

Távoli szervi kondicionálás: rövid távú hepatoprotectiv hatások patkánymodellben

Czigány Zoltán¹ ▪ Turóczy Zsolt dr.¹ ▪ Bulhardt Orsolya¹
Hegedüs Viktor dr.¹ ▪ Lotz Gábor dr.² ▪ Rakonczay Zoltán dr.³
Balla Zsolt dr.³ ▪ Harsányi László dr.¹ ▪ Szijártó Attila dr.¹

Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, ¹I. Sebészeti Klinika, ²II. Patológiai Intézet, Budapest

³Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, I. Belgyógyászati Klinika, Szeged

Bevezetés: Az ischaemiás-reperfüziós károsodások mérséklésére kipróbált módszerek között újszerű elképzelés a célszervi ischaemia *alatt* alkalmazott távoli szervi ischaemiás perkondicionálás. **Célkitűzés:** Patkánymáj ischaemiás-reperfüziós modellben alkalmazni ezen újszerű kondicionálási technikát. **Módszer:** Hím Wistar patkányok ($n = 30$, 10/csoport) 60 perc parciális ischaemiában, majd 60 perc reperfüzióban részesültek. Egy csoportban perkondicionálás került alkalmazásra a máj ischaemia utolsó 40 percében, az infarenalis aortán. A máj és az alsó végtag mikrokeringésének regisztrálása lézeres Doppler-áramlásmérővel történt. A reperfüziót követően a máj szövettani elváltozásainak analízise és a májszöveti hősokkfehérje-72-expresszió mérése mellett a szérumtranszamináz-aktivitások, továbbá a redox-homeosztázis állapotának meghatározása történt. **Eredmények:** A máj és az alsó végtag mikrocirkulációt jellemző paraméterei szignifikáns ($p < 0,05$) javulást mutattak a perkondicionált csoportban a kontrollhoz képest. A szérum-alanin-transzamináz-aktivitás és a májszövettani vizsgálatok, továbbá a májszöveti redox-homeosztázis vonatkozásában egyaránt szignifikánsan enyhébb károsodás volt megfigyelhető a perkondicionált csoportban a kontrollhoz képest. **Következtetés:** A perkondicionálás alkalmas lehet a máj ischaemiás-reperfüziós károsodásának mérséklésére. Orv. Hetil., 2012, 153, 1579–1587.

Kulcsszavak: ischaemia, reperfüzió, máj, távoli szervi kondicionálás, mikrocirkuláció

Remote ischemic conditioning: Short-term effects on rat liver ischemic-reperfusion injury

Introduction: Several techniques have been developed to reduce ischemic-reperfusion injury. A novel method is the remote ischemic preconditioning, applied *parallel* with target organ ischemia. **Aim:** The aim of the study was to determine the extent of liver ischemic-reperfusion injury via the application of this novel method. **Methods:** Male Wistar rats ($n = 30$, 10/group) were subjected to 60-minute partial liver ischemia and 60-minute reperfusion. Rats in the preconditioned group received conditioning treatment during the last 40 minutes of liver ischemia by infrarenal aortic clamping. Hepatic and lower limb microcirculation was monitored by laser Doppler flowmeter during reperfusion. After reperfusion, liver samples were taken for routine histological examination and redox-state assessment. Serum transaminase activities and liver tissue heat-shock protein-72 expression were measured. **Results:** Parameters of microcirculation showed significant ($p < 0.05$) improvement in the preconditioned group in comparison with the control. Besides the significant improvement observed in the serum alanine amino-transferase activities, significantly milder tissue injury was detected histologically in the liver sections of the preconditioned group. Moreover, significant improvement was found in the redox-state parameters. **Conclusion:** Preconditioning may be a reasonable possibility to reduce liver ischemic-reperfusion injury. Orv. Hetil., 2012, 153, 1579–1587.

Keywords: ischemia, reperfusion, liver, remote conditioning, microcirculation

(Beérkezett: 2012. augusztus 21.; elfogadva: 2012. szeptember 13.)

A Prof. Dr. Regöly-Mérei János Alapítvány 2012. évi pályázatán elismerő oklevéllel jutalmazott pályamunka alapján készült kézirat.

Rövidítések

ALAT = (alanine amino-transferase) alanin-aminotranszferáz; ASAT = (aspartate amino-transferase) aszpartát-aminotranszferáz; ASE = (ascorbic acid equivalent) aszkorbinsav-ekvivalens; DPPH = (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil; GAPDH = (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) glicerin-aldehid-3-foszfát-dehidrogenáz; H-donor-kapacitás = (hydrogen donor-capacity) hidrogéndonor-kapacitás; HSP-72 = (heat-shock protein 72) 72 kDa-os hő sokkfehérje; IPC = (ischemic preconditioning) ischaemiás prekondicionálás; IPOST = (ischemic postconditioning) ischaemiás poszt-kondicionálás; IR = (ischemia-reperfusion) ischaemia-reperfúzió; IU = (international unit) nemzetközi egység; LDF = (laser Doppler flowmeter) lézeres Doppler-áramlásmérő; PM = (plateau maximum) platómaximum; R-IPC = (remote ischemic preconditioning) távoli szervi ischaemiás prekondicionálás; R-IPER = (remote ischemic perconditioning) távoli szervi ischaemiás perkondicionálás; R-IPOST = (remote ischemic postconditioning) távoli szervi ischaemiás poszt-kondicionálás; RLU% = (Relative Light Unit) relatív fényegység; RT = (reperfusion area) reperfúziós terület; SH = (sulphydryl) szulfhidril

Egy szerv vérkeringésének megszűnésével járó ischaemia, majd az azt követő revascularisatio kapcsán létrejövő reperfúziós károsodás mindennapi problémát jelent a klinikai gyakorlatban. Az ischaemiás-reperfúziós (IR) károsodás mérséklése interdiszciplináris feladat, a ma rendelkezésre álló legtöbb bizonyítékot a szívsebészeti, kardiológiai kutatások szolgáltatták. Miután 1960-ban megszületett a reperfúziós károsodás koncepciója, intenzív próbálkozások kezdődtek e káros jelenséget hatékonyan csökkentő módszerek irányába [1]. Számos eljárás került kidolgozásra több-kevesebb sikerrel. Jelentős áttörés lehetőségével kecsegtetett *Murry és munkatársainak* 1986-ban bemutatott tanulmánya, amely szerint rövid IR-periódus a myocardium tartós ischaemiáját megelőzően alkalmas a második, tartós vértelenségből és reperfúzióból fakadó károsodások mérséklésére [2]. A módszer az ischaemiás prekondicionálás nevet kapta (IPC). Ezen gondolatmenetbe illeszkedik a később leírt ischaemiás poszt-kondicionálás (IPOST) is, amely közvetlenül a reperfúzió kezdetén alkalmazott rövid IR-ciklusokkal történő beavatkozást jelent [3, 4]. A fent említett módszerek hátránya, hogy alkalmazásuk körülményes, a műtéti időt prolongálják, illetve az IPC alkalmazása kizárólag elektív beavatkozások során merülhet fel, hiszen ez esetben tudnunk kell a bekövetkező tartós ischaemia kezdetének időpontját.

Mindezen ismeretek tudatában 1993-ban egy új irányvonal jelent meg az IR-károsodás mérséklését célzó sebésztechnikai kondicionálási eljárások (sebésztechnikai kondicionálások: az ischaemiatolerancia növelésének érdekében a szervek, szövetek rövid, repetitív IR-ciklusait alkalmazó metodikák) között. A távoli szervi kondicionálás gondolata *Przyklenk és mtsai* nevéhez fűződik [5]. Kísérleti modelljük alapjául szolgált a következő mintegy két évtized kutatásainak. A távoli szervi

kondicionálás lehetősége fokozott érdeklődést szült, így nem csupán a szívizomszövet, de szinte minden szerv rövid IR-ciklusával történtek próbálkozások a különböző célszervek ischaemiatoleranciájának növelésére [6]. Igazán nagy előrelépést jelentett a végtagi vázizomszövet kirekesztésének kondicionálási stimulusként történő alkalmazása [7, 8]. A végtagi kirekesztés noninvazív módon, felfújható mandzsettákkal történő alkalmazásának lehetősége jelenti e módszer egyik igazán nagy előnyét [9]. A távoli szervi kondicionálási technika további előnye, újdonsága, hogy nem csupán a célszervi ischaemia előtt (távoli prekondicionálás, remote preconditioning, R-IPC), illetve a reperfúzió elején (távoli poszt-kondicionálás, remote postconditioning, R-IPOST), hanem a célszervi ischaemia *alatt* is alkalmazható (távoli perkondicionálás, remote perconditioning, R-IPER). *A távoli szervi ischaemiás perkondicionálás definíciószerűen a célszervi ischaemia alatt, egy távoli szervben létrehozott rövid IR-periódusok alkalmazását jelenti* [10]. A módszer, jellemzőiből adódóan, egyszerűen kivitelezhető, költséghatékony, a műtéti idő prolongálása nélkül alkalmazható protektív stratégiát jelenthet. A technika hatékonyságát csupán alig több mint egy tucat közlemény taglalja [11]. A távoli szervi kondicionálás egy igen összetett és meglehetősen feltáratlan hatásmechanizmus révén fejti ki célszervi hatását. Feltehetően a humorális, neurális és szisztémás védelmi mechanizmusok aktiválása révén, többek között antiinflammatorikus folyamatok indukcióját és a hő sokkfehérjéjének fokozott expresszióját okozza.

A májsebészetben az IR-károsodás minden beavatkozás során megjelenik, ahol a máj afferens ereinek időleges okklúziójára van szükség. A károsodás mérséklése kulcsfontosságú a morbiditási és mortalitási mutatók szempontjából, ugyanakkor ez idáig olyan közlemény nem jelent meg, amely májsebészeti szituációban vizsgálná az R-IPER hatékonyságát.

Mindezek tükrében *jelen munka célja a távoli szervi ischaemiás perkondicionálás rövid távú protektív hatásainak vizsgálata patkánymáj-IR-modellben.*

Módszer

Törvényi háttér

Az állatkísérletek az 1998. évi XXVIII. számú állatvédelmi törvény, valamint a 243/1998 (XII. 31.) kormányrendelet előírásainak megfelelően zajlottak. A műtétek az 1858/000/2009 számú engedély alapján, a Semmelweis Egyetem EAB által kiállított, állatkísérletek végzésére feljogosító 27/2000 számú bizonyítvány birtokában folytak. A kísérletek során 200–250 g tömegű, meghatározott kórokozóktól mentes (specified pathogen free, spf), hím Wistar patkányok kerültek felhasználásra (Charles Rivers Magyarország Kft., Budapest). Az állatok az operációt megelőzően száraz tápot (Toxi-coop Zrt., Dunakeszi) és vizet kaptak ad libitum,

a műtét előtti 12 órától csak víz volt biztosított számukra. Tartásuk a napszaki változásokat követő mesterséges világítás mellett, 22–24 °C-os hőmérsékleten történt.

Műtéti protokoll

Az anesztézia biztosítására – intraperitonealisán adott 75 mg/ttkg ketaminnal (Calypsol®), valamint 7,5 mg/ttkg xylasinnal (Sedaxilan®) való indukció után – a jobb vena jugularis internába vezetett polietilén kanülön keresztül (25 mg/ttkg/h ketamin és 2,5 mg/ttkg/h xylasin) intravénás infúzió került adagolásra. Az állatok testhőmérsékletének folyamatos regisztrálása rectalisán történt. Fűthető műtőasztal segítségével az állatok hőmérséklete a kísérletek alatt mindvégig 36,5–37,5 °C között volt tartható.

Az anesztézia biztosítását felső-középső medián laparotomia, majd a lobus caudatus mobilizálása követte. Ezt követően az aorta infrarenalis szakaszának felszabadítására került sor, a későbbi alsó végtagi IR kirekesztési ciklusok létrehozásához szükséges mikroklipp szelektív felhelyezhetőségének biztosítására.

A mikrocirkulációs áramlás regisztrálása lézeres Doppler-áramlásmérővel (LDF) történt. Az egyik felszíni mérőfej a máj bal lateralis lebenyén [12] mindig azonos lokalizációban került felhelyezésre. A másik mérőfej a bal m. biceps femoris felett került rögzítésre. A máj ischaemiaindukcióját megelőzően a bal lateralis májlebenyen és az alsó végtagon, párhuzamosan ötperces alapáramlás regisztrálására került sor.

A kísérlet során a középső és bal lateralis lebenyek biliovascularis nyelére atraumatikus mikroklippet helyezve a májban 60 perces – a szerv közel kétharmadát érintő – ischaemia alakult ki. Az aorta infrarenalis szakaszának szintén atraumatikus mikroklippel történő okkludálása révén a 60 perces májischemia 20. percétől kezdődően négy ciklusban (öt perc ischaemia, öt perc reperfüzió) perkondicionálást végeztünk.

A 60 perc ischaemia utolsó öt percében az anhepatikus állapotot kivédő, ischaemiában nem részesülő jobb lateralis és caudatus lebenyek eltávolításra kerültek. A májischemia 60. percében a májkirekesztés megszüntetésével az ischaemizált, residualis lebenyek vérellátása helyreállt.

Kísérleti elrendezés

Kísérletünkbe összesen 30 állatot vontunk be. Az *ál-operált* állatok (10 darab) v. jugularis kanülálását követően a *biliovascularis kirekesztés és a perkondicionálási kezelés kivételével* a műtét menete és az áramlásmérés időtartama megegyezett a műtéti protokollban leírtakkal. Az *IR-kontroll*- (10 darab) csoportban, az alapáramlás regisztrációját követően, a középső és bal lateralis májlebenyek 60 perces kirekesztésére – *perkondicionálás nélkül* –, majd a 60 perc reperfüzióra került sor. A *per-*

kondicionált (10 darab) csoport a műtéti protokollban leírtaknak megfelelő valamennyi beavatkozásban részesült. A 60 perces májischemia 20. percétől az infrarenalis aortaszakaszon 4×10 perces (öt perc ischaemia, öt perc reperfüzió) perkondicionálást alkalmaztunk, amelyet 60 perc reperfüzió követett.

Mintavétel

A 60 perc reperfüzió után közvetlenül, az állatok vérének begyűjtése jobbkamra-punkcióval történt. A vér Nacitráttal történő alvadésgátlását centrifugálás (1300 g, 2×10 percig szobahőmérsékleten), majd a hemolízismentes, sejtmentes felülúszó, szérum elválasztása követte. A szérum folyékony nitrogénben került tárolásra (–196 °C) a későbbi feldolgozásig. Az IR-károsodást szenvedett bal lateralis májlebeny centrális részéből, minden esetben azonos anatómiai lokalizációban, 5×5×5 mm-es szövetminták kerültek eltávolításra. Ezek egy része fagyasztva került tárolásra (–196 °C), HSP-72-szintek meghatározása céljából, a fennmaradó részből 4%-os formalinban való fixálást, majd paraffinba ágyazást követően 3–5 µm vastag, HE- (hematoxilin-eozin) festett metszetek készültek a szövettani kiértékeléshez. Az IR-károsodást szenvedett májlebenyek residualis része Potter-Elvehjem-készülékkel jeges hűtés mellett (0–4 °C) homogenizálásra került, vértartalmának – többszöri, fiziológias sóoldattal való mosással – minimálisra csökkentését követően.

Laboratóriumi vizsgálatok

A fagyasztott szérummintákból, a szérum-alanin-amino-transzferáz- (ALAT), valamint -aszpartát-aminotranszferáz- (ASAT) aktivitások meghatározása laboratóriumi automatán történt (Sangui & Hemo-Vet Állatorvosi Klinikai Laboratóriumi Szolgálat, Budapest).

A máj mikrocirkulációjának mérése lézeres Doppler-áramlásmérővel

A kísérletben használt eszköz (forgalmazó: MOOR Instruments Ltd., London, Egyesült Királyság; DRT4, kétcsatornás; λ = 632,8 nm; monokromatikus 2 mW Helium-Neon lézer) a fényvisszaverődést a Doppler-elv alapján értékeli.

Az eszközhöz tartozó 0,5 cm átmérőjű felszíni mérőfej a máj bal lateralis lebenye felett, illetve az alsó végtagon, mindig azonos lokalizációban a musculus biceps femorisra került felhelyezésre. Az eszköz folyamatos adatrögzítéssel és számítógépes feldolgozással hat másodpercenként regisztrálta az áramlási értékeket, illetve a szöveti hőmérsékletet.

A mérőeszköz kísérletünkben mikrocirkuláció-mérésre való felhasználásának és az eredmények kiértéke-

lésének alapelveit munkacsoportunk korábbi kísérleti tapasztalataira alapoztuk [13].

A reperfúziós áramlás leírására és a görbék jellemzésére a következő fogalmak kerültek bevezetésre.

1. *Platómaximum (PM)*: A reperfúziós szakasz végső, ellaposodó, stabil áramlást mutató szakaszán kiválasztott időintervallumhoz (utolsó mért 10 perc = 100 mérési pont) tartozó szakasz értékeinek számtani átlaga.
2. *Reperfúziós terület (RT)*: Kiszámítása a reperfúzióhoz tartozó görbe alatti terület integrálásával történik.

Az utóbbi paramétert az adatok jobb összehasonlíthatósága érdekében egy hipotetikus, már a reperfúzió nulla pillanatában 100%-os áramlással jellemezhető görbe, görbe alatti területének százalékában adhatjuk meg.

Májszöveti HSP-72-szintek vizsgálata

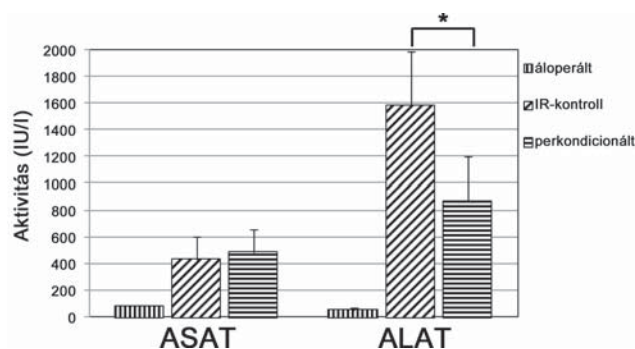
A májszöveti HSP-72-szint meghatározása western-blot-analízissel történt fagyasztott májszövetminták felhasználásával. A májszöveti HSP-72-meghatározáshoz csoportonként öt állat került felhasználásra. A kiértékelést ImageJ szoftver (NIH, Bethesda, MD, Amerikai Egyesült Államok) segítségével végeztük. A HSP-expresszió mértéke a kontrollként alkalmazott glicerin-aldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH, „house-keeping” gén) expressziójához viszonyítva került megállapításra [14].

Szövettani értékelés

A kvalitatív szövettani kiértékelés, a reperfúziót követő mintavételezés után, HE-festett metszetek alapján történt. A vizsgáló patológus a csoportbeosztás tekintetében nem volt tájékozott. A szemikvantitatív értékeléshez az irodalomban ismert Suzuki-score került alkalmazásra, amely individuálisan értékeli 1. a sinusoidális *pangás*, 2. a *hepatocytavakuolizáció* és 3. a *nekrozis* jelenlétét, a jelenségekre egyenként 0–4 pont adható [15]. Emellett rendszeresítettünk egy úgynevezett total-score értéket is, amely a három paraméter pontszámainak összegét jelenti (maximum $3 \times 4 = 12$ pont) [16]. A pontozás metszetenként tíz random látótér (20-szoros nagyítás) értékelése alapján folyt.

Oxidatív státus vizsgálata

Az antioxidáns státus vizsgálata májhomogenizátumból, fehérjetartalmának Lowry-módszere szerinti beállítást követően történt [17]. A *luminometriás összscavenger-kapacitás* meghatározása Heide-Bögl módszerének *Blázovics és mtsai-féle* módosítása szerint történt [18]. *Oyaizu* módszere szerinti *redukálóképesség-vizsgálat* a szövet teljes antioxidáns képességéről informál [19]. A fehérjékhez kötött antioxidáns



1. ábra

Szérumtranszamináz-aktivitások. A szérum-aszpartát-aminotranszferáz-aktivitások nem szignifikáns eltérései mellett az alanin-aminotranszferáz szintje szignifikánsan alacsonyabb maradt (* $p < 0,05$) a perkondicionált csoportban az IR-kontrollcsoporthoz képest (Csoportbeosztás: *áloperált*: 10 állat, 60+60 perc megfigyelési idő; *IR-kontroll*: 10 állat, 60 perc ischaemia+60 perc reperfúzió; *perkondicionált*: 10 állat, 60 perc ischaemia+60 perc reperfúzió+négy ciklusban végzett távoli kondicionálás a májischemia utolsó 40 perce alatt)

szulfhidrilcsoportok meghatározása spektrofotométeren Ellman-reagens felhasználásával (5,5-ditiobisz-nitrobenzoesav, SERVA) pH 7,4 Na-foszfát pufferben, 512 nm-en történtek, *Sedlak és Lindsay* módszere szerint [20]. A *H-donor-kapacitás* értékét meghatározó mérések *Blois* módszere szerint 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) stabil gyök jelenlétében 517 nm-en spektrofotométeren folytak [21].

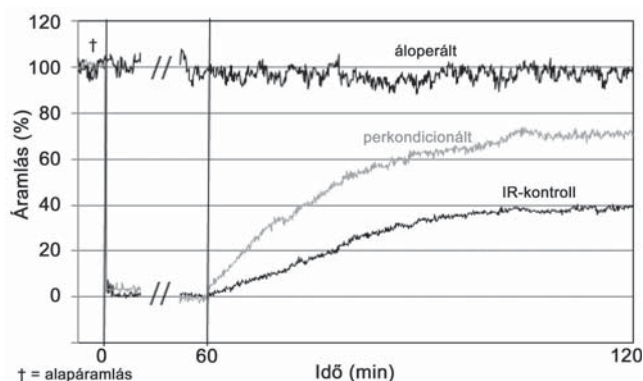
Statisztikai feldolgozás

Az adatok grafikus és statisztikai megjelenítése Microsoft Office 2003 Excel, illetve Statistica 7.0 for Windows (Statsoft Magyarország Rt., Budapest, Magyarország) szoftver felhasználásával történt. Az átlagértékek közötti különbségek $p < 0,05$ konfidenciaintervallum esetén szignifikáns, és $p < 0,01$ esetén erősen szignifikáns különbség minősítést kaptak. A táblázatban a mérések eredménye a mért értékek átlagával és a standard deviáció ($\pm$ SD) megadásával került kifejezésre. A statisztikai értékeléshez Student-féle kétmintás t-próbát, Mann-Whitney-próbát használtunk.

Eredmények

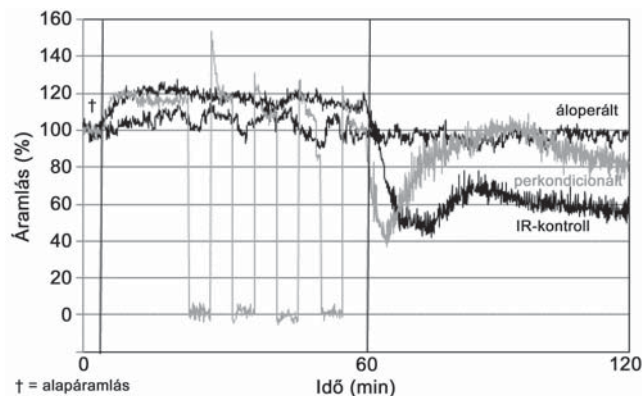
Szérumtranszamináz-szintek

A 60 perc májischemiát, majd 60 perc reperfúziót követően vett szérummintákban az ASAT-szintek esetében nem volt értékelhető különbség a csoportok között. Ezzel szemben az ALAT aktivitása a perkondicionált csoportban (863 ± 338 IU/l) szignifikánsan alacsonyabb volt az IR-kontrollcsoporthoz (1576 ± 405 IU/l)) képest ($p = 0,042$) (1. ábra).



2. ábra

A máj mikrocirkulációs változásai. A máj reperfüziós mikrocirkulációja erősen szignifikánsan javult a perkondicionált csoportban az IR-kontrollcsoportéhoz képest (áloperált: 10 állat; IR-kontroll: 10 állat; perkondicionált: 10 állat)



3. ábra

Az alsó végtag mikrocirkulációs változásai. Az alsó végtag mikrocirkulációjában jellegzetes karakterisztikái sajátosságok, valamint szignifikánsan kedvezőbb reperfüziós platómaximum-érték került detektálásra (áloperált: 10 állat; IR-kontroll: 10 állat; perkondicionált: 10 állat)

Mikrocirkuláció

Az alapáramlás tekintetében (0–5. perc) nem volt eltérés az egyes csoportok görbéi között. Az ötödik percben az IR-kontroll és a perkondicionált állatok májkeringése az érkirekesztés következtében azonnal a relatív skála nulla pontjára csökkent, majd egészen az ischaemia 60. percéig (májkirekesztés megszüntetése) változatlanul ezen a szinten maradt (2. ábra). Az ischaemia 20. percétől kezdődően a négy ciklusban alkalmazott ötperces reokklúziós és ötperces reperfüziós periódusok a perkondicionált állatok alsó végtagján kerültek regisztrálásra (3. ábra).

Az áloperált csoport keringése a kísérlet alatt mindig az alapáramlás szintje körül maradt. A perkondicionált és az IR-kontrollcsoportok reperfüziós mikrocirkulációs paramétereinek tekintetében jelentős különbségek tapasztalhatók a csoportok között (1. táblázat). A perkondicionált csoportban a máj PM-, illetve RT-értékei erős szignifikanciájú javulást mutattak az

IR-kontrollcsoport megfelelő keringési paramétereikhez képest. A perkondicionált csoport alsó végtagi mikrocirkulációs PM-értéke szignifikánsan magasabbnak igazolódott az IR-kontrollcsoporttal összevetve, azonban az RT esetében szignifikáns különbség nem mutatkozott (1. táblázat).

Májszöveti HSP-72-szintek vizsgálata

Bár az IR-kontroll ($0,268 \pm 0,126$) és a perkondicionált ($0,559 \pm 0,285$) csoport máj szöveti HSP-72-expressziója meghaladta az áloperált csoport HSP-72-szintjét ($0,056 \pm 0,009$), a csoportok között azonban nem igazolódott szignifikáns különbség (4. ábra).

Szövettan

Az áloperált csoport metszetein kismértékű sinusoidális pangás, v. centralis tágulat fedezhető fel, egyéb

1. táblázat | A kísérlet mérési eredményei

		áloperált	IR-kontroll	perkondicionált	perk. vs. IR
Máj-mikrocirkuláció	RA%	99,7 $\pm$ 0,1	32,7 $\pm$ 13,1	55,8 $\pm$ 22,7	p = 0,007
	PM%	96,8 $\pm$ 0,1	39,9 $\pm$ 14,9	70,6 $\pm$ 14,7	p = 0,001
Alsó végtagi mikrocirkuláció	RA%	98,8 $\pm$ 2,9	60,9 $\pm$ 21,6	79,5 $\pm$ 29,1	p = 0,101
	PM%	98,3 $\pm$ 3,7	55,6 $\pm$ 25,1	92,2 $\pm$ 26,9	p = 0,038
Suzuki totál-score		0,60 $\pm$ 0,89	6,25 $\pm$ 0,96	3,00 $\pm$ 1,00	p = 0,013
Máj szöveti szabadgyök-tartalom (kemilumineszcencia)	RLU%	0,043 $\pm$ 0,029	0,132 $\pm$ 0,026	0,118 $\pm$ 0,027	p = 0,640
Máj szöveti antioxidáns tartalom (spektrofotometria)	Redukálóképesség (ASE)	156 $\pm$ 40	109 $\pm$ 12	117 $\pm$ 19	p = 0,446
	Szabad SH-csoportok (μ mol/l)	855 $\pm$ 169	542 $\pm$ 19	596 $\pm$ 62	p = 0,048
	H-donor-kapacitás (gátlás%)	88,4 $\pm$ 8,2	65,1 $\pm$ 11,1	85,6 $\pm$ 12,0	p = 0,023

RT = reperfüziós terület; PM = platómaximum; RLU = Relative Light Unit; ASE = aszkorbinsav-ekvivalens; SH = szulfhidril; IR = ischaemia-reperfüzió

kóros elváltozás nem volt látható (Suzuki total-score: $0,60 \pm 0,89$).

Az IR-kontrollcsoportban szembetűnő hisztopatológiai elváltozásokat detektáltunk. A májacinusoknak csupán a periportalis régiókban voltak ép hepatocyták, innen a v. centralisok felé haladva a látóterek többségében jelentős mértékben tág és vörösvértestekkel kitöltött sinusoidok, nagyfokú sejtoedema, habos jellegű citoplazma, a magszerkezet fellazulása, ezáltal prominenssé váló nucleolusok voltak láthatóak. Megfigyelhető volt még degeneratív elváltozásként hepatocytavakuolizáció, valamint az alig sejthető maghatárok, a kisebb sejtmagmentes területek, a caryolysis, a caryorrhesis, az eosinophilia, amelyek nekrozisra utalnak (Suzuki total-score: $6,25 \pm 0,96$).

A perkondicionált csoport szövettani preparátumai kisebb mértékű sinusoidalis pangással, minimális vakuolizációval, megtartott szerkezetű sejtmagokkal, kisebb mértékű sejtoedemával jellemezhetőek. A nekrozis igen kisfokú (Suzuki total-score: $3,00 \pm 1,00$).

A Suzuki total-score értéke szignifikánsan alacsonyabb volt a perkondicionált csoportban az IR-kontrollcsoportéhoz képest ($p = 0,013$) (1. táblázat).

Oxidatív státus vizsgálata

A Relative Light Unit %-ban (RLU%) kifejezett *luminometriás összscavenger-kapacitás* vizsgálata során kapott eredményeink tanulsága szerint a perkondicionált csoport szabadgyök-szintjeiben szignifikáns csökkenés nem volt igazolható az IR-kontrollcsoportéhoz képest (áloperált: $0,043 \pm 0,029$; IR-kontroll: $0,132 \pm 0,026$; perkondicionált: $0,118 \pm 0,027$ RLU%). Megfigyelhető (1. táblázat), hogy a perkondicionált csoportban magasabb a *redukálóképesség* értéke az IR-kontrollcsoportéhoz képest, azonban a két csoport között szignifikáns különbséget nem igazoltunk (áloperált: 156 ± 40 , IR-kontroll: 109 ± 12 , perkondicionált: 117 ± 19 ASE). A fehérjéhez kötött antioxidáns tulajdonság (*sulphhidrilcsoportok*) vizsgálata során a perkondicionálás szignifikáns javulást eredményezett az IR-kontrollcsoportban tapasztaltakhoz képest ($p = 0,048$) (áloperált: 855 ± 169 , IR-kontroll: 542 ± 19 , perkondicionált: 596 ± 62 $\mu\text{mol/l}$). A fehérjéhez nem kötött antioxidáns kapacitás (*H-donor-kapacitás*) értéke szintén szignifikánsan kedvezőbbnek mutatkozott a perkondicionált csoportban az IR-kontrollcsoporttal összevetve ($p = 0,023$) (áloperált: $88,4 \pm 8,2$, IR-kontroll: $65,1 \pm 11,1$, perkondicionált: $85,6 \pm 12,0$ gátlás%).

Megbeszélés

A kondicionálási eljárások történelmében több mint két évtized telt el, mire a tudomány a lokális perkondicionálástól [2] eljutott a jelen munka legszorosabb bázisát képező különböző távoli szervi kondicionálási technikák alapjainak lefektetéséig [22]. Lai és mtsai

2006-ban igazolták a távoli szervi perkondicionálás hatékonyságát patkánymájmodellben, alsó végtagi IR-ciklusokat alkalmazva távoli szervi kondicionálási stimulusként [23]. Következő lépés a célszervi poszt-kondicionálás mintájára kidolgozott távoli szervi ischaemiás poszt-kondicionálás volt [24], amely gyakorlati szempontból előnyösebb metodika, hiszen alkalmazásakor az ischaemiás inzultus idejét nem szükséges előre ismerni. Technikai kivitelezhetőség tekintetében még kedvezőbb tulajdonságokkal jellemezhető az általunk vizsgált távoli szervi ischaemiás perkondicionálás, amelyet Schmidt és munkatársai alkalmaztak először 2007-ben [10].

A távoli szervi ischaemiás perkondicionálás hatásait – újszerűsége folytán – eddig szinte kizárólag szív vonatkozásában vizsgálták [22]. A témakörben megjelent közlemények száma azonban a mai napig elenyésző, így nem meglepő, hogy a hatásmechanizmus igen kis részben tisztázott. Tekintve, hogy az eljárás máj-IR-károsodásra kifejtett hatásával foglalkozó közlemény ez idáig nem jelent meg az irodalomban, így jelen munka célkitűzése, hogy ezen eljárás májra kifejtett hatásait vizsgálja IR-rágcsálómodellben.

Kísérleteinket a Semmelweis Egyetem I. Sebészeti Klinikáján már korábban kifejlesztett IR-állatmodellre alapoztuk (Kupcsulik és mtsai, 1979; Szijártó és mtsai, 2006) [13]. A modell lényege, hogy a patkánymáj lebénózott szerkezete révén parciális ischaemia hozható létre, amely mentes az állatok által nem tolerált, a totális kirekesztéssel járó splanchnicus pangástól és anhepaticus fázistól, azonban megfelelően alkalmas a máj IR-károsodásának tanulmányozására.

Állatmodellünk felállítása során az egyik kulcskérdés a perkondicionálási protokoll megválasztása volt. Kevés irodalmi adat áll rendelkezésre, amelyek nem egységesek, több különböző protokoll sikeres alkalmazásáról olvashatunk. Az irodalomban jelenleg egyetlen, a perkondicionálási protokollok összehasonlítását célzó közlemény olvasható. Xin és munkatársainak [25] megfigyeléseit azonban több szerző eredményei is alátámasztják [10, 26]. Az irodalmi adatokat figyelembe véve kísérletünk során a korábban eredményesnek talált 4×10 (öt perc I, öt perc R) perces ciklusokat alkalmazó protokoll hatásait vizsgáltuk.

Ismert, hogy az IR-károsodás súlyossága szempontjából igen fontos a mikrocirkulációs érterület, mikrokeringés károsodásának foka. A reperfüzió eleji mikrocirkulációs károsodás kiemelt jelentősége, hogy lokálisan, heterogén eloszlásban képes meghosszabbítani az ischaemiás időt, ezzel növelni az irreverzibilis károsodás valószínűségét, valamint a károsodott területeket („no-reflow” jelenség) [27]. A mikrocirkulációs rendszer állapotának az IR-károsodásban betöltött kulcsfontosságú szerepe miatt alkalmas lehet az egyes protektív stratégiák hatékonyságának monitorozására. Ez indokolja, hogy kísérletünk egyik vizsgálati paraméterének a máj lézeres Doppler-áramlásmérővel regisztrált áramlási értékeit választottuk.

Eredményeink szerint a perkondicionált csoportban a kezelés hatására a máj reperfúziós mikrocirkulációja erősen szignifikáns módon javult az IR-kontrollcsoporthoz képest (1. táblázat, 2. ábra). Elmondható továbbá, hogy a perkondicionált csoport keringése azon túl, hogy körülbelül 30%-kal magasabb értéken stabilizálódik az IR-kontrollcsoporthoz viszonyítva, annak rendeződése is sokkal gyorsabb ütemű volt ebben a csoportban, következményként a két görbe meredeksége már a reperfúzió első pillanatától jelentősen eltér (2. ábra).

A máj mikrokeringésének vizsgálata mellett kísérleteink során megvizsgáltuk, hogy az alsó végtag kapilláris áramlásában milyen változások alakulnak ki. A máj kirekesztésének megszüntével mind az IR-kontroll-, mind a perkondicionált csoportokban egy igen jelentős mikrocirkulációs keringésmegingást tapasztaltunk a m. biceps femorisban, amelynek során a keringési értékek gyors ütemben 40% körüli szintre zuhannak mindkét csoportban (3. ábra). A keringésmegingást követően a perkondicionált csoport keringése gyorsabb ütemben javul és magasabb értéken stabilizálódik, mint az IR-kontrollcsoport keringése, jobban megközelítve az áloperált csoportra jellemző értékeket. Az eltérés a platómaximumot tekintve szignifikánsnak bizonyult az IR-kontrollcsoporthoz képest (1. táblázat).

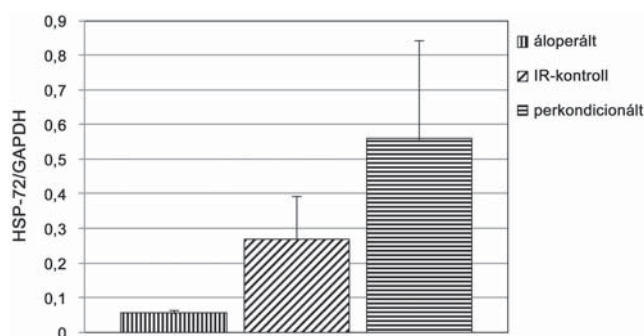
A két csoport görbéi között fennálló karakterisztikai eltérések több okra is visszavezethetőek. A máj reperfúziójának kezdetén az alsó végtagi keringésmegingás feltehetően mindkét IR-ben részesült csoportban, a májreperfúzióval kapcsolatban létrejövő keringéscentralizációval, így a perifériás térfogat csökkenésével magyarázható. A késői alsó végtagi reperfúziós különbségek lehetséges okai között megjelölhetjük továbbá a perkondicionálási kezelés hatására létrejövő csökkent mértékű máj-IR-károsodást, amelynek következtében valószínűleg kevesebb májeredetű aktív metabolit kerül a szisztémás keringésbe. Így, némi túlzással, a javuló alsó végtagi mikrokeringés hipotetikusan kisebb mértékű szisztémás reakcióként értékelhető. Azonban a számos egyéb, korábban tárgyalt kondicionálási eljárás ismereténél tükrében felmerül a lokális kondicionálás lehetősége is. Feltehetően ebben az esetben az alsó végtagon alkalmazott távoli szervi *perkondicionálás*, egy adaptív védőmechanizmusként, lokálisan *perkondicionálja* az alsó végtagot a máj IR-károsodásának szisztémás hatásaival szemben. Legvalószínűbb tehát, hogy a javuló mikrocirkuláció kevert válaszreakció következménye.

Távoli szervi kondicionálás hatásmechanizmusára felállított, az irodalomban olvasható hipotézisek nagy része humorális, neurális, illetve szisztémás kölcsönhatásokat feltételeznek a célszerv és a távoli szerv között [6]. Ezen említett kapcsoló mechanizmusok triggerelhetik a célszervi celluláris, szubcelluláris szinten jelentkező végrehajtó folyamatokat. A háttérben álló feltételezett mechanizmusok részletes fejtegetésével munkacsoportunk elméleti összefoglaló közleménye foglalkozik [11].

Konstantinov és munkatársai igazolták, hogy a távoli szervi kondicionálás módosítja a keringő leukocyták génexpressziós mintázatát [28]. A közölt eredmények alapján úgy tűnik, hogy a kezelés szuppresszálja a leukocytákban a proinflammatorikus génexpressziót, ezáltal gátolva bizonyos IR-károsodásban kulcsfontosságú leukocytafunkciókat, például kemotaxis, adhézió, migráció, exocytosis. Ezen jelenség lehetséges magyarázattal szolgálhat a kísérletünk során a máj áramlásában talált különbségekre, figyelembe véve az említett leukocytafunkciók jelentős szerepét a máj IR-károsodásában [29], azonban mindezek igazolása egyelőre várat magára. A reperfúzió során a szövetet infiltráló leukocyták kitapadásának, aktiválódásának gátlása megakadályozhatja ezen sejtek ischaemiás időt prolongáló, keringést akadályozó szerepét („no-reflow” jelenség), amely minden bizonnyal gyorsabb mikrocirkulációs restitúcióhoz vezethet a perkondicionált csoportban, így magyarázatot adhat az ebben a csoportban megfigyelhető meredekebben emelkedő reperfúziós görbe lefutására. Mikrocirkulációs vizsgálataink eredményei jól korrelálnak *Zhao és mtsai* [26], illetve *Loukogeorgakis és munkatársainak* [30] megfigyeléseivel, akik szintén a célszervi ischaemia alatt alkalmazott távoli szervi kondicionálás kedvező hatásairól számoltak be. Az említett munkák a mikrocirkulációs vizsgálatok egészen eltérő eszközeihez folyamodva a perkondicionálás hatására létrejövő mikrocirkulációs változások különböző aspektusait érintik, ezáltal jelentősen hozzájárulnak a kondicionáló hatások komplexebb megértéséhez.

Kísérletünkben a hematoxilin-eozin festett metszetek elemzése alapján kisebb mértékű májszöveti károsodást detektáltunk a perkondicionált csoportban, amellyel jól korrelált a szérumban mért, májkárosodásra specifikusabb transzamináz, az ALAT szignifikánsan alacsonyabb aktivitása a kezelt csoportban az IR-kontrollcsoporthoz képest. A szérum-ASAT-aktivitás tekintetében ugyan nem volt értékelhető különbség a csoportok között, azonban ez az enzim kevésbé specifikus a májszövetre, így a perkondicionált csoportban – minimális mértékben ugyan, de – az alsó végtagból is felszabadulva, a csoportok közötti különbség elmosódását okozhatta.

Kísérleteink során a májhomogenizátumból végzett antioxidáns státus meghatározását célzó mérések során a redox-homeosztázis kedvezőbb állapotát tapasztaltuk a perkondicionált csoportban az IR-kontrollcsoporthoz képest. Eredményeink szerint az antioxidáns hatású vegyületek szignifikánsan nagyobb mértékben vannak jelen a perkondicionált állapotok májszövetében (1. táblázat). A megőrzött antioxidáns kapacitás feltehetően képes a reperfúzió későbbi szakaszában nagy mennyiségben keletkező szabadgyökök káros hatásainak mérséklésére, kivédésére. A globális szabadgyök-szintekkel korreláló luminometriás méréseink és a globális antioxidáns mennyiségre reflektáló redukálóképesség-meghatározás esetében a szignifikancia hiánya feltehetően a



4. ábra Májzsöveti HSP-72-szintek. A western-blot analízissel mért májzsöveti HSP-72-szintek vonatkozásában nem volt szignifikáns különbség a kísérleti csoportok között (áloperált: 5 állat; IR-kontroll: 5 állat; perkondicionált: 5 állat)

HSP = hő sokkfehérje; GAPDH = glicerin-aldehid-3-foszfát-dehidrogenáz

rövid reperfúziós időknél köszönhető. Valószínű, hogy egy óra reperfúzió nem volt elegendő ahhoz, hogy a májzsövet globális redox-homeosztázisát jelentékeny mértékben megváltoztathassa.

Xin és munkatársai kimutatták távoli szervi perkondicionálás kapcsán a lipidperoxidációt jelző szöveti malondialdehid-szintek, illetve a szuperoxidanion-termelés csökkenését [25], amely összhangban lehet a szöveti antioxidáns kapacitás prezervációjával perkondicionálást követően. Mindezek tükrében a redox-homeosztázis értékelése során nyert eredményeink szintén magyarázatot adhatnak a kísérletünk során tapasztalt kisebb mértékű szöveti károsodásra, illetve a kedvezőbb máj-mikrocirkulációs változásokra.

A már említett *Konstantinov és munkatársai* 2004-es közleményükben beszámoltak a távoli szervi kondicionálás hatására létrejövő hő sokkfehérjéjének expressziójának fokozódásáról [28]. A máj-IR-károsodás, illetve az ischaemiaterolerancia növelését célzó eljárások kapcsán leggyakrabban vizsgált hő sokkfehérjék az egy családba tartozó HSP-70, illetve HSP-72, amelyek protektív szerepével számos közlemény foglalkozik. Az irodalomban több állatkísérlet is igazolja az összefüggést a parenchymás szervek HSP-72-expressziója és az IR-károsodások mértéke között. *Kume és munkatársai* például a HSP-72-expresszió fokozódásával együtt a patkánymáj-IR tolerancianövekedéséről számoltak be 15 perces ischaemiás perkondicionálás és hő sokk kapcsán egyaránt [31]. Hasonló eredményekről olvashatunk szíven [32], agyon [33] és vesén [34] végzett kísérletek esetében is. A HSP-72 szerepe valószínűleg igen szerteágazó, feltételezhetjük, hogy az ischaemia-reperfúzió, illetve a különböző kezelések hatására létrejövő celluláris védelmi mechanizmusok résztvevője [35, 36].

A májhomogenizátumból, western-blot-analízissel mért májzsöveti HSP-72-szintek vizsgálata során kapott kísérleti eredményeink összevethetők a fent leírt irodalmi adatokkal (4. ábra). Kísérletünkben a két, ischaemia-

miában és reperfúzióban részesült csoport között nem találtunk szignifikáns különbséget. Feltételezhetjük, hogy ezen rövid távú modellben az IR-kontroll- és a perkondicionált állatok között található nem szignifikáns különbség oka lehet, hogy a 60 perces reperfúzió nem elegendő a génexpressziós változások teljes mértékű kialakulásához. Egy hosszabb reperfúziós időtartamot vizsgálva, amikor az expressziós változások már lezajlottak, a különbség markánsabbá válhat. Ezen elmélet igazolására azonban hosszabb reperfúziós időket alkalmazó további kísérletek és a mintaszámok emelése szükségesek.

Kísérletünk eredményei igazolják az alkalmazott perkondicionálás hatékonyságát máj esetében. A továbbiakban fontos cél lehet a háttérben álló mechanizmusok feltárása, valamint más kezelési protokollok, továbbá hosszabb reperfúziós időtartamok eredményeinek összehasonlítása. Mindezek érdekében további vizsgálatok szükségesek, amelyek segíthetnek az optimális alkalmazási protokoll megválasztásában és esetlegesen utat nyithatnak a klinikai vizsgálatok felé.

Köszönetnyilvánítás

Külön köszönet illeti a Magyar Tudományos Akadémia-Bolyai János Kutatási Ösztöndíjprogramot (*dr. Szijártó Attila*, Bolyai János Kutatási Ösztöndíj, 2010) a kutatás anyagi alapjainak megteremtéséért.

Irodalom

- [1] Jennings, R. B., Sommers, H. M., Smyth, G. A., et al.: Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arc. Pathol.*, 1960, 70, 68–78.
- [2] Murry, C. E., Jennings, R. B., Reimer, K. A.: Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 1986, 74, 1124–1136.
- [3] Halkos, M. E., Kerendi, F., Corvera, J. S., et al.: Myocardial protection with postconditioning is not enhanced by ischemic preconditioning. *Ann. Thorac. Surg.*, 2004, 78, 961–969.
- [4] Zhao, Z. Q., Corvera, J. S., Halkos, M. E., et al.: Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2003, 285, H579–H588.
- [5] Przyklenk, K., Bauer, B., Ovize, M., et al.: Regional ischemic preconditioning protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation*, 1993, 87, 893–899.
- [6] Hausenloy, D. J., Yellon D. M.: Remote ischaemic preconditioning: underlying mechanisms and clinical application. *Cardiovasc. Res.*, 2008, 79, 377–386.
- [7] Oxman, T., Arad, M., Klein, R., et al.: Limb ischemia preconditions the heart against reperfusion tachyarrhythmia. *Am. J. Physiol.*, 1997, 273 (4 Pt 2), H1707–H1712.
- [8] Birnbaum, Y., Hale, S. L., Kloner, R. A.: Ischemic preconditioning at a distance – Reduction of myocardial infarct size by partial reduction of blood supply combined with rapid stimulation of the gastrocnemius muscle in the rabbit. *Circulation*, 1997, 96, 1641–1646.
- [9] Veighey, K., MacAllister, R. J.: Clinical applications of remote ischemic preconditioning. *Cardiol. Res. Pract.*, 2012, 2012, 620681.
- [10] Schmidt, M. R., Smerup, M., Konstantinov, I. E., et al.: Intermittent peripheral tissue ischemia during coronary ischemia reduces

- myocardial infarction through a KATP-dependent mechanism: first demonstration of remote ischemic preconditioning. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2007, 292, H1883–H1890.
- [11] Szigártó, A., Czigány, Z., Turóczy, Z., *et al.*: Remote ischemic preconditioning – a simple, low-risk method to decrease ischemic reperfusion injury: models, protocols and mechanistic background. A review. *J. Surg. Res.*, Published online 30 July 2012.
- [12] Aller, M. A., Arias, J. L., García-Domínguez, J., *et al.*: Experimental obstructive cholestasis: the wound-like inflammatory liver response. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 2008, 1, 6.
- [13] Szigártó, A., Hahn, O., Lotz, G., *et al.*: Effect of ischemic preconditioning on rat liver microcirculation monitored with laser Doppler flowmetry. *J. Surg. Res.*, 2006, 131, 150–157.
- [14] Rakonczay, Z., Jr., Boros, I., Jármay, K., *et al.*: Ethanol administration generates oxidative stress in the pancreas and liver, but fails to induce heat-shock proteins in rats. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2003, 18, 858–867.
- [15] Suzuki, S., Toledo-Pereyra, L. H., Rodríguez, F. J., *et al.*: Neutrophil infiltration as an important factor in liver ischemia and reperfusion injury. Modulating effects of FK506 and cyclosporine. *Transplantation*, 1993, 55, 1265–1272.
- [16] Si, Z. Z., Li, J. Q., Qi, H. Z., *et al.*: Recombinant adenovirus vector Ad-hIL-10 protects grafts from cold ischemia-reperfusion injury following orthotopic liver transplantation in rats. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.*, 2010, 9, 144–148.
- [17] Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., *et al.*: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265–275.
- [18] Blázovics, A., Kovács, A., Lugasi, A., *et al.*: Antioxidant defense in erythrocytes and plasma of patients with active and quiescent Crohn disease and ulcerative colitis: a chemiluminescent study. *Clin. Chem.*, 1999, 45, 895–896.
- [19] Oyaizu, M.: Studies on products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 1986, 44, 307–315.
- [20] Sedlak, J., Lindsay, R. H.: Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.*, 1968, 25, 192–205.
- [21] Blois, M. S.: Antioxidant determination by the use of stable free radicals. *Nature*, 1958, 181, 1999–2000.
- [22] Szigártó, A., Czigány, Z., Turóczy, Z., *et al.*: Ischemic preconditioning: New adaptive technique to increase the ischemic tolerance of the myocardium. Review article. *Cardiologia Hungarica*, 2011, 41, 344–355.
- [23] Lai, I. R., Chang, K. J., Chen, C. F., *et al.*: Transient limb ischemia induces remote preconditioning in liver among rats: the protective role of heme oxygenase-1. *Transplantation*, 2006, 81, 1311–1317.
- [24] Andreka, G., Vertesaljai, M., Szantho, G., *et al.*: Remote ischemic postconditioning protects the heart during acute myocardial infarction in pigs. *Heart*, 2007, 93, 749–752.
- [25] Xin, P., Zhu, W., Li, J., *et al.*: Combined local ischemic postconditioning and remote preconditioning recapitulate cardioprotective effects of local ischemic preconditioning. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2010, 298, H1819–H1831.
- [26] Zhao, J. L., Yang, Y. J., Pei, W. D., *et al.*: Remote preconditioning reduces myocardial no-reflow by the activation of K-ATP channel via inhibition of Rho-kinase. *Int. J. Cardiol.*, 2009, 133, 179–184.
- [27] Cutrn, J. C., Perrelli, M. G., Cavalieri, B., *et al.*: Microvascular dysfunction induced by reperfusion injury and protective effect of ischemic preconditioning. *Free Radic. Biol. Med.*, 2002, 33, 1200–1208.
- [28] Konstantinov, I. E., Arab, S., Kharbanda, R. K., *et al.*: The remote ischemic preconditioning stimulus modifies inflammatory gene expression in humans. *Physiol. Genomics*, 2004, 19, 143–150.
- [29] Serracino-Inglott, F., Habib, N. A., Mathie, R. T.: Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Surg.*, 2001, 181, 160–166.
- [30] Loukogeorgakis, S. P., Williams, R., Panagiotidou, A. T., *et al.*: Transient limb ischemia induces remote preconditioning and remote postconditioning in humans by a K(ATP) channel-dependent mechanism. *Circulation*, 2007, 116, 1386–1395.
- [31] Kume, M., Yamamoto, Y., Saad, S., *et al.*: Ischemic preconditioning of the liver in rats: Implications of heat shock protein induction to increase tolerance of ischemia-reperfusion injury. *J. Lab. Clin. Med.*, 1996, 128, 251–258.
- [32] Marber, M. S., Mestri, R., Chi, S. H., *et al.*: Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury. *J. Clin. Invest.*, 1995, 95, 1446–1456.
- [33] Nisbi, S., Taki, W., Uemura, Y., *et al.*: Ischemic tolerance due to the induction of HSP70 in a rat ischemic recirculation model. *Brain Res.*, 1993, 615, 281–288.
- [34] Stokes, K. Y., Abdi, H. K., Kelly, C. J., *et al.*: Thermotolerance attenuates ischemia-reperfusion induced renal injury and increased expression of ICAM-1. *Transplantation*, 1996, 62, 1143–1149.
- [35] Kobba, S., Kim, S. C., Chen, L., *et al.*: The heat shock paradox and cardiac myocytes: role of heat shock factor. *Shock*, 2011, 35, 478–484.
- [36] Hasegawa, A., Iwasaka, H., Hagiwara, S., *et al.*: Relationship between HMGB1 and tissue protective effects of HSP72 in a LPS-induced systemic inflammation model. *J. Surg. Res.*, 2011, 169, 85–91.

(Szigártó Attila dr.,
Budapest, Üllői út 78., 1082
e-mail: szijartoattila@gmail.com)