

**Gyógyszeres és sebészi beavatkozások iszkémia-reperfúziós károsodásokra gyakorolt
hatásának vizsgálata kétoldali akut végtag iszkémia állatmodellen**

Ph.D. Tézis

Dr. Nagy Tibor

Doktori Iskola vezetője:	Prof. Dr. Kovács L. Gábor
Programvezető:	Dr. Jancsó Gábor
Témavezető:	Dr. Arató Endre



Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar
Sebészeti Oktató és Kutató Intézet

Pécs, 2015

1. Bevezetés

A kardiovaszkuláris betegségekben szenvedő betegek jelentős hányadában a revaszkularizációs műtét az egyetlen lehetőség a normál funkció helyreállítására, azonban a reperfüzió pillanatában fellépő volumen és nyomásterhelés, oxidatív stressz és a kialakuló reperfüziós károsodás gyakran szövődmények kialakulásához vezet. Az érsebészeti kórképek közül az akut végtagszékémia súlyos, potenciálisan életet veszélyeztető kórállapot. Ebben az állapotban feltétlenül szükséges a gyors revaszkularizáció. Az akut iszkémia időtartama is fontos tényező, mivel a keringés helyreállítását követően mindig kell számolnunk különböző mértékű reperfüziós károsodással. A reperfüziós károsodás súlyossága az iszkémiás időtől, az iszkémiás szövet mennyiségétől és az érintett szövet kollaterális keringésétől függ. A sebészeti kutatásokban valós klinikai jelentősége van a reperfüziós károsodás kialakításában résztvevő jelátviteli utak felderítésének és az ezekben történő beavatkozásnak. [1, 2, 3] Az oxigén eredetű szabadgyökök reperfüziós károsodásban betöltött szerepe jól ismert, így ezek termelésének csökkentése, vagy eliminációjuk gyorsítása nagyon fontos. Az endogén antioxidáns védelem első vonalába a kataláz, szuperoxid dizmutáz (SOD), glutation peroxidáz és repair enzimek tartoznak, azonban a közelmúltban a kutatások fókuszába- egyéb antioxidáns enzimek mellett- a glutation S-transzferáz (GST) került. A reperfüziós károsodás a szövetek iszkémiát követő vérkeringés-helyreállításra adott összetett válasza, mely mechanikai-, extra-, és intracelluláris folyamatokat foglal magában. Ezek a folyamatok a reperfüzió első pillanataiban indulnak és potenciálisan napokig tarthatnak. A reperfüziós károsodás patogenezisének modern hipotézisét Piper és munkatársai fogalmazták meg. [4] Az akut verőér elzáródásban szenvedő betegek esetében széleskörűen elfogadott tény, hogy az elzáródott ér periodikus újramegnyitása és elzárása következtében csökken a nekrosis kiterjedése, valamint csökken a rövid és hosszútávú mortalitás. A szöveti iszkémia-reperfüzió különböző típusú sejthalálhoz vezethet, úgy, mint apoptózis és nekrosis. [5]

A szívizom iszkémia-reperfüziós károsodásokkal szembeni védelmére az iszkémiás poszt-kondicionálás egy jól ismert módszer. [6] Az iszkémiás poszt-kondicionálás koncepcióját elsőként Vinten-Johansen munkacsoportja fogalmazta meg. [7] Általánosságban elmondható, hogy az iszkémiás poszt-kondicionálás a koronária-áramlás intermittáló megszakítása a reperfüziós fázis legelején, mely a reperfüziós károsodások elleni védelem kialakításához vezet. Az alkalmazott iszkémiás poszt-kondicionálás protokolljának kiadologozása, finomhangolása a korai poszt-kondicionálással foglalkozó kutatások fő célkitűzése volt.

A glutationS-transzferázok (GST) az endogén antioxidáns enzimrendszer tagjai. A GST-k 3 nagy fehérjecsaldót alkotnak úgy, mint citoszolikus, mitokondriális és

mikroszómális transzferázok, amelyek közül a citoszólikus család a legnagyobb. [8] A közelmúlt publikációiban megfogalmazták, hogy ezek az enzimek katalizálják a redukált glutation (GSH) elektrofil komponensekkel történő konjugációját, így részt vesznek a különböző endogén- és exogén ágensek detoxifikálásában. [9, 10] A GST-k néhány izoenzimeről bizonyítást nyert, hogy részt vesznek különböző sejt-túlélést és sejt-halált irányító jelátviteli utak szabályozásában is. Ebben a nem enzimatis folyamatban a GST szerepe, hogy a mitogén aktivált protein kinázt (MAPK) egy fehérjekomplexben tartsa, így megelőzve a MAPK hatásait további célmolekulákon. [11]

Az etakrinsav (EA) egy a klinikumban használatos diuretikum, mely emellett potens GST-gátló hatással is rendelkezik. Több ponton és több mechanizmussal is képes gátolni a GST-k működését. [12]

A peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor-gamma (PPARG) a nukleáris receptor-szupercsalád tagja. A PPAR-ok ligand-függő transzkripciós faktorok, melyek a szabályozandó gén enhancer régiójának specifikus peroxiszóma proliferátor reszponzív elementjeihez kötődnek. [13] Részt vesznek a zsírsejt differenciáció irányításában, az inzulin- szenzitivitás és gyulladós folyamatok szabályozásában, [14, 15] valamint az NF- κ B-függő gyulladós gének transzkripciójának gátlása révén down-regulálják a makrofágok proinflammatorikus mediátor-termelését. [16, 17, 18] Szintetikus PPARG agonisták (PPARGA) a nem-inzulinfüggő diabetes mellitus kezelésében használt orális antidiabetikumok egy csoportja is. [19] Újkeletű evidenciaként tartjuk számon, hogy a PPARG aktiváció képes szabályozni a gyulladós válaszreakciókat, receptor-függő transzrepresszió révén képes számos proinflammatorikus molekula expresszióját gátolni. [20] Ezen folyamatok mellett a PPARG agonisták iszkémia-reperfúziós károsodásokkal szembeni jótékony hatásáról több közlés is született a bél, [21, 22, 23] tüdő, [24] szív, [25, 26, 27] vese [28] és agy [29, 30] tekintetében.

A pentoxifyllin (PTX) egy nem specifikus foszfodiészteráz-gátló, mely régóta használatos a klaudikáció intermittens kezelésére alsó végtagi verőérbetegeken. [31] Hemoreológiai hatásai révén képes a vörösvérsejtek konformációját megváltoztatni, ezáltal növelni a mikrocirkulációs vérátáramlást krónikus artériás elégtelenség esetén. Újabban a PTX alkalmazása kibővült, képes a gyulladós válaszreakció csökkentésére. A PTX-el foglalkozó kutatások napjainkban erre az anti-inflammatorikus hatásra fókuszálnak.

2. Célkitűzés

Az első kísérletben kétoldali alsó végtagi akut iszkémiát hoztunk létre az infrarenális hasi aorta kirekesztésével, majd reperfúzió történt. A kísérletben vizsgáltuk a GST EA-val történő gátlásának iszkémia-reperfúziós károsodásokra, valamint az iszkémiás posztkondicionálás védő hatására gyakorolt befolyását. Meghatároztuk a kialakuló oxidatív stressz és gyulladáshoz vezető válasz mértékét, továbbá az izomszövet strukturális változásait. Vizsgálatok történtek továbbá különböző pro- és antiapoptotikus jelátviteli utak irányában.

A második kísérletsorozat célkitűzése volt, hogy megvizsgáljuk egy PPARGA hatását alsó végtagi akut iszkémia állatmodellünkön. Két nagy vizsgálatot végeztünk, hatás-idő és dóziszvizsgálatokat annak feltérképezése érdekében, hogy a szert mely időpontban és mely dózisban alkalmazzuk a legkedvezőbb hatás elérése érdekében. Vizsgáltuk az oxidatív stressz paramétereit (MDA, GSH, -SH, SOD), valamint PCR analízissel detektáltuk a SOD-mRNS és a PPARG-mRNS expressziós mintázatát. Az érintett izmok strukturális vizsgálatára szövettani metszeteket készítettünk.

A harmadik kísérletben a foszfodiészteráz-gátló PTX hatásait vizsgáltuk infrarenális aorta elzáródást és reperfúziót követően. Hypotézisünk szerint a „single-shot”, emelt dózisú PTX alkalmazása képes csökkenteni az iszkémia-reperfúziós károsodásokat, valamint a helyi és szisztémás gyulladáshoz vezető válasz nagyságát. Vizsgálataink során meghatároztuk az oxidatív stressz paramétereit (MDA, GSH, -SH, SOD), valamint a gyulladáshoz vezető válasz mértékét (TNF-alfa, IL-6).

3. Anyagok és módszerek

3.1. Állatmodell

200-250 g közötti hím Wistar patkányokon végeztük a kísérleteket, melyeket Charles River Breeding Laboratories-től szereztünk be. Az állatokat egyéni ketrecekben hőmérséklet- és fényszabályozott, légkondicionált teremben tartottuk, ahol szabadon juthattak folyadékhoz és táplálékhoz. A tápot 12 órával a vizsgálatok előtt megvontuk az állatoktól.

3.2. Aorta iszkémia-reperfúziós modell

Az állatok anesztéziája intraperitoneálisan adott ketamin (500 mg / 10 ml) és diazepam (10 mg / 2 ml) 1:1 (0,2 ml / 100 g = 5 mg ketamin + 0,5 mg diazepam / 100 g) arányú keverékével történt. EKG-t helyeztünk fel, valamint a karotisz artériát kanüláltuk (22 gauge) a vérnyomás monitorozása céljából. A bőrt fertőtlenítettük, majd medián laparotomiát végeztünk. 2 ml meleg fiz. sóoldatot injektáltunk a hasüregbe a folyadékkegyensúly fenntartása érdekében. A v.

mesenterica inferiort kanüláltuk a gyógyszerbeadás, vérvételek és a folyadékpótlás céljából. A bélkacsokat balra eltartva kipreparáltuk a hasi aorta infrarenalis szakaszát, majd az aortára mikrovaszkuláris érleszorítót helyeztünk fel 60 percre. A hasüreget ezután reverzibilisen zártuk és meleg fiz. sóoldatos törlőt helyeztünk a sebre. Az iszkémiás idő elteltével megnyitottuk a hasüreget és a mikrovaszkuláris érfogót eltávolítottuk az aortáról, majd a kísérlettől függően 60 vagy 120 perces reperfúziós fázis következett.

3.3. Az etakrinsav adagolása

Az etakrinsav dózisát a humán diuretikus dóziséból számoltuk, mely 8,6 mg/ttkg. Az oldatot 24, illetve 1 órával a beavatkozások előtt, intraperitonealisan adagoltuk az állatoknak. A GST-gátlás hatékonyságának igazolására GST-alfa ELISA vizsgálat történt.

3.4. A PPARGA adagolása

A PPARGA oldatot a kísérletnek megfelelő koncentrációkban (10, 50, 100, 500 μ M) injektáltuk a v. mesenterica superiorba, a kísérlet alapján különböző időpontokban (20, 40, 60 perccel a reperfúziót megelőzően).

3.5. A PTX adagolása

Irodalmi adatokra támaszkodva 50 mg/kg dózisban határoztuk meg a PTX adagolását. Intravénásan (VMS) 30 perccel a reperfúziót megelőzően injektáltuk a szert.

3.6. Az iszkémiás posztkondicionálás protokollja

Az iszkémiás posztkondicionálást a reperfúziós fázis legelején 4 fázisban végeztük 15 másodperc reperfúzió- 15 másodperc reokklúzió alkalmazásával.

3.7. Vizsgálati csoportok

I. Az állatokat 6 csoportba osztottuk (10 állat/csoport). A kontroll csoportban csak medián laparotomia történt, ezen felül 20 %-os etanol oldatot kaptak az állatok az etakrinsavas oldat koncentrációjában és dózisában 24, illetve 1 órával a kísérletek előtt (control). A második csoportban 60 perces infrarenális aorta leszorítás és 120 perc reperfúzió történt (IR). Az állatok a harmadik csoportban az iszkémia-reperfúzió mellett posztkondicionáláson estek át (PC). A negyedik, ötödik, hatodik csoport állatai az első három csoportnak megfelelő beavatkozásokon estek át, azzal a különbséggel, hogy GST-gátlóetakrinsav kezelésben is részesültek (EA-control, IR/EA, PC/EA). Az állatoktól a kísérlet

végén vérmintát gyűjtöttünk, valamint szövettani mintavétel történt az iszkémia által érintett izomból.

II. Hatás-idő vizsgálat

Az állatokat 5 csoportba rendeztük. Az első csoport állatai 60 perc aorta iszkémián és 60 perc reperfúzió estek át PPARGA kezelés nélkül (operált, kezeletlen kontroll). A további négy csoport állatai az iszkémia-reperfúzió mellett PPARGA kezelésben is részesültek (100 μ M) rendre 0, 20, 40, 60 perccel a reperfúziót megelőzően.

II. Dózisvizsgálat

Az állatokat 5 csoportba rendeztük. Az első csoport állatai 60 perc aorta iszkémián és 60 perc reperfúzió estek át PPARGA kezelés nélkül (operált, kezeletlen kontroll). A további négy csoport állatai az iszkémia-reperfúzió mellett 20 perccel a reperfúziót megelőzően PPARGA kezelésben is részesültek, rendre 10, 50, 100, 500 μ M koncentrációban.

Egy további dózisvizsgálatban az állatokat 5 csoportba rendeztük. Az első csoport állatai 60 perc aorta iszkémián és 60 perc reperfúzió estek át PPARGA kezelés nélkül (operált, kezeletlen kontroll). A további négy csoport állatai az iszkémia-reperfúzió mellett 40 perccel a reperfúziót megelőzően PPARGA kezelésben is részesültek, rendre 10, 50, 100, 500 μ M koncentrációban.

III. Az állatokat 5 csoportba osztottuk. A kontroll csoport állatai medián laparotomián estek át további beavatkozás nélkül, majd 3 óra elteltével termináltuk őket (control). A második csoportban 60 perces infrarenális aorta leszorítás és 120 perc reperfúzió történt (IR). Az állatok a harmadik csoportban az iszkémia-reperfúzió mellett poszt kondicionáláson estek át (IR + PC). A negyedik csoportban a 60 perces iszkémiás fázis 30. percében injektáltuk a pentoxifyllint, majd az iszkémiás fázist 120 perc reperfúzió követte (IR + PTX). Az ötödik csoportban az iszkémia-reperfúzió mellett PTX kezelés történt 30 perccel a reperfúziót megelőzően, majd iszkémiás poszt kondicionálást végeztünk a reperfúzió kezdetén (IR + PC + PTX).

3.8. Az oxidatív stressz paraméterek analízise

A malondialdehid (MDA) mérése: Az MDA a sejtmembránok lipid-peroxidációjának mértékét jelző marker. Az MDA meghatározása teljes, alvadásban gátolt vérből történik fotometriás módszerrel Placer, Cushman és Johnson nyomán. [32]

A redukált glutation (GSH) és plazma tiol-csoport (-SH) szintjének meghatározása: Teljes, EDTA-val alvadásgátolt vérből Ellman-reagens felhasználásával Sedlak és Lindsay protokollja alapján történt. [33]

A szuperoxid dizmutáz (SOD) enzimaktivitását Superoxide Dismutase Assay ELISA Kit-tel (Trevigen Inc., Gaithersburg, USA) végeztük a gyártó protokollja alapján. Ez a módszer a biológiailag aktív SOD meghatározására alkalmas.

3.9. RNS izolálás

Teljes RNS izolálást végeztünk veseszövetből TRI reagenssel (Sigma-Aldrich) a gyártó protokollját követve.

3.10. cDNS szintézis

Komplementer DNS-t szintetizáltunk az 5 µg DNÁ-zal kezelt teljes RNS-ből 20 µL mennyiség felhasználásával oligo(dT) primer és M-MuLV reverz transzkriptáz (Fermentas Revert Aid) alkalmazásával a gyártó protokollja alapján. A RT-ázt 70 °C-on 10-10 percig inaktiváltuk.

3.11. Szemi-kvantitatív reverz transzkripció PCR analízis

A szintetizált 10-szeresen hígított cDNS-ből 2 mikrolitert használtunk az amplifikációhoz, melyet 20 µL, 1 egység Taq DNS polimerázzal végeztünk 5 percig 95 °C-on, majd ezt követte 30 ciklus, mely 30 másodperc 94°C, majd 30 másodperc 60°C, 1 perc 72°C-ból állt. A folyamatot 72 °C, 5 perccel fejeztük be. 15 mikroliter PCR produktumot 1,2 %-os etídium bromidot tartalmazó agaróz géltre vittünk fel, majd szétválasztást követően előhívtuk.

3.12. Szérum TNF-alfa és IL-6 meghatározás

Szérum TNF-alfa és IL-6 meghatározás céljából Rat TNF-alfa és Rat IL-6 ELISA kitet használtunk (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA) a gyártó protokollját követve.

3.13. Szérum alfa-GST meghatározás

A GST-gátlás effektivitásának meghatározásához Rat GST-alpha ELISA kit-et (Abnova, Taipei City, Taiwan) használtunk a gyártó protokollját követve.

3.14. A proapoptotikus jelátviteli utak (JNK, p38) western blot vizsgálata

50 mg quadriceps femoris izmot homogenizáltunk jeges TRIS pufferben (50 mM, pH 8,0). A homogenizátum felülúszójának fehérjetartalmát bicinchoninic savval derítjük, hogy a

Laemmli oldat 1 mg/ml fehérjét tartalmazzon. A mintákat kétszeres koncentrációjú SDS-poliakrilamid gél-elektroforetikus pufferben tároljuk. A fehérjéket 12 %-os SDS poliakrilamid gélben futtatjuk és választjuk szét, majd nitrocellulóz membránra blottoljuk. Blokkolást követően egy éjszán át 4 °C-on az elsődleges antitesttel inkubáljuk a membránt (phospho-SAPK/JNK (Thr¹⁸³/Tyr¹⁸⁵, 1:1000 dilution; phospho-p38 MAPK (Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸², 1:1000 dilution), (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). A membránokat ezt követően hatszor 5 percig mossuk Tween-es TBS-ben, majd hozzáadjuk a tormaperoxidázzal jelölt másodlagos antitestet (1:3000 dilution; Bio-Rad, Budapest, Hungary). Ismét hatszor 5 percig mossuk a membránokat Tween-es TBS-ben, majd kemilumineszcens oldattal láthatóvá tesszük a blottot, majd Scion Image Beta 4.02 programmal kvantifikáljuk az eredményt.

3.15. Szövetten ivizsgálatok

A kísérlet végén terminált állatokból szövettani vizsgálat céljából mintát vettünk a végtagi izomzathól. A szövettani vizsgálatok célja a csoportok közti izomszövet-változások vizuális megjelenítése volt. Csoportonként 5-6 paraffinba ágyazott blokkot készítettünk, majd metszés után hematoxylin-eozin festést végeztünk.

3.16. Statisztikai analízis

Minden értéket átlag \pm SEM-mel fejeztünk ki. A csoportok varianciája közötti eltéréseket one-way ANOVA analízissel vizsgáltuk, majd szignifikáns eltérés esetén a többszörös összehasonlítások érdekében adekvát post-hoc tesztekkel végeztünk. Az eltéréseket szignifikánsnak tekintettük, ha a p kisebb volt, mint 0,05.

4.1. Eredmények-I

4.1.1. Plazma MDA szintek

Az MDA koncentrációja négy csoportban szignifikánsan magasabb volt a kontrollcsoporthoz viszonyítva (IR, PC, IR/EA, PC/EA). Eredményeink szignifikáns eltérést mutattak az EA-control és az IR/EA csoportok között. Az IR/EA csoportban szignifikánsan magasabb MDA szintet mértünk.

4.1.2. Redukált glutation szintek

A GSH koncentrációja négy csoportban szignifikánsan magasabb volt a kontrollcsoporthoz viszonyítva (IR, PC, IR/EA, PC/EA). A poszt kondicionált csoport értékei szignifikánsan magasabbnak adódtak, mint az IR csoport értékei, azonban ez a különbség EA adása esetén nem éri el a szignifikanciaszintet.

4.1.3. Plazma tiol csoportok

Csak az IR/EA csoportban találtunk szignifikánsan alacsonyabb –SH szinteket a kontrollcsoporthoz viszonyítva.

4.1.4. A SOD enzimaktivitása

Három vizsgált csoportban találtunk szignifikánsan alacsonyabb (IR, IR/EA, PC/EA), egy csoportban szignifikánsan magasabb (PC) értékeket a kontrollhoz viszonyítva. A PC csoportban szignifikánsan magasabb volt a SOD enzimaktivitása, mint az IR csoportban. A PC/EA csoportban szignifikánsan alacsonyabb volt a SOD enzimaktivitása, mint az EA nélküli PC csoportban.

4.1.5. Szérum TNF-alfa szintek

Szignifikánsan magasabb értékeket találtunk három csoportban (IR, IR/EA, PC/EA) a kontrollhoz viszonyítva. A poszt kondicionált csoportban nem találtunk a kontrollhoz viszonyítva szignifikáns emelkedést. Ez a poszt kondicionálás által kiváltott anti-inflammatorikus hatás EA együttes adása esetén nem látható.

4.1.6. Szérum IL-6

Szignifikánsan magasabb értékeket találtunk három csoportban (IR, IR/EA, PC/EA) a kontrollhoz viszonyítva. IR/EA csoportban szignifikánsan magasabb IL-6 szintet mértünk, mint az etakrinsav kezelésben nem részesülő IR csoportban. EA kezelés nélkül a

poszt kondicionálás szignifikánsan csökkenti az IL-6 szintet. A poszt kondicionálás nem tudta szignifikánsan mérsékelni az IL-6 emelkedését az PC/EA csoportban.

4.1.7. Szérum alfa-GST

A GST-gátlás effektívitasának bizonyítására GST-ELISA analízist végeztünk. A kontrollhoz viszonyítva szignifikánsan alacsonyabb értékeket mértünk az etakrinsavval kezelt csoportokban (EA-control, IR/EA, PC/EA). Az IR csoportban szignifikánsan emelkedett GST koncentrációt mértünk a PC és a control csoporthoz viszonyítva.

4.1.8. Proapoptikus jelátviteli utak (JNK, p38) western blot vizsgálata

Két proapoptikus jelátviteli fehérje vizsgálatát végeztük el (foszfo-JNK, foszfo-p38). Eredményeink azt mutatják, hogy mind a foszfo-JNK, mind a foszfo-p38 expressziója fokozott az EA kezelésen átesett csoportokban akár a kontroll, akár a PC, akár az IR csoporthoz viszonyítjuk.

4.1.9. Szöveti eredmények

Az IR csoportban az izomrostok kissé duzzadtak, az intersticiális tér mérete csökkent. Fokális nekrozisok láthatók az izomszövetben. A PC csoportban az izom struktúrája megtartott, minimális rostduzzadás megfigyelhető, de nekrozis nem látható. A legsúlyosabb kép az IR/EA csoport mintáiban látható. Az izomrostok dezorganizációja, intersticiális ödéma és nagyobb mértékű nekrozis figyelhető meg. A PC/EA csoportban szintén súlyos morfológiai változásokat látunk.

4.2. Eredmények-II

4.2.1. A hatás-idő vizsgálat eredményei

Az alkalmazott PPARGA kezelés hatékonyan csökkentette minden tesztelt időpontban az MDA szintjét. A GSH szintek emelkedtek a kontrollhoz képest, ha a PPARGA kezelés 40 vagy 60 perccel a reperfüziót megelőzően történt. A SOD enzimaktivitása a kontrollhoz viszonyítva minden tesztelt időpontban emelkedett.

4.2.2. A dóziszvizsgálat eredményei I.

Az alkalmazott PPARGA kezelés hatékonyan csökkentette az MDA szintjét mind a 10, 50, 100, 500 μ M-os koncentrációban. 100 és 500 μ M-os koncentrációban emelkedett SOD enzimaktivitást találtunk. 50, 100 és 500 μ M-os koncentrációban 20 perccel a reperfüziót

megelőzően adva csökkentette a GSH koncentrációt. A fenti eredmények tükrében elmondható, hogy a PPARGA kezelés hatékonyabban csökkenti az iszkémia-reperfúziós károsodások mértékét, ha több, mint 20 perccel a reperfúziót megelőzően alkalmazzuk.

4.2.3. A dóziszvizsgálat eredményei II.

Az alkalmazott PPARGA kezelés hatékonyan csökkentette az MDA szintjét 100 és 500 μM -os koncentrációban. 50, 100 és 500 μM -os koncentrációban a PPARGA képes volt emelni a GSH szinteket, továbbá 10, 100 és 500 μM -os koncentrációban megemelte a SOD enzimaktivitását is. A SOD génexpressziós mintája is korrelál a SOD enzimaktivitás értékeivel, így 40 perccel a reperfúziót megelőzően alkalmazva, emelkedett SOD mRNS szinteket mértünk, továbbá a PPARG mRNS expressziója is emelkedett.

4.2.4. Szövettani eredmények

Az iszkémia-reperfúziós csoportban enyhe izomrost károsodás észlelhető, a sejtvakulizáció és az extracelluláris ödémaképződés korai jelei figyelhetőek meg. A PPARGA kezelés érzékelhetően képes volt ezeket a strukturális károsodásokat enyhíteni, minimális extracelluláris ödémaképződés megfigyelhető, azonban a celluláris vakulizáció nem látható.

4.3. Eredmények-III

4.3.1. Plazma MDA szintek

A kontrollhoz viszonyítva valamennyi csoportban szignifikánsan emelkedett MDA szinteket mértünk (IR, IR+PC, IR+PTX, IR+PC+PTX). Az IR csoporthoz viszonyítva szignifikánsan alacsonyabb MDA szinteket mértünk az IR+PC, IR+PTX és az IR+PC+PTX csoportokban. Az IR+PC+PTX csoportban szignifikánsan alacsonyabb MDA szinteket mértünk, mint az IR+PTX csoportban.

4.3.2. Plazma GSH szintek

A kontrollhoz viszonyítva két csoportban találtunk szignifikánsan alacsonyabb koncentrációt (IR, IR+PTX). Szignifikánsan magasabb GSH szinteket találtunk az IR+PC, IR+PTX és az IR+PC+PTX csoportokban az IR csoporthoz viszonyítva.

4.3.3. Plazma tiol csoportok (-SH)

A kontrollhoz viszonyítva az IR csoportban találtunk szignifikánsan alacsonyabb koncentrációt.

4.3.4. SOD enzimaktivitás

Két vizsgált csoportban találtunk szignifikánsan emelkedett (IR+PC, IR+PC+PTX) és egy csoportban alacsonyabb (IR) SOD enzimaktivitást a kontrollhoz viszonyítva. Az IR+PC, IR+PTX és az IR+PC+PTX csoportban szignifikánsan emelkedett SOD enzimaktivitást mértünk az IR csoporthoz viszonyítva. Az IR+PC+PTX csoportban szignifikánsan magasabb SOD enzimaktivitást mértünk, mint az IR+PTX csoportban.

4.3.5. Szérum TNF-alfa szintek

Az IR csoportban szignifikánsan magasabb koncentrációt mértünk a kontrollhoz viszonyítva. Az IR+PC, IR+PTX és az IR+PC+PTX csoportban szignifikánsan alacsonyabb értékeket mértünk, mint az IR csoportban.

4.3.6. Szérum IL-6 szintek

Az IR csoportban szignifikánsan magasabb koncentrációt mértünk a kontrollhoz viszonyítva. Az IR+PTX, IR+PC és az IR+PC+PTX csoportban szignifikánsan alacsonyabb koncentrációkat mértünk, mint az IR csoportban.

5. Megbeszélés

I. Az iszkémia az intracelluláris ATP csökkenéséhez és a hypoxantin folyamatos emelkedéséhez vezet. A reperfüzió nagyon korai fázisában a molekuláris oxigén megjelenik a sejtben és a xantin-oxidáz által katalizált xypoxantin-xantin konverzió következtében óriási mennyiségű szuperoxid gyök keletkezik. A szuperoxid és más oxigén eredetű szabadgyökök lipidperoxidáción keresztül károsítják a membránlipideket, fehérjéket és a DNS-t. Az endogén antioxidáns enzimrendszer feladata, hogy ezekkel a károsító hatásokkal szemben megvédje a sejtet és a makromolekulákat. [4] Vizsgálataink kapcsán azt találtuk, hogy az iszkémia-reperfüzió növelte az oxidatív paraméterek plazmaszintjét, melyek tovább emelkedtek EA kezelés hatására. A poszt kondicionálás pozitív, védő hatásait megfigyeltük az oxidatív paraméterek vizsgálata kapcsán, azonban ez a védő hatás EA kezelés hatására eltűnik. [34]

Kísérletünk során azt találtuk, hogy az állatok EA-val történő kezelése markánsan emeli az oxidatív stressz paraméterek szintjét, továbbá növeli a proapoptotikus jelátviteli fehérjék expresszióját és foszforilációját. A reaktív oxigénszármazékok emelkedett szintje magyarázhatja a proapoptotikus jelátviteli fehérjék fokozott foszforilációját a GST-gátolt csoportokban iszkémia-reperfüzió és poszt kondicionálás kapcsán. [35]

A GST-k kapcsolatban állnak a MAPK-út tagjaival. Ezek az útvonalak jelentős szerepet játszanak a sejt túlélése-, illetve halála jelátviteli mechanizmusaiban. [36] A GST-pi bizonyult az első JNK-inhibitornak, mely direkt fehérje-fehérje kölcsönhatás révén fejt ki hatását. [37] A JNK egy proapoptotikus MAPK, mely fontos szerepet játszik bizonyos körülmények között- oxidatív stressz, nitrozatív stressz, stressz válasz, gyulladási válasz, apoptózis- a citotoxicitásban. [38, 39] Normál, stresszmentes állapotban a JNK katalitikus aktivitása a sejtben belül alacsony, mivel a GST-pi, JNK és a c-Jun egy fehérjekomplexet alkot. [10] Ettől eltérő körülmények esetén, mint amilyen az oxidatív stressz, a GST-pi-JNK komplex disszociál, így a szabadabbá váló JNK visszanyeri foszforilációs képességét, ezáltal szabadon képes a hatását további célgéneken kifejteni, melynek eredménye a sejt apoptózis-indukciója. [40] Ez magyarázhatja az általunk is megfigyelt JNK foszforilációban történő változást. Ezen túlmenően a JNK aktivációja létrejöhet a keletkező oxidánsok elnyújtott, lassú eliminációja miatt. Sun és munkatársai közleménye igazolta, hogy a poszt kondicionálás eredményeként csökken a keletkező oxidánsok mennyisége, s ezzel párhuzamosan csökken a JNK és a p38 MAPK-ok aktivációja és a következményes apoptózis-indukció. Ezzel azt is felvetik, hogy a MAPK jelátviteli utak modulációja befolyásolhatja a poszt kondicionálás által kiváltott védelmet. [41]

II. A második kísérletsorozatban természetes, nem szintetikus PPARGA-t alkalmaztunk. Vizsgálataink során azt találtuk, hogy a PPARGA kezelés képes volt csökkenteni az iszkémia-reperfúziós károsodások mértékét a szisztémás gyulladási válasz csökkentésén keresztül. A PPARG agonisták iszkémia-reperfúzióban kifejtett pozitív hatását közölték már vékonybélben, [21, 22, 23] tüdőn, [24] szíven, [25, 26, 27] vesén [28] és a közelmúltban agyon is. [29, 30]

A hatás-idő vizsgálatok kapcsán azt találtuk, hogy az MDA szintje csökkent, a GSH emelkedett, ha a PPARGA alkalmazása 40 vagy 60 perccel a reperfúzió előtt történt. A SOD enzimaktivitása -minden tesztelt időpontban adva a PPARGA-t- emelkedett.

Az első dóziszvizsgálat alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a PPARGA már 10 μM -os koncentrációban is potensen csökkentette az iszkémia-reperfúziós károsodások mértékét. 100 és 500 μM -os koncentrációban a SOD enzimaktivitását is képes volt fokozni. Mivel a GSH szintek csökkenését figyeltük meg, ha 20 perccel reperfúzió előtt alkalmaztuk a PPARGA-t, így a hatás-idő vizsgálattal konzisztensen kijelenthető, hogy hatásosabban csökkenti az iszkémia-reperfúziós károsodásokat, ha több, mint 20 perccel a reperfúzió előtt alkalmazzuk.

A második dóziszvizsgálat eredményei alapján kijelenthetjük, hogy a PPARGA 100 és 500 μM -os koncentrációban alkalmazva hatásosan csökkentette az MDA szintjét.

A reaktív oxigén eredetű szabadgyökök fő forrása a mitokondrium, ezen belül is a légzési lánc I-es és III-as komplexe. [42] Nemrégiben bizonyítást nyert, hogy a rosiglitazon és a pioglitazon képes gátolni a légzési lánc I-es [43] és III-as [44] komplex aktivitását. A PPARGA részlegesen szétkapcsolja a mitokondriális légzési láncot, ez érinti az elektrontranszportot és a szuperoxid termelést is. A legfrissebb kutatások leírtak egy új mitokondriális célfehérjét, melyen a PPARG agonisták kifejthetik hatásukat (mito-NEET). [45] A mito-NEET-ről bizonyítást nyert, hogy kapcsolatban áll a III-as komplex komponenseivel, ez magyarázhatja a PPARGA-k kötődési képességét a mito-NEET-hez, így szelektíven képesek blokkolni különböző mitokondriális célmolekulákat. A PPARGA-k ezen hatása, hogy képesek befolyásolni a mitokondriumok funkcióját, magyarázhatja reaktív oxigén intermedierek hatásukra történő csökkent képződésének okát.

III. A pentoxifyllin (PTX) egy nem specifikus foszfodiészteráz-gátló, mely régóta használatos a klaudikáció intermittens kezelésére alsó végtagi verőérbetegeken. [31] Hemoreológiai hatásai révén képes a vörösvérsejtek konformációját megváltoztatni, ezáltal növelni a mikrocirkulációs vérátáramlást krónikus artériás elégtelenség esetén. Újabban a PTX alkalmazása kibővült, bizonyítást nyert, hogy képes a gyulladási válaszreakciók

csökkentésére. A PTX képes csökkenteni a gyulladást kardiopulmonális bypasszal járó nyitott szívműtétet követően, sepsisben, illetve újszülöttek ARDS-e kapcsán. Többszörös pozitív hatást képes kifejteni a gyulladást kaskádban az intracelluláris cAMP növelése és a TNF-alfa, illetve az IL-6 szintézis csökkentése révén. [46, 47]

Az NFkB egy transzkripciós faktor, mely kétélű fegyverként viselkedik a szöveti folyamatokban. Aktivációja elengedhetetlen a késői prekondicionálás kialakulásában, mivel up-regulálja az iNOS és a COX-2 géneket.

A PTX és a transzkripciós faktorok közti kapcsolat már tisztázott. A PTX dóziszfüggő módon csökkenti az NFkB nukleáris transzlokációját LPS kezelés hatására, [48] továbbá az aktivált T-limfocitákban is gátolja a transzlokációt. [49] Vizsgálataink során azt találtuk, hogy a PTX képes volt csökkenteni az iszkémia-reperfúziós károsodások mértékét és markánsan csökkentette a gyulladást mediátorok szintjét. A közelmúltban El-Ghoneimi és munkatársai közölték, hogy a PTX képes volt szignifikánsan csökkenteni a TNF-alfa szintjét és a nekrotikus terület nagyságát májban. Úgy tűnik, hogy a PTX képes lehet a proinflammatorikus mediátorok szintjének- mint az IL-6- csökkentésére, valamint a mikrovaskuláris máj és bélkeringés növelésére vérzéses sokkot követően. [51, 52, 53, 54] Vizsgálataink során mi is azt találtuk, hogy a PTX képes volt csökkenteni a TNF-alfa és az IL-6 szintjét. Vizsgálatunk is megerősítette, hogy a PTX rendelkezik antiinflammatorikus hatással, melyet a TNF-alfa, IL-6 gátlásán, a neutrofil leukociták kikapadásának gátlásán és a vérlemezkék aktivációjának gátlásán keresztül fejt ki.

6. Következtetés

Vizsgálataink eredménye alapján elmondhatjuk, hogy az iszkémiás posztkondicionálás, mely egy endogén adaptációs mechanizmus, csökkentette az oxidatív stressz mértékét és a gyulladásos válaszreakciók nagyságát. Jelen tanulmányunkból lesűrhetjük, hogy a GST etakrinsavval történő gátlása a proapoptotikus JNK és p38 fokozódó foszforilációjához vezet, valamint csökkenti az iszkémiás posztkondicionálás pozitív hatását. A vizsgálatunk klinikai jelentősége abban áll, hogy az iszkémiás posztkondicionálás egy gyors, egyszerű, könnyen alkalmazható eljárás a műtétet követően kialakuló reperfüziós károsodások csökkentésére. Az érbetegeknél alkalmazott etakrinsav súlyosbíthatja az iszkémia-reperfüziós károsodások mértékét, továbbá a posztkondicionálás pozitív hatását is eltörölheti, így ezeknél a betegeknél megfontolandó az etakrinsav elhagyása, illetve helyettesítése.

A második kísérletsorozat eredményei alapján megállapíthatjuk, hogy a PPARGA alkalmazása aorta iszkémia-reperfüziót követően csökkentette az oxidatív károsodások mértékét. Vizsgálataink igazolták, hogy a PPARGA képes csökkenteni az MDA szintjét, emelni a GSH és -SH koncentrációját, valamint fokozni a SOD enzimaktivitását. A PPARGA már 10 és 50 μM -os koncentrációban is kellően hatékony, továbbá a legígéretesebb eredményeket akkor látjuk, ha több, mint 20 perccel a reperfüzió előtt alkalmazzuk. Klinikai haszna, hogy könnyen, gyorsan alkalmazható, természetes anyag, mely a reperfüziót megelőzően adva fejt ki legmarkánsabban a hatását, így egy akut érelzáródás műtéti megoldásánál terápiás lehetőségként számolhatunk vele.

A harmadik kísérletsorozat eredményei alapján elmondhatjuk, hogy a PTX adása hemoreológiai és anti-inflammatórikus hatásai révén képes csökkenteni az iszkémia-reperfüziós károsodások mértékét és a gyulladásos válaszreakciók nagyságát. A vizsgált pro-inflammatórikus mediátorok eredményei alátámasztják, hogy a PTX, hemoreológiai támadáspontjain kívül anti-inflammatórikus és immunmodulációs potenciállal is rendelkezik.

7. Új eredmények

1. Elsőként demonstráltuk in-vivo állatkísérletben, hogy a GST farmakológiai gátlása súlyosbíthatja az iszkémia-reperfúziós károsodások mértékét infrarenalis aorta okklúziót követően. Továbbá bizonyítottuk, hogy a GST-gátlás összefügg különböző MAPK aktivációjával, melyek pro- és antiapoptotikus jelátviteli utakat szabályoznak.

2. Elsőként írtuk le in-vivo állatkísérletben, hogy az iszkémiás posztkondicionálás védő hatása nem alakul ki etakrinsavval történő GST gátlás esetén. A hypoxia és reoxigenizáció képes volt csökkenteni a JNK és p38 aktivációját, ezáltal feltételezhetjük, hogy a MAPK jelátviteli utak részt vesznek a posztkondicionálás-kiváltotta védelem kialakításában.

3. A PPAR γ agonisták iszkémia-reperfúziós károsodásokra gyakorolt hatását már közölték vékonybélben, tüdőn, szíven, vesén és agyszöveten. Elsőként demonstráltuk a PPAR γ iszkémia-reperfúziós károsodásokra gyakorolt pozitív hatását in-vivo alsó végtagi vázizom modellen.

4. Elsőként végeztünk az általunk vizsgált PPAR γ -val hatás-idő és dózis vizsgálatokat az optimális időzítés és dózis meghatározása érdekében, mellyel hatékonyan csökkenteni tudtuk in-vivo állatmodellen az iszkémia reperfúziós károsodások mértékét infrarenalis aorta leszorítást követően.

5. Igazoltuk in-vivo állatmodellben, hogy a pentoxifyllin az eddig ismert hatásain túl anti-inflammatórikus hatással is bír infrarenalis aorta iszkémia-reperfúziót követően, melyet a TNF- α és IL-6 szintézisének gátlásán keresztül fejt ki.

6. Egyszeri, nagy dózisú (50 mg/kg) pentoxifyllin alkalmazása képes az iszkémiás posztkondicionálás pozitív hatásait potenciózni infrarenalis aorta iszkémia-reperfúzió állatmodellben.

Köszönetnyilvánítás

Elsőként szeretném megköszönni családomnak a szeretetet és támogatást, amivel körülvettek, feleségemnek Helgának és kislányomnak Dórinak, hogy biztattak, és szeretetükkel támogattak a nehezebb időszakokban is.

Szeretném megragadni az alkalmat, hogy kifejezzem köszönetemet a támogatásért, melyet munkám során kaptam témavezetőmtől Dr. Arató Endrétől és a Doktori Program vezetőjétől Dr. Jancsó Gábortól, hogy ez a munka elkészülhessen.

Szeretném megköszönni a segítséget kollégáimnak Dr. Hardi Péternek, Dr. Takács Ildikónak, Kovács Viktóriának, Dr. Veres Gyöngyvér Tündének, Dr. Kürthy Máriának, Dr. Lantos Jánosnak és a Sebészeti Oktató és Kutató Intézet valamennyi munkatársának, hogy az állatkísérletek és a laboratóriumi munkák sikeresen lezajlottak.

Szeretném megköszönni Nagy Ágnesnek és Kovács Viktóriának a pótolhatatlan segítséget, melyet a molekuláris biológiai vizsgálatok során kaptam.

**Effects of pharmacological and surgical interventions on ischemia reperfusion injury in
bilateral acute hind limb ischemia rat model.**

Ph.D. theses summary

Tibor Nagy M.D.

Head of the Doctoral School: Prof. Gábor L. Kovács M.D. D.Sc.

Head of the Doctoral (Ph.D.) program: Gábor Jancsó M.D. PhD.

Tutor: Endre Arató M.D. PhD.



University of Pécs, Medical Faculty

Department of Surgical Research and Techniques

Pécs, Hungary

Pécs, 2015

1. Introduction

In patients suffering from cardiovascular diseases in many cases revascularization surgery is the only way to restore normal function, but volume and pressure overload, oxidative stress and the developing reperfusion injury frequently induce complications. In vascular surgery the acute limb ischemia is a severe, potentially life-threatening state. In this case it is necessary to perform a prompt revascularization. The duration of acute ischemia could also be serious, thus after the revascularization we always have to face reperfusion injury. The severity of reperfusion injury depends on the ischemic time, the mass of ischemic tissue and the collateral circulation of the affected tissue. In the surgical research it is of real clinical importance to reduce the extent of reperfusion injury associated pathways. [1, 2, 3] The role of oxygen free radicals in reperfusion injury is well known, accordingly to decrease of these harmful agents is very important. Catalase, superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase and repair enzymes are in the first line of antioxidant protection, but recently among other antioxidant enzymes researches are focus on glutathione S-transferase (GST). Reperfusion injury is an integrated response to the restoration of blood flow after ischemia involving mechanical, extracellular and intracellular processes. It is initiated at the very early moments of reperfusion, lasting potentially for days. The modern hypothesis of the pathogenesis of reperfusion injury has been reviewed by Piper and al. [4] Patients suffering from acute arterial occlusion, it is now widely accepted that periodically reopening the occluded artery is accompanied by a reduction of the extent of necrosis and a major reduction of short- and long-term mortality. However, together with a definite protective effect on ischemic tissues, post-ischemic reperfusion may bring with it unwanted consequences that may partly counteract its beneficial effects. This phenomenon has thus been named reperfusion injury. Ischemia-reperfusion in the tissue can lead to various forms of cell death, such as apoptosis, oncosis and necrosis. [5]

To protect the heart against ischemia-reperfusion injury ischemic postconditioning is a well-known method. [6] The concept of 'Ischemic postconditioning' (PC) was first described by Vinten-Johansen's group. [7] In general, PC can be defined as intermittent interruption of coronary flow in the very early phase of a reperfusion, which leads to protection against reperfusion injury. The duration and number of these stuttering periods of reperfusion and ischemia has been one of the aims of early studies on this topic.

Glutathione S-transferases are members of the endogenous antioxidant enzyme system. GSTs represent three major families of proteins: cytosolic, mitochondrial, microsomal transferases, of which the cytosolic GSTs create the greatest family. [8] It has

been recently published that these enzymes catalyze the conjugation of reduced glutathione to electrophilic compounds, thus, that's the way they are involved in the detoxification of endogenous as well as exogenous substances. [9, 10] Several isoenzymes of GSTs play an important role in the regulation of pathways involved in cell survival and death signaling. In this non-enzymatic way, GSTs' role is to segregate the mitogen activated protein kinase in a complex, thus preventing it from acting on additional targets. [11]

Ethacrynic acid (EA) is a widely spread diuretic drug and in addition, a potent inhibitor of GST enzymes. Some pathways and mechanisms were discovered for the inhibition of the GST enzymes by EA. EA has been shown to be a substrate of reduced glutathione, on the other hand nonenzymatic GSH conjugation of EA also exist. Additionally it was shown that the EA glutathione conjugate was an inhibitor of GSTs as well due to its stronger affinity for the enzymes. So EA itself inhibits GSTs through reversible covalent binding and the EA glutathione conjugate is another strong inhibitor of GSTs. [12]

The peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPARG) is a member of the nuclear receptor superfamily. PPARs are ligand-dependent transcription factors that bind to specific peroxisome proliferators response elements at the enhancer sites of regulated genes. [13] They are implicated in adipocyte differentiation, insulin sensitivity and inflammatory processes [14, 15] and also down-regulate proinflammatory mediators in macrophages, mainly by inhibiting transcription of NF- κ B-dependent inflammatory genes. [16, 17, 18] Synthesized PPARG agonists (PPARGA) are used as oral antihyperglycemic drugs in treating noninsulin-dependent diabetes mellitus. [19] However, emerging evidence indicates that PPARG activation can regulate inflammatory responses, included inflammatory disorders of the central nervous system, inhibiting expression of a variety of pro-inflammatory molecules by a mechanism termed receptor-dependent transrepression. [20] Furthermore, beneficial effects of PPARG agonists on ischemia reperfusion injury have been previously documented in the intestine [21, 22, 23], lung [24], heart [25, 26, 27], kidney [28] and, more recently, also in the brain [29, 30].

Pentoxifyllin (PTX) a xanthine-derived non-specific phosphodiesterase (PDE) inhibitor, has been used for the treatment of intermittent claudication in patients suffering from peripheral and cerebrovascular disease. [31] Through its hemorheologic properties, PTX can modify the conformation of red blood cells and improve the microcirculatory blood flow in chronic arterial insufficiency. On the other hand PTX has been used in the attenuation of the inflammatory response too. Recent studies have focused on the anti-inflammatory effects of PTX, more specifically, the neutrophils. We hypothesized that single-shot, increased dose

of PTX treatment in conjunction with its known hemorheological effects decreases the developing ischemia-reperfusion injury and can attenuate the local and systemic inflammatory response.

2. Aims

In the **first study** we performed acute bilateral hind limb ischemia and reperfusion on rat animal model. In the study we investigated the effects of inhibition of glutathione S-transferase by ethacrynic acid on ischemia reperfusion injuries and its influence on possible protecting effect of ischemic postconditioning. We examined the developing oxidative stress and inflammatory response and the histological changes in structure of skeletal muscle. We investigated various pro- and antiapoptotic signaling pathways.

The aim of the **second study** was to investigate the effects of novel therapies on bilateral hind limb ischemia reperfusion injury following a temporal infra-renal aortic occlusion and reperfusion. A peroxysome proliferator activated receptor-gamma agonist (PPARGA) was applied in rats. Two major experiments were planned: time course experiment, and the dosage experiment. Oxidative stress was followed upon the determination of malondialdehyde (MDA), reduced glutathione (GSH), thiol group (-SH), and superoxide dismutase (SOD) plasma levels. In addition the expression patterns of SOD-mRNA (messenger ribonucleic acid) and PPARG-mRNA were measured with RNA extraction, complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) synthesis and semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (PCR) analysis. To evaluate the visible changes in muscle structure in the investigated groups histological investigations were performed as well.

In the **third study** we investigated the effects of phosphodiesterase inhibition by pentoxifyllin (PTX) on infrarenal aortic occlusion and reperfusion. Recently has been established that PTX could modulate the inflammatory response in ischemia reperfusion injury and sepsis. We hypothesized that “single shot”, increased dose of PTX treatment in conjunction with its known hemorheological effects decreases the extent of developing ischemia-reperfusion injury and can attenuate the local and systemic inflammatory response [85]. We investigated the developing ischemia-reperfusion by measuring MDA, GSH, -SH, SOD. TNF-alpha, IL-6 plasma levels were determined to follow and describe the inflammatory response after infrarenal aortic ischemia and reperfusion.

3. Materials and methods

3.1. Animal model

Male Wistar rats, weighed between 200-250 g were used in the present study from Charles River Breeding Laboratories (Hungary, Isaszeg). The animals were housed in individual cages in a temperature ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), light controlled (12 hours light-dark cycle) and air-filtered room with free access to food and water. Food was withdrawn 12 hours prior to experiment. The present study conforms to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996) and was approved by the local institutional Committee on Animal Research of Pécs University (BA02/2000-29/2001).

3.2. Aortic ischemia-reperfusion model

The animals were anaesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine hydrochloride (500 mg / 10 ml) and diazepam (10 mg / 2 ml). The ratio was 1:1 (0.2 ml / 100 g = 5 mg ketamine + 0.5 mg diazepam / 100 g) and the animals were placed on a heated pad. ECG was placed and the carotid artery was catheterized (22 gauge) for blood pressure measurement (Siemens Sirecust 1260, Düsseldorf, Germany). The skin was disinfected and a midline laparotomy was performed. 2 ml of warm saline was injected into the abdominal cavity to help maintain the fluid balance. The inferior mesenteric vein was catheterized for collecting blood samples, fluid equilibration and supplemental anesthetic. The abdominal aorta was exposed by gently deflecting the intestine loops to the left. After fine isolation of the infrarenal segment, an atraumatic microvascular clamp was placed on the aorta for 60 minutes. The abdomen was then closed and the wound was covered with warm, wet compress to minimize heat and fluid losses. The microvascular clamp was then removed and the infrarenal abdominal aorta (IAA) was reperfused for 60 or 120 minutes. Aortic occlusion and reperfusion was confirmed by the loss and reappearance of satisfactory pulsation in the distal aorta.

3.3. Administration of ethacrynic acid

The dose of EA was 8.6 mg/kg and the solution was administered to the animals intraperitoneally 24 hours and 1 hour before the operation. To determine the effectivity of GST inhibition the biologically active alpha-GST concentration was measured in each group using Rat GST-alpha ELISA kit (Abnova, Taipei City, Taiwan), following the manufacturers protocol. This method determines the free i.e. biological active alpha-GST concentration.

3.4. PPARGA administration

A PPARGA solution was injected in an appropriate concentration (e.g., 10, 50, 100, or 500 μM at a final concentration) into the superior mesenteric vein at different time points (e.g., 20, 40, or 60 minutes before reperfusion of the ischemic period).

3.5. Administration of pentoxifyllin

Animals in the treated groups received intravenous bolus of PTX (50mg/kg) half an hour before the reperfusion. Control animals received only normal saline solution. The dosage based on data from literature.

3.6. Protocol of ischemic postconditioning

Those groups wherein the animals underwent ischemic postconditioning, after the ischemic phase intermittent 15 seconds reperfusion – 15 seconds ischemic periods were applied four times.

3.7. Experimental groups

I. Rats were divided into six groups (10 rats in each group). In the control group a midline laparotomy was performed for three hours without following intervention. 20% EtOH vehicle the same volume with the EA-EtOH solution (1 ml/kg) was administered to the animals intraperitoneally 24 hours and 1 hour before the operation (control). The aorta in the second group was closed for 60 min and then a 120 min of reperfusion followed (IR). Rats in the third group underwent 60 minutes ischemia, after the ischemic phase postconditioning was performed followed by a 120 minutes reperfusion phase (PC). In the fourth, fifth and sixth groups the animals were treated with EA as well (EA-control, IR/EA, PC/EA).

Peripheral blood samples and biopsy from quadriceps muscle were collected from the animals at the end of the reperfusion phase. The serum and tissue samples were harvested and stored at minus 78°C until biochemical assays.

II. Time course experiment

The rats were divided randomly into five groups. The first group was a group of operated rats that underwent ischemia followed by an hour-long reperfusion without being treated with PPARGA (operated untreated control). The other four groups included operated rats that underwent ischemia followed by an hour-long reperfusion with aPPARGA treatment (intravenously; final concentration of 100 μM) either 0 minute, 20 minutes, 40 minutes, or 60 minutes before reperfusion. Upon completion of the one hour reperfusion, the rats were

anesthetized with intraperitoneal injection of ketamine (40 mg/kg) and diazepam (5 mg/kg) and evaluated.

II. Dosage experiments

Rats were randomly divided into five groups. The first group was a group of operated rats that underwent ischemia followed by an hour-long reperfusion without being treated with PPARGA (operated untreated control). The other four groups included operated rats that underwent ischemia followed by an hour-long reperfusion with an intravenous PPARGA treatment 20 minutes before reperfusion at a final concentration of either 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M, or 500 μ M of PPARGA. Upon completion of the one-hour reperfusion, the rats were anesthetized with intraperitoneal injection of ketamine (40 mg/kg) and diazepam (5 mg/kg) and evaluated.

In another dosage experiment, rats were randomly divided into five groups. The first group was a group of operated rats that underwent ischemia followed by an hour-long reperfusion without being treated with PPARGA (operated untreated control). The other four groups included operated rats that underwent ischemia followed by an hour-long reperfusion with an intravenous PPARGA treatment 40 minutes before reperfusion at a final concentration of either 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M, or 500 μ M of PPARGA. Upon completion of the one-hour reperfusion, the rats were anesthetized with intraperitoneal injection of ketamine (40 mg/kg) and diazepam (5 mg/kg) and evaluated.

III. Rats were divided into five groups (10 rats in each group). In the control group a midline laparotomy was performed for three hours. Normal saline solution was administered to the animals intravenously 30 minutes before the “reperfusion phase” (control). The infrarenal abdominal aorta in the second group was closed for 60 minutes and then 120 minutes of reperfusion followed (IR). Rats in the third group underwent a 60 minutes of ischemia, after the ischemic phase postconditioning was performed followed by a 120 minutes reperfusion phase (IR+PC). In the fourth group 60 minutes of ischemia was performed, 30 minutes before the reperfusion PTX was administered to the animals and then 120 minutes of reperfusion is followed (IR+PTX). Rats in the fifth group underwent a 60 minutes of ischemia, 30 minutes before the reperfusion PTX was administered to the animals, after the ischemic phase postconditioning was performed followed by 120 minutes of reperfusion (IR+PC+PTX).

3.8. Analysis of oxidative stress parameters

Measurement of malondialdehyde: MDA is a marker for the quantification of lipid peroxidation in cell membranes. MDA was determined in anticoagulated whole blood, by photometric method of Placer, Cushman and Johnson. [32]

Measurement of reduced glutathione and plasma thiol-groups: GSH and plasma SH levels were determined in anticoagulated whole blood (ethylene-diamine-tetra-acetic acid (EDTA)) by Ellman's reagent according to the method of Sedlak and Lindsay. [33]

For measuring of superoxide dismutase activity in serum we used Superoxide Dismutase Assay Kit (Trevigen Inc., Gaithersburg, USA), following the manufacturers protocol. This method determines the free i.e. biological active SOD activity.

3.9. RNA extraction

Total RNA was extracted from the renal tissue samples with TRI reagent (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions.

3.10. cDNA synthesis

Complementary DNA was synthesized from 5µg DNase treated total RNA in 20 µL final volume using oligo(dT) primer and the M-MuLV reverse transcriptase from FermentasRevertAid™ Reverse Transcriptase Kit according to the manufacturer's recommendations. The RTase was then inactivated at 70°C for 10-10 minutes.

3.11. Semi-quantitative reverse transcription PCR analysis

Two microliters of synthesized and 10-times diluted cDNA samples were used for PCR amplification by 1 units of Taq DNA polymerase (Fermentas, DreamTaq™ Green DNA Polymerase) in a total volume of 20 µL under the following conditions: 95°C for 5 min, followed by 30 cycles consisting of 30 seconds at 94°C then 30 seconds at 60°C (annealing temperature of PPARG and SOD GAPDH primer pairs), 1 minute at 72°C. The procedure was ended at 72°C for 5 minutes. The number and temperature of cycles were optimized for each specific primer pair (Integrated DNA Technologies Inc.). Fifteen microliters of the PCR products were loaded and separated on 1.2% agarose gel containing ethidium bromide for visualization and photography experiments.

3.12. Serum TNF-alpha and IL-6 quantification

For measuring TNF-alpha and IL-6 concentration in serum we used Rat TNF-alpha and Rat IL-6 ELISA kit (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA), following the manufacturers

protocol. These methods determine the free i.e. biological active TNF-alpha and IL-6 concentrations.

3.13. Serum alpha-GST quantification

To determine the effectivity of GST inhibition the biologically active alpha-GST concentration was measured in each group using Rat GST-alpha ELISA kit (Abnova, Taipei City, Taiwan), following the manufacturers protocol. This method determines the free i.e. biological active alpha-GST concentration.

3.14. The western-blot analysis of proapoptotic (JNK, p38) signaling pathways

Fifty milligrams of quadriceps muscle samples were homogenized in ice-cold TRIS buffer (50 mM, pH 8.0), the homogenate was pelleted, and the supernatant was measured by bicinchoninic acid reagent and equalized for 1 mg/ml protein content in Laemmli solution for Western blotting. The samples were harvested in 2X concentrated SDS-polyacrylamide gel electrophoretic sample buffer. Proteins were separated on 12% SDS-polyacrylamide gel and transferred to nitrocellulose membranes. After blocking membranes were probed overnight at 4°C with antibodies recognizing the following antigens: phospho-SAPK/JNK (Thr¹⁸³/Tyr¹⁸⁵, 1:1000 dilution), phospho-p38 MAPK (Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸², 1:1000 dilution), (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). Membranes were washed six times for 5 min in TRIS-buffered saline (pH 7.5) containing 0.2% Tween (TBST) before addition of goat anti-rabbit horseradish peroxidase conjugated secondary antibody (1:3000 dilution; Bio-Rad, Budapest, Hungary). Membranes were washed six times for 5 min in TBST and the antibody-antigen complexes were visualized by means of enhanced chemiluminescence. The results of Western blots were quantified by means of Scion Image Beta 4.02 program. All experiments were repeated four times.

3.15. Histological examinations

The animals were terminated at the end of the experiment and biopsy was taken from quadriceps femoris or tensor fasciae latae muscle. The fragments of muscle did not contain well-identified fascia. The definite aim of the biopsy was to register the qualitative differences in changes between the animal groups, firstly the transformations in the striated muscular tissue. 5-6 paraffin-embedded blocks were made from striated muscle-pieces, and sample slices were prepared staining by hematoxylin and eosin.

3.16. Statistical analysis

All values are expressed as means \pm SEM. Differences between the variances of the groups were assessed with one-way analysis of variance (ANOVA) and when the results were significant we used adequate post-hoc tests for multiple comparisons. For comparing the treated groups to the control group we performed in case of each investigated parameters Dunnett's test. We used Sidak post-hoc test for comparisons across multiple different groups. Multiple comparisons tests resulted in adjusted p-values, each p-value is adjusted to account for multiple comparisons. We performed five-five comparisons (Dunnett's and Sidak) per investigated parameter. T-tests were performed independently to show the differences between the investigated groups. Data were considered significant when p-value was less than 0.05.

4.1. Results-I

4.1.1. Plasma malondialdehyde levels

The MDA concentration was significantly higher in four groups (IR, PC, IR/EA, PC/EA) comparing to the control group. Our data showed significant ($p=0.022$) differences between EA-control and IR/EA groups. MDA level was significantly higher in the IR/EA group.

4.1.2. Reduced glutathione levels (GSH)

The values of reduced glutathione levels were significantly lower in four groups (IR, PC, IR/EA, PC/EA) comparing to the control group. In postconditioned (PC) group the values were significantly higher than in non-conditioned (IR) group, however this protecting factor of postconditioning between the similar groups in the presence of EA was not significant.

4.1.3. Plasma thiol groups (-SH)

We detected in the IR/EA group significantly lower level of -SH comparing to control group.

4.1.4. Enzyme activity of superoxide dismutase (SOD)

We have detected in three investigated groups significantly lower (IR, IR/EA, PC/EA) and in one group significantly elevated (PC) SOD activity comparing to the control group. In PC group we have found significantly higher values comparing to the IR group. We have measured in the PC/EA group significantly decreased SOD activity comparing to the PC group.

4.1.5. Serum TNF- α levels

The values were significantly higher in three groups (IR, IR/EA, PC/EA) than in the control group. In the postconditioned group we have not found significant elevation in the level of TNF- α comparing to the control group. This anti-inflammatory protecting effect of postconditioning was not marked in the presence of EA.

4.1.6. Serum interleukin-6 (IL-6)

The values were significantly higher in three groups (IR, IR/EA, PC/EA) than in the control group. IR in the presence of EA caused a significantly elevated level of IL-6 comparing to the IR group without EA administration. Postconditioning decreased significantly the IL-6 level without EA. Postconditioning did not temper significantly that elevation of IL-6 level if the animals were co-treated with IR and EA administration.

4.1.7. Serum alpha-GST

To evaluate the effectivity of GST inhibition by ethacrynic acid we measured the serum alpha-GST concentrations in the investigated groups. These concentrations stem from the biologically active enzymes and correlate with the enzyme activity (Abnova). The values were significantly lower in the EA administered groups (EA, IR/EA, PC/EA) according to the control group. We have found significantly elevated alpha-GST concentration in the IR group according to the control and PC group.

4.1.8. Western blot of proapoptotic signaling pathways (p38, JNK)

To characterize the expression and phosphorylation of two proapoptotic signaling proteins (phospho-JNK, phospho-p38) we used Western blot analysis to separate and establish them. We found that the expression of phospho-JNK and phospho-p38 was appreciably higher in the EA administered groups comparing to the control, IR and PC groups.

4.1.9. Histological results

In the IR group the muscle fibers are swelled, irregular-shaped and the interstitial space between the fibers is pressed, decreased. Focal atrophy and necrosis were seen in the picture as well. In the PC group the basic muscle structure is mainly kept. Muscle fibers are gently swelled but interstitial edema or necrosis cannot be defined. In the slice of the EA-control group the muscle structure is undamaged, healthy, there is no necrosis or atrophy in the fibers. We have seen the most severe damage of the muscle structure in the IR/EA group. The muscle fibers are disorganized, irregular-shaped and due to the edema the interstitial space between the fibers is increased. In the PC/EA group the damage of the muscle structure is severe. The muscle fibers are swelled, focal atrophy and necrosis can be seen in the picture as well.

4.2. Results-II

4.2.1. Results of the time course experiment

The PPARGA treatment efficiently diminished the level of MDA at all time-points tested. The decline of MDA levels indicates that PPARGA is a potent inhibitor of oxidative stress responses during the ischemia-reperfusion process. This ability of PPARGA to inhibit oxidative stress responses during the ischemia-reperfusion process was further supported by the observed increases in reduced GSH levels when PPARGA was administered 40 or 60 minutes prior to reperfusion and the observed increases in SOD activity at all

timepoint tested. These results also demonstrate that PPARGA is effective when administered at the time of reperfusion or when administered before reperfusion (e.g., 20, 40, or 60 minutes before reperfusion).

4.2.2. Results of dosage experiments I.

The PPARGA treatment efficiently diminished the level of MDA when injected to deliver a final concentration within the rats of 10, 50, 100, and 500 μM . These results demonstrate that PPARGA is a potent inhibitor of oxidative stress responses during the ischemia-reperfusion process at concentrations as low as 10 μM . In addition, administration of PPARGA at 100 and 500 μM resulted in an increase in SOD activity. Administration of PPARGA at 50, 100, and 500 μM 20 minutes before reperfusion resulted in a decrease in the levels of reduced GSH levels. These results demonstrate that PPARGA may be used more effectively as an inhibitor of oxidative stress during the ischemia-reperfusion process when administered more than 20 minutes (e.g., about 30 to 60 minutes such as about 40 minutes) prior to reperfusion.

4.2.3. Results of dosage experiments II.

The PPARGA treatment efficiently diminished the level of MDA when injected to deliver a final concentration within the rats of 100 and 500 μM . In addition, administration of PPARGA at 50, 100, and 500 μM resulted in an increase in the levels of reduced GSH levels. Administration of PPARGA at 10, 100, and 500 μM also resulted in an increase in SOD activity. Further, the gene expression pattern of SOD correlated with the SOD activity results as samples for gene expression analysis taken from renal tissue exhibited increased levels of SOD mRNA expression as the amount of PPARGA injected 40 minutes before reperfusion increased. Administration of PPARGA at 10, 50, 100, and 500 μM resulted in an increase in the levels of SH. Thiols can help aerobic cells maintain their reducing state in an oxidizing environment. Thus, higher total thiol levels can indicate a greater reducing state of the cell. Administration of PPARGA 40 minutes before reperfusion also resulted in increased expression of PPARG mRNA. Taken together, these results confirm that PPARGA is an effective inhibitor of oxidative stress during the ischemia-reperfusion process at levels as low as 10 to 50 μM .

4.2.4. Histological results

In the sham operated control rats (without ischemia-reperfusion treatment), the physiological fiber architecture was intact. Muscular fibers were polygonal shape, contained peripherally placed nuclei, and exhibited a tightly packed structure. In ischemic reperfused operated controls, however, many of the numerous fibers lost their internal structure (e.g., round shape,

small diameter). About 20 percent of the examined fibers were affected. In addition, there were signs of cellular vacuolizations, and extracellular edema formation. PPARGA treatment noticeable helped to preserve of the normal tissue and cell architecture with minimal extracellular edema (e.g., minimal fiber separation) and a near complete absence of intercellular vacuolization as compared to the ischemic reperfused operated controls. These results demonstrate that PPARGA can be administered to a mammal to reduce the severity of ischemia-reperfusion injury.

4.3. Results-III

4.3.1. Plasma malondialdehyde levels

MDA concentration was significantly higher in all groups (IR, IR+PC, IR+PTX, IR+PC+PTX) comparing to the control group. Our data showed significantly lower MDA concentrations in IR+PC, IR+PTX and IR+PC+PTX groups comparing to the IR group. In the IR+PC+PTX group we found significantly lower MDA concentrations than in IR+PTX group.

4.3.2. Reduced glutathione levels (GSH)

The values of reduced glutathione levels were significantly lower in two groups (IR, IR+PTX) comparing to the control group. Our data showed significantly higher concentrations in IR+PC, IR+PTX and IR+PC+PTX groups comparing to IR group.

4.3.3. Plasma thiol groups (-SH)

We detected in the IR group significantly lower level of –SH comparing to control group.

4.3.4. Enzyme activity of superoxide dismutase (SOD)

We have detected in two investigated groups significantly elevated (IR+PC, IR+PC+PTX) and in one group significantly lower (IR) SOD activity comparing to the control group. In IR+PC, IR+PTX and IR+PC+PTX groups we have detected significantly elevated SOD activity comparing to IR group. In IR+PC+PTX group we found significantly elevated SOD activity than in IR+PTX group.

4.3.5. Serum TNF- α levels

The values were significantly higher in IR group than in the control group. In IR+PC, IR+PTX and IR+PC+PTX groups we detected significantly lower values comparing to the IR group.

4.3.6. Serum interleukin-6 (IL-6)

We investigated the serum IL-6 levels in our groups. The values were significantly higher in IR group, than in the control group. We have found significantly lower concentrations in IR+PTX, IR+PC and IR+PC+PTX groups than in IR group.

5. Discussion

I. Ischemia will lead to decreasing level of intracellular adenosine triphosphate (ATP) and consecutive elevation of hypoxanthine. In the very early moments of reperfusion the oxygen appears in the cell and the xanthine oxidase catalyzed hypoxanthine-xanthine conversion will produce a mass of superoxide radicals. Through lipid peroxidation the superoxide radicals and other ROI will damage the membrane lipids, proteins and DNA. The endogenous antioxidant system tries to defend the cells and macromolecules against these injuries. [4] We have found that the simulated IR cause increased oxidative stress parameters which was further increased by administration of EA. The positive effect of ischemic postconditioning have been detected through the investigation of oxidative parameters, but this positive effect has not been seen in the presence of EA. We have found that –SH groups and TNF-alpha did not showed significant changes by EA. It can be explicable with the short time of IR. On the other way IL-6 showed significant changes due to injury of endothelial layer. This could be the first effect of the inflammatory response in reperfusion injury. [34]

In our experiment administration of EA resulted in marked increase of oxidative stress parameters, extended expression and phosphorylation of proapoptotic proteins, especially when animals were co-treated with IR. While ischemic postconditioning could decrease the concentrations of oxidative stress parameters in IR group, this positive effect could not be established in GST inhibited group co-treated with IR. The increased levels of ROI may explain the increased amount of phosphorylated proapoptotic proteins in GST inhibited group during IR and ischemic postconditioning. [35]

GSTs are associated with members of the MAPK pathways. These pathways play a role in the cell survival and death signaling. [36] GST π was described as the first inhibitor of JNK by direct protein-protein interaction. [37] JNK is a proapoptotic MAPK that plays a crucial role in cytotoxicity during numerous conditions including oxidative stress, nitrosative stress and involved in stress response, inflammation, apoptosis and cellular proliferation. [38, 39] In normal conditions low JNK catalytic activity is maintained in the cell, GST π , JNK and c-Jun constitute a protein complex. [10] Under conditions of oxidative stress, the GST π -JNK complex dissociates, so that JNK regain its phosphorylating ability and is free to act on downstream gene targets resulting in induction of apoptosis. [40] We found that inhibition of GST by EA increases JNK activation by itself and diminishes the protective effect of postconditioning. This could be explained by the elimination of sequestration of JNK within a protein complex with GST. Furthermore, effective inhibition of GST may cause JNK

activation as a result of oxidative stress due to hampered elimination of developing oxidants. Sun et al. have reported that attenuation in superoxide anion generation by postconditioning after hypoxia and reoxygenation was able to decrease the activation of JNK and p38 MAPKs, suggesting that modulation of MAPK signaling pathways are involved in the postconditioning-induced protection. [41]

We have found that IR treatment caused a gently induction of p38 activation in rats quadriceps muscle which was further increased by administration of EA while the protective effect (the decreased phosphorylation of p38) of postconditioning could not develop.

II. We used in our investigations a natural, non-synthetic PPARGA. We found that the administration of PPARGA can reduce severity of the ischemia reperfusion injury through decreasing the systemic inflammatory response. Beneficial effects of PPARG agonists on ischemia reperfusion injury have been previously documented in the intestine [21, 22, 23], lung [24], heart [25, 26, 27], kidney [28] and, more recently, also in the brain [29, 30].

In the time course experiments we have found that MDA decreased, the GSH levels increased when PPARGA was administered 40 or 60 minutes prior to reperfusion and SOD enzyme activity increases at all time points tested. These results also demonstrate that PPARGA is effective when administered at the time of reperfusion or when administered before reperfusion (e.g., 20, 40, or 60 minutes before reperfusion).

In the first dosage experiment we found that PPARGA is a potent inhibitor of oxidative stress responses during the ischemia reperfusion process at concentrations as low as 10 μM . In addition, administration of PPARGA at 100 and 500 μM resulted in an increase in SOD activity. Consistent with the results from time course experiment, administration of PPARGA at 50, 100, and 500 μM 20 minutes before reperfusion resulted in a decrease in the levels of reduced GSH levels. These results demonstrate that PPARGA may be used more effectively as an inhibitor of oxidative stress during the ischemia-reperfusion process when administered more than 20 minutes prior to reperfusion.

In the second dosage experiment we found that PPARGA treatment efficiently diminished the level of MDA when injected to deliver a final concentration within the rats of 100 and 500 μM . These results confirm that PPARGA is an effective inhibitor of oxidative stress during the ischemia reperfusion process at levels as low as 10 to 50 μM .

Mitochondria are the major source of reactive oxygen species, which are mainly generated at complexes I and III of the respiratory chain [42]. There is now evidence indicating that rosiglitazone and pioglitazone exert direct and rapid effects on mitochondrial respiration, inhibiting complex I [43] and complex III [44] activity. As PPARG agonists partially disrupt

the mitochondrial respiratory chain, both electron transport and superoxide anion generation are affected. Moreover, a novel mitochondrial target protein for PPAR γ agonists (“mito-NEET”) has recently been identified [45]. MitoNEET was found associated with components of complex III, suggesting how PPAR γ agonists binding to mitoNEET could selectively block different mitochondrial targets. PPAR γ agonists' ability to influence mitochondrial function might contribute to their inhibitory effects on reactive oxygen species generation evoked by ischemia reperfusion.

III. PTX a xanthine-derived non-specific PDE inhibitor, has been used for the treatment of intermittent claudication in patients suffering from peripheral and cerebrovascular disease [31]. Through its hemorheologic properties, PTX can modify the conformation of red blood cells and improve the microcirculatory blood flow in chronic arterial insufficiency. On the other hand recently PTX has been used in the attenuation of the inflammatory response too. PTX can decrease the inflammatory process after cardiopulmonary bypass in open-heart surgery, sepsis, and acute respiratory distress syndrome (ARDS) in neonates. PTX exerts multiple beneficial effects on the inflammatory cascade by increasing intracellular cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and decreasing TNF- α and IL-6 synthesis. [46, 47] NF κ B is a transcription factor which plays a double edged sword role in tissue processes. Activation of NF κ B is essential for late preconditioning, in which NF κ B is involved in the up-regulation of inducible NO synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) genes.

NF κ B is also important in reperfusion injury. It contributes to exacerbation of the tissues' lesions sustaining inflammatory reactions. The activation of NF κ B is induced by inter alia hydrogen peroxide.

The relationship between transcription factors and PTX has yet to be determined. PTX dose-dependently reduced NF κ B subunit nuclear translocation when given lipopolysaccharide (LPS). [48] PTX also diminishes NF κ B translocation in activated T lymphocytes. [49] These results suggest that PTX is involved in a common signaling pathway, however, further experimentation is necessary. During investigation of oxidative parameters we have found that postconditioning and PTX administration decreased significantly the plasma levels of MDA comparing to the IR group which further decreased in the “co-treated” group. Postconditioning and administration of PTX could significantly moderate the decrease of GSH level in the groups. Enzyme activity of SOD was significantly higher both postconditioned and PTX-administered groups comparing to IR group. Beside the hemorheological effects, the additive beneficial pathway of PTX can be the anti-inflammatory

effect. Recently El-Ghoneimi et al [50] reported significantly lower levels of serum TNF-alpha and a lower necrotic area in liver tissue in the PTX group. PTX has been shown to downregulate the synthesis of proinflammatory mediators like IL-6, improve microvascular hepatic and intestinal blood flow after hemorrhagic shock. [51,52,53,54] We found that administration of PTX could decrease significantly both the TNF-alpha and the IL-6 concentrations in plasma. The degree of these decreases could be beyond the decrease observed in the postconditioned groups. Our data seems to be confirmed the recent findings, that PTX has anti-inflammatory effects through inhibition of TNF-alpha and IL-6 formation and attenuation of neutrophil adhesion to endothelial cells and platelet activation.

6. Conclusion

Our investigation results showed that postconditioning, which is an endogenous adaptation mechanism, reduced the oxidative stress parameters and the inflammation with regard to the IR injury. The present study showed that inhibition of GST by EA leads to increased phosphorylation of JNK and p38 proapoptotic signaling proteins and abolishes the protective effect of postconditioning. The clinical importance of this study is that postconditioning seems to be an effective, quick and simple method to decrease the reperfusion damages after surgery. In vascular surgery, the administration of EA to the patients could worsen the reperfusion injuries and the postconditioning could not ameliorate these worsening effects. So in case of patients suffering from arterial occlusive vascular disease, the replacement of this diuretic drug by another agent is worthy of considering.

Results of second investigation showed that the administration of a PPARGA can decrease the ischemia reperfusion injury in bilateral acute hind limb ischemia rat model. The time course and the dosage experiments showed that PPARGA can reduce the MDA, increase the GSH, SH and the enzyme activity of SOD. We found that PPARGA may be used more effectively as an inhibitor of oxidative stress during the ischemia reperfusion process at levels as low as 10 to 50 μ M when administered more than 20 minutes prior to reperfusion. The clinical importance of this study is that PPARGAs seem to be an effective, quick and simple method to decrease the reperfusion damages after surgery. So in case of patients suffering from arterial occlusive vascular disease, the administration of this drug during revascularization surgery before the complete restoration of blood flow is worthy of considering.

Results of our third investigation showed that administration of PTX can decrease the extent of ischemia reperfusion injuries including the inflammatory response through its hemorheological- and recently described anti-inflammatory effects. In our study the administration of PTX could reach almost the same protection like ischemic postconditioning. The results of the investigated inflammatory mediators could support the finding, that PTX has anti-inflammatory or immunomodulating effects as well. So the clinical importance of this investigation is the possible beneficial effects of PTX on ischemia-reperfusion injury due to its hemorheological and anti-inflammatory effects.

7. List of the PhD theses

1. Firstly we demonstrated in in-vivo animal experiment that pharmacological inhibition of GST by EA could augment the ischemia reperfusion injury after infrarenal aortic occlusion. Furthermore GST inhibition was associated with different activation of MAP kinases regulating pro- and antiapoptotic pathways under stress conditions.

2. We described first in in-vivo experiment that the protective effect of ischemic postconditioning could not develop in case of GST inhibition by EA. Hypoxia and reoxygenation was able to decrease the activation of JNK and p38 MAPKs, suggest that modulation of MAPK signaling pathways are involved in the postconditioning-induced protection.

3. Beneficial effects of PPARG agonists on ischemia reperfusion injury have been previously documented in the intestine [60, 61, 62], lung [63], heart [64, 65, 66], kidney [67] and, more recently, also in the brain [66, 69]. We described first the positive effects of a PPARGA on ischemia reperfusion injury in the skeletal muscle in in-vivo animal model.

4. We performed at first time time-course and dosage experiments in in-vivo animal model to explain the most effective timing and dosage of administration of PPARGA to decrease the ischemia reperfusion injury after infrarenal aortic occlusion.

5. We proved in in vivo animal model that PTX has an additional anti-inflammatory effect in case of infrarenal aortic ischemia and reperfusion due to attenuation of TNF-alpha and IL-6 concentration.

6. Single shot, high dose administration of PTX (50 mg/kg) could augment the positive effects of ischemic postconditioning.

List of publications

1. Fazekas G, Kasza G, Arató E, Sínay L, Vadász G, Füzi A, Hardi P, Benkő L, Nagy T, Jancsó G, Menyhei G. Cerebralishyperperfúsiósszindrómaésvérnyomás-kontroll. ORVOSI HETILAP 156:(26) pp. 1049-1053. (2015)
2. T Nagy, V Kovács, P Hardi, T GyVeres, I Takács, G Jancsó, L Sinay, G Fazekas, Ö Pintér, E Arató. Inhibition of Glutathione S-transferase by ethacrynic acid augments the ischaemia-reperfusion damages and apoptosis and attenuates the positive effect of ischemicpostconditioning in bilateral acute hindlimb ischemia rat model. JOURNAL OF VASCULAR RESEARCH 52:(1) pp. 53-61. (2015)
IF: 2.901
3. Szelechman I, Jancso G, Vadasz G, Kasza G, Sinay L, Fazekas G, Hardi P, Nagy T, Benko L, Gadacsi M, Lima N, Menyhei G, Arato E. Amedenceiverőérhelyreállításának dilemma szeptikus aortagraftesetek kapcsán. MAGYAR SEBÉSZET 68:(1) pp. 12-17. (2015)
4. Nagy T, Kasza G, Sínay L, Benkő L, Fazekas G, Hardi P, Jancsó G, Szelechman I, Hughes R, Menyhei G, Kollár L, Arató E. Das posttraumatische Pseudoaneurysma der A. ulnaris und seine operative Versorgung - eine Fallbeschreibung. PERFUSION-GERMANY 27:(6) pp. 200-203. (2014)
5. Ripp K, Szilagyi K, Nagy M, Jeges S, Nagy T, Arato E. Prevalence of lymphedema in patients following breast surgery in Hungary. HEALTHMED 8:(3) pp. 372-376. (2014)
6. Arató Endre, Kasza Gábor, Sínay László, Benkő László, Fazekas Gábor, Hardi Péter, Füzi Árpád, Nagy Tibor, Masoud Shafei, Jancsó Gábor, Kollár Lajos, Menyhei Gábor. Aortobifemorális graft gennyedésmegoldásának kései szövődményeként jelentkező subclaviaálaneurysma endovascularis kezelése. MAGYAR SEBÉSZET 65:(3) pp. 92-96. (2012)

Cumulative impact factor: 2.901

Acknowledgements

First, I would like to thank my family for their love and support, especially my wife Helga and my daughter Dóri, who supported, encouraged and loved me.

I would like to take this opportunity to express my thanks for the overwhelming support I have received from my supervisor Dr. Arató Endre and Dr. Gábor Jancsó in completing this work.

I would also like to acknowledge the help and assistance of Dr. Péter Hardi, Viktória Kovács, Dr. Tünde Gyöngyvér Veres, Dr. Mária Kürthy, Dr. János Lantos, Dr. Ildikó Takács and of all the staff at the Department of Surgical Research and Technique of Pécs University to carrying out the investigations and giving me the inward support over the years.

I would thank the indispensable help in the molecular biology methods to Ágnes Nagy and Viktória Kovács in the Department of Surgical Research and Techniques of Pécs University.

References

- ¹E. Arató, M. Kürthy, G. Jancsó, H. Merkli, E. Pál, L. Kollár and E. Róth. The revascularization syndrome of the lower limbs, *Perfusion* 5 (2005), 168–176.
- ²T. Gori, G. Di Stolfo, S. Sicuro, S. Dragoni, J.D. Parker and S. Forconi. The effect of ischemia and reperfusion on microvascular function: a human in vivo comparative study with conduit arteries, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 35(1/2) (2006), 169–173.
- ³T. Gori, M. Lisi and S. Forconi. Ischemia and reperfusion: the endothelial perspective. A radical view, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 35 (2006), 31–34 (Review).
- ⁴Piper HM, Meuter K, Schafer C. Cellular mechanisms of ischaemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg.* 2003; 75: S644–8.
- ⁵Takemura G, Fujiwara H. Morphological aspects of apoptosis in heart diseases. *J Cell Mol Med.* 2006; 10: 56–75.
- ⁶Ji Y, Pang QF, Xu G, Wang L, Wang JK, Zeng YM. Exogenous hydrogen sulfide postconditioning protects isolated rat hearts against ischaemia-reperfusion injury. *Eur J Pharmacol.* 2008 Jun 10;587(1-3):1-7.
- ⁷Z.Q. Zhao, J.S. Corvera, M.E. Halkos, F. Kerendi, N.P.Wang, R.A. Guyton and J. Vinten-Johansen. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 285 (2003), H579–H588.
- ⁸Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. BiolChem* 1974 Nov 25;249(22):7130-9
- ⁹Tew KD. Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. *Cancer Res.*, 1994;54:4313–4320.
- ¹⁰Hayes JD, and McLellan LI. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a coordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radical Res.* 1999;31:273–300.
- ¹¹Davis RJ. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase. *Biochem. Soc. Symp.*, 1999;64:1–12.
- ¹²Tirona RG, Pang KS. Bimolecular glutathione conjugation kinetics of ethacrynic acid in rat liver: in vitro and perfusion studies. *J PharmacolExpTher.* 1999 Sep;290(3):1230-41.
- ¹³Berger, J., Moller, D.E., 2002. The mechanisms of action of PPARs. *Annu. Rev. Med.* 53, 409–435.
- ¹⁴Lemberger, T., Desvergne, B., Wahli, W., 1996. Peroxisome proliferator-activated receptors: a nuclear receptor signaling pathway in lipid physiology. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 12, 335–363.
- ¹⁵Vamecq, J., Latruffe, N., 1999. Medical significance of peroxisome proliferator-activated receptors. *Lancet* 354, 141–148.
- ¹⁶Ricote, M., Li, A.C., Willson, T.M., Kelly, C.J., Glass, C.K., 1998. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 391, 79–82.
- ¹⁷Petrova, T.V., Akama, K.T., Van Eldik, L.J., 1999. Cyclopentenone prostaglandins suppress activation of microglia: down-regulation of inducible nitric oxide synthase by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 4668–4673.
- ¹⁸Colville-Nash, P.R., Qureshi, S.S., Willis, D., Willoughby, D.A., 1998. Inhibition of inducible nitric oxide synthase by peroxisome proliferator-activated receptor agonists: correlation with induction of heme oxygenase 1. *J. Immunol.* 161, 978–984.
- ¹⁹Yki-Jarvinen, H., 2004. Thiazolidinediones. *N. Engl. J. Med.* 351, 1106–1118.
- ²⁰Kielian, T., Drew, P.D., 2003. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists on central nervous system inflammation. *J. Neurosci. Res.* 71, 315–325.

-
- ²¹Nakajima, A., Wada, K., Miki, H., Kubota, N., Nakajima, N., Terauchi, Y., Saubermann, L.J., Kadowaki, T., Blumberg, R.S., Nagai, R., Matsushashi, N., 2001. Endogenous PPAR gamma mediates anti-inflammatory activity in murine ischemia-reperfusion injury. *Gastroenterology* 120, 460–469.
- ²²Ichikawa, H., Naito, Y., Takagi, T., Tomatsuri, N., Yoshida, N., Yoshikawa, T., 2002. A specific peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand, pioglitazone, ameliorates gastric mucosal damage induced by ischemia and reperfusion in rats. *Redox Rep.* 7, 343–346.
- ²³Naito, Y., Takagi, T., Uchiyama, K., Handa, O., Tomatsuri, N., Immoto, E., Kokura, S., Ichikawa, H., Yoshida, N., Yoshikawa, T., 2002. Suppression of intestinal ischemia-reperfusion injury by a specific peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand, pioglitazone, in rats. *Redox Rep.* 7, 294–299.
- ²⁴Okada, M., Yan, S.F., Pinsky, D.J., 2002. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) activation suppresses ischemic induction of Egr-1 and its inflammatory gene targets. *FASEB J.* 16, 1861–1868.
- ²⁵Wayman, N.S., Hattori, Y., McDonald, M.C., Mota-Filipe, H., Cuzzocrea, S., Pisano, B., Chatterjee, P.K., Thiernemann, C., 2002. Ligands of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR-gamma and PPARalpha) reduce myocardial infarct size. *FASEB J.* 16, 1027–1040.
- ²⁶Khandoudi, N., Delerive, P., Berrebi-Bertrand, I., Buckingham, R.E., Staels, B., Bril, A., 2002. Rosiglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, inhibits the Jun NH(2)-terminal kinase/activating protein 1 pathway and protects the heart from ischemia/reperfusion injury. *Diabetes* 51, 1507–1514.
- ²⁷Yue, T.L., Chen, J., Bao, W., Narayanan, P.K., Bril, A., Jiang, W., Lysko, P.G., Gu, J.L., Boyce, R., Zimmerman, D.M., Hart, T.K., Buckingham, R.E., Ohlstein, E.H., 2001. In vivo myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone. *Circulation* 104, 2588–2594.
- ²⁸Sivarajah, A., Chatterjee, P.K., Patel, N.S., Todorovic, Z., Hattori, Y., Brown, Stewart, K.N., Mota-Filipe, H., Cuzzocrea, S., Thiernemann, C., 2003. Agonists of peroxisome-proliferator activated receptor-gamma reduce renal ischemia/reperfusion injury. *Am. J. Nephrol.* 23, 267–276.
- ²⁹Sundararajan, S., Gamboa, J.L., Victor, N.A., Wanderi, E.W., Lust, W.D., Landreth, G.E., 2005. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands reduce inflammation and infarction size in transient focal ischemia. *Neuroscience* 130, 685–696.
- ³⁰Shimazu, T., Inoue, I., Araki, N., Asano, Y., Sawada, M., Furuya, D., Nagoya, H., Greenberg, J.H., 2005. A peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist reduces infarct size in transient but not in permanent ischemia. *Stroke* 36, 353–359.
- ³¹Porter JM, Cutler BS, Lee BY, et al. Pentoxifylline efficacy in the treatment of intermittent claudication: multicenter controlled double-blind trial with objective assessment of chronic occlusive arterial disease patients. *Am Heart J.* 1982;104:66-72.
- ³²Placer ZA, Cushman LL, Johnson BC. Estimation of product of lipidperoxidation (malonyldialdehyde) in biochemical systems, *AnalBiochem.* 1966 Aug;16(2):359-64.
- ³³Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and non protein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent, *AnalBiochem.* 1968 Oct 24;25(1):192-205.
- ³⁴Granger DN, Korthuis RJ. Physiologic mechanisms of postischaemic tissue injury. *Annu Rev Physiol* 1995;57: 311-332.
- ³⁵Róth E, Marczin N, Balatonyi B, Ghosh S, Kovács V, Alotti N, Borsiczky B, Gasz B. Effect of a glutathione S-transferase inhibitor on oxidative stress and ischaemia-reperfusion-induced apoptotic signaling of cultured cardiomyocytes. *Exp. Clin. Cardiol.* 2011;16(3):92-96.
- ³⁶Laborde E. Review. Glutathione transferases as mediators of signaling pathways involved in cell proliferation and cell death. *Cell Death and Differentiation* 2010 Sep;17(9):1373-80.
- ³⁷T. Gori, M. Lisi and S. Forconi. Ischemia and reperfusion: the endothelial perspective. A radical view, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 35 (2006), 31–34 (Review).

-
- ³⁸Adler V, Yin Z, Fuchs SY, Benezra M, Rosario L, Tew KD et al. Regulation of JNK signaling by GSTp. *EMBO J* 1999 Mar 1;18(5):1321-34.
- ³⁹Weston CR, Davis RJ. The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Genet Dev* 2002 Feb;12(1):14-21.
- ⁴⁰Davis W Jr, Ronai Z, Tew KD. Cellular Thiols and Reactive Oxygen Species in Drug-Induced Apoptosis. *J PharmacolExpTher*. 2001 Jan;296(1):1-6.
- ⁴¹Sun HY, Wang NP, Halkos M, Kerendi F, Kin H, Guyton RA, Vinten-Johansen J, Zhao ZQ. Postconditioning attenuates cardiomyocyte apoptosis via inhibition of JNK and p38 mitogenactivated protein kinase signaling pathways. *Apoptosis*. 2006 Sep;11(9):1583-93.
- ⁴²Kudin, A.P., Debska-Vielhaber, G., Kunz, W.S., 2005. Characterization of superoxide production sites in isolated rat brain and skeletal muscle mitochondria. *Biomed. Pharmacother.* 59, 163–168.
- ⁴³Brunmair, B., Staniek, K., Althaym, A., Clara, R., Roden, M., Gnaiger, E., Nohl, H., Waldhausl, W., Fornsinn, C., 2004. Thiazolidinediones, like metformin, inhibit respiratory complex I: a common mechanism contributing to their antidiabetic actions, *Diabetes* 53, 1052–1059.
- ⁴⁴Dello Russo, C., Gavriluk, V., Weinberg, G., Almeida, A., Bolanos, J.P., Palmer, J., Pelligrino, D., Galea, E., Feinstein, D.L., 2003. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma thiazolidinedione agonists increase glucose metabolism in astrocytes. *J. Biol. Chem.* 278, 5828–5836.
- ⁴⁵Colca, J.R., McDonald, W.G., Waldon, D.J., Leone, J.W., Lull, J.M., Bannow, C.A., Lund, E.T., Mathews, W.R., 2004. Identification of a novel mitochondrial protein (“mitoNEET”) cross-linked specifically by a thiazolidinedione photoprobe. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 286, E252–E260.
- ⁴⁶Dunzendorfer S, Schratzberger P, Reinisch N, Kahler CM, Wiedermann CJ. Pentoxifylline differentially regulates migration and respiratory burst activity of the neutrophil. *ANN N Y Acad Sci.* 1997;15:330-340.
- ⁴⁷Strieter RM, Remick DG, Ward PA, et al. Cellular and molecular regulation of tumor necrosis factor-alpha production by pentoxifylline. *BiochemBiophys Res Commun.* 1988;155:1230-1236.
- ⁴⁸Haddad JJ, Land SC, Tarnow-Mordi WO, Zembala M, Kowalczyk D, Lauterbach R. Immunopharmacological potential of selective phosphodiesterase inhibition: II – evidence for the involvement of an inhibitory-kappaB/nuclear factor kappa B-sensitive pathway in alveolar epithelial cells. *J PharmacolExpTher.* 2002;300:567-576.
- ⁴⁹Wang W, Tam WF, Hughes CCW, Rath S, Sen R. c-Rel is a target of pentoxifylline-mediated inhibition of T lymphocyte activation. *Immunity* 1997;6:165-174.
- ⁵⁰El-Ghoneimi A, Cursio R, Schmid-Alliana A, Tovey M, Lasfar A, Michiels JF, et al. Pentoxifylline inhibits liver expression of tumor necrosis factor alpha mRNA following normothermic ischemia-reperfusion. *HPB (Oxford)* 2007;9:112-119.
- ⁵¹Flynn WJ, Cryer HG, Garrison RN. Pentoxifylline restores in-testinal microvascular blood flow during resuscitated hemorrhagic shock. *Surgery* 1991;110:350-356.
- ⁵²Hernández E, Bucio L, Souza V, Escobar MC, Gómez-Quiroz LE, Farfán B, et al. Pentoxifylline downregulates alpha (I) col-lagen expression by the inhibition of I kappa balphadegradation in liver stellate cells. *CellBiolToxicol* 2008;24:303-314.
- ⁵³Marzi I, Maier M, Herzog C, Bauer M. Influence of pentoxifylline and albifylline on liver microcirculation and leukocyte adhesion after hemorrhagic shock in the rat. *J Trauma* 1996;40:90-96.
- ⁵⁴Wang P, Ba ZF, Morrison MH, Ayala A, Chaudry IH. Mechanism of the beneficial effects of pentoxifylline on hepatocellular function after trauma hemorrhage and resuscitation. *Surgery* 1992;112:451-458.