

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

A vékonybél ischaemia-reperfusio okozta haemorheologiai és mikrokeringési változások vizsgálata kísérletes modellben

Dr. Mester Anita

Témavezető: Dr. Németh Norbert



**DEBRECENI EGYETEM
KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA**

Debrecen, 2018

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	4
1. BEVEZETÉS.....	5
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	7
2.1. A mesenterialis ischaemia	7
2.1.1. A mesenterialis ischaemia osztályozása.....	7
2.1.2. A vékonybél ischaemia etiológiája	8
2.1.3. Ischaemia-reperfusio okozta vékonybél károsodás mechanizmusai.....	10
2.1.3.1. A mesenterialis véráramlást befolyásoló tényezők.....	10
2.1.3.2. Az ischaemia-reperfusio patofiziológiája.....	11
2.1.3.3. A vékonybél ischaemia-reperfusió károsodásának következményei	13
2.1.4. Az intestinalis ischaemia-reperfusio kísérletes modelljei.....	13
2.2. Haemorheológiai és microcirculációs tényezők	15
2.2.1. Haemorheológiai paraméterek	15
2.2.1.1. Vörösvérsejt deformabilitás	15
2.2.1.2. Vörösvérsejt aggregatio	16
2.2.2. A micro-rheológiai paraméterek hatása a keringésre	16
2.3. A kor és a nem hatása a haemorheológiai paraméterekre és az ischaemia-reperfusió károsodásokra.....	18
3. CÉLKITŰZÉSEK.....	19
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	20
4.1. Korai micro-rheológiai és mikrokeringési eltérések mesenterialis ischaemia-reperfusio során	20
4.1.1. Kísérleti állatok és anaesthesia	20
4.1.2. Műtéti technika és vérvételi protokoll.....	20
4.1.3. Laboratóriumi vizsgálatok	21
4.1.3.1. Haematológiai paraméterek	21
4.1.3.2. Vörösvérsejt aggregatio	22
4.1.3.3. Vörösvérsejt deformabilitás	23
4.1.4. Mikrokeringési vizsgálatok.....	24
4.1.5. Szövettani vizsgálatok	26
4.1.6. Statisztikai analízis	26
4.2. Micro-rheológiai változások nemi különbségei és korfüggő eltérései vékonybél ischaemia-reperfusio során	27
4.2.1. Kísérleti állatok és anaesthesia	27
4.2.2. Kísérleti csoportok és műtéti protokoll	27
4.2.3. Laboratóriumi vizsgálatok	28
4.2.4. Szövettani vizsgálatok	28

4.2.5.	Statisztikai analízis	28
5.	EREDMÉNYEK.....	29
5.1.	Korai micro-rheológiai és mikrokeringési eltérések mesenterialis ischaemia-reperfusio során	29
5.1.1.	Haematológiai paraméterek	29
5.1.2.	Vörösvérsejt aggregatio	30
5.1.3.	Vörösvérsejt deformabilitás	31
5.1.4.	Hőmérséklet és mikrokeringés.....	32
5.1.5.	Makroszkópos változások és szövettan.....	34
5.2.	Micro-rheológiai változások nemi különbségei és korfüggő eltérései vékonybél ischaemia-reperfusio során	36
5.2.1.	Haematológiai paraméterek	36
5.2.2.	Vörösvérsejt deformabilitás	37
5.2.3.	Vörösvérsejt aggregatio	39
5.2.4.	Szövettani vizsgálatok	42
6.	MEGBESZÉLÉS.....	44
6.1.	Korai micro-rheológiai és mikrokeringési eltérések mesenterialis ischaemia-reperfusio során	44
6.2.	Micro-rheológiai változások nemi különbségei és korfüggő eltérései vékonybél ischaemia-reperfusio során	46
7.	FONTOSABB EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK ÖSSZEFOGLALÁSA	51
8.	Összefoglalás.....	52
9.	IRODALOMJEGYZÉK	54
9.1.	Hivatkozott közlemények jegyzéke	54
9.2.	Az értekezés alapjául szolgáló és egyéb <i>in extenso</i> közlemények hitelesített listája.....	63
10.	Tárgyszavak.....	65
11.	Köszönetnyilvánítás.....	66
12.	Függelék.....	67
	Az értekezés alapját képező <i>in extenso</i> közlemények másolatai.....	67

Rövidítések jegyzéke

BFU	blood flux unit
DAMP	veszély-asszociált antigénmintázat (damage-associated molecular pattern)
EI	elongációs index
Fvs	fehérvérsejt
Htc	haematocrit
I/R	ischaemia-reperfusio
MOF	többszervi elégtelenség (multi-organ failure)
NO	nitrogén-monoxid
NOMI	non-occlusiv mesenterialis ischaemia
NOS	nitrogén-monoxid szintáz
PAMP	mikrobiális antigénmintázat (pathogen-associated molecular pattern)
PVP	polyvinylpyrrolidon
ROS	reaktív oxigén származékok
SIRS	szisztémás gyulladásos válaszreakció (systemic inflammatory response syndrome)
SMA	arteria mesenterica superior (superior mesenteric artery)
SS	nyírófeszültség (shear stress)
Thr	thrombocyta
TLR	toll-like receptor
Vvs	vörösvérsejt

*„Az ember hivatása, hogy
megismerje az igazságot,
szeresse a szépet,
kívánja a jót,
és cselekedje a legjobbat.”*
(Ludwig van Beethoven)

1. BEVEZETÉS

Az akut mesenterialis ischaemia egy életveszélyes sürgősségi kórkép, amely akut has formájában jelentkezik. Habár a gasztrointestinalis betegségek mindössze 1-2%-áért felelős, jelentőségét mégis az adja, hogy mortalitása ma is kiemelkedően nagy, eléri a 60-80%-ot.¹ Ennek oka egyrészt, hogy a korai diagnosztikai markerek hiánya miatt a kórkép továbbra is kihívást jelent a klinikusok számára, melynek következtében gyakran késik a diagnózis felállítása.² Másrészt, a preventív és terápiás lehetőségek csekély volta, illetve a nem minden részletében tisztázott patofiziológia is hozzájárul a magas halálozási arányhoz.

Az ischaemia-reperfusio során zajló történésekről rengeteg információ gyűlt össze napjainkra. Az ischaemia alatt a sejtekben kialakuló energiahány metabolikus változásokhoz vezet, majd a vérkeringés visszatérése során reaktív szabadgyökök képződnek, amely nagyobb szövetkárosodást okozhat, mint az oxigénhiányos állapot önmagában. A reperfusio káros hatása elsősorban a microvasculatura területét érinti, mikrokeringési zavar alakul ki az adott szövetben, szervben. A jó microcirculatio fenntartásában az erek megfelelő állapota mellett elengedhetetlen a vér optimális áramlási tulajdonságainak megléte, ezért kóros körülmények között a vörösvérsejtek rheológiai jellemzőinek kiemelkedő szerep jut.³

Nem elhanyagolható jelentőségű tény, hogy a népesség öregedésével és az idős betegek arányának növekedésével a mesenterialis ischaemia előfordulása is várhatóan emelkedni fog. Az idősebb betegek esetén azonban a halálozás szignifikánsan magasabb, így a mortalitás csökkenésére sem számíthatunk a jövőben.^{4,5}

Fontos megjegyezni, hogy a cardiovascularis rizikó férfiakban magasabb, mint a nőkben.⁶ Ennek hátterében feltételezhető egyrészt az ösztrogének protektív hatása, másrészt az, hogy a nők kedvezőbb haemorheológiai tulajdonságokkal rendelkeznek.⁷

A nagymennyiségű tudásanyag és a jelenleg is folyamatban lévő kutatások ellenére számos kérdés továbbra is tisztázatlan. A haemorheológiai paraméterek *in vivo* változásának jelentősége a kórfolyamatokban, illetve hogy ezek az eltérések mikor érnek el olyan mértéket,

amely már thromboticus szövődmények kialakulásához vezet, továbbra is kérdéses. A prevenció és terápiás lehetőségek vizsgálata továbbra is szükséges, mivel a haemorheológiai terápia nem elterjedt a gyakorlatban, habár a véráramlási tényezők figyelmen kívül hagyása az orvosi gyakorlatban korszerűtlen szemléletet tükröz.⁸

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A mesenterialis ischaemia

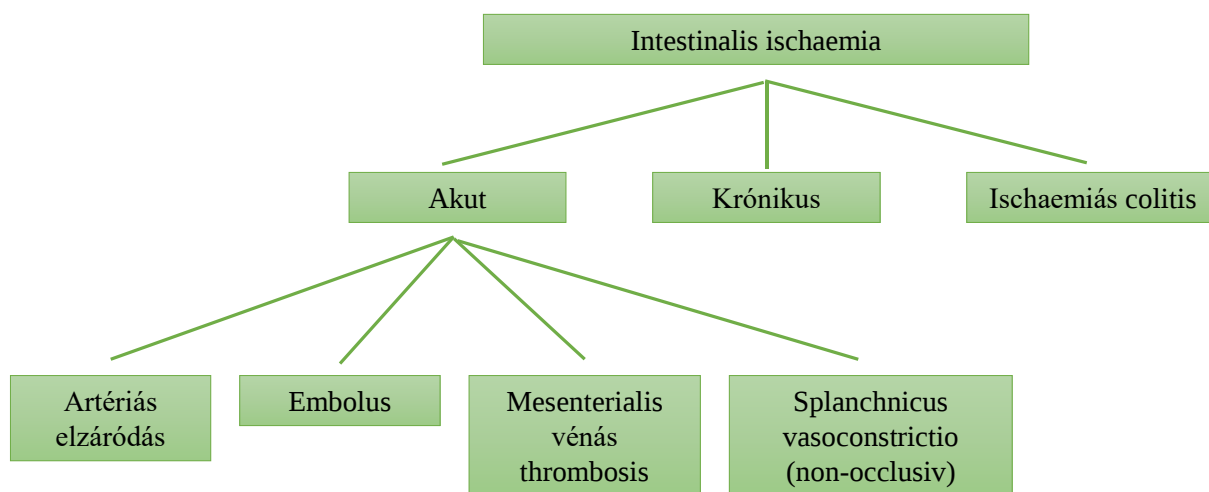
2.1.1. A mesenterialis ischaemia osztályozása

A bél ischaemia nevezetektana nem egységes. Az egyik lehetséges osztályozási szempont az érelzáródás mechanizmusa, mely szerint megkülönböztetünk occlusiv és non-occlusiv intestinalis ischaemiát. Másfajta osztályozások a betegség patogenezisét veszik figyelembe, eltekintve a folyamat akut vagy krónikus jellegétől.^{9,10}

I. táblázat Az intestinalis ischaemia osztályozása az érelzáródás mechanizmusa szerint ¹¹

1. Occlusiv intestinalis ischaemia
a. Artériás elzáródás (thrombus/embolus)
- Akut
- Krónikus
b. Ischaemiás colitis
c. Vénás elzáródás
2. Non-occlusiv intestinalis ischaemia

Az Amerikai Gastroenterológiai Társaság (AGT) saját osztályozása a klinikai tünetekre fókuszál, három fő kategóriát kialakítva: akut mesenterialis ischaemia, krónikus mesenterialis ischaemia vagy intestinalis angina, illetve vastagbél ischaemia, más néven ischaemiás colitis.



1. ábra Az intestinalis ischaemia osztályozása az Amerikai Gastroenterológiai Társaság ajánlása alapján ¹²

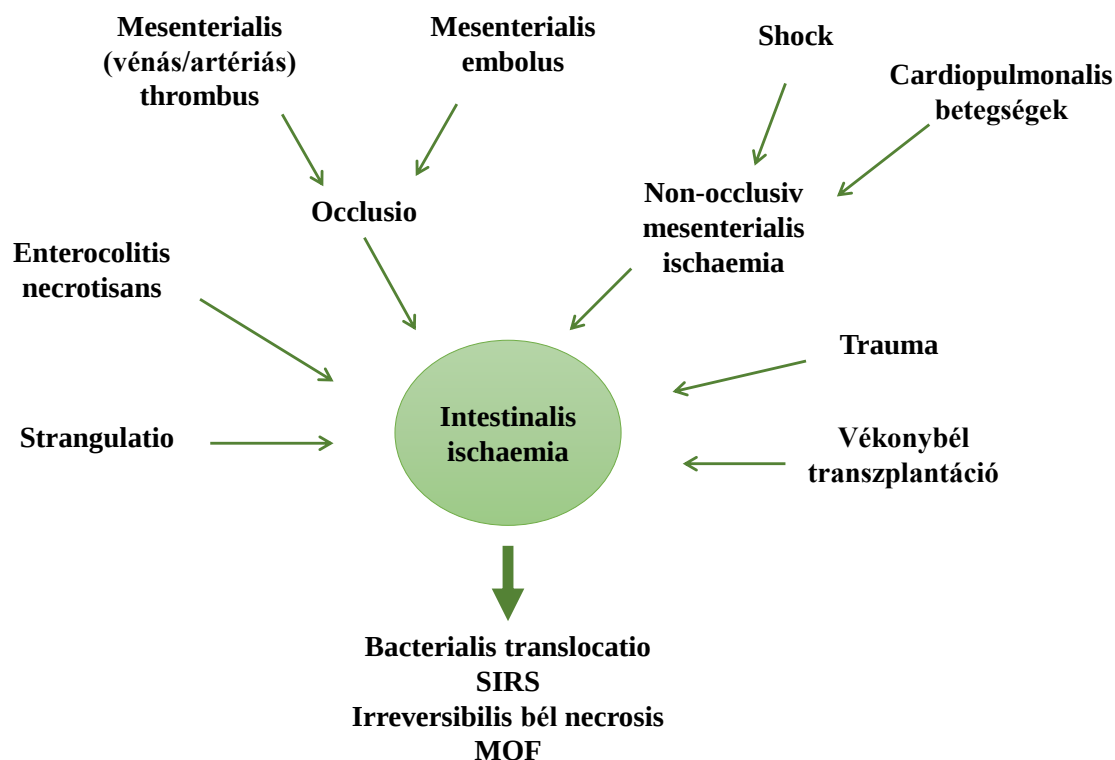
Az AGT klasszifikáció szerint az akut mesenterialis ischaemiának számos kategóriája van, többek között az artériás thromboembolia, vénás thrombosis és a splanchnikus vasoconstrictio (más néven non-occlusiv mesenterialis ischaemia [NOMI]).¹³

2.1.2. A vékonybél ischaemia etiológiája

A vékonybél ischaemia bármely életkorban és sokféle okból kialakulhat, súlyos, gyakran fatális következményekkel járhat.

Az akut mesenterialis ischaemia leggyakoribb oka az artériás embolia, ami a legtöbb esetben cardialis eredetű.¹⁴ Rizikótényezőt jelent a megelőző szívinfarktus, szívritmuszavar, cardiomyopathiák, kamrai aneurysmák, billentyű betegségek, melyek thrombus kialakulásához vezethetnek. A zsigeri embolusok leggyakrabban az arteria mesenterica superiorra érintik, mivel ez az ér kisebb szögben ered az aortából, mint a truncus coeliacus vagy az arteria mesenterica inferior. Az embolus általában az arteria mesenterica superior eredésétől néhány centiméterre ékelődik be, megkímélve ezáltal a duodenumot és a colon transversumot a necrosistól. Az embolia okozta mesenterialis ischaemia miatt jelentkező betegeknél a panaszok általában hirtelen kezdődnek, súlyos hasi fájdalom és véres hasmenés formájában, habár a fizikális vizsgálat során gyakran minimális jeleket találunk. Ezeknél a betegeknél a mesenterialis ischaemia lehetőségének gondolata mindenképpen fel kell, hogy merüljön, főként azoknál a pácienseknél, akik valamilyen rizikófaktorral rendelkeznek.¹⁵

Akut artériás mesenterialis thrombosis általában atherosclerosis talaján alakul ki, legtöbbször az arteria mesenterica superior eredéséhez közel. Ebben az esetben az ischaemia általában nagyobb kiterjedésű, mint embolisatio során, a necrosis a duodenumtól a colon transversumig terjedhet. Az akut artériás thrombosis kialakulását megelőzően a betegeknél gyakran hosszú ideje fennálló krónikus mesenterialis thrombosis nem specifikus tünetei figyelhetők meg (például postprandialis hasi fájdalom, ételundor, hasmenés, fogyás),¹⁶ mivel a lassan kialakuló atherosclerosis lehetővé teszi, hogy a kollaterális keringés kompenzálja a csökkent zsigeri perfúziót.¹⁷



2. ábra A vékonybél ischaemiás károsodásának lehetséges okai. (SIRS: szisztémás gyulladásos válaszreakció; MOF: többszervi elégtelenség) ¹⁸

Mesenterialis vénás thrombosis ritkábban fordul elő, mint artériás. Számos tényező hozzájárulhat a kialakulásához, melyeket három fő kategóriába lehet osztani: direkt károsodás (hasi trauma, műtét utáni állapot, pancreatitis, peritonitis), lokális vénás congestio vagy stasis (portalis hypertensio, elhízás, terhesség), thrombophilia (protein C és S hiány, antithrombin III hiány, Leiden mutáció). A thrombus kialakulásának sebességétől függően megkülönböztetünk akut és krónikus mesenterialis vénás thrombosit, ami a mortalitás egyik meghatározó tényezője a thrombosis kiterjedtsége mellett. ¹⁹

Mesenterialis ischaemia kialakulhat érelzáródás nélkül is. A hypovolaemiával, hypotensióval, csökkent pumpafunkcióval járó állapotok, illetve bizonyos gyógyszerek (digitálisz származékok, vazopresszorok) splanchnicus vasoconstrictiót okozhatnak, melynek következtében intestinalis hypoxia és necrosis jön létre. Ez a kórkép leginkább az idős, illetve az intenzív osztályokon kezelt betegeket érinti. ²⁰

A vérátáramlás csökkenése továbbá súlyos hasi distenzióval vagy strangulatióval (volvulus, intussusceptio, hernia) járó kórképekben is előfordulhat. ¹⁸ Ezen kívül az újszülött korban jellemző enterocolitis necrotisans kialakulásában is szerepet tulajdonítanak az ischaemiás károsodásnak. ²¹ Végül, a vékonybél transzplantáció során is elkerülhetetlen az ischaemiás időszak létrejötte. ²²

2.1.3. Ischaemia-reperfusio okozta vékonybél károsodás mechanizmusai

2.1.3.1. A mesenterialis véráramlást befolyásoló tényezők

A bélrendszer a nyugalmi percvolumen 25 %-át, míg a postprandialis percvolumen 35 %-át kapja. A mesenterialis véráramlás 70 % -a a mucosa és submucosa felé irányul, a maradék a muscularis és serosa rétegeket látja el.²³ Az intestinalis keringést a szisztémás vérnyomáson kívül helyi tényezők is szabályozzák. Az oxigén kínálat és szükséglet közötti aránytalanság következtében a helyi metabolitok koncentrációja megemelkedik, melynek hatására vasodilatatio alakul ki. A perfúziós nyomás hirtelen esésekor az arteriolák falában csökken a nyomás, ezáltal fenntartva a splanchnicus véráramlást. Számos intrinsic és extrinsic humoralis faktor is befolyásolja a mesenterialis keringést, vasodilatációt (pl. acetilkolin, hisztamin) vagy vasoconstrictiót (pl. adrenalin, noradrenalin) okozva. Az extrinsic neurális tényezők α - és β -adrenerg receptorokon keresztül indukálják a vérátáramlás csökkenését illetve növekedését.¹¹

Mivel az intestinalis vérátáramlás széles skálán változik, ahhoz, hogy a bélrendszer fenntartson egy konstans oxigénszintet, kompenzatórikus mechanizmusokra van szükség. Hypoperfusio során, a normális mesenterialis vérkeringés megtartásának érdekében, fokozódik a sejtek oxigénfelvétele, másrészt ilyenkor több kapilláris nyílik meg (ahhoz képest, hogy éhezési időszakban a mesenterialis kapillárisoknak csak mintegy 20-25%-a nyitott és járul hozzá az oxigénfelvételhez).^{24,25} Ha a mesenterialis vérátáramlás azonban 30 ml/min/100 g szövet alá csökken,²⁶ vagy ha a szisztémás vérnyomás 40-70 Hgmm alá esik,²⁴ az oxigénfelvétel áramlásfüggővé válik, ami a megfelelő oxigén utánpótlás hiányában ischaemiához vezet.

A vékonybél vérellátása egy speciális felépítésű érhálózaton keresztül valósul meg. Az a. mesenterica superior ágakat ad le, amelyek egymással anasztomizálva árkádokat képeznek. Az erek a bél serosai felszínét a mesenterialis szél felől érik el. A bélbolyhok tengelyében fut egy arteriola a boholy csúcsa felé, ami gazdagon elágazódik és a hám alatt kapillárishálózatot alkot. A bolyhot általában egy vagy két véna drenálja, amelyek egy nagyobb venulába futnak.²³ Mivel az erek párhuzamosan és egymástól mindössze 15-20 μ m-re helyezkednek el, ez lehetővé teszi az ellenáramlás kialakulását: a bolyhok bázisán az arteriolából az oxigén egy része a vénába diffundál anélkül, hogy elérné a boholy csúcsi részét. Hypoperfusio során ez a folyamat még kifejezettebbé válik és súlyosbítja az I/R károsodásokat. A boholy csúcsán lévő sejtek az I/R okozta sérüléseknek egyébként nagyobb mértékben vannak kitéve, mivel jobban érik őket a mechanikai erők a lumen felől.²⁷

2.1.3.2. Az ischaemia-reperfusio patofiziológiája

Ischaemia során romlik a szövetek vérátáramlása, amely számos kompenzációs folyamatot indít el a sejtekben. Az alacsony oxigén kínálat következtében csökken az adenosin-trifoszfát (ATP) termelés a mitokondriumokban. A sejtek anaerob anyagcserefolyamatokon keresztül kezdenek energiát termelni (glikolízis), amely eredményeképpen fokozódik a laktát és H^+ ion termelés és csökken az intracelluláris pH.²⁸ A sejtmembránban lévő ATP-függő ioncsatornák működése ezáltal megváltozik, így kalcium (Ca), nátrium és víz lép be a sejtekbe, sejtduzzadást okozva. Továbbá, az emelkedett Ca^{2+} koncentráció következménye, hogy aktiválódik egy Ca-függő proteáz, amely a xantin-dehidrogenáz enzimet xantin-oxidázzá alakítja. Ischaemia során az ATP defoszforilálódik, és végül hipoxantinná katabolizálódik, amit fiziológiás körülmények között a xantin-dehidrogenáz xantinná oxidál. Hypoxiás körülmények között azonban a xantin-oxidáz reakcióba lép a nagy mennyiségben jelen lévő hipoxantinnal, valamint a reperfusio során újra megjelenő oxigénnel, szabadgyök (szuperoxid anion $[O_2^-]$, hidrogén peroxid $[H_2O_2]$) termelődést indukálva.

A reaktív oxigén gyökök (ROS: reactive oxygen species) párosítatlan elektront tartalmaznak, rövid élettartamúak és rendkívül reaktívak. A különböző biológiai struktúrák direkt károsításán (pl. lipidperoxidáció) túl, a ROS fokozzák a fehérvérsejtek aktiválódását, chemotaxisát a foszfolipáz A_2 aktiválása révén, illetve stimulálják a leukocita adhesiót különböző transzkripciós faktorok (pl. NF- κ B) aktiválásán keresztül.²⁹⁻³¹ Élettani körülmények között a szervezetben működő védekező rendszerek (pl. szuperoxid-dizmutáz, kataláz, glutation-peroxidáz) a keletkező szabadgyököket semlegesítenék, azonban a reperfusio során ezek a mechanizmusok kimerülnek.^{32,33} A szuperoxid anion kevésbé reakcióképes szabadgyök, azonban részt vehet további szabadgyökök képződésében, mint a hidrogén peroxid és a rendkívül reaktív hidroxil szabadgyök ($OH^\bullet$). Ez a folyamat kis sebességgel megy végbe, viszont fémionok jelenlétében (pl. vas, réz) spontán is bekövetkezhet. A hipoxantin-xantin útvonalon kívül a szabadgyökök további potenciális forrásai lehetnek a nitrogén-monoxid szintáz (NOS), az aktivált fehérvérsejtek és a mitokondriális elektrontranszport rendszer.³⁴

A nitrogén-monoxid szintáznak három izoformája ismert, melyből kettő konstitutív és Ca^{2+} /calmodulin-függő (cNOS), egy pedig indukálható (iNOS). Normális körülmények között a NOS oxigénből és L-argininből szintetizál nitrogén-monoxidot. Az ischaemia első néhány percében megemelkedik a Ca szint, melynek következménye a NOS aktiválódása, ami az L-arginin koncentrációjának csökkenéséhez vezet. Alacsony L-arginin szint esetén a NOS a nitrogén-monoxid helyett szuperoxid aniont termel, amely a nitrogén-monoxiddal reakcióba

lépve peroxinitritet állít elő, ami egy potens oxidáns. Ez a nitrogén-monoxid szint csökkenéséhez vezet, melynek eredményeképpen előnyös hatásait sem tudja kifejteni, mint a vasodilatatio illetve a thrombocytá aggregatio és adhesio gátlás.³⁵

Az aktivált fehérvérsejtek kölcsönhatásba lépnek a vascularis endotheliummal, melynek első lépése az úgynevezett „rolling”, ami az ischaemia-reperfusio indukálta fokozott endothelialis P-selectin expressziónak köszönhető. Ezt követően jön létre a leukocyták kitapadása és kivándorlása az interstitiumba különböző adhesiós molekulák segítségével. Az extravascularis teret elérve a fehérvérsejtek, főleg neutrophil granulocyták, számos módon okozhatnak szövetkárosodást: ROS és proteolitikus enzimek kibocsátása következtében romlik a mikrokeringés, nő a microvascularis permeabilitás, oedema, thrombosis, sejthalál alakul ki.^{28,36}

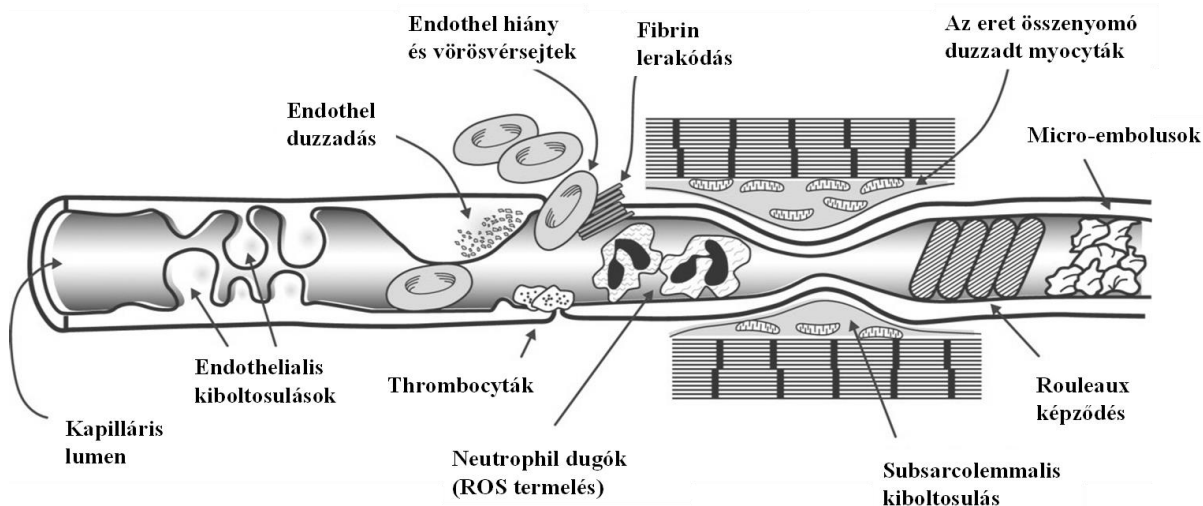
A szövetkárosodással járó folyamatok a veleszületett immunitás részét képező toll-like receptorok (TLR) aktiválódását is előidézik. Ezek a receptorok mikrobiális antigénmintázatokat ismernek fel (PAMP), melynek következtében olyan jelátviteli utak aktiválódnak, amelyek fokozzák a proinflammatorikus citokinek termelődését. Azonban a toll-like receptorokat nem csak exogen, hanem endogen, leginkább a szövetek károsodása (például ischaemia-reperfusio) során megjelenő molekulák is aktiválhatják, ezek az úgynevezett veszély-asszociált molekuláris mintázatok (DAMP).³⁷

Az ischaemia-reperfusio a komplement rendszer aktiválódását is eredményezi, ami fokozza a proinflammatorikus molekulák szintézisét (pl. tumor necrosis factor α , interleukin-1, interleukin-6), elősegíti a fehérvérsejtek aktivációját, illetve befolyásolja a véráramlást az erek vasodilatációjának gátlásán keresztül. Az ischaemia-reperfusio ezen felül növeli a vasoconstrictiót okozó thromboxán A_2 és endothelin termelődését, párhuzamosan a vasodilatator hatású prosztaglandinok (PGI_2 , PGE_1) szintézisének gátlásával.³⁸

Az I/R-indukálta endothel sejt károsodás fokozza a thrombocytá aggregációt, az procoagulans aktivitást és a fibrinolysis gátlását, ami még tovább veszélyezteti a mikrokeringést és necrosis kialakulásával fenyeget.³⁹⁻⁴¹ Az endothel sejtek aktiválódása a thrombocyták kitapadásán és ezáltal a microvascularis perfusio csökkentésén kívül, hozzájárul a fehérvérsejtek „toborzásához” és a gyulladásos folyamatok kifejlődéséhez.⁴²

A reperfusio által okozott károsodások súlyosabbak lehetnek, mint az ischaemia által okozott sérülés önmagában.⁴³ Ennek oka két folyamat lehet, egyrészt az úgynevezett „reflow paradox”, ami a reoxigenizációval kapcsolatos eseményekre utal, másrészt pedig a „no-reflow” jelenség, azaz a véráramlás visszatérésének hiánya,²³ ami különböző funkcionális és mechanikai változásokra vezethető vissza (3. ábra).⁴⁴ Ezen történések hátterében számos

patofiziológiai mechanizmust feltételeznek, melyek közül kiemelhető a NO és szuperoxid gyökök szerepe, az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció emelkedése, illetve a vasodilatator és vasoconstrictor mediátorok egyensúlyának felborulása.^{34,45}



3. ábra A „no-reflow” jelenség kialakulásában részt vevő folyamatokat összefoglaló sematikus ábra Reffermann és Kloner ábrája alapján⁴⁴ (ROS: reaktív oxigén származékok)

2.1.3.3. A vékonybél ischaemia-reperfüsiós károsodásának következményei

A vékonybél ischaemia és az azt követő reperfüsió következtében helyi és szisztémás károsodás is létrejöhet, amelynek oka a különböző sejtek (fehérvérsejtek, thrombocyták, endothel sejtek) aktiválódása folytán kialakuló mikrokeringés romlás.^{11,46} A microcirculatio sérülése lokális szöveti necrosishoz vezet, melynek következtében a vékonybél nem tudja ellátni funkcióját, ami a tápanyagok elégtelen felszívódását eredményezi.⁴⁷ A folyamat során károsodik a vékonybél mucosa, elveszti barrier funkcióját, ezáltal a jelenlévő bélbaktériumok kijuthatnak extraintestinalis szövetekbe, pl. a mesenterialis nyirokcsomókba, a lépbe, a májba és a vérbe.^{48,49} A bacterialis translocatióknak szerepe lehet a szisztémás gyulladásos válaszreakció (SIRS) és a többszervi károsodás (MOF) kialakulásában. Intestinalis I/R után gyakran megfigyelhető távoli szervek, főként a máj, a vese és a tüdő érintettsége is.^{50,51} Ennek hátterében egyrészt a vérkeringésbe kerülő baktériumok és toxinok, másrészt a felszabaduló nagy mennyiségű szabadgyökök, gyulladásos mediátor és sejt feltételezhető.^{36,52,53}

2.1.4. Az intestinalis ischaemia-reperfüsió kísérletes modelljei

Az állatkísérletek nélkülözhetetlenek az ischaemia-reperfüsiós károsodások mechanizmusának tanulmányozásában. Mindegyik modellnek megvannak az előnyei és hátrányai, de egyik sem képes tökéletesen utánozni a humán betegség kialakulását és lefolyását.

A modelleket három nagy csoportba lehet sorolni: teljes vascularis occlusio, segmentalis occlusio és úgynevezett „low-flow” típusú ischaemia.¹⁸

A teljes érelzáródást ki lehet alakítani ideiglenesen vagy véglegesen, az a. mesenterica superior (SMA) leszorítása révén atraumatikus klip vagy ligatura segítségével, ami manapság a leggyakrabban használt módszer. Az SMA leszorítása kombinálható a kollaterális erek lekötésével, ami nagyobb mértékű ischaemiát, illetve nagyobb és egyenletes szintű mortalitást eredményez.⁵⁴ Egy másik lehetőség az SMA elzárására az embolizáció, aminek előnye, hogy a belek manipulálása (ami önmagában is okozhat gyulladást és a klinikai esetek során sincs jelen) nélkül lehet létrehozni az ischaemiát.¹⁸

Segmentalis vascularis occlusio esetén egy egyedi bélkacs vérellátását szüntetik meg. Ezzel a módszerrel egy állaton belül több ilyen szegment is kialakítható, különböző hosszúságú ischaemiát hozva létre, reperfúsióval vagy anélkül. Ennek a technikának az érdekessége, hogy alkalmazható emberekben is, bizonyos típusú műtétek (pl. Roux-Y kacs) végrehajtása során.^{55,56}

A „low-flow” módszer a non-occlusiv mesenterialis ischaemiát modellezi, és általában egy állítható vascularis klipet használnak, amelynek segítségével az SMA-ban csökkenthető a vérnyomás.¹⁸

Az I/R ideje eltérő hosszúságú lehet. Kimutatták, hogy a reperfúziós károsodás mértéke függ a megelőző ischaemia időtartamától: csak 30-60 perc közötti mesenterialis ischaemiát követően alakul ki reperfúziós sérülés. Lényeges szempont továbbá az is, hogy a különböző bélszakaszok I/R károsodással szembeni ellenállása sem egyforma, aborális irányba haladva egyre fokozódik.^{57,58}

Az állatfaj kiválasztása is hozzájárulhat a végeredmény kialakulásához, mivel élettani és anatómiai különbségek léteznek a különböző fajok között. Emberekben és sertésekben a villusok érszerkezete nagyon hasonló, míg patkányokban kissé eltér a humánhoz képest.^{59,60} Egy másik fontos eltérés, hogy macskákban és patkányokban erőteljes I/R károsodás figyelhető meg, ami a nagy mennyiségű mucosalis xantin-oxidáznak köszönhető, emberekben és sertésekben viszont ez nem jellemző.⁶¹ Jelentős különbség még a mucosában található rezidens neutrophil granulocyták szerepe, ugyanis ezek számottevő funkciót látnak el macskákban és rágcsálókban kialakuló I/R károsodások létrejöttében, viszont emberekben a rezidens neutrophilek száma relatíve alacsony, ahogy sertésekben is.⁶² A rágcsálók nagy előnye viszont, hogy viszonylag alacsony a költségük, egyszerű a tartásuk és gyors a szaporodásuk, így manapság ezek a leggyakrabban használt kísérleti állatok az I/R kutatásokban.¹⁸

2.2. Haemorheologiai és microcirculációs tényezők

A rheologia különböző anyagok erőhatásra bekövetkező deformálódásával, folyási tulajdonságaival foglalkozó tudományág, melynek egy speciális része a haemorheologia, azaz a vér áramlástanával foglalkozó diszciplína.⁶³ A vér rheologiai jellemzőinek alapvető szerepe van a szöveti mikrokeringés meghatározásában.^{64,65}

2.2.1. Haemorheologiai paraméterek

A fő rheologiai paramétert, a teljes vér viszkozitást, számos tényező befolyásolja, mint a plazma viszkozitás, a haematocrit, illetve a vörösvérsejt micro-rheologiai jellemzői, az aggregatio és a deformabilitás.⁶⁶

II. táblázat A vér viszkozitását meghatározó paraméterek és az azokat befolyásoló tényezők⁶³

Paraméter	Befolyásoló tényezők
Plazma viszkozitás	Víz Nagymolekulájú anyagok (fibrinogén, globulin frakciók) Lipidfrakciók (trigliceridek)
Haematocrit	Vörösvérsejtszám Átlagos vörösvérsejt térfogat
Vörösvérsejt deformabilitás	Sejtmembrán saját viszkozitása Vörösvérsejt belső viszkozitása Felület-térfogat arány Alaki tulajdonságok Nyírófeszültség
Vörösvérsejt aggregatio	Nagyméretű, elágazó molekulák (főként fibrinogén) Vörösvérsejt felszíni sajátságai (glycocalyx összetétele) Vörösvérsejt alaki és mechanikus jellemzői Sebességgradiens

2.2.1.1. Vörösvérsejt deformabilitás

A vörösvérsejt deformabilitás a sejtek azon passzív képessége, hogy nyíróerő hatására képesek alakjukat változtatni.⁶⁷ A vörösvérsejteknek ez a tulajdonsága elengedhetetlen a kapillárisokon való átjutáshoz. A deformabilitás egyik meghatározója a sejtmembrán és az alatta elhelyezkedő cytoskeleton, ami egy fehérjéből álló komplex hálózat, melyek közül a legfontosabb alkotóelem a spectrin. Ennek a struktúrájának fontos szerepe van a vörösvérsejtek bikonkáv alakjának fenntartásában.⁶⁸ A bikonkáv, discoid alak lehetővé teszi a sejt alakváltoztatását anélkül, hogy a membrán felszíni területe növekedne. A felszín-térfogat arányt a sejt hidratáltsági állapota is befolyásolja. A vörösvérsejtek belső viszkozitása, vagyis

a haemoglobin koncentráció, szintén hozzájárul az alakváltoztatási képességhez. A vörösvérsejtek akár duzzadnak (a térfogatuk nő, de a felszín nem változik) akár zsugorodnak (a belső haemoglobin tartalom emelkedik), az a deformabilitás romlásához fog vezetni.⁶⁶

2.2.1.2. Vörösvérsejt aggregatio

Az aggregatio egy reverzibilis folyamat, melynek során a vörösvérsejtek összekapcsolódnak, és nagy, linearis aggregatumokat alkotnak, melyeket gyakran neveznek „rouleaux”-nak (pénztekercs képződés). Ezeket a képződményeket különböző erők könnyen szétválasztják, de ugyanilyen gyorsan újra össze is állnak, mikor a disaggregáló erők megszűnnek.⁶⁹

Az erythrocyta aggregatiót elsősorban az aggregabilitás (azaz a vörösvérsejt aggregatiót befolyásoló belső tulajdonságai) és az elongált térszerkezetű fehérjék (elsősorban a fibrinogén) plazmakoncentrációja határozzák meg.⁷⁰

Az aggregatio az aggregatiót elősegítő és a disaggregáló erők (elektosztatikus repulsio, membrán rigiditása, nyírófeszültség) egyensúlyának eredményeként jön létre. Jelenleg két modell létezik a vörösvérsejt aggregatio magyarázatára. Az egyik, az úgynevezett „bridging” teória, amely szerint az aggregatio akkor alakul ki, amikor a disaggregáló erők nagyságát meghaladja a sejt felszínéhez kötődő makromolekulák által létrehozott összeköttetés.⁷¹ A másik, az úgynevezett depletiós modell, azt feltételezi, hogy a sejtfelszínhez közel, a környező mediumhoz viszonyítva, egy fehérjékben szegény zóna alakul ki, ami ozmotikus gradiens kialakulásához vezet és a sejtek közötti kölcsönhatás létrejöttét eredményezi.⁷²

2.2.2. A micro-rheologiai paraméterek hatása a keringésre

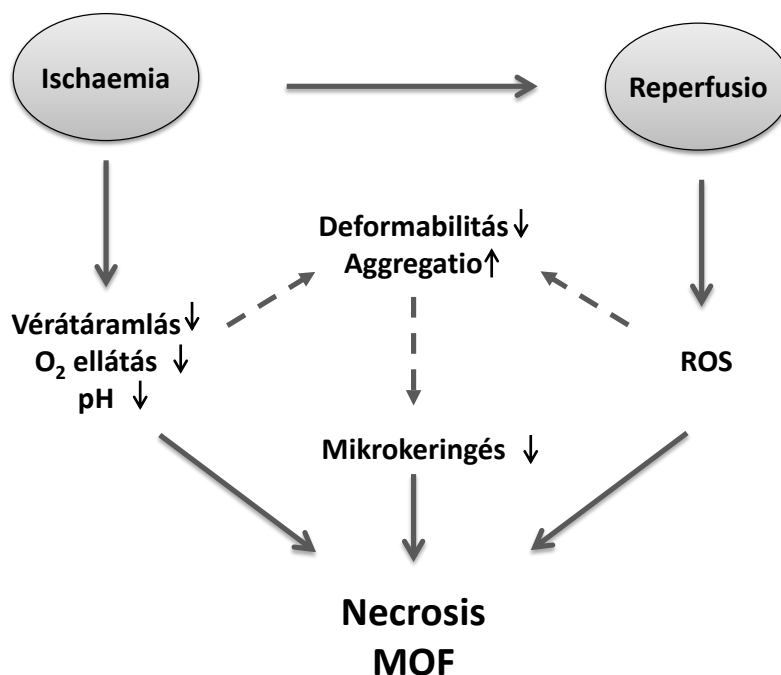
A vörösvérsejtek, a fent részletezett egyedülálló tulajdonságok miatt, meghatározó szerepet játszanak a keringésben. Az erythrocyták élettani körülmények között hozzájárulnak a megfelelő vérátáramláshoz és szöveti perfúzióhoz, azonban bizonyos kórképekben (pl. trauma, ischaemia, gyulladás, diabetes stb.) megváltozik a normális funkciójuk, és hemodinamikai problémák kialakulását okozhatják (4. ábra).

A keringés rheologiai megközelítésben három szakaszra osztható. A 300 μm -nél nagyobb átmérőjű erekben a vérsejtek egymástól függetlenül áramlanak és az áramlás a klasszikus hemodinamikai törvényekkel (Poiseuille-törvény) jól jellemezhető. Az átmeneti zónában, ahol az érátmérő 300 és 8 μm között van, a vörösvérsejtek axiális migrációja figyelhető meg: az

érpálya tengelye mentén magasabb haematocrit és áramlási sebesség, míg az érfal mellett egy sejtszegény zóna (Poiseuille-zóna) és alacsonyabb áramlási sebesség alakul ki, ami az érpályán belül a haematocrit dinamikus redukciójához vezet (Fåhræus-effektus).⁷³ Ezen felül a 40-10 μm átmérőjű területen jellemző, hogy a vérviszkozitás az érátmérővel csökken (Fåhræus-Lindquist-effektus).⁷⁴ Az egyenkénti áramlás szakaszáról a 8 μm és alatti átmérőjű erek esetén beszélhetünk, ahol különös jelentősége van a vörösvérsejtek alakváltozási képességének. A jó deformabilitás azonban nemcsak a kapillárisokon való átjutáshoz, hanem a nagy erekben is szükséges a megfelelő áramláshoz, mivel a nyíróerők hatására elnyúló vörösvérsejtek így csökkentik a vér viszkozitását.⁷⁵

A patológiás, oxidált vörösvérsejteknek romlik a deformabilitásuk, és fokozódik az aggregációs készségük, ami emelkedett vérviszkozitáshoz és áramlási ellenálláshoz, illetve következményes áramlási sebesség csökkenéshez vezet. A fokozott aggregabilitás elősegíti továbbá az érfal menti sejtszegény zóna kiszélesedését is, ami csökkentheti az O_2 diffúziót.⁷⁶ Ezen kívül a vörösvérsejt aggregatio más sejtek funkcióját is befolyásolhatja, pl. elősegíti az endothel sejtek aktivációját, illetve a thrombocyták és a fehérvérsejtek érfalhoz történő kitapadását.⁷⁷

Ezek a folyamatok akár kisebb erek elzáródását és ischaemia kialakulását is okozhatják, ami viszont a micro-rheológiai paraméterek további romlását idézi elő és így egy öngerjesztő, „ördögi kör” kialakulásához vezethetnek.⁷⁸



4. ábra Az ischaemia-reperfúziós károsodás mechanizmusai. A micro-rheológiai paraméterek romlása a mikrokeringés gyengüléséhez, lokális és távoli szervi károsodáshoz vezethet. (ROS: reaktív oxigén származékok; MOF: többszervi elégtelenség)

2.3. A kor és a nem hatása a haemorheologiai paraméterekre és az ischaemia-reperfúziós károsodásokra

Az öregedés az ischaemiás rendellenességek – stroke, ischaemiás szívbetegség, mesenterialis ischaemia és számos sebészeti beavatkozás – egyik fő rizikófaktor, illetve az I/R károsodások gyakrabban is fordulnak elő az idősebb populációban. A „szabadgyök teória” szerint az öregedés részben az oxidatív stressz által okozott károsodásoknak köszönhető.⁷⁹ Az öregedés továbbá a haemorheologiai paraméterek romlásával is összefügg, idősebb korban fokozódik a vér és plazma viszkozitás, a vörösvérsejt aggregatio és csökken a vörösvérsejt deformabilitás.^{80,81}

Egyre több irodalmi adat támasztja alá, hogy a haemorheologiai paraméterek különböznek nőkben és férfiakban. Nőkben alacsonyabb a vérviszkozitás, a haematocrit, a vörösvérsejt aggregatio, illetve jobb a deformabilitás a férfiakhoz viszonyítva.⁸² Kimutatták továbbá, hogy a vörösvérsejtek korbeli eloszlása is szignifikánsan eltérő nőkben és férfiakban: a nők vére sokkal több „fiatal” vörösvérsejtet tartalmaz, mint a férfiaké. Az „idős” erythrocyták a „fiatalabbakhoz” képest rigidebbek, nagyobb a mechanikai fragilitásuk és az aggregabilitásuk.⁶ A vér ezen tulajdonságai hozzájárulhatnak ahhoz, hogy a férfiakban magasabb a cardiovascularis betegségek kialakulásának rizikója.

Az ösztrogén protektív hatását I/R károsodásokkal szemben (pl. szívben, agyban és végtagokban) már számos tanulmányban kimutatták. Ennek a hatásnak a hátterében komplex mechanizmusok állnak: az ösztrogének részt vesznek géntranszkripciós folyamatokban, az intracellularis jelátvitelben, illetve a vasoregulációban, emellett anti-inflammatorikus és anti-oxidáns hatásuk is van.^{7,83,84} Ugyanakkor, néhány tanulmány felvetette, hogy az ösztrogén terápia fokozza a cardiovascularis események incidenciáját nőkben.⁸⁵ Ez az ellentmondás is rávilágít a terület további vizsgálatának a fontosságára.

3. CÉLKITŰZÉSEK

1. Patkányban 30 perces vékonybél ischaemia, illetve az ezt követő 120 perces reperfusio szisztémás haematologiai és micro-rheologiai paraméterekre kifejtett, valamint lokális microcirculációs hatásainak szimultán vizsgálata.
2. Patkányban 30 perc időtartamú intestinalis ischaemia és 120 perc hosszúságú reperfusio távoli szervekre kifejtett hatásának elemzése mikrokeringési és szövettani vizsgálatok segítségével.
3. A 30 perces vékonybél ischaemia és 120 perces reperfusio haematologiai és micro-rheologiai eltéréseinek összehasonlítása hím és nőstény, illetve fiatal és idősebb patkányokban.
4. Vékonybél ischaemia-reperfusio okozta szövettani eltérések vizsgálata során a korfüggő és nemi különbségek kimutatása patkányban.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A kísérletek a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottság (DEMÁB) engedélyével történtek (engedélyszám: 20/2011 DEMÁB) az 1998. évi XXVIII. „Az állatok védelméről és kíméletéről” szóló törvény, a 40/2013-as Kormányrendelet az állatkísérletekről és az európai unió (Európai Parlament és a Tanács 2010/63/EU irányelve) szabályozásoknak megfelelően.

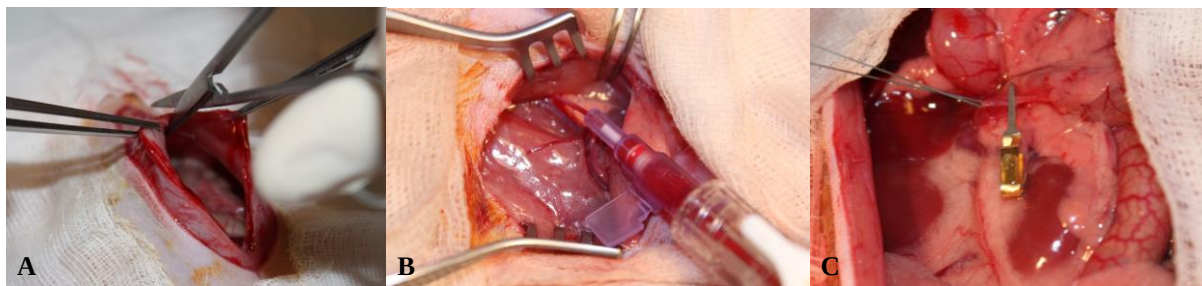
4.1. Korai micro-rheologiai és mikrokeringési eltérések mesenterialis ischaemia-reperfusio során

4.1.1. Kísérleti állatok és anaesthesia

Nőstény Crl:WI outbred patkányokat (4 hónapos, testtömeg: $265,5 \pm 26,7$ g) random módon Kontroll (n=7) és Ischaemia-reperfusio (I/R, n=7) csoportokba soroltunk. Az állatokat konvencionális állatházban, standard méretű ketrecekben tartottuk, és *ad libitum* hagyományos rágszáló tápot, illetve vizet biztosítottunk számukra. Minden kísérlet általános anaesthesiában zajlott (Thiopental, 60 mg/ttkg, i.p.), premedicatióként az állatok atropin-szulfát injekcióban részesültek (0,06 mg/ttkg, s.c.). Az állatokat melegítő párnára helyeztük, elősegítve a testhőmérsékletük fenntartását.

4.1.2. Műtéti technika és vérvételi protokoll

A has középső részének és a bal inguinalis terület fertőtlenítését (Betadine) követően kanüláltuk (BD NeoflonTM, 26G) a bal oldali arteria femoralist operáló mikroszkóp segítségével (LeicaWild 64 M650). Ezután median laparotomiát végeztünk és óvatos preparálással közelítettük meg az a. mesenterica superiort. A Kontroll csoportban más beavatkozás nem történt. Az I/R csoportban az a. mesenterica superiort atraumatikus microvascularis klip segítségével 30 percre leszorítottuk, majd 120 perc reperfúziós időszak megfigyelése következett. A hasfali és inguinalis sebeket nedves gézlappal fedtük a kísérlet során.



5. ábra Median laparotomia (A), a bal oldali a. femoralis kanülálása (B) és az a. mesenterica superior leszorítása microvascularis klip segítségével (C)

Az ischaemia előtt (Alap), közvetlenül a klip eltávolítása után (I-30), a reperfusio 30. (R-30), 60. (R-60) és 120. (R-120) percében végeztük a hőmérséklet és a mikrokeringés vizsgálatát, illetve vért vettünk a kanülált artériából (~0,3 ml minden alkalommal, anticoagulans: 1,5 mg/ml K3-EDTA). A mintavételek után azonos mennyiségű fiziológiás sóoldatot adtunk az állatoknak. A Kontroll csoportban azonos időpontokban történtek a vérvételek és a mérések. A kísérletek végén szövettani mintavétel történt a vékonybélből, a májból, a veséből, a hasnyálmirigyből és a tüdőből, majd exsanguinációval extermináltuk az állatokat.

4.1.3. Laboratóriumi vizsgálatok

4.1.3.1. Haematológiai paraméterek

A haematológiai paraméterek mérését Sysmex F-800 készülékkel (TOA Medical Electronics Corp., Japán) végeztük. A teszt elvégzéséhez körülbelül 70 µl vér használata szükséges. Az automata a kvantitatív értékeket (vörösvérsejtszám (Vvs) [$\times 10^6/\mu\text{l}$]), fehérvérsejtszám (Fvs) [$\times 10^3/\mu\text{l}$], thrombocyta szám (Thr) [$\times 10^3/\mu\text{l}$]) apertura-impedancia elven méri, amelyekből további származtatott értékeket (Htc [%]) számol.



6. ábra A Sysmex F-800 haematológiai automata

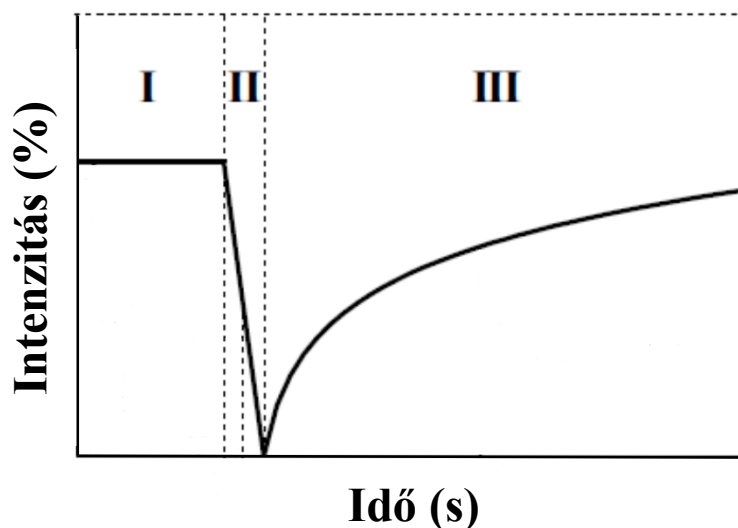
4.1.3.2. Vörösvérsejt aggregatio

A vörösvérsejt aggregatiót Myrenne MA-1 erythrocyta aggregometer segítségével mértük (Myrenne GmbH, Németország). A technika a fényáteresztő képesség növekedésén alapszik, ami akkor alakul ki, amikor az egyedi vörösvérsejtek aggregátumokat képeznek és csak az ezek közötti réseken tud átjutni a fény. A gép egy átlátszó kúp-sík kamrát tartalmaz, ahová 20 µl vért kell helyezni, majd a készülék nagy sebességgradienssel (600 s^{-1}) rövid ideig (10 sec) forgó mozgással disaggregálja a mintát. Ezután a sebességgradiens 0-ra (M mód) vagy 3 s^{-1} -re (M1 mód) csökken. Az aggregációs index értékeket az automata a mérés 5. (M 5 s, M1 5 s) vagy 10. másodpercében (M 10 s, M1 10 s) számítja a minta fénytranszmissziójának megváltozása alapján.⁸⁶



7. ábra A Myrenne MA-1 erythrocyta aggregometer

Az így nyert intenzitás-idő diagramot syllectogramnak nevezik és három fázist lehet rajta elkülöníteni: (I) az első a disaggregációs fázis, (II) a második fázisban a vörösvérsejtek visszanyerik alakjukat, (III) a harmadik pedig az aggregációs fázis (8. ábra).⁸⁷ A magasabb index értékek fokozott aggregatiót tükröznek.



8. ábra A fénytranszmissziós elven működő erythrocyta aggregometer syllectogramja⁸⁷

4.1.3.3. Vörösvérsejt deformabilitás

A vörösvérsejt deformabilitás méréséhez a LoRRca MaxSis Osmoscan rotációs ektacytometert (Mechatronics BV, Hollandia) használtuk.

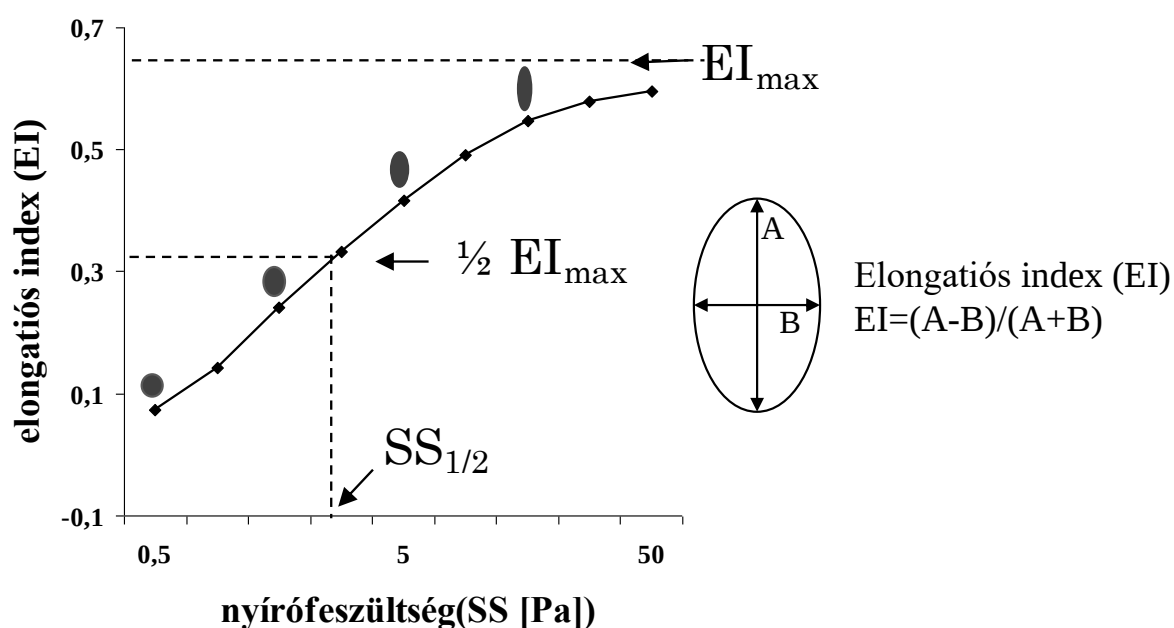


9. ábra A LoRRca MaxSis Osmoscan rotációs ektacytometer

A minta előkészítése során 10 μ l vért összekeverünk 2 ml magas viszkozitású polyvinylpyrrolidon (PVP) oldattal (viszkozitás: 27 mPas, ozmolaritás: 300mOsm/kg, pH: ~7,3). A szuszpenzió a készülék transzparens falú hengerébe kerül, amibe egy átlátszó henger merül (a cilinderek közötti távolság 0,3 mm). A külső henger egy meghatározott sebességgel forogva nyíróerőt ad át a vérmintának, amire eközben lézernyaláb vetül. Az elnyúló vörösvérsejtekről visszaverődő fényt egy kamera rögzíti, és egy számítógép elemzi. Az így

keletkezett lézerdiffrakciós kép egy ellipszis, amelynek a hosszanti (A) és haránt átmérőjéből (B) számolható az elongatiós index (EI): $EI=(A-B)/(A+B)$.⁸⁸ A mérések 37°C fokon történnek.

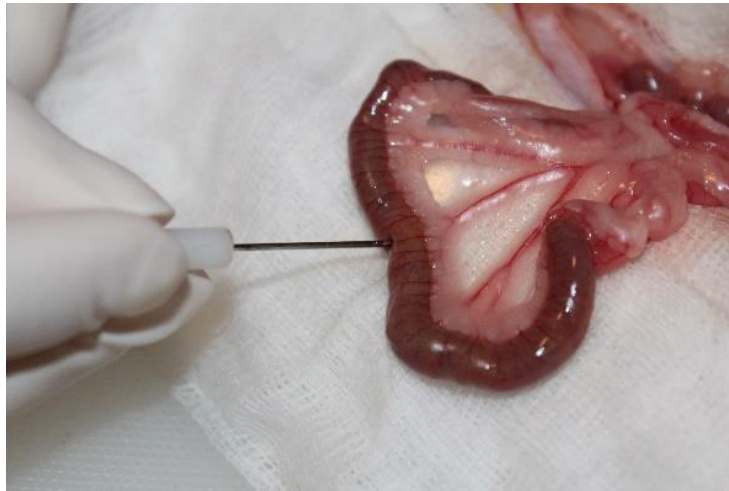
A vörösvérsejtek folyamatosan növekvő (0,3 és 30 Pa között) nyírófeszültségnek (shear stress [SS]) vannak kitéve, ami egy S-alakú deformabilitási (EI – SS) görbét eredményez. Mivel a hagyományos EI-SS görbék morfológiailag különbözőek lehetnek, szükség van egy globális paraméterre, ami az egész görbét jellemzi, így azok jobban összehasonlíthatók. Ennek a problémának a megoldására használható a Lineweaver-Burk analízis ($1/EI=SS_{1/2}/EI_{max} \times 1/SS + 1/EI_{max}$), amelynek segítségével a görbékéből kalkulálható a maximális elongatiós index (EI_{max}) és ennek feléhez tartozó nyírófeszültség érték ($SS_{1/2}$), illetve a két paraméter aránya ($EI_{max}/SS_{1/2}$) (10. ábra).⁶⁷



10. ábra Az ektacytometriás mérések során egy ellipszis alakú lézerdiffrakciós kép keletkezik, amelyből EI-SS görbe nyerhető. A görbéből kalkulálható a maximális elongatiós index (EI_{max}) és ennek feléhez tartozó nyírófeszültség érték ($SS_{1/2}$).⁸⁶

4.1.4. Mikrokeringési vizsgálatok

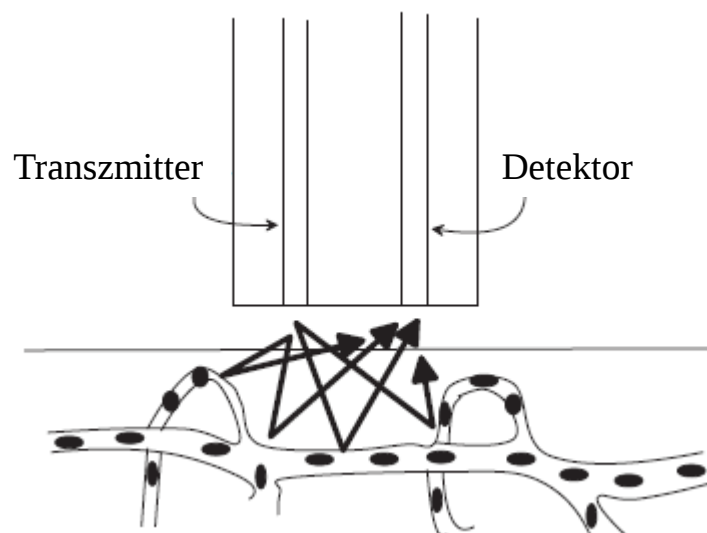
A mikrokeringés vizsgálatára lézer Doppler-es szöveti áramlásmérőt (LD-01 Laser Doppler Tissue Flowmeter Experimetria Kft.; standard pencil probe MNP100XP, Oxford Optronix Ltd., Egyesült Királyság) alkalmaztunk egy jejunum kacs antimesenterialis szélén, a máj és a jobb oldali vese elülső felszínén. A vékonybél esetén a méréseket egy nedves gézlapon izolált bélszakaszon végeztük, a mérések között a beleket visszahelyeztük a hasüregbe.



11. ábra A Lézer Doppler-es szöveti áramlásmérő alkalmazása

Ez egy non-invazív módszer, ami a perfusio mérésére szolgál a szövetek károsítása nélkül. Az eljárás a Doppler-jelenségen alapszik (12. ábra). A készülék által kibocsátott lézernyaláb a szövetben található mozgó és nyugalomban lévő sejtekről is visszaverődik, azonban a mozgásban lévő partikulumokról visszaverődő lézerfény frekvencia-eltolódáson megy keresztül. A visszaverődő lézer Doppler-jel intenzitása a mozgó sejtek számától és sebességétől függ. A jel összetettsége nem teszi lehetővé a vér áramlási sebességének mérését ml/s mértékegységben, így a készülék relatív áramlási egységet (blood flux unit, BFU) ad meg.^{89,90}

A lézer Doppler-jelet 20 másodpercig rögzítettük, majd az adatokat „offline” elemeztük, 10 másodperc hosszú, stabil, melléktermék mentes periódusok átlagértékeit használva.



12. ábra A lézer Doppler-es szöveti áramlásmérő működési elve⁹¹

A mikrokeringés mérése mellett, a vékonybél felszínének hőmérsékletét is vizsgáltuk egy digitális, infravörös hőmérő (Riester Ri-thermo N) segítségével, illetve a rectalis hőmérsékletet is monitoroztuk (Experimetria Kft.).

4.1.5. Szövettani vizsgálatok

Az utolsó vérvételt követően szövettani vizsgálat céljából mintavétel történt a vékonybélből, a májból, a hasnyálmirigyből, a jobb veséből és a tüdőből. A vékonybél, a máj és a vese esetén a szövettani mintavétel arról a szakaszból történt, ahol a lézer Doppler-es mérési pont volt. A minták 5%-os formaldehid oldatban lettek fixálva, felszálló alkoholsorban dehidrálni és paraffinba ágyazni. Microtommal 3-5 µm vastagságú metszetek készültek, majd hematoxylin-eosin (H&E) festést alkalmazva hagyományos fénymikroszkópos eljárással kerültek értékelésre.

4.1.6. Statisztikai analízis

A statisztikai vizsgálatot a SigmaStat (Systat Software Inc, San Jose, California, USA) szoftverrel végeztük. Az adatokat átlag ± szórás formájában tüntettük fel. A csoportokon belüli összehasonlításhoz Student *t*-próbát vagy Mann-Whitney tesztet, a csoportok között összehasonlításhoz egyirányú ANOVA tesztet (Dunn vagy Bonferroni módszer) használtunk, az adatok eloszlásának normalitásától függően. A statisztikailag szignifikáns különbséget $p < 0,05$ szintnél fogadtuk el.

4.2. Micro-rheologiai változások nemi különbségei és korfüggő eltérései vékonybél ischaemia-reperfusio során

4.2.1. Kísérleti állatok és anaesthesia

A tanulmányba fiatal (4 hónapos) hím és nőstény, illetve idősebb (18 hónapos) hím és nőstény Crl:WI outbred patkányokat vontunk be. Az állatokat konvencionális állatházban helyeztük el és szabad hozzáférést biztosítottunk a fajtájuknak megfelelő takarmányhoz és vízhez. A kísérleteket általános anaesthesiában végeztük (Thiopental, 60 mg/ttkg, i.p.), az operáció előtt az állatoknak atropin-szulfátot (0,06 mg/ttkg, s.c.) adtunk és melegítő párnára helyeztük őket.

4.2.2. Kísérleti csoportok és műtéti protokoll

Hat kísérleti csoportot alakítottunk ki:

- I. Kontroll fiatal hím (n=7; $435,9 \pm 75,2$ g)
- II. Kontroll fiatal nőstény (n=7; $281,7 \pm 27,8$ g)
- III. Ischaemia-reperfusio (I/R) fiatal hím (n=7; $333,3 \pm 149$ g)
- IV. Ischaemia-reperfusio (I/R) fiatal nőstény (n=7; $249,3 \pm 25,6$ g)
- V. Ischaemia-reperfusio (I/R) idős hím (n=6; $622,2 \pm 189,6$ g)
- VI. Ischaemia-reperfusio (I/R) idős nőstény (n=6; $548,7 \pm 217$ g)

Az idősebb Kontroll csoport adatai a Tanszék adatbázisából származnak (hím csoport n=7; $743,57 \pm 148,6$ g; nőstény csoport n=8; $407,87 \pm 37,2$ g).

A Kontroll csoportokban a has és a bal inguinalis régió fertőtlenítése (Betadine), illetve a bal a. femoralis kanülálása (BD NeoflonTM, 26G) után median laparotomia történt, majd az a. mesenterica superior óvatosan kireparáltuk. Az I/R csoportokban lezorításra került az a. mesenterica superior 30 percre atraumatikus microvascularis klip segítségével, majd a klip felengedése után 120 perc reperfusio megfigyelése történt.

A kanülált artériából vért vettünk az ischaemia előtt (Alap), után (I-30), a reperfusio 30. (R-30), 60. (R-60) és 120. (R-120) percében (~0,3 ml/alkalom, anticoagulans: 1,5mg/ml K3-EDTA). A Kontroll csoportokban azonos időpontokban zajlottak a vérvételek. Az utolsó vérvételt követően a vékonybélből mintát vettünk szövettani vizsgálat céljából, majd az állatokat exsanguinációval extermináltuk.

4.2.3. Laboratóriumi vizsgálatok

A laboratóriumi paraméterek a 4.1.3. fejezetben leírt módszerek szerint kerültek meghatározásra.

4.2.4. Szövettani vizsgálatok

A szövettani mintákat 5%-os formaldehid oldatban fixáltuk, felszálló alkoholsorban dehidráltuk, paraffinba ágyaztuk, microtommal 3-5 µm vastagságú metszeteket készítettünk, majd perjódsv-Schiff (PAS) festést alkalmaztunk és hagyományos fénymikroszkópos eljárással vizsgáltuk.

A vékonybélből vett szövettani minták kiértékelése az irodalomban gyakran használt Chiu-féle klasszifikáció alapján történt⁹²:

Grade 0: nincs látható elváltozás

Grade 1: a villusok tetején kis subepithelialis fellazulás (Grunhagen subepithelialis tér)

Grade 2: nagyobb fokú fellazulás, ami elemeli az epithel réteget a lamina propriáról

Grade 3: az epithel réteg elemelkedése a villusok hosszában követhető, néhány denudált boholy, tágult kapillárisok és gyulladásos sejtek jelenléte

Grade 4: denudált villusok, tágult kapillárisok, necrotikus területek

Grade 5: lamina propria teljes destrukciója, bevérzés, fekélyek

4.2.5. Statisztikai analízis

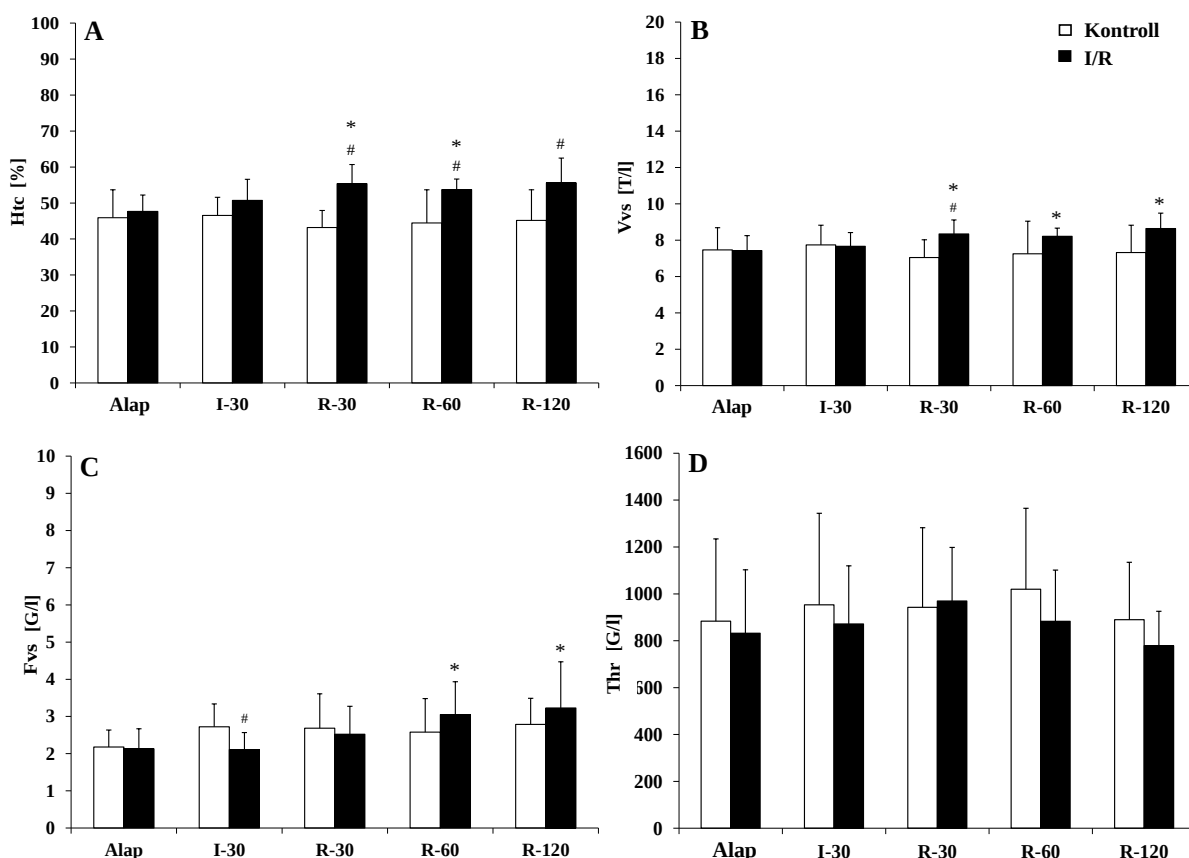
A statisztikai analízist a 4.1.6. pontban ismertetett módszerrel végeztük.

5. EREDMÉNYEK

5.1. Korai micro-rheologiai és mikrokeringési eltérések mesenterialis ischaemia-reperfusio során

5.1.1. Haematologiai paraméterek

A haematocrit a Kontroll csoportban nem mutatott jelentős eltérést, míg az I/R csoportban emelkedés volt megfigyelhető, szignifikánsan magasabb értékeket mutatva a reperfusio során (I/R vs. Kontroll R-30-nál: $p<0,001$; R-60-nál: $p=0,035$; R-120-nál: $p=0,001$ és vs. Alap R-30-nál: $p<0,001$; R-60-nál: $p<0,001$) (13/A ábra).



13. ábra A haematocrit (Htc), vörösvérsejtszám (Vvs), fehérvérsejtszám (Fvs) és a thrombocytaszám (Thr) változásai a Kontroll és az Ischaemia-reperfusio (I/R) csoportokban.

Alap=ischaemia előtt; I-30=30 perces ischaemia vége; R-30=a reperfusio 30. perce; R-60=a reperfusio 60. perce; R-120=a reperfusio 120. perce. Átlag±szórás; * $p<0,05$ vs. Alap; # $p<0,05$ vs. Kontroll.

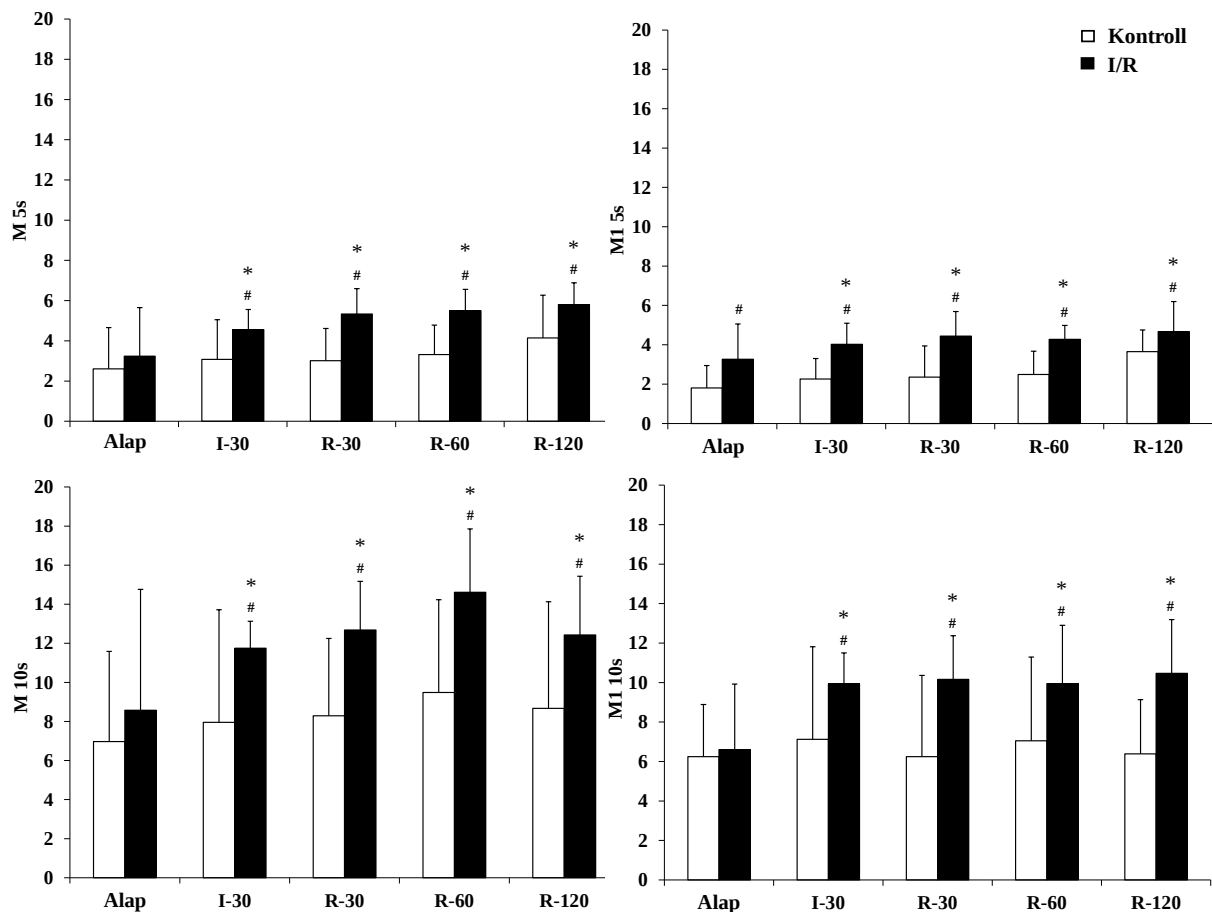
A vörösvérsejtszám hasonló változásokat mutatott: az I/R csoportban emelkedett értékek látszottak a reperfusio idején. (I/R vs. Kontroll R-30-nál: $p<0,001$ és vs. Alap R-30-nál: $p=0,005$; R-60-nál: $p=0,021$; R-120-nál: $p=0,014$) (13/B ábra).

A fehérvérsejtszám a Kontroll csoportban kismértékben növekedett, és emelkedett maradt az ischaemia, illetve a reperfusio alatt, ahogyan az I/R csoportban is, habár az I/R csoportban szignifikánsan magasabb értékek voltak láthatóak a reperfusio 60. és 120. percében (I/R vs. Alap R-60-nál: $p=0,003$; R-120-nál: $p=0,007$) (13/C ábra).

A thrombocytaszám fokozódott az ischaemia során, illetve a reperfusio első órájában a Kontroll és az I/R csoportban egyaránt, majd csökkenés volt megfigyelhető, szignifikáns különbség nélkül (13/D ábra).

5.1.2. Vörösvérsejt aggregatio

A vörösvérsejt aggregatio értékei (14. ábra) szignifikánsan magasabbak voltak az I/R csoportban az ischaemia alatt és emelkedettek maradtak a reperfusio során is (pl. M 5 s I/R vs. Kontroll I-30-nál: $p=0,004$; R-30-nál: $p<0,001$; R-60-nál: $p<0,001$; R-120-nál: $p=0,007$ és vs. Alap I-30-nál: $p=0,043$; R-30-nál: $p=0,001$; R-60-nál: $p=0,001$; R-120-nál: $p=0,001$). Az aggregációs index értékek, az M 10 s paraméter kivételével, a reperfusio végén voltak a legmagasabbak. A Kontroll csoportban is látható volt az aggregatio fokozódása, ez azonban kisebb mértékű volt, mint az I/R csoportban.



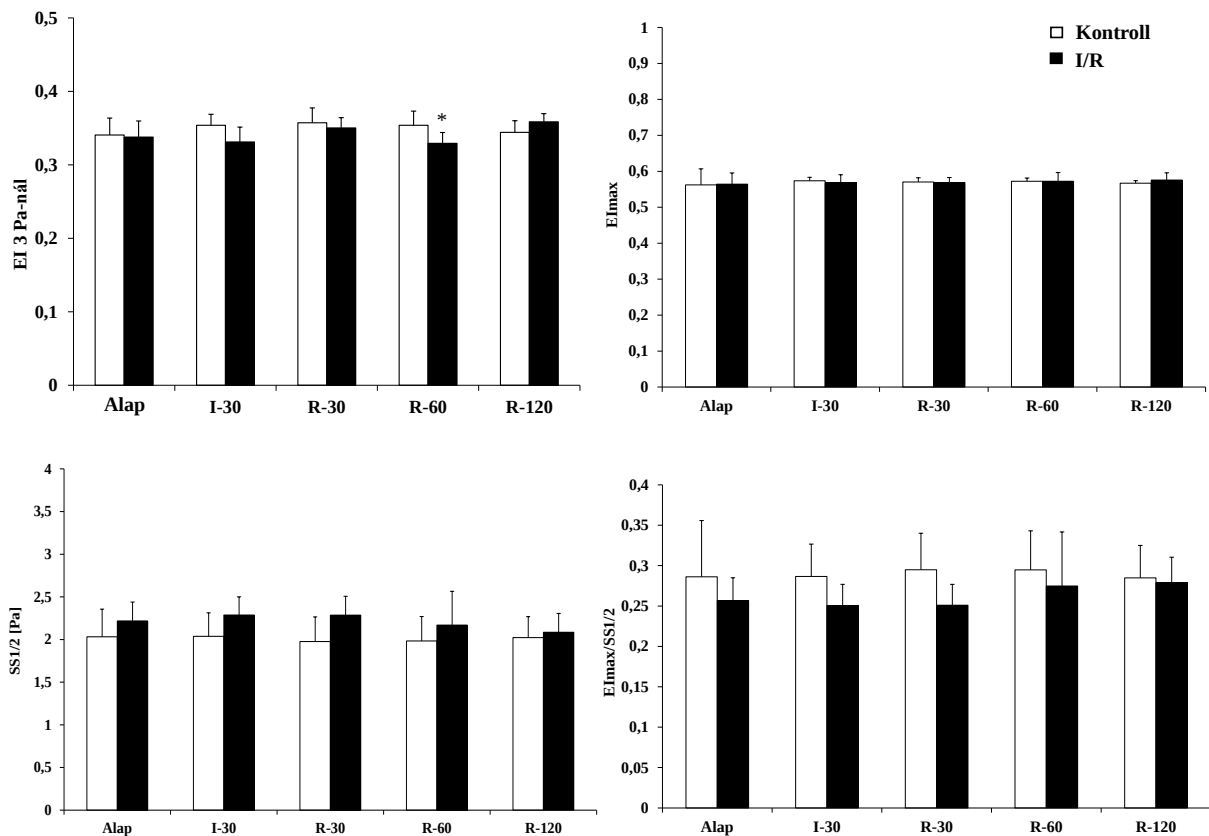
14. ábra Az M 5 s, M1 5 s, M 10 s és M1 10 s aggregációs index értékek változásai a Kontroll és az Ischaemia-reperfusio (I/R) csoportokban.

Alap=ischaemia előtt; I-30=30 perces ischaemia vége; R-30=a reperfusio 30. perce; R-60=a reperfusio 60. perce; R-120=a reperfusio 120. perce. Átlag±szórás; * p<0,05 vs. Alap; # p<0,05 vs. Kontroll.

5.1.3. Vörösvérsejt deformabilitás

A 3 Pa nyírófeszültségnél mért elongációs index értékek alacsonyabbak voltak az ischaemia idején és a reperfusio első órájában, jelentősen csökkenve a reperfusio 60. percében az I/R csoportban (I/R vs. Kontroll p=0,018).

Az elongációs index-nyírófeszültség görbék összehasonlítására szolgáló paraméterek közül az EI_{max} értékek nem változtak jelentős mértékben az I/R csoportban. Az $SS_{1/2}$ értékek a reperfusio végére csökkentek, az $EI_{max}/SS_{1/2}$ arány emelkedett az I/R csoportban a reperfusio 120. percére (15. ábra).



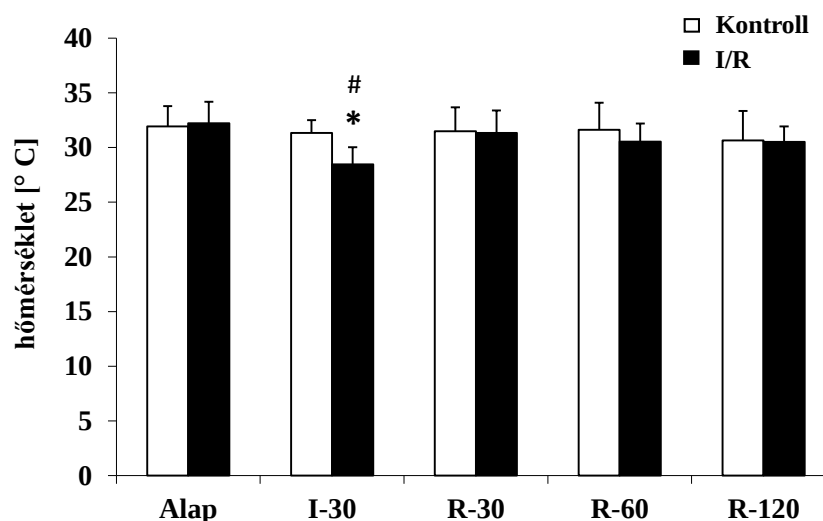
15. ábra Elongációs index 3 Pa nyírófeszültségnél (EI 3 Pa-nál), kalkulált maximális elongációs index (EI_{max}), a maximális elongációs index feléhez tartozó nyírófeszültség (SS_{1/2}) és ezek aránya (EI_{max}/SS_{1/2}) a Kontroll és az Ischaemia-reperfusio (I/R) csoportokban.

Alap=ischaemia előtt; I-30=30 perces ischaemia vége; R-30=a reperfusio 30. perce; R-60=a reperfusio 60. perce; R-120=a reperfusio 120. perce. Átlag±szórás; * p<0,05 vs. Alap.

5.1.4. Hőmérséklet és mikrokeringés

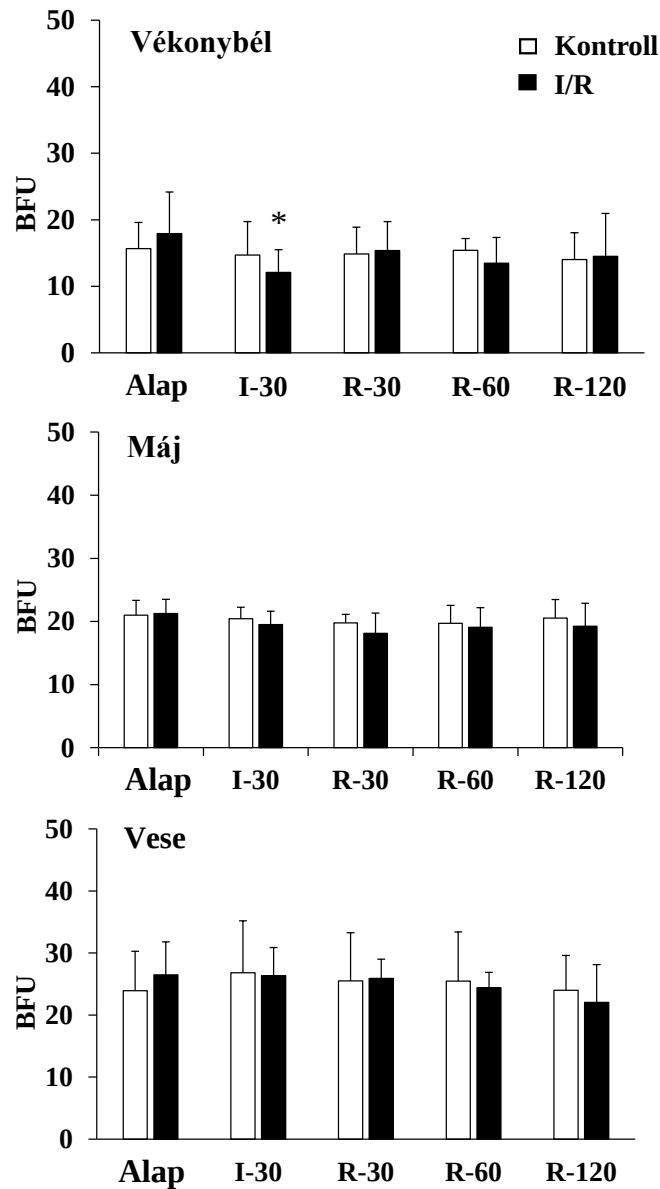
A testhőmérsékletben nem találtunk szignifikáns különbséget a két csoport között, habár enyhe emelkedés megfigyelhető volt az I/R csoportban a reperfusio 120. percére.

A vékonybél felszíni hőmérséklete nem változott a Kontroll csoportban a kísérlet során, míg az I/R csoportban jelentős csökkenés volt kimutatható a 30 perces ischaemia végére (vs. Kontroll p=0,002; vs. Alap p=0,002), majd a reperfusio során a hőmérséklet megközelítette a kiindulási értéket.



16. ábra A vékonybél felszíni hőmérsékletének változásai. Alap=ischaemia előtt; I-30=30 perces ischaemia vége; R-30=a reperfusio 30. perce; R-60=a reperfusio 60. perce; R-120=a reperfusio 120. perce. Átlag±szórás; * $p < 0,05$ vs. Alap; # $p < 0,05$ vs. Kontroll.

A vékonybél esetén az I/R csoportban a mikrokeringési BFU értékek csökkentek az ischaemia során (vs. Alap: $p=0,048$), de nem estek közel nullára, valószínűleg a mesenterialis kollaterális keringés miatt. Az értékek magasabbak voltak a klip felengedése után, de nem normalizálódtak a reperfusio végére. A máj mikrokeringési értékei alacsonyabbak voltak az I/R csoportban a Kontrollhoz viszonyítva, a reperfusio 30. percében a legalacsonyabb értékeket mutatva. A vese BFU értékei a reperfusio végére csökkentek (17. ábra).



17. ábra A relatív áramlási egység (BFU) változásai a jejunum, a máj és a jobb oldali vese felszínén mérve. Alap=ischaemia előtt; I-30=30 perces ischaemia vége; R-30=a reperfusio 30. perce; R-60=a reperfusio 60. perce; R-120=a reperfusio 120. perce. Átlag±szórás; * $p < 0,05$ vs. Alap.

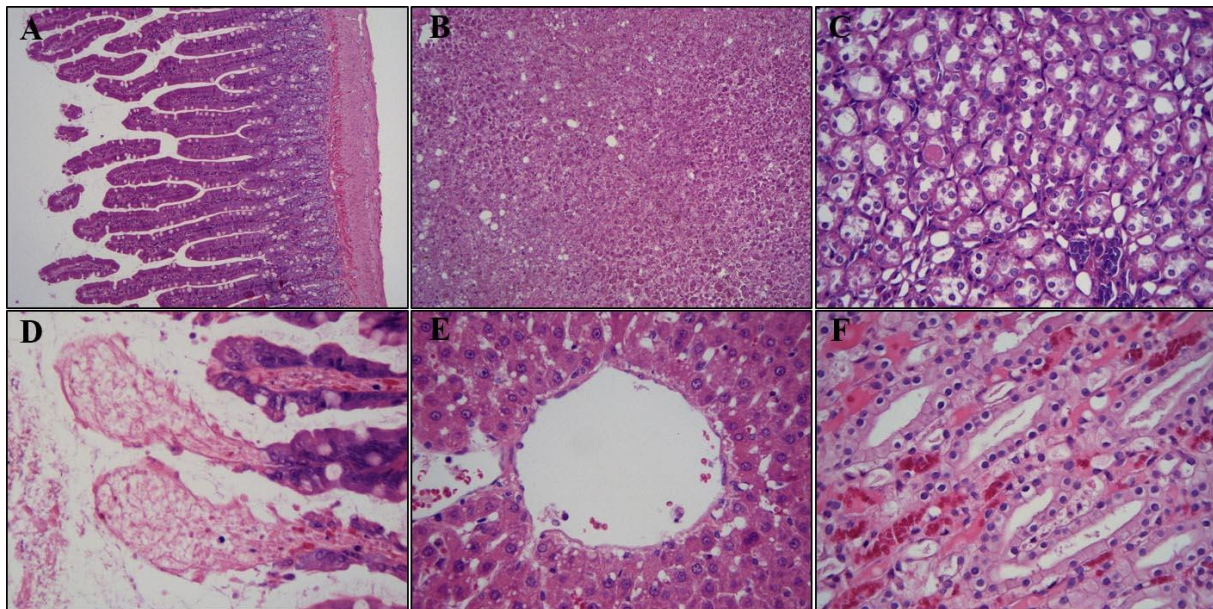
5.1.5. Makroszkópos változások és szövettan

Az a. mesenterica superior leszorítása után 10 perccel észlelhető volt a jejunum kacsok spazmusa. Az ischaemia végére ezen kívül megváltozott a sérült területek színe, sötét livid részek voltak megfigyelhetőek a bélszakaszon (18. ábra).



18. ábra A vékonybél makroszkópos képe az ischaemia előtt (A), az ischaemia 10. percében (B) és az ischaemia végén, a reperfusio kezdetén (C).

Az I/R csoport vékonybél szövettani mintáiban a következő eltérések voltak megfigyelhetőek: subepithelialis fellazulások a villusok tetején, oedemás, kifeléelyesedett bélbolyhok, tágult kapillárisok és gyulladásos sejtes beszűrődés. A Kontroll csoportban szöveti károsodás nem volt kimutatható. A távoli szervek közül a májban és a vesében találtunk szövettani eltéréseket: a májban a centralis vénák körül kis zsírcseppek voltak láthatóak, a vesében a glomerulosokban és a vasa rectában pangás volt megfigyelhető. A pancreasban és a tüdőben nem voltak eltérések kimutathatóak (19. ábra).



19. ábra A vékonybél, a máj és a vese szövettani mintái a Kontroll (A, B, C) és az I/R (D, E, F) csoportban.

5.2. Micro-rheologiai változások nemi különbségei és korfüggő eltérései vékonybél ischaemia-reperfusio során

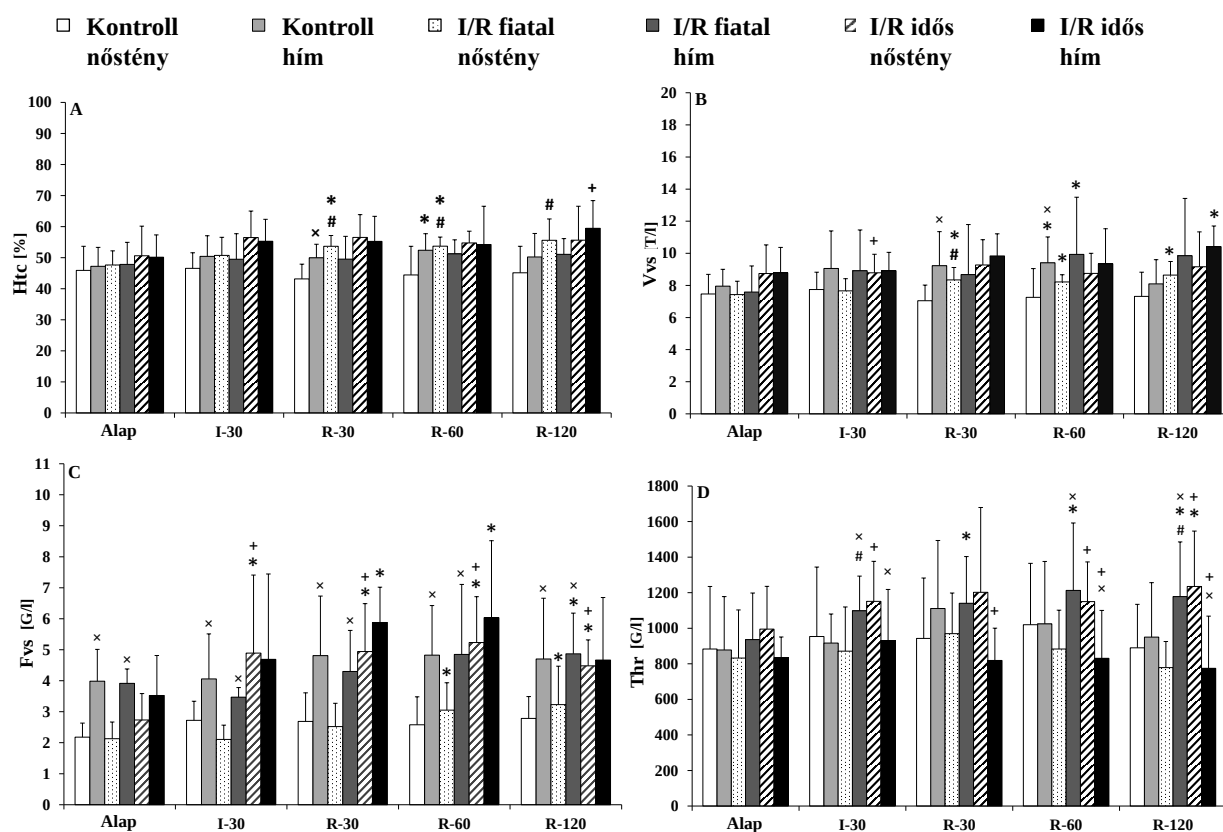
5.2.1. Haematologiai paraméterek

A haematocrit nőtt a fiatal hím csoportokban, de szignifikáns különbség nem volt a Kontroll és az I/R csoportok között, míg a fiatal nőtény I/R csoportban jelentős emelkedés volt megfigyelhető a reperfusio alatt (pl. R-30-nál vs. Kontroll $p < 0,001$; vs. Alap $p < 0,001$). Az idősebb I/R nőtények és hímek esetén a haematocrit értékek magasabbak voltak a fiatalabb I/R csoportokhoz viszonyítva (vs. fiatal I/R hím R-120-nál: $p = 0,045$) (20/A ábra).

A vörösvérsejtszám magasabb volt a hím állatokban (Kontroll hím vs. Kontroll nőtény R-30-nál, $p = 0,004$; R-60-nál, $p = 0,023$). A fiatalabb I/R csoportokban szignifikáns emelkedés volt kimutatható a reperfusio során a hímekben (vs. Alap R-60-nál, $p = 0,015$) és nőtényekben (vs. Alap R-30-nál, $p = 0,005$; R-60-nál, $p = 0,021$; R-120-nál, $p = 0,014$; vs. Kontroll R-30-nál, $p < 0,001$) egyaránt. Magasabb vörösvérsejtszám volt mérhető az idősebb I/R csoportokban a fiatalabb azonos neműekhez képest (nőtényekben I-30-nál, $p = 0,019$), kivéve az R-60-as értékeket hímekben (20/B ábra).

A fehérvérsejtszám tekintetében a hím állatoknak voltak magasabb értékei a nőtényekhez viszonyítva. A fiatal I/R csoportokban a fehérvérsejtszám szignifikánsan emelkedett a reperfusio végére mindkét nemből (vs. Alap R-120-nál, nőtény: $p = 0,007$; hím: $p = 0,025$). Az idősebb nőtény és hím I/R csoportokban a változások nagyobb mértékűek voltak. Az ischaemia és a reperfusio alatt a fehérvérsejtszám-emelkedés az idősebb nőtény I/R csoportban szignifikáns volt az alap értékekhez (I-30-nál, $p = 0,003$; R-30-nál, $p < 0,001$; R-60-nál, $p < 0,001$, R-120, $p < 0,001$) és a fiatal I/R nőtényekhez (I-30-nál, $p < 0,001$; R-30-nál, $p < 0,001$; R-60-nál, $p < 0,001$, R-120-nál, $p = 0,013$) viszonyítva. Az idősebb hím I/R csoportban a fehérvérsejtszám-növekedés csak a reperfusio első órájában volt kifejezett (vs. Alap R-60-nál $p = 0,021$). A fiatalabb I/R csoportokban a fehérvérsejtszám emelkedett maradt, az idősebb I/R csoportban egy enyhe csökkenés volt látható a reperfusio végére (20/C ábra).

A thrombocytaszám emelkedett a reperfusio első órájában, a Kontroll csoportokban és a fiatal nőtény I/R csoportban, amit csökkenés követett a reperfusio 120. percében, míg a fiatal hím I/R csoportban a vérlemezke szám szignifikánsan magasabb maradt (R-120-nál vs. Alap $p = 0,041$; vs. Kontroll $p = 0,037$; vs. nőtény $p = 0,002$). Az idősebb I/R csoportokban a nőtényeknél voltak emelkedett értékek, szignifikáns különbségeket mutatva az alaphoz ($p = 0,046$) és a fiatal I/R nőtényekhez ($p < 0,001$) viszonyítva R-120-nál. Az idősebb hím I/R csoportban ezek az eltérések nem voltak megfigyelhetők, az értékek az alap adatokhoz voltak hasonlóak (20/D ábra).

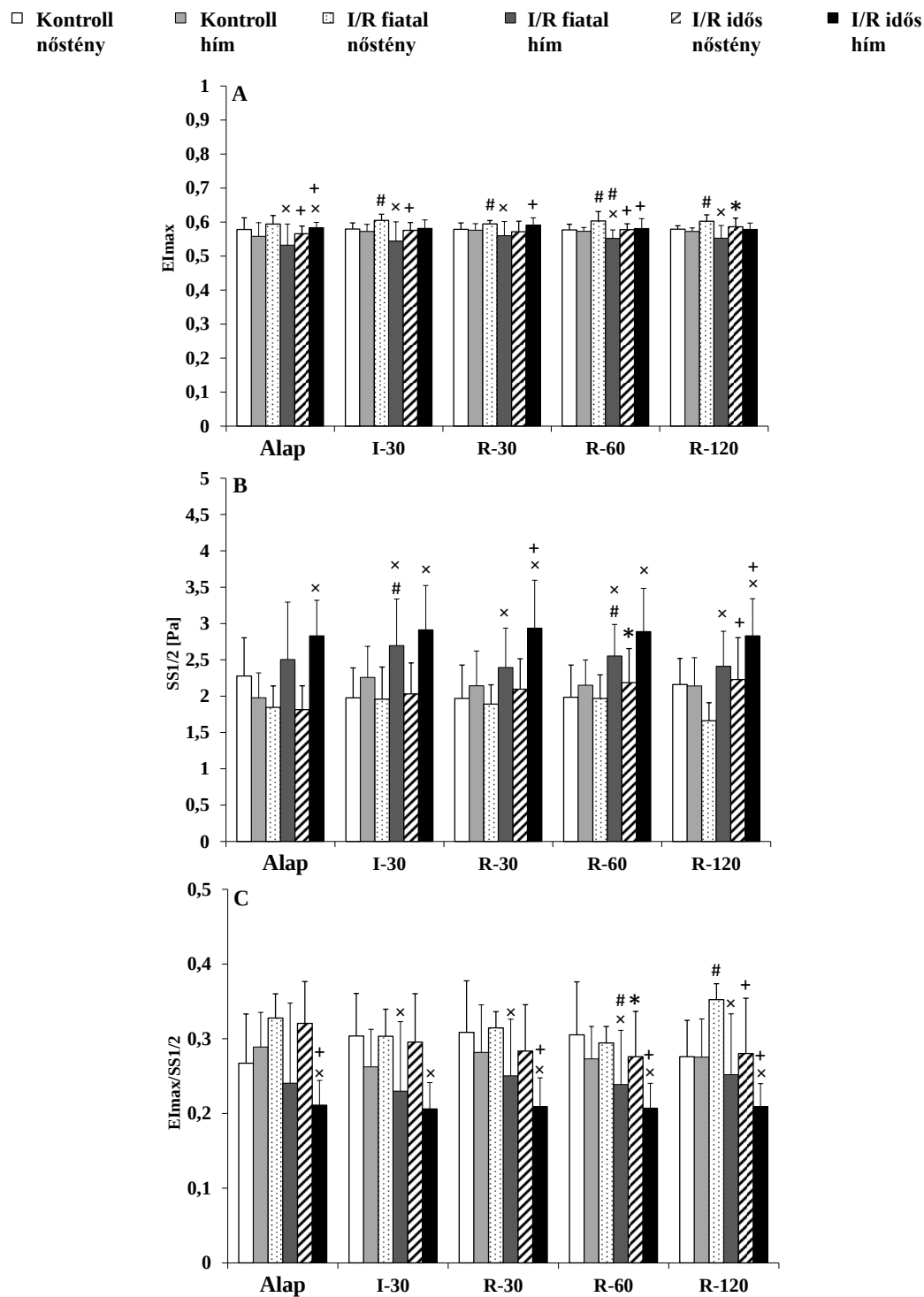


20. ábra A haematologiai paraméterek változásai. A: haematocrit (Hct); B: vörösvérsejtszám (Vvs); C: fehérvérsejtszám (Fvs); D: thrombocyta (Thr) a Kontroll és az Ischaemia-Reperfusio (I/R) csoportokban. Alap=ischaemia előtt; I-30=30 perces ischaemia vége; R-30=a reperfusio 30. perce; R-60=a reperfusio 60. perce; R-120=a reperfusio 120. perce. Átlag±szórás; * $p < 0,05$ vs. Alap; # $p < 0,05$ vs. Kontroll; × $p < 0,05$ vs. Nőstény; + $p < 0,05$ vs. I/R (azonos nemű).

A III. táblázat haematologiai paraméterek összehasonlító adatait tartalmazza a fiatal és idősebb Kontroll csoportban. A haematocrit ($p=0,022$), vörösvérsejtszám ($p=0,017$) és fehérvérsejtszám ($p=0,002$) jelentősen alacsonyabb volt a fiatal nőstény csoportban az idősebb nőstényekhez viszonyítva. Szignifikáns különbségek a nemek között a fehérvérsejtszámban mutatkoztak a fiatal ($p=0,002$) és az idősebb ($p=0,010$) állatok esetén egyaránt.

5.2.2. Vörösvérsejt deformabilitás

A kalkulált EI_{max} értékek a fiatal hím I/R csoportban voltak a legalacsonyabbak. A különbség szignifikáns volt a nőstény I/R csoporthoz (Alap-R-120-nál, $p < 0,001$), a Kontroll hím csoporthoz (R-60-nál, $p=0,011$) és az idősebb hím I/R csoporthoz (Alap, $p=0,022$; R-30-nál, $p=0,042$; R-60-nál, $p=0,011$) képest.



21. ábra A vörösvérsejt deformabilitás változásai. A: kalkulált maximális elongációs index (EI_{max}); B: a maximális elongációs index feléhez tartozó nyírófeszültség ($SS_{1/2}$); C: és ezek aránya ($EI_{max}/SS_{1/2}$) a Kontroll és az Ischaemia-reperfusio (I/R) csoportokban. Alap=ischaemia előtt; I-30=30 perces ischaemia vége; R-30=a reperfusio 30. perce; R-60=a reperfusio 60. perce; R-120=a reperfusio 120. perce. Átlag±szórás; * $p<0,05$ vs. Alap; # $p<0,05$ vs. Kontroll; × $p<0,05$ vs. Nőstény; + $p<0,05$ vs. I/R (azonos nemű).

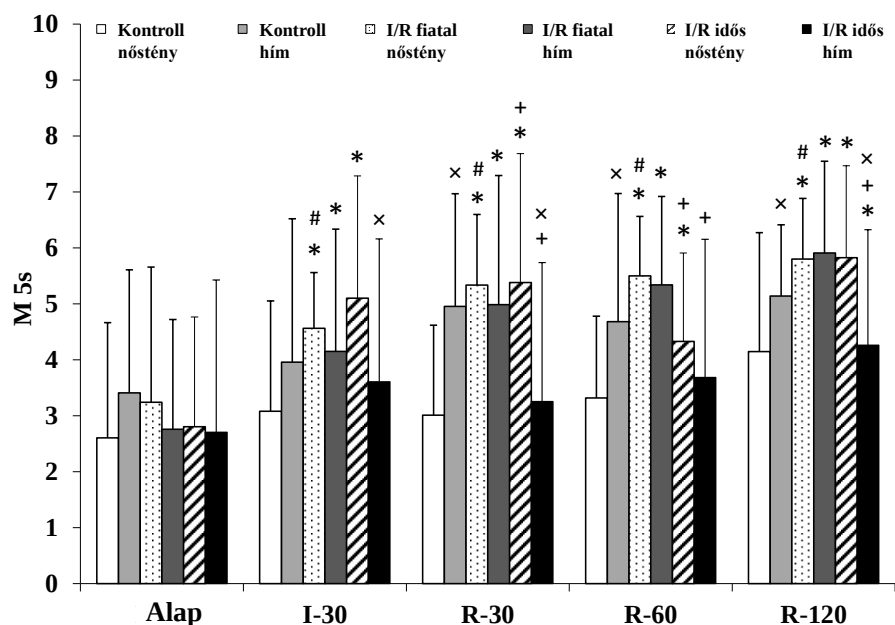
A nőstény csoportokban a kísérlet kezdetétől a fiatal I/R állatok mutatták a legmagasabb $EI_{\max}$ értékeket, és magasak maradtak a megfigyelési időszak alatt. Mindkét fiatal csoportban a hím állatoknál voltak alacsonyabb $EI_{\max}$ értékek megfigyelhetők. Az idősebb állatok esetén a hímeknél az Alap értékek voltak magasabbak ($p=0,033$) (21/A ábra).

A hím csoportokban magasabb $SS_{1/2}$ értékek voltak kimutathatók a nőstényekhez képest. A legmagasabb értékek az idősebb I/R hím csoportban látszóttak (vs. fiatal hím I/R csoport R-30-nál, $p=0,025$; R-120-nál, $p=0,031$). A fiatal I/R hímek emelkedett értékeket mutattak a Kontroll (I-30-nál, $p=0,017$; R-60-nál, $p=0,006$) és a nőstény I/R csoporthoz (I-30-nál, $p=0,002$; R-30-nál, $p=0,02$; R-60-nál, $p<0,001$; R-120-nál, $p=0,003$) viszonyítva (21/B ábra). A Kontroll idősebb hím csoport szintén rosszabb értékekkel rendelkezett, mint a Kontroll fiatal hímek ($p=0,017$) (IV. táblázat).

Az $EI_{\max}/SS_{1/2}$ arány tekintetében hasonló tendencia volt megfigyelhető. Az idősebb I/R hímeknél mutatkoztak a legalacsonyabb értékek, és a fiatal I/R hím csoportban is kimutatható volt egy csökkenés (vs. Kontroll R-60-nál, $p=0,042$; vs. I/R nőstény I-30-nál, $p=0,046$; R-30-nál, $p=0,02$; R-60-nál, $p=0,017$; R-120-nál, $p=0,008$) (21/C ábra).

5.2.3. *Vörösvérsejt aggregatio*

Az aggregációs index értékek emelkedtek az ischaemia során a Kontroll és az I/R csoportokban egyaránt, és emelkedettek maradtak a reperfusio alatt is, jelentősen magasabb értékeket mutatva az I/R csoportokban (pl. M 5s: I/R nőstény vs. Kontroll nőstény R-30-nál, $p<0,001$; R-60-nál, $p=0,01$; R-120-nál, $p=0,043$; I/R hím vs. Kontroll hím I-30-nál, $p=0,004$; R-30-nál, $p<0,001$; R-60-nál, $p<0,001$, R-120-nál, $p=0,007$). Az idősebb I/R hím csoportban az értékek alacsonyabbak voltak, mint a fiatal I/R hím csoportban az ischaemia és a reperfusio idején (22. ábra).



22. ábra Az M 5s aggregációs index értékek változásai a Kontroll és az Ischaemia-reperfusio (I/R) csoportokban. Alap=ischaemia előtt; I-30=30 perces ischaemia vége; R-30=a reperfusio 30. perce; R-60=a reperfusio 60. perce; R-120=a reperfusio 120. perce. Átlag±szórás; *p<0,05 vs. Alap; # p<0,05 vs. Kontroll; × p<0,05 vs. Nőstény; + p<0,05 vs. I/R (azonos nemű).

A Kontroll csoportokban a hímek, az I/R csoportok esetén általában a nőstények mutattak magasabb aggregációs index értékeket, és szignifikáns különbségek voltak kimutathatók a két nem között (pl. M1 5s: Alap, $p<0,005$; I-30-nál, $p=0,006$; R-30-nál, $p=0,041$, R-60-nál, $p=0,013$ fiatal Kontrollokban; Alap, $p=0,010$ idősebb Kontrollokban) (IV. táblázat).

III. táblázat Haematologiai paraméterek összehasonlító adatai a fiatal és idősebb Kontroll csoportokban. Átlag±szórás; *p<0,05 vs. hím (azonos korú); # p<0,05 vs. idősebb (azonos nemű).

		Htc [%]	Vvs [x10⁶/μl]	Fvs [x10³/μl]	Thr [x10³/μl]
Kontroll fiatal	nőstény	45,9 ± 7,77 #	7,47 ± 1,22 #	2,18 ± 0,46 * #	883,36 ± 351,33
	hím	47,23 ± 6,11	7,95 ± 1,05 #	3,98 ± 1,03	877,86 ± 300,36
Kontroll idős	nőstény	52,89 ± 16,87	8,52 ± 2,96	3,11 ± 0,87 *	1000,44 ± 284,28
	hím	56,01 ± 14,62	9,67 ± 2,45	4,31 ± 1,81	828,44 ± 409,71

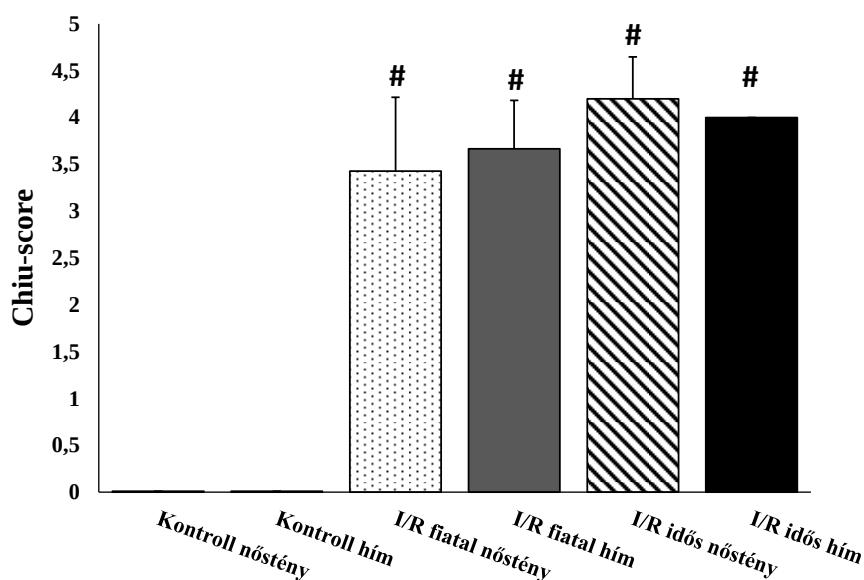
IV. táblázat A micro-rheologiai paraméterek összehasonlító adatai (EI_{max}: kalkulált maximális elongációs index; SS_{1/2}: a maximális elongációs index feléhez tartozó nyírófeszültség; M 5s and M1 5s: aggregációs index értékek). Átlag±szórás; *p<0,05 vs. hím (azonos korú); # p<0,05 vs. idősebb (azonos nemű).

		EI_{max}	SS_{1/2} [Pa]	EI_{max}/SS_{1/2}	M 5s	M1 5s
Kontroll fiatal	nőstény	0,578 ± 0,034	2,277 ± 0,526	0,267 ± 0,065	2,6 ± 2,05	1,8 ± 1,14 *
	hím	0,558 ± 0,039	1,977 ± 0,342 #	0,289 ± 0,046	3,4 ± 2,19	3,0 ± 1,59
Kontroll idős	nőstény	0,571 ± 0,009	2,234 ± 0,471	0,265 ± 0,046	1,76 ± 1,07 *	1,35 ± 1,11 *
	hím	0,573 ± 0,026	2,342 ± 0,410	0,251 ± 0,039	2,94 ± 1,42	1,85 ± 1,22

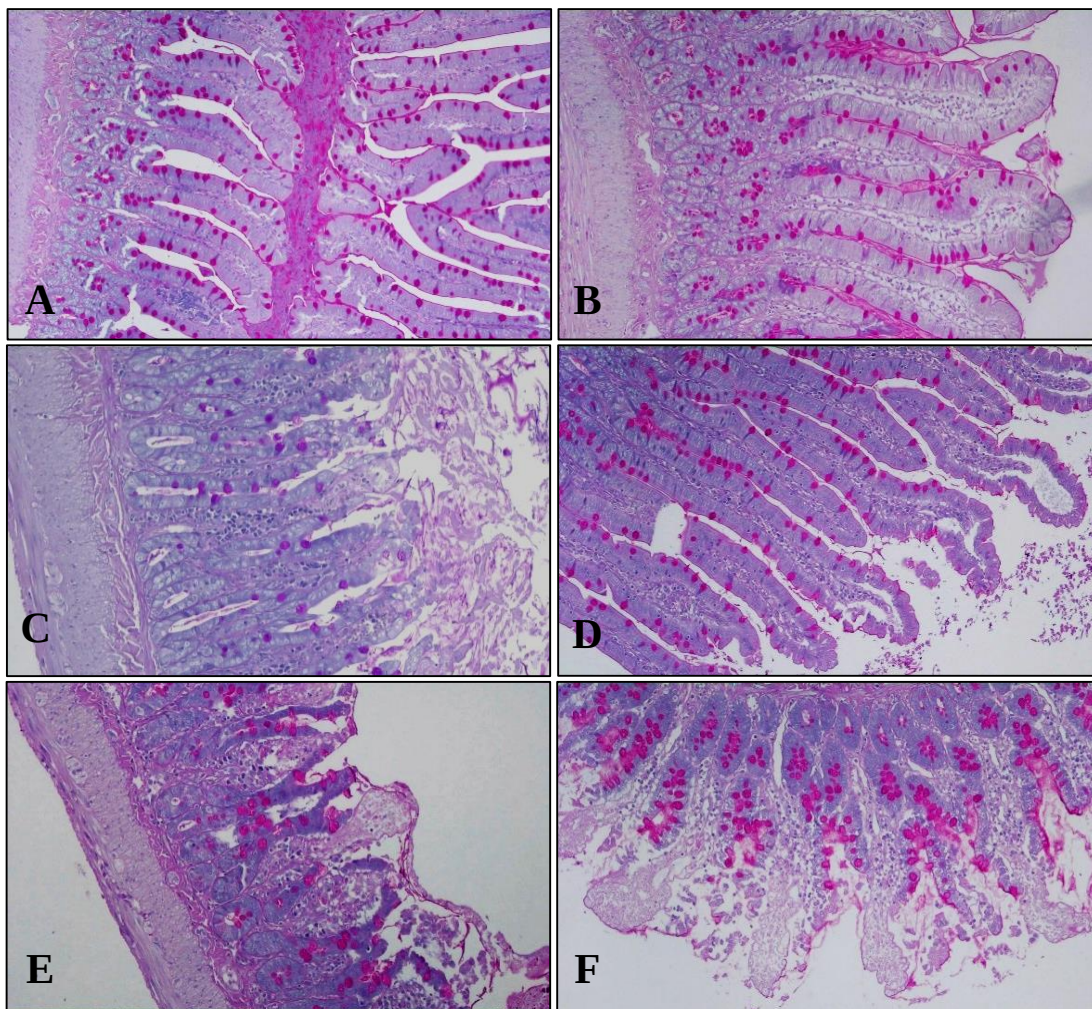
5.2.4. Szövettani vizsgálatok

A vékonybél szövettani vizsgálata során a Chiu-féle klasszifikációt alkalmaztuk. A Kontroll csoportokban ép szöveti szerkezet volt látható (Chiu-score: 0). Ehhez képest az I/R csoportokban jelentős szövettani eltérések mutatkoztak. A szövettani metszeteken subepithelialis fellazulások, denudált bélbolyhok, necroticus területek, tágult kapillárisok és gyulladásos sejtek ábrázolódtak (Chiu-score: 4), illetve az idős nőstény I/R csoportban egy esetben lamina propria bevérzés látszott (Chiu-score: 5).

A fiatal I/R csoportokban szignifikánsan magasabb pontértékek voltak jellemzők a fiatal Kontroll csoportokhoz képest mindkét nemben. A hímek és nőstények, illetve a fiatal és idősebb csoportok között szignifikáns különbség nem volt kimutatható, azonban az idősebb csoportok magasabb értékekkel rendelkeztek. Minden esetben 4 vagy afölötti pontszámot kaptak, míg a fiatal csoportokban előfordult alacsonyabb pontérték (2 és 3) is.



23. ábra A Chiu-féle osztályozás pontértékei a Kontroll és Ischaemia-reperfusio (I/R) csoportokban. Átlag±szórás; # $p < 0,05$ vs. Kontroll



24. ábra A vékonybél szövettani mintái a Kontroll nőstény (A), Kontroll hím (B), fiatal I/R nőstény (C), fiatal I/R hím (D), idős I/R nőstény (E) és idős I/R hím (F) csoportokban.

6. MEGBESZÉLÉS

6.1. Korai micro-rheologiai és mikrokeringési eltérések mesenterialis ischaemia-reperfusio során

A mesenterialis ischaemia-reperfusio életet veszélyeztető szövődményekhez vezethet lokális és távoli szervi károsodások révén. Kísérletünkben a haematologiai, micro-rheologiai és mikrocirculációs paraméterek változásait vizsgáltuk az a. mesenterica superior 30 perces leszorítása által kiváltott intestinalis ischaemia, illetve az ezt követő reperfusio 120 perce során. A Kontroll csoportban bőrmetszés és az artéria preparálása történt. Ez a modell lehetővé teszi a vékonybél I/R okozta akut és korai eltérések tanulmányozását.

Vizsgálatunkban a haematocrit és vörösvérsejtszám az I/R csoportban szignifikánsan emelkedett a reperfusio alatt. A fehérvérsejtszám nőtt a Kontroll és az I/R csoportban is, az I/R állatokban szignifikáns szintet elérve a reperfusio során. A thrombocytaszám növekedést mutatott mindkét csoportban az ischaemia alatt és a reperfusio első órájában, majd csökkenés volt megfigyelhető. Ezek a változások az I/R által kiváltott gyulladásos és akut fázis reakciókkal állhatnak összefüggésben.⁹³ A Kontroll csoportban mutatkozó fehérvérsejt és thrombocytaszám változás a beavatkozás által okozott szöveti károsodásnak lehet a következménye. Az akut fázis reakció során a thrombocytaszám esetén emelkedés és csökkenés is előfordulhat. A korai időszakban általában változatlan vagy csökken a vérlemezke szám, ami micro-thrombusok kialakulása miatt jelentkezhet.

Az eredményeink azt mutatták, hogy a micro-rheologiai jellemzők romlottak az ischaemia és az utána következő reperfusio alatt. Ismert, hogy az I/R befolyásolja a vér micro-rheologiai paramétereit. A kirekesztett régióban lévő vér tulajdonságai megváltozhatnak: a fokozott haematocrit, megnövekedett fehérjekoncentráció hozzájárulhat a vérviszkozitás emelkedéséhez, illetve az ott bekövetkező anaerob folyamatok miatt megváltozik a vér összetétele, pH-ja. Az ischaemia során kialakult sérüléseket tovább súlyosbíthatja a vérátáramlás visszatérése.^{3,34,37,46} Reperfusio során az oxigén újra megjelenik a szövetekben, ahol reakcióba lép a xantin-oxidázzal, amelynek eredménye a reaktív oxigén származékok képződése.^{34,37,94,95} A szabadgyökök további forrásai lehetnek a nitrogén-monoxid szintáz és a polymorphonuclearis granulocyták.⁹⁶⁻¹⁰⁰ A szabadgyök felszabadulás és az akut sérülés következtében megemelkedett fibrinogén szint következménye lehet a fokozott vörösvérsejt aggregatio. A csökkent erythrocyta deformabilitás oka a szabadgyökök indukálta lipidperoxidáció, illetve megváltozott fehérje szerkezet és funkció, a lokális metabolikus

változások és az energiahiány miatt kialakuló sejtfelszín/térfogat arány megváltozása lehet.^{96,100,101} A sejtkárosodás fokozott intestinalis permeabilitáshoz, endothelialis és epithelialis diszfunkcióhoz és bakteriális translocációhoz vezet.²³

Jól dokumentált, hogy a haemorheológiai paraméterek fontos szerepet játszanak a mikrokeringés meghatározásában.^{64,102} A micro-rheológiai tényezők romlása kísérletünkben együtt járt a hasi szervek microcirculációjának károsodásával. Ez részben az ischaemiás területől kiáramló megváltozott tulajdonságú vérnek, a vörösvérsejtek fokozott aggregációjának és a csökkent deformabilitásának köszönhető, másrészt pedig a „no reflow” jelenségnek, ami a jellemzője az I/R-nek.^{23,44,103} Számos mechanizmus hozzájárulhat ahhoz, hogy a vérátáramlás nem indul meg újra az adott szövetben: intravascularis thrombosis, fehérvérsejt és vérlemezke dugók, haemoconcentratio, endothel sejt duzzadás, vasoconstrictio és interstitialis oedema.

Az intestinalis relatív áramlási egység (BFU) csökkent az ischaemia alatt, de a vérátáramlás megszűnése nem volt teljes. Megison és munkatársai kimutatták, hogy az a. mesenterica superior occlusiót követő áramláscsökkenés 44-97% között mozgott és az egyéni különbség is nagy volt a kollaterális keringés variabilitása miatt.⁵⁴ Esetünkben a mért értékekben nem tapasztaltunk nagy szórást. A legtöbb állatmodell esetén az a. mesenterica superior 30 percre történő leszorítását alkalmazzák, de mesenterialis ischaemiát számos más módon is létre lehet hozni, pl. az a. mesenterica superior leszorítása a kollaterálisok lekötésével, embolisatio, „low-flow” ischaemia, segmentalis mesenterialis ér occlusio, melyeknek mind megvan a megfelelő célja, előnye és hátránya.^{18,105}

A mikrokeringés vizsgálata hasznos lehet különböző betegségek diagnosztikájában, a keringési zavar súlyosságának megítélésében, bélanastomosisek esetén a megfelelően perfundált szakaszok kiválasztásában, a terápia, illetve annak hatásosságának megítélésében.¹⁰⁴ A microcirculatio vizsgálatára számos invazív és non-invazív módszer alkalmas, melyek közül az egyik legelterjedtebb a lézer Doppler-es áramlásmérés. Ez egy egyszerűen használható, a perfúzióban bekövetkező változások folyamatos, gyors és valós idejű követésére alkalmas módszer. A vizsgálat során azonban számos tényezővel kalkulálni kell, amelyek befolyásolhatják a méréseket. Kiemelt figyelmet kell fordítani a stabil mérési körülmények, a megfelelő mérési geometria és nyomás kialakítására, valamint a légző- és izommozgások által okozott műtermékek minimalizálására. A szövetek száradásának elkerülése is szükséges a mérések során. Figyelembe kell venni, hogy a Thiopentallal történt anaesthesia is hatással lehet a mikrokeringésre, arteriovenosus shuntok megnyitása és az oxigenizáció csökkentése által.¹⁰⁶ Továbbá, a lézer Doppler-es áramlásmérésre hatása van a vizsgált szövet anatómiájának,

érszerkezetének is, és nem jelentéktelen a lézersugár energiatartalma sem, amely hosszabb idejű használat során befolyásolhatja a méréseket.^{107,108} Ezeket a faktorokat igyekeztünk minimalizálni a vizsgálatok során és véleményünk szerint az azonos körülmények között végzett mérések adatai összehasonlíthatóak.

A kísérlet során vizsgáltuk a vékonybél felszíni hőmérsékletét, ami az I/R csoportban jelentősen csökkent az ischaemia végére, majd a reperfusio alatt emelkedett, megközelítve a kiindulási értékeket. Intestinalis I/R során a bél életképességének meghatározása rendkívül nehéz. Ennek előrejelzése egyrészt klinikai szempontok (szín, perisztaltika, pulzálás, vérzés) szerint történik, másrészt számos más objektív módszer is rendelkezésre áll, amelyek azonban nem terjedtek el a gyakorlatban. Malafaia és munkatársai infravörös kamerával vizsgálták patkányokban a vékonybél hőmérsékletét különböző hosszúságú ischaemia alatt és után az életképesség megállapítása céljából. Tanulmányukban a bél hőmérséklete az ischaemia során csökkent, a reperfusio idején pedig reaktív hyperaemia volt megfigyelhető azokban az esetekben, ahol a bél klinikailag életképesnek bizonyult, szövettanilag pedig nem, vagy csak enyhe eltérések látszóttak.¹⁰⁹ A reaktív hyperaemia általában a felengedést követő percekben alakul ki, saját vizsgálataink során ilyen nem tapasztaltunk, habár a kísérlet során nem folyamatosan monitoroztuk a felszíni hőmérsékletet, hanem adott időpontokban. A szövettani analízis és patológussal történt egyeztetés alapján a károsodásokat reverzibilisnek ítéltük meg.

Az előzőekben részletezett patofiziológiai folyamatok hatással vannak a lokális és távoli sejtekre egyaránt, amelynek következménye, hogy a vékonybél I/R károsodása gyakran társul máj, vese és tüdő elégtelenséggel.^{50,51} Vizsgálatunkban a szövettan, illetve a lézer Doppleres mérések alapján a távoli szervek közül a máj és a vese károsodása volt megfigyelhető.

6.2. Micro-rheologiai változások nemi különbségei és korfüggő eltérései vékonybél ischaemia-reperfusio során

Az I/R által okozott vékonybél károsodás jelentős szerepet játszik számos klinikai kórképben és a sebészeti betegek mortalitásának is egy fontos oka.¹¹⁰ A hasüregi szervek közül a bél különösen érzékeny az I/R sérülésekre, mivel a szabadgyök termelő enzimek, többek között a xantin-oxidáz, nagy mennyiségekben található a bélbolyhokban.^{111,112}

A vér micro-rheologiai paraméterei, azaz a vörösvérsejt aggregatio és deformabilitás, számottevő szerepet játszanak a szöveti perfusio kialakításában, ezért kísérletes sebészeti és mikrosebészeti vizsgálatuk hasznos lehet.^{64,113,114} Számos patofiziológiai folyamat ronthatja ezeket a paramétereket, beleértve az I/R károsodásokat. A reperfusio során, az oxigén

megjelenésével, szabadgyökök képződnek, amelyek a vörösvérsejt-membránban sérüléseket okoznak, az aggregatio és a deformabilitás károsodásához vezetnek.^{99,100}

Egyre több tanulmány veti fel, hogy a nemnek és a kornak nagymértékű szerepe van az I/R-ra adott válaszban, illetve haemorheológiai paraméterekben. Annak a feltételezésnek a vizsgálatára, hogy az idősebb kor és a hím nem összefüggésben van az I/R károsodásokra való nagyobb érzékenységgel, vékonybél I/R hatását tanulmányoztuk szisztémás haematológiai és micro-rheológiai paramétereken hím és nőstény, illetve fiatal és idősebb patkányokban. Az I/R csoportokban az a. mesenterica superior 30 percre történő leszorításával értünk el mesenterialis ischaemiát, a Kontroll csoportokban bőrmetszést és az ér kipreparálását végeztük.

Főbb eredményeink a következők voltak: (1) a haematocrit szignifikánsan nőtt a fiatal nőstény I/R csoportban. Az idősebb I/R csoportokban az értékek magasabbak voltak a fiatalabb állatokhoz viszonyítva. (2) A vörösvérsejtszám magasabb volt a hím állatokban a nőstényekhez képest, illetve az idősebb I/R állatokban a fiatal I/R csoportokhoz viszonyítva. (3) A fehérvérsejtszám esetén a hím állatoknál voltak magasabb értékek megfigyelhetők a nőstényekkel szemben. Az idősebb nőstény és hím I/R csoportokban a változások nagyobb mértékűek voltak. (4) A thrombocyta szám emelkedett a fiatal I/R állatokban a hímek esetén, míg a nőstény csoportokban az idősebb állatok mutattak magasabb értékeket. (5) A vörösvérsejt deformabilitás romlása leginkább a hím és az idősebb csoportokban látszott. (6) Fokozott vörösvérsejt aggregatio volt látható minden csoportban, de legkifejezettebben a nőstény I/R csoportokban. (7) A szövettani vizsgálat alapján az I/R csoportokban jelentős I/R károsodás volt kimutatható. A hímek és nőstények, illetve a fiatal és idősebb csoportok között szignifikáns különbség nem volt látható, azonban az idősebb csoportok magasabb Chiu-score értékekkel rendelkeztek.

Az emelkedett haematocrit, vörösvérsejtszám, fehérvérsejtszám és thrombocyta szám az I/R által okozott akut fázis reakció jelei. Az ischaemiás bélszövetben az aktivált fehérvérsejtek, endothel sejtek és vérlemezkék citokinetet termelnek, melynek következtében az adhesiós molekulák szintézise fokozódik, amelynek szerepe van micro-thrombusok kialakulásában, és ezáltal a mikrokeringés romlásában.^{41,115}

Számos folyamat, például az oxidatív stressz, megváltoztathatja a vörösvérsejtek rheológiai tulajdonságait, lipidperoxidációt, haemoglobin és fehérje elváltozásokat okozva. Reaktív szabadgyökök az öregedés (az öregedés „szabadgyök teóriája”) és reperfusio során is képződnek.^{79,100,112}

Az öregedés számottevő rizikótényezőt jelent az ischaemiás megbetegedésekben, mint a stroke, ischaemiás szívbetegség, továbbá sebészeti beavatkozások során is. Az I/R károsodások

főként az idősebb populációt érintik, tehát célszerű és elvárható I/R modellekben idősebb állatok használata, illetve hogy erre gondoljunk már a kísérlet tervezésekor. Ezzel szemben a kísérletek során általában fiatalabb állatok felhasználása történik, amelynek számos oka van, többek között a könnyebb elérhetőség és az alacsonyabb költség.¹¹⁶ Néhány tanulmányban azt is kimutatták, hogy az I/R sérülések mechanizmusa is eltérő fiatal és idősebb korban. Fiatal állatokon végzett kísérletek a neutrophilek központi szerepét mutatták ki az I/R okozta vascularis permeabilitás és constrictio kialakulásában. Azonban a neutrophil granulocyták szerepe nem biztos, hogy kiterjeszthető az idősebb állatokra, ugyanis ezek a sejtek idősebb korban csökkent chemotaxist, szabadgyök termelést és fagocitózist mutatnak. A fehérvérsejt-endothel kapcsolat fokozódásának elmaradása ellenére idősebb patkányokban is megnő az erek áteresztőképessége és csökken a perfusio I/R következtében. Továbbá, a keringő neutrophilek eliminálása csak fiatal patkányokban csökkentette az I/R által kiváltott mikrokeringés romlást. Így feltételezhető, hogy idősebb korban neutrophil-független mechanizmusok állnak a microvascularis diszfunkció kialakulásának hátterében I/R során.¹¹⁷

A laboratóriumi patkányok átlagos várható élettartama 2,5-3 év között van. Amennyiben a patkányok korát az emberi kornak szeretnénk megfeleltetni, fontos figyelembe venni, hogy a relatív kor változik az életszakasztól függően. Például, egy 4 hónapos patkány egy 10 éves embernek felel meg, míg a 18 hónapos kor körülbelül 45 humán évvel egyenlő.¹¹⁸

Az öregedés „szabadgyök teóriája” szerint, az öregedés folyamata (részben) az oxidatív stressznek köszönhető, ami biológiailag fontos struktúrákban okoz károsodást.⁷⁹ A korfüggő változásokat különböző szervekben létrehozott I/R során számos tanulmányban kimutatták. Azhar és munkatársai azt találták, hogy az I/R okozta károsodások mértéke nagyobb volt idős egerek szívében, mint a fiatal felnőtt egerek esetén. Kusaka és munkatársai kimutatták, hogy idős patkányok sokkal súlyosabb I/R károsodást szenvednek, és Shah és munkatársai megfigyelték, hogy idős egerek fogékonyabbak az intestinalis I/R okozta szövődményekre.^{116,119,120}

Az öregedés a haemorheológiai paraméterek romlásával is összefüggésbe hozható. Idősebb korban emelkedett a vér és plazmaviszkozitás, melynek oka elsősorban a fokozott fibrinogén koncentráció. Az öregedéssel csökken a vörösvérsejtek élettartama, ami annak köszönhető, hogy felgyorsul a szíalsav eltűnése a vörösvérsejt membránról és fokozódik a makrofágok általi elpusztítása. A fokozott vörösvérsejt aggregatio a megváltozott cellularis (csökkent felszíni töltés) és plazmatikus (megnövekedett fibrinogén koncentráció) faktoroknak az eredménye. A csökkent deformabilitás szintén jellemző idős korban, a vörösvérsejtek

oxidatív károsodása miatt.^{80,81} Ezek a tényezők hozzájárulnak a vér viszkozitásának fokozódásához, ami a cardiovascularis rizikó egyik fő meghatározója.⁶

A nem vonatkozásában is megfigyeltek haemorheologiai különbségeket számos humán tanulmányban. A férfiakban magasabb a vérviszkozitás, a haematocrit és a vörösvérsejt aggregatio, míg a vörösvérsejt deformabilitás alacsonyabb.^{6,82,121,122} A két nemben a vörösvérsejtek koreloszlása is szignifikánsan különbözik: a nők vérében több a fiatal vörösvérsejt, mint a férfiakéban. Az idősebb vörösvérsejteknek a fiatal sejtekhez képest nagyobb a mechanikai fragilitásuk, rigiditásuk és fokozott az aggregabilitásuk. Ennek köszönhetően a férfiakban több vörösvérsejt kerül fagocitózisra, ami nagyobb mennyiségű haemoglobin kibocsátásával jár a plazmába. A szabad haemoglobinnak erős érösszehúzó hatása van, mivel képes a nitrogén-monoxidhoz kötődni, így csökkentve annak koncentrációját, illetve vasodilatátor és thrombocyta aggregatio gátló hatását.⁶ Ezek a tulajdonságok hozzájárulhatnak ahhoz, hogy a férfiakban fokozott a cardiovascularis betegségek kialakulásának esélye. Kísérletünkben a vörösvérsejt aggregatio a Kontroll csoportok esetén a hímekben volt magasabb, viszont humán adatokkal ellentétben, I/R hatására a nőstények mutattak nagyobb aggregációs index értékeket, amelynek oka a nőstény patkányokban megfigyelhető magasabb fibrinogén szintben keresendő.¹²³

Kimutatták továbbá, hogy politraumatizált, menopausa előtt álló nőkben szignifikánsan kevesebb többszervi károsodás alakul ki, mint férfi betegekben, ami alacsonyabb citokinin szintekkel is együtt jár.¹²⁴ Ezt a megfigyelést kísérletek is megerősítik, magasabb ösztadiol szinttel rendelkező nőstény patkányokban intestinalis I/R után kisebb mértékű a bélbolyhok sérülése.¹²⁵ Az ösztrogén protektív hatását megfigyelték már ischaemiás szív, agy és végtag károsodások során.^{126,127} Vékonybél I/R során adott ösztadiol terápia csökkentette a lokális és a távoli szervi (tüdő) sérüléseket is hím patkányokban.^{128,129} A védőhatás hátterében komplex mechanizmusok állnak: az ösztrogének szerepet játszanak a géntranszkripcióban, intracellularis szignalizációban, vasoregulációban, illetve antioxidáns és gyulladásgátló hatásuk is van, csökkentik a citokinek szintjét, a fehérvérsejtek migrációját és az adhesiós molekulák expresszióját.^{7,83,84} Néhány humán tanulmányban azonban az ösztrogén helyettesítő terápia növelte a cardiovascularis események incidenciáját nőkben.⁸⁵ Ez az ellentmondás is kiemeli a terület további kutatásának fontosságát.

Bármely sebészeti beavatkozás vagy kórkép, amely egy szerv vagy szövet vérátáramlásnak megszűnésével, majd a vérellátás helyreállításával jár, ischaemia-reperfúziós károsodást, illetve lokális és távoli szervi sérülést okozhat. A micro-rheologiai paraméterek vizsgálata fontos információt szolgáltat az intestinalis I/R pathomechanizmusáról és

potenciális terápiás lehetőségekről. Kutatásunk felhívja a klinikusok figyelmét arra is, hogy az idősebb betegekben súlyosabbak lehetnek ezek a károsodások.

A tanulmány néhány limitációját figyelembe kell venni. Először is, az állatoktól levehető vérminták mennyisége korlátozza a meghatározható paraméterek számát. Ezen kívül, a kísérleti protokollt figyelembe véve, az állatok hosszabb távú követése nem volt kivitelezhető. Egy másik tényező a fajok közötti különbségek és az adatok extrapolálhatósága, amely minden állatkísérlet természetes limitációját jelenti. A megfigyelési időszak teljes hossza alatt a fiatal kontroll csoportot követtük végig, az idősebb kontroll csoportban csak az alap minták kerültek mérésre. Az alap értékek esetén észlelhető volt néhány különbség a csoportok között (III. és IV. táblázat), de véleményünk szerint ezek a különbségek hasonló mértékűek lennének a kétórás periódus után is, amit alátámaszt, hogy egy előző vékonybél I/R kísérletben a kontroll csoport értékei csak kismértékben változtak.⁴⁸ Ezért, állatjóléti szempontokat is figyelembe véve, megpróbáltuk csökkenteni a kontroll állatok számát, és az I/R különbségeire fókuszálni a hím és nőstény, illetve fiatal és idősebb csoportok között.

7. FONTOSABB EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. Kimutattuk, hogy patkányban 30 perces vékonybél ischaemia, illetve az ezt követő 120 perces reperfusio során a haematocrit, a vörösvérsejtszám és a fehérvérsejtszám szignifikánsan emelkedtek. A micro-rheologiai paraméterek romlottak a megfigyelési periódus alatt. A vékonybél mikrokeringési értékei az ischaemia alatt csökkentek és nem normalizálódtak teljes mértékben a reperfusio végére.
2. Kimutatásra került, hogy intestinalis ischaemia-reperfusio során a távoli szervek közül a máj és a vese mikrokeringési értékei csökkentek és szövettani vizsgálattal is ugyanezen szervek esetén találtunk eltérést.
3. Bebizonyítottuk, hogy vékonybél ischaemia-reperfusio során a haematologiai és micro-rheologiai paraméterek nemi és életkorbeli különbségeket mutatnak patkányokban. Az idősebb hím I/R csoportban mutatkozott legmagasabbnak a haematocrit és a vörösvérsejtszám a reperfusio végén, valamint ennek a csoportnak voltak a legrosszabb vörösvérsejt deformabilitási értékei a vizsgálat során.
4. Kimutattuk, hogy a mesenterialis ischaemia-reperfusio jelentős szöveti károsodást okozott. A szövettani analízis szerint az I/R okozta változások az idősebb csoportokban voltak a leg súlyosabbak.

A micro-rheologiai paraméterekben bekövetkezett eltérések hozzájárulhatnak a lokális és távoli szervek mikrokeringésének romlásához. A vékonybél ischaemia-reperfusio patofiziológiájának jobb megismerése további, haemorheologiai terápia kifejlesztését szolgálhatja. A megfigyelt nemi különbségek és korfüggő eltérések hasznos információval szolgálhatnak további kísérletek tervezéséhez és az eredmények értékeléséhez.

8. Összefoglalás

A vékonybél ischaemia egy magas mortalitású kórkép, melyet számos betegség okozhat. Az ischaemia-reperfusio (I/R) során kialakuló változások nagymértékben befolyásolják a vér micro-rheológiai tulajdonságait, a vörösvérsejt aggregatiót és deformabilitást, melyek a mikrokeringés fontos meghatározói. Egyre több irodalmi adat támasztja alá az I/R okozta károsodások korfüggő eltéréseinek és nemi különbségeinek fontosságát. Ezért célul tűztük ki a vékonybél I/R korai szisztémás micro-rheológiai következményeinek, valamint mikrokeringési és hisztomorfológiai hatásainak, illetve ezek nemi és korfüggő eltéréseinek vizsgálatát kísérletes modellben.

Általános anesthesiában patkányokon kanülálásra került a bal oldali a. femoralis, majd median laparotomia történt. A kontroll állatokban más beavatkozást nem végeztünk. Az I/R csoportokban az a. mesenterica superiorat atraumatikus klippel 30 percre leszorítottuk, majd 120 perc reperfúziós időszak következett. Az ischaemia előtt és után, valamint a reperfusio 30., 60., és 120. percében vért vettünk a kanülált artériából a haematológiai paraméterek, a vörösvérsejt aggregatio és a deformabilitás meghatározására, a mikrokeringés vizsgálatával párhuzamosan. A kísérlet végén szövettani mintavétel történt a vékonybélből, a májból, a veséből, a hasnyálmirigyből és a tüdőből.

A haematocrit, a vörösvérsejt, a fehérvérsejt és a thrombocyta szám emelkedése az akut fázis reakció történéseit tükrözték. A micro-rheológiai paraméterek közül a vörösvérsejt aggregatio mutatott nagyobb mértékű változásokat, míg a vörösvérsejt deformabilitás kismértékben romlott. A mikrokeringési értékek a vékonybél esetén az ischaemia alatt csökkentek, a máj és a vese vonatkozásában a reperfusio során találtunk eltérést.

A korfüggő és nemi különbségek tekintetében a vörösvérsejt deformabilitás romlása a hím és az idősebb patkányokban volt nagyobb mértékű. Az aggregatio a nőstényeknél fokozódott jelentősebben. A szövettani vizsgálat alapján jelentős károsodás volt kimutatható az I/R csoportokban. A szövettani vizsgálatok során a hímek és nőstények, illetve a fiatal és idősebb csoportok között szignifikáns különbség nem volt látható, azonban az I/R okozta változások az idősebb csoportokban voltak a legsúlyosabbak.

A micro-rheológiai paraméterekben bekövetkezett korai és szignifikáns mértékű eltérések hozzájárulhatnak a mikrokeringés romlásához. A micro-rheológiai paraméterek nemi és életkorbeli alapkülönbségeket mutattak patkányokban. Ezen megfigyelések hasznos információval szolgálhatnak további kísérletek tervezéséhez, az eredmények értékeléséhez, prevenció és terápiás lehetőségek kiterjesztéséhez.

Summary

Intestinal ischemia is a life-threatening clinical disorder associated with several conditions. Ischemia-reperfusion (I/R) may cause significant alterations in the flow properties of blood, mainly in erythrocyte aggregation and deformability, which are important determinants of the microcirculation. More and more studies support the importance of gender- and age-related differences caused by I/R injuries. Thus, the aim of our study was to investigate the early effects of intestinal I/R on systemic hemorheological parameters, microcirculation and histomorphology of selected intra-abdominal organs along with the gender- and age related differences of these parameters in an experimental model.

Under general anesthesia the left femoral artery was cannulated and midline laparotomy was performed in rats. In the Control groups there were no other interventions. In the I/R groups the superior mesenteric artery was clipped atraumatically for 30 minutes and 120 minutes of reperfusion was observed afterwards. Before and after the ischemia, at the 30th, 60th and 120th minute of the reperfusion blood samples were taken from the cannulated artery to determine hematological parameters, red blood cell aggregation and deformability, parallel with microcirculatory monitoring. At the end of the experiments samples were taken from the small intestine, liver, kidney, pancreas and lungs for histological examinations.

Elevated hematocrit, red blood cell count, leukocyte count and platelet count may be associated with the acute phase reactions. In case of the micro-rheological factors, red blood cell aggregation deteriorated in a greater degree, while deformability showed smaller alterations. Intestinal blood flux units decreased during the ischemia, the liver and kidney microcirculatory BFU values decreased in the course of the reperfusion.

Regarding age- and gender related differences, erythrocyte deformability was worse in the older and male animals. The most expressed rise of aggregation was observed in the I/R female groups. Histological examinations did not show significant differences between male and female or younger and older groups, however the I/R induced changes were the most severe in the older groups.

The worsening of micro-rheological parameters during ischemia-reperfusion may contribute to microcirculatory disturbances of local and remote organs. The microrheological parameters show gender and age-related differences in rats. These observations have great importance regarding the planning and evaluation of experiments and may be useful for introducing preventive and therapeutic protocols.

9. IRODALOMJEGYZÉK

9.1. Hivatkozott közlemények jegyzéke

1. Clair DG, Beach JM. Mesenteric ischemia. *N Engl J Med*. 2016;374(10):959-968.
2. Oldenburg WA, Lau LL, Rodenberg TJ, Edmonds HJ, Burger CD. Acute mesenteric ischemia: A clinical review. *Arch Intern Med*. 2004;164(10):1054-1062.
3. Boros M. Microcirculatory dysfunction during intestinal ischemia-reperfusion. *Acta Physiol Hung*. 2003;90(4):263-279.
4. Kassahun WT, Schulz T, Richter O, Hauss J. Unchanged high mortality rates from acute occlusive intestinal ischemia: Six year review. *Langenbecks Arch Surg*. 2008;393(2):163-171.
5. Tilsed JVT, Casamassima A, Kurihara H, et al. ESTES guidelines: Acute mesenteric ischaemia. *European Journal of Trauma and Emergency Surgery*. 2016;42:253-270.
6. Kameneva MV, Watach MJ, Borovetz HS. Gender difference in rheologic properties of blood and risk of cardiovascular diseases. *Clin Hemorheol Microcirc*. 1999;21(3-4):357-363.
7. Mendelsohn ME. Genomic and nongenomic effects of estrogen in the vasculature¹. *Am J Cardiol*. 2002;90(1, Supplement 1):F3-F4.
8. Pongrácz E, Csornai M. A haemorheologiai terapia általános szempontjai. In: Bernát SI, Pongrácz E, eds. *A klinikai haemorheologia alapjai*. Budapest: Kornétás Kiadó; 1999:55-89.
9. Acosta S. Epidemiology of mesenteric vascular disease: Clinical implications. *Semin Vasc Surg*. 2010;23(1):4-8.
10. Acosta S. Mesenteric ischemia. *Curr Opin Crit Care*. 2015;21(2):171-178.
11. Yasuhara H. Acute mesenteric ischemia: The challenge of gastroenterology. *Surg Today*. 2005;35(3):185-195.
12. American gastroenterological association medical position statement: Guidelines on intestinal ischemia. *Gastroenterology*. 2000;118(5):951-953.
13. Brandt LJ, Boley SJ. AGA technical review on intestinal ischemia. american gastrointestinal association. *Gastroenterology*. 2000;118(5):954-968.
14. Falkensammer J, Oldenburg WA. Surgical and medical management of mesenteric ischemia. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*. 2006;8(2):137-143.
15. Bobadilla JL. Mesenteric ischemia. *Surg Clin North Am*. 2013;93(4):925-40.
16. van Noord D, Kuipers EJ, Mensink PBF. Single vessel abdominal arterial disease. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2009;23(1):49-60.

17. Herbert GS, Steele SR. Acute and chronic mesenteric ischemia. *Surg Clin North Am.* 2007;87(5):1115-34.
18. Gonzalez LM, Moeser AJ, Blikslager AT. Animal models of ischemia-reperfusion-induced intestinal injury: Progress and promise for translational research. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2015;308(2):63-75.
19. Kumar S, Sarr MG, Kamath PS. Mesenteric venous thrombosis. *N Engl J Med.* 2001;345(23):1683-1688.
20. Bassiouny HS. Nonocclusive mesenteric ischemia. *Surg Clin North Am.* 1997;77(2):319-326.
21. Chen Y, Chang KT, Lian DW. The role of ischemia in necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg.* 2016;51(8):1255-61.
22. Siniscalchi A, Spedicato S, Lauro A, et al. Intraoperative coagulation evaluation of ischemia-reperfusion injury in small bowel transplantation: A way to explore. *Transplant Proc.* 2006;38(3):820-822.
23. Vollmar B, Menger MD. Intestinal ischemia/reperfusion: Microcirculatory pathology and functional consequences. *Langenbecks Arch Surg.* 2011;396(1):13-29.
24. Bulkley GB, Kvietys PR, Parks DA, Perry MA, Granger DN. Relationship of blood flow and oxygen consumption to ischemic injury in the canine small intestine. *Gastroenterology.* 1985;89(4):852-857.
25. Boley SJ, Brandt LJ, Veith FJ. Ischemic disorders of the intestines. *Curr Probl Surg.* 1978;15(4):1-85.
26. Wilcox MG, Howard TJ, Plaskon LA, Unthank JL, Madura JA. Current theories of pathogenesis and treatment of nonocclusive mesenteric ischemia. *Dig Dis Sci.* 1995;40(4):709-716.
27. Guan Y, Worrell RT, Pritts TA, Montrose MH. Intestinal ischemia-reperfusion injury: Reversible and irreversible damage imaged in vivo. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009;297(1):187-96.
28. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology.* 2001;94(6):1133-1138.
29. Blaser H, Dostert C, Mak TW, Brenner D. TNF and ROS crosstalk in inflammation. *Trends in Cell Biology.* 2016;26(4):249-261.
30. Jezek J, Jaburek M, Zelenka J, Jezek P. Mitochondrial phospholipase A2 activated by reactive oxygen species in heart mitochondria induces mild uncoupling. *Physiol Res.* 2010;59(5):737-747.
31. Muralikrishna Adibhatla R, Hatcher JF. Phospholipase A2, reactive oxygen species, and lipid peroxidation in cerebral ischemia. *Free Radic Biol Med.* 2006;40(3):376-387.

32. Granger DN, Kvietys PR. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biol.* 2015;6:524-551.
33. Fukai T, Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: Role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal.* 2011;15(6):1583-1606.
34. Nanobashvili J, Neumayer C, Fuegl A, et al. Ischaemia/reperfusion injury of skeletal muscle: Mechanisms, morphology, treatment strategies, and clinical applications; ischemia/reperfusionsschaden der skelettmuskulatur: Mechanismen, morphologie, behandlungsstrategien und klinische anwendungen. *European Surgery.* 2002;34(2):83-89.
35. Galley HF. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. *Br J Anaesth.* 2011;107(1):57-64.
36. Mallick IH, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM. Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. *Dig Dis Sci.* 2004;49(9):1359-1377.
37. Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nat Med.* 2011;17(11):1391-1401.
38. Tauber S, Menger MD, Lehr HA. Microvascular in vivo assessment of reperfusion injury: Significance of prostaglandin E(1) and I(2) in postischemic "no-reflow" and "reflow-paradox". *J Surg Res.* 2004;120(1):1-11.
39. Massberg S, Enders G, Matos FC, et al. Fibrinogen deposition at the postischemic vessel wall promotes platelet adhesion during ischemia-reperfusion in vivo. *Blood.* 1999;94(11):3829-3838.
40. Schoots IG, Levi M, Roossink EH, Bijlsma PB, van Gulik TM. Local intravascular coagulation and fibrin deposition on intestinal ischemia-reperfusion in rats. *Surgery.* 2003;133(4):411-419.
41. Schoots IG, Levi M, van Vliet AK, Maas AM, Roossink EH, van Gulik TM. Inhibition of coagulation and inflammation by activated protein C or antithrombin reduces intestinal ischemia/reperfusion injury in rats. *Crit Care Med.* 2004;32(6):1375-1383.
42. Salter JW, Kriegstein CF, Issekutz AC, Granger DN. Platelets modulate ischemia/reperfusion-induced leukocyte recruitment in the mesenteric circulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001;281(6):1432-9.
43. Parks DA, Granger DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol.* 1986;250(6 Pt 1):749-53.
44. Reffelmann T, Kloner RA. The no-reflow phenomenon: A basic mechanism of myocardial ischemia and reperfusion. *Basic Res Cardiol.* 2006;101(5):359-372.
45. Kaszaki J, Wolfárd A, Szalay L, Boros M. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc.* 2006;38(3):826-828.

46. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol.* 2000;190(3):255-266.
47. Sileri P, Morini S, Schena S, et al. Intestinal ischemia/reperfusion injury produces chronic abnormalities of absorptive function. *Transplantation Proceedings.* 2002;34(3):984.
48. Kong SE, Blennerhassett LR, Heel KA, McCauley RD, Hall JC. Ischaemia-reperfusion injury to the intestine. *Aust N Z J Surg.* 1998;68(8):554-561.
49. Ozban M, Aydin C, Cevahir N, et al. The effect of melatonin on bacterial translocation following ischemia/reperfusion injury in a rat model of superior mesenteric artery occlusion. *BMC Surg.* 2015;15:18-015-0003-7.
50. Mura M, Andrade CF, Han B, et al. Intestinal ischemia-reperfusion-induced acute lung injury and oncotic cell death in multiple organs. *Shock.* 2007;28(2):227-238.
51. Kalia N, Brown NJ, Hopkinson K, Stephenson TJ, Wood RF, Pockley AG. FK409 inhibits both local and remote organ damage after intestinal ischaemia. *J Pathol.* 2002;197(5):595-602.
52. Ishii H, Ishibashi M, Takayama M, Nishida T, Yoshida M. The role of cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 in neutrophil-mediated remote lung injury after intestinal ischaemia/reperfusion in rats. *Respirology.* 2000;5(4):325-331.
53. Pierro A, Eaton S. Intestinal ischemia reperfusion injury and multisystem organ failure. *Seminars in Pediatric Surgery.* 2004;13(1):11-17.
54. Megison SM, Horton JW, Chao H, Walker PB. A new model for intestinal ischemia in the rat. *J Surg Res.* 1990;49(2):168-173.
55. Grootjans J, Lenaerts K, Derikx JPM, et al. Human intestinal ischemia-Reperfusion–Induced inflammation characterized: Experiences from a new translational model. *The American Journal of Pathology.* 2010;176(5):2283-2291.
56. Grootjans J, Lenaerts K, Buurman WA, Dejong CH, Derikx JP. Life and death at the mucosal-luminal interface: New perspectives on human intestinal ischemia-reperfusion. *World J Gastroenterol.* 2016;22(9):2760-2770.
57. Leung FW, Su KC, Passaro E, Jr, Guth PH. Regional differences in gut blood flow and mucosal damage in response to ischemia and reperfusion. *Am J Physiol.* 1992;263(3 Pt 1):G301-5.
58. Park PO, Haglund U, Bulkley GB, Falt K. The sequence of development of intestinal tissue injury after strangulation ischemia and reperfusion. *Surgery.* 1990;107(5):574-580.
59. Bellamy JE, Latshaw WK, Nielsen NO. The vascular architecture of the porcine small intestine. *Can J Comp Med.* 1973;37(1):56-62.
60. Chen YM, Zhang JS, Duan XL. Changes of microvascular architecture, ultrastructure and permeability of rat jejunal villi at different ages. *World J Gastroenterol.* 2003;9(4):795-799.

61. Bianciardi P, Scorza R, Ghilardi G, Samaja M. Xanthine oxido-reductase activity in ischemic human and rat intestine. *Free Radic Res.* 2004;38(9):919-925.
62. Blikslager AT, Roberts MC, Rhoads JM, Argenzio RA. Is reperfusion injury an important cause of mucosal damage after porcine intestinal ischemia? *Surgery.* 1997;121(5):526-534.
63. Tóth K, Juricskay I. Rheologiai alapfogalmak. In: Bernát SI, Pongrácz E, eds. *A klinikai haemorheologia alapjai.* Budapest: Kornétás Kiadó; 1999:13-24.
64. Lipowsky HH. Microvascular rheology and hemodynamics. *Microcirculation.* 2005;12(1):5-15.
65. Popel AS, Johnson PC. Microcirculation and hemorheology. *Annu Rev Fluid Mech.* 2005;37:43-69.
66. Baskurt OK, Meiselman HJ. Blood rheology and hemodynamics. *Semin Thromb Hemost.* 2003;29(5):435-450.
67. Baskurt OK, Meiselman HJ. Analyzing shear stress-elongation index curves: Comparison of two approaches to simplify data presentation. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2004;31(1):23-30.
68. Mohandas N, Gallagher PG. Red cell membrane: Past, present, and future. *Blood.* 2008;112(10):3939-3948.
69. Neu B, Meiselman HJ. Red blood cell aggregation. In: Baskurt OK, Hardeman MR, Rampling MW, Meiselman HJ, eds. *Handbook of hemorheology and hemodynamics.* The Netherlands: IOS Press; 2007:114-136.
70. Rampling MW, Meiselman HJ, Neu B, Baskurt OK. Influence of cell-specific factors on red blood cell aggregation. *Biorheology.* 2004;41(2):91-112.
71. Saldanha C. Fibrinogen interaction with the red blood cell membrane. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2013;53(1-2):39-44.
72. Neu B, Meiselman HJ. Depletion-mediated red blood cell aggregation in polymer solutions. *Biophysical Journal.* 2002;83(5):2482-2490. Accessed 1/13/2018 11:02:49 AM. doi:
73. FAHRAEUS R. The influence of the rouleau formation of the erythrocytes on the rheology of the blood. *Acta Med Scand.* 1958;161(2):151-165.
74. Fåhræus R, Lindqvist T. The viscosity of the blood in narrow capillary tubes. *Am J Physiol.* 1931;96:562-568.
75. Mohandas N, Chasis JA. Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: Regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids. *Semin Hematol.* 1993;30(3):171-192.
76. Tateishi N, Suzuki Y, Cicha I, Maeda N. O(2) release from erythrocytes flowing in a narrow O(2)-permeable tube: Effects of erythrocyte aggregation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;281(1):H448-56.

77. Pearson MJ, Lipowsky HH. Influence of erythrocyte aggregation on leukocyte margination in postcapillary venules of rat mesentery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;279(4):H1460-71.
78. Yedgar S, Koshkaryev A, Barshtein G. The red blood cell in vascular occlusion. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2002;32(5-6):263-268.
79. Liochev SI. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. *Free Radical Biology and Medicine*. 2013;60:1-4.
80. Simmonds MJ, Meiselman HJ, Baskurt OK. Blood rheology and aging. *J Geriatr Cardiol*. 2013;10(3):291-301.
81. Vaya A, Alis R, Romagnoli M, et al. Rheological blood behavior is not only influenced by cardiovascular risk factors but also by aging itself. research into 927 healthy spanish mediterranean subjects. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2013;54(3):287-296.
82. Baev VM. Effect of sex on rheological properties of blood in adults. *Klin Lab Diagn*. 2001;(12)(12):33-35.
83. Lang TJ. Estrogen as an immunomodulator. *Clinical Immunology*. 2004;113(3):224-230.
84. Prokai-Tatrai K, Perjesi P, Rivera-Portalatin NM, Simpkins JW, Prokai L. Mechanistic investigations on the antioxidant action of a neuroprotective estrogen derivative. *Steroids*. 2008;73(3):280-288.
85. Grodstein F, Manson JE, Colditz GA, Willett WC, Speizer FE, Stampfer MJ. A prospective, observational study of postmenopausal hormone therapy and primary prevention of cardiovascular disease. *Ann Intern Med*. 2000;133(12):933-941.
86. Baskurt OK. Methods in hemorheology. In: Baskurt OK, Hardeman MR, Rampling MW, Meiselman HJ, eds. *Handbook of hemorheology and hemodynamics*. Amsterdam, The Netherlands: IOS Press; 2007:242-266.
87. Ong PK, Jain S, Namgung B, et al. Study of time-dependent characteristics of a syllectogram in the presence of aggregation inhibition. *International Journal of Precision Engineering and Manufacturing*. 2012;13(3):421-428.
88. Bogár L. Diagnosztika. In: Bernát SI, Pongrácz E, eds. *A klinikai haemorheologia alapjai*. Budapest: Kornétás Kiadó; 1999:33-50.
89. Fredriksson I, Larsson M, Strömberg T. Laser doppler flowmetry. In: Leahy MJ, ed. *Microcirculation imaging*. Weinheim: Wiley-Blackwell; 2012:67-86.
90. Holloway GA, Jr, Watkins DW. Laser doppler measurement of cutaneous blood flow. *J Invest Dermatol*. 1977;69(3):306-309.
91. Shiogai Y, Stefanovska A, McClintock P. Nonlinear dynamics of cardiovascular ageing. *Physics Reports*. 2009;488(2-3):51-110.

92. Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, Scott HJ, Gurd FN. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. *Arch Surg.* 1970;101(4):478-483.
93. Koppensteiner R. Blood rheology in emergency medicine. *Semin Thromb Hemost.* 1996;22(1):89-91.
94. Kocael A, Inal BB, Guntas G, et al. Evaluation of matrix metalloproteinase, myeloperoxidase, and oxidative damage in mesenteric ischemia-reperfusion injury. *Hum Exp Toxicol.* 2016;35(8):851-60.
95. Parks DA, Williams TK, Beckman JS. Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: A reevaluation. *Am J Physiol.* 1988;254(5 Pt 1):G768-74.
96. Baskurt OK. Mechanisms of blood rheology alterations. In: Baskurt OK, Hardeman MR, Rampling MW, Meiselman HJ, eds. *Handbook of hemorheology and hemodynamics.* Amsterdam, The Netherlands: IOS Press; 2007:170-190.
97. Baskurt OK, Temiz A, Meiselman HJ. Effect of superoxide anions on red blood cell rheologic properties. *Free Radic Biol Med.* 1998;24(1):102-110.
98. Gori T, Lisi M, Forconi S. Ischemia and reperfusion: The endothelial perspective. A radical view. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2006;35(1-2):31-34.
99. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2012;298:229-317.
100. Reinhart WH, Gaudenz R, Walter R. Acidosis induced by lactate, pyruvate, or HCl increases blood viscosity. *J Crit Care.* 2002;17(1):68-73.
101. Nemeth N, Furka I, Miko I. Hemorheological changes in ischemia-reperfusion: An overview on our experimental surgical data. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2014;57(3):215-225.
102. Jung F, Mrowietz C, Hiebl B, Franke RP, Pindur G, Sternitzky R. Influence of rheological parameters on the velocity of erythrocytes passing nailfold capillaries in humans. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2011;48(1):129-139.
103. Bouleti C, Mewton N, Germain S. The no-reflow phenomenon: State of the art. *Arch Cardiovasc Dis.* 2015;108(12):661-674.
104. Hoff DAL, Gregersen H, Hatlebakk JG. Mucosal blood flow measurements using laser doppler perfusion monitoring. *World Journal of Gastroenterology : WJG.* 2008;15(2):198-203.
105. Derikx JPM, Matthijsen RA, de Bruïne AP, van Dam RM, Buurman WA, Dejong CHC. A new model to study intestinal ischemia-reperfusion damage in man. *J Surg Res.* 2011;166(2):222-226.
106. Franke N, Endrich B, Laubenthal H, Peter K, Messmer K. The effect of pentobarbital on the microcirculation of skeletal muscles and the subcutis. an animal-experimental study. *Anasth Intensivther Notfallmed.* 1982;17(1):11-14.

107. Obeid AN, Barnett NJ, Dougherty G, Ward G. A critical review of laser doppler flowmetry. *J Med Eng Technol.* 1990;14(5):178-181.
108. Vongsavan N, Matthews B. Some aspects of the use of laser doppler flow meters for recording tissue blood flow. *Exp Physiol.* 1993;78(1):1-14.
109. Malafaia O, Brioschi ML, Aoki SM, et al. Infrared imaging contribution for intestinal ischemia detection in wound healing. *Acta Cir Bras.* 2008;23(6):511-519.
110. Berland T, Oldenburg WA. Acute mesenteric ischemia. *Curr Gastroenterol Rep.* 2008;10(3):341-346.
111. Chu W, Li S, Wang S, Yan A, Nie L. Ischemic postconditioning provides protection against ischemia-reperfusion injury in intestines of rats. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(6):6474-6481.
112. Granger DN, Hollwarth ME, Parks DA. Ischemia-reperfusion injury: Role of oxygen-derived free radicals. *Acta Physiol Scand Suppl.* 1986;548:47-63.
113. Lee BK, Durairaj A, Mehra A, Wenby RB, Meiselman HJ, Alexy T. Microcirculatory dysfunction in cardiac syndrome X: Role of abnormal blood rheology. *Microcirculation.* 2008;15(5):451-459.
114. Baskurt OK. In vivo correlates of altered blood rheology. *Biorheology.* 2008;45(6):629-638.
115. Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. *Br Med Bull.* 2004;70:71-86.
116. Azhar G, Gao W, Liu L, Wei JY. Ischemia-reperfusion in the adult mouse heart: Influence of age. *Exp Gerontol.* 1999;34(5):699-714.
117. Harris NR, Rumbaut RE. Age-related responses of the microcirculation to ischemia-reperfusion and inflammation. *Pathophysiology.* 2001;8(1):1-10.
118. Sengupta P. The laboratory rat: Relating its age with human's. *Int J Prev Med.* 2013;4(6):624-630.
119. Kusaka J, Koga H, Hagiwara S, Hasegawa A, Kudo K, Noguchi T. Age-dependent responses to renal ischemia-reperfusion injury. *Journal of Surgical Research.* 2012;172(1):153-158.
120. Shah PC, Brolin RE, Amenta PS, Deshmukh DR. Effect of aging on intestinal ischemia and reperfusion injury. *Mech Ageing Dev.* 1999;107(1):37-50.
121. Bogar L, Juricskay I, Kesmarky G, Feher G, Kenyeres P, Toth K. Gender differences in hemorheological parameters of coronary artery disease patients. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2006;35(1-2):99-103.

122. Wiewiora M, Sosada K, Slowinska L, et al. Sex-dependent differences in rheological properties and the relation of blood viscosity to erythrocyte aggregation indices among morbidly obese patients. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2010;44(4):259-267.
123. Nemeth N, Kiss F, Furka I, Miko I. Gender differences of blood rheological parameters in laboratory animals. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2010;45(2-4):263-272.
124. Frink M, Pape HC, van Griensven M, Krettek C, Chaudry IH, Hildebrand F. Influence of sex and age on mods and cytokines after multiple injuries. *Shock.* 2007;27(2):151-156.
125. Deitch EA, Feketeova E, Lu Q, et al. Resistance of the female, as opposed to the male, intestine to I/R-mediated injury is associated with increased resistance to gut-induced distant organ injury. *Shock.* 2008;29(1):78-83.
126. Wise PM, Dubal DB, Wilson ME, Rau SW, Böttner M, Rosewell KL. Estradiol is a protective factor in the adult and aging brain: Understanding of mechanisms derived from in vivo and in vitro studies. *Brain Res Rev.* 2001;37(1-3):313-319.
127. Dubal DB, Kashon ML, Pettigrew LC, et al. Estradiol protects against ischemic injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1998;18(11):1253-1258.
128. Breithaupt-Faloppa AC, Thais Fantozzi E, Romero DC, et al. Acute effects of estradiol on lung inflammation due to intestinal ischemic insult in male rats. *Shock.* 2014;41(3):208-213.
129. Ricardo-da-Silva FY, Fantozzi ET, Rodrigues-Garbin S, et al. Estradiol modulates local gut injury induced by intestinal ischemia-reperfusion in male rats. *Shock.* 2017.

9.2. Az értekezés alapjául szolgáló és egyéb *in extenso* közlemények hitelesített listája



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/100/2018.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

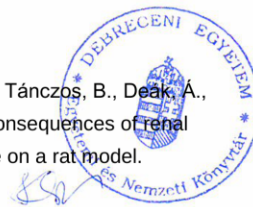
Jelölt: Mester Anita
Neptun kód: HFWA3B
Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Mester, A., Magyar, Z., Molnár, Á., Somogyi, V., Tanczos, B., Pető, K., Németh, N.: Age- and gender-related hemorheological alterations in intestinal ischemia-reperfusion in the rat.
J. Surg. Res. 225, 68-75, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jss.2017.12.043>
IF: 2.187 (2016)
2. Mester, A., Magyar, Z., Somogyi, V., Tanczos, B., Stark, Y., Cherniavsky, K., Bidiga, L., Pető, K., Németh, N.: Intestinal ischemia-reperfusion leads to early systemic micro-rheological and multiorgan microcirculatory alterations in the rat.
Clin. Hemorheol. Microcirc. 68 (1), 35-44, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-170278>
IF: 1.679 (2016)

További közlemények

3. Magyar, Z., Mester, A., Nadubinszky, G., Varga, G., Souleiman, G., Somogyi, V., Tanczos, B., Deák, Á., Bidiga, L., Mihai, O., Pető, K., Németh, N.: Beneficial effects of remote organ ischemic preconditioning on micro-rheological parameters during liver ischemia-reperfusion in the rat.
Clin. Hemorheol. Microcirc. "Accepted by Publisher", 2018.
IF: 1.679 (2016)
4. Pető, K., Németh, N., Mester, A., Magyar, Z., Souleiman, G., Somogyi, V., Tanczos, B., Deák, Á., Bidiga, L., Frecska, E., Nemes, B.: Hemorheological and metabolic consequences of renal ischemia-reperfusion and their modulation by N,N-dimethyltryptamine on a rat model.
Clin. Hemorheol. Microcirc. [Epub ahead of print], 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-170361>
IF: 1.679 (2016)





5. Magyar, Z., Molnár, Á., Nachmias, B. D., Mann, D., Somogyi, V., Mester, A., Pető, K., Németh, N.:
Impact of groin flap ischemia-reperfusion on red blood cell micro-rheological parameters in a
follow-up study on rats.
Clin. Hemorheol. Microcirc. [Epub ahead of print], 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-170277>
IF: 1.679 (2016)
6. Józsa, T., Klárik, Z., Kiss, F., Tóth, E., Mester, A., Hargitai, Z., Changchien, Y. C., Fossum, M.,
Németh, N.: Morphological and microcirculatory evaluation of the rat testis after detorsion
with or without a capsular release with a tunica vaginalis flap.
Asian J. Androl. 18 (3), 462-466, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.4103/1008-682X.157546>
IF: 2.996
7. Németh, N., Kiss, F., Klárik, Z., Tóth, E., Mester, A., Furka, I., Mikó, I.: Simultaneous investigation
of hemodynamic, microcirculatory and arterio-venous micro-rheological parameters in
infrarenal or suprarenal aortic cross-clamping model in the rat.
Clin. Hemorheol. Microcirc. 57 (4), 339-353, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-131724>
IF: 2.242

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 14,141

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
3,866

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai
ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján
elvégezte.

Debrecen, 2018.04.23.



10. Tárgyszavak

vékonybél ischaemia-reperfusio	intestinal ischaemia-reperfusion
micro-rheologia	microrheology
vörösvérsejt deformabilitás	red blood cell deformability
vörösvérsejt aggregatio	red blood cell aggregation
korfüggő és nemi különbségek	age-related and gender differences
mikrokeringés	microcirculation
kísérletes sebészeti kutatás	experimental surgical research

11. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek, Dr. Németh Norbert tanszékvezető egyetemi docens Úrnak, aki IV. éves orvostanhallgató korom óta témavezetőként segítette Tudományos Diákköri és DETEP munkámat, és vezetése mellett végezhettem PhD kutatómunkámat. Köszönöm tanácsait, biztatását és támogatását.

Köszönöm Prof. Dr. Furka Istvánnak és Prof. Dr. Mikó Irénnek, hogy tanulhattam tőlük.

Köszönettel tartozom a Sebészeti Műtéttani Tanszék jelenlegi PhD hallgatóinak, Dr. Magyar Zsuzsannának, Somogyi Viktóriának és Tánczos Bencének, hogy kutatómunkám során nagy segítséget nyújtottak a kísérletek kivitelezésében és a laboratóriumi mérésekben, illetve barátságukért és a jó hangulatban eltöltött munkanapokért.

Köszönet illeti Dr. Pető Katalin és Dr. Deák Ádám adjunktusokat, akikhez bármikor fordulhattam tanácsért.

Köszönetet mondok a Sebészeti Műtéttani Tanszék valamennyi dolgozójának, kiemelve Gödényné Rozáliát, akiktől rengeteg segítséget kaptam munkám során.

Köszönöm Dr. Bidiga László tanársegéd Úrnak az idejét és a szövettani vizsgálatokban nyújtott segítségét.

Nem utolsó sorban szeretném megköszönni Családomnak a támogatásukat és hogy tanulmányaimhoz nyugodt háttérrel biztosítottak. Végül hálás köszönettel tartozom Férjemnek türelméért és a mindennapok során nyújtott támogatásáért.

12. Függelék

Az értekezés alapját képező *in extenso* közlemények másolatai