre- és poszt-kondicionálás anti-iszkémiás hatásának javítására. Ez a hatás erősebb, ha a TMZ-t az iszkémiás poszt-kondicionálással alkalmazzuk együtt.

7 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megragadni a lehetőséget, hogy köszönetet mondjak témavezetőimnek, Dr. Jancsó Gábornak és Dr. Takács Ildikónak a sok segítségért és támogatásért amit munkám során nyújtottak. Továbbá kiemelten szeretném megköszönni Dr. Nagy Tibor segítségét, aki szintén nagy mértékben hozzájárult ahhoz, hogy ez a dolgozat elkészülhessen. Köszönöm a segítséget kollégáimnak Dr. Hardi Péternek, Dr. Lantos Jánosnak és a Sebészeti Oktató és Kutató Intézet valamennyi munkatársának: Pázmándy Ágnesnek, Jakabovics Adriennnek, Átol Erikának, Mák Gábornak, Buza Nikolettnek.

Hálás vagyok Dr. Pavlovics Gábornak és Dr. Tizedes Györgynek. a szakmai támogatásért. Köszönettel tartozom Dr. Tapodi Antalnak, Dr. Kálmán Endrének és Dr. Kovács Gyulának a közös munkáért és a sok segítségéért.

A hemoreológiai vizsgálatok kivitelezésében köszönöm a segítséget Dr. Kenyeres Péternek és Dr. Praksch Dórának.

Végül szeretnék köszönetet mondani a szüleimnek és a családomnak a türelmükért, szeretetükért, és támogatásukért.

Ez a munka nem jöhetett volna létre az "EFOP 3.6.1-16-2016-00004" által nyújtott pénzügyi támogatás nélkül.

8 PUBLIKÁCIÓS LISTA

8.1 TÉMÁHOZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK

- **Petrovics L**, Nagy T, Hardi P, Bognar L, Pavlovics G, Tizedes Gy, Takacs I, Jancso G: The effect of trimetazidine in reducing the ischemia-reperfusion injury in rat epigastric skin flaps. CLINICAL HEMORHEOLOGY AND MICROCIRCULATION &: p. &. (2018) **(IF (2018): 1,914)**
- Nagy T, Hardi P, Takacs I, Toth M, **Petrovics L**, Jancso G, Sinay L, Fazekas G, Pinter O, Arato E: Pentoxifylline attenuates the local and systemic inflammatory response after infrarenal abdominal aortic ischemia-reperfusion. CLINICAL HEMORHEOLOGY AND MICROCIRCULATION 65:(3) pp. 229-240. (2017) **(IF (2017): 1,679)**

8.2 TÉMÁHOZ KAPCSOLÓDÓ PREZENTÁCIÓK

- **L. Petrovics**, I. Takacs, G. Jancso, T. Nagy, P. Hardi, F. Németh, Z. Trojnar, L. Bognar, P. Varga, B. Gasz, G. Pavlovics: Comparison the effect of chemical preconditioning with ischemic preconditioning, in reducing the ischemia-reperfusion injury in rat small intestine; **53rd Congress of the European Society for Surgical Research (ESSR 2018), Madrid, Spain; 05.30-06.02.2018. (Poster section 1. price)**
- G. Jancso, I. Takacs, P. Hardi, B. Gasz, T. Nagy, L. Bognar, **L. Petrovics**, P. Varga, E. Arato, L. Sinay: Ischemic postconditioning decreased inflammatory response and oxidative stress in reperfusion injury evoked by aorto-bifemoral bypass surgery. **53rd Congress of the European Society for Surgical Research (ESSR 2018) Madrid, Spain; 05.30-06.02.2018 (Poster)**
- **Petrovics Laura**, Nagy Tibor, Hardi Péter, Németh Franciska, Trojnar Zoltán, Takács Ildikó, Pavlovics Gábor, Jancsó Gábor: Iszkémia-reperfúziós károsodások csökkentése ismert anti-iszkémiás szerrel, patkány bőrlebenyekben, A Magyar Sebész Társaság Kísérletes Sebészeti Szekciójának XXIV. Kongresszusa, Herceghalom, 2017. szeptember.29
- **L. Petrovics**, F. Németh, Z. Trojnar, T. Nagy, P. Hardi, G. Pavlovics, I. Takács, G. Jancsó Ischaemia-Reperfusion Injury Is Reduced by an Anti-Ischaemic Agent in Skin Flaps, **52nd Congress of the European Society for Surgical Research (ESSR 2017), Amsterdam, The Netherlands; June 2017** Eur Surg Res 2017;58(suppl 2):1–69 51 DOI: 10.1159/000479831 Published online: September 21, 2017
- Németh F, **Petrovics L.**: The role of trimetazidine in reducing ischemia-reperfusion injury in rat epigastric skin flap model, HMAA, Balatonfüred, 2017. augusztus 25-26
- Németh F., Trojnar Z, **Petrovics L.**: Trimetazidin szerepe az iszkémia-reperfúziós károsodások csökkentésében, patkány bőrlebenyek esetén, Grastyán Konferencia, Pécs, 2017.03.29-31