

# A VÉKONYBÉL-ISCHAEMIA ÉS REPERFÚZIÓ KÓRTANA – ÚJ TERÁPIÁS LEHETŐSÉGEK

Dr. Kaszaki József, Dr. Mészáros András, Dr. Büki Tamás, Dr. Varga Gabriella, Dr. Érces Dániel, Dr. Boros Mihály

Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Sebészeti Műtéttani Intézet

**ÖSSZEFOGLALÁS:** A vékonybél akut okkluzív vagy nem okkluzív ischaemiája az általános orvosi gyakorlat gyakori és súlyos következményekkel járó problémája. A kórfolyamat hátterében alapvető jelentősége van az ischaemiát követő reperfúzió kezdetén fellépő oxidatív és nitrozatív biokémiai reakciónak és az ezzel összefüggő kórélettani változásoknak. A reoxigenizációt követő mikrokeringési zavar leggyakoribb megnyilvánulása a mikroperforáció egyre fokozódó heterogenitása, térben és időben egyaránt. Ez a leukocita-endothelsejt interakciók növekedésében, a „no-reflow” jelenség kialakulásában, gyulladásos sejtek aktivációjában nyilvánul meg, és végeredményben a hypoxiás szövet szerkezeti károsodásához vezethet. A tanulmány célja, hogy áttekintést adjon a mesenterialis ischaemia-reperfúzió biokémiai, mikrokeringési és morfológiai következményeiről, másrészt pedig e biokémiai háttérre alapozott új terápiás lehetőségről, a metáninhaláció kedvező kísérletes eredményeiről kíván beszámolni.

**Kulcsszavak:** vékonybél ischaemia-reperfúzió, oxidatív stressz, mikrokeringés, konfokális lézer scanning endomikroszkópia, metán

Kaszaki J, Mészáros A, Büki T, Varga G, Érces D, Boros M: PATHOPHYSIOLOGY OF INTESTINAL ISCHEMIA AND REPERFUSION – NOVEL THERAPEUTIC POSSIBILITIES

**SUMMARY:** Acute occlusive or non-occlusive ischemia and reperfusion of the small intestine is a frequent event with severe consequences in the clinical practice, with high mortality rates. There is a basic significance of oxidative and nitrosative stress reactions starting at the beginning of reperfusion. The most frequent pathophysiological manifestation of these reactions is microcirculatory dysfunction with increased spatial or temporal heterogeneity of microperfusion following reoxygenation. This may lead to enhanced leukocyte-endothelial cell interactions, no-reflow phenomenon with plugging of neutrophils, inflammatory cell activation and ultimately to cell injury and failure. The aim of this paper is to give an overview of the biochemical, microcirculatory and morphological consequences of the intestinal ischemia-reperfusion syndrom, and to present a novel therapeutic possibility: the beneficial effects of methane inhalation on the consequences of intestinal ischemia-reperfusion.

**Keywords:** intestinal ischemia-reperfusion, oxidative stress, microcirculation, confocal laser scanning endomicroscopy, methane

Magy Belorv Arch 2013; 66: 6–12.

A tápcsatorna akut, okkluzív vagy nem okkluzív ischaemiája az általános orvosi gyakorlat gyakori, nehezen diagnosztizálható és sokrétű problémája. A mesenterialis erek elzáródása leginkább thromboembolia, atherosclerosis, obstruktív ileus, illetve stranguláció miatt következik be, de a sebészeti rekonstruktív, keringésjavító beavatkozások (aorta cross-clamping, ballon-angioplastika) vagy transzplantációs műtétek is átmeneti ischaemiával járnak. A nem okkluzív ischaemia intakt mesenterialis artériák és vénák jelenlétében, számos keringési kórkép (vérzés, hypotonia, szívelégtelenség) következményeként jöhet létre, amelyek direkt vagy indirekt módon a mesenterialis keringés csökkenéséhez, nyálkahártya-ischaemiához vezetnek.<sup>3, 18</sup>

A véráramlás visszaállítása esszenciális feltétele a szöveti túlélésnek. A reperfúzió kezdetén lokális hyperaemiás érreakció észlelhető, amely biztosítja a véráramlás adósságának törlesztését. A reperfúzió azonban paradox módon, olyan események sorozatához is vezet, amelyek súlyosabb következményekkel járhatnak, mint az ischaemia önmagában.<sup>21, 22</sup> Ezt a jelenséget ischaemia-reperfúziós (I/R) károsodásnak nevezi a szakirodalom, és a kórfolyamat hátterének tisztázása, valamint a lehetséges terápiás pontok feltárása izgalmas és intenzív kutatások tárgyát képezi mind a mai napig.

Az egyes szervek között jelentős különbségek vannak a hypoxia tűréshatárát illetően. A vékonybél szövege csupán percekig képes komoly károsodás nélkül el-

viselni a vérellátás megszűnését, és kifejezetten érzékeny az I/R folyamatára is<sup>3</sup>. A mesenterialis I/R egyik legsúlyosabb következménye a mucosa permeabilitásának növekedése, amelynek folytán a szisztémás keringésbe baktériumok, endotoxin, illetve a lumen potenciálisan káros anyagai juthatnak, a végeredmény pedig szisztémás gyulladáshoz vezet, szepszis, szepikus shock és többszervi elégtelenség lehet. A mesenterialis I/R ezért potenciális életveszélyt jelentő állapot, amely még ma is 60–80%-os halálozással jár, és a modern diagnosztikus és terápiás próbálkozások ellenére sem emelkedett jelentősen a túlélési ráta az elmúlt fél évszázadban.<sup>23</sup> A fentiek alapján a mesenterialis I/R jelentős patofiziológiai entitást jelent, amelynek oki kezelése mindmáig alapvetően megoldatlan. A tanulmány célja, hogy egyrészt áttekintést adjon a mesenterialis I/R biokémiai, mikrokeringési és morfológiai következményeiről, másrészt pedig az alapvető biokémiai változásokra épített, új terápiás lehetőség, a metáninhaláció első kísérletes eredményeit mutatja be.

### Az oxidatív és nitrozatív stressz

Ha egy szerv vérellátása, azaz oxigén-utánpótlása megszakad, annak elsődleges következménye a mitokondriális elektrontranszport zavara, amely egyrészt intracelluláris reaktív oxigéngyökök (ROS) képződéséhez,<sup>10, 30</sup> másrészt az oxidatív foszforiláció csökkenése miatt ATP-deplációhoz vezet. ATP hiányában a sejtmembránhoz kötött enzimek, ionpumpák nem működnek megfelelően, ezért ionok (főleg Na<sup>+</sup> és Ca<sup>2+</sup>) és víz áramlik a sejtekbe,<sup>18</sup> valamint felszaporodnak a redukáló hatású molekulák. A megemelkedett mitokondriális NADH/NAD<sup>+</sup> arány miatt a sejtben a redukzív folyamatok oldalára billen a mérleg, így az oxigénhiányos állapot redukzív stresszként definiálható.<sup>7</sup>

A Ca<sup>2+</sup>-felhalmozódás egyik következménye, hogy hatására a xantindehidrogenáz (XDH) enzim xantinoxidázzá (XO) hidrolizál, az utóbbi (XDH) NAD<sup>+</sup>-ot használ szubsztrátként, az előbbi (XO) oxigént. Az ATP lebomlása hipoxantinfelhalmozódáshoz vezet, azonban ezt az oxigéndependens XO enzim oxigén hiányában nem képes lebontani.<sup>29</sup> A vérkeringés helyreállításával oxigén lép be az ischaemiás szövetbe, ahol az intracellulárisan felhalmozódott hipoxantinból a XO enzim révén xantin és nagy koncentrációban ROS képződik,<sup>29</sup> amely a membránlipidek peroxidációjával együtt oxidatív stresszt okoz, azaz károsítja a sejtek strukturális és funkcionális elemeit. A lipidperoxidáció emellett aktiválja a foszfolipáz A<sub>2</sub>-t, amely az arachidonsav és származékai, az eikozanoidok képzése révén stimulálja a leukocyták aktivációját és migrációját a sérült szövetbe.<sup>25</sup> Az aktivált, illetve akkumulálódott leukocyták további jelentős mennyiségű szabad gyököt termelnek, amelyek valamennyi sejtorganellumban károsodást okozhatnak.

Az oxidatív stressz mellett a reperfüziós károsodás másik potenciális tényezője a nitrozatív stresszt ered-

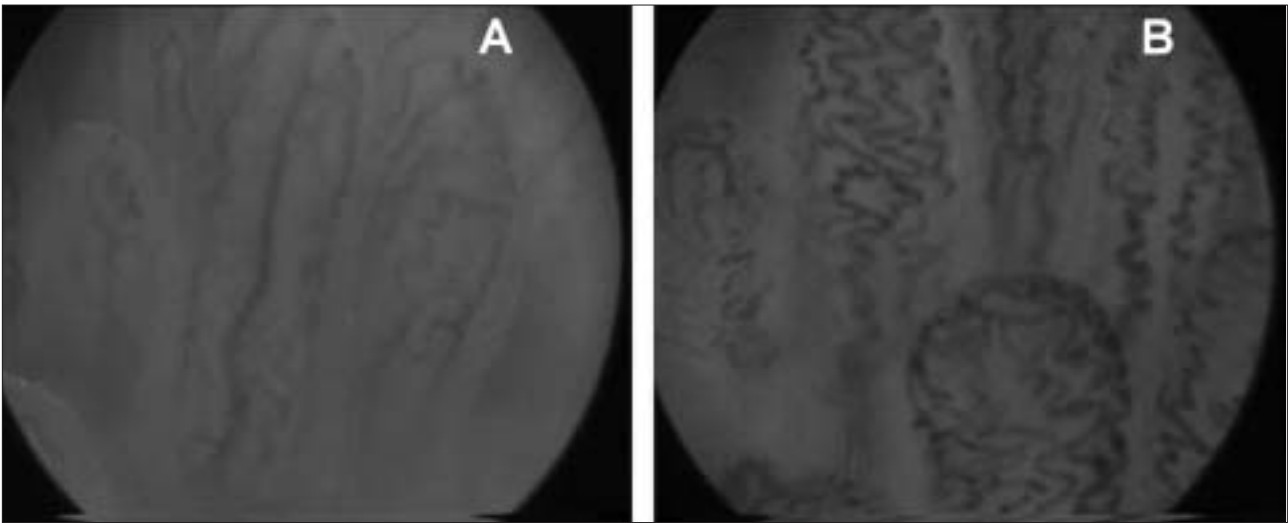
ményező nitrogén-monoxid (NO) és származékai. A NO rövid féleletidejű reaktív molekula, amely a gastrointestinalis traktusban különösen nagy mennyiségben képződik a konstitutív módon működő neuronális és endothelialis típusú NO-szintetáz (NOS) enzimek által katalizált folyamatban. Mivel párosítatlan elektronja van, szabad gyöknek tekinthető, és nagy affinitással reagál a reperfüzió kezdetén képződő szuperoxidgyökökkel, peroxinitrit-aniont képezve,<sup>19</sup> amely szintén rendkívül reaktív oxidatív ágens. Bár önmaga nem szabad gyök, sokkal reakcióképesebb, mint a kiindulási molekulák, és jelentős szerepe van proteinstruktúrák módosításában, funkciójuk megváltoztatásában.<sup>1</sup>

### Mikrokeringési következmények

Napjainkban a mikrokeringés vizsgálata már nem csupán az orvostudományi kutatások középpontjában áll, megjelent a klinikai diagnosztikában is, köszönhetően a képalkotó technikai eszközök fejlődésének. A mikrokeringés aktuális dinamikus vizsgálómódszerei az *in vivo* intravitális videomikroszkópia (IVM) alkalmazásain alapulnak. Ennek egyik területe a vér sejtsejtes elemek különböző fluoreszcens festékekkel történő jelölése, leukocyták esetében Rhodamine 6G-vel, a vörösvértestek esetében pedig pl. fluoreszcein-izotiocianáttal. Így a sejtreakciók, a vörösvértestek áramlási sebessége és az érfal permeabilitási viszonyai láthatóvá tehetők.

A mélyebb rétegek mikrokeringésének direkt megfigyelését kontraszterősítés nélküli IVM-technika, az Ortogonális Polarizációs Spektrális (OPS) képalkotás teszi lehetővé.<sup>11</sup> Ez esetben a vizsgált tárgyat lineárisan polarizált fényvel világítják meg. A képalkotás a szövetek belsejéből visszaérkező depolarizált fényel történik, amely elegendő ahhoz, hogy hátulról megvilágítson minden olyan struktúrát, ami a tárgy felszíne alatt található. Az OPS képalkotáshoz az 548 nm-es hullámhosszhoz közelítő fényt alkalmaznak (ebben a tartományban a hemoglobint és az oxihemoglobint egyenlő mértékű fényelnyelést mutat), ezáltal minden olyan képlet láthatóvá válik, ami hemoglobint tartalmaz. Mesenterialis I/R béltranszplantációs modelljében a transzplantációt követő 2–4 órás reperfüziós fázis alatt készült OPS-felvételeken a vörösvértestek áramlási sebességének szignifikáns csökkenését, fluoreszcens IVM alkalmazásával pedig a leukocyták fokozott kikapadást és extravasációját figyeltük meg.<sup>28</sup> Emellett strukturális elváltozásokat is megfigyeltünk: reperfüzió alatt a villusokban a kapillárisok dugóhúzó jellegű spirális összecsavarodása jelezte a villus hosszának rövidülését (1. ábra A és B).

A mikrokeringési zavarok hátterében álló kórfolyamatokat kimenetelük szempontjából alapvetően két fő csoportba sorolhatjuk: *autoregulációs diszfunkciót*, illetve *celluláris interakciót* eredményező folyamatok, amelyekben a mikrocirkuláció valamennyi sejtsejt részt vehet<sup>14</sup>.



1. ábra. Vékonybélnyálkahártya- (kutya) villusok alapállapotban (A) és béltranszplantációt követő károsodott állapotban (B). OPS intravitális videomikroszkópos felvételek

#### *Autoregulációs diszfunkció – mikrocirkulációs shunt kialakulása*

A mikrokeringési diszfunkció korai megjelenési formája a heterogén, fluktuáló kapillárisperfúzió. A terület számos kapillárisa alulperfundált, míg mások normális, vagy akár kórosan magas áramlással rendelkeznek.<sup>24, 26</sup> A funkcionálisan sérülékeny mikrokeringési egység hypoxiássá válik, amely oxigénextrakciós deficitet eredményez. Ebben az állapotban a mikrokeringési parciális oxigénnyomás ( $\mu\text{pO}_2$ ) a vénás  $\text{pO}_2$ -értéke alá csökken. Ez a „ $\text{pO}_2$  gap” néven definiált egyenlőtlenség eredményezi a mikrocirkulációs shunt létrejöttét. Mérése lehetővé teszi az adott területen a funkcionális shunt súlyosságának megítélését. A „ $\text{pO}_2$  gap” jelensége az egyik oka annak, hogy a szisztémás hemodinamikai és oxigenizációs paraméterek nem alkalmasak a mikrocirkulációs zavarok érzékelésére.<sup>13</sup>

Az autoreguláció egyik lényeges eleme a lokális NO-rendszer. A különböző NOS izoformáknak (endothelialis, neuronális, induktív) meglehetősen heterogén expressziója a különböző szervterületeken inhomogén NO-produkciót eredményezhet. A lokális NO-hiány a prekapilláris vasodilatatio csökkenését, ezáltal mikrokeringési shunt kialakulását, a terület csökkent perfúzióját eredményezheti.<sup>26</sup> Az autoreguláció másik jelentős komponense a vasoconstrictor mediátorok, elsősorban az endotelin (ET) peptidek képződése, amelyek az értónusra gyakorolt erőteljes vasoconstrictor hatásukat a prekapilláris és arterioláris simaizomsejteken fejtik ki autokrin, illetve parakrin módon, ET-A és ET-B<sub>2</sub> receptorok közvetítésével.<sup>3</sup> Az ET képződése, metabolizmus szoros kapcsolatban áll a keringési elégtelenségek mikrokeringési következményeivel, mivel az ET plazmaszintjének emelkedése heterogén mikroperfúziót és a funkcionális kapillárisdenzitás csökkenését

okozza.<sup>17, 24</sup> Számos közlemény jelzi, hogy az ET-A-receptorok szelektív gátlásával a mikrokeringési elégtelenség kedvezően befolyásolható.<sup>24, 28</sup>

#### *Celluláris interakciók és következményeik*

A leukocytá-endothel interakció a keringési elégtelenség anoxiás, hypoxiás fázisát követő reoxigenizációs periódus későbbi szakaszára jellemző, fokozatosan erősödő, antigénfüggetlen gyulladás karakterisztikus jelensége. A folyamat korai szakaszában, elsősorban a mikroérhálózat venuláris oldalán a neutrofil leukocyták áramlása lelassul, a sejtek egyre szorosabban kapcsolódnak az endotheliumhoz. Ez az interakció gördülő (*rolling*) fázisa, amelyet az endothelsejtek felszínén E- és P-szelektinek, míg a leukocytá oldalon L-szelektin-molekulák expressziója kísér. A folyamat további szakaszában jelentős mértékben fokozódik a leukocyták endotheliumhoz való időleges, majd tartós kitapadása, adhézioja, amelyet az endothelsejteken adhézios molekulák (ICAM-1, VCAM-1), míg a leukocyták esetében integrinek (CD11/CD18) megjelenése követ. A folyamat utolsó fázisa végül a leukocyták szöveti transzmigrációja és akkumulációja.<sup>15</sup> Az érpályából kilépett leukocyták proteázaik és elasztázaik révén microvascularis károsodást, az endothelialis glyco-calix sérülését, microvascularis koagulációs zavarokat okozhatnak. Mindezek együttes következménye a „no-reflow” jelenség, amely során a hypoxiás endothelsejtek duzzadása egyrészt a kapillárisok lumenének beszűküléséhez vezet, másrészt az aktivált endothelsejtek további adhézios molekulák expresszióját indukálják, ezáltal további elzáródást eredményező leukocytá-endothelium interakciót és a következményes leukocytá-extravasatiót okozva.<sup>15</sup>

### *A gastrointestinalis mikrokeringés heterogenitása*

A vékonybél mikrokeringése élettani körülmények között sem tekinthető homogénnek, hiszen a bélfalba jutó vérmennyiség túlnyomó része a mucosát látja el.<sup>26</sup> Feltételezhetjük, hogy ez a jelenség eszkalálódhat kóros körülmények között. A bél falon belül a keringés heterogenitásának fokozódása mind térben (vagyis az egyes anatómiai rétegek között és egy adott rétegen belül is), mind időben (fluktuáló áramlás) jelentkezhet, s mindezek alapján a noxa jellegétől függően három alapvető heterogenitási formát különböztethetünk meg. 1. Hypoxia-reoxigenizáció alatt a vékonybélvillusokban a mikrokeringés időbeli heterogenitása („*flow motion*”) általános jelenség. 2. A splanchnicus keringést befolyásoló szisztémás keringési zavarokban (pl. vérzéses shock) a vékonybél egymáshoz párhuzamosan kapcsolt mikrokeringési rendszerei között eltérő mértékű térbeli heterogenitás alakul ki: az izom mikrokeringése a villusokénál sokkal jobban károsodik, vagyis a vékonybél különböző anatómiai rétegei között is redisztribúció alakul ki a mucosa javára. 3. A vasodilatator NO szintézisének teljes, nem szelektív gátlásának hatására (pl. gyulladáshoz mediátorok miatt) az egymással sorosan kapcsolt mikrokeringési rendszerekben (villusokban) alakul ki heterogenitás.<sup>24, 26</sup>

A mikroperfúzió heterogenitása és az oxigénextrakció között fordított kapcsolat áll fenn,<sup>16</sup> ha a mikroperfúzió heterogén, a szövetek oxigénextrakciója csökken. A mikroperfúzió heterogenitása tehát olyan tényező, ami meghatározhatja a folyamat végkimenetelét.

### **A mesenterialis I/R károsodás *in vivo* morfológiai vizsgálata**

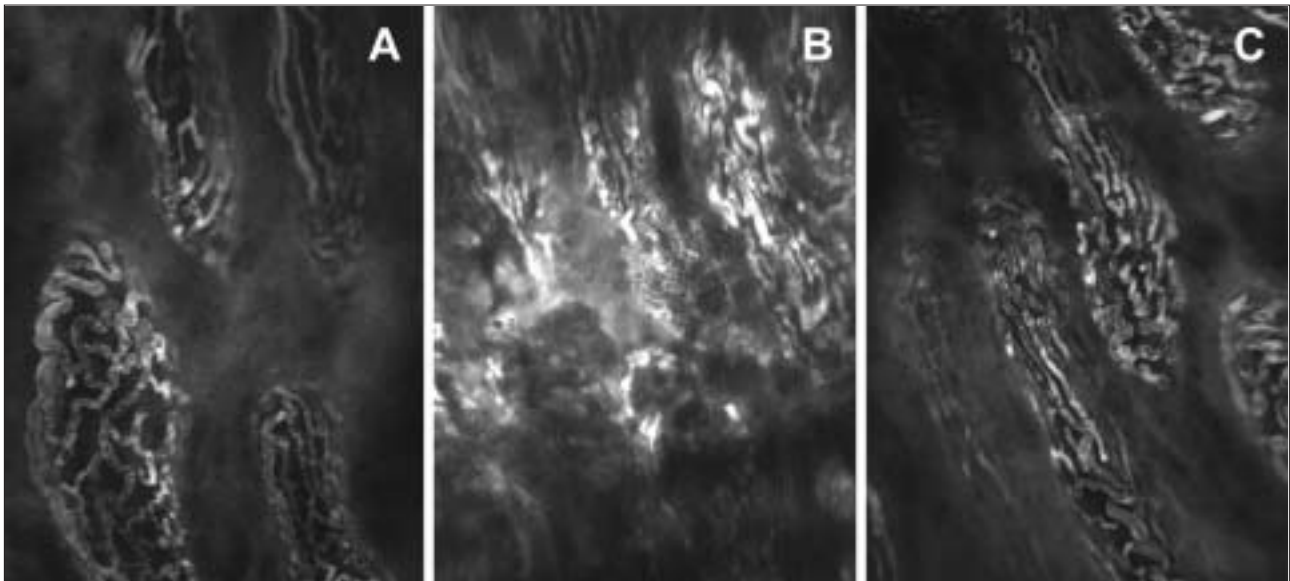
A mesenterialis artéria elzáródását követően leghamarabb a villusok csúcsa károsodik, mivel ez a terület rendkívül érzékeny a hypoxiára és az alacsony áramlással járó állapotokra viszonylag rossz alap-oxigénellátása és nagy oxigénigénye folytán. Ennek hátterében a bélbolyag-arterioláknak és -venuláknak a villus hossz tengelyével párhuzamos lefutása áll, amely lehetőséget biztosít egy ellenáramú kicserélő mechanizmussal artériás oxigénshunt kialakulására.<sup>27</sup> A sejtek duzzadása, a subepithelialis folyadékfelhalmozódás és az epithel-sejtek elemelkedése az elzáródás korai következményei, és mivel a sejtek így távolabb kerülnek a tápláló kapillárisoktól, mindez tovább rontja az egyébként is rossz intracelluláris anyagcserét. Helyzetükből fakadóan a villuscsúcsok vannak leginkább kitéve a bélpasszázs miatti nyíróerőknek is, az itt található epithel-sejtek válnak le először, és itt kezdődik meg a mucosa szerkezetének felbomlása.<sup>12</sup> Ha a mesenterialis I/R hosszú ideig tart, akkor a villusok denudálódnak, dezintegrálódnak a lamina propria, végül transmucosalis, transmuralis infarktusz alakul ki.<sup>4, 20</sup> Az irodalmi adatok<sup>12, 27</sup> és saját megfigyeléseink szerint is fontos kiemelni, hogy a vékonybél-nyálkahártya károsodása

nem homogén, részben a fentebb leírt vertikális heterogenitás (villuscsúcs – bázis), részben pedig a mikrokeringés térbeli és időbeli heterogenitása miatt. A statikus szövettani kép sokszor – látszólag – ellentmondásban áll az adott elváltozás súlyosságával. A morfológiai változások dinamikájának *in vivo* követésére alkalmas fluoreszcens konfokális pásztázó lézer endomikroszkóp technikát (Five1, Optiscan Pty. Ltd., Melbourne, Victoria, Australia) alkalmazva elkerülhetők a konvencionális szövettani vizsgálatok artefaktumai. Az eszközzel elsőként végzett vizsgálatainkhoz a vékonybél lumenét megnyitva a nyálkahártyát feltártuk, módszerünkkel a mucosa microvascularis szerkezetét és a funkcióra utaló permeabilitási változást fluorescein-izotiocianát-dextrán (FITC-dextrán; 150 KDa, 20 mg/ml, Sigma Chem) iv. adása után vizsgálhatjuk. A nyálkahártya szerkezeti változásait akridin orange fluoreszcens festék (Sigma-Aldrich Inc, St. Louis, MO, USA) felszíni alkalmazása tette láthatóvá. Az optikai felbontás a laterális dimenzióban 0,7 µm, míg axiálisan 7 µm volt, az ábrázolt terület 475 × 475 µm. A vizsgálatok során 250 µm mélységig, 4 µm-es szeletvastagsággal készültek virtuális metszetek a bélbolyhok átmetszeteiről, illetve felszínéről.

Altatott patkányokon végzett kísérletekben, 45 perc ischaemia után, a reperfúzió 20. percében készült felvételeken akridin orange jelölés esetében, kontroll állatokban a bélbolyhok normál felszíne volt látható. Az I/R-on átesett állatok esetében a villus csúcsi részén kifejezett hámszejtleválást figyeltünk meg. FITC-dextrán jelölését követően, kontroll állatokban intakt érfaletésén a jelzőanyag az érpályán belül marad (2. *ábra A*). Az I/R károsodás hatására megnőtt a vascularis permeabilitás, a FITC-dextrán kijutott a környező szövetekbe, diffúz háttér-fluoreszcenciát és a kapillárisok mentén megnövekedett jelintenzitást okozva (2. *ábra B*). A morfológiai károsodás mértékét konvencionális szövettani vizsgálattal is összehasonlítottuk (validáltuk): az epithel elvékonyodása, a villusok hosszának jelentős rövidülése látható az I/R-en átesett mucosa hematoxilín-eozin festéssel készült szövettani metszetein (3. *ábra A és B*).

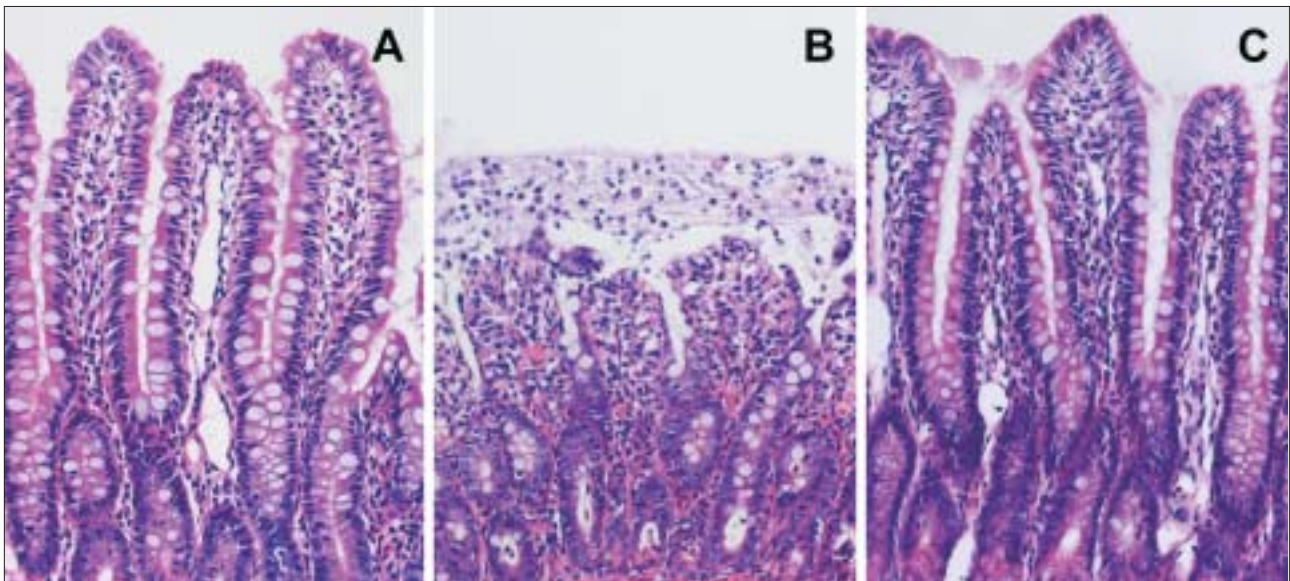
### **Új terápiás lehetőség – a metáninhaláció – alkalmazása a mesenterialis I/R károsodás csökkentésére**

A munkacsoportunk által az elmúlt évtizedben végzett *in vitro* és *in vivo* vizsgálatok felvetették egy eddig inertnek tekintett biológiai gáz, a metán nem bakteriális termelésének lehetőségét eukarióta sejtekben. Első vizsgálatainkban igazoltuk a membránalkotó foszfátidil-kolin- (PC-) molekula szerepét a ROS-képződéssel járó I/R reakciókban, és emellett több gyulladáshoz kapcsolódóan megfigyeltük a PC és származékai gyulladáscsökkentő hatását.<sup>5, 6</sup> Kimutattuk továbbá, hogy a vékonybél ischaemiáját követő reperfúzió elején megnövekszik a kilélegzett levegő metántartalma, valamint igazoltuk, hogy a jelenség összefügg a táplálékkal a



2. ábra. Vékonybél-nyálkahártya (patkány) in vivo szövettani felvételei fluoreszcens konfokális lézer pásztázó endomikroszkóppal iv. adott FITC-dextrán alkalmazása után

Kontroll nyálkahártya kapilláris hálózata (A); 45 perc ischaemia – 20 perc reperfúzió átesett állatok nyálkahártya kapilláris hálózata fokozott vasculáris permeabilitással (B); normoxiás metánkezelést kapott, ischaemia-reperfúzió átesett állatok nyálkahártya kapilláris hálózata (C)

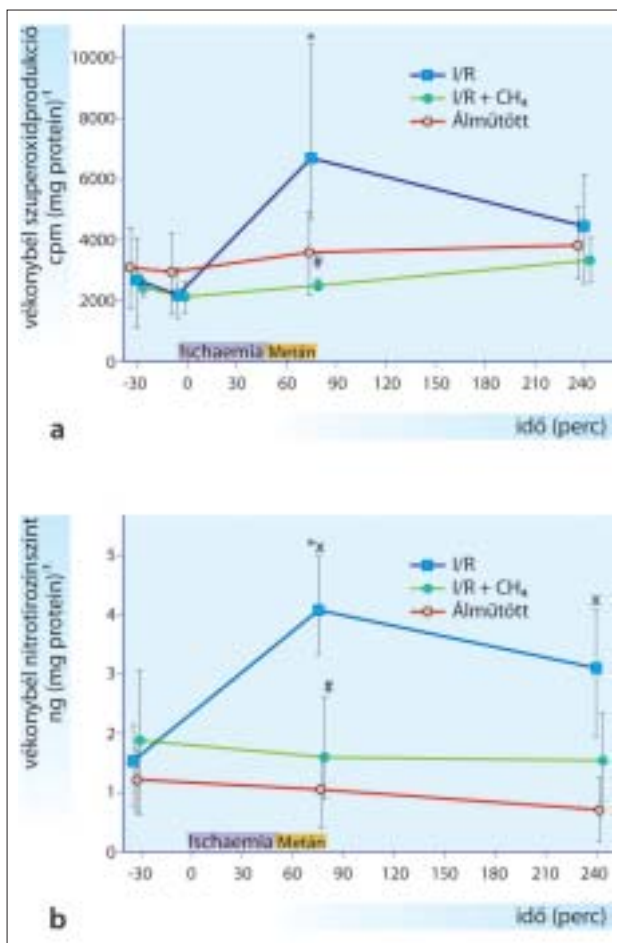


3. ábra. Vékonybél-nyálkahártya (patkány) konvencionális hematoxin-eozinnal festett szövettani vizsgálata: kontroll állatok nyálkahártyája (A), ischaemia-reperfúzió átesett állatok nyálkahártyája (B), metánkezelést kapott, ischaemia-reperfúzió átesett állatok nyálkahártyája (C)

keringésbe jutó PC-tartalommal.<sup>8</sup> Feltételeztük, hogy a metánképző reakció az ischaemiás periódus, vagyis a szöveti reduktív stressz alatt játszódhat le, és felvetettük, hogy a membrán kettős rétegek PC fejcsoportjából (kolinból), potenciális elektronakceptoroként viselkedő metilcsoportokból metán képződhet többlépéses demetilációs folyamat során.<sup>9</sup> Mindezek alapján arra következtetünk, hogy a metánképződés mechanizmusa az

aerob sejtek átmeneti oxigénhiányos állapotával áll összefüggésben, és a metángeneráló reakció az élő szervezetek reduktív stresszre adott válasza, mely védelmet nyújthat a szervezet redox egyensúlyának felborulásakor.<sup>2</sup>

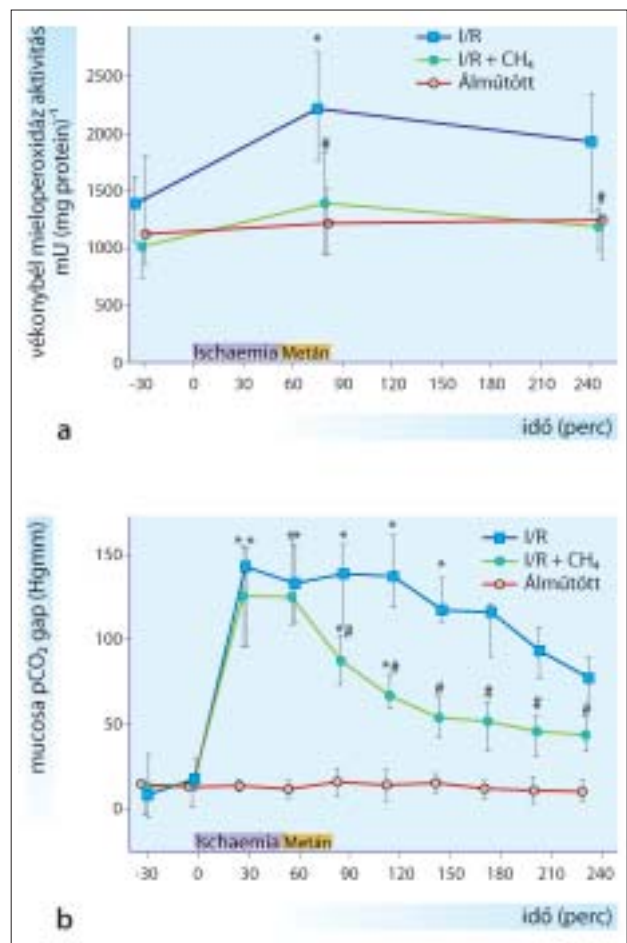
A fentiekre alapozva megvizsgáltuk az exogén, normoxiás metáninhaláció – mint gyulladáscsökkentésre alkalmas, adjuváns terápia – hatását vékonybél



4. ábra. A vékonybél (kutya) szöveti szuperoxid- (A) és nitrotirozin- (B) képződésének változása az álműtött, az I/R és az I/R + metánkezelés csoportokban

A vonalgrafikonon a mediánértéket és a szórás jellemzésére a 25 és 75 percentilértékeket tüntettük fel. \*  $p < 0,05$  csoporton belüli szignifikáns változás mutatja a kontroll értékhez képest; #  $p < 0,05$  I/R + metán csoport szignifikáns változása az I/R csoporthoz képest

I/R nagyállat-modelljében. Kimutattuk, hogy az ischaemia végén, valamint a reperfüzió kezdetén alkalmazott folyamatos metáninhaláció (2,5% v/v metán-normoxiás levegő gázkeverék  $\approx 1$  mmol/perc; LindeGáz, Budapest, Magyarország) szignifikánsan, a kontroll csoport szintjére csökkentette az I/R által indukált oxidatív stressz (szöveti ROS-produkció) és nitrozatív stressz (szöveti nitrotirozin-képződés) markereit (4. ábra A és B). A metánkezelés normalizálta a leukocitaakkumulációt jelző vékonybél-mieloperoxidáz aktivitását is, jelentősen javította a mucosa mikrokeringését (5. ábra A és B),<sup>2</sup> és megakadályozta a súlyos morfológiai károsodás kialakulását. Mindezt az *in vivo* fluoreszcens konfokális lézer endomikroszkópiával (2. ábra C) és konvencionális szövettani vizsgálattal kapott eredmények is alátámasztották (3. ábra C).



5. ábra. A vékonybél-nyálkahártya (kutya) szöveti leukocita-akkumulációjának (mieloperoxidáz aktivitás) (A) és mikrokeringésének (pCO<sub>2</sub>-gap) (B) változása az álműtött, az I/R és az I/R + metán csoportokban

A vonalgrafikonon a mediánértéket és a szórás jellemzésére a 25 és 75 percentilértékeket tüntettük fel. \*  $p < 0,05$  csoporton belüli szignifikáns változás mutatja a kontroll értékhez képest; x  $p < 0,05$  az álműtött csoporthoz képest; #  $p < 0,05$  I/R + metán csoport szignifikáns változása az I/R csoporthoz képest

A hatásmechanizmus további elemeinek tisztázására mindenképpen szükség lesz még kísérletes vizsgálatokra, de eredményeinket összefoglalva elmondhatjuk, hogy a normoxiás metán alkalmazása előnyös adjuváns kezelés lehet az I/R által okozott potenciálisan káros, gyulladáshatásos hatások mérséklésére reményeink szerint a későbbiekben a klinikumban is.

### Köszönetnyilvánítás

Jelen kutatási eredmények megjelenését „Az SZTE Kutatóegyetemi Kiválósági Központ tudásbázisának ki szélesítése és hosszú távú szakmai fenntarthatóságának megalapozása a kiváló tudományos utánpótlás biztosításával” című, TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0012 azonosítószámú projekt támogatja. A projekt az Euró-

pai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

Köszönetünket fejezzük ki az SZTE ÁOK Patológiai Intézet munkatársainak a szövettani képek elkészítéséért.

További kutatási támogatás: OTKA K75161; TÁMOP-4.2.2/A-11/1/KONV-2012-0035;

## Irodalom

1. **Beckman JS:** Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chem Res Toxicol* 1996; **9**: 836-844.
2. **Boros M, Ghyzcy M, Ércs D, Varga G, Tókécs T, Kupai K, Torday C, Kaszaki J:** The anti-inflammatory effects of methane. *Crit Care Med*, 2012; **40**: 1269-1278.
3. **Boros M:** Microcirculatory dysfunction during intestinal ischemia-reperfusion. *Acta Physiol Hung* 2003; **90**: 263-279.
4. **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**: 478-488.
5. **Erős G, Kaszaki J, Czobél M, Boros M:** Systemic phosphatidylcholine pretreatment protects canine esophageal mucosa during acute experimental biliary reflux. *World J Gastroenterol* 2006; **12**: 271-279.
6. **Gera L, Varga R, Torok L, Kaszaki J, Szabo A, Nagy K, Boros M:** Beneficial effects of phosphatidylcholine during hindlimb reperfusion. *J Surg Res* 2007; **139**: 45-50.
7. **Ghyzcy M, Torday C, Boros M:** Simultaneous generation of methane, carbon dioxide, and carbon monoxide from choline and ascorbic acid – a defensive mechanism against reductive stress? *FASEB J* 2003; **17**: 1124–1126.
8. **Ghyzcy M, Torday C, Kaszaki J, Szabó A, Czobél M, Boros M:** Oral phosphatidylcholine pretreatment decreases ischemia-reperfusion-induced methane generation and the inflammatory response in the small intestine. *Shock* 2008a; **30**: 596-602.
9. **Ghyzcy M, Torday Cs, Kaszaki J, Szabó A, Czobél M, Boros M:** Hypoxia-induced generation of methane in mitochondria and eukaryotic cells – an alternative approach to methanogenesis. *Cell Physiol Biochem* 2008b; **21**: 251-258.
10. **Granger DN:** Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury *Am J Physiol* 1988; **255**: H1269-H1275.
11. **Groner W, Winkelman JW, Harris AG, Ince C, Bouma GJ, Messmer K, Nadeau RG:** Orthogonal polarization spectral imaging: A new method for study of the microcirculation. *Nature Med* 1999; **5**: 1209-1213.
12. **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**: G187-G196.
13. **Ince C, Sinaappel M:** Microcirculatory oxygenation and shunting in sepsis and shock. *Crit Care Med* 1999; **27**: 1369-1377.
14. **Ince C:** The microcirculation is the motor of sepsis. *Critical Care* 2005; **9** (S4): S13-S19.
15. **Jaeschke H, Smith CW:** Mechanism of neutrophil-induced parenchymal cell injury. *J Leukoc Biol* 1997; **61**: 647-653.
16. **Kalliokoski KK, Oikonen V, Takala TO, Sipilä H, Knuuti J, Nuutila P:** Enhanced oxygen extraction and reduced flow heterogeneity in exercising muscle in endurance-trained men. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; **280**: E1015-E1021.
17. **Kaszaki J, Wolfárd A, Szalay L, Boros M:** Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc* 2006; **38**: 826-828.
18. **Kolkman JJ, Mensink PBF:** Non-occlusive mesenteric ischaemia: a common disorder in gastroenterology and intensive care. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003; **17**: 457-473.
19. **Koppenol WH, Moreno JJ, Pryor WA, Ischiropoulos H, Beckman JS:** Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem Res Toxicol* 1992; **5**: 834-842.
20. **Park PO, Haglund U, Bulkley GB, Fält K:** The sequence of development of intestinal tissue injury after strangulation ischemia and reperfusion. *Surgery* 1990; **107**: 574-580.
21. **Parks DA, Bulkley GB, Granger DN, Hamilton SR, McCord JM:** Ischemic injury in the cat small intestine: role of superoxide radicals. *Gastroenterology* 1984; **82**: 9-15.
22. **Parks DA, Granger DN:** Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol* 1986; **250**: D749-D753.
23. **Schoots IG, Koffeman GI, Legemate DA, Levi M, van Gulik TM:** Systematic review of survival after acute mesenteric ischaemia according to disease etiology. *Br J Surg* 2004; **91**: 17-27.
24. **Szabó A, Suki B, Csonka E, Eszlári E, Kuksa K, Vajda K, Kaszaki J, Boros M:** Flow motion in the intestinal villi during hemorrhagic shock: a new method to characterize the microcirculatory changes. *Shock* 2004; **21**: 320-328.
25. **Toyokuni S:** Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathol Int* 1999; **49**: 91-102.
26. **Vajda K, Szabó A, Kuksa K, Suki B, Boros M:** Microcirculatory heterogeneity in the rat small intestine during compromised flow conditions. *Microcirculation* 2004; **11**: 307-315.
27. **Vollmar B, Menger MD:** Intestinal ischemia/reperfusion: microcirculatory pathology and functional consequences. *Langenbecks Arch Surg* 2011; **396**: 13-19.
28. **Wolfárd A, Szalay L, Kaszaki J, Sahin-Tóth G, Vangel R, Balogh Á, Boros M:** Dynamic in vivo observation of villus microcirculation during small bowel autotransplantation: effects of endothelin-A receptor inhibition. *Transplantation* 2002; **73**: 1511-1513.
29. **Yokoyama Y, Beckman JS, Beckman TK, Wheat JK, Cash TG, Freeman BA, Parks DA:** Circulating xanthine oxidase: potential mediator of ischemic injury. *Am J Physiol* 1990; **258**: G564-G570.
30. **Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ:** Mitochondrial ROS-induced ROS release: an update and review. *Biochim Biophys Acta* 2006; **1757**: 509-517.

Levelezési cím: Dr. Kaszaki József  
Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar, Sebészeti Műtéttani Intézet  
6720 Szeged, Pécsi u. 6.  
Tel: 06/62-545-103, Fax: 06/62-545-743  
E-mail: kaszaki.jozsef@med.u-szeged.hu