

**A posztkondicionálás hatásának vizsgálata vese
iszkémia-reperfúziót követően metabolikusan
károsított patkánymodellben**

Egyetemi doktori (Ph. D.) értekezés

Dr. Miklós Zsanett Éva

Témavezetők: Dr. Jancsó Gábor, Dr. Kürthy Mária

Programvezető: Prof. Dr. Róth Erzsébet

A Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Komoly Sámuel



Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar

Sebészeti Oktató és Kutató Intézet

2013

TARTALOMJEGYZÉK	2
Rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezetés	6
1.1. Az iszkémia-reperfúziós károsodás	7
1.2. A vese iszkémiás károsodásainak kialakulása	11
1.3. Az iszkémia-reperfúziós károsodást csökkentő eljárások	12
1.4. A diabétesz mellitusz és a posztkondicionálás	16
2. Célkitűzések	17
3. A posztkondicionálás hatásának vizsgálata a vese iszkémia-reperfúziós károsodásaira hiperkoleszterinémiában	19
3.1. Célkitűzések	19
3.2. Anyag és módszerek	19
3.2.1. A kísérleti csoportok és műtéttechnikai módszerek	19
3.2.2. Laboratóriumi vizsgálatok	21
3.2.3. Morfológiai vizsgálatok	24
3.2.4. Statisztikai analízis	25
3.3. Eredmények	26
3.3.1. Laboratóriumi vizsgálatok eredményei	26
3.3.2. Morfológiai vizsgálatok eredményei	32
3.4. Megbeszélés	36
4. Az iszkémiás posztkondicionálás hatásának vizsgálata vese iszkémia-reperfúziót követően 2-es típusú diabétesz mellituszban	40
4.1. Bevezetés	40
4.2. Célkitűzések	41
4.3. Anyag és módszerek	42
4.3.1. A kísérleti modellek, vizsgálati módszerek	42
4.3.2. Laboratóriumi vizsgálatok	43
4.3.3. Statisztikai analízis	46
4.4. Eredmények	47
4.4.1. Az orális glükózterhelés eredményei	49
4.4.2. A műtėti eredmények szérumban és teljes vérben	52
4.4.3. A műtėti eredmények májszövetben	54
4.5. Megbeszélés	55

5. Az iszkémiás és farmakológiai posztkondicionálás hatása a vese iszkémia-reperfúziós károsodásaira streptozotocin-indukált diabétesz mellituszban	59
5.1. Bevezetés	59
5.2. Célkitűzések	63
5.3. Anyag és módszerek	63
5.3.1. A kísérleti csoportok és műtéttechnikai módszerek	63
5.3.2. Laboratóriumi vizsgálatok	65
5.3.3. Morfológiai vizsgálatok	65
5.3.4. Statisztikai analízis	66
5.4. Eredmények	66
5.4.1. Laboratóriumi vizsgálatok eredményei	66
5.4.2. Morfológiai vizsgálatok eredményei	69
5.5. Megbeszélés	71
6. Következtetések	72
7. Összefoglalás, új eredmények	74
Köszönetnyilvánítás	76
Publikációs jegyzék	77
Irodalomjegyzék	80

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

Akt	szerin/treonin specifikus protein kináz
AMP	adenozin-monofoszfát
AMPK	AMP aktivált protein-kináz
Arb Unit	tetszőleges egység (Arbitrary Unit)
ATP	adenozin-trifoszfát
Ca²⁺	kalcium ion
CAT	kataláz enzim
COX	ciklooxygenáz enzim
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
eNOS	endoteliális nitrogén monoxid szintáz
ER	endoplazmás retikulum
ERK	extracelluláris szignál által regulált kináz
FADD	Fas-Associated protein with Death Domain
FFA	szabad zsírsav (Free Fatty Acid)
GC	guanilat cikláz
GIP	glükóz dependens inzulinotrop peptid (gasztrikus inhibitor peptid)
GLP-1	glukagonszerű peptid-1
GLUT	glükóz transzporter
GPX	glutation-peroxidáz
GSH	redukált glutation
GSK-3	glikogén szintáz kináz-3
H₂O₂	hidrogén-peroxid
HOMA_{IR}	Homeostasis Model Assessment-of β cell funkcion and Insulin Resistance
HRPO	tormaperoxidáz (horseradish peroxidase)
IFG	károsodott éhgyomri vércukorszint (Impaired Fasting Glucose)
IGF-1	inzulinszerű növekedési faktor-1
IGT	károsodott glükóz tolerancia (Impaired Glucose Tolerance)
IκB	inhibitor κ B
IL	interleukin
iNOS	indukálódott nitrogén monoxid szintáz
INZ	inzulin
i.p.	intraperitoneál alkalmazás
IP3	inozitol-trifoszfát
IR	iszkémia-reperfúzió
IRS	izulinreceptor-szubsztrát
JNKs	c- Jun N-terminal Kináz
K⁺	kálium ion
K_{ATP}	ATP-függő kálium-csatorna
LDH	laktát dehidrogenáz
LDL	alacsony denzitású lipoprotein
LTB4	leukotrién B4
MAPK	mitogén-aktivált protein kináz (Mitogen Activated Protein Kinase)
ME	műtét előtt
MEK	Mitogen Activated Protein Kinase Kinase (MAPK kinase)

Mg²⁺	magnézium ion
mTOR	Mammalian Target Of Rapamycin
mPTP	Mitochondrial Permeability Transition Pore
MU	műtét után
NA⁺	nátrium ion
NAD⁺	nikotinamid adenin dinukleotid
NADP(H)	nikotinamid adenin dinukleotid fosztát
NFκB	Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NO	nitrogén-monoxid
·NO₂	peroxynitrit
OGTT	orális glükóz tolerancia teszt
·OH	hidroxil gyök
·O²⁻	szuperoxid szabad gyök
p70s6K	70 kDa ribosomal protein S6 kináz
PAF	vérlemezke aktiváló faktor (Platelet Activating Factor)
PK	poszt kondicionálás
PI3K	foszfatidilinozitol 3-kináz
PIP₂	foszfatidilinozitol-biszfoszfát
PIP₃	foszfatidilinozitol-triszfoszfát
PKB	proteinkináz B
PKC	proteinkináz C
PMA	forbol-12-mirisztát-13-acetát
p.o.	per os
PTCA	Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty
RAF	protoonkogén szerin/treonin protein kináz
RAS	protoonkogén-Rat sarcoma
RISK	a reperfüziós károsodás mentő kinázai(Reperfusion Injury Salvage Kinase)
ROS	szabad gyök (Reactive Oxygen Species)
RPS6	riboszomal protein S6
s	másodperc (secundum)
SAFE	survivor activating factor enhancement
SERCA	Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca ²⁺ -ATPase
SOD	szuperoxid-dizmutáz
STZ	streptozotocin
T2DM	2-es típusú diabétesz mellitusz
TGF-β	transzformáló növekedési faktor-β
TNF-α,β	Tumor Nekrózis Faktor-α, β
TOR	a rapamycin kináz célpontja (kinase Target Of Rapamycin)
TRADD	Tumor necrosis factor Receptor type 1-Associated Death Domain protein
TRAF2	TNF Receptor-Associated Factor 2
tsg	testtömeggramm
XO	xantin-oxidáz

1. BEVEZETÉS

A sebészeti gyakorlatban komoly problémát jelent a transzplantációt és hasi érműtéteket kísérő súlyos szöveti **iszkémia-reperfúziós (IR) károsodás**, mely nemcsak az érintett szerv, hanem távoli szervek, gyakran az egész szervezet integritását is érinti. Érműtétek, szervátültetés során az iszkémia-reperfúzió okozta károsodás csökkentése és annak megelőzése kiemelt klinikai jelentőséggel bír. Az IR károsodás okozta elváltozások okainak és mechanizmusának ismerete hozzásegíthet az egyre hatékonyabb védelmi stratégiák kidolgozásához, melyek segítségével a műtéteket követően javíthatók a betegek életkilátása és túlélése.

A reperfúziós károsodás csökkentésének egyik legígéretesebb kísérletes lehetőségét, az iszkémiás **prekondicionálást** mintegy 30 éve fedezték fel^{1,2}. A tervezett iszkémia-reperfúzióval járó beavatkozások (érrekonstrukció, szervtranszplantáció, koronária bypass) esetében a prekondicionálás a klinikum számára meglepően hatékonyan bizonyult, azonban terápiás használhatóságát jelentősen beszűkíti, hogy akut érelzáródások (embólia, trombózis) esetében nem kivitelezhető.

Az első áttörést Vinten-Johansen és munkatársai érték el 2002-ben azáltal, hogy megfigyelték kísérletes körülmények között a **posztkondicionálás** jelenségét^{3,4}. A posztkondicionálás tartósan fennálló iszkémiát követően a reperfúziós periódus kezdetén alkalmazott rövid intermittáló hipoxiás stimulusokat jelenti. Az iszkémiás posztkondicionálás által kiváltott endogén adaptáció a jelenleg ismert leghatékonyabb védelem a reperfúziós károsodásokkal szemben. A posztkondicionálással kapcsolatos vizsgálatok középpontjában eddig az iszkémiás szívbetegség és a módszer kardioprotektív hatása állt. Érsebészetben, alsó végtagi IR károsodás tekintetében 2007-től több munkacsoport végez vizsgálatokat.

A **cukorbetegség (diabétesz mellitusz)** és hipertonia növelik az IR okozta károsodás kockázatát⁵. A diabétesz mellitusz a fejlett ipari országok lakosait sújtó vezető kórokok és halálokok egyike. Kialakulásáért az inzulin abszolút vagy relatív hiánya okolható, melyben a működőképes béta-sejtek csökkent mennyisége és/vagy a szövetek inzulinrezisztenciája a fő tényező. Leírták, hogy genetikusan diabéteszes ob/ob egereken miokardiális infarktust követően a posztkondicionálás védő hatása nem érvényesült⁶.

Kevés preklinikai vizsgálat történt a posztkondicionálás alkalmazásával a vese IR károsodásának csökkentésére⁷, míg **metabolikus eltérések jelenlétében** tudomásunk szerint még nem vizsgálták.

1.1. Az iszkémia-reperfúziós károsodás

Az IR károsodás releváns probléma minden olyan esetben, amikor a keringés egy szegmense (trombus vagy embólia következtében) kizáródik a keringésből, vagy sebészeti úton kizárják, majd újból megnyílik, illetve megnyitják.

Az IR károsodás számos reakciósor egymásba kapcsolódó láncolata, melynek egy része az iszkémia alatt, míg másik látványosabb része a keringés helyreállítását - reperfúziót - követően jön létre. Reaktív oxigén szabad gyökök (ROS) megjelenése, a pH eltolódása, a „no reflow” jelenség, illetve a gyulladásos válaszreakciók kialakulása számos mediátor részvételével határozza meg a károsodott sejt további sorsát, mely vagy a túlélés, vagy a sejthalál (*1. ábra*).

Iszkémia következtében funkcionális, metabolikus és strukturális változások jönnek létre. Az iszkémia hatására csökken a sejt ATP tartalma, ezzel párhuzamosan csökken a membránok Na^+/K^+ ATPáz aktivitása, károsodnak a transzmembrán fehérjék, fokozódik a K^+ -kiáramlás, ioneloszlási zavarok lépnek fel. A mitokondriális mátrix felhígul, vezikula dilatáció és kismértékű citoskeleton-átrendeződés figyelhető meg. A mitokondriumok nemcsak az oxidatív stressz érzékeny célpontjai, hanem a szabad gyökök egyik legfontosabb sejten belüli termelői. A folyamat során felerősödik a glikolízis, a pH csökkenni kezd, a sejt hipoxiássá válik. Kórosan megváltozik a sejt ionháztartása. Az iszkémia okozta szerkezeti és működésbeli károsodások egy határig helyreállíthatóak, a károsodás reverzibilis, ha a vérrellátás spontán, vagy terápiás beavatkozás (pl.: PTCA, érképletek kirekesztésének megszüntetése) hatására helyreáll (reperfúzió). Amennyiben irreverzibilis károsodások kialakulnak, ekkor már a sejtpusztulás elkerülhetetlen (point of no return). Megváltoznak a sejtfelszíni antigének, a sérült lizoszómákból kiáramló emésztőenzimek károsítják a makromolekulákat. A sejt szerkezete szétesik és beáll a sejthalál.

A fenti folyamatot követi a gyulladásos sejtek megjelenése, érfalhoz való kitapadása. A kis erek falát szegélyező endotélsejtek szerepe meghatározó, különösen érzékenyen reagálnak hipoxia és reoxigenizáció okozta károsító hatásokra⁸. Az endotél vazóaktív anyagok és szignáltranszdukciós molekulák, mint a nitrogén-monoxid (NO), prosztaciklinek, endothelinek, interleukinok, adhéziós molekulák és fibrinolitikus faktorok szintézisével és kibocsátásával reagál⁹. Megszűnik az egyensúly a relaxáló és a vazokonstriktor faktorok között, az anti- és a prokoaguláns tényezők valamint a

növekedést serkentő és gátló anyagok között. Az így kialakult állapotot összefoglalóan endotél diszfunkciónak nevezzük.

Mára egyre inkább elfogadottá válik az a nézet, hogy számos kardiovaszkuláris rizikótényező, mint például az oxidatív stresszt okozó dohányzás, cukorbetegség, elhízás tulajdonképpen az endotél diszfunkcióját előidézve fejt ki károsító hatását¹⁰. Patológias állapotokban a szabadgyök-képződés is jelentősen megnő¹¹. Az emelkedett szabadgyök-koncentráció önmagában is felelőssé tehető az endotél diszfunkcióért, mivel a szuperoxid szabad gyökök az endotélhez közvetlenül kapcsolódva, direkt módon képesek azt károsítani, elsősorban a NO módosítása révén.¹²

A reperfüzió nélkülözhetetlen az iszkémiás károsodásból való felépüléshez. Amikor a szerv keringése spontán, vagy terápiás beavatkozás hatására helyreáll, azonban paradox módon a szervkárosodás fokozódhat is, és kialakulhat a reperfüziós károsodás. Ennek ellenére a reperfüzió az egyetlen módszer, mely helyreállítja a szövet oxigén- és energiaellátását, valamint elszállítja a felhalmozódott toxikus metabolitokat. Ezzel egyrészt megmentheti az iszkémia során reverzibilisen károsodott sejteket¹³, másrészt azonban paradox módon a sejtek további károsodásához vezet^{14,15} a hirtelen megnövekvő oxigénkínálatból eredő nagy mennyiségű szabadgyök-képződés miatt, ezt a jelenséget „oxigén paradoxon”-ként tárgyalja az irodalom^{16,17,18}.

A reperfüzió során a szabad gyökök többféle mechanizmussal keletkezhetnek. Az endotélben megtalálható xantin-dehidrogenáz jelentős szereppel bír a reperfüziós károsodás létrehozásában az iszkémia alatt xantinoxidázzá (XO) alakulva. Ez az enzim katalizálja ugyanis a nukleotid-degradáció sebesség meghatározó lépését, az ATP lebontása során keletkező hipoxantin – xantin átalakulást. A folyamatban az enzim elektron akceptorként oxigént használ fel¹⁹, működése közben reaktív oxigén származékok [szuperoxid szabad gyök ($\cdot\text{O}^{2-}$) és hidrogén-peroxid (H_2O_2)] keletkeznek²⁰. A XO-nak tulajdonítják továbbá az IR következtében kialakuló távoli szervekben létrejövő károsodásokat is. A XO elsősorban a reperfüziót követő első percekben felelős az ROS termeléséért addig, amíg vissza nem nyeri dehidrogenáz funkcióját. Az ezt követő, jóval nagyobb mértékű oxidatív stressz forrása a kitapadó, aktivált fehérvérsejtek, melyek felszínén található NADPH-oxidáz aktiválódása révén képes a molekuláris oxigén redukcióját elvégezni hidrogén-peroxiddá és szuperoxiddá. Ez az ún. „respiratory burst”-ként ismert jelenség. A granulocita-mieloperoxidáz enzim révén katalizált folyamatban hipoklórossav keletkezik H_2O_2 felhasználásával. A neutrofil eredetű H_2O_2 és a monoklóraminok serkentik a vérlemezke aktiváló faktor (PAF)

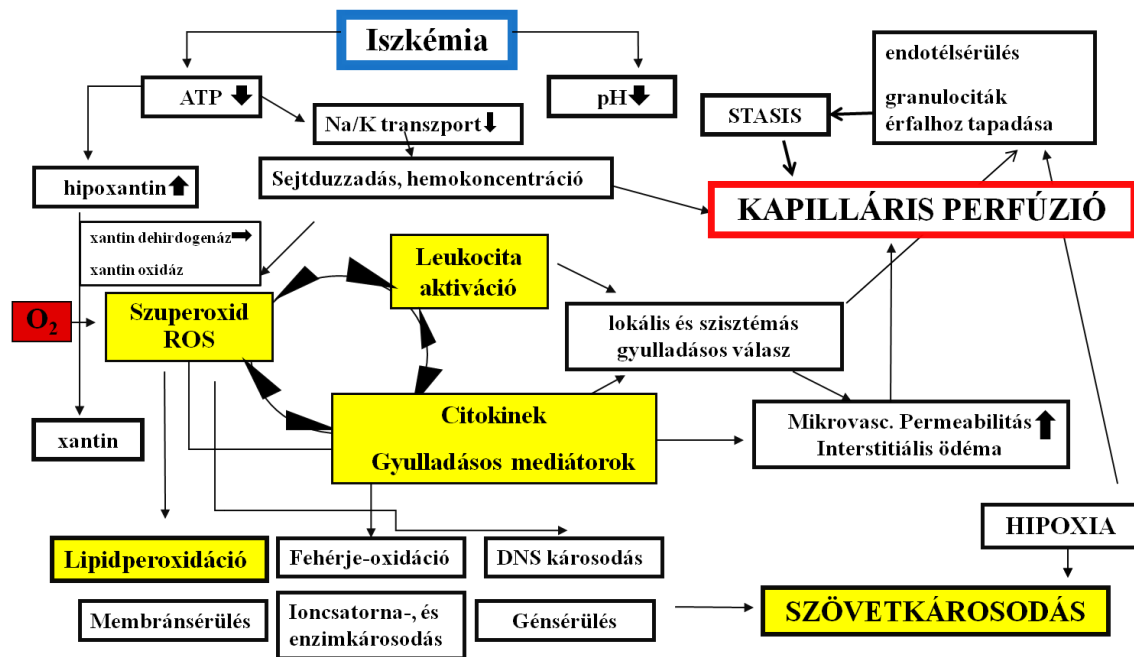
képződését a vaszkuláris endotélben, ami fokozza a leukocita adhéziót²¹. A reaktív oxigén intermedierek a kemotaxisban proinflammatorikus anyagok termelésének serkentése és felszabadítása révén játszanak szerepet.

Ha a keletkezett szabad gyökök mennyisége meghaladja a sejtek endogén antioxidáns kapacitását, kialakul az oxidatív stressz. A szabad gyökök olyan láncreakciókat generálnak, melyek hatására az érintett molekulák maguk is szabad gyökként viselkednek, reaktív lipid, nitro és peroxid gyökök keletkeznek és további sejtkárosító hatásokat okoznak. A nagy tömegben keletkező oxidáns szabad gyökök számos biomolekula károsodását hozzák létre. A károsodó membránlipidek, proteinek, szénhidrátok és nukleinsavak számos enzim és receptor működését befolyásolják. A reaktív gyökök DNS keresztkötéseket, nukleinsav hasítást és bázis hidroxilációs folyamatokat hoznak létre. A többszörösen telítetlen zsírsavak károsodása révén lipidperoxidáció jön létre. A klasszikus láncreakció eredményeként zsírsav-peroxilgyökök és lipid-peroxidok képződnek. A végeredmény a kompartmentalizációt biztosító membránok integritásának elvesztése, a kontraktilis apparátus károsodása, a mitokondrium-membrán energiatermelésének, iontranszportjának sérülése és idővel visszafordíthatatlan sejt- és szövetkárosodás.

A szabad gyökök a leukocita aktivációt és kitapadást sem közvetlenül hozzák létre, hanem az endotél sejtmembránra lokalizálódó foszfolipáz-A2 aktiválása révén képződő arachidonsav tovább alakításával vezetnek erős kemoattraktánsok, mint a leukotrién-B4 (LTB4) és a PAF fokozott szintéziséhez. Az általuk kiváltott hatások és a belőlük felszabaduló mediátorok a gyulladási reakció szerves részét képezik, melyeket számos kemotaktikus anyag vonz a károsodás területére. Közülük sejtes eredetűek a TNF- α , a LTB4, a PAF, az IL-1, és az IL-8, valamint különböző sejttypusok növekedési faktori. A folyamat eredménye: leukostasis, azaz a fehérvérsejtek lassult keringése, mely akadályozza a mikrokeringést. Áramlásuk lelassulása nagyban hozzájárul a reperfüzió utáni mikrokeringés elégtelenségének (no-reflow jelenség) kialakulásához²².

Legnagyobb jelentőségű sejt szintű válasz a reaktív oxigéngyökök fokozott képződése, melyhez hozzájárul a granulocitákban a gyulladás hatására indukálódott nitrogén monoxid szintáz (iNOS) enzim, illetve a NO csökkent felszabadulása az endotél sejtekből. Iszkémia-reperfüziós károsodásban megváltozik a mikrovaszkuláris apparátus endotél sejtjeiben a NO-O²⁻ közötti egyensúly. Az NO-képződés meghaladja a szuperoxid-produkcióját, és ennek következménye az arteriolák relaxációs zavara. A ma leginkább elfogadott nézet szerint normál körülmények között az NO-képződés

mértéke meghaladja a reaktív szabadgyök-felszabadulás ütemét. Így a nitrogén-monoxid hatékonyan pufferozza, megköti a minimális mennyiségű intracelluláris szabad gyököket; csökkenti az arteriolák tónusát a simaizomzat guanilat-cikláz aktivációján keresztül; megakadályozza a vérlemezkék aggregációját és thrombus képződését; és minimálisra csökkenti az adhezív interakciókat a leukociták és az endotél sejtek felszíne között²³. Az IR az endotél dependens aktív vazodilatátor tónus csökkenésével jár, ezért a NO vazodilatátor hatásának elmaradása a felelős.



1. ábra: Az iszkémia-reperfúziós károsodásban szerepet játszó folyamatok. Iszkémiát követően a sejt ATP szintje csökken, a membrántranszport folyamatok kórossá válnak, a szöveti pH acidotikus irányba változik. A folyamatot gyulladásos sejtek, főleg neutrofil granulociták aktiválódása és ér falhoz való kitapadása követi. A keringés ismételt megindulását robbanásszerű szabadgyök-képződés kíséri, mellyel párhuzamosan számos citokin és gyulladásos mediátor szabadul fel. A folyamat eredménye a kiserekben a keringés lassulása, mely akadályozza a kapilláris perfúziót, létrehozva a reperfúziós károsodást.

A mitokondrium belső membránjában tranzíciós pórusok (mPTP) nyílnak meg, melyek hozzájárulnak az energiatermelő folyamat teljes dezorganizációjához²⁴ illetve a nekrozis és/vagy apoptózis megjelenéséhez a reperfúzió során. Az IR károsodás kialakulásában az mPTP nyitása kulcsszerepet tölt be. Az iszkémia alatt még zárt állapotú pórusok a korai reperfúzió folyamán fokozatosan kinyílnak. Ennek kialakulásáért feltehetőleg az intracelluláris kalcium és oxigén szabad gyökök felszaporodása a felelős. Nagy tömegben keletkező oxigén reaktív gyökök (pl. $\cdot\text{NO}_2$,

·OH) számos biomolekula (nukleinsavak, membránok lipid- és fehérjekomponensei) károsodását²⁵ okozza, ezzel számos enzim és receptor működését kedvezőtlen irányba befolyásolja. A kapilláris diszfunkció következményeként ödéma jön létre. A folyamat végeredménye egy lokális és szisztémás gyulladáshoz vezető válasz, a kapilláris perfúzió fokozott csökkenésével jelentős mértékű szövetkárosodást idézve elő (1. ábra).

A szabad gyökök eliminációjáért felelős mechanizmusok

Az antioxidánsok védelmet nyújtanak a szabad gyökök hatásával szemben. A szabad gyökök legfontosabb *in vivo* forrása a mitokondriális légzési lánc, mely a felvett oxigén 0,4-4%-át alakítja át reaktív oxigén speciosekké (ROS) fiziológiai körülmények között. A természetes öregedés, cukorbetegség, iszkémia-reperfúziós károsodás fokozzák a szabadgyök-produkciót. Az oxidatív stressz az egyensúly megbomlását jelenti a reaktív oxigén vegyületek és az antioxidánsok hatása között^{26,27}. A ROS-t intracelluláris antioxidáns enzimek, a szuperoxid-dizmutáz (SOD), glutation peroxidáz (GPX), repair enzimek, valamint az extracellulárisan elhelyezkedő transferrin, aszkorbinsav, glutation (GSH), albumin, cöruoplazmin és haptoglobin közömbösítik, vagy eliminálják a szervezetből. A szabad gyökök fiziológiai körülmények között szignálmolekulákként vesznek részt a folyamatokban.

1.2. A vese iszkémiás károsodásainak kialakulása

A veseartériák betegségeinek döntő többsége a generalizált ateroszklerózis részjelenségeként alakul ki. A vese vér- és érellátásának anatómiai és fiziológiai viszonyai sajátos klinikopatológiai következményekkel járnak. A vesét ellátó erek végartériák; a fiziológiai veseműködés a keringő vérmennyiség közel 25%-át igényli. A veseerek progresszív, ateroszklerotikus szűkülete általában tünetszegény iszkémiás atrófiát, akut elzáródása pedig klinikai tüneteket okozó anémiás infarktust idéz elő.

A vesekeringés zavarai kialakulhatnak akután és krónikusan. Akut artériás elzáródás létrejöhet embolizáció, arteria renalis aneurizma, aorta okklúzió és disszekció, vaszkuláris intervenciók beavatkozás, trauma és trombofilia miatt. A veseartéria krónikus elzáródását kiválthatja ateroszklerózis, fibromuszkuláris diszplázia, Takayasu-betegség és középső aorta szindróma. A vena renalis trombózis ritka betegség, kialakulhat vesét ért trauma, intervenció és venográfia szövődeményeként, valamint ligatúra (vesetumor terjedés, aneurysma műtét) következményeként. Leggyakrabban vesevéna-trombózis nefrózis-szindrómában alakul ki²⁸.

Vesetranszplantációnál artériás és vénás elzáródás együtt jön létre, mikor művi úton a két ér folytonossága megszakad. A vesetranszplantáció egyik legfontosabb és a legtöbbet vizsgált kockázati tényezője az iszkémia-reperfúziós károsodás, mely különös jelentőséggel bír²⁹.

Az iszkémia akut tubuláris nekrozishoz vezethet, amit a tubulushám sejtek nekrozisba torkolló akut károsodása, klinikailag heveny veseelégtelenség jellemez. Az iszkémiás tubulushám károsodás során kialakuló akut veseelégtelenség patogenetikai tényezői pl. az intrarenális vazokonstriktió; a tubulushámsejtekben az aktin hipoxiára és az ATP kiürülésre kialakuló károsodása; a hámsejtek bazolaterális, illetve bazális régiójában lévő integrinek szétterülése; valamint a tubuláris cilinderek által létrehozott nefronelzáródás³⁰.

A vesepapillák elhalása gyakran keletkezik diabétesz mellituszban, és a beültetett vese heveny kilökődésekor. Az akut rejekeció során az alloantigéneket hordozó sejtek nekrozisa, valamint sejtek által alkotott érhálózat, glomerulusok és tubulointerstícium gyulladásos károsodása jön létre³¹. Számos citokin képződik, melyek a szisztémás gyulladásos folyamat továbbviteléért felelősek (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-18). Ezek az anyagok a tubulushámsejtek aktinját és sejtmembránfehérjéit károsítják. A neutrofil, makrofág, monocita, T-limfocita szám a vesében megemelkedik. A vese sérülésében mindenképp a TNF- α citokinnek jelentős szerepe van³². Elsősorban szisztémásan termelődik, de lokálisan is keletkezhet a vesében a mezangiális és tubuláris sejtekben³³.

1.3. Az iszkémia-reperfúziós károsodást csökkentő eljárások

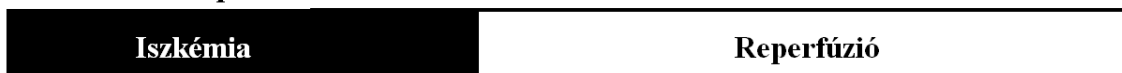
A reperfúziós károsodások kivédése, és a szöveti oxidatív stressz csökkentése alapvetően fontos a teljes klinikai restitúció eléréséhez³⁴. A reperfúziós károsodás mértékére hatással lehet bármely beavatkozás, mely a reperfúzió előtt vagy közben történik. Ez lehet mechanikai (prekondicionálás, fokozatos reperfúzió, kontrollált reperfúzió, lokális hipotermia, posztkondicionálás), vagy pedig gyógyszeres.

Az iszkémiás prekondicionálás és posztkondicionálás által kiváltott endogén adaptáció a jelenleg ismert leghatékonyabb védelem a reperfúziós károsodásokkal szemben („gold standard”)³⁵ (2. ábra).

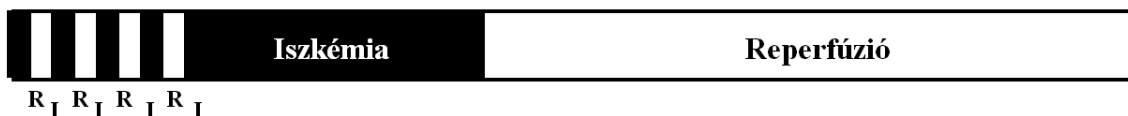
Murrey és munkatársai mintegy 25 éve mutatták ki először kutyákon, hogy rövid ideig tartó iszkémiás epizódok paradox módon csökkentik egy későbbi miokardiális infarktus kiterjedését³⁶. Ezt a jelenséget, mely során a miokardium rövid ideig tartó iszkémiás inzultusra adaptációs és protektív válasszal reagál, „**iszkémiás**

prekondicionálásnak” nevezük. Kísérletes alkalmazhatóságát szívben^{37,38}, vázizmokban³⁹, agyban⁴⁰, bélben^{41,42} és vesében^{43,44} is felismerték. Azóta számos emlősfajon bizonyítást nyert az eljárás hatékonysága^{45,46,47,48}. Egyrészt rövid iszkémiás epizódokkal, másrészt pedig farmakológiai módszerekkel létrehozható iszkémia elleni relatív védettséget jelent. Ez az úgynevezett klasszikus iszkémiás prekondicionálás hatására jelentkező védelem az alkalmazott inger után rövid időn belül jelentkezik, mintegy 3 órán keresztül áll fenn, nem függ a kollaterális hálózat nagyságától, és protein szintézis gátló mellett is működik. Így a klasszikus prekondicionálásban a sejt és a szervezet már meglévő készletei vesznek részt. A jelenséget klasszikus prekondicionálásnak is nevezük. A prekondicionálás klinikai alkalmazása mégis limitált maradt, ugyanis a prekondicionálásnak az iszkémiás attack előtt meg kell történnie, különben nincs megfelelő védő hatása.

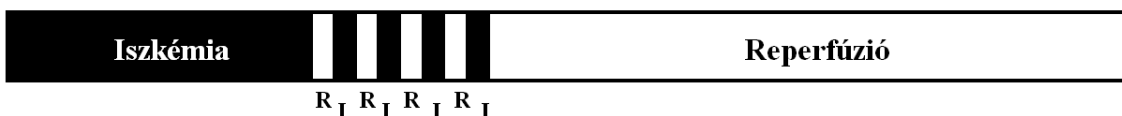
Iszkémia/ Reperfúzió:



Prekondicionálás:



Posztkondicionálás:



2. ábra: Az iszkémiás prekondicionálás és posztkondicionálás algoritmusai. A prekondicionálásnál az iszkémia előtt legalább 4 ciklusban rövid iszkémiás-reperfúziós beavatkozással történik az indukció. A posztkondicionálás az iszkémiát követően a reperfúzió indulásakor alkalmazott rövid (10-20 másodperc) keringéscsökkentést és keringés helyreállítást jelent.

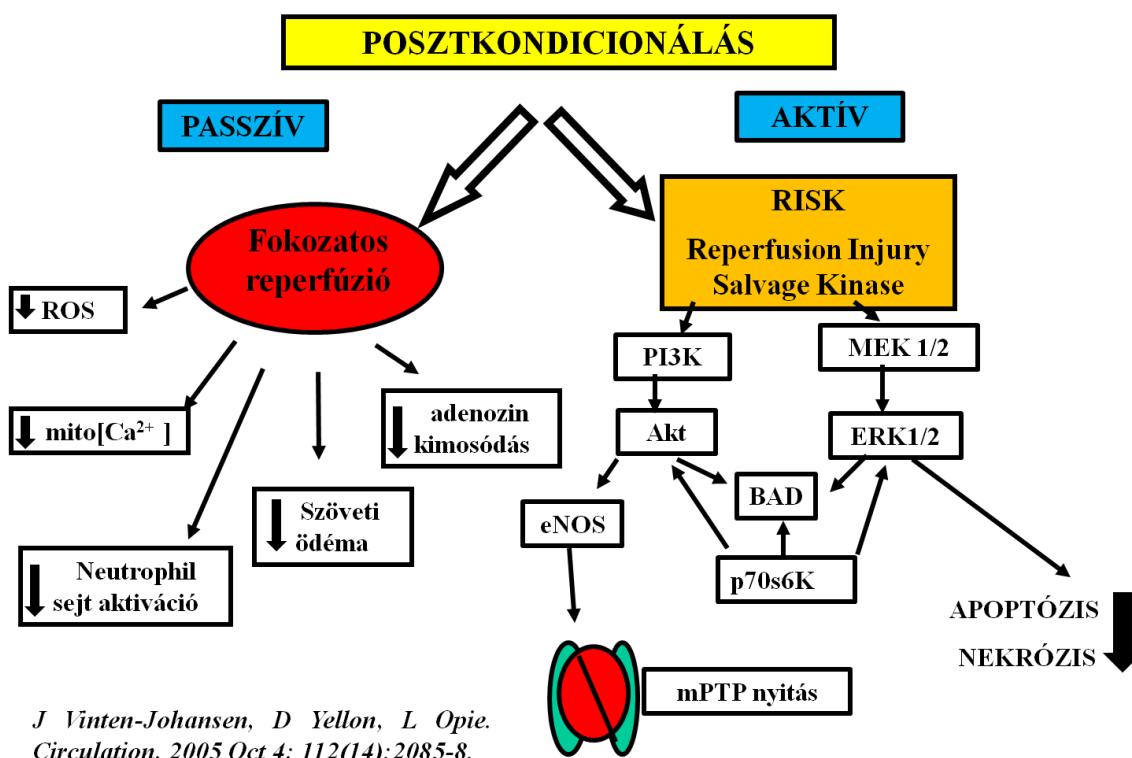
A **fokozatos reperfúzió („gradual, staged”)** egy olyan eljárás, amikor a kirekesztés után fokozatos felengedést alkalmazunk, így ennek következtében a véráramlást fokozatosan állítjuk vissza a nulla szintről az autoregulációs szintre⁴⁹.

A **kontrollált reperfúzió**, mikor reperfúzió során az iszkémia végén nem rögtön kerül felengedésre a kirekesztés, hanem először az első percekben a kirekesztéstől proximális érszakaszból vett, speciális oldattal hígított vér kerül beadásra a kirekesztéstől disztálisan az érszakaszba⁵⁰.

A **lokális hypothermia**, ahol a hipoxiás szöveteket először gyakran hűtött heparinos fiziológias sóoldattal perfundálva csökkenthető az IR károsodás^{51,52}.

Az első áttörést⁵³ Vinten-Johansen és munkatársai érték el 2002-ben azáltal, hogy megfigyelték kísérletes körülmények között a **poszt kondicionálás** jelenségét. A poszt kondicionálás tartósan fennálló iszkémiát követően a reperfüziós periódus kezdetén alkalmazott rövid intermittáló hipoxiás stimulusokat jelenti. Demonstrálása elsőként kutyaszíven történt. Ígéretesebb eljárásnak tűnik, mivel alkalmazására az iszkémiás területek vérellátásának helyreállítása után kerül sor, így kivitelezése jól tervezhető.

A poszt kondicionálás hátterében különböző mechanizmusokat írtak le, melyek alapvetően két csoportra oszthatók. Tsang és kutatócsoportjának felvetése⁵⁴ az volt, hogy a poszt kondicionálás által kiváltott védőhatás egy passzív (mechanikai komponensnek is nevezik) és egy aktív komponensből tevődik össze (3. ábra).



3. ábra: A poszt kondicionálás feltételezett mechanizmusai: aktív és passzív komponens⁵⁵. A fokozatos reperfüzió csökkenti az ödémát és az adenzin kimosódását; míg a molekuláris szinten elinduló védőenzimek aktivációja az apoptózis és a nekrosis kialakulását mérsékeli.

A posztkondicionálás okozta védelmet számos elmélet magyarázza⁵⁶. A mechanikai elmélet szerint a posztkondicionálás során csökken az intravazális nyomás, a mikrovaszkuláris károsodás, és a folyadék érpályából történő kiáramlása, így csökkentve az ödéma képződést, és az adenzinnak, mint védőfaktorok a kimosódását az érintett területről, és csökkenti a szabadgyök-képződés mértékét. Feltehetőleg összefüggésben áll a mitokondriális Ca^{2+} koncentrációjával és az mPTP nyitásával, melyet celluláris magyarázatként említ az irodalom⁵⁷. A celluláris elmélet alapján az intracelluláris oxidánsok és a Ca^{2+} szintje csökken, illetve az mPTP nyitása gátlódik, melyek által csökken az apoptózis és nekrozis kialakulása. Az mPTP a posztkondicionálás egyik fő támadáspontjának tekinthető.

Az aktív komponens kapcsolódik a passzívhoz azáltal, hogy a csökkent áramlás miatt csökken az adenzin, inzulin kimosódása, ezáltal az adenzin és inzulin⁵⁸ a megfelelő receptorokon keresztül, a károsodás közvetlen környezetében indíthatja el a protektív jelátviteli utakat.

A molekuláris magyarázat szerint a PI3K (foszfatidilinozitol 3-kináz), az Akt, a MEK (mitogen-activated protein kinase kinase), az ERK 1 és 2 (extracellular signal regulated kinase) túlélést segítő (survival) jelátviteli utak aktiválása (reperfusion injury survival kinase, „RISK”); antiapoptotikus enzimek termelődése vezet az iszkémiás károsodás kivédéséhez. Ezen útvonal további tagjai még az eNOS (endoteliális nitrogén oxid szintáz) illetve a p70s6K (70 kDa riboszómális protein S6 kináz).

A "reperfusion injury survival kinase"-okon kívül más enzimek is hozzájárulnak a posztkondicionálás védő hatásához. Régóta ismert a protein kináz C (PKC) izoformájának szerepe az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációk regulálásában⁵⁹. Az enzim aktivált állapotában foszforilálja a Ca^{2+} -érzékelő receptort, amely G-fehérjéhez kapcsolódva az IP3 felszabadulást serkenti. A PKC ezenkívül aktiválja a SERCA-pumpát (Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase), gyorsítva ezzel az intracelluláris Ca^{2+} felvételét a szarkoplazmatikus retikulumba. A folyamatok végeredménye az intracelluláris Ca^{2+} -szint csökkentése, ami megóvjaa a sejteket a Ca^{2+} által mediált károsodásoktól. A PKC ϵ aktiválódik mind prekondicionálás⁶⁰, mind posztkondicionálás⁶¹ során.

1.4. A diabétesz mellitusz és a poszt kondicionálás

A diabétesz mellitusz és hipertónia növelik az iszkémia-reperfúzió okozta károsodás kockázatát⁶². A diabétesz mellitusz a leggyakrabban előforduló endokrin kórkép, amely jelenleg világszerte több mint 170 millió embert érint. Ez a szám egyes becslések szerint 2030-ra meghaladhatja a 365 milliót⁶³.

A WHO klasszifikációja szerint a cukorbetegséget etiológia szerint a következő típusokba sorolhatjuk: 1-es típusú diabétesz mellitusz, 2-es típusú diabétesz mellitusz, gesztációs diabétesz mellitusz és egyéb speciális altípusok.

A cukorbetegség több mint 90%-a 2-es típusú diabétesz mellituszban (T2DM) szenved. Mind a prekondicionálás, mind a poszt kondicionálás alkalmazhatóságát limitálják metabolikus betegségek^{64,65,66,67}. Bouhidel és munkatársai leírták, hogy genetikusan diabéteszes ob/ob egereken a poszt kondicionálás hatástalan maradt miokardiális infarktust követően. A protektív jelátviteli utakban szerepet játszó kinázok aktivitása csökkent (foszfo AMPK/AMPK és foszfo MAPK/MAPK arányok csökkentek), az ellenreguláló foszfatázok szintje növekedett, így a poszt kondicionálás védő hatása nem érvényesült⁶⁸. Más munkacsoport eredményei alapján az iszkémiás poszt kondicionálás protektív hatása kimutatható elhízott és streptozotocin indukálta diabétesz mellituszban, míg a TNF- α knockout (TNF $^{-/-}$) egerekben nincs protektív hatása⁶⁹.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A posztkondicionálással kapcsolatos vizsgálatoknak a középpontjában eddig az iszkémiás szívbetegség és a módszer kardioprotektív hatása állt. Érsebészetben, alsó végtagi iszkémia-reperfúziós károsodás tekintetében 2007-től több munkacsoport végez vizsgálatokat^{70,71}. Kísérletes modellünkben az érműtétek és transzplantáció után kialakuló lokális és generalizált gyulladós folyamatok mérséklésének lehetőségét szeretnénk volna vizsgálni egy új sebészeti technikával: a posztkondicionálással. **Tudomásunk szerint még nem történt preklinikai vizsgálat a posztkondicionálás alkalmazásával a vese iszkémia-reperfúziós károsodásának csökkentésére metabolikus eltérések jelenlétében.** Munkánk során a vesét érintő sebészeti beavatkozásokat kísérő iszkémia-reperfúziós károsodást modelleztük metabolikusan egészséges, hiperkoleszterinémiás és diabéteszes patkányokban. Az iszkémia-reperfúziós károsodást próbáltuk csökkenteni iszkémiás és farmakológiai posztkondicionálással.

A kutatócsoportok dolgoznak a vese iszkémia-reperfúziós károsodások körében különféle modellekkel^{72,73}. Az iszkémiás 5-15-30-45-60-120 perces időszakot követően a 2-6-12-24-72 órás, vagy akár a 12 hetes reperfúziós időt követően vizsgálták a károsodások mértékét. A hosszantartó renalis iszkémiás károsodás következménye a nekrozis, míg az átmeneti renalis iszkémia (120 perc iszkémia, 4 óra reperfúzió) a tubuláris epithelium apoptózisához vezet⁷⁴. Rövidebb ideig tartó renalis iszkémiát (5, 30, 45 perc) követő reperfúzió (12-24 óra) esetén is kimutatták az apoptózis jelenségét a tubulus hámban⁷⁵. **A posztkondicionálással kapcsolatos kutatások igazolták azt a feltevést, hogy az alkalmazott iszkémiás-reperfúziós ciklusok száma és időtartama nagymértékben befolyásolja a kialakuló védőhatás mértékét**⁷⁶.

I. Munkánk első részében célkitűzésünk: hiperkoleszterinémiás állatok veséjén iszkémia-reperfúziót (45 perc iszkémia- 120 perc reperfúzió) követően iszkémiás posztkondicionálás létrehozása; veseilus-okklúziót követően iszkémiás posztkondicionálás alkalmazása; és a kialakuló oxidatív stressz és gyulladós válaszreakciók mértékének vizsgálata. Az oxidatív stressz mértékét a lipidperoxidáció mérésével kívántuk jellemezni. A reperfúzió indukálta gyulladós válaszreakció jellemzése a TNF- α citokin-szint meghatározásával történt; a leukocita aktiváció változását az indukált szabadgyök-termeléssel mértük; továbbá vizsgáltuk veseszövetben az iszkémiás-reperfúziós károsodásokat.

II. Munkánk második részében célkitűzésünk: 2-es típusú diabétesz mellituszban a patkányok veséjén iszkémia-reperfúziót (90 perc iszkémia- 240 perc reperfúzió) követően iszkémiás posztkondicionálás létrehozása; májszövetben az iszkémiás posztkondicionálás hatását kívántuk mérni; az orális glükóz tolerancia teszt (OGTT) során vizsgálni a szérumglükóz-, inzulin- és TNF- α -szintet; vizsgálata vérben, szérumban és perifériás szöveteken a kialakuló oxidatív stressznek és gyulladásos válaszreakcióknak. Az oxidatív stressz mértékét a szérumperoxid-szint mérésével kívántuk jellemezni. A reperfúzió indukálta gyulladásos válaszreakciót a TNF- α meghatározásával, és a fehérvérsejtek indukált szabadgyök-termelésével jellemeztük. Továbbá célunk: mérése az antioxidáns enzimek (SOD, GSH) mennyiségének, aktivitásának; és a lipidperoxidáció indirekt markereként ismert malondialdehid koncentrációjának májszövetben.

III. Kísérletünk harmadik részében célkitűzésünk: 1-es típusú diabétesz mellituszban szenvedő állatok veséjében az iszkémia-reperfúziós (45 perc iszkémia- 120 perc reperfúzió) károsodások vizsgálata; az iszkémiás és az inzulinnal történő farmakológiai posztkondicionálás hatásának vizsgálata. Célunk: a vese károsodásának vizsgálata, továbbá az egyik fő védő útvonalat legátolva (a PI3K/Akt útvonal gátlása Wortmanninnal) a posztkondicionálás hatásának csökkentése; az iszkémia-reperfúziós károsodás vizsgálata szérumban és perifériás szövetekben, a TNF- α citokin-szint meghatározásával.

3. A POSZTKONDITIONÁLÁS HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA A VESE ISZKÉMIA-REPERFÚZIÓS KÁROSODÁSAINA HIPERKOLESZTERINÉMIÁBAN

3.1. Célkitűzések

Célunk az iszkémiás-reperfúziós károsodás hatását vizsgálni 45 perc vese iszkémiát és 120 perc reperfúziót követően egészséges és hiperkoleszterinémias patkánymodellben. Az iszkémiás posztkondicionált csoportban a reperfúzió kezdeti fázisában 4 ciklus 15 másodperces reperfúzió és 15 másodperces reokklúziót alkalmaztunk. Ezen a modellen az állatok endogén adaptációs mechanizmusainak indukálását, az iszkémiás posztkondicionálás hatását kívántuk vizsgálni a reperfúziót követően teljes vérben, szérumban és veseszövetben. A metabolikus státusz jellemzésére glükóz, koleszterin, triglicerid, inzulin szinteket mértünk; a vesefunkció meghatározására szérumkarbamid-, kreatinin-szintet mértünk; az oxidatív stressz mértékét a lipidperoxidáció (szérumperoxid-szint) mérésével kívántuk jellemezni. A reperfúzió indukálta gyulladáshoz való válaszreakció jellemzése a TNF- α -szint meghatározásával, és a fehérvérsejtek indukálta szabadgyök-termelésével történt. Az iszkémiás posztkondicionálás hatását fénymikroszkópos (HE, PAS, TNF- α immunhisztokémia) technikákkal kívántuk vizsgálni veseszövetben.

3.2. Anyag és módszerek

3.2.1. A kísérleti csoportok és műtéttechnikai módszerek

A vizsgálatokhoz 32 darab felnőtt, hím Wistar laboratóriumi patkányt (250-280g) /Charles River Magyarország Kft/ használtunk. Kísérleteinket az állatok védelméről és kíméletéről szóló törvény és az állatkísérletek végzéséről szóló kormányrendelet előírásainak megfelelő hatósági engedély (BA02/2000-25/2006) birtokában végeztük. A patkányokat két csoportra osztottuk. Az állatokat ketrecekbe helyeztük el, táplálék és ivóvíz az egyes vizsgálatok közötti időszakban *ad libitum* állt rendelkezésükre. Az egyik csoportot (kontroll) patkánytápon, a másikat (hiperkoleszterinémias) 1,5 %-os koleszterin tartalmú diétán tartottuk. Az állatok a vérvételek és műtét előtti 15 órában csak vizet kaptak.

Diéta kialakítása

A száraz laboratóriumi patkánytápot (Bioplan, Isaszeg, Magyarország) por formájában szereztük meg. A hiperkoleszterinemiás csoport számára ugyanezt a tápot kevertük össze koleszterinnel (Sigma Aldrich Kft., Magyarország) úgy, hogy 1,5 % koleszterin tartalmú legyen. Víz és olaj segítségével ugyanolyan formára gyúrtuk, mint amit a normál tápon tartott csoportunk fogyasztott. A tápfogyasztást, testtömeget kétnaponta feljegyeztük.

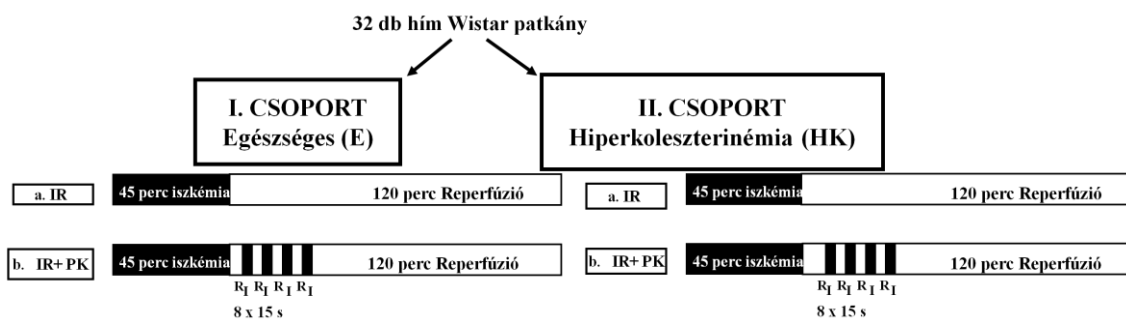
Klinikai kémiai paraméterek és testtömeg változás követése

Mindegyik állat testtömeget és a tápfogyasztását kétnaponta digitális mérleggel grammos pontossággal mértük. A koleszterin etetés anyagcsere-hatásainak jellemzésére vércukor, szérumkoleszterin- és triglicerid-koncentráció meghatározására a 0., 2., 6., 8. héten került sor, enzimatikus, kolorimetriás tesztek segítségével farokvégből nyert vérből.

Műtét és a kísérleti csoportok

A hiperkoleszterinémia kialakulása után kezdtük meg a műtéteket. A narkózist intraperitoneálisan bólusban adott ketamin (Calypsol, 500 mg ketaminium chloratum ampullánként, Richter G. Rt. Magyarország) és diazepam (Seduxen, 10 mg diazepam ampullánként, Richter G. Rt., Magyarország) 1:1 arányú keverékével végeztük (0,2 ml/100 tsg). A kísérleti állatot hátára fektetve, lábait leragasztva rögzítettük a kisállat műtőpadon, majd a hasán a szőrt a könnyebb műtéti hozzáférhetőség miatt lenyírtuk. Laparotómiát követően mobilizáltuk a mezenteriális gyököt, meggyőződünk a vesék kb. azonos nagyságáról, illetve azonosítottuk az ellátó ereket (a. és v. renalis), majd mindkét vesét atraumatikus mikroklippel 45 percre a keringésből kirekesztettük. Az iszkémiás periódus alatt az állatok hasfalát a túlzott folyadékvesztés elkerülése érdekében átmenetileg zártuk. Mindkét csoportot további alcsoportra osztottuk (n=8): 1) az egyik alcsoportnál az iszkémiát követően kétórás reperfúziót [IR], 2) a másik alcsoportnál az iszkémiát követően a reperfúzió megkezdése előtt 2 perc posztkondicionálást (15 s reperfúzió/ 15 s reokkluzió 4 ciklusban) alkalmaztunk [PK] (4. ábra).

Mintavételre a reperfúzió végén került sor. Az állatokat exsanguináltuk, vért és szérumot használtunk a következőkben részletezésre kerülő paraméterek mérésére. Szövetteni vizsgálatra a bal vesét formalinba helyeztük.



4. ábra: Kísérletsorozatunk sematikus ábrázolása a kísérleti csoportok feltüntetésével (n=8).

I/ a: Normál táp, 45 perc iszkémiát 120 perces reperfúzió követte.

I/ b: Normál táp, 45 perc iszkémia után poszt kondicionálást (15 s felengedés/15 s reokklúzió 4 ciklusban) alkalmaztunk a 120 perces reperfúzió előtt.

II/ a: Koleszterindús táp, 45 perc iszkémiát 120 perces reperfúzió követte.

II/ b: Koleszterindús táp, 45 perc iszkémia után poszt kondicionálást (15 s felengedés/15 s reokklúzió 4 ciklusban) alkalmaztunk a 120 perces reperfúzió előtt.

3.2.2. Laboratóriumi vizsgálatok

Glükóz meghatározás

A szérumglükóz-szintet standard enzimatikus, kolorimetriás módszerrel (Glükóz-kit, Diagnosticum Zrt, Magyarország) mértük. A mérés során 10 µl mintához 1 ml – foszfát puffert, fenolt, 4-aminoantipirint, peroxidázt és glükóz-oxidázt tartalmazó reagenst adtunk, majd 5 perc inkubáció után fotométer (Hitachi U-2001, Japán) segítségével mértük az oldatok abszorbanciáját. Az abszorbanciák és egy ismert standard koncentráció segítségével kiszámítottuk a minták glükóz koncentrációját, majd az eredményeket grafikonon ábrázoltuk.

A mérés elve az, hogy a glükóz-oxidáz a glükózt glükonsavvá alakítja, a reakcióban keletkező hidrogén-peroxidot a peroxidáz bontja és a Trinder-féle indikátor reakcióban 505 nm-en jól mérhető színes kondezációs termék keletkezik. Az abszorbancia-növekedés arányos a minta glükóz koncentrációjával.

Összkoleszterin, triglicerid meghatározás

A szérumkoleszterin- és triglicerid-koncentrációkat standard enzimatikus, kolorimetriás teszt (Koleszterin-, Triglicerid-kit; Diagnosticum Zrt, Magyarország) segítségével határoztuk meg. Mindkét esetben 10 µl mennyiségű mintához adtunk 1 ml a kitéhez tartozó standard reagens oldatot, majd az 5 perces inkubáció után fotometriás

úton (Hitachi U-2001, Japán) 505 nm hullámhosszon mértük az abszorbanciákat. Ismert koncentrációjú standard segítségével kiszámoltuk mintáink koleszterin és triglicerid koncentrációit, majd az eredményeket grafikonon ábrázoltuk.

Szérumkarbamid-, és kreatinin-koncentráció meghatározása

A vér és vizelet kreatinin koncentrációja a veseműködés, ezen belül a glomeruláris filtráció elsődleges jelzője. Szérumkarbamid- és kreatinin-koncentrációját vizsgáltuk, standard fotometriás módszerrel (Karbamid-, Kreatinin-kit, Diagnosticum Zrt, Magyarország). Mindkét esetben 45 µl mennyiségű mintához adtunk 1 ml R1 reagens oldatot, majd 5 perces inkubáció után fotometriás úton (Hitachi U-2001, Japán) 555 nm hullámhosszon mértük az A1-abszorbanciát. Ezt követően 330 µl R2 reagens hozzáadása történt, ismét 5 perc inkubáció után megmértük az A2-abszorbanciát. Az abszorbanciák és egy ismert standard koncentráció segítségével kiszámítottuk a minták karbamid és kreatinin koncentrációját, majd az eredményeket grafikonon ábrázoltuk.

Inzulin meghatározás

A széruminzulin-szintjét standard ELISA módszerrel mértük (Mercodia Rat Insulin Elisa kit, Mercodia, Uppsala, Svédország). A mérés elve az ún. „szendvics ELISA”, mely módszer során a célfehérje detektálása három antitesttel történik. Az első, ismert mennyiségű befogó antitest az ELISA lemezre kötött. A célfehérjét tartalmazó mintát a lemezhez adva a célfehérje a befogó antitesthez kötődik. A detektáló, primer antitest a célmolekulával immunkomplexet képez, létrejön az ún. szendvics. Ezt követően adjuk a rendszerhez az enzimmel konjugált ellenanyagot, ami a detektáló antitesthez fog kötődni. Végül kromogén szubsztrát tartalmú oldatot adunk a rendszerhez, amit a jelölt antitesthez kapcsolt enzim színes végtermékké átalakít. A kapott színintenzitást mérjük, ami egyenesen arányos a mintában található citokin mennyiségével.

A kísérlet során 10 µl standardot, mintát, és kontrollt, majd 100 µl tormaperoxidáz enzimmel konjugált ellenanyagot pipettáztunk a lemezre. 18-25 °C-on horizontális mikrolemez rázó segítségével végzett 2 órás inkubáció után a lemez 6-szor került átmosásra (700 µl mosópuffer segítségével) a meg nem kötött konjugált ellenanyag eltávolítása érdekében. Ezután 200 µl kromogén tetrametil-benzidin (TMB) szubsztrátot adagoltunk a lemezre és ismét szobahőmérsékleten 15 percig inkubáltuk. A reakciót 50 µl STOP oldat hozzáadásával állítottuk le. Az optikai denzitást mikrolemez olvasó segítségével mértük 450 nm hullámhosszon a STOP oldat hozzáadása utáni 30 percen belül. Az eredményeket grafikonon ábrázoltuk.

Oxidatív stressz

Az oxidatív stressz jellemzése a lipid peroxidok szérumban koncentrációjának meghatározásával történt. A vérben az oxidatív stresszre érzékeny komponens az LDL (low density lipoprotein). Az LDL oxidációja az oxigén eredetű szabad gyökök következménye, mely során az LDL többszörösen telítetlen zsírsavláncjai (PUFA) átalakulnak a lipidperoxidáció során lipid hidroperoxidokká. A szérumban peroxid-szint mérésére az Oxystat ELISA kitesztet alkalmaztuk, követve a gyártó protokollját (Biomedica Medizinprodukte GmbH, Bécs, Ausztria). Az oxLDL ellenes antitesttel bevont ELISA lemezt 100 µL pufferrel és 20 µL szérumban mintával szobahőmérsékleten (18-26 °C) 1,5 órát inkubáltuk. Mosást követően a lemezt anti-oxLDL-antitest-HRPO konjugátummal 1,5 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk. A mosási lépés után 100 µL szubsztrát (tetrametil-benzidin) segítségével színreakciót idéztünk elő. A színváltozást 30 perc múlva leállítottuk kénsav hozzáadásával. Az abszorbanciát 450 nm-en mértük. Az eredményeket grafikonon ábrázoltuk. Az eredmény direkt összefüggést mutat a keringő lipid peroxidok és a szabad gyökök mennyisége között, ezzel következtetni enged a reperfüzió alatti oxidatív státusz változásaira.

A fehérvérsejtek indukált gyöktermelésének meghatározása

A gyulladáshoz vezető reakciók fő szabad gyök forrásai az aktivált fehérvérsejtek, elsősorban a neutrofil granulociták. A leukociták forbol-12-mirisztát-13-acetáttal (PMA) indukált szabadgyök-termelését (ROS) standard kinetikus luminometriás módszerrel teljes vérből mértük. A szuperoxid-anion termelés indukciójára 0,2 µg/ml PMA (Sigma-Aldrich Kft, Budapest, Magyarország) szolgált. A detektálás 3,33 µg/ml luminollal (Boehringer GmbH, Mannheim, Németország) történt egy Chrono-log 560-VS lumino-aggregométerrel (Chrono-log Corp., Havertown, Pennsylvania, USA). A kapott diagrammok alapján az indukciót követő szabadgyök-termelés idejét [„lag time”(s)], a szabadgyök-termelés sebességét (egység/sec) és a szabadgyök-termelés fehérvérsejt számra vonatkoztatott csúcserősségét (arbitráris egység/mm³-enkénti fehérvérsejt szám) mértük, mellyel meghatározható az indukált gyöktermelés maximuma. Valamennyi paraméter a fehérvérsejtek aktiváltságának mértékét jellemzi.

A Tumor Nekrózis Faktor-alfa (TNF-α) expresszió meghatározása

A TNF-α az egyik legfontosabb proinflammatorikus citokin az iszkémia-reperfüziós károsodás patogenezisében⁷⁷. A citokin expresszió meghatározására szérumban TNF-α-koncentrációt mértünk szendvics ELISA módszerrel (TNF-α immunoassay kit,

R&D Systems, Inc. Minneapolis, USA), követve a gyártó cég utasításait. A kalibrálási görbét rekombináns patkány TNF- α hígítási sorával készítettük el. A TNF- α ellenes antitesttel bevont ELISA lemezt 100 μ L szérumbelval szobahőmérsékleten 2 órát inkubáltuk. Ismételt mosást követően a lemezt poliklonális anti-TNF- α -tormaperoxidáz enzimmel konjugált ellenanyaggal 2 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk. A mosási lépés után hidrogén-peroxid és tetrametil-benzidin segítségével színreakciót idéztünk elő. A színváltozást 20 perc múlva leállítottuk kénsav hozzáadásával. Az abszorbanciát 450 nm-en mértük. Az abszorbancia értékekből a rekombináns TNF- α standard segítségével készített kalibrációs görbe alapján számítottuk ki a szérumbel-TNF- α -koncentrációkat.

3.2.3. Morfológiai vizsgálatok

Az állatoknál a reperfüzió végén a bal oldali vesét két részre osztottuk, majd neutrális formalinba helyeztük.

Fénymikroszkópos vizsgálat

A veséket 10%-os neutrális formalinban fixáltuk, majd felszálló alkoholsorban víztelenítettük és paraffinba ágyasztuk. A vese keresztmetszete mentén készült 5 μ m vékony metszetek egy részét haematoxin-eosinnal (HE) festettük meg, és perjódsva-Schiff (PAS) reakciót végeztünk. Vizsgáltuk a vese minden rétegét, és a hyalincylinder mennyiségét. A proximális tubulusok értékelésére a Jablonski score-t⁷⁸ használtuk (5. ábra). Vesepapilla-károsodás hipoxia során és diabétesz mellitusban gyakran jön létre, ezért kiemelten vizsgáltuk e területet.

0: normál, fiziológiás

1: egyes sejtek mitózisai és nekrozisai

2: a proximális kanyarulat csatorna szomszédos sejtjeinek nekrozisa, a nem károsodott környező tubulusokkal

3: a nekrozis körül fogja a proximális kanyarulat csatornák disztális harmadát, a nekrozis sáv a belső kortexre is kiterjed

4: a nekrozis a proximális kanyarulat csatorna mindhárom rétegét érinti

5. ábra: Jablonski-score rendszer a proximális tubulusok károsodásának felmérésére.

TNF- α immunhisztológiai (IH) fénymikroszkópos vizsgálata

Immunhisztokémiai vizsgálataink TNF- α monoklonális egér ellenanyaggal történtek (Histopatológia Kft, Pécs), mely keresztreakciót ad más rágcslók, így a patkány TNF- α -val is. A monoklonális ellenanyag a TNF- α -t termelő sejtek citoplazmáját festi. Pozitív kontrollunk granulomatózus gyulladás volt.

A formalinban fixált, paraffinba ágyazott veseszövetből 5 μ m vékony metszeteket készítettünk, a fent említett módon, és ezeket deparaffinálás után desztillált vízzel öblítettük. Ezt 5 perc mikrohullámú előkezelés követte citrát pufferben (pH= 6). Peroxidáz enzim gátlás 10 percig történt (3% H₂O₂). TBS-ben (Tris Buffered Saline, pH=7,6-7,8)-ben mostuk 3-szor 5 percig, ezt követően került rá az antitest 60 percig, majd 3-szor 5 perc mosás következett. A másodlagos antitest (Histols-PO MR) 30 percig volt a metszeten. Ismét 3-szor 5 perc mosás következett. Ezt követte a Chromogén (amino-etil-carbazol) festés, majd desztillált vizes öblítés 3 percig. Magfestésre haematoxilint használtunk. Végül dehidráció (2-szer 1 perc alkohol) és víztelenítés (3-szor 2 perc xilol) történt.

A tubulus hám TNF- α pozitivitását 200x-os nagyítás mellett 24 látóteret a MIRAX Viewer programban értékeltünk. A pozitív és negatív sejtek arányát vizsgáltuk.

Score rendszert alkalmaztunk a TNF- α pozitívítás számszerűsítésére a tubulus hámokban: nincs TNF- α = Grade 0, 20% =Grade 1, 40%= Grade 2, 60% = Grade 3, 80% =Grade 4, 100% = Grade 5.

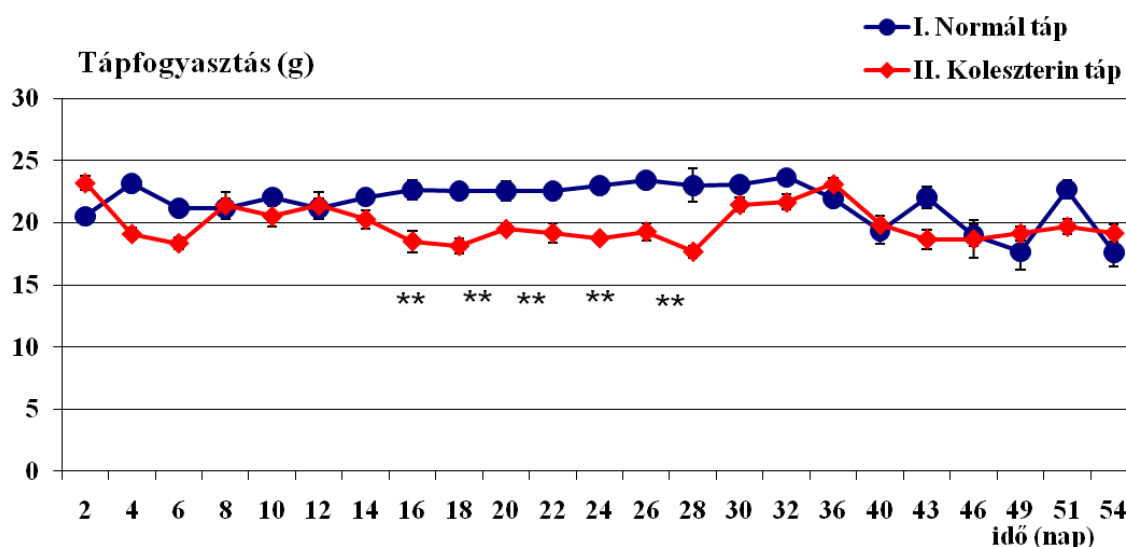
3.2.4. Statisztikai analízis

Az analízishez és az ábrázoláshoz a Microsoft Office Excel 2007 és az SPSS 17.0 programokat használtuk. Az adatok ábrázolásakor a középértéket (átlag) és annak hibáját (\pm SEM-standard error of mean) tüntettük fel. Az állatmodell létrehozásakor, az egyes csoportokat Student féle t-próbával hasonlítottuk össze. A kísérleti eredményeket egyirányú varianciaanalízissel (ANOVA) a csoportokon belül Wilcoxon, a csoportok között Mann-Whitney tesztet alkalmaztuk. A különbséget akkor tekintettük szignifikánsnak, ha p érték kisebb volt, mint 0,05. Az ábrákon *, # karakterrel jelöltük a szignifikánsan eltérő értékeket.

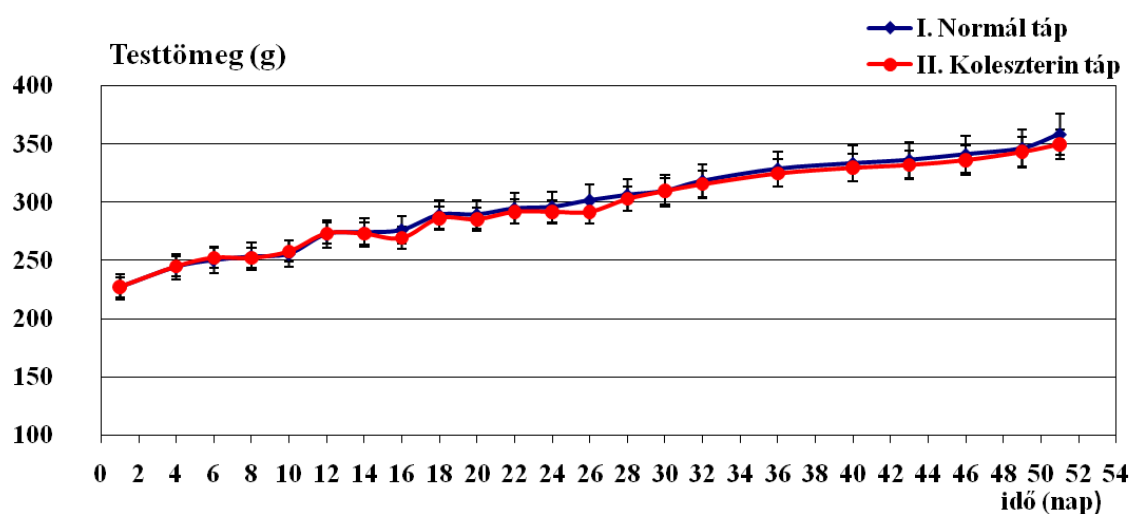
3.3. Eredmények

3.3.1. Laboratóriumi vizsgálatok eredményei

Az általunk készített tápot mindkét csoport elfogadta. A tápfogyasztás a két csoport között nem mutatott alapvető különbséget. A 1,5%-os koleszterintartalmú tápon tartott állatok szignifikánsan kevesebbet ettek a diétás időtartam közepén. Ennek ellenére testtömegkülönbség a két csoport között nem volt, mindkét csoportunk folyamatosan gyarapodott (6-7. ábra).

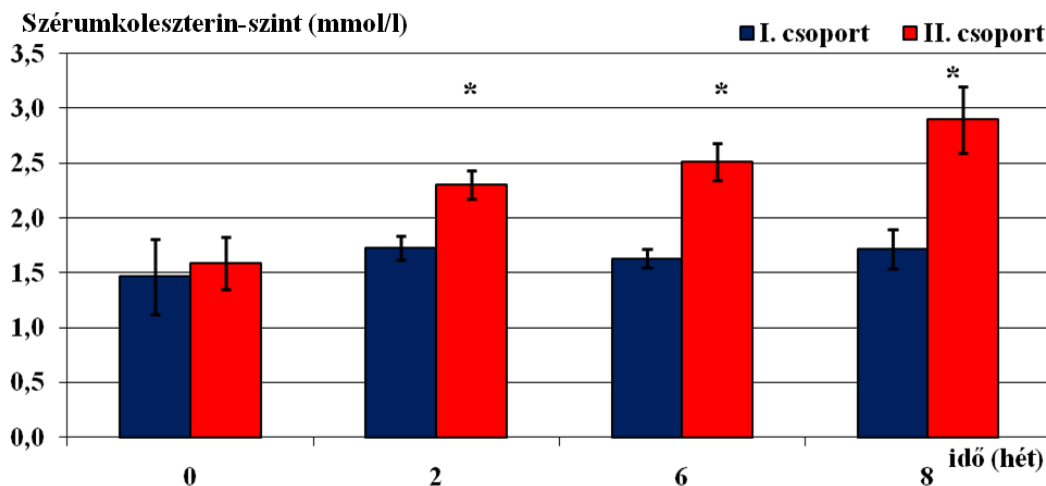


6. ábra: Az állatok tápfogyasztása az etetés során. I. csoport: Normál táp II. csoport: Koleszterindús táp (**= $p < 0,01$ vs normál táp)

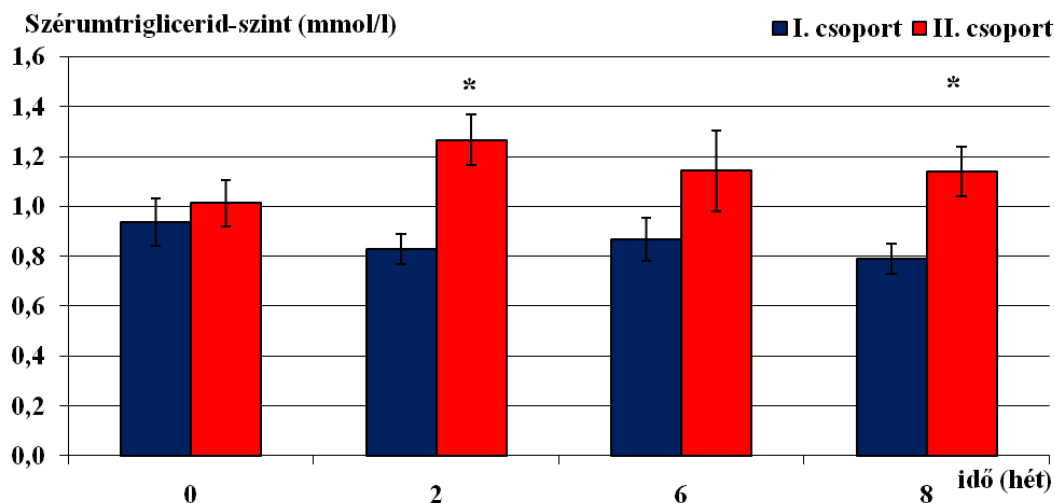


7. ábra: Az állatok testtömeg-változása az etetés során. I. csoport: Normál táp II. csoport: Koleszterindús táp

A koleszterinben gazdag diéta hatására már a második héten a kiindulási értékhez képest szignifikánsan magasabb szérumkoleszterin- és triglicerid-szintet mértünk. A koleszterindús tápot kapott csoportban a különbség a 8. hétig folyamatosan nőtt (8- 9. ábra).

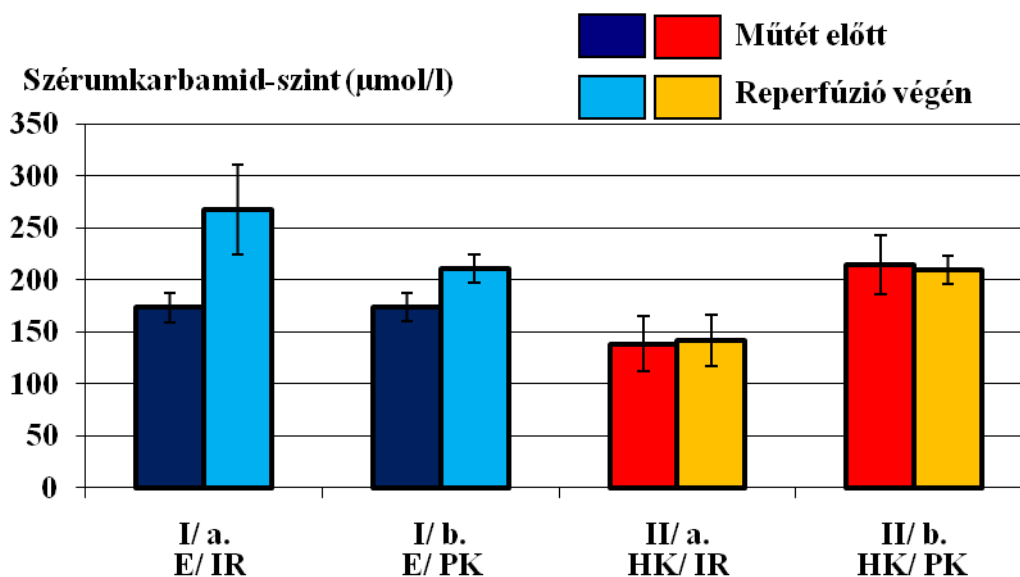


8. ábra: Szérumkoleszterin-szint a diéta 0., 2., 6., 8. hetében. I. csoport: Normál táp
II. csoport: Koleszterindús táp. A koleszterindús tápot kapott csoportnál a 2., 6., 8. héten szignifikánsan nagyobb a szérumkoleszterin-szint (*= $p < 0,05$ vs normál diéta).



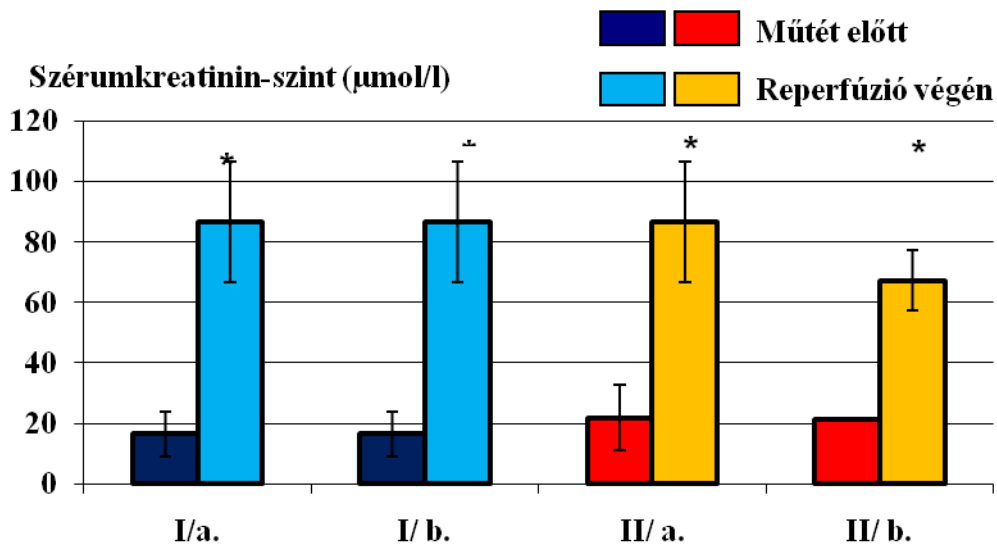
9. ábra: Szérumtriglicerid-szint a diéta 0., 2., 6., 8. hetében. I. csoport: Normál táp
II. csoport: Koleszterindús táp. A diéta 2., illetve 8. hetében szignifikánsan magasabb a szérumtriglicerid-szint a koleszterindús tápot kapott csoportnál (*= $p < 0,05$ vs Normál táp).

A vese iszkémia-reperfúzió hatása egészséges és hiperkoleszterinémias állatok klinikai kémiai paramétereire

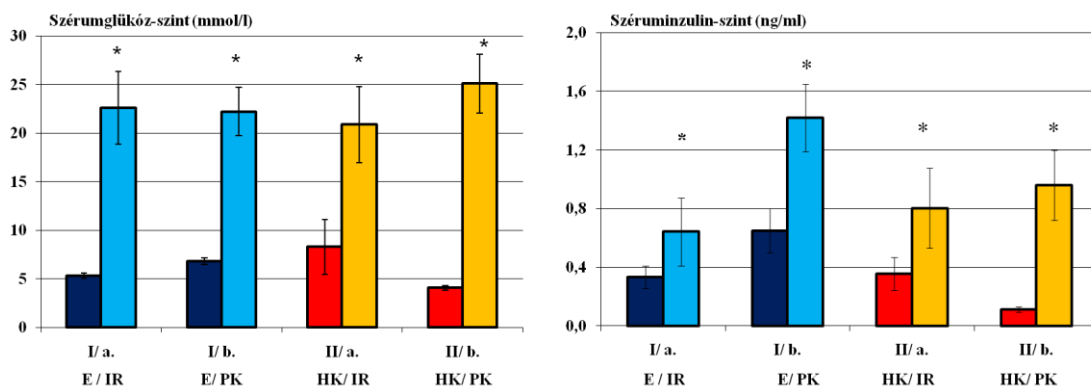


10. ábra: Karbamid koncentráció szérumban. A koleszterindús tápot kapott állatoknak nem magasabb a kiindulási szérumkarbamid-szintje, mint a kontroll csoportban; és ez a műtét hatására nem változik.

A szérumban mért karbamid-, kreatinin-, glükóz- és inzulinszintekben a csoportok között a műtétet megelőzően nincs különbség. Az iszkémia-reperfúziót követően a normál tápon tartott csoportnál nem volt szignifikáns különbség a karbamid koncentrációban (10. ábra). Mind a négy csoportban a műtéti beavatkozást emelkedett szérumkreatinin-koncentráció kísérte (11. ábra). Az iszkémia-reperfúziót követően mind a normál, mind a koleszterindús tápon tartott állatokban jelentősen emelkedett a szérumglükóz- és inzulin-szint. Amennyiben az iszkémiát követően poszt kondicionálást alkalmaztunk, mindkét csoportnál az inzulin koncentrációban további fokozódás volt megfigyelhető (12. ábra).



11. ábra: Kreatinin koncentráció szérumban. A szérumkreatinin-szint mind a négy csoportban a műtétet követően szignifikánsan nagyobb, mint a műtét előtt (*= $p < 0,05$ vs Műtét előtt).

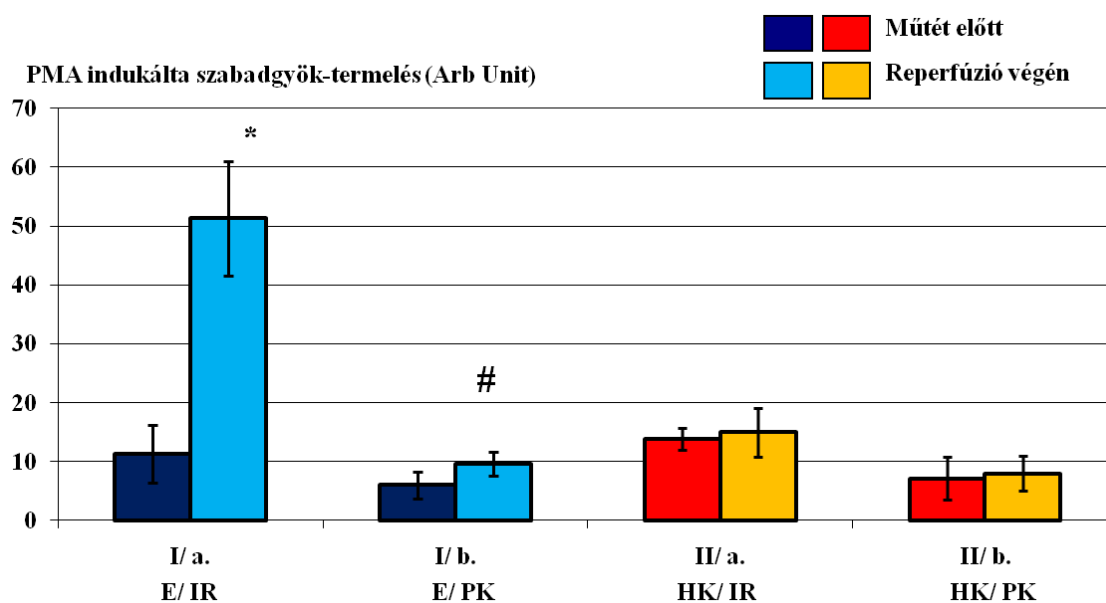


12. ábra: Glükóz és inzulin koncentráció szérumban. A műtéti beavatkozás minden csoportban szignifikánsan emelte a vércukorszintet és a széruminzulin-koncentrációt, míg a posztkoncionált csoportban nagyobb mértékű inzulinemelkedést mutat (*= $p < 0,05$ vs Műtét előtt).

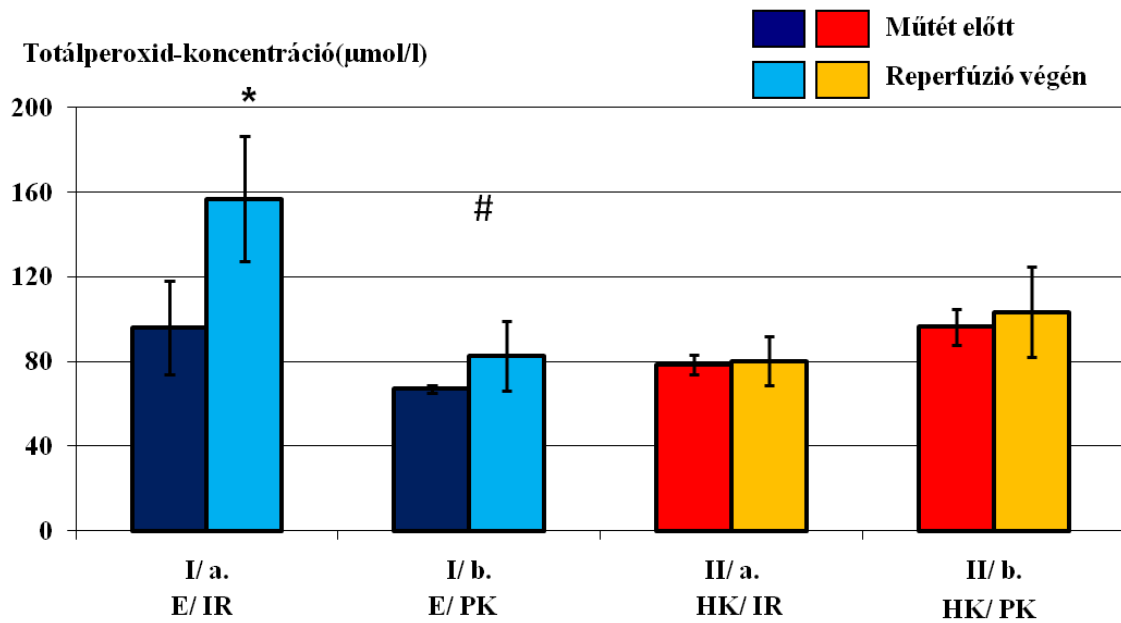
A vesén végzett iszkémia-reperfúzió hatása egészséges és hiperkoleszterinémias állatok szabadgyök-termelésére és peroxid koncentrációjára

A 13. ábra a teljes vér sejtjes elemeinek külső stimulussal, forbol-12-mirisztát-13-acetáttal (PMA) indukált szabadgyök-termelő képességét ábrázolja. Mivel a sejtjes elemek közül a leukociták termelik szinte a teljes mennyiséget, így ez a paraméter a fehérvérsejtek aktivitását mutatja meg. A normál tápon tartott csoportban a reperfúzió

végére nőtt a szabadgyök-termelés, melyet a posztkondicionálás szignifikánsan csökkentett. A koleszterindús tápot kapott csoportnál az iszkémia-reperfúzió nem járt fokozott szabadgyök-termeléssel. A műtét előtt a szérumperoxid-koncentráció minden csoportnál közel azonos volt. A normál tápon tartott állatokban a műtéti beavatkozás jelentősen emelte a totál peroxid koncentrációt, ezt a posztkondicionálás szignifikánsan csökkentette, míg a hiperkoleszterinémiás csoportnál változás nem történt (14. ábra).

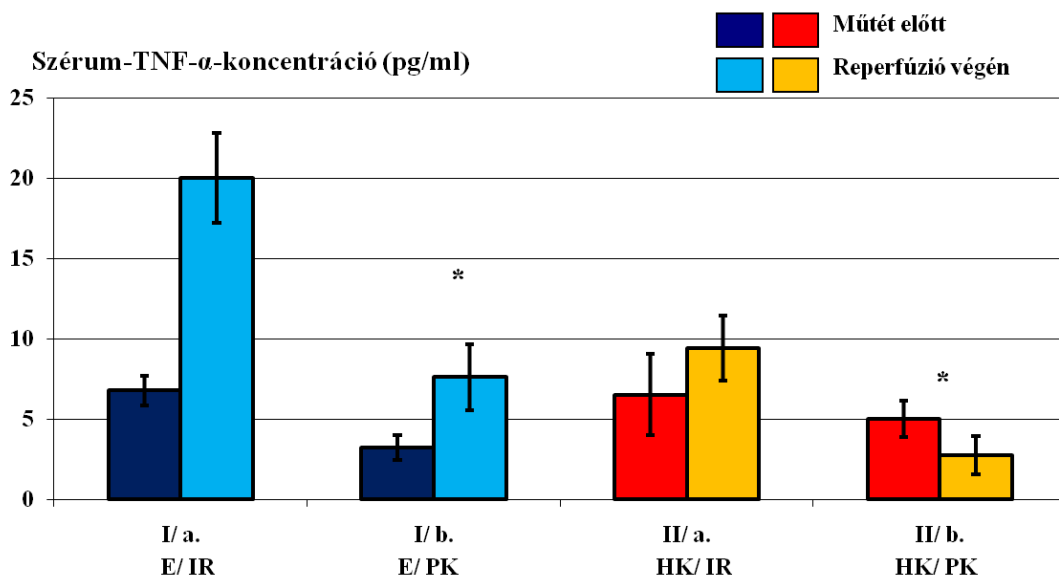


13. ábra: Forbol-12-mirisztát-13-acetáttal (PMA) indukált szabadgyök-termelés teljes vérben. A normál tápon tartott csoportban a reperfúzió végére nőtt a szabadgyök-termelés, melyet a posztkondicionálás szignifikánsan csökkentett (* = $p < 0,05$ vs. Műtét előtt, # = $p < 0,05$ vs I/a. Reperfúzió végén).



14. ábra: Totálperoxid-koncentráció a szérumban. A normál tápon tartott állatokban a műtéti beavatkozás jelentősen emelte a totálperoxid-koncentrációt, ezt a posztkondicionálás szignifikánsan csökkentette (* = $p < 0,05$ vs Műtét előtt, # = $p < 0,05$ vs I/a. Reperfúzió végén).

A vesén végzett iszkémia-reperfúzió hatása egészséges és hiperkoleszterinémias állatok szérum TNF- α koncentrációjára



15. ábra: TNF- α koncentráció szérumban. A műtéti beavatkozás jelentősen emelte a TNF- α koncentrációt a normál tápon tartott állatoknál, a posztkondicionálás ezt szignifikánsan csökkentette (* = $p < 0,05$ vs I/a. Reperfúzió végén).

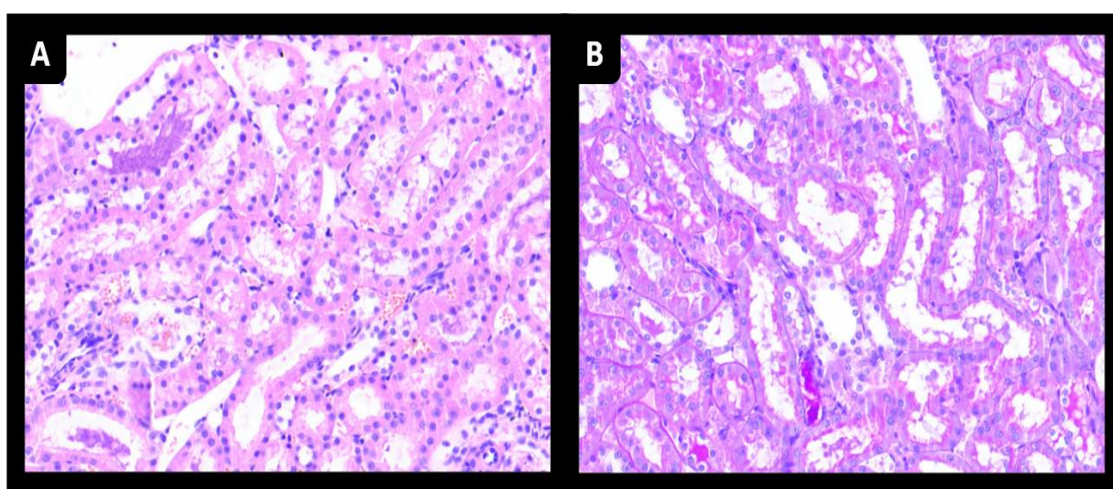
A 15. ábra a sejtaktiváció jellemzésére a szérumb-TNF- α mennyiségét ábrázolja. A normál/kontroll csoportban a műtéti beavatkozást jelentős szérumb-TNF- α -koncentráció-emelkedés kísérte, ezt a posztkondicionálás szignifikáns mértékben csökkentette. A koleszterindús tápon tartott állatoknál nem emelkedett szignifikáns mértékben a TNF- α koncentráció a műtét hatására, a posztkondicionált csoportban a reperfúzió végén szignifikánsan kisebb TNF- α koncentrációt mértünk az I/a. csoporthoz képest.

3.3.2. Morfológiai vizsgálatok eredményei

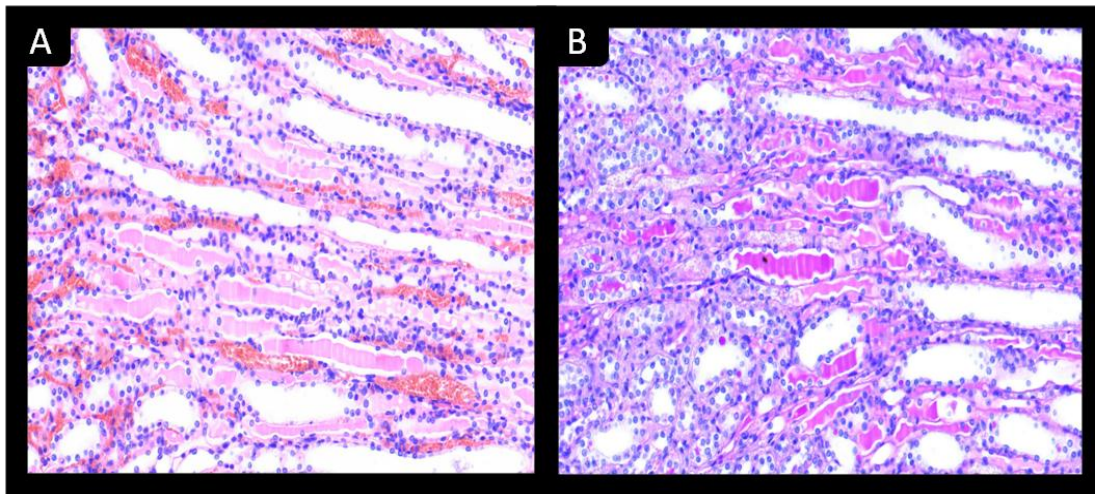
A vesében a papilla területén, a proximális tubulusról láttunk morfológiai eltéréseket. Sejtes beszűrődést, fibrotikus elváltozást elszórtan észleltünk. A hyalincylinder megjelenése feltűnő volt a vese minden részében.

Fénymikroszkópos vizsgálat

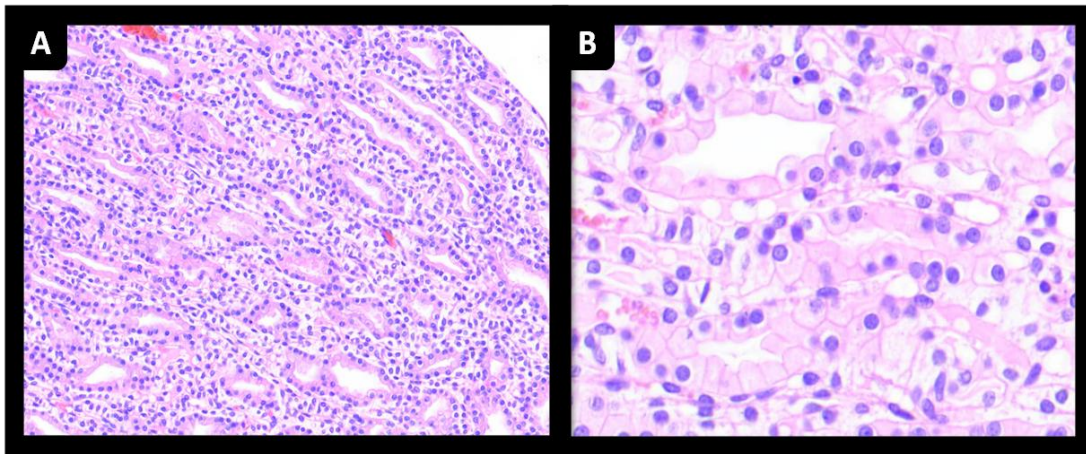
A HE és PAS metszeteken nem találtunk szignifikáns különbséget csoportjaink között. A proximális tubulus értékelésénél Jablonski 0-1-2 fázisokat láttunk, teljesen random módon (16. ábra). A PAS-pozitív hyalincylinder mennyiségét a csatornák lumenében leszámolva nem láttunk csoportjaink és a lokalizáció tekintetében különbséget (17. ábra). A papilla területén megtartott volt a tubulushám (18. ábra). A kéregállomány interstíciumában kóros elváltozást egyik csoportban sem észleltünk. Feltételezzük, hogy a fázis, amikor eltávolítottuk a vesét, az iszkémia-reperfúzió időtartam rövidege miatt egy korai, egyéb fénymikroszkópos eltérésekkel járó fázis.



16. ábra: A vese corticomedulláris területe. **A:** HE metszet, 200x nagyítás. **B:** PAS reakció, 200x nagyítás.



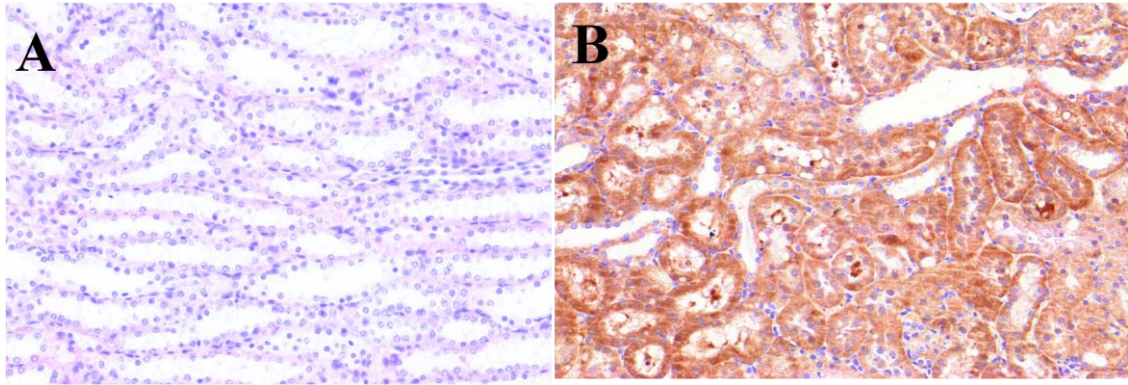
17. ábra: Hyalincylinder a vese corticomedulláris területében. A: HE metszet, 200x nagyítás. B: PAS reakció, 200x nagyítás.



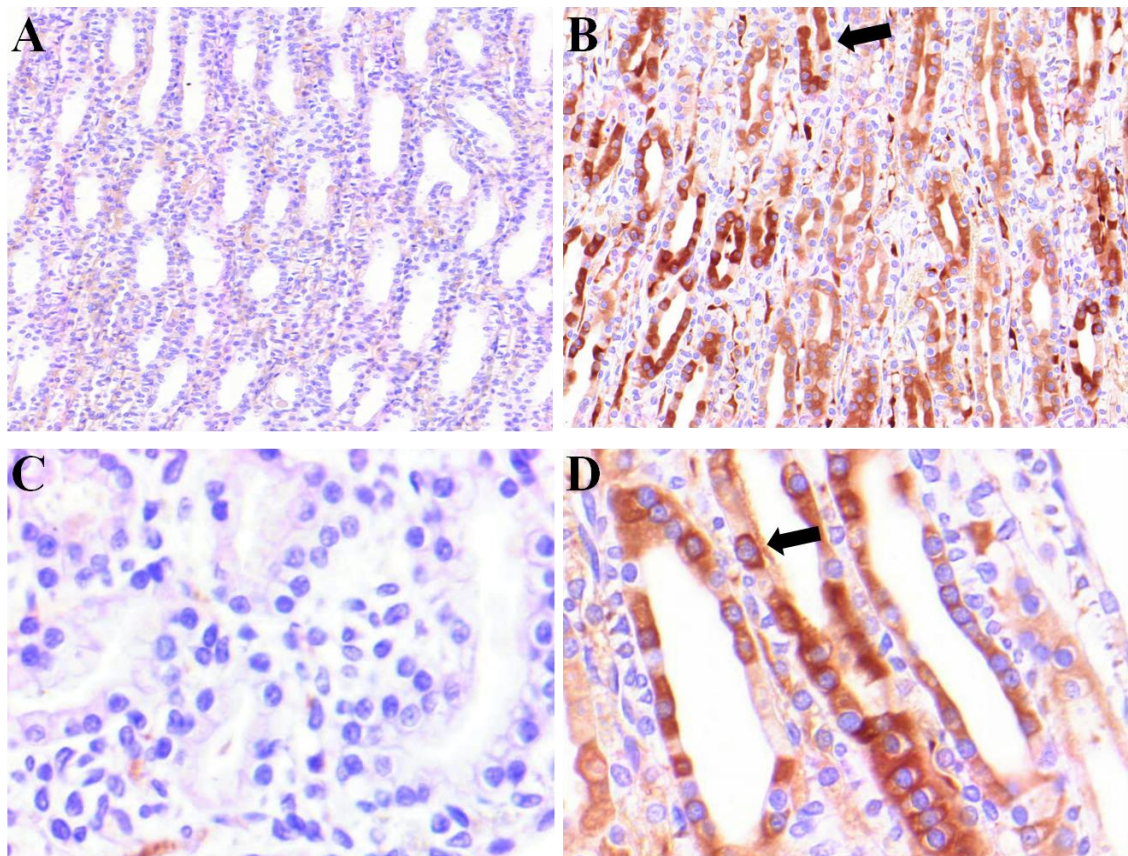
18. ábra: A vesepapilla területe. HE metszet. A: 200x nagyítás. B: 600x nagyítás.

Immunhisztokémiai vizsgálat

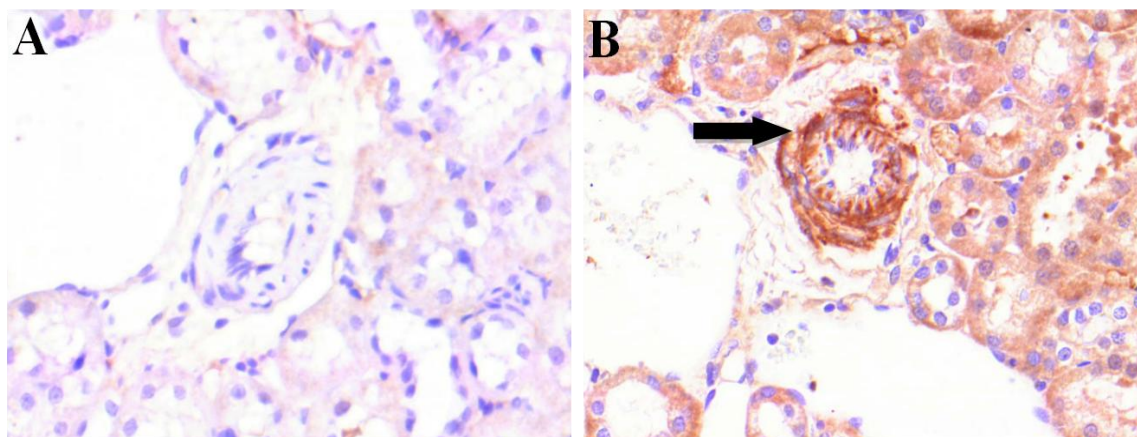
A papilla és a corticomedulláris területen fénymikroszkópos immunhisztokémiával jelentős mértékű TNF- α pozitivitást láttunk a tubulusok hámjának citoplasmájában (19-20. ábra). Az arteriolák falában kiterjedt TNF- α pozitivitást észleltünk az IR károsodást szenvedett csoportjainknál (21. ábra).



19. ábra: TNF- α kimutatása a vese corticomedulláris területében. A: Intakt normál (iszkémia-reperfúziót nem szenvedett) csoportban TNF- α pozitívitas nincs. 200x nagyítás. **B:** Iszkémia-reperfúzió hatására a tubulusok hámjában jelentős mértékű TNF- α pozitívitas figyelhető meg. Barna szín jelzi a pozitívítást, 200x nagyítás.

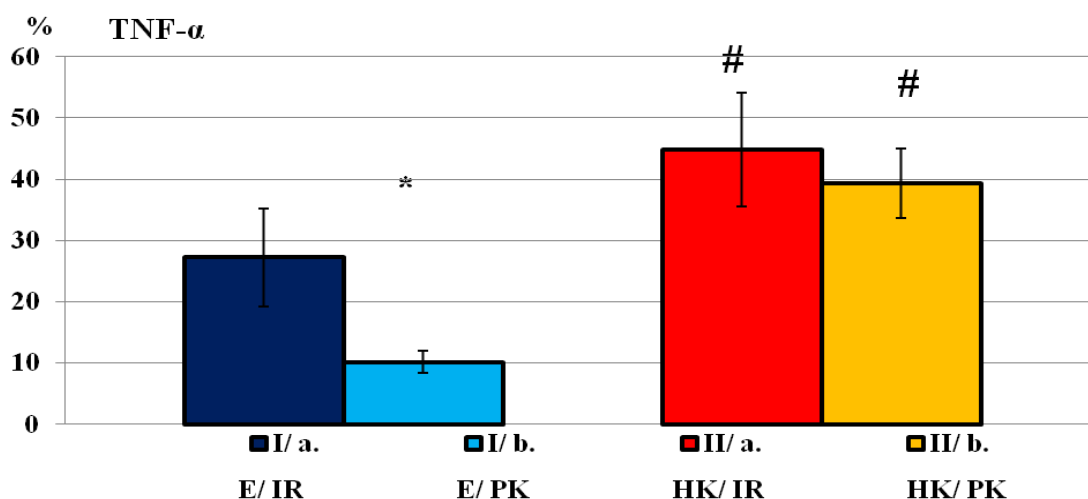


20. ábra: A TNF- α kimutatása a vese papilla területében. A: Intakt normál (iszkémia-reperfúziót nem szenvedett) vesében a papilla területén a gyűjtőcsatorna hámjában nincs TNF- α pozitívitas, 200x nagyítás. **B:** Hiperkoleszterinémias csoport, jelentős mértékű pozitívitas. 200x nagyítás. **C:** Intakt normál vese, nincs TNF- α pozitívitas a gyűjtőcsatorna hámjában, 600x nagyítás. **D:** Iszkémia-reperfúzió hatására kifejezett TNF- α pozitívitas. A nyíl jelzi a TNF- α akkumulációját (barna szín) a citoplazmában. Barna szín jelzi a pozitívítást, 600x nagyítás.



21. ábra: A TNF- α kimutatása a vese corticomedulláris területében, középen az arteria arcuata. A: Az arteria arcuata falában nincs TNF- α pozitivitás, 400x nagyítás. **B:** Iszkémia-reperfúzió hatására az arteria arcuata falában masszív TNF- α pozitivitás. Barna szín jelzi a pozitivitást, 400x nagyítás.

A papilla hámjában látható TNF- α mennyiségét számszerűsítettük és statisztikailag értékeltük (22. ábra). A normál tápot kapó csoportjaink közül a poszt-kondicionált csoportban szignifikánsan kisebb értéket detektáltunk, mint az IR csoportban. A normál csoporthoz képest a hiperkoleszterinémias csoportban a papilla hámterületén nagyobb pozitivitást kaptunk. A koleszterindús táppal etetett csoportjainknál szignifikánsan magasabb értéket detektáltunk mindkét műtéti eljárásban, mint a normál tápot kapó csoportjainknál.



22. ábra: A TNF- α mennyisége a papilla területén. I/a: Normál táp, IR, **I/b:** Normál táp, Poszt-kondicionálás, **II/a:** Hiperkoleszterinémia, IR, **II/b:** Hiperkoleszterinémia, Poszt-kondicionálás (* = $p < 0,05$ vs IR; # = $p < 0,05$ vs I. csoport).

3.4. Megbeszélés

A posztkondicionálást Vinten-Johansen és munkatársai írták le elsőként, mint a szervezet egyik leghatásosabb védelmi reakcióját. Kísérletes körülmények között igazolták, hogy az iszkémiát követő reperfúzió során rövid idejű (10-20 s) iszkémiás-reperfúziós ciklusok hatására lényegesen mérséklődik a sejt- és szövetkárosodás. A kísérletek eredményei alapján a módszert klinikai körülmények között is alkalmazzák (szívműtétek^{79,80}, érsebészet⁸¹). Ez az ígéretes endogén adaptáció az egészséges szervezetben kiválóan működik⁸², azonban metabolikusan beteg egyéneknél a védelem nem, vagy csak részben váltható ki.

Kísérleteinkben ezért tűztük ki célul a hiperkoleszterinémiás állapot létrehozását, feltéve azt a kérdést, hogy vajon anyagcsere-rendellenességekben is jelent-e védelmet a reperfúziós károsodásokkal szemben az iszkémiás posztkondicionálás. Kérdésfelvetésünk aktualitását mutatja, hogy veseműtéteknél hosszabb iszkémia során, nem az akut rejekció okozza a legnagyobb problémát, hanem az iszkémia-reperfúziós károsodás^{83,84}. Gyakran jár együtt az ateroszklerózis, hiperkoleszterinémia és lipidtárolási betegség vesebetegségekkel, és ezek a korai fázisban fokozhatják a vesekárosodást⁸⁵. A hiperkoleszterinémia növelheti a vesében az oxidatív stressz mértékét, endotél károsodásokat, gyulladást, fibrózist és szöveti károsodást okozhat⁸⁶.

Érdekesség, hogy az összes út aktiválása és a TNF- α indukálása is az endoplazmás retikulumba (ER) történő koleszterin áramlását igényli. A hiperkoleszterinémia mediálta ER-stressz az NF κ B és a MAPK gyulladásoz szignál útvonalak aktivációjához vezet. A TNF- α 3 útvonalat indukál: az apoptotikus sejtthálalt; a MAPK útvonal aktiválását; és NF κ B-útvonalat⁸⁷.

Célunk volt, hogy a citokin expressziót és az apoptózist vizsgáljuk a károsodott szövetekben a revaszkularizációt követően (TNF- α -szint a szérumban és a vesében).

Tanulmányoztuk az iszkémiás posztkondicionálás protektív hatásait egészséges patkányokban az iszkémiás-reperfúziós károsodások kapcsán. Magas koleszterintartalmú táppal, hím patkányokban hiperkoleszterinémiát és hipertrigliceridémiát alakítottunk ki. Az általunk létrehozott állatmodell alkalmas volt arra, hogy indukált endogén védelem létrejöttét anyagcsere-eltérésekben is megvizsgáljuk. Az iszkémia-reperfúziós károsodás mértékét a leukociták és az endotél által termelt TNF- α -szintekkel jellemeztük. Az iszkémia-reperfúziós károsodás egyik fő összetevője az oxidatív stressz⁸⁸, másik a steril gyulladás. Kísérleteinkben az oxidatív

károsodás kimutatására szérumperoxid-szintet, illetve a teljes vérből az oxigén szabad gyökök (szuperoxid anion) koncentrációját határoztuk meg⁸⁹. A sejtaktiváció jellemzésére az aktivált sejtekben (leukocita, monocita, makrofág) termelődő és a szérumba kikerülő TNF- α mennyiségét mértük.

Kísérleteink eredményei szerint egészséges, normál tápon tartott állatokon a poszt kondicionálás szignifikánsan csökkentette az oxigén szabad gyökök mennyiségét és a peroxid koncentrációt, valamint a szérum-TNF- α -szintet. A hiperkoleszterinemiás patkányoknál fellépő IR károsodások mértéke alacsonyabb volt a normál étrendű patkányokhoz képest, de a továbbiakban nem befolyásolta azokat a poszt kondicionálás.

Ennek magyarázatára az a feltevésünk, hogy az általunk előidézett állapot, a hiperkoleszterinémia önmagában is képes volt indukálni az endogén védelmet, melynek következtében csökkent a reperfüzió az oxidatív stressz súlyossága.

A szérumban mért karbamid, kreatinin, glükóz és inzulin szintekben a csoportok között a műtétet megelőzően nincs különbség. A műtéti beavatkozás mindkét csoportban jelentősen emelte a vércukor és inzulin szintet, mely a poszt kondicionált csoportban még tovább fokozódott. Az irodalmi adatok szerint ez feltehetően a poszt kondicionálás védelmi mechanizmusában szerepet játszik⁹⁰.

A vesefunkció megítélésének elterjedten használt markere a szérumkreatinin-koncentráció. Mivel a kreatinin szinte csak glomeruláris filtrációval ürül a szervezetből (minimális mértékben szekretálódik még a tubulusokban) és a vesetubulusokban nem reabszorbeálódik, szintje arányos a felszabadulásának mértékével és a vese exkréciós működésével. Az állatok szérumkreatinin-koncentrációja mindkét operált csoportban szignifikánsan magasabb volt a műtét előtti értékhez képest. A poszt kondicionált csoportban nem volt szignifikánsan kisebb a kreatininszint-emelkedés, mint az IR-kontroll csoportban. A szérumkarbamid-szintben nem találtunk szignifikáns különbséget. A koleszterindús tápot kapott állatoknál a karbamid szint a műtét hatására nem változik. Tehát a poszt kondicionálás nem csökkentette a szérumkarbamid-szintet, a kreatinin szint alapján ugyanolyan mértékű veseelégtelenség jött létre minden csoportban, tehát a rövidtávú klinikai kimenetelt nem befolyásolta. Megállapíthatjuk, hogy szerencsés lett volna egy álműtött kontroll csoport használata is, hogy ezekben az állatokban milyen mértékű elváltozások történnek a műtét hatására.

A HE, PAS metszeteken nem találtunk különbséget csoportjaink között, elképzelhető, hogy hosszabb iszkémiás és reperfüziós periódus után már látható lenne elváltozás. A vesénél az iszkémia-reperfüziós károsodás jeleit immunhisztokémiai

módszerekkel analizáltuk. Főleg a reperfüziót követő gyulladási kaszkád fő faktorára, a TNF- α vizsgálatára helyeztük a hangsúlyt.

Az iszkémia-reperfüzió során a komplex gyulladással kapcsolatos kaszkád aktiválódik, melynek indukálásában és fenntartásában fontos szerepet játszanak a proinflammatorikus citokinek. Lokális gyulladást elősegítő hatásuk fokozottan érvényesül az iszkémia-reperfüzió során megjelenő mikrocirkulációs zavar hatására. A csökkent véráramlás miatt nem csak a védő faktorok, hanem a citokinek kimosódása is csökken a szövetből, így nagy koncentrációt érnek el a károsodott szövetben. A TNF- α az egyik legfontosabb proinflammatorikus citokin az IR károsodás patogenezisében. A TNF- α 25 kDa molekulatömegű 2-es típusú sejtmembrán fehérjeként szintetizálódik, amiből proteolitikusan hasad le a 17 kDa méretű szekretált forma, amely stabil homotrimereket alkot. A TNF- α elsősorban aktivált makrofágokból, endotél sejtekből és a vesében parenchyma sejtekből származik. A TNF- α -t először tumorsejteket ölő és általános leromlást (kahexiát) okozó hatása alapján írták le (ez utóbbi miatt „kahektin”-nek is nevezték). A TNF- α nagyon erős kemotaktikus hatással rendelkezik, és fokozza a szabadgyök-termelést. Halálligand citokinnek is nevezik, mely specifikus receptoraihoz kapcsolódva elindítja az arra érzékeny sejtek apoptózis programját. Ilyenkor instruktív apoptózisról beszélünk. A TNF két ismert receptora TNFR I és a TNFR II. A halálreceptorok intracitoplazmatikus részükön haláldomént tartalmaznak a jelátvitel elindításához. Az apoptózis programját a stimulust jelentő ligand és receptorának kapcsolata indítja el. Érdekes megfigyelés volt, hogy a halálreceptorok által elindított szignáltranszdukciós mechanizmusok a sejt túlélését is közvetíthetik, az IR károsodásokat csökkenthetik. Kardiológiai kísérletekben leírták kardioprotektív hatását iszkémia-reperfüziós károsodás esetén^{91,92}. TNF- α receptor-asszociált faktor képes aktiválni az NF κ B transzkripciós faktort, mely számos gén promoteréhez képes kapcsolódni és antiapoptotikus lehetőségnek tekinthető⁹³.

A TNF- α egyrészt direkt veseparenchyma károsodást idéz elő, másrészt erős kemotaktikus hatással rendelkezik. Az aktivált neutrofilek által termelt szabad gyökök a glomerulusok barrier funkcióját megszakítva megnövekedett albumin átérésztéshez vezetnek⁹⁴. Ezen kívül csökken a glomeruláris vérátáramlás és filtrációs ráta, a TNF- α stimulálja a mezangiális sejteket, különböző vazokonstriktor (trombocita aktivációs faktor, endothelin-1, prosztaglandinok) és vazodilatátor (adenozin, NO, prosztaglandinok) faktorok termelésére.

Eredményeink szerint a TNF- α mindkét csoportban a vese kéreg- és velőállományában egyaránt kimutatható volt, a legjellegzetesebb eltéréseket a papillában tapasztaltuk. A papilla hámjában látható TNF- α mennyiségét számszerűsítettük és statisztikailag értékeltük. A posztkondicionált csoportban szignifikánsan kisebb értéket detektáltunk, mint az IR csoportban. A koleszterinnel etetett állatoknál a posztkondicionálás nem változtatta meg a TNF- α mennyiségét.

Ennek alapján megállapíthattuk, hogy az iszkémiás posztkondicionálás egészséges állatokon csökkentette a TNF- α pozitívítást- tehát az akut gyulladásos reakciót - míg a hiperkoleszterinemiás állatokban ez nem jött létre.

Különösen fontosnak tartjuk azt a megfigyelésünket, hogy a hiperkoleszterinémia önmagában képes fokozni a TNF- α termelődést a vese tubulus hengerhám sejtjeiben és az erek simaizmában.

Wilson és munkatársai kimutatták: az NF κ B és a TNF- α nagy mennyiségben expresszálódik⁹⁵ hiperkoleszterinemiában a vesében és fokozza a renális gyulladás mértékét. A neutrofil limfociták és makrofágok infiltrációja a különböző citokinek termelése által fokozhatja a szöveti károsodást. Korábbi tanulmányok már kimutatták, hogy a makrofágok és neutrofilek által termelt proinflammatorikus citokinek koncentrációja (TNF- α , IL-6), emelkedett az iszkémiás vesében és pathofiziológiai szerepe lehet az IR sérüléseket követően⁹⁶.

Vizsgálatainkból levonható következtetésként kimondhatjuk, hogy a posztkondicionálás csökkentheti az egészséges szervekben a TNF- α -szintet, azonban a hiperkoleszterinemiás szervek esetében ez a hatás nem alakul ki. Feltételezzük, hogy az NF κ B- és a MAPK-útvonalakat a hiperkoleszterinémia már a TNF- α receptor asszociált útvonal előtt indukálni képes. Így a korai válasz által lehetséges, hogy az iszkémia nem tud olyan szignifikáns gyulladásos választ kiváltani. Feltételezzük, hogy a hiperkoleszterinémia egy adott szintig befolyásolhatja az endogén védelmet. Hasonló eredményt kaptak Róth és munkatársai⁹⁷ a szabad gyököket lekötő antioxidáns kezelés kapcsán, melynek során kiderült, hogy az endogén antioxidáns védelem aktiválásához szükséges bizonyos mennyiségű szabad gyök jelenléte. A hiperkoleszterinémia már önmagában is képes indukálni az endogén védelmet, feltételezhetően egy a ROS-hoz kapcsolódó útvonal segítségével. Ez az útvonal akár jelentősebb szereppel bírhat a szérumban, mint magában a veseszövetben. Így megmagyarázható az eltérés a szérumban és a szövetben mért TNF- α -szintek között. Ezen feltevésünk bizonyítására még további kutatásokra van szükség.

4. AZ ISZKÉMIÁS POSZTKONDITIONÁLÁS HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA VESE ISZKÉMIA-REPERFÚZIÓT KÖVETŐEN 2-ES TÍPUSÚ DIABÉTESZ MELLITUSZBAN

4.1. Bevezetés

A **2-es típusú diabétesz mellitusz (T2DM)** multifaktoriális, poligenetikus betegség, melyet az inzulinszekréció elégtelensége, relatív inzulinhiány és inzulinrezisztencia jellemez. Ennek háttérében elsősorban az elhízás⁹⁸, a népesség elöregedése⁹⁹, az urbanizáció, a nyugati életstílus: a túlzott zsír¹⁰⁰, energiadús táplálkozás és a mozgásszegény életmód¹⁰¹ terjedése húzódik. A genetikai hajlam a patogenezisben nem elhanyagolható¹⁰², ezt mutatja a betegség családi halmozódása, és gyakrabban fordul elő színesbőrű populációkban. Számos gyógyszer (például kortikoszteroidok¹⁰³, a növekedési hormon¹⁰⁴) indukálhat csökkent inzulin érzékenységet. Bár az inzulinrezisztencia és a T2DM pontos patogenezise még nem ismert, az utóbbi évek kutatásai hozzájárultak a háttérben húzódó molekuláris mechanizmusok mélyebb megismeréséhez. A zsírszövet is fontos regulátora az inzulin hatásának, mivel szabad zsírsavakat termel, melyek az inzulin receptor szubsztrát (IRS)-proteinek szerin-foszforilációjának elősegítése révén gátolják az inzulin jelátvitelét. Ezen kívül a zsírszövet endokrin szervként is funkcionál, adipokineket szekretál: az inzulin-antagonista hatású TNF- α -t¹⁰⁵, rezisztint¹⁰⁶, illetve az inzulin szenzitivitást növelő adiponektint¹⁰⁷ és leptint¹⁰⁸. Inzulinrezisztencia esetén az inzulin célszervein (vázizom, szív, zsírszövet, hasnyálmirigy, máj) nem képes a fiziológiás hatását kifejteni, a pankreasz β -sejtjei fokozott inzulintermeléssel válaszolnak. A tartósan magas inzulinszint csökkenti az inzulin-függő glükóz transzporter, GLUT4 gén transzkripcióját, illetve rövidíti a GLUT4 mRNS féléletidejét az inzulin-dependens sejtekben¹⁰⁹, tovább rontva az inzulin iránti érzékenységet. Ez végül a hasnyálmirigy fokozatos kimerüléséhez, ún. emelkedett éhgyomri glükóz szinthez (impaired fasting glucose, IFG) vagy csökkent glükóz-toleranciához (impaired glucose tolerance, IGT), majd manifeszt diabétesz kialakulásához vezet. A T2DM és az azt megelőző állapotok diagnózisát orális glükóz tolerancia teszt (OGTT) elvégzésével állíthatjuk fel¹¹⁰. Ha az éhgyomri vércukorérték 5,6 és 6,9 mmol/l közötti, akkor emelkedett éhgyomri glükóz szintről (IFG) beszélünk. Ha a vizsgálat 2. órájában a kapott érték 7,8-11,0 mmol/l közötti, akkor károsodott glükóz toleranciát (IGT) állapíthatunk meg. 2-es típusú

diabétesz mellituszról (T2DM) beszélünk, ha a random (nem éhgyomri) vércukor $> 11,1$ mmol/l, ha az éhgyomri vércukorérték > 7 mmol/l, vagy ha az orális glükóz tolerancia teszt során a 2 órás érték a 11,1 mmol/l-t meghaladja.

Az iszkémiás posztkondicionálást kutató munkacsoportok körében fontos téma az időintervallum, melyben a posztkondicionálást alkalmazzuk, és annak jelentősége a protektív hatás szempontjából. Eddig széleskörű vizsgálatok irányultak az infarktuszos területek csökkentésére miokardiumban. Kin, Zhao és Vinten-Johansen állapították meg¹¹¹, hogy a reperfüzió első fázisa a legkritikusabb. Kísérletükben a bal arteria coronaria elülső leszálló ágában fél órás okklúziót alkalmaztak patkánymodellben. Ezt 3-6 ciklus 10 másodperces reperfüziós-iszkémiás posztkondicionálás, és három órás reperfüzió követte így csökkentve az infarktus méretét. Viszont, ha a posztkondicionálás a reperfüzió megindulása után egy perccel később kezdődik, az infarktust csökkentő hatása elvész, és megnövekedett szabadgyök-szint mérhető.

4.2. Célkitűzések

Munkánk második részében célkitűzésünk: 2-es típusú diabétesz mellituszban (T2DM) vesehilus-okklúziót követően iszkémiás posztkondicionálás alkalmazása; és a kialakuló oxidatív stressz és gyulladásos válaszreakciók mértékének vizsgálata. Kérdésünk, hogy normál és T2DM patkányokban az orális glükóz tolerancia teszt során milyen mértékben változik a szérumglükóz-, inzulin- és TNF- α -szint.

Célunk az iszkémiás posztkondicionálás hatásának vizsgálata vesében 90 perc iszkémiát és 240 perc reperfüziót követően; az iszkémiás posztkondicionált csoportban a reperfüzió kezdeti fázisában 4 ciklus 15 másodperces reperfüziót és 15 másodperces reokklúziót alkalmaztunk. Ezt követően vérben, szérumban és távoli szervben (a májban) a kialakuló oxidatív stressz és gyulladásos válaszreakciók vizsgálata. Az oxidatív stressz mértékét a szérumperoxid-szint mérésével kívántuk jellemezni. A reperfüzió indukálta gyulladásos válaszreakciót a TNF- α meghatározásával, és a fehérvérsejtek indukált szabadgyök-termelésével. Továbbá mértük az antioxidáns enzimek (SOD, GSH) mennyiségét, aktivitását, és a lipidperoxidáció indirekt markereként ismert malondialdehid koncentrációját májszövetben.

4.3. Anyag és módszerek

4.3.1. A kísérleti modellek, vizsgálati módszerek

A kísérleti állatok

Kísérletünkhöz 32 darab ivarérett, hím, 3 hónapos Wistar patkányt használtunk (332 g, \pm 11,31g). Az állatokat egyesével, külön ketrecekbe helyeztük el, melyeket egyedi azonosító számmal láttunk el. Ivóvíz és táplálék az egyes vizsgálatok közötti időszakokban szabadon állt rendelkezésükre. Vizsgálatainkat az állatok védelméről és kíméletéről szóló 2009. évi CXLV törvény és az állatkísérletek végzéséről szóló kormányrendelet előírásainak megfelelő hatósági engedély (BA02/2000-25/2006) birtokában végeztük.

A diéta kialakítása

A patkányokat két csoportra osztottuk. Az egyik csoportot normál patkánytáppal, a másikat egy zsírdús, általunk készített táppal etettük¹¹². A száraz laboratóriumi patkánytápot őrlemény formájában szereztük be. Ehhez koleszterint, epesavat és napraforgóolajat kevertünk, úgy hogy a táp 2% koleszterin, 0,5% kólsav és 20% napraforgóolaj tartalmú legyen¹¹³. (A táp semmiféle állati eredetű komponenst nem tartalmazott.) Desztillált víz segítségével formázhatóvá téve olyan alakúra gyúrtuk, mint amit a normál tápon tartott csoportunk fogyasztott, majd két nap alatt kiszáritottuk.

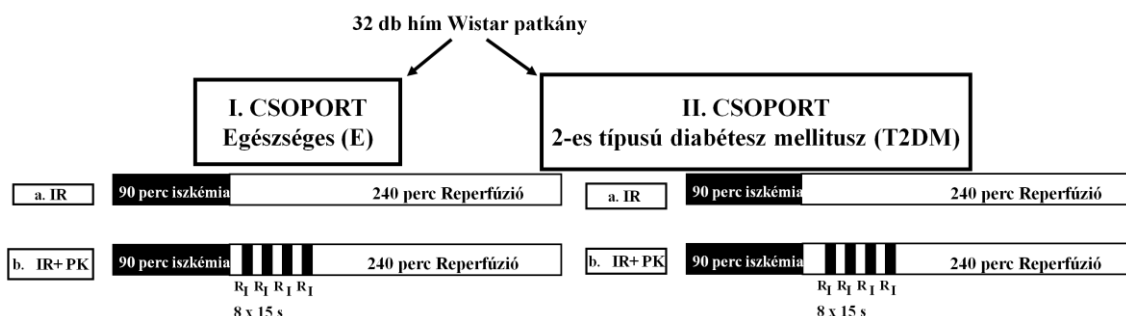
A tápfogyasztás és testtömegváltozás követése

Az állatok tápfogyasztását és testtömegét hetente kétszer digitális mérleggel, grammos pontossággal mértük.

A kísérleti csoportok, a mintavételi protokoll

A kísérlet 5. és 12. hetét követően kezdtük meg a műtéteket. A narkózist intraperitoneálisan bólusban adott ketamin (Calypsol, Richter G. Rt. Magyarország) és diazepam (Seduxen, Richter G. Rt., Magyarország) 1:1 arányú keverékével végeztük (0,2 ml / 100 tsg). Laparotómiát követően mobilizáltuk a mezenteriális gyököt, meggyőződünk a vesék kb. azonos nagyságáról, illetve azonosítottuk az ellátó ereket, majd mindkét vesét atraumatikus mikroklippel 90 percre a keringésből kirekesztettük. Mindkét csoportot további alcsoportokra osztottuk (n=4): az egyik alcsoportnál iszkémiát követően 4 órás reperfüziót [IR], a másik alcsoportnál pedig az iszkémiát követően a reperfüzió megkezdése előtt 2 perc poszt-kondicionálást (15 s reperfüzió / 15 s reokklúzió 4 ciklusban) alkalmaztunk [PK] (23. ábra). A kétórás reperfüziót követően

vért és szövetmintákat vettünk. Az állatokat exsanguináltuk, vért és szérumot használtunk a következőkben részletezésre kerülő paraméterek mérésére. Szövetteni vizsgálatra a májat (V. lebeny) a feldolgozásig -70 °C-on folyékony nitrogénben tároltuk.



23. ábra: Kísérlet sematikus ábrázolása a kísérleti csoportok feltűntetésével a 5. és a 12. héten (n=4).

I/ a: Normál táp, 90 perc iszkémiát 240 perces reperfúzió követte.

I/ b: Normál táp, 90 perc iszkémia után (15 s felengedés/15 s reokklúzió 4 ciklusban) poszt kondicionálást alkalmaztunk a 240 perces reperfúzió előtt.

II/ a: Zsírdús táp, 90 perc iszkémiát 240 perces reperfúzió követte.

II/ b: Zsírdús táp, 90 perc iszkémia után (15 s felengedés/15 s reokklúzió 4 ciklusban) poszt kondicionálást alkalmaztunk a 240 perces reperfúzió előtt.

4.3.2. Laboratóriumi vizsgálatok

Glükóz meghatározás

A már ismertett módszer szerint végeztük a vizsgálatokat (21. oldal).

Összkoleszterin, triglicerid meghatározás

A szérumkoleszterin- és triglicerid-szintjét a korábban leírtak szerint standard fotometriás módszerrel mértük (21. oldal).

Orális glükóz tolerancia teszt (OGTT)

A vizsgálatot emberben éhgyomorral, 12 óra éhezés után kell elvégezni (az éhezés során víz fogyasztása megengedett). Az éhomi vércukorszint mérése után a glükóz bevitel rendszerint orálisan történik. A maximális vércukor érték normálisan általában az első óra végére alakul ki, a 2 órás érték már a görbe leszálló szakaszán helyezkedik el, 2-2,5 órán belül pedig visszatér a kiinduló szintre. Ezt követően még mérsékelt, rendszerint tünetmentes posztaliméntáris hipoglikémia is kialakulhat, ami azonban a 4. óra végére rendeződik. Ha az inzulinszekréció mértéke vagy dinamikája nem kielégítő,

a lefutás módosul: a csúcérték később alakul ki, tovább tart a hiperglikémia. Ezt nevezik diabetoid lefutásnak, mert jellemzően inzulinrezisztens, prediabéteszes-diabéteszes egyéneken fordul elő. Regisztrálhatjuk a glükóz által kiváltott inzulinszint-változásokat is a β -sejtek válaszkészségének vizsgálatára. Fiziológias esetben a szérumban mért inzulin szint egy hirtelen kialakuló kiugrás és visszaesés után fokozatos, elnyújtottabb növekedést mutat. A kezdeti gyors válaszreakció a β -sejtekben tárolt inzulin felszabadulásának, míg a későbbi, fokozatos emelkedés az inzulintermelés fokozódásának tulajdonítható. Inzulinrezisztencia esetén a nyugalmi inzulin koncentráció megemelkedett, viszont tárolt inzulin hiányában a korai gyors válaszreakció elmarad¹¹⁴.

A koleszterin-etetés szénhidrát anyagcserére gyakorolt hatásának jellemzésére a diéta beállítását követő 5. és 12. héten cukorterhelést végeztünk. Az állatokat a kísérlet előtti nap délutánjától éhezettük (15 óra tápmegvonás). A kísérlet napján meghatároztuk az éhgyomri vércukorszintet. Majd orálisan gyomorszondán keresztül 1 g/kg glükózt adtunk és az ezt követő 5., 15., 30., 60. és 120. percben meghatároztuk a vércukorszintet. Az inzulin és TNF- α koncentrációját a tolerancia teszt 0., 30., 60. és 120. percében mértük meg.

Inzulin meghatározása

Inzulin „high range” ELISA- kit (ALPCO Diagnostics, Salem, USA) segítségével, a kitben szereplő útmutató alapján kvantitatívan mértük kísérleti állataink széruminzulin-szintjét. A kísérlet során 5 μ l standardot, mintát, és kontrollt, majd 65 μ l tormaperoxidáz enzimmel konjugált ellenanyagot pipettáztunk a lemezre. Szobahőmérsékleten, horizontális mikrolemez rázó segítségével végzett 2 órás inkubáció után a lemez 6-szor került átmosásra - minden esetben 300 μ l mosóoldattal - a meg nem kötött konjugát eltávolítása érdekében. Ezután a lemezre 90 μ l TMB szubsztrátot adagoltunk és ismét szobahőmérsékleten 15 percig inkubáltuk. A reakciót 90 μ l STOP oldat hozzáadásával állítottuk le. Az optikai denzitást mikrolemez olvasó segítségével mértük 450 nm hullámhosszon (a referencia hullámhossz 630 nm volt) a STOP oldat hozzáadása utáni 30 percen belül. Az eredményeket grafikonon ábráztuk.

Inzulinrezisztencia meghatározása (HOMA_{IR})

A HOMA_{IR} index a szervezet inzulinérzékenységének meghatározására szolgáló módszer^{115,116}. A HOMA_{IR} indexet az éhgyomri vércukor- és inzulinszintből az alábbi képlet alapján számoltuk: $HOMA_{IR} = [Éhgyomri\ inzulin\ (\mu U/ml) \times glükóz\ (mmol/l)] /$

22,5. Minél alacsonyabb ez az érték, az inzulinérzékenység annál jobb¹¹⁷. ≤ 1 normális; >2 inzulinrezisztencia gyanúja; $>2,5$ inzulinrezisztencia valószínű; $>4,4$ T2DM.

Szabadgyök-termelés meghatározása teljes vérből

A már ismerttetett módszer szerint végeztük a vizsgálatokat (23. oldal).

Citokintermelés

A citokin expresszió meghatározására szérum-TNF- α -koncentrációt mértünk ELISA kit-tel (R&D Systems, Inc. Minneapolis, USA), követve a gyártó cég utasításait (23. oldal).

Matkovics-féle malondialdehid (MDA) meghatározás májszövetből

A malondialdehid a lipidperoxidáció leggyakrabban mért biológiai markere, mely főként a membrán többszörösen telítetlen zsírsavainak peroxidációját jelzi.

*Minta előkészítése*¹¹⁸: thiobarbiturát (TBA, Renal) 10%-os perklórsavban (Reanal) készített túltelített oldatát háromszoros mennyiségű 20 %-os triklórecetsavval (TCA, Carbo Erbe) elegyítettük. Az így kapott 1:3 arányú elegy 4,5 ml-éhez 0,5 ml homogenizátum (1 g szövet+ 4 ml 0,9 % fiziológiás só) adunk. A keletkezett mintát forrásban levő vízfürdőben 20 percig inkubáltuk, majd jégben gyorsan hűtöttük és 4000 rpm-en 15 percig centrifugáltuk (Universal 3RF, Hetterich Zentrifugen). A felülúszót 532 nm-en, a TBA-TCA elegy ellenében fotometráltuk (Milton Roy Spectronic 6001 spektrofotométer). A minták koncentrációját (nmol/ml) standardgörbe alapján határoztuk meg.

Szuperoxid dizmutáz enzim aktivitás mérése májszövetben

A szuperoxid dizmutázok (SOD) a legősibb fémtartalmú endogén antioxidáns enzimek, melyek rezet, cinket, mangánt, vasat és nikkelt tartalmazhatnak kofaktorként. Prokarióta és eukarióta szervezetekben egyaránt megtalálhatók. A SOD1 (Cu-Zn SOD) az eukarióta szervezetek citoplazmájában található, míg a SOD2 (Mn-SOD) a prokarióta szervezetekre jellemző, de megtalálható az eukarióta szervezetek mitokondriális mátrixában. Méréseinkben az intracelluláris SOD-ot (SOD1+SOD2) határoztuk meg vörösvértest hemolizátumban. A mérés alapelve, hogy a szövetekben, vérben, plazmában található SOD enzim gátolja az adrenalin átalakulását adrenochrommá (színes, fotometrálnak komplex). A gátlás mértékéből (optimálisan 50%-os) a benne levő enzim mennyisége kiszámítható¹¹⁹. Valójában azt számítottuk ki,

hogy a mintánkban levő enzim aktivitása milyen koncentrációjú standard SOD oldat aktivitásának felelt meg.

*Minta előkészítése*¹²⁰: 1 gramm májszövethez 4ml hideg fiziológiás sóoldatot adunk. Homogenizálás után hűtött gyorscentrifugában centrifugálunk 20 percig 16000-es fordulattal (Hettich Zentrifugen Universal 3RF) 4°C-on. A felülúszót leöntjük, és ezt különböző hígításokból mérjük. Az üledékből 100-szoros hígítást készítettünk fiziológiás sóoldattal. *Mérés*: Hitachi U-2001 típusú spektrofotométer. *Adrenalin standard (ASTD)*: 1,6488 mg/ml adrenalin 0,1N sósavban oldva. *0,05 M-os SOD puffer*: 3597 g Na₂CO₃, 1428 g NaHCO₃ 1000 ml deszt.vízre, 0,037 g EDTA. 100 µl hígított szövet, melyhez 100 µl-t adunk az ASTD-ből. A végső térfogat mindig 3 ml. *Aktivitésmérés*: Az abszorbanciát 480 nm-en 3 percig folyamatosan mértük és regisztráltuk. A kontroll görbe és a minta jelenlétében kapott görbe felszálló szárainak meredeksége közötti eltérésből számítottuk ki a gátlás mértékét.

Redukált glutation (GSH) meghatározás májszövetből

A GSH fontos intracelluláris antioxidáns tripeptid. Ciszteinjének thiol csoportja az instabil molekulákat, mint amilyenek a szabad gyökök, egy elektron átadásával képes stabilizálni. A reakció során a glutathion maga is reaktívvá válik, de másik aktivált glutathionnal glutathion diszulfidot alkot, amit a glutathion reduktáz regenerál redukált glutathionná.

*Minta előkészítése*¹²¹: 1 gramm májszövethez 4 ml fiziológiás sóoldatot adunk, majd homogenizáltuk. 1 ml homogenizátumhoz 10%-os triklórecetsavat (TCA, Carbo Erbe) adunk. Az elegyet 15 percig 4000-es fordulattal centrifugáltuk. A felülúszó 2 ml-éhez 4 ml 0,4 M-os (pH 8,7) Trisz-(hidroximetil)-amino-metan (TRIS, Reanal) puffert adunk. Az így kapott elegyet 100 µl 5,5-Dithiobisz-2-nitrobenzoésav (DTNB, SERVA) hozzáadása után, 412 nm-en fotometráljuk (Milton Roy Spectronic 6001). A minta GSH koncentrációját (nmol/ml) standardgörbe alapján határoztuk meg.

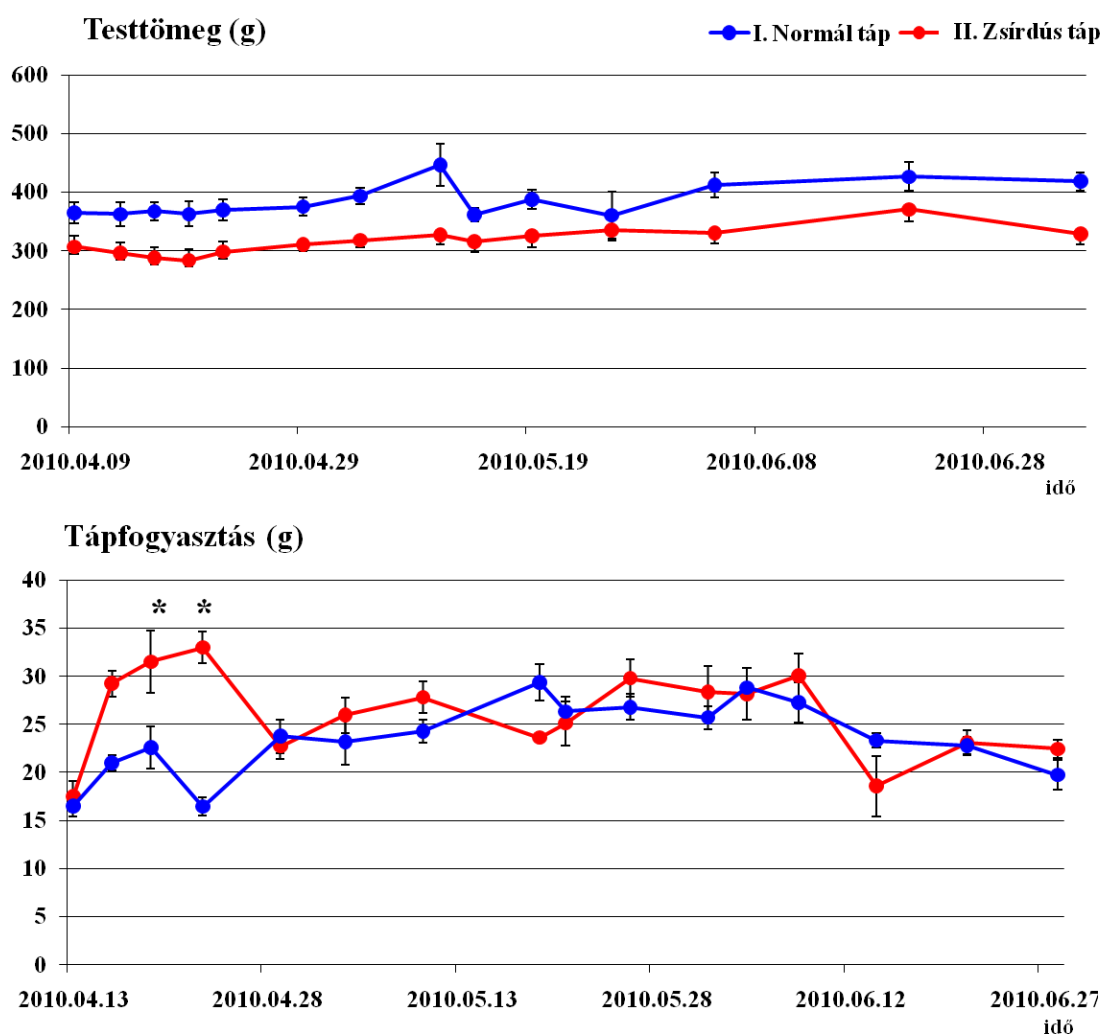
4.3.3. Statisztikai analízis

Az analízishez és az ábrázoláshoz a Microsoft Office Excel 2007 és az SPSS 17.0 programokat használtuk. Az adatok ábrázolásakor a középértéket (átlag) és annak hibáját (\pm SEM-standard error of mean) tüntettük fel. Az állatmodell létrehozásakor, az egyes csoportokat Student féle t-próbával hasonlítottuk össze. A kísérleti eredményeket egyirányú varianciaanalízissel (ANOVA) a csoportokon belül Wilcoxon, a csoportok között Mann-Whitney tesztet alkalmaztuk. A különbséget akkor tekintettük

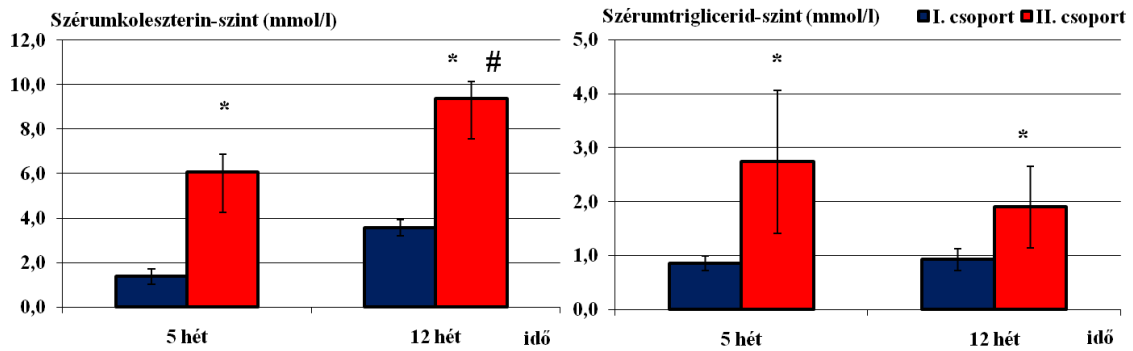
szignifikánsnak, ha p érték kisebb volt, mint 0,05. Az ábrákon *, # karakterrel jelöltük a szignifikánsan eltérő értékeket.

4.4. Eredmények

A koleszterinben dús diéta hatását a testtömegre és a tápfogyasztásra a 24. ábra mutatja. A két kísérleti periódusban egyik kísérleti csoportnak sem gyarapodott jelentősen a testsúlya. Mindkét csoport elfogadta a kínált tápot. Eleinte a koleszterinnel etetett állatok szignifikánsan többet fogyasztottak, mint a kontroll csoport, de a 3. hét kezdetétől a két csoport tápfogyasztása nem különbözött (**= $p < 0,01$ vs Normál táp).

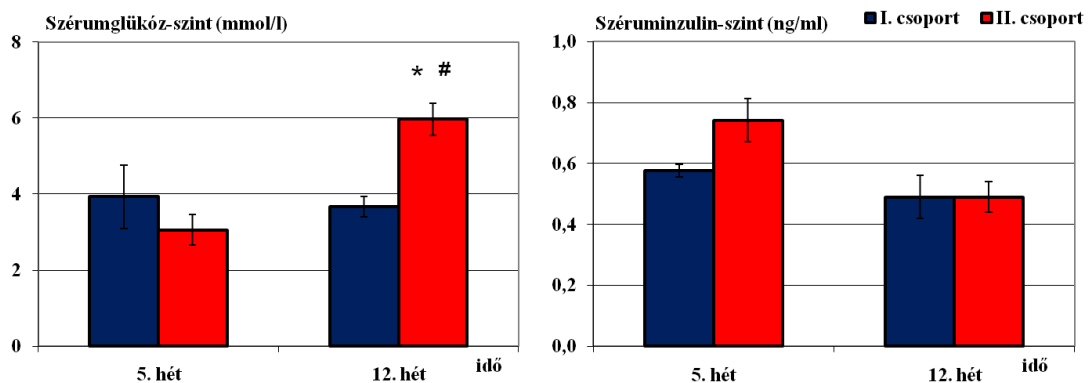


24. ábra: Kísérleti állataink testtömegének gyarapodása és tápfogyasztása az etetés során. (Kék jelölés= Normál tápon tartott csoport; piros= Zsírús táppal etetett csoport)



25. ábra: Szérumkoleszterin- és trigliceridszint az 5. és 12. héten normál, és a zsírdús tápon tartott patkányokban. (*= $p < 0,05$ vs Normál táp, # = $p < 0,05$ vs 5. hét)

A zsírdús tápon tartott kísérleti állatok szérumkoleszterin- és triglicerid-szintje szignifikánsan magasabb volt a normál diétán tartott állatokhoz képest mind az ötödik, mind a tizenkettedik héten (25. ábra).

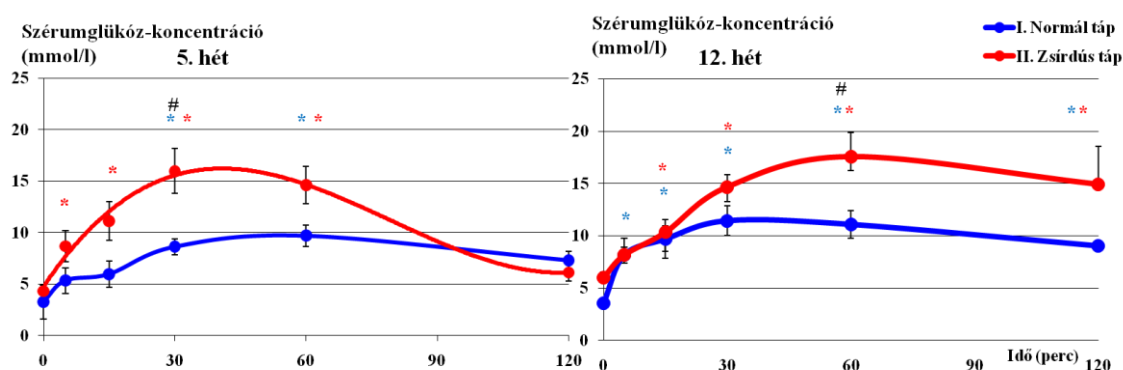


HOMA _{IR}	5. hét	12. hét
Normál táp	2,51±0,01	1,99±0,02
Koleszterin táp	2,52±0,03	3,25±0,02

26. ábra: Éhomi szérumglükóz-, inzulin-szint és a HOMA_{IR} index az 5. és 12. héten normál, és a zsírdús tápon tartott patkányokban. (*= $p < 0,05$ vs Normál táp, # = $p < 0,05$ vs 5. hét)

A zsírdús táppal etetett csoportban az éhgyomri vércukorszint a 12. héten szignifikánsan nagyobb volt, mint a normál tápon tartott csoporté. Az éhgyomri széruminzulin-szintben nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget. T2DM csoportban a 12. héten nagy valószínűséggel megállapítható az inzulinrezisztencia (HOMA_{IR}=3,25±0,02), szignifikáns különbség ($p=0,059$) nincs a csoportok között (26. ábra).

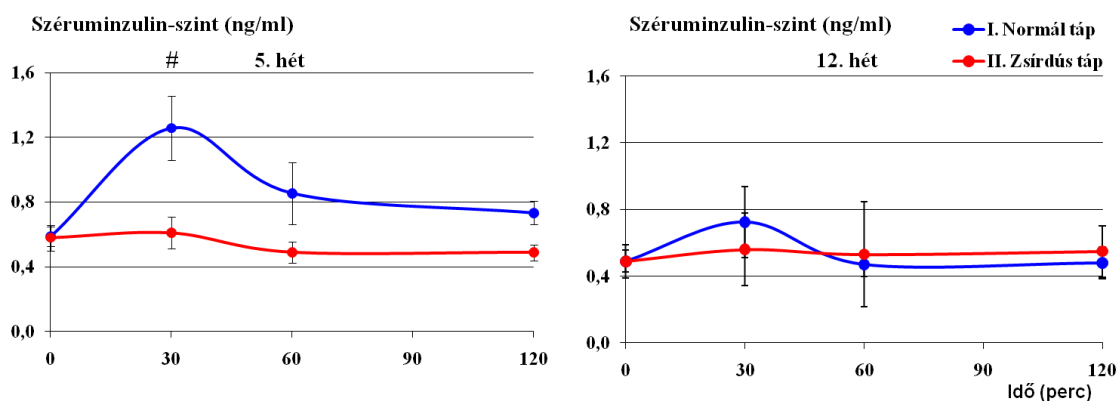
4.4.1. Az orális glükózterhelés eredményei



27. ábra: Szérumglükóz-koncentráció 1g/kg p.o. glükóz adagolása után az idő függvényében 5 és 12 heti zsírdús táplálás után. (*= $p < 0,05$ vs 0. perc, #= $p < 0,05$ vs Zsírdús táp)

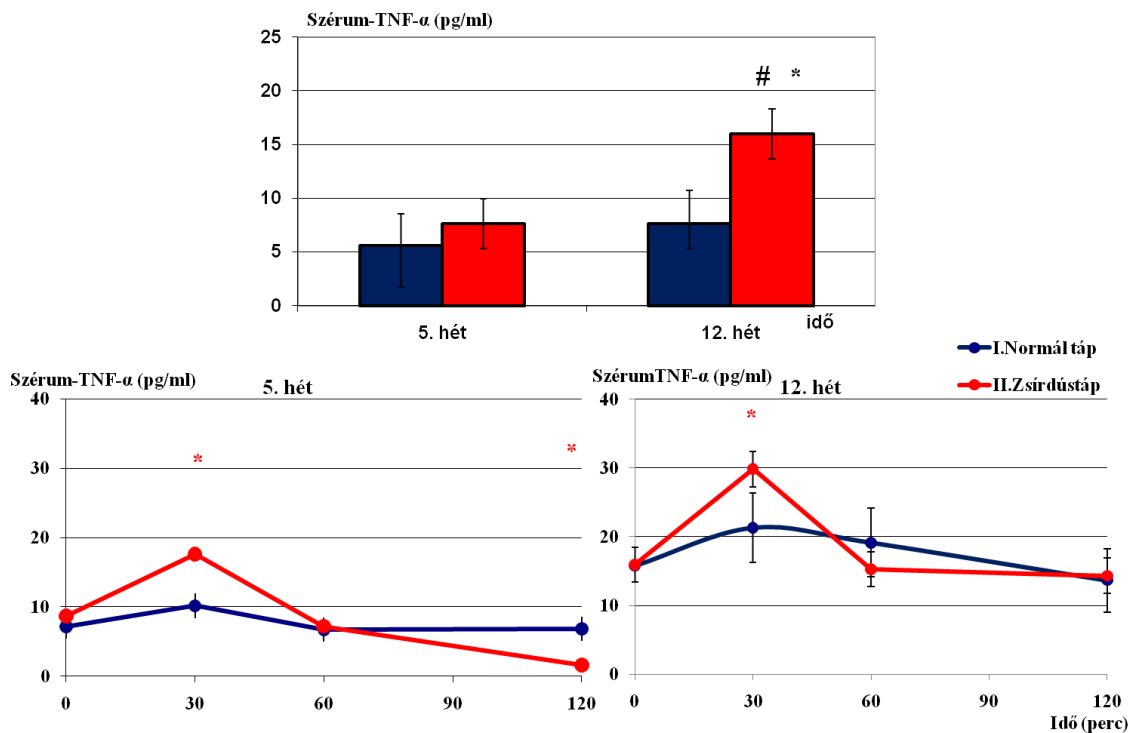
Az **5. héten** az éhgyomri vércukor szint a fiziológiásnak megfelelő volt mindkét csoportnál. A szérumglükóz-emelkedés a zsírdús táppal etetett csoportban azonnal jelentkezett, míg a kontroll csoportnál több idő telt el, míg a szérumglükóz-szint emelkedése megindult. A vércukor emelkedés maximuma szignifikánsan magasabb volt a zsírdús tápon tartott állatoknál a 30. percben, de 2 óra múlva mindkét csoport vércukor szintje normalizálódott, nem különbözött szignifikánsan az éhgyomri szinttől. A vizsgálat során a zsírdús táppal etetett csoportban a 15., 30., 60. percben a szérumglükóz-szint magasabb volt, mint 11,1 mmol/l, a 120. percben normalizálódott.

A **12. héten** a zsírdús táppal etetett csoport éhgyomri értéke $5,37 \pm 0,53$ mmol/l volt. A kontroll csoportban a vizsgálat 2. órájában $9,032 \pm 0,337$ mmol/l a szérumglükóz-szintje, mely károsodott glükóz toleranciára utal (IGT). A zsírdús tápon tartott csoportban az OGTT 60. percében szignifikáns különbséget mértünk a kontroll csoporthoz képest. Az érték nagyobb, mint 11,1 mmol/l, vagyis az eltérés T2DM-nek felel meg (27. ábra).



28. ábra: Széruminzulin-koncentráció az idő függvényében az OGTT 0., 30. 60. és 120. percében 5 és 12 heti zsírdús diéta után. (#= $p < 0,05$ vs Zsírdús táp)

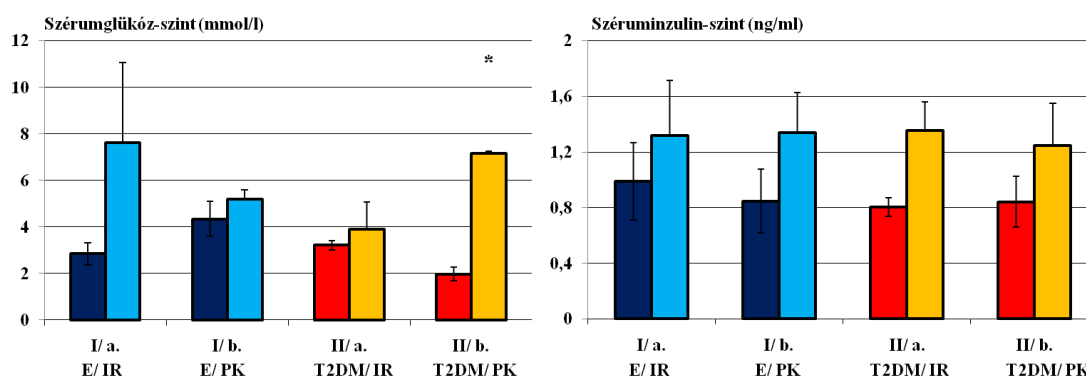
A széruminzulin-szintet az OGTT során a 28. ábra mutatja. Éhgyomri inzulin szintben szignifikáns különbség a két csoport között nem volt. A széruminzulin-szint a kontroll csoportban a glükóz beadása utáni 30. percben érte el maximális értékét, mely szignifikánsan több volt, mint a zsírdús táppal etetett csoportban mért érték. A zsírdús táppal táplált csoportban nem tapasztaltunk inzulin koncentráció növekedést a per os 1 g/kg glükóz beadása utáni 120 percben. Méréseink szerint mindkét csoportban inzulinrezisztencia alakult ki, azzal a különbséggel, hogy míg a zsírdús táppal etetett csoportnál egyáltalán nem tapasztaltunk az exogén glükóz által indukált inzulin felszabadulást, addig a kontroll csoportban kismértékben indukálható volt az inzulinszekréció.



29. ábra: Szérum-TNF- α -koncentráció a kísérlet 5. és 12. hetében, valamint az idő függvényében az OGTT 0., 30. 60. és 120. percében (#= $p < 0,05$ vs 5. hét Zsírűs táp, *= $p < 0,05$ vs 12. hét Normál táp)

A szérum-TNF- α -koncentrációban (29. ábra) az 5. hét során nem volt szignifikáns különbség csoportjaink között. A 12. hét után a TNF- α koncentrációja szignifikánsan magasabb a zsírűs táppal etetett csoportban a normál csoportéhoz, valamint az 5. héthez képest. Meglepő módon mindkét csoportban az 1g/kg p.o. adott cukor hatására átmenetileg megemelkedett a szérum-TNF- α -szint, maximális koncentrációját a 30. percen mértük (szinkronban az inzulinemelkedéssel), majd a 120. percen visszatért a kiindulási értékre.

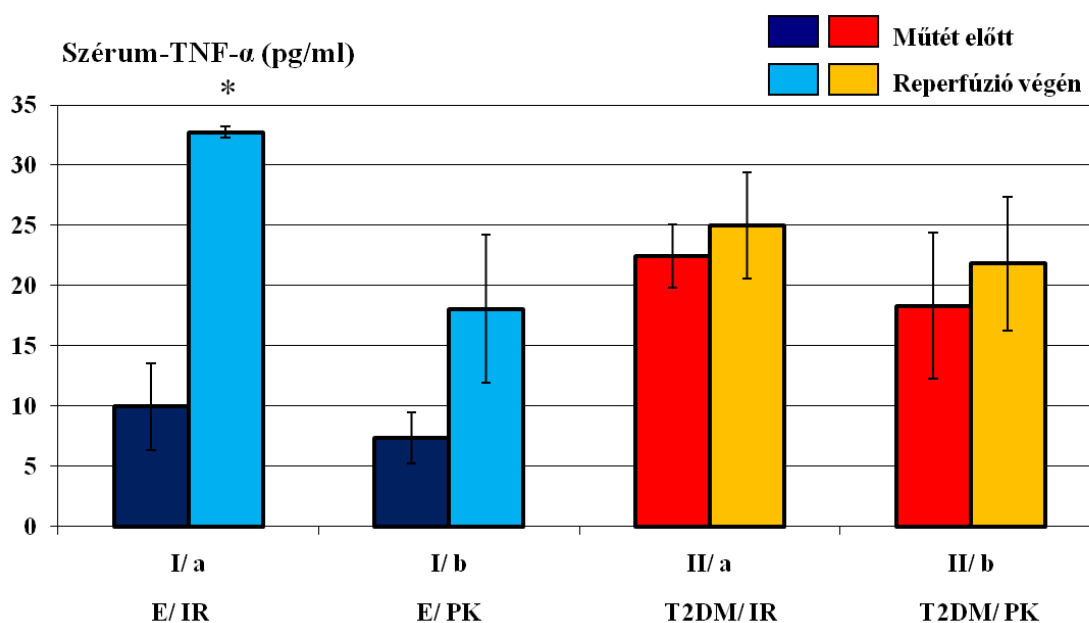
4.4.2. A műtéti eredmények szérumban és teljes vérben



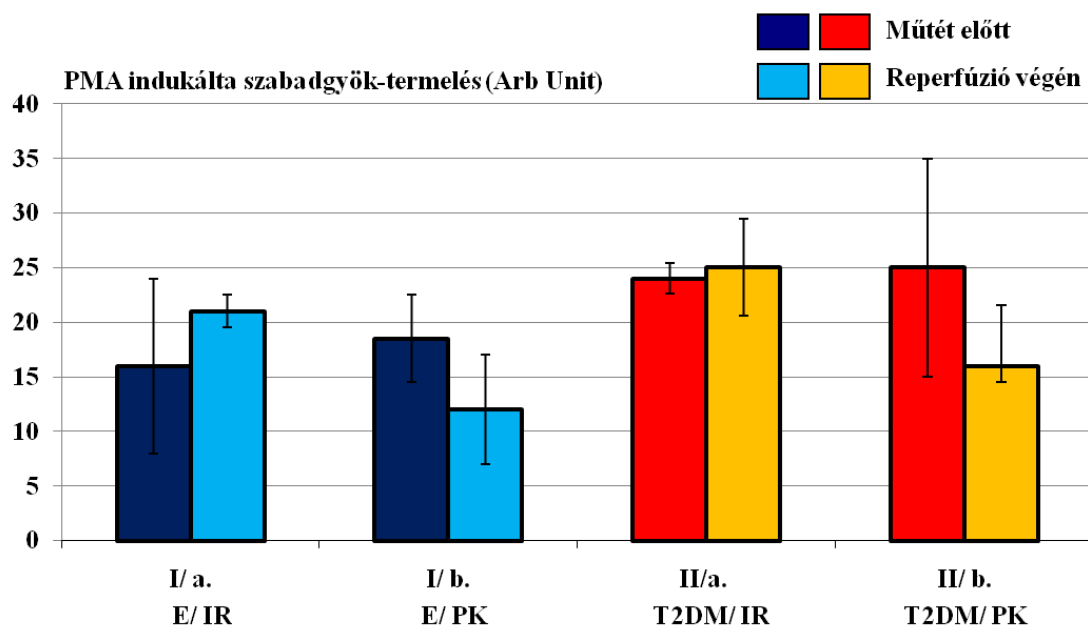
30. ábra: A szérumban mért glükóz és inzulin koncentráció a műtét előtt és a reperfúzió végén az 5. héten. (*= $p < 0,05$ vs Műtét előtt)

A kontroll-IR csoportban minimálisan megemelkedett, míg a posztkondicionált állatoknál a műtét előtti szinttel megegyezett a műtét után mért vércukor szint. A zsírdús táppal etetett állatokban a posztkondicionálás hatására szignifikánsan emelkedett a szérumglükóz-koncentráció. Az inzulinszint mind az IR, mind a posztkondicionált állatoknál megemelkedett a műtét hatására, de szignifikáns különbséget nem tapasztaltunk (30. ábra).

A műtéti beavatkozás emelte a TNF- α -koncentrációt minden csoportnál, szignifikáns növekedést egyedül a normál tápon tartott, posztkondicionált állatoknál mértünk (31. ábra).



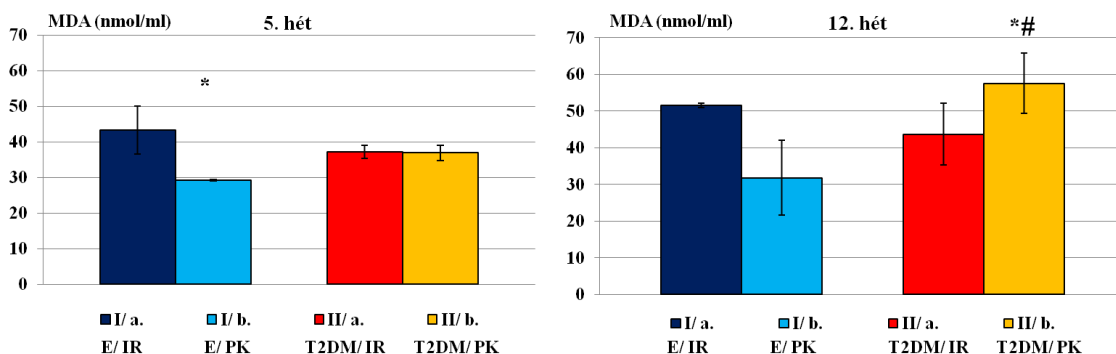
31. ábra: Szérum-TNF- α -koncentráció műtét előtt és a reperfúzió végén a 12. héten. (*= $p < 0,05$ vs Műtét előtt)



32. ábra: PMA indukálta szabadgyök-termelés (Arb Unit) teljes vérben a műtét előtt és a reperfúzió végén a 12. héten.

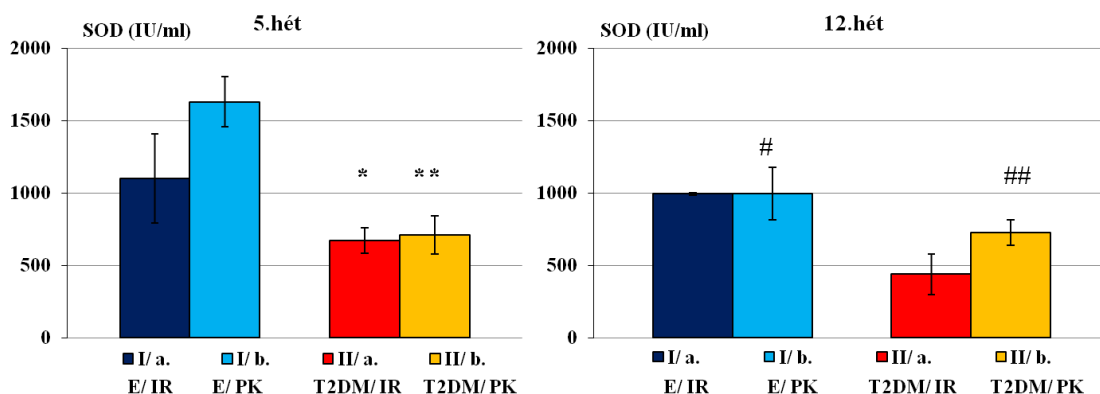
A PMA indukálta szabadgyök-termelés a normál tápon tartott csoportban kisebb volt a T2DM csoporthoz képest. Kisebb, de nem szignifikáns értéket mértünk a normál tápon tartott, poszt-kondicionált csoportban az iszkémia-reperfúziós csoporthoz képest. T2DM-ben növekedett a szabadgyök-produkció, nem szignifikáns mértékben (32. ábra).

4.4.3. A műtéti eredmények májszövetben



33. ábra: Májzsövetben mért malondialdehid (MDA) koncentráció az 5. és a 12. héten a reperfúzió végét követően. (*= $p < 0,05$ vs IR (I/a; II/b), #= $p < 0,05$ vs II/b. az 5. héten)

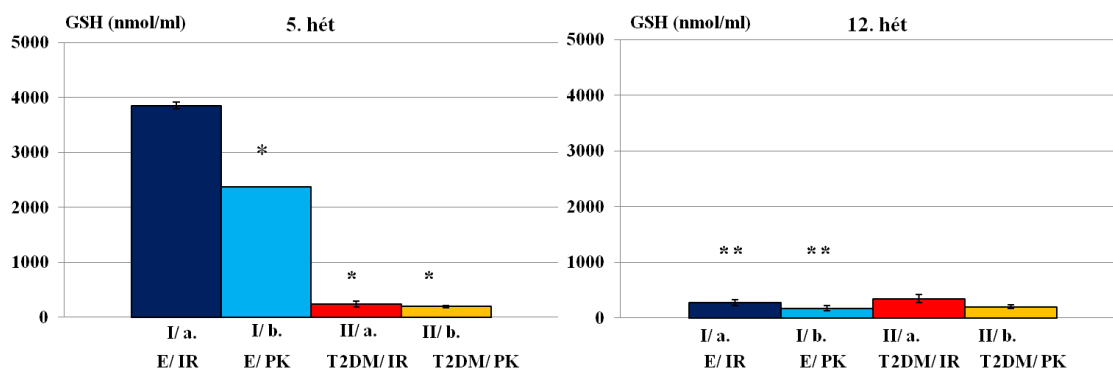
Az **5. héten** a posztkondicionálás az I/b. csoportban szignifikánsan csökkentette a membránkárosodást, mert a lipidperoxidációt jelző malondialdehid májban mért szintje szignifikánsan kisebb volt az I/a. csoporthoz képest. A II/b. csoportban a posztkondicionálást követően nem változott az MDA koncentráció az iszkémia-reperfúziós csoporthoz képest (II/a.). A **12. héten** a normál tápon tartott csoportban a posztkondicionálás csökkentette az MDA koncentrációt. A T2DM, posztkondicionált csoportban (II/b.) szignifikánsan több MDA-t mértünk, mint az IR csoportban és az 5. héten (33. ábra).



34. ábra: A szuperoxid dizmutáz enzim (SOD) májszövetben mért aktivitása reperfúziót követően. (*= $p < 0,05$ vs I/a., **= $p < 0,05$ vs I/b.- 5. hét, #= $p < 0,05$ vs I/b.- 5. hét, ##= $p < 0,05$ vs II/a.- 12. hét)

A szuperoxid dizmutáz enzim aktivitása az **5. héten** emelkedett a posztkondicionált csoportban. A T2DM posztkondicionált csoportban kisebb a SOD

aktivációja, mint a normál táppal etetett iszkémia-reperfúziós, valamint a poszt kondicionált csoportban. A **12. héten** a poszt kondicionált csoportban szignifikánsan kisebb a SOD aktivációja az egészséges állatokban az 5. héthez képest. A T2DM poszt kondicionált csoportban szignifikánsan több SOD enzim aktivációt mértünk, mint az IR csoportban (34. ábra).



35. ábra: A redukált glutathion (GSH) májszövetben mért koncentrációja a reperfúzió után. (*= $p < 0,05$ vs I/a.; **= $p < 0,05$ vs 5. hét)

A redukált glutathion koncentrációját a reperfúzió után a 35. ábra mutatja. Az **5. héten** a reperfúzió végén a poszt kondicionált csoportban szignifikánsan kevesebb a GSH koncentrációja. A koleszterin, epesav és napraforgóolajban dús tápon tartott csoportban, tehát T2DM-ben szignifikánsan kisebb a GSH koncentrációja, mint a normál táppal etetett csoportban. A **12. hét** elteltével szignifikánsan kisebb a normál tápon tartott csoport GSH koncentrációja.

4.5. Megbeszélés

Ivarérett, hím, 3 hónapos Wistar patkányokat 2% koleszterin, 0,5% epesav és 20% napraforgóolaj tartalmú táppal 5 és 12 hétig speciális diétán tartottunk. A diéta bevezetését követő 5. és 12. héten orális cukorterhelést végeztünk 1g/kg glükóz per os adásával. A normál tápon tartott csoportnál patkányokban az 5. heti fiziológiás cukorterhelési görbét a 12. héten károsodott glükóz tolerancia és inzulinrezisztencia váltotta fel, mely csaknem összemérhető volt zsírdús tápon tartott csoportéval. Ezt azzal magyarázzuk, hogy Escriva és munkatársai kimutatták, hogy a korábban metabolikusan egészséges Wistar patkányokban az öregedés során perifériás inzulinrezisztencia jön létre¹²².

A 12. hét után a TNF- α koncentrációja szignifikánsan magasabb T2DM-ben, ez megegyezik a korábbi irodalmi mérésekkel¹²³. Mindkét csoportban az exogén glükóz hatására átmenetileg, az inzulinnal párhuzamosan megemelkedett a szérum-TNF- α -szint is, melynek maximális koncentrációját a 30. percben mértük, a 120. percre pedig visszatért a kiindulási értékére. A metabolikus állapot jellemzésére HOMA inzulinrezisztencia indexet számoltunk, ahol eredményeink alapján az inzulinrezisztencia valószínűsíthető, de T2DM nem mondható ki. A zsírdús táppal etetett csoport esetében 2-es típusú diabétesz mellitusz (T2DM) volt megfigyelhető. Ezen kísérleti állataink inzulintermelése nem volt indukálható az OGTT során sem az 5., sem a 12. héten.

Az így létrehozott állatmodell alkalmas volt arra, hogy az endogén védelem létrejöttét T2DM-ben vizsgáljuk. Kísérletünk 5. és 12. hetében műtéteket végeztünk. Mind a zsírdús (T2DM), mind a normál táppal etetett (Egészséges) kísérleti csoportunkat két további alcsoportra osztottuk. Az egyik alcsoporton 90 perces iszkémiát indukáltunk mindkét oldali vese ereinek leszorításával, majd négy órán keresztül reperfúziót végeztünk. A másik alcsoporton 2 perces iszkémiás posztkondicionálást hajtottunk végre a 240 perces reperfúzió megkezdése előtt. A műtétek előtt és után kísérleti állatainktól vért vettünk, melyből glükóz, inzulin, szabad gyök, karbamid, kreatinin és TNF- α koncentrációkat határoztunk meg. A négyórás reperfúziót követően szövetmintát (máj) vettünk.

A műtétet követően a szérum-TNF- α -szint a normál, posztkondicionált csoportban nem csökkent. A TNF- α volt az első olyan zsírszöveti citokin, amelynek felismerték szerepét az elhízás és az inzulinrezisztencia kapcsolatában¹²⁴. Az irodalom a TNF- α inzulinrezisztenciában játszott szerepével számos cikk foglalkozik, melyekben különböző eredmények születtek. Day és munkatársai a -238 A allélt hordozók körében alacsonyabb inzulinrezisztencia paramétereket talált, míg a -308 A allél hordozása nem mutatott összefüggést az inzulinérzékenységgel¹²⁵. Más vizsgálatokban a -308 A allél hordozása az elhízás és az inzulinrezisztencia magasabb rizikójával járt¹²⁶. A TNF szerepét vizsgálták TNF- illetve TNFR-gén hiányos egerekben. A TNF hiánya a táplálkozás eredetű elhízásban és az ob/ob genotípusú egerekben egyaránt az inzulinszenzitivitás határozott javulását eredményezi. Ez jelzi, hogy elhízás kapcsán a TNF az inzulinrezisztencia egy fontos mediátora, mivel az inzulin mediálta folyamatokat különböző pontokon befolyásolja¹²⁷.

A TNF- α három ponton avatkozik be az inzulin jelátvitelébe. A TNF- α elősegíti az IRS-1 szerin foszforilációját, amely akadályozza az inzulin által stimulált tirozin

foszforilációt, így károsodik a PI3K-út¹²⁸. Aktiválja az SH-PTPáz, mely eltávolítja a tirozin foszfát csoportokat az IRS-1 fehérjéről, ezzel terminálva az inzulinhatást. Végül pedig foszforilációja révén inaktiválja a protein foszfát-1-et¹²⁹, ezáltal csökkentve a glükóz raktározását. Fontos szerepe van a 2-es típusú diabétesz mellitusz pathogenezisében. A jelenség hátterében az áll, hogy a TNF- α interferál az inzulin egyik jelátviteli mechanizmusával, olyan módon, hogy gátolja az inzulinreceptor tirozin-kináz aktivitását és az inzulin receptor szubsztrát-1 foszforilációját. Így az inzulin nem tudja indukálni a tirozin kötőhelyen történő foszforilációt, ami feltétlenül szükséges lenne az inzulin jelátviteléhez¹³⁰. Az előbbiekből következően az inzulin szenzitív szövetekben a glükóz transzporter nem jut fel a sejtek felszínére és perifériás inzulinrezisztencia jön létre.

Fontosnak tartjuk azt a megfigyelésünket, hogy a glükóz terhelés során nem csak inzulin felszabadulás figyelhető meg, hanem ezzel párhuzamosan a szérum-TNF- α -szint is megnő. Az állandóan magas vércukorszint együtt járhat a gyulladásos citokinek fokozott termelésével, és ez szerepet játszhat az inzulinrezisztencia kialakulásában patkánymodellben is.

Vizsgáltuk, hogy a májban, a reperfüzió közvetlenül nem érintett szövetében milyen jelentősége van az iszkémiás poszt kondicionálásnak iszkémiás-reperfüziós károsodásban. Az oxidatív folyamatok védő oldalaként ismert endogén antioxidáns scavenger anyagok közül a glutation (GSH) koncentrációját és a szuperoxid dizmutáz (SOD) aktivitását mértük májszövetben. Ismert, hogy protektív hatással rendelkezik a reperfüziós károsodásokban a glutamin, katabolitikus állapotokban esszenciális aminosavként viselkedik. A glutamin védő hatása a csökkent szabadgyök-produkció keresztül valósul meg¹³¹; ismerte a tényt, hogy a glutamin a májban, az antioxidáns glutation (GSH) bioszintézisében vesz részt, illetve prekursor molekulája. Ugyanakkor a glutamin, a fentiek mellett az apoptózisban is fontos szerepet tölt be. Feltételezések szerint a glutamin a Fas ligandmediált apoptózist gátolja, a TNF- α mediált apoptózist serkenti¹³².

Kísérletünkben a SOD és GSH koncentrációja szignifikánsan csökkent T2DM-ben, jelezve a fokozott gyöktermelésből származó felhasználódásukat.

Elterjedt az a nézet, hogy számos kardiovaszkuláris rizikótenyező, mint például az oxidatív stresszt okozó cukorbetegség, az elhízás az endotél diszfunkcióját okozza. Patológias metabolikus állapotokban a szabadgyök-képződés is jelentősen megnő¹³³. Számos tény igazolta, hogy az emelkedett szabadgyök-koncentráció önmagában is felelőssé tehető az endotél diszfunkcióért, mivel a szuperoxid szabad gyökök az

endotélhez közvetlenül kapcsolódva, direkt módon képesek azt károsítani. Az ereket az egy sejtsor vastagságú vaszkuláris endotél béleli, amely érzékenyen reagál a hemodinamikai változásokra. Feladata a vaszkuláris tónus és struktúra fenntartása, a vaszkuláris sejtek növekedésének, a thrombotikus és a fibrinolitikus folyamatoknak, a gyulladásos és immunfolyamatoknak, a fehérvérsejtek adhéziójának, a vaszkuláris permeabilitásnak, az oxidációs-redukciós folyamatoknak a szabályozása, a lipidoxidáció befolyásolása.

Mind a lipidperoxidáció indirekt markereként ismert malondialdehid koncentrációja májszövetben, mind a fehérvérsejtek indukált szabadgyök-termelése szérumban szignifikánsan emelkedett volt T2DM-es csoportban az egészséges kontroll csoporthoz viszonyítva. A poszt kondicionálás jótékony hatását 90 perc iszkémiát követően csak a máj MDA koncentrációjában tudtuk igazolni. Kísérletünkben láthatjuk, hogy célzott vese iszkémia-reperfúzió során megváltozik a máj antioxidáns rendszer aktivitása, melyre pozitív hatással van a poszt kondicionálás.

5. AZ ISZKÉMIÁS ÉS FARMAKOLÓGIAI POSZTKONDITIONÁLÁS HATÁSA A VESE ISZKÉMIA-REPERFÚZIÓS KÁROSODÁSÁIRA STREPTOZOTOCIN-INDUKÁLT DIABÉTESZ MELLITUSZBAN

5.1. Bevezetés

Farmakológia posztkondicionálás

Vinten-Johansen és munkatársai 2005-ben¹³⁴ kijelentették, hogy nagy előrelépést jelentene, ha sikerülne találni egy védő farmakológiai állapotot, mely imitálja a posztkondicionálást.

Számos farmakoterápiás próbálkozásról olvashatunk az irodalomban, ahol különböző anyagokkal kísérelték meg befolyásolni a reperfúzió eseményeit. A legtöbb ilyen kísérlet miokardium iszkémia-reperfúziós károsodása kapcsán történt. Ilyenek voltak az adozin és analógjai¹³⁵, a nitrogén-monoxid¹³⁶, az inzulin¹³⁷, opioidok¹³⁸, CO₂¹³⁹ és sok más anyag. Eddig egy szert sem vezettek még be a rutin klinikai gyakorlatba.

Még nem bizonyított, hogy a farmakológiaszerek intermittáló adagolása imitálni tudja-e a posztkondicionálás időbeli karakterisztikáját, és így hatékonyabb-e alkalmazásuk. Továbbá fontos kritérium a posztkondicionálásban, hogy rögtön a reperfúzió kezdetén kell, hogy megkezdődjön.

Az inzulin, elválasztásának szabályozása és hatása

A Banting és Best által felfedezett és tiszta formában először izolált inzulin két, viszonylag rövid polipeptidláncból áll (A-lánc 21 és a B-lánc 30 aminosav), amelyeket diszulfidhidak kötnek össze. Az **inzulin szekréción** elsősorban a vér glükóz szintjének emelkedése váltja ki. A glükóz a GLUT-2 facilitatív glükóztranszporterrel az endokrin pankreasz β -sejtjeibe lép, majd metabolizálódik a glükokináz enzim, illetve glikolízis révén. Ennek következtében a sejt ATP-koncentrációja, amely a sejtmembrán ATP-érzékeny K⁺ csatornáit zárva a sejt depolarizációjához, a feszültségfüggő Ca²⁺ csatornák megnyíltához és ennek következtében inzulin szekréciónhoz vezet. A hiperglikémiával kiváltott inzulinelválasztást tovább növelik a bélnyálkahártyából felszabaduló inkretin hormonok: a glükózdependens inzulinotrop peptid (GIP) és a glukagonszerű peptid-1 (GLP-1)¹⁴⁰. Egyes aminosavak (lizin, arginin és leucin) közvetlenül fokozzák a β -sejtek inzulin-szekréciónját. Az inzulinelválasztást időben

előbbre hozó mechanizmus, a β -sejtek kolinerg beidegzésén keresztül létrejövő nervus vagus által közvetített paraszimpatikus hatás¹⁴¹.

A megemelkedett vércukorszint hatására aktiválódik a **poliol anyagcsereút**. Két enzime, az aldóz-reduktáz és a szorbitol-dehidrogenáz, melyek túlműködése eredményezi az intracelluláris szorbitol- és fruktózkoncentráció növekedését. Ezek ozmotikus hatásuk révén szöveti károsodást idézhetnek elő, növelik a szabadgyök-produkciót és csökkentik az antioxidáns enzimek hatásfokát¹⁴². Ugyanakkor az aldóz-reduktáz enzim kofaktorként ugyanazt a nikotinamid adenin dinukleotid fosztátot (NADPH-t) használja, melyet a redukált glutation (GSH) regenerációját végző glutation-reduktáz, és az endotél függő simaizom relaxációért felelős NO-szintáz is. Az aldóz-reduktáz túlműködése a NADPH jelentős csökkenéséhez vezet, ez a jelenség fokozott szabadgyök-termeléssel jár¹⁴³. A magas vércukor- és szabadzsírsav-szint számos módon fokozza a szabadgyök-produkciót.

Az inzulin a szervezet legfontosabb anabolikus hatású hormonja, a táplálékkal felvett anyagok (glükóz, aminosavak, zsírok) sejtbe való beépülését és raktározását serkenti, ill. teszi lehetővé. Főként a vázizomzatra, a zsírsejtekre és a májsejtekre hat, azonban hatása a szervezet legtöbb sejtjén érvényesül¹⁴⁴. A sejtek fiziológiás funkciójához minimális szintű inzulin jelenléte nélkülözhetetlen.

Az inzulin valamennyi hatását a sejtmembrán inzulin receptorához való kötődését követően fejti ki. A receptor $\alpha_2\beta_2$ heterotetramer, két α és két β egységét diszulfidkötések kapcsolják össze. Az inzulin megkötését követően a receptor addig inaktív tirozin proteinkináza aktiválódik, mely révén mindkét heterodimer kölcsönösen foszforilálja a másik intracelluláris szakaszát (transz-autofoszforiláció)¹⁴⁵. Az aktivált receptorhoz nagyméretű dokkoló fehérjék, ún. inzulin receptor szubsztrát proteinek (IRS) kapcsolódnak, melyek adapter funkciót látnak el: több jelátviteli út indul róluk. A Ras/ERK-úton keresztül mitogén jelátvitel érvényesül. Az inzulin metabolikus hatásainak fő közvetítője a **PI3K-út**¹⁴⁶: serkenti a glikogén- és fehérjeszintézist, illetve a sejtek glükózfelvételét¹⁴⁷. ATP felhasználásával inozitol-fosfolipid molekulákat foszforilál (PIP₃), melyek másodlagos messengerként működnek. Foszfinozitolid dependens kinázhoz (PDK) kötődnek, melynek szubsztrátjai a szerin-treonin kináz PKB (más néven Akt), ill. a PKC atípusos formái.

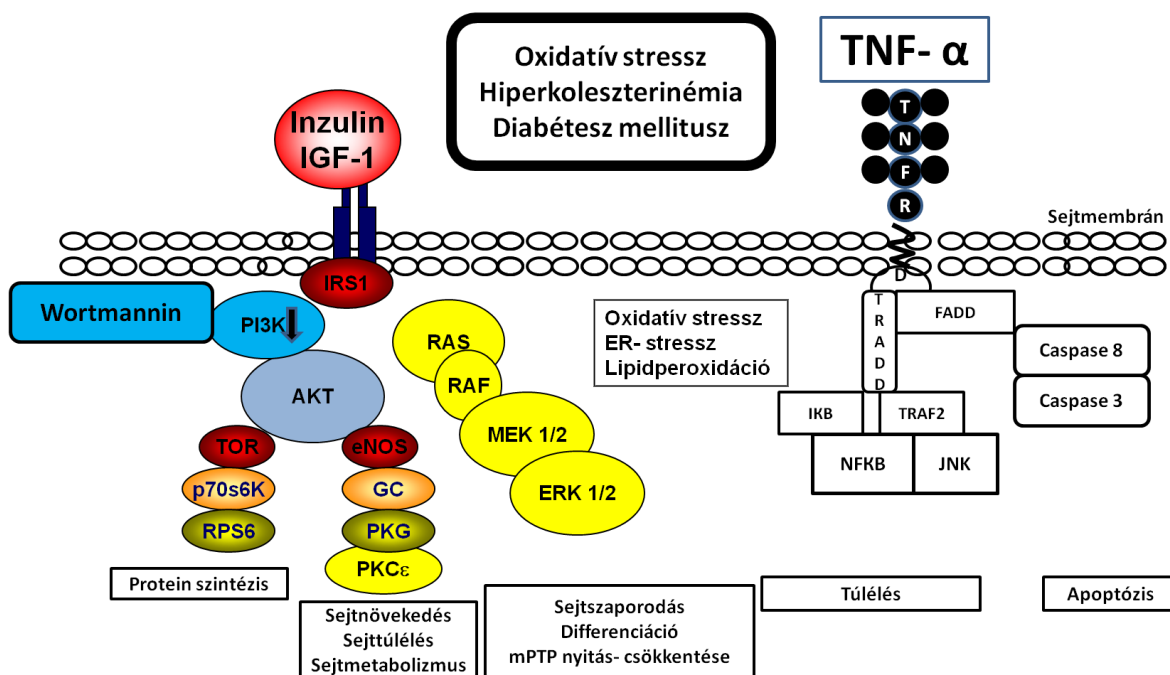
Az Akt jelátviteli út és a PI3-kináz

Valószínűsíthető, hogy a posztkondicionálás kardioprotektív hatása a foszfatidilinozitol 3-kináz (PI3 kináz) - Akt ún. "pro-survival" jelátviteli utak által

mediált¹⁴⁸. A PI3kináz gátlószere, a Wortmannin csökkenti a myocardialis p-Akt szinteket (amely markere az enzim működésének), illetve megsemmisíti a poszt kondicionálás infarktus-csökkentő potenciálját. Az Akt szerin/treonin specifikus protein kináz a legtöbb sejtben jelen van. Növekedési faktorok és inzulin, valamint környezeti hatások, így oxigéntenzió-változás és magas hőmérséklet hatására aktiválódik. Az Akt markáns hatást fejt ki a sejtanyagcsere intenzitására, az inzulin hatásaként létrejövő cukorfelvétel és raktározás egyik legfontosabb közvetítője¹⁴⁹. Az Akt családnak emberben három izoformája van: Akt1 (PKB α), Akt2 (PKB β) és Akt3 (PKB γ) molekulák. Ezek szövetspecifikus módon expresszálódnak¹⁵⁰. Akt2-hiányos egerekben csökkent glükóztolerancia, hiperglikémia, hiperinzulinémia és in vitro glükóztárolási zavar figyelhető meg. Az inzulinrezisztencia kialakulásában pontos szerepe még nem ismert, de inzulinrezisztenciában és cukorbetegségben leírták a perifériás szövetek csökkent Akt-aktivitását. Az Akt a zsírsejten belüli metabolizmust is befolyásolja, a GSK3 gátlása révén ugyanis fokozza a lipidszintézist.

Mind az 1-es, mind a 2-es típusú cukorbetegségben felvetődik az Akt szerepe¹⁵¹. Az Akt több ponton fejt ki **apoptózisellenes** hatását. Fokozza a sejtek túlélését, mivel gátolja a proapoptotikus molekulákat és folyamatokat¹⁵², illetve az antiapoptotikus fehérjégtől fehérjék működését (Bad, Bcl2). Ezenkívül csökkenti az apoptózis mitokondriális útvonalában szereplő kaszpázok enzimátikus hatását. Az Akt egyik legfontosabb funkciója a **sejtnövekedés** fenntartása. Ezt elsősorban az mTOR komplex közvetlen aktiválása, másrészt expressziója fokozása révén hozza létre. Az mTOR komplex központi szerepet játszik a fehérjeátírás megindításában és a riboszomaképződésben. Az mTOR komplex mellett egyéb, a sejtnövekedést meghatározó molekulákra is hat az Akt¹⁵³. A **sejt túlélését és szaporodását** az Akt a génátírást szabályozó kulcsfontosságú transzkripciós faktorok (p21, p27) foszforilációja révén szabályozza. Emellett a glikogén szintáz kináz-3-ra (GSK3) hatva regulálja a sejt ciklust (a GSK3 a ciklin-D aktiválásában vesz részt). A sejt ciklus szabályozásában részt vevő molekulákat indirekt módon, az mTOR komplex aktiválása révén is befolyásolja. Az Akt a sejt ciklus egyéb fázisában is szerepet játszhat, így a G2/M fázisban is. Az Akt-aktiváció a mitózis befejezését biztosítja DNS-károsodás esetén is, a DNS károsodást ellenőrző kinázok foszforilálása révén. Az Akt az **angiogenezisben** is szerepet játszik. Endotheliális sejtekben az Akt mediálta PI3K-útvonal a vaszkuláris endotheliális növekedési faktor hatásait közvetíti, ez az angiogenetikus vegyület az endothelsejtek túlélésében, növekedésében, proliferációjában játszik fontos szerepet. Az endotheliális nitrogénmonoxid-szintáz (eNOS) foszforilálása révén az Akt hatásaként fokozott az

NO-termelődés, és ez vazodilatációhoz, vaszkuláris remodellinghez és érképződéshez vezet (36. ábra).



36. ábra: Az inzulin és a TNF- α egy komplex jelátviteli úton keresztül fejt ki antiapoptotikus, oxidatív stresszt csökkentő és apoptózis indukáló hatását.

A TNF- α

A TNF- α hatásait közvetítő TNF-receptorok a szervezet szinte valamennyi sejtjén megtalálhatóak (vörösvértesteken és limfocitákon nem). A TNFR 1 a szervezet legtöbb sejtjén jelen lehet, citoplazmatikus része tartalmaz egy ún. halál domént, amely a sejthalál mediálásban, illetve az NF κ B és egyéb kinázok aktiválásában vesz részt. A TNFR 2 nem rendelkezik specifikus intracelluláris doménnel, a TRAF-2-t megkötve a JNK-t és az NF κ B-t aktiválja, mely utóbbi más fehérjék transzkripcióját befolyásolja¹⁵⁴. Az NF κ B a gyulladásos válaszreakciók alapvető fontosságú mediátora, számos ilyen reakcióban részt vevő receptor aktivációjának végső közös faktora. Inzulínérzékeny szövetekben történő aktiválódása szerepet játszhat az inzulinrezisztencia kialakulásában is. A receptor aktiváció egyes gének expresszióját fokozhatja, de vezethet sejthalálhoz, apoptózishoz is, az antiapoptotikus fehérjék szintjének csökkentése révén, de kaspázok aktiválás útján is.

5.2. Célkitűzések

Harmadik kísérletsorozatunkban 1-es típusú diabéteszes állatmodellen kívánjuk vizsgálni az iszkémiás és farmakológiai poszt kondicionálást. Az inzulinról kimutatták kardioprotektív hatását akut koronária iszkémia során¹⁵⁵. Nem történtek még széleskörű vizsgálatok az inzulin vese iszkémia-reperfúziós károsodása tekintetében. Az inzulin hatására aktiválódik az Akt enzim, mely a sejtek metabolizmusában, cukorfelvételében, raktározásában¹⁵⁶ és a sejt túlélésében játszik szerepet. A poszt kondicionálás által aktivált útvonalak a molekuláris magyarázat szerint; a PI3K, az Akt, a MEK, az ERK túlélést segítő jelátviteli utak aktiválása (RISK)¹⁵⁷, és az antiapoptotikus enzimek termelődése vezet az iszkémiás károsodás kivédéséhez. A PI3kináz gátlószere, a Wortmannin korábbi kísérletekben megsemmisíti a poszt kondicionálás infarktus-csökkentő potenciálját. Ezen útvonal gátlásával célunk az iszkémiás poszt kondicionálás közelebbi, mélyebb megismerése vese iszkémia-reperfúzió esetén.

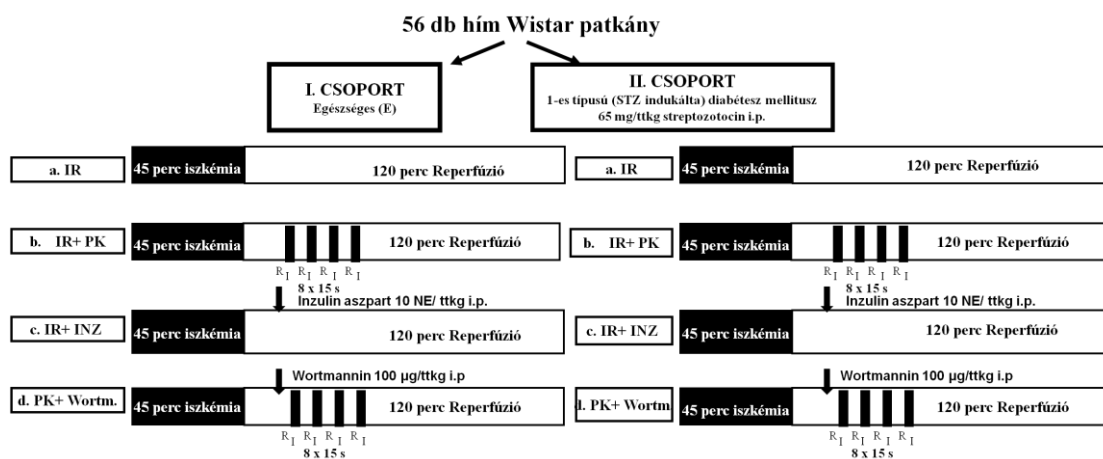
Ebben a kísérletsorozatban célunk az iszkémiás poszt kondicionálás hatását vizsgálni 45 perc vese iszkémiát és 120 perc reperfúziót követően. Az iszkémiás poszt kondicionált csoportban a reperfúzió kezdeti fázisában 4 ciklus 15 másodperces reperfúziót és 15 másodperces reokklúziót alkalmaztunk. Az iszkémia-reperfúziós károsodás vizsgálata szérumban és perifériás szövetekben, a TNF- α citokin szint meghatározásával történt. Az iszkémiás-reperfúziós károsodás mértékét veseszövetben HE és TNF- α immunhisztokémiai fénymikroszkópos módszerrel vizsgáltuk.

5.3. Anyag és módszerek

5.3.1. A kísérleti csoportok és műtéttechnikai módszerek

Vizsgálatainkat 56 darab hím Wistar patkányon (testtömeg: 300 \pm 50 g) végeztük. Az állatkísérletekhez általában kétféle diabétesz modellt használnak az 1-es típusú diabétesz mellitusz modellezésére. Az egyik a non-obes diabéteszes (NOD) egér, ami egy egyedi állat-modell a veleszületett 1-es típusú diabéteszre^{158,159}. Egy másik állat-modell a streptozotocin (STZ) indukálta diabéteszes állatmodell¹⁶⁰. Kísérletünkben az 1-es típusú diabétesz indukálására a streptozotocint (STZ: 65 mg/kg ip, Sigma Chemical Co., Budapest) 0,1M citrát pufferben (pH 4,5) oldottuk fel, intraperitoneál injektáltuk. A kontroll csoportnak bőr alá fiziológiás só (65 mg/kg) injektáltunk. A vércukrot

farokvégből nyert vérből, Accu Chek Active (Roche, Magyarország) vércukorszintmérő készülékkel rendszeresen mértük. 5-7 nap elteltével azokat az állatokat választottuk be a kísérleti diabéteszes csoportba, amelyeknél a vércukor koncentráció értéke megegyezett vagy meghaladta a 17 mmol/l értéket.



37. ábra: A kísérlet ábrázolása a kísérleti csoportok feltüntetésével (n=7).

I/a. Egészséges, 45 perc iszkémia, 120 perc reperfúzió.

I/b. Egészséges, 45 perc iszkémia után (15 s felengedés/15 s reokklúzió után) 4 ciklusban poszt-kondicionálást alkalmaztunk a 120 perces reperfúzió előtt.

I/c. Egészséges, 45 perc iszkémia, Inzulin aszpart 10 NE/ttkg i.p., 120 perc reperfúzió.

I/d. Egészséges, 45 perc iszkémia, Wortmannin 100 µg/ttkg i.p., (15 s felengedés/15 s reokklúzió után) 4 ciklusban poszt-kondicionálás, 120 perc reperfúzió.

II/a. STZ-diabétesz, 45 perc iszkémia, 120 perc reperfúzió.

II/b. STZ-diabétesz, 45 perc iszkémia után (15 s felengedés/15 s reokklúzió után) 4 ciklusban poszt-kondicionálás, 120 perc reperfúzió.

II/c. STZ-diabétesz, 45 perc iszkémia, Inzulin aszpart 10 NE/ttkg i.p., 120 perc reperfúzió.

II/d. STZ-diabétesz, 45 perc iszkémia után Wortmannin 100 µg/ttkg i.p., (15 s felengedés/15 s reokklúzió után) 4 ciklusban poszt-kondicionálás, 120 perc reperfúzió.

Az altatást intraperitoneálisan adagolt Calypsol (500 mg ketaminium chloratum ampullánként) és Seduxen (10 mg diazepam ampullánként) 1:1 arányú keverékével végeztük (0,2 ml/ 100 tsg). Az állatot hátára fektetve, lábait leragasztva rögzítettük a műtőpadon. Laparotómiát követően mobilizáltuk a mezenterialis gyököt, meggyőződünk a vesék kb. azonos nagyságáról, illetve azonosítottuk az ellátó ereket, majd mindkét vesét atraumatikus mikroklippel 45 percre a keringésből kirekesztettük. A patkányokat az alábbi csoportokba (n=7) osztottuk (37. ábra).

Mintavételre a reperfúzió végén került sor. A kétórás reperfúziót követően az állatokat exsanguináltuk, vért és szérumot használtunk a következőkben részletezésre kerülő paraméterek mérésére. Szövetteni vizsgálatra a bal vesét formalinba helyeztük.

5.3.2. Laboratóriumi vizsgálatok

Glükóz meghatározás

A már ismertetett módszer szerint végeztük a vizsgálatot (21. oldal).

Kreatinin koncentráció meghatározása

Szérumban a kreatinin koncentrációját vizsgáltuk a már ismertetett standard fotometriás módszerrel (22. oldal).

A Tumor Nekrózis Faktor-alfa (TNF- α) expresszió meghatározása

A szérum-TNF- α -koncentrációt ELISA kit-tel mértük (R&D Systems, Inc. Minneapolis, USA), követve a gyártó cég utasításait (23. oldal).

5.3.3. Morfológiai vizsgálatok

A bal oldali vesét a reperfúziót követően 10%-os neutrális formalinban fixáltuk, majd felszálló alkoholsorban víztelenítettük és paraffinba ágyasztuk. A vese keresztmetszete mentén készült 5 μ m vékony metszetek egy részét haematoxilín-eosinnal (HE) festettük meg. Vizsgáltuk csoportonként a vese minden rétegét, és a hyalincylinder mennyiségét. A tubulusok értékelésére a Jablonski score-t¹⁶¹ (24. oldal), és a Banff szerinti beosztást¹⁶² használtuk.

TNF- α immunhisztológiai fénymikroszkópos vizsgálata

Immunhisztokémiai vizsgálataink TNF- α monoklonális egér ellenanyaggal történtek, mely keresztreakciót ad más rágcslók, így a patkány TNF- α -val is. A monoklonális ellenanyag a TNF- α -t termelő sejtek citoplazmáját festi. A folyamat laboratóriumi és kiértékelési tematikája a 25. oldalon található.

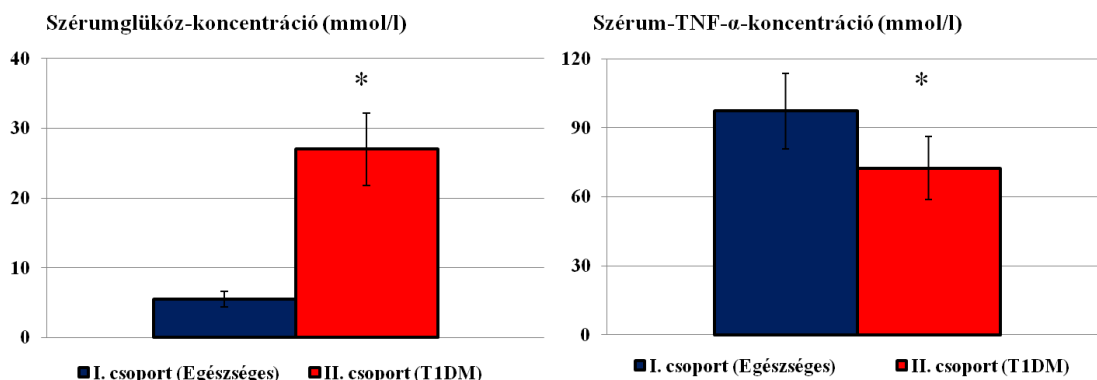
5.3.4. Statisztikai analízis

Az analízishez és az ábrázoláshoz a Microsoft Office Excel 2007 és az SPSS 17.0 programokat használtuk. Az adatok ábrázolásakor a középértéket (átlag) és annak hibáját (\pm SEM-standard error of mean) tüntettük fel. Az állatmodell létrehozásakor, az egyes csoportokat Student féle t-próbával hasonlítottuk össze. A kísérleti eredményeket egyirányú varianciaanalízissel (ANOVA) a csoportokon belül Wilcoxon, a csoportok között Mann-Whitney tesztet alkalmaztuk. A különbséget akkor tekintettük szignifikánsnak, ha p érték kisebb volt, mint 0,05. Az ábrákon *, # karakterrel jelöltük a szignifikánsan eltérő értékeket.

5.4. Eredmények

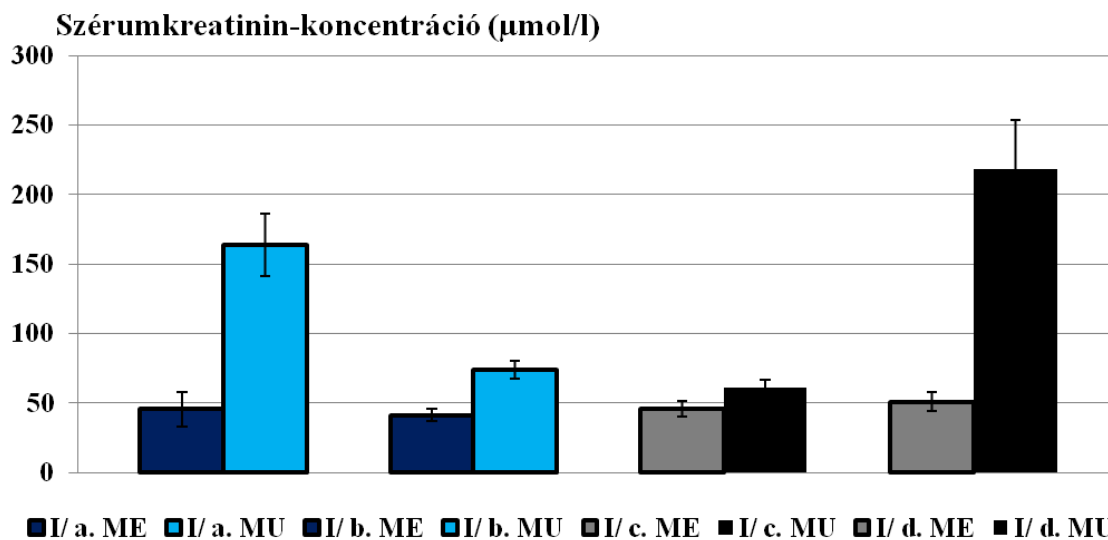
5.4.1. Laboratóriumi vizsgálatok eredményei

A streptozotocinnal indukált diabétesz mellituszban az éhgyomri vércukor szignifikánsan nagyobb, mint a normál tápon tartott csoportban. Az STZ diabéteszben szignifikánsan kisebb a szérumban a TNF- α -szintje a kontroll csoporthoz képest (38. ábra).

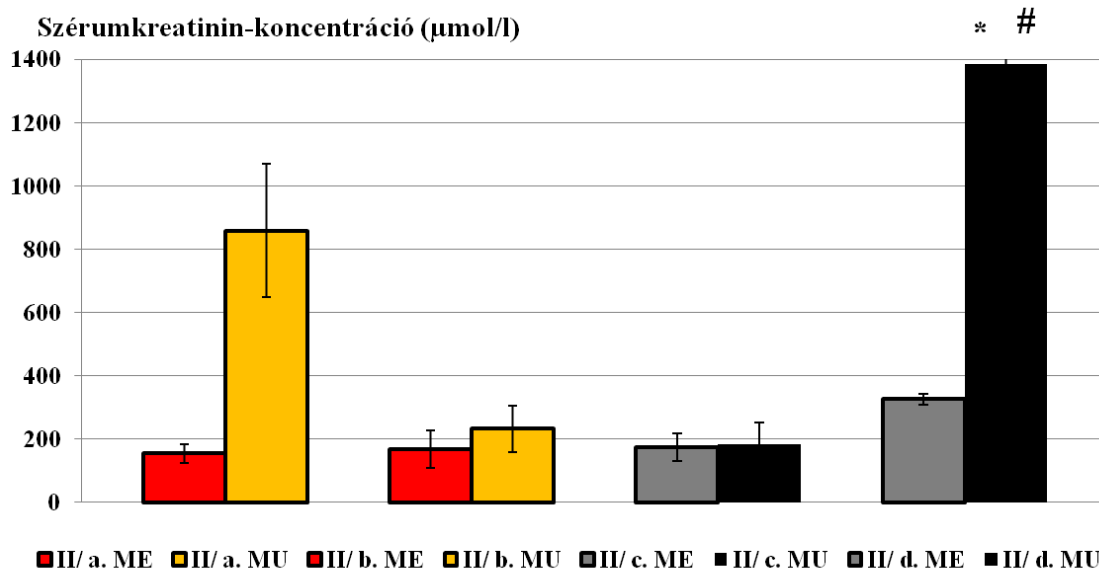


38. ábra: Szérumglükóz- és szérumban a TNF- α -koncentrációja iszkémia előtt. (*= p < 0,05 vs I. csoport)

A szérumban a kreatinin-szintben a csoportok között a műtétet megelőzően nincs különbség (39. ábra). Mind a négy csoportban a műtéti beavatkozást követően emelkedett a kreatinin koncentrációja méréseink szerint. Kisebb a szérumban a kreatinin-koncentrációja a kontroll posztoperatív (I/b.) és az inzulinnal posztoperatív (I/c.) csoportban az IR csoporthoz képest (p=0,0564). A Wortmanninnal gátolt, iszkémiás posztoperatív csoportban magasabb a kreatinin koncentrációja az I/b. és I/c. csoporthoz képest.



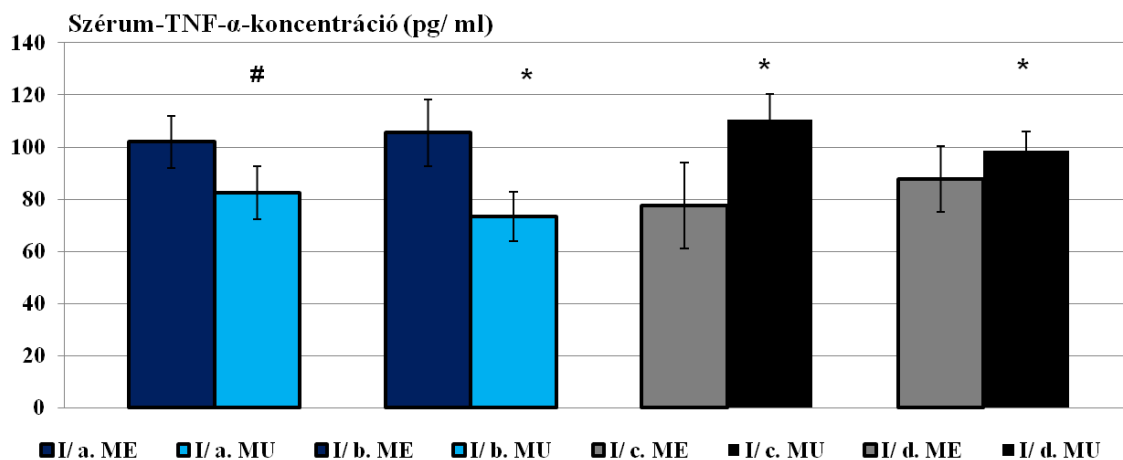
39. ábra: Szérumkreatinin-koncentráció iszkémia előtt és reperfúziót követően az egészséges kontroll csoportban. I/a. IR I/b. Poszt Kond. I/c. IR+ Inzulin aszpart 10 NE/ttkg I/d. Iszkémia, Wortmannin 100 µg/ttkg i.p., Poszt Kond. ME: Műtét előtt, MU: Műtét után (Reperfúzió végén)



40. ábra: Szérumkreatinin-koncentrációja iszkémia előtt és reperfúziót követően a streptozotocin indukálta diabétesz mellituszban. II/a. IR II/b. Poszt Kond. II/c. IR+ Inzulin aszpart 10 NE/ttkg II/d. Iszkémia, Wortmannin 100 µg/ttkg i.p., Poszt Kond. (*=p< 0,05 vs II/d. ME, #= p< 0,05 vs II/c. MU) ME: Műtét előtt, MU: Műtét után (Reperfúzió végén)

STZ diabétesz mellituszban magasabb a szérumkreatinin-koncentrációja műtétet megelőzően az egészséges csoporthoz képest. Szignifikánsan magasabb a kreatinin

koncentráció STZ indukálta diabétesz mellituszban az iszkémiás posztkondicionált, Wortmanninnal kezelt csoportban (40. ábra).

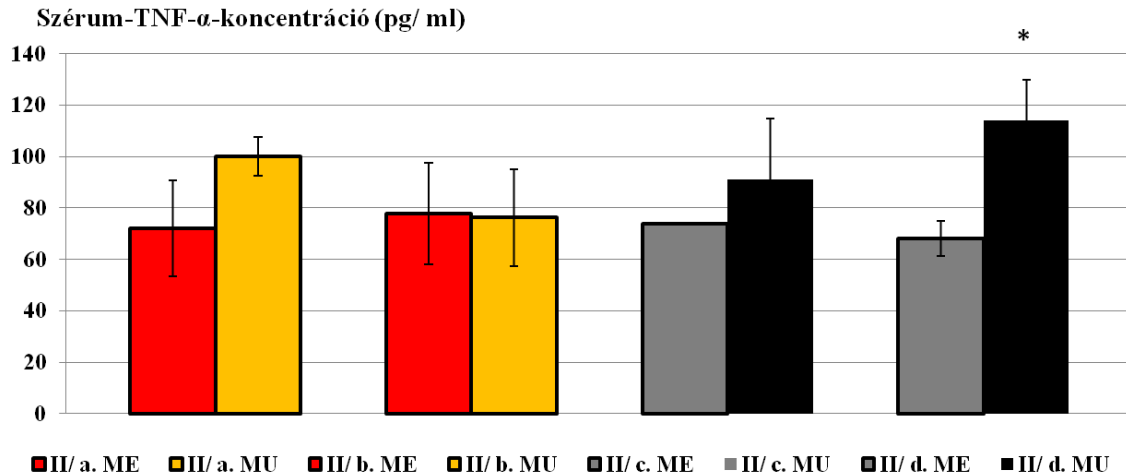


41. ábra: Szérum-TNF- α -koncentráció az egészséges kontroll csoportban.

I/a. IR **I/b.** Posztkond. **I/c.** IR+ Inzulin aszpart 10 NE/ttkg **I/d.** Iszkémia, Wortmannin 100 μ g/ttkg i.p., Posztkond. (*= $p < 0,05$ vs IR; # = $p < 0,05$ vs ME). **ME:** Műtét előtt, **MU:** Műtét után (Reperfúzió végén)

Az iszkémiás posztkondicionálás csökkentette a TNF- α koncentrációt az egészséges kontroll IR csoporthoz képest. A 45 perces iszkémiát követően inzulinnal kezelt csoportban és a Wortmanninnal gátolt iszkémiás posztkondicionált csoportban szignifikánsan emelkedett a koncentráció a reperfúzió végén (41. ábra).

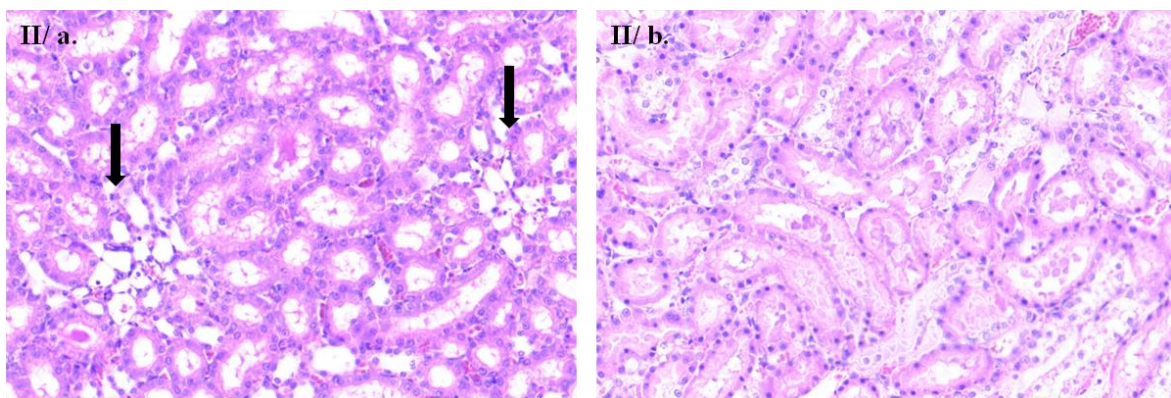
STZ indukálta diabétesz mellituszban az iszkémiás posztkondicionálás nem csökkentette szignifikánsan a TNF- α koncentrációt az IR csoporthoz képest. A Wortmanninnal gátolt iszkémiás posztkondicionált csoportban szignifikánsan emelkedett a koncentráció a reperfúzió végén (42. ábra).



42. ábra: Szérum-TNF- α -koncentráció az STZ indukálta diabétesz mellituszban. II/a. IR II/b. Posztkond. II/c. IR+ Inzulin aszpart 10 NE/ttkg II/d. Iszkémia, Wortmannin 100 μ g/ttkg i.p., Posztkond. (*= $p < 0,05$ vs ME). ME: Műtét előtt, MU: Műtét után (Reperfúzió végén)

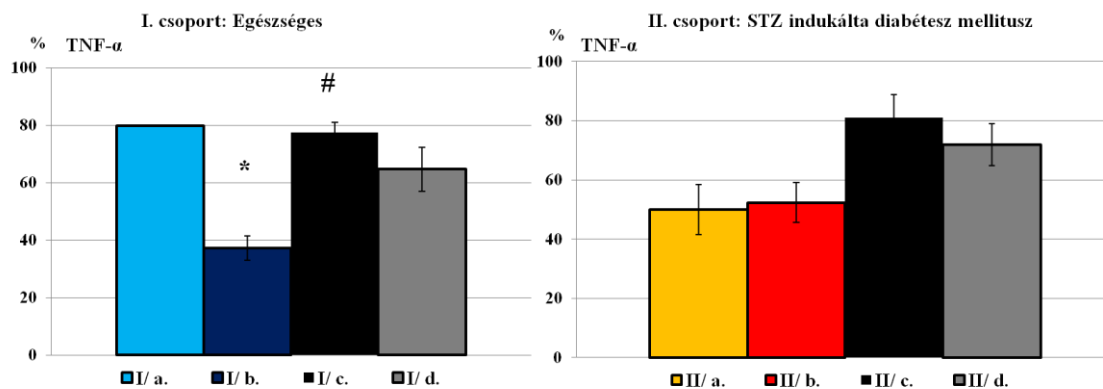
5.4.2. Morfológiai vizsgálatok eredményei

A HE metszeteken az egészséges, kontroll csoportban nem találtunk különbséget csoportjaink között. Jablonksi 0-2 és Banff Grad I. fázisokat láttunk. Szignifikáns különbséget láttunk a STZ diabéteszes IR csoportban származó metszetekben, ahol Grade II súlyosságú multifokális tubuláris atrófiát tapasztaltunk a corticomedulláris átmenetben (43. ábra).

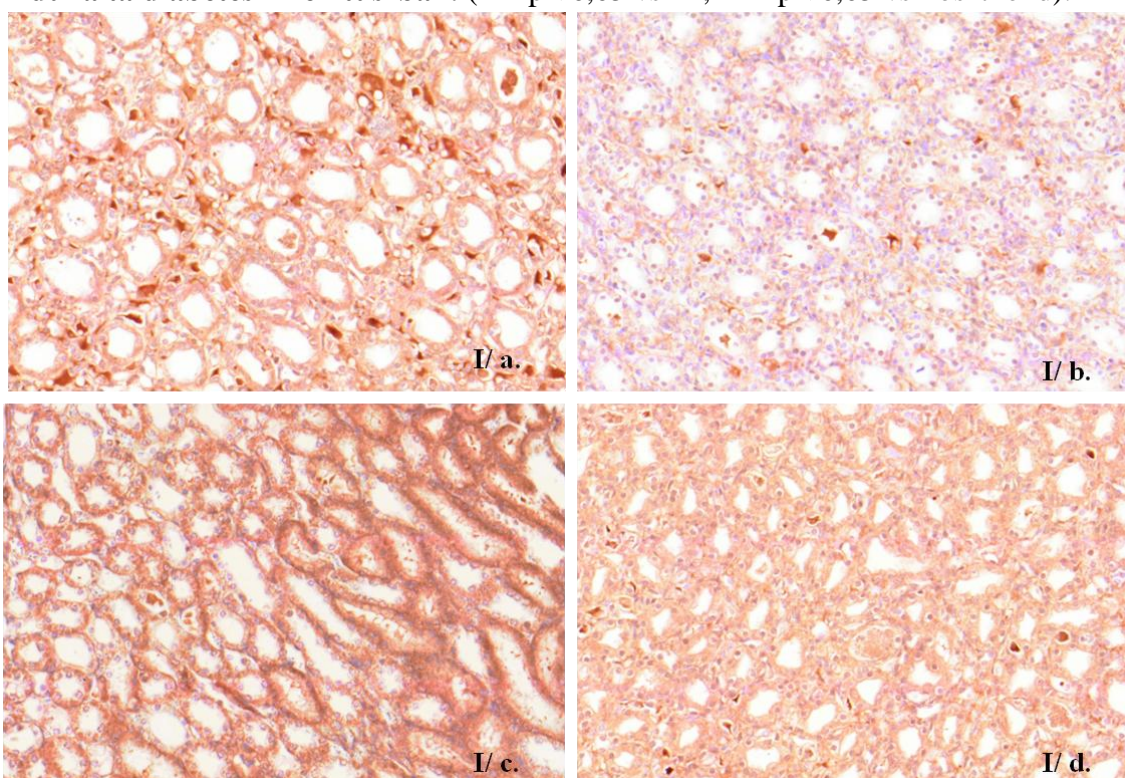


43. ábra: A vese corticomedulláris területe, HE. II/a.: T1DM, iszkémia-reperfúzió csoportban Grade II súlyosságú tubuláris atrófia (nyíl); II/b.: Posztkondicionált csoportban enyhe fokú tubuláris atrófia (Banff Grade I). 200x nagyítás.

A papilla hámjában látható TNF- α mennyiségét számszerűsítettük és statisztikailag értékeltük. A normál tápot kapó csoportjaink közül a posztkondicionált csoportban szignifikánsan kisebb értéket detektáltunk, mint az iszkémia-reperfúziós csoportban (I/a.). Az inzulinnal posztkondicionált csoportban szignifikánsan magasabb volt a TNF- α koncentrációja, mint az iszkémiás posztkondicionált csoportban (I/b.). STZ indukálta diabétesz mellituszban magasabb értékeket detektáltunk minden csoportban, mint a kontroll csoportban. A csoportokon belül szignifikáns különbséget nem tapasztaltunk (44-45. ábra).



44. ábra: A TNF- α mennyisége a papilla területén az egészséges és a streptozotocin indukálta diabétesz mellituszban. (* = $p < 0,05$ vs IR; # = $p < 0,05$ vs Posztkond).



45. ábra: A TNF- α kimutatása a vese papilla területében. Barna szín jelzi a pozitívítást, 200x nagyítás. I/a: Iszkémia-Reperfúzió. I/b: Posztkondicionált. I/c: IR+ Inzulin aszpart 10 NE/ttkg. I/d: Iszkémia, Wortmannin 100 μ g/ttkg i.p., Posztkond.

5.5. Megbeszélés

Tanulmányoztuk az iszkémiás és farmakológiai posztkondicionálás protektív hatásait egészséges és STZ indukálta diabétesz mellituszban.

A szérumkreatinin-szintben a csoportok között a műtétet megelőzően nincs különbség. A Wortmanninnal gátolt, iszkémiás posztkondicionált csoportban magasabb a kreatinin koncentrációja a többi csoporthoz képest. Szignifikánsan magasabb a kreatinin koncentráció STZ diabétesz mellituszban az iszkémiás posztkondicionált, Wortmanninnal kezelt csoportban az inzulinnal kezelt csoporthoz képest.

A TNF- α jelentős citokin az IR károsodásban. Az iszkémia-reperfúziós károsodás mértékét a leukociták és az endothelium által termelt TNF- α szintekkel jellemeztük. Kísérleteink eredményei szerint egészséges, normál tápon tartott állatokon a posztkondicionálás szignifikánsan csökkentette a szérum-TNF- α -szintet. A 45 perces iszkémiát követően inzulinnal kezelt csoportban és a Wortmanninnal gátolt iszkémiás posztkondicionált csoportban szignifikánsan emelkedett a koncentráció a reperfúzió végén. STZ indukálta diabétesz mellituszban fellépő iszkémia-reperfúziós károsodások mértéke magasabb volt a kontroll csoporthoz képest, de nem befolyásolta azokat az iszkémiás posztkondicionálás, mint ahogy az inzulin alkalmazása a reperfúzió kezdetén sem. Az inzulinnal történő farmakológiai posztkondicionálás nem csökkentette a szérum-TNF- α -szintet egyik csoportban sem.

A HE metszeteken az egészséges, kontroll csoportban nem találtunk különbséget csoportjaink között. Jablonksi 0-2 és Banff Grad I. fázisokat láttunk. Feltételezzük, hogy 2 óra reperfúziós időtartam rövid, még fénymikroszkópos eltérés (HE) nélküli fázis.

Szignifikáns különbséget láttunk az STZ diabéteszes IR csoportban származó metszetekben, ahol Grade II súlyosságú multifokális tubuláris atrófiát tapasztaltunk a corticomedulláris átmenetben. Mint ahogy már az első fejezetben tapasztaltuk, kísérletünket megismételve szintén megállapítható, a TNF- α mindkét csoportban a vese kéreg- és velőállományában egyaránt kimutatható volt. A papilla hámjában látható TNF- α mennyiségét számszerűsítettük és statisztikailag értékeltük. A posztkondicionált csoportban szignifikánsan kisebb értéket detektáltunk, mint az IR csoportban. STZ indukálta diabétesz mellituszban a posztkondicionálás nem változtatta meg a TNF- α mennyiségét.

6. KÖVETKEZTETÉSEK

A szervátültetés sikerének egyik fontos pillére az iszkémia-reperfúzió okozta károsodás megelőzése, illetve kezelése. Jelen tudomásunk szerint az iszkémiás poszt kondicionálás enyhíti az akut reperfúziós károsodást. Ezen kívül hosszabb távú hatása is van. Zhao és munkatársai szerint a miokardiális iszkémia után elért infarktusz terület méretének csökkenése 24 órán át fennmarad¹⁶³. Ez a megfigyelés további bizonyítékkal szolgál arra a feltevésre, hogy a korai események befolyásolása a későbbi eseményekre is hatást gyakorol. Eredetileg iszkémiás poszt kondicionálásnak nevezték a jelenséget, de talán jobb a jelzőt elhagyni, mivel még nem világos, hogy tényleg a reokklúziók, vagy pedig az ezeket követő rövid reperfúziós epizódok a jelentősebbek a protektív stratégia szempontjából¹⁶⁴.

A poszt kondicionálás ráirányította a tudományos világ figyelmét a reperfúzióra, mint egy biológiailag aktív és terápiásan fontos célpontra. Továbbá a poszt kondicionálás kapcsolatba hozható rapidan aktiválódó survival kinázokkal, ezzel is alátámasztva szerepüket a posztiszkémiás károsodás mértékének meghatározásában.

A poszt kondicionálást egyre több laboratóriumban, különböző modelleken vizsgálják, mint pl. kis és nagy állatokon, in vivo, ex vivo perfundált szerveken, illetve sejtenyészetekben¹⁶⁵. A végső kihívást az jelenti, hogy a poszt kondicionálás elméletét és kísérletes tapasztalatait a mindennapi klinikai gyakorlatba mi módon lehet átültetni.

Valószínűleg a poszt kondicionálás az egész folyamat háttérében álló szisztémás gyulladáshoz való válaszreakció kialakulásának valószínűségére, illetve mértékére is kedvező hatást fejt ki. Az iszkémiás poszt kondicionálás 45 perc vese iszkémiát követően egészséges állatokon csökkenti a TNF- α koncentrációját szérumban és a TNF- α pozitívítást vesepapillában. Jelen kísérletben az iszkémiás poszt kondicionálással sikerült megfékezni a revaszkularizációt követő kezdeti folyamatokat, mind a lokális gyulladást, a vese-, mind a májkárosodást tekintetében. A poszt kondicionált csoportban, melyet Wortmanninnal gátoltunk nem csökkent az iszkémia-reperfúziós károsodás. Arra következtethetünk, hogy a PI3K-Akt útvonal jelentős szerepet játszik az iszkémiás poszt kondicionálás jelátviteli mechanizmusában.

Összefoglalva tehát kísérletünkkel sikerült kimutatni azt, hogy a vese kirekesztéssel járó érműtétek során alkalmazott iszkémiás poszt kondicionálással mérsékelhetők az iszkémia-reperfúziós károsodások.

A vesefunkciót tekintve nem bizonyult az iszkémiás poszt kondicionálás jótékony hatásának kísérletünkben. A poszt kondicionálás nem csökkentette szignifikánsan a

szérumkarbamid-szintet, a szérumkreatinin-szint alapján ugyanolyan mértékű veseelégtelenség jött létre minden csoportban, tehát a rövidtávú klinikai kimenetelt nem befolyásolta. Eredményünk összefüggésben állhat a reperfüziós időtartam rövidegével.

További megfigyelésünk, hogy a hiperkoleszterinémia önmagában képes fokozni a TNF- α termelődést a vese tubulus hengerhám sejtjeiben és az erek simaizmában. A poszt kondicionálás csökkenti az egészséges szervekben a TNF- α -szintet, azonban a hiperkoleszterinémiás szervek esetében ez a hatás nem alakul ki.

Metabolikusan egészséges 6 hónapos Wistar patkányokban az öregedés során perifériás inzulinrezisztencia jött létre. Orális glükóz terhelés során nem csak inzulin felszabadulás figyelhető meg, hanem ezzel párhuzamosan a szérum-TNF- α -szint is megnő, és ezzel szerepet játszva az inzulinrezisztencia kialakulásában.

Célzott vese iszkémia-reperfüzió során megváltozik a máj antioxidáns rendszer aktivitása, melyre pozitív hatással van a poszt kondicionálás.

Streptozotocin indukálta diabétesz mellituszban fellépő iszkémia-reperfüziós károsodások mértéke magasabb volt a kontroll csoporthoz képest, de nem befolyásolta azokat az iszkémiás poszt kondicionálás, mint ahogy az inzulin alkalmazása a reperfüzió kezdetén sem. Az inzulinnal történő farmakológiai poszt kondicionálás nem csökkentette az akut gyulladási reakciót. STZ diabétesz mellituszban szignifikáns különbséget az iszkémia-reperfüzió csoportban származó metszetekben mutattunk ki, ahol Banff Grade II súlyosságú multifokális tubuláris atrófiát tapasztaltunk a corticomedulláris átmenetben.

Mindezek alapján elmondható, hogy a kísérleteinkben vizsgált endogén adaptációt indukáló mechanizmus – az iszkémiás poszt kondicionálás - jelentősen csökkenteni képes az iszkémia-reperfüzió során kialakuló oxidatív stressz mértékét és az ezzel párhuzamosan kialakuló gyulladási reakciót egészséges szervezetben.

Ennek jelentősége a klinikumban realizálódhat minden olyan műtétet követően, ahol megelőzően hipoxiás vagy iszkémiás területek keringésbe kapcsolása történik (ér- és szívsebészeti műtét, traumás végtag sérülések, transzplantáció).

Tehát hatékonyságát, gyorsaságát és egyszerűségét tekintve az iszkémiás poszt kondicionálás alkalmas lehetőségnek mutatkozik sebészeti műtéteket követően a reperfüziós károsodások csökkentésére.

A módszer eredményességét sajnálatos módon megnehezíti, hogy egészséges, vagy beteg szervezetben kerül alkalmazásra, melyek közül kiemelendő a metabolikus zavarok és azok nagyszámban történő előfordulása (hiperkoleszterinémia, diabétesz mellitusz).

7. ÖSSZEFOGLALÁS, ÚJ EREDMÉNYEK

Elsőként vizsgáltuk vese iszkémia-reperfúziós modellben az iszkémiás és farmakológiai posztkondicionálást metabolikus eltéréssel rendelkező patkánymodellekben.

I. a. 1,5 % koleszterintartalmú táppal 8 hét után, hím patkányokban hiperkoleszterinémiát és hipertrigliceridémiát alakítottunk ki.

b. Mindkétoldali vesehilus okklúziót követően, az iszkémiás posztkondicionálás 45 perc iszkémiát követően és 120 perc reperfúziót megelőzően csökkenti az oxigén szabad gyökök mennyiségét a teljes vérben, a szérumperoxid- és TNF- α -szintet, tehát az akut gyulladós reakciót.

c. A hiperkoleszterinémia már önmagában is képes indukálni az endogén védelmet. A hiperkoleszterinémiás patkányoknál fellépő iszkémia-reperfúziós károsodások mértéke alacsonyabb, önmagában képes fokozni a TNF- α termelődést a vese tubulus hengerhám sejtjeiben és az erek simaizmában.

d. Feltételezzük, hogy az NF κ B- és a MAPK-útvonalakat a hiperkoleszterinémia már a TNF- α receptor asszociált útvonal előtt indukálni képes. Így a korai válasz által lehetséges, hogy az iszkémia nem tud olyan szignifikáns gyulladós választ kiváltani.

e. A vesefunkciót tekintve nem bizonyult az iszkémiás posztkondicionálás jótékony hatásának kísérletünkben. A posztkondicionálás nem csökkentette szignifikánsan a szérumkarbamid-szintet, a szérumkreatinin-szint alapján ugyanolyan mértékű veseelégtelenség jött létre minden csoportban, tehát a rövidtávú klinikai kimenetelt (2 óra) nem befolyásolta. Eredményünk összefüggésben állhat a reperfúziós időtartam rövidegével

II. a. 2% koleszterin, 0,5% epesav és 20% napraforgóolaj tartalmú táppal 2-es típusú diabétesz mellitust alakítottunk ki.

b. Orális glükóz terhelés során kimutattuk patkánymodellben, hogy nemcsak inzulin felszabadulás figyelhető meg, hanem ezzel párhuzamosan a szérum-TNF- α -szint is nő, szerepet játszva az inzulinrezisztencia kialakulásában. A korábban metabolikusan egészséges Wistar patkányokban az öregedés során (6 hónap) perifériás inzulinrezisztencia jön létre.

c. Az iszkémiás posztkondicionálás csak a máj MDA szintben csökkenti az iszkémia-reperfúziós károsodásokat 90 perces iszkémiát, és 240 perces reperfúziót követően.

d. A SOD és GSH koncentrációja szignifikánsan csökken vese iszkémia-reperfúziót követően T2DM-ben, jelezve a fokozott gyöktermelésből származó felhasználódásukat.

e. A malondialdehid koncentrációja májszövetben szignifikánsan emelkedett volt a T2DM-es csoportban az egészséges kontroll csoporthoz viszonyítva.

III. a. Streptozotocinnal 1-es típust modellező diabétesz mellitust alakítottunk ki. Az iszkémiás posztkondicionálás 45 perc iszkémiát követően egészséges állatokon csökkenti a TNF- α koncentrációját szérumban és a TNF- α pozitivitást vesepapillában.

b. Az inzulinnal posztkondicionált csoportban és a Wortmanninnal gátolt iszkémiás posztkondicionált csoportban szignifikánsan emelkedett a koncentráció a reperfúzió végén. A PI3kináz gátlószere, a Wortmannin szignifikánsan csökkentette az iszkémiás posztkondicionálás jótékony hatását a kontroll csoportban. Arra következtethetünk, hogy a PI3K-Akt útvonal jelentős szerepet játszik az iszkémiás posztkondicionálás jelátviteli mechanizmusában.

c. A fénymikroszkópos, HE metszeteken az egészséges csoportban nem találtunk különbséget csoportjaink között. Jablonksi 0-2 és Banff Grad I. fázisokat láttunk. Feltételezzük, hogy 2 óra reperfúziós időtartam, amikor eltávolítottuk a vesét, az iszkémia-reperfúzió időtartam rövidege miatt egy korai, egyéb fénymikroszkópos eltérésekkel járó fázis.

d. A streptozotocin indukálta diabétesz mellituszban szignifikáns különbséget az iszkémia-reperfúzió csoportban származó metszetekben mutattunk ki, ahol Banff Grade II súlyosságú multifokális tubuláris atrófiát tapasztaltunk a corticomedulláris átmenetben.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom **Dr. Kürthy Máriának és Dr. Jancsó Gábornak**, akik negyedéves orvostanhallgató korom óta egyengetik tudományos munkámat. Időt és fáradságot nem kímélő rengeteg segítségükért, örökös biztatásukért.

Kiemelt köszönettel tartozom **Dr. Róth Erzsébet Professzor Asszonynak** az iránymutatásért, építő kritikai bírálatokért. A témaválasztástól egészen ezen disszertáció megírásáig hasznos jótanácsokkal látott el, és megadott minden segítséget.

Szeretném köszönetemet kifejezni **Dr. Degrell Péternek** hasznos tanácsaiért, a sok türelmes óráért a mikroszkóp mellett, mely alatt bevezetett a vese szövettanának érdekes, lenyűgöző világába. („Ennél vakabb vizsgálat nincsen, még jó, hogy nyitva volt a szemem.”)

Köszönöm egykori TDK társaim, **Ranczinger Eszter és Dr. Kovács Dóra** segítségét, gondos, szorgalmas munkáját.

Köszönet **Dr. Lantos Jánosnak, Dr. Mikolás Esztellának, Dr. Vida Mariannak** a laboratóriumi segítségért, hasznos tudományos észrevételekért.

Köszönöm **Dr. Arató Endre, Dr. Sínay László és Prof. Dr. Weber György** támogató segítségét.

Köszönettel tartozom a Sebészeti Oktató és Kutató Intézet és Központi Állatkísérleti Laboratórium valamennyi munkatársának (**Bakainé Matus Ilona, Buza Nikoletta, Fábíán Ildikó, Karádiné Sztárai Mária, Kathleen De Roo, Pintéerné Henrich Éva, Tamás Zoltán**) a nélkülözhetetlen segítségért, és a munkámhoz biztosított kellemes és baráti környezetért. Szeretném kiemelni **Tóthné Fajtik Csillát** laboratóriumi munkában nyújtott segítségéért. Az intézet volt és jelenlegi PhD hallgatóinak egyéb témákban való együttgondolkodást és együttműködést.

Köszönet **Mindenkinek**, aki a fentiekben nem került felsorolásra, de segített a munkámban.

Hálásan köszönöm **Édesanyámnak, Testvéremnek, Családomnak és Barátaimnak**, hogy mindig mindenben mellettem állnak.

PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK

Közlemények

Arató E, Kürthy M, Sínay L, Kasza G, Menyhei G, Hardi P, Shafiei M, Ripp K, Szilágyi K, Takács I, **Miklós Z**, Bátor A, Lantos J, Kollár L, Róth E, Jancsó G. Effect of vitamin E on reperfusion injuries during reconstructive vascular operations on lower limbs. *Clinical Hemorheology And Microcirculation* 44:(2) pp. 125-136. (2010) [IF: 2,838]

Miklós Z, Kürthy M, Degrell P, Ranczinger E, Vida M, Lantos J, Arató E, Sínay L, Hardi P, Balatonyi B, Ferencz S, Jávör Sz, Kovács V, Borsiczky B, Wéber Gy, Róth E, Jancsó G. Ischaemic postconditioning reduces serum and tubular TNF-expression in ischaemic-reperfused kidney in healthy rats. *Clinical Hemorheology And Microcirculation* 50:(3) pp. 167-178. (2012) [IF: 3,398]

Előadáskivonatok, Konferenciaszereplések

Miklós Z, Kürthy M, Jancsó G, Degrell P, Ranczinger E, Lantos J, Ferencz S, Wéber Gy, Róth E. A posztkondicionálás hatása az ischemia-reperfúzió okozta szövettani elváltozásokra hyperkoleszterinémiás patkányokban. *Magyar Sebészet* 62:(3) p. 155/3. (2009)

Miklós Z, Kürthy M, Degrell P, Jancsó G. A posztkondicionálás hatásainak vizsgálata a vese iszkémiás-reperfúziós károsodásaira kontroll és hiperkoleszterinémiás patkányokban. *HMAA Balatonfüredi Nyári Diákkonferencia*, Balatonfüred. (2009)

Sínay L, Kürthy M, Arató E, Bátor A, **Miklós Z**, Szabó A, Kovács K, Kollár L, Róth E, Jancsó G. Iszkémiás posztkondicionálás protektív hatásainak vizsgálata hasi aorta műtétet követő reperfúziós károsodásokban. *Érbetegségek* 16:(2) p. 62. (2009)

Miklós Z, Kürthy M, Degrell P, Ranczinger E, Lantos J, Sínay L, Arató E, Horváth Sz, Ferencz S, Wéber Gy, Róth E, Jancsó G. Effects of postconditioning on kidney ischemia/reperfusion injury in hypercholesterolemic rats. *Acta Biologica Szegediensis* 53:(1) pp. 39-72. (2009)

Kürthy M, **Miklós Z**, Jancsó G, Ranczinger E, Lantos J, Sínay L, Arató E, Horváth Sz, Ferencz S, Wéber Gy, Róth E. A posztkondicionálás hatásának vizsgálata a vese ischemia-reperfúziós károsodásaira kontroll és hyperkoleszterinémiás patkányokban. *Magyar Sebészet* 62:(3) p. 143. (2009)

Miklós Z, Ranczinger E, Róth E, Kürthy M, Jancsó G. A posztkondicionálás hatásának vizsgálata a vese iszkémia-reperfúziós károsodásaira kontroll és hiperkoleszterinémias patkányokban. *Tudományos Diákköri Konferencia, Pécs*. (III. helyezés) (2009)

Kürthy M, Jancsó G, Ferencz S, Lantos J, **Miklós Z**, Ranczinger E, Balatonyi B, Horváth Sz, Takács I, Szalai M, Kiss K, Lahner M, Feiszt P, Wéber Gy, Róth E. A Diclofenac aggregációgátló hatásának in vitro összehasonlító vizsgálata izolált trombocitákon. *Cardiologica Hungarica*; 39: A70. (2009)

Kürthy M, Jancsó G, **Miklós Z**, Degrell P, Ranczinger E, Lantos J, Ferencz S, Horváth Sz, Wéber Gy, Róth E. Ischemic postconditioning reduces kidney damage in healthy but not in hypercholesterinaemic rats. *British Journal Of Surgery* 97:(Suppl. 4) p. S95. (2010) [IF: 4,444]

Kovács D, Ranczinger E, **Miklós Z**, Kürthy M, Keszthelyi Zs. Az inzulin trombocita funkcióra és szabadgyök termelésre gyakorolt hatásának összehasonlító vizsgálata I-es és II-es típusú diabéteszes betegek és egészséges véradók teljes vérében. *Tudományos Diákköri Konferencia, Pécs*. (2010)

Miklós Z, Degrell P. A szialsav felszaporodása diabéteszes nodulariszklerózisban. *Tudományos Diákköri Konferencia, Pécs*. (II. helyezés) (2010)

Arató E, Sínay L, Kürthy M, Hardi P, Shaafiei M, **Miklós Z**, Róth E, Jancsó G. Protection of vitamin E on reperfusion injuries in reconstructive vascular operations. *British Journal Of Surgery* 97:(S4) p. 63. (2010) [IF: 4,444]

Kürthy M, Jancsó G, **Miklós Z**, Degrell P, Ranczinger E, Lantos J, Ferencz S, Horváth Sz, Balatonyi B, Jávör Sz, Wéber Gy, Róth E. Ischaemic postconditioning reduces renal ischaemia/reperfusion injury in healthy but not in hypercholesterinaemic rats. *Magyar Kardiológusok Társasága, Balatonfüred, MKT Tudományos Kongresszus*. (2010)

Miklós Z, Degrell P. Diabéteszes nodulariszklerózisban felszaporodik a szialsav. *XVII. Tudományos Diákköri Konferencia, Marosvásárhely*. (2010)

Miklós Z, Ranczinger E, Németh M, Kürthy M, Jancsó G, Degrell P, Róth E. A posztkondicionálás hatásának vizsgálata a vese iszkémia-reperfúziós károsodásaira. *XVII. Tudományos Diákköri Konferencia, Marosvásárhely*. (2010)

Degrell P, **Miklós Z**, Berta G, Halmai R, Molnár G, Wittmann I. Kimmelstiel–Wilson diabeteses nodularis glomerulosclerosisban felszaporodik a szialsav. *Hypertonia és nephrologia*; 14 (Supplement 1): S1-S72. (2010)

Miklós Z, Kürth M, Lantos J, Vida M, Wéber Gy, Jancsó G, Róth E. Effect of kidney ischemic postconditioning and pharmacological post-treatment on in healthy and diabetic rats. *Acta Physiologica* 202:(Supplement 684) Paper 034. (2011) [IF: 0,821]

Miklós Z, Kürthy M, Lantos J, Vida M, Wéber Gy, Róth E, Jancsó G. Effect of kidney ischemic postconditioning and pharmacological post-treatment on plasma big Endothelin level in healthy and diabetic rats. *British Journal Of Surgery* 98:(S4) pp. 50-69. (2011) [IF: 4,606]

Kürthy M, **Miklós Z**, Kovács D, Ranczinger E, Jancsó G, Arató E, Degrell P, Kovács V, Balatonyi B, Róth E and Lantos J. Effect of hypercholesterolemia on glucose tolerance and endogenous adaptation to Ischemia/reperfusion kidney injury in rats. *2nd Central and Eastern Laboratory Animal Science (CEELA) Budapest*. (2012)

Könyvfejezet

Kürthy M, Jancsó G, Arató E, Sínay L, Lantos J, **Miklós Z**, Balatonyi B, Jávör Sz, Ferencz S, Ranczinger E, Kovács V, Kovács D, Verzár Zs, Wéber Gy, Borsiczky B, Róth E. Investigation of the oxidative stress, the altered function of platelets and neutrophils, in the patient with periferial arterial disease. In: T Forbes (szerk.) *Angioplasty Rijeka: InTech*, pp. 63-88.(2012)

IRODALOMJEGYZÉK

- 1** Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia. A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*; 74: 1124-1136, 1986.
- 2** Jancsó G, Lantos J, Borsiczky B, Szántó Z, Róth E. Dynamism of NF- κ B and AP1 activation in the signal transduction of ischaemic myocardial preconditioning. *European Surgical Research Clinical and Experimental Surgery*; 36: 129-135, 2004.
- 3** Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, and Vinten-Johansen J. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 285: H 579-H588, 2003.
- 4** Zhao Z-Q, Corvera JS, Wang N-P, Guyton RA, Vinten-Johansen J. Reduction in infarct size and preservation of endothelial function by ischemic postconditioning: Comparison with ischemic preconditioning. *Circ*; 106 (Suppl. II): 314, 2002.
- 5** Gal J, Bogar L, Acsady G, Kertai M: Cardiac risk reduction in non-cardiac surgery: the role of anesthesia and monitoring techniques. *European Journal of Anesthesiology*; 23, (8): 641-648, 2006.
- 6** Bouhidel O, Pons S, Souktani R, Zini R, Berdeaux A, Ghaleh B. Myocardial ischemic postconditioning against ischemia-reperfusion is impaired in ob/ob mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 29, 2008.
- 7** Liu X, Chen H, Zhan B, Xing B, Zhou J, Zhu H, Chen H. Attenuation of reperfusion injury by renal ischemic postconditioning: The role of NO. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 359: 628–634, 2007.
- 8** Granger, D. N. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia reperfusion injury. *Am. J. Physiol*; 255: H1269-H1275, 1988.
- 9** Granger, D. N. Ischemia reperfusion: mechanisms of microvascular dysfunction and the influence of risk factors for cardiovascular disease. *Microcirculation*; 6: 167-178, 1999.
- 10** Raitakari OT, Celermajer DS. Testing for endothelial dysfunction. *Ann Med*; 32: 293-304, 2000.
- 11** De Artinano AA, Gonzalez VL. Endothelial dysfunction and hypertensive vasoconstriction. *Pharm Res*; 40 (2):113-124, 1999.

-
- 12** Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K. Endothelial dysfunction, oxidative stress and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation*; 104: 2673-2678, 2001.
- 13** Carden, D. L. and Granger, D. N. Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury. *Journal of Pathology*; 190: 255-266, 2000.
- 14** Szokoly M, Nemeth N, Brath E, Acs G, Hamar J, Miko I, Furka I. Experimental "functional amputate model" in ischemia-reperfusion. *Magy Seb*; 58 (2): 138-43, 2005.
- 15** Kvietys PR, Granger DN. Endothelial cell monolayers as a tool for studying microvascular pathophysiology. *Am J Physiol*; 273: 1189-1199, 1997.
- 16** Darley Usmar, V. M., Stone, D., and Smith, D. R. Oxygen and reperfusion damage: an overview. *Free Radical Research Communications*; 7 (36):247-54, 1989.
- 17** Stone, D., Darley Usmar, V., Smith, D. R. and O'Leary, V. Hypoxia reoxygenation induced increase in cellular Ca^{2+} in myocytes and perfused hearts: the role of mitochondria. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*; 21 (10): 963-73, 1989.
- 18** Suzuki, S., Toledo Pereyra, L. H., Rodriguez, F. J., and Cejalvo, D. Neutrophil infiltration as an important factor in liver ischemia and reperfusion injury. Modulating effects of FK506 and cyclosporine. *Transplantation*; 55: 1265-1272, 1993.
- 19** Babior BM, Peters WE. The superoxide producing enzyme of human neutrophils: further properties. *J Biol Chem*; 256: 2321-2323, 1981.
- 20** Granger DN, Korthuis RJ. Physiologic mechanism of postischaemic tissue injury. *Annu Rev Physiol*; 57: 311-332, 1995.
- 21** Kurose I, Granger DN. Evidence implicating xanthine-oxidase and neutrophils in reperfusion-induced microvascular dysfunction. *Ann NY Acad Sci*; 723: 158-179, 1994.
- 22** Pober JS. Warner-Lambert/ Parke Davis award lecture. Cytokine-mediated activation of vascular endothelium. *Physiology and pathology. Am. J. Pathol*; 133 (3): 426-433, 1988.
- 23** Chello M, Mastroberto P, Marchese AR, Mactese G, Santangelo E, Amantea B. Nitric oxide inhibits neutrophil adhesion during experimental extracorporeal circulation. *Anesthesiology*; 89: 443-448, 1998.
- 24** Hoek JB, Walajtys Rode E, and Wang X. Hormonal stimulation, mitochondrial Ca^{2+} accumulation, and the control of the mitochondrial permeability transition in intact hepatocytes. *Mol. Cell Biochem*; 174: 173-179, 1997.

-
- 25** Arató E, Kürthy M, Sínay L, Kasza G, Menyhei G, Masoud S, Bertalan A, Verzár Z, Kollár L, Róth E, Jancsó G. Ischaemic postconditioning reduces peroxide formation, cytokine expression and leukocyte activation in reperfusion injury after abdominal aortic surgery in rat model. *Clin. Hemorheol. Microcirc*; 41 (1): 1-8, 2009.
- 26** Aruoma O.I. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *J. Am. Oil Chem. Soc*; 75: 199, 1998.
- 27** Arató E, Kürthy M, Jancsó G, Sínay L, Fehér I, Kollár L, Róth E. Monitoring of prooxidant-antioxidant state following limb revascularisation surgery. *Journal of Vascular Research*; 43 (1): 45-45, 2006.
- 28** Dr. Kakukk Gy., fejezetet írta: Kárpáti István. *Klinikai nephrológia kézikönyv*; VII. fejezet, 335-349 old, 2004.
- 29** Szabó A, Heemann U. Ischemia reperfusion injury and chronic allograft rejection. *Transplant Proc*; 30: 4281-4, 1998.
- 30** Kopper L, Schaff Zs, *Patológia*; Medicina Könyvkiadó, Budapest 20. fejezet 976-985, 2004.
- 31** Kopper L, Schaff Zs, *Patológia*; Medicina Könyvkiadó, Budapest 20. fejezet 990-996, 2004.
- 32** Schelling JR, Nkemere N, Kopp JP, Cleveland RP. Fas-dependent fratricidal apoptosis is a mechanism of tubular epithelial cell deletion in chronic renal failure. *Lab. Invest*; 78: 813-24, 1998.
- 33** Baud L, Oudinet JP, Bens M, et al.: Production of tumor necrosis factor by rat mesangial cells in response to bacterial lipopolysaccharide. *Kidney Int*; 35: 1111—1118, 1989.
- 34** Arató E, Kürthy M, Jancsó G, Kasza G, Rozsos I, Merkli H, Pál E, Kollár L, Róth E. The revascularization syndrome of the lower limbs. *Perfusion*; 18: 168-176, 2005.
- 35** Gumina RJ, Gross GJ. If ischemic preconditioning is the gold standard, has a platinum standard of cardioprotection arrived? Comparison with NHE inhibition, *J Thromb Thrombolysis* 8; 39–44; 1999.
- 36** Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia. A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*; 74: 1124-1136, 1986.
- 37** Róth E, Jancsó G, Temes G, Lantos J. Long term follow-up of leukocyte function during myocardial reperfusion injury. *Myocardial Ischemia and Preconditioning. Progress In Experimental Cardiology*; 6: 139-148, 2003.

-
- 38** Róth E, Cserepes B, Gasz B, Rác B, Lantos J, Kürthy M, Gaszner B, Jancsó G. Ischaemic and pharmacological preconditioning induces heme oxygenase-1 expression in cultured myocardium *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*; 40 (6) 959, 2006.
- 39** Pang CY, Yang RZ, Zhong A, Xu N, Boyd B, Forrest CR. Acute ischaemic preconditioning protects against skeletal muscle infarction in the pig. *Cardiovasc. Res*; 29: 782-788, 1995.
- 40** Heurteaux, C., Lauritzen, I., Widmann, C., and Lazdunski, M. Essential role of adenosine, adenosine A1 receptors, and ATP sensitive K⁺ channels in cerebral ischemic preconditioning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*; 92: 4666-4670, 1995.
- 41** Hotter G, Closa D, Prados M, FernandezCruz L, Prats N, Gelpi E, and RoselloCatafau J. Intestinal preconditioning is mediated by a transient increase in nitric oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun*; 222: 2732, 1996.
- 42** Ferencz A, Rác B, Gasz B, Benkő L, Jancsó G, Kürthy M, Róth E. Intestinal ischemic preconditioning in rats and NF-kappaB activation. *Microsurgery*; 26 (1):54-7, 2006.
- 43** Turman MA, Bates CM. Susceptibility of human proximal tubular cells to hypoxia: effect of hypoxic preconditioning and comparison to glomerular cells. *Ren Fail*; 19: 4760, 1997.
- 44** Jefayri MK, Grace PA, Mathie RT: Attenuation of reperfusion injury by renal ischaemic preconditioning: the role of nitric oxide. *Ireland BJU International*; 85: 1007-1013, 2000.
- 45** Kin H, Wang NP, Mykytenko J, Reeves J, Deneve J, Jiang R, Zatta AJ, Guyton RA, Vinten-Johansen J, Zhao ZQ. Inhibition of myocardial apoptosis by postconditioning is associated with attenuation of oxidative stress-mediated nuclear factor-kappa B translocation and TNF alpha release. *Shock*; 29 (6): 761-8, 2008.
- 46** Dow J, Bhandari A, Kloner RA. Ischemic postconditioning's benefit on reperfusion ventricular arrhythmias is maintained in the senescent heart. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*; 13 (2): 141-8, 2008.
- 47** Sun K, Liu ZS, Sun Q. Role of mitochondria in cell apoptosis during hepatic ischemia-reperfusion injury and protective effect of ischemic postconditioning. *World J Gastroenterol*; 10 (13): 1934-8, 2004.
- 48** Yue T, Roth Z'graggen B, Blumenthal S, Neff SB, Reyes L, Booy C, Steurer M, Spahn DR, Neff TA, Schmid ER, Beck-Schimmer B. Postconditioning with a volatile anaesthetic in alveolar epithelial cells in vitro. *Eur Respir J*; 31 (1): 118-25, 2008.

-
- 49** Okamoto F, Allen BS, Buckberg GD, Bugyi H, Leaf J. Studies of controlled reperfusion after ischemia. XIV. Reperfusion conditions: Importance of ensuring gentle versus sudden reperfusion during relief of coronary occlusion. *J Thorac Cardiovasc Surg* 92: 613–620, 1986.
- 50** Mitrev Z, Beyersdorf F, Hallmann R, et al. Eperfusion injury in sceletal muscle: controlled limb reperfusion reduces local and systemic complications after prolonged ischemia. *Cardiovas Surg*; 2: 737-748, 1994.
- 51** De Groot H, Rauen U. Ischemia-reperfusion injury: Processes in pathogenetic networks: A Review *Transplantation Proceedings*; 39: 481-484, 2007.
- 52** Miki T, Liu GS, Cohen MV, Downey JM. Mild Hypothermia reduces infarct size in the beating rabbit heart: A practical intervention for acute myocardial infarction? *Basic Res Cardiol*; 93: 372–383, 1998.
- 53** Zhao Z-Q, Corvera JS, Wang N-P, Guyton RA, Vinten-Johansen J. Reduction in infarct size and preservation of endothelial function by ischemic postconditioning: Comparison with ischemic preconditioning. *Circ*; 106 (Suppl. II): 314, 2002.
- 54** Andrew Tsang, Derek J. Hausenloy and Derek M. Yellon. Myocardial postconditioning: reperfusion injury revisited. *AM J Physiol Heart Circ Physiol*; 289: 2-7, 2005.
- 55** Tsang A, Hausenloy DJ, Mocanu MM, Yellon DM. Postconditioning: a form of „modified reperfusion” protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. *Circ Res*; 95: 230-232, 2004.
- 56** Vinten-Johansen J, Zhao ZQ, Zatta AJ, Kin H, Halkos ME, Kerendi F. Postconditioning. A new link in nature’s armor against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Basic Res Cardiol*; 100 (4): 295-310, 2005.
- 57** Argaud L, Gateau- Roesch O, Raisky O, et al. Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition. *Circulation*; 111: 194-197, 2005.
- 58** Gao F, Gao E, Yue TL. Nitric oxide mediates the antiapoptotic effect of insulin in myocardial ischemia-reperfusion: the roles of PI3-kinase, Akt, and endothelial nitric oxide synthase phosphorylation. *Circulation*; 105: 1497-1502, 2005.
- 59** Jiang YF, Zhang ZX, Kifor O, Lane CR, Quinn SJ, Bai M. Protein kinase C (PKC) phosphorylation of the Ca²⁺-sensing receptor (CaR) modulates functional interaction of Gproteins with the CaR cytoplasmic tail. *J Biol Chem*; 277: 50543-50549, 2002.
- 60** Inagak K, Churchill E, Mochly-Rosen D. Epsilon protein kinase C as a potential therapeutic target for the ischemic heart. *Cardiovasc Res*; 70: 222-230, 2006.

-
- 61** Zhang WH, Lu FH, Zhao YJ, Wang LN, Tian Y, Pan ZW, Lv YJ, Wang YL, Du LJ, Sun ZR, Yang BF. Post-conditioning protects rat cardiomyocytes via PKCe-mediated calcium-sensing receptors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 361: 659-664, 2007.
- 62** Gal J, Bogár L, Acsády G, Kertai M: Cardiac risk reduction in non-cardiac surgery: the role of anesthesia and monitoring techniques. *European Journal of Anesthesiology*; 23 (8): 641-648, 2006.
- 63** Wild S., Roglic G., Green A, Sicree R, King H.:Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*; 27 (5): 1047-53, 2004.
- 64** Ferdinandy P, Schulz R, Baxter GF. Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning. *Pharmacol Rev*; 59 (4): 418-58, 2007.
- 65** Hausenloy DJ, Yellon DM. Preconditioning and postconditioning: new strategies for cardioprotection. *Diabetes Obes Metab*; 10 (6): 451-9, 2008.
- 66** Moraes C, Davel AP, Rossoni LV, Antunes E, Zanesco A. Exercise training improves relaxation response and SOD-1 expression in aortic and mesenteric rings from high caloric diet-fed rats. *BMC Physiol*; 29: 8: 12, 2008.
- 67** Szilvassy Z, Ferdinandy P, Szilvassy J, Nagy I, Karcasu S, Lonovics J, Dux L, Koltai M. Loss of preconditioning in atherosclerotic rabbits: The role of hypercholesterolaemia. *J. Mol. Cell. Cardiol*; 27: 2559-2569, 1995.
- 68** Bouhidel O, Pons S, Souktani R, Zini R, Berdeaux A, Ghaleh B. Myocardial ischemic postconditioning against ischemia-reperfusion is impaired in ob/ob mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 295 (4): H1580-H1586, 2008.
- 69** Lydia Lacerda, Lionel H. Opie, and Sandrine Lecour. Influence of Tumour Necrosis Factor Alpha on the Outcome of Ischaemic postconditioning in the Presence of Obesity and Diabetes. *Experimental Diabetes Research*; Article ID 502654, 2012.
- 70** Gyurkovics E, Arányi P, Stangl R, Ónody P, Ferreira G, Lotz G, Kupcsulik P, Szijártó A. Postconditioning of the lower limb - protection against the reperfusion syndrome. *Journal of Surgical Research*; 1-9 p, 2009.
- 71** Sínay L, Kürthy M, Horváth Sz, Arató E, Shafiei M, Lantos J, Ferencz S, Bátor A, Balatonyi B, Verzár ZS, Sütő B, Kollár L, Wéber Gy, Róth E, Jancsó G. Ischaemic postconditioning reduces peroxide formation, cytokine expression and leukocyte activation in reperfusion injury after abdominal aortic surgery in rat model. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*; 40: 133–142, 2008.

-
- 72** Feldkamp T, Kribben A, Roeser F, Senter RA, Weinberg JM. Accumulation of nonesterified fatty acids causes the sustained energetic deficit in kidney proximal tubules after hypoxia-reoxygenation. *Am J Physiol Renal Physiol*; 290 (2): F465-77, 2006.
- 73** Chataerjee PK, Cuzzocrea S, Brown PAJ, Zacharowski K, Stewart KN, Mota-Filipe, Thiernemann C. Tempol, a membrane-permeable radical scavenger, reduces oxidant stress-mediated renal dysfunction and injury in the rat. *Kidney International*; 58: 658-673, 2000.
- 74** Takenaka M, Tatsukawa Y, Dohi K, Ezaki H, Matsukawa K, Kawasaki T: Protective effects of Alfa-tocoferol and coenzyme Q10 on warm ischemic damage of the rat kidney. *Transplantation*; 32: 137-41, 1981.
- 75** Schumer M, Colombel M, Sawczuk I, Gobe G, Connor J, Toole KM, Olsson C, Wise GJ, Buttyan R. Morphologic, Biochemical, and Molecular Evidence of Apoptosis During the Reperfusion Phase After Brief Periods of Renal Ischaemia. *Am. J. of Pathology*; 140: 831-8, 1992.
- 76** Vinodini NA, Tripathi Y, Raghuveer. Effect of 60 minutes of renal ischemia followed by 10 and 90 minutes of reperfusion in rats: A possible role of oxygen free radicals. *Journal of Chinese Clinical Medicine*; 4 (3): 121-125, 2009.
- 77** Bo Ding, Kirkiles-Smith NC, Pober JS. FOXO3a Regulates Oxygen-responsive Expression of Tumor Necrosis Factor Receptor 2 in Human Dermal Microvascular Endothelial Cells. *The Journal of Biological Chemistry*; 284: 19331-19339, 2009.
- 78** Jablonski P, Howden BO, Rae DA, et al. An experimental model for assessment of renal recovery from warm ischemia. *Transplantation*; 35: 198-204, 1983.
- 79** Staat P, Rioufol G, Piot C, et al. Postconditioning the Human Heart *Circ*; 112: 2143-2148, 2005.
- 80** Granfeldt A, Lefer DJ, Vinten-Johansen J. Protective ischaemia in patients: preconditioning and postconditioning. *Cardiovasc Res*; 15; 83 (2): 234-46, 2009.
- 81** Jancsó G, Sínay L, Horváth Sz, Kürthy M, Szabó A, Kovács K, Róth E. Iszkémiás poszt kondicionálás protektív hatásainak vizsgálata hasi aorta műtétet követő reperfüziós károsodásokban. *Cardiologia Hungarica*; 38: B16, 2008.
- 82** Serviddio G, Davide Romano A, Gesualdo L, Tamborra R, Di Palma AM, Rollo T, Altomare E, Vendemiale G. Postconditioning is an effective strategy to reduce renal ischaemia/reperfusion injury. *Nephrol Dial Transplant*; 23: 1504–1512, 2008.
- 83** Szabo A, Heemann U. Ischemia reperfusion injury and chronic allograft rejection, *Transplant Proc*; 30: 4281–4284, 1998.

-
- 84** Cicora F, Lausada N, Vasquez DN, Cicora P, Diego G, Gonzalez P, Salazar G, Stringa P, Raimondi C. Protective effect of immunosuppressive treatment before orthotopic kidney autotransplantation. *Transplant Immunology*; 24: 107-112, 2010.
- 85** O'Hare AM, Glidden DV, Fox CS, Hsu CY. High prevalence of peripheral arterial disease in persons with renal insufficiency: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999–2000, *Circulation*; 109 (3): 320-323, 2004.
- 86** Chade AR, Mushin OP, Zhu X, Rodriguez-Porcel M, Grande JP, Textor CS, Lerman A, Lerman LO. Pathways of renal fibrosis and modulation of matrix turnover in experimental hypercholesterolemia. *Hypertension*; 46 (4): 772-779, 2005.
- 87** Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling, *Cell Death Differ*; 10 (1) 45-65, 2003.
- 88** Róth E, Jancsó G, Jaberansari MT, Kiss K, Szeberényi J. Az oxidatív stressz szerepe az endogén adaptáció kialakulásában. *Folia Hepatologica*; 7 (1): 6-7, 2002.
- 89** Kürthy M, Arató E, Jancsó G, Sínay L, Verzár Z, Cserepes B, Lantos J, Ferencz S, Bertók S, Ferencz A, Kollár L, Róth E. Duration of hypoxia influences platelet function due to free radical production in revascularization surgery of lower limb. *Perfusion*; 20 (6) 187-194, 2007.
- 90** Gao F, Gao E, Yue TL. Nitric oxide mediates the antiapoptotic effect of insulin in myocardial ischemia-reperfusion: the roles of PI3-kinase, Akt, and endothelial nitric oxide synthase phosphorylation. *Circulation*; 105: 1497-1502, 2005.
- 91** Lecour S, Rochette L, Opie L. Free radicals trigger TNF α -induced cardioprotection. *Cardiovasc Res*; 65 (1): 239-43, 2005.
- 92** Lecour S, Smith RM, Woodward B, Opie LH, Rochette L, Sack MN. Identification of a novel role for sphingolipid signaling in TNF α and ischemic preconditioning mediated cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol*; 34: 509–18, 2002.
- 93** Schwabe RF, Bennett BL, Manning AM, Brenner DA. Differential role of I kappa B kinase 1 and 2 in primary rat hepatocytes. *Hepatology*; 33 (1): 8190, 2001.
- 94** McCarthy ET, Sharma R, Li JZ, Sarin VJ. TNF- α increases albumin permeability through the generation of superoxide. *J. Am. Soc. Nephrol*; 4: 620, 1993.
- 95** Wilson SH, Chade AR, Feldstein A, Sawamura T, Napoli C, Lerman A and Lerman LO. Lipid- lowering-independent effects of simvastatin on the kidney in experimental hypercholesterolaemia, *Nephrol Dial Transplant*; 18: 703–709, 2003.

-
- 96** Collino M, Benetti E, Miglio G, Catiglia S, Rosa AC, Aragno M, Thiemermann C, Fantozzi R. Free, Peroxisome proliferator-activated receptor β/δ agonism protects the kidney against ischemia/reperfusion injury in diabetic rats, *Free Radical Biology and Medicine*; 50 (2): 345-353, 2011.
- 97** Róth E, Hejmel L, Jaberansari MT, Jancsó G. The role of free radicals in endogenous adaptation and intracellular signals. *Exp. Clin. Cardiol*; 9: 13-16, 2004.
- 98** Beard JC, Ward WK, Wallum BJ, Porte D JR. Relationship of Islet Function to Insulin Action in Human Obesity. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*; 65 (1): 59-64, 1987.
- 99** Chen M, Bergman RN, Pacini G, Porte D Jr. Pathogenesis of age-related glucose intolerance in man: insulin resistance and decreased beta-cell function. *J Clin Endocrinol Metab*; 60 (1): 13-20, 1985.
- 100** Hancock CR, Han DH, Chen M, Terada s, Yasuda T, Wright DC, and Holloszy JO. High-fat diets cause insulin resistance despite an increase in muscle mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA*; 105 (22): 7815–7820, 2008.
- 101** King DS, Dalsky GP, Clutter WE, Young DA, Staten MA, Cryer PE, Holloszy JO. Effects of exercise and lack of exercise on insulin sensitivity and responsiveness. *J Appl Physiol*; 64 (5): 1942-6, 1988.
- 102** Hanis CL, Boerwinkle E, Chakraborty R, Ellsworth DL, Concannon P, Stirling B, Morrison VA, Wapelhorst B, Spielman RS, Gogolin-Ewens KJ, Shephard JM, Williams SR, Bell GI. A genome-wide search for human non-insulin-dependent (type 2) diabetes genes reveals a major susceptibility locus on chromosome 2. *Nature Genetics*; 13: 161-166, 1996.
- 103** Beard JC, Halter JB, Best JD, Pfeifer MA, Porte D Jr. Dexamethasone-induced insulin resistance enhances B cell responsiveness to glucose level in normal men. *Am J Physiol*; 247: E592-6, 1984.
- 104** Rizza RA, Mandarino LJ, Gerich JE. Effects of growth hormone on insulin action in man. Mechanisms of insulin resistance, impaired suppression of glucose production, and impaired stimulation of glucose utilization. *Diabetes*; 31: 663-669, 1982.
- 105** Bullo-Bonet M, Garcia-Lorda P, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM, Salas-Salvado J. Tumour necrosis factor, a key role in obesity? *FEBS Lett*; 451: 215-219, 1999.
- 106** Stepan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*; 409 (6818): 307-12, 2001.

-
- 107** Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med*; 7 (8): 941-6, 2001.
- 108** Shimomura I, Hammer RE, Ikemoto S, Brown MS, Goldstein JL. Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy. *Nature*; 401 (6748): 73-6, 1999.
- 109** Flores-Riveros JR, McLenithan JC, Ezaki O, Lane MD. Insulin down-regulates expression of the insulin-responsive glucose transporter (GLUT4) gene: effects on transcription and mRNA turnover. *Proc Natl Acad Sci USA*; 90 (2): 512-516, 1993.
- 110** Unwin N, Shaw J, Zimmet P, et al. Impaired glucose tolerance and impaired fasting glycaemia: the current status on definition and intervention. *Diab Med*; 19: 708-723, 2002.
- 111** Kin H, Zhao Z-Q, Sun H-Y, Wang N-P, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Guyton RA, Vinten-Johansen J. Postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion. *Cardiovasc Res*; 62: 74-85, 2004.
- 112** Sipos P, Hagymási K, Blázovics A. Damaging effect of oxidized bile on colonic mucosa and the protective mechanism of an antioxidase. *Magyar Sebészet*; 56 (3-4):123-6, 2003.
- 113** Giricz Z, Görbe A, Pipis J, Burley DS, Ferdinandy P, Baxter GF. Hyperlipidaemia induced by a high-cholesterol diet leads to the deterioration of guanosine-3',5'-cyclic monophosphate/protein kinase G-dependent cardioprotection in rats. *Br J Pharmacol*; 158 (6): 1495-1502, 2009.
- 114** Székely M: Kórélettani alapok. Egyetemi jegyzet; 9.2 fejezet, 296-326, 2006.
- 115** Wagner Z, Degrell P, Lukáts B, Niwa T, Molnár GA, Markó L, Karádi Z, Wittmann I. Accumulation of renin and imidazolone in peritubular capillary endothelial cells in insulin-resistant hypertensive rats. *Nephrol*; 24 (05): 656-664, 2011.
- 116** Levy JC, Matthews DR, Hermans MP. Correct homeostasis model assessment (HOMA) evaluation uses the computer program. *Diabetes Care*; 21 (12): 2191-2, 1998.
- 117** Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*; 28 (7): 412-9, 1985.
- 118** Placer ZA, Cushmann LL, Johnson BC. Estimation of product of lipid peroxidation (malondialdehyde) in biochemical systems. *Anal. Biochem*; 16: 359-364, 1966.

-
- 119** Stevens JB and AP Aitor. Induction of superoxide dismutase by oxygen in neonatal rat lung. *J Biol Chem*; 252: 3509, 1977.
- 120** Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the antioxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*; 247: 3170-3175, 1972.
- 121** Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total protein-bound and non-protein sulphhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem*; 25: 192-205, 1968.
- 122** Escriva F, Agote M, Rubio E, Molero JC, Pascual-Leone AM, Andres A, Satrustegui J, Carrascosa JM. In vivo insulin-dependent glucose uptake of specific tissues is decreased during aging of mature Wistar rats. *Endocrinology*; 138 (1): 49-54, 1997.
- 123** Straczkowski M, Dzienis-Straczkowska S, Kowalska I, Szelachowska M, Stepień A, Kinalska I. Increased plasma-soluble tumor necrosis factor- α receptor 2 level in lean nondiabetic offspring of type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care*; 25: 1824-1828, 2002.
- 124** Hotamisligil GS, Spiegelman BM: Tumor necrosis factor alpha – a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes* 43: 1271-1278, 1994.
- 125** Day CP, Grove J, Daly AK, Stewart MW, Avery PJ, Walker M: Tumour necrosis factor-alpha gene promoter polymorphism and decreased insulin resistance. *Diabetologia*; 41: 430-434, 1998.
- 126** Sookoian SC, González C, Pirola CJ. Meta-analysis on the G-308A tumor necrosis factor alpha gene variant and phenotypes associated with the metabolic syndrome. *Obes Res*; 12: 2122-31, 2005.
- 127** Uysal KT, Wiesbrock, S.M., Marino, M.W., Hotamisligil, G.S. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. *Nature*; 389: 610-4, 1997.
- 128** Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Donovan A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor in TNF α and obesity-induced insulin resistance. *Science*; 271: 665-668, 1996.
- 129** Ragolia L, Begum N. Protein phosphatase-1 and insulin action. *Mol. Cellular Biochem*; 182 (1-2): 49-58, 1998.
- 130** Hotamisligil GS, Murray, D.L., Choy, L.N., Spiegelman, B.M. Free in PMC tumor necrosis factor- α inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*; 91: 4854-8, 1994.
- 131** Róth E, Oehler R, Manhart N, Exner R, Wessner B, Strasser E, and Spittler A. Regulative potential of glutamine relation to glutathione metabolism. *Nutrition*; 18 (3): 217-221, 2002.

-
- 132** Oehler R, Róth E. Regulative capacity of glutamine. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*; 6 (3): 277-282, 2003.
- 133** De Artinano AA, Gonzalez VL. Endothelial dysfunction and hypertensive vasoconstriction. *Pharm Res*; 40 (2): 113-124, 1999.
- 134** Vinten-Johansen J, Zhao ZQ, Zatta AJ, et al. Postconditioning: A new link in nature's armor against myocardial ischemiareperfusion injury. *Basic Res Cardiol*; 100: 295-310, 2005.
- 135** Lee TM, Su SF, Chou TF, Tsai CH. Effect of pravastatin on myocardial protection during coronary angioplasty and the role of adenosine. *Am J Cardiol*; 88 (10): 1108-13, 2001.
- 136** Johnson G, III, Tsao PS, Lefer AM. Cardioprotective effects of authentic nitric oxide in myocardial ischemia with reperfusion. *Crit Care Med*; 19: 244-252, 1991.
- 137** Mozaffari MS, Liu JY, Schaffer SW. Effect of pressure overload on cardioprotection via PI3K-Akt: comparison of postconditioning, insulin, and pressure unloading. *J Hypertens*; 6: 668-74, 2010.
- 138** Schultz JE, Gross GJ. Opioids and cardioprotection. *Pharmacol Ther*; 89: 123-137, 2001.
- 139** Cohen MV, Yang X, Downey JM. The pH hypothesis of postconditioning. Staccato reperfusion reintroduces oxygen and perpetuates myocardial acidosis. *Circ*; 115: 1895-1903, 2007.
- 140** Kim W, Egan JM. The role of incretins in glucose homeostasis and diabetes treatment. *Pharmacol Rev. Dec*; 60 (4): 470-512, 2008.
- 141** Gilon P, Henquin JC. Mechanisms and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic β -cell function. *Endocrine reviews*; 22: 565-604, 2001.
- 142** Yabe-Nishimuraa C. Aldose reductase in glucose toxicity: a potential. *Pharmacol Review*; 50 (1): 21-33, 1998.
- 143** Stephen SM, Chung E, Karen SL, Lamsookja K, Chung J. Contribution of Polyol Pathway to Diabetes-Induced Oxidative Stress. *Am Soc Nephrol*; 14: S233-S236, 2003.
- 144** Bálint P. *Orvosi élettan. Medicina Könyvkiadó, 7.7. fejezet 558-570, 1975.*
- 145** Gammeltoft S, Van Obberghen E. Protein kinase activity of the insulin receptor. *Biochem J*; 235 (1): 1-11, 1986.
- 146** Derek J. Hausenloy C, Derek M. Yellon Reperfusion injury salvage kinase signalling: taking a RISK for cardioprotection. *Heart Fail Rev*; 12: 217-234, 2007.

-
- 147** Szeberényi J. Molekuláris sejtbiológia. Dialóg Campus Kiadó, 48. fejezet, 415-421, 2004.
- 148** Philipp SD, Downey JM, Cohen MV. Postconditioning must be initiated in less than 1 minute following reperfusion and is dependent on adenosine receptors and P13-kinase. *Circulation*; 110: III-168, 2004.
- 149** Zdychova J, Komers R. Emerging role of Akt kinase/protein kinase B signaling in pathophysiology of diabetes and its complications. *Physiol. Res*; 54, 1-16, 2005.
- 150** Bellacosa A, Testa JR, Moore R. A portrait of AKT kinases: human cancer and animal models depict a family with strong individualities. *Cancer Biol. Ther*; 3: 268–275, 2004.
- 151** Elghazi L, Balcazar N, Bernal-Mizrachi E. Emerging role of protein kinase B/Akt signaling in pancreatic beta-cell mass and function. *Int. J. Biochem. Cell. Biol*; 38: 157–163, 2006.
- 152** Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev*; 13: 2905–2927, 1999.
- 153** Dann SG, Selvaraj A, Thomas G. mTOR complex1-S6K1 signaling: at the crossroads of obesity, diabetes and cancer. *Trends Mol. Med*; 13: 252–259, 2007.
- 154** Carpentier I, Coornaert B, Beyaert R: Function and Regulation of Tumor Necrosis Factor Receptor Type 2. *Current Medicinal Chemistry*; 11: 2205-2212, 2004.
- 155** Michael N. Sack, Derek M. Yellon. Insulin therapy as an adjunct to reperfusion after acute coronary ischemia: A Proposed direct myocardial cell survival effect independent of metabolic modulation. *Journal of the American College of Cardiology*; 41 (8): 1404-1407, 2003.
- 156** Zdychova, J, Komers R. Emerging role of Akt kinase/protein kinase B signaling in pathophysiology of diabetes and its complications. *Physiol. Res*; 54: 1-16, 2005.
- 157** Philipp SD, Downey JM, Cohen MV. Postconditioning must be initiated in less than 1 minute following reperfusion and is dependent on adenosine receptors and P13-kinase. *Circ*; 110: III-168, 2004.
- 158** Rees DA, Alcolado JC. Animal models of diabetes mellitus. *Diabetic medicine*; 22: 359-370, 2005.
- 159** Atkinson M, Leiter EH. The NOD mouse model of insulin dependent diabetes: As good as it gets? *Nat Med*; 5: 601–604, 1999.

-
- 160** Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). *Cancer Chemother Rep*; 29: 91-98, 1963.
- 161** Jablonski P, Howden BO, Rae DA, et al. An experimental model for assessment of renal recovery from warm ischemia. *Transplantation*; 35: 198-204, 1983.
- 162** Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bonsib SM, Castro MC, Cavallo T, Croker BP, Demetris AJ, Drachenberg CB, Fogo AB, Rayner DC, Roberts I, Rose S, Rush D, Salinas-Madrigal L, Salamon DR, Sund S, Taskinen E, Trpkov K, Yamaguchi Y: The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int*; 55: 713-23, 1999.
- 163** Thibault H, Piot C, Staat P. Long-term benefit of postconditioning. *Circ*; 117: 1037-1044, 2008.
- 164** Yang XM, Downey JM, Cohen MV. Postconditioning's protection is not dependent on circulating blood factors or cells but requires P13-kinase and guanylyl cyclase activation. *Circ*; 110: III-168, 2004.
- 165** Cserepes B, Jancsó G, Rácz B, Gasz B, Gaszner B, Kürthy M, Lantos J, Róth E. Cell protective role of urocortin against ischemia/reperfusion injury in the process of pre-and postconditioning on cultured cardiomyocytes. *Experimental and Clinical Cardiology* 11. (3) A8. 248, 2006.