

Vplyv vitamínu C a N-acetylcysteínu pri ischemicko-reperfúznom poškodení priečne pruhovaného svalu v experimente

MUDr. Tatiana Granda, PhD.¹, doc. MUDr. Štefan Tóth, PhD.²

¹Klinika cievnej chirurgie LF UPJŠ a VÚSCH, a.s.

²Ústav histológie a embryológie LF UPJŠ v Košiciach

Hlavným cieľom tejto práce bolo preskúmať protektívny účinok antioxidantov na priečne pruhované svalstvo dolných končatín po vyvolaní akútnej ischemie v experimente a ich vplyv na zmiernenie poškodenia tkanív v období reperfúzie.

V pokuse boli použité laboratórne potkany kmeňa Wistar (n=95). U všetkých jedincov bola navodená hodinová ischemia uzáverom brušnej aorty cievnu atraumatickou svorkou. Rozdelené boli do 18 experimentálnych skupín. I₁R_y(3,6,9,12,24,48) – skupiny s ischemicko-reperfúznym (IR) poškodením bez použitia antioxidantov, I₁R_y(3,6,9,12,24,48)C – skupiny s IR poškodením a aplikáciou vitamínu C a I₁R_y(3,6,9,12,24,48)NAC – skupiny s IR poškodením a aplikáciou N-acetylcysteínu (n=90). Skupina zdravých jedincov FK (n=5) zahŕňala potkanov bez navodenia IR poškodenia. Histologické zmeny sme analyzovali po 3, 6, 9, 12, 24 a 48 hodinách reperfúzie. Po uplynutí doby reperfúzie boli odobraté vzorky m. gracilis na ďalšie histologické spracovanie.

Morfometricky sme zaznamenali signifikantný nárast hrúbky svalových vlákien vo všetkých skupinách s IR poškodením. Aplikáciou vitamínu C došlo k zabráneniu rozvoja zmien hrúbky svalových vlákien (***p<0,001 I₁R₂₄ vs. I₁R₂₄C; ***p<0,001 I₁R₄₈ vs. I₁R₄₈C). V skupinách s IR poškodením a aplikáciou NAC s narastajúcou časovou periódou reperfúzie (I₁R₂₄NAC, I₁R₄₈NAC) mala hrúbka svalových vlákien taktiež klesajúcu tendenciu a namerané hodnoty dosiahli fyziologické parametre.

Na základe našich výsledkov konštatujeme, že aplikáciou vitamínu C ako aj N-acetylcysteínu došlo k zmierneniu následkov ischemicko-reperfúzneho poškodenia.

Kľúčové slová: ischemicko-reperfúzne poškodenie, potkan, kostrové svalstvo, N-acetylcysteín, vitamín C

Effect of vitamin C and N-acetylcysteine during ischemia-reperfusion injury in experiment

The main focus of this thesis was to analyze the protective effect of antioxidants on skeletal muscles of lower limbs after experimental induction of acute ischemia and their impact on reduction of tissue damage during reperfusion.

Wistar rats (n=95) were the animal models used in this experiment. One hour ischemia was induced in all of the models by clipping of abdominal aorta with atraumatic clip. The rats were divided into 18 experimental groups. I₁R_y(3,6,9,12,24,48) - groups with ischemia-reperfusion (IR) injury without the use of antioxidants, I₁R_y(3,6,9,12,24,48)C - groups with IR injury and the use of vitamin C and I₁R_y(3,6,9,12,24,48)NAC - groups with IR injury and the use of N-acetyl cysteine (n=90). Physiological control (FK) group (n=5) were healthy rats without induced IR injury. Histologic changes were analyzed after 3, 6, 9, 12, 24 and 48 hours of reperfusion. Tissue samples of gracilis muscle were collected after reperfusion for histologic examination.

Significant increase of muscle fiber thickness was morphometrically registered in all the groups with ischemia-reperfusion injury. Administration of vitamin C inhibited the changes of muscle fiber thickness (***p<0,001 I₁R₂₄ vs. I₁R₂₄C; ***p<0,001 I₁R₄₈ vs. I₁R₄₈C). The muscle fiber thickness had progressively decreasing tendency upon longer reperfusion in the groups with ischemia-reperfusion injury and the use of N-acetyl cysteine (I₁R₂₄NAC, I₁R₄₈NAC) almost to physiological levels.

Our findings conclude that the use of vitamin C and N-acetyl cysteine reduce the results of ischemia-reperfusion injury.

Key words: ischemia-reperfusion injury, rat, skeletal muscles, N-acetyl cysteine, vitamin C

Slov. chir., 2020;17(3):62-71

Úvod

Akútna končatinová ischemia (ALI – z angl. acute limb ischemia) je definovaná ako náhly pokles alebo zhoršenie prietoku krvi končatinou (1). Akútne uzávěry končatinových artérií sa radia medzi náhle cievne príhody, ktoré vyžadujú urgentnú diagnostiku a následnú adekvátnu liečbu. Oneskorená, resp. nesprávna diagnostika, a tým pádom

odklad nevyhnutnej terapie môžu mať za následok ohrozenie života pacienta a nutnosť amputácie postihnutej končatiny (3, 19, 3, 15). Bez adekvátnej terapie u 2/3 pacientov dochádza k okamžitej amputácii (9). Mortalita u pacientov po prekonaní akútnej končatinovej ischemie sa pohybuje v rozmedzí 9 – 22 % (7).

Ročná incidencia v populácii v prípade náhleho uzávěru tepien dolných

končatín je 14/100 000 obyvateľov (8, 9), v USA 15-26/100 000 obyvateľov (24). Akútne arteriálne uzávěry sú spôsobené embóliou, trombózou, úrazom, prípadne iatrogénne – punkciou tepny (10). Ku embólii dochádza najmä z kardiálnych príčin, vzniká predovšetkým pri neliečenej, prípadne nedostatočne liečenej fibrilácii predsiení (22, 17). ALI je diagnostikovaná na základe anamnézy a fyzikálneho vy-

šetrenia pacienta. Pacient sa sťažuje na krutú bolesť a náhle stŕpnutie postihnutej končatiny, ktoré v mnohých prípadoch postupne progreduje až do straty motorickej funkcie a svalovej rigidity (6).

Základná liečba ALI spočíva vo včasnom obnovení toku krvi do postihnutej oblasti. Dôsledkom akútnej končatinovej ischémie a následnej reperfúzie však môže dôjsť k vzniku lokálnych a celkových komplikácií (4). Toto ischemicko - reperfúzne poškodenie môže ohroziť život pacienta (hrozi multiorgánové zlyhanie). Reperfúzne poškodenie totiž zahŕňa aj poškodenie vzdialených, predtým neischemických orgánov (5). Aj po úspešnej revaskularizácii sa tak pomerne často stretávame s následkami IR poškodenia, ktorých zvládnutie pre pacienta je mnohokrát ťažšie ako prekonanie ischémie samotnej. Preto je nevyhnutné neustále hľadať možnosti ako tieto následky zmierniť.

Najdôležitejším predpokladom pre zabránenie rozvoja multiorgánového zlyhania následkom akútnej končatinovej ischémie je teda včasná endovaskulárna alebo chirurgická intervencia. V modernej komplexnej terapii ischemicko - reperfúzneho poškodenia však nesmú chýbať antioxidantne pôsobiace látky, ktorých úlohou je znížiť poškodenie vyvolané reaktívnymi formami kyslíka.

Materiál a metódy

Experimentálna časť bola realizovaná po schválení Štátnou veterinárnou a potravinovou správou Slovenskej republiky a po schválení Etickou komisiou LF UPJŠ. V pokuse boli použité laboratorne potkany kmeňa Wistar, ktoré pochádzali z Centrálného zvieratníka UPJŠ LF v Košiciach. Išlo o samce ($n=95$), ktorých vek sa pohyboval v rozmedzí 3 - 4 mesiace a priemerná hmotnosť jedinca predstavovala 290 gramov.

Celková anestézia bola u všetkých jedincov navodená intramuskulárnou aplikáciou anestetika (Zoletil 50 inj. sicc. ad us. vet.) v adekvátnej dávke. Po navodení celkovej anestézie a príprave operačného poľa prebiehal samotný operačný výkon. Realizovaná bola mediálna laparotómia, mobilizácia tenkého a hrubého čreva a retroperitoneálne preparácia brušnej aorty až po jej bifur-

káciu. Tepnový uzáver (ischemická fáza) bol navodzovaný atraumatickou cievnu svorkou. U všetkých jedincov bola realizovaná ischémia v trvaní jednej hodiny. Vybraným experimentálnym skupinám bol v ischemickej fáze, 10 minút pred plánovaným navodením reperfúzie intravenózne podaný antioxidant. Ako antioxidanty boli v tomto experimente použité registrované lieky, bežne dostupné na našom území. V projekte sme používali Vitamín C (Acidum ascorbicum biotika sol inj 500 mg/5ml) v dávke 150mg/kg živej hmotnosti a N-acetylcysteín, dostupný pod názvom ACC injekt sol inj 300 mg/3ml (amp.skl.) v dávke 250mg/kg živej hmotnosti. Hodinová ischémia bola ukončená odstránením cievnej svorky, čím bolo navodené obdobie reperfúzie (3, 6, 9, 12, 24 a 48 hodín). Dĺžka reperfúzie bola závislá od zaradenia zvierata do jednotlivých experimentálnych skupín.

Rozdelenie zvierat do jednotlivých skupín:

A./ Kontrolná skupina - fyziologická kontrola FK ($n = 5$)

Kontrolná skupina pozostávala z piatich zdravých potkanov (bez navodenia akútnej ischémie/reperfúzie). Z každého potkana boli odobraté dve kontrolné vzorky svalu m. gracilis a plná krv z vena cava inferior. Vzorky boli následne spracované a využité pre porovnanie vzoriek so skupinami s navodenou ALI.

B./ Experimentálne skupiny $I_1R_y(3,6,9,12,24,48)$, $I_1R_y(3,6,9,12,24,48)C$, $I_1R_y(3,6,9,12,24,48)NAC$ ($n = 90$)

Skupiny $I_1R_y(3,6,9,12,24,48)$ pozostávali z potkanov, ktorým bola navodená hodinová ischémia uzáverom abdominálnej aorty subrenálne a následne bol presne stanovený čas reperfúzie odsťahovaním aorty (skupiny bez použitia antioxidantne pôsobiacich látok).

Skupiny $I_1R_y(3,6,9,12,24,48)C$ pozostávajúce z potkanov, ktorým bola navodená obdobným spôsobom hodinová ischémia a následne bol presne stanovený čas reperfúzie. Danej skupine potkanov bol aplikovaný 10 minút pred navodením reperfúzie Vitamín C i.v. v dávke 150mg/kg živej hmotnosti.

Skupiny $I_1R_y(3,6,9,12,24,48)NAC$ pozostávajú z potkanov, ktorým bola taktiež navodená hodinová ischémia a následne sa stanovila presná doba reperfúzie. Danej skupine potkanov bol aplikovaný v 50. minúte ischémie (10 minút pred navodením reperfúzie) i.v. N-acetylcysteín v dávke 250mg/kg živej hmotnosti.

C./ Rezervná skupina R ($n = 2$)

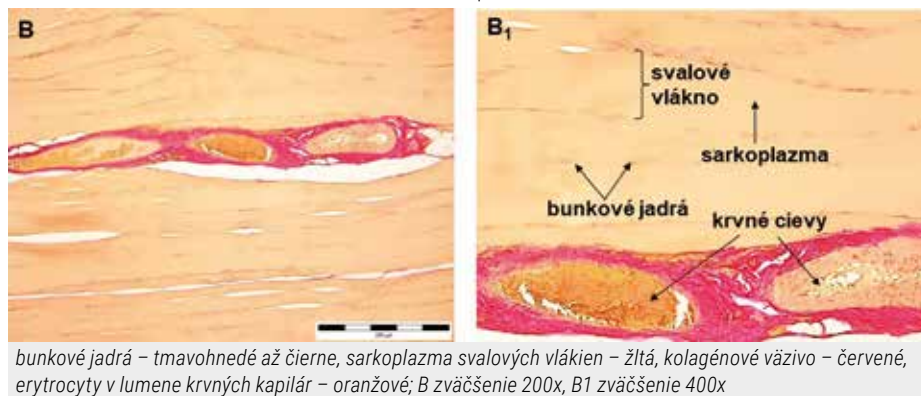
Rezervná skupina experimentálnych zvierat s počtom 2 kusov, ktorá zohľadňovala možnosť nepredvídateľných úhynov z iných ako experimentálnych príčin.

Po ukončení ischemickej fázy bola brušná dutina zvierata uzavretá a potkany boli v doznievajúcej anestézii a analgézii vrátené späť do vyhrievaných klietok. Počas doby reperfúzie boli zvieratá pravidelne kontrolované a bolesť bola tlmená podávaním tramadolu (TRAMAL 50 mg/ml sol inj) subkutánne v adekvátnych dávkach. Po uplynutí stanovenej doby reperfúzie bola u potkanov opakovane navodená celková anestézia. Za aseptických podmienok boli odobraté vzorky musculus gracilis a plná krv z vena cava inferior. Následne boli všetky experimentálne zvieratá v hlbokoj anestézii usmrtené exsanguináciou.

Histologická analýza

Za aseptických podmienok sme u potkanov odobrali bioptické vzorky kostrového svalu musculus gracilis (0,5 až 1,0 cm³), ktoré sme po odbere fixovali v 4 % roztoku neutrálneho paraformaldehydu pre následné histologické spracovanie na Ústave histológie a embryológie LF UPJŠ v Košiciach. Po 48 - 72 hodinovej fixácii sme bioptické vzorky po excidovaní odvodnili, zaliali do paraplastu a narezali na 4-5 μ m hrubé histologické rezy a farbili príslušnými histologickými farbiacimi metódami.

Histologické rezy sme sfarbili základnou histologickou farbiacou metódou hematoxylín&eoín (H&E), ktorá je prehľadná a najčastejšie používaná metóda na získanie histologického obrazu tkaniva. Pri tejto metóde sa bunkové jadrá farbja bazofilne (na modro - fialovo), cytoplazma, kolagénové a svalové vlákna

Obrázok 1. Farbenie Van Gieson Pikrofuchsín v skupine I1R3

sa farbila acidofilne (ružovo – červenou), erytrocyty v lumene krvných kapilár na tehlovočerveno (2). Selektívnou farbiacou metódou Van Gieson Pikrofuchsín (VGP) sme zvýraznili a vzájomne rozlíšili prítomnosť kolagénových a svalových vlákien.

Komplexná histologická analýza kostrovej svaloviny (m. gracilis) bola zameraná na nasledujúce histomorfologické parametre priečne pruhovanej kostrovej svaloviny:

1. Morfometrická analýza hrúbky svalového vlákna ($\varnothing$ μ m)
2. Semikvantitatívne hodnotenie intenzity priečneho pruhovania
3. Semikvantitatívne hodnotenie zmeny bazofilie bunkových jadier svalových vlákien

V tkanivových rezoch m. gracilis farbených metódou H&E prípadne metódou VGP sme hodnotili celkový histopatologický obraz poškodenia architektúry priečne pruhovanej kostrovej svaloviny v obraze svetelnej mikroskopie. Následne sme kvantifikovali priemernú hrúbku svalových vlákien morfometricky na priečnom priereze, semikvantitatívne hodnotili histomorfologické zmeny základných cytologických komponentov svalových vlákien – zmeny zreteľnosti priečneho pruhovania svalových vlákien a zmeny intenzity bazofilie bunkových jadier na základe vytvoreného skórovacieho histomorfologického systému (18). V 10-tich náhodne vybraných zorných poliach svetelného mikroskopu pri 400-násobnom zväčšení sme morfometrickým programom QuickPHOTO Industrial 2.3 (Image analyzer software, Promicra, Praha, Česká republika) sme morfometricky merali hrúbku

svalových vlákien na priečnom reze. V 10-tich náhodne vybraných zorných poliach mikroskopu pri 400-násobnom zväčšení sme taktiež semikvantitatívne posúdili prítomnosť a zreteľnosť priečneho pruhovania a zmeny bazofilie bunkových jadier svalových vlákien (tabuľka 1 a 2).

Štatistická analýza

Štatistická analýza bola vykonaná pomocou programu GraphPad In-Stat v 3.01 (GraphPad Software, San Diego, CA). Kvantitatívne výsledky (morfometrická analýza hrúbky svalových vlákien) boli hodnotené pomocou one-way ANOVA testu a Tukey-Kramer post-hoc testom. Semikvantitatívne výsledky (analýza priečneho pruhovania a zmien bazofilie bunkových jadier) boli hodnotené pomocou neparametrického ANOVA testu Kruskal-Wallis a neparametrickým Dunnovým post-hoc testom. Výsledky boli vyjadrené ako aritmetický priemer (M) $\pm$ štandardná chyba merania (S.E.M.). Hodnoty p menšie ako 0,05 sa považovali za štatisticky významné.

Výsledky

U zdravých jedincov, t.j. v kontrolných skupinách (FK) zvierat bez ischemicko – reperfúzneho (IR) poškodenia sme zaznamenali úplne normálnych obraz architektúry priečne pruhovanej kostrovej svaloviny. Morfometricky nezmenené svalové vlákna boli s priemerom vo fyziologickom intervale ($30,72 \pm 2,62$ μ m). Histologicky boli prítomné krvné cievy a nervové vlákna bez známok histologického poškodenia a lézií. Histologicky sme nezaznamenali zmeny zreteľnosti, prípadne intenzity analyzovaných parametrov svalových vlákien – priečneho

Tabuľka 1. Histomorfologický skórovací systém posúdenia zreteľnosti priečneho pruhovania (PP) svalových vlákien (zdroj: doc. MVDr. Štefan Tóth, PhD.)

Charakter histomorfologických zmien:	Celkový stupeň:
Norma (BPN)	0
Mierne znížený stupeň PP	1
Stredne znížený stupeň PP	2
Zreteľne výrazné zníženie stupňa PP až absencia PP	3

Tabuľka 2. Histomorfologický skórovací systém posúdenia zmien intenzity bazofilie bunkových jadier (zdroj: doc. MVDr. Štefan Tóth, PhD.)

Charakter histomorfologických zmien:	Celkový stupeň:
Norma (BPN)	0
Mierne zvýšená intenzita bazofilie bunkového jadra	1
Pyknóza bunkového jadra	2
Karyolýza/strata bunkových jadier	3

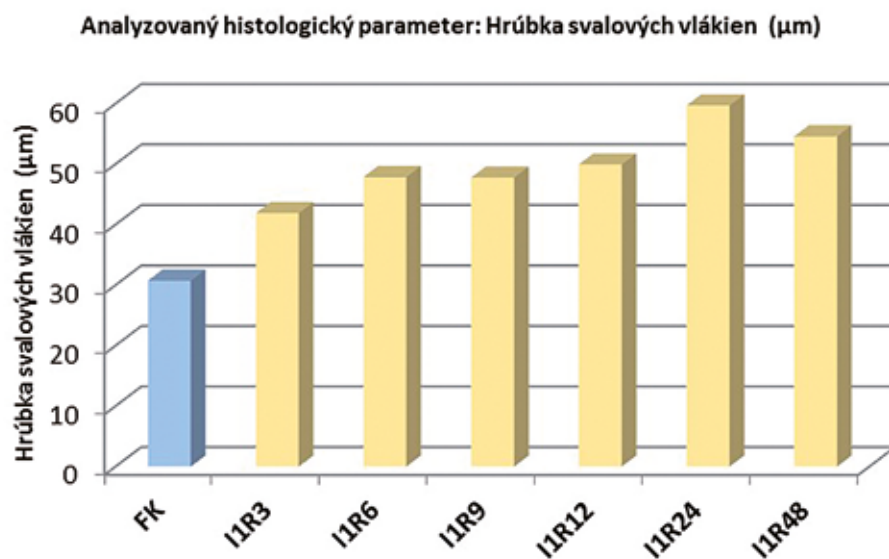
pruhovania sarkoplazmy a ani zmeny bazofilie bunkových jadier svalových vlákien.

Skupiny s IR poškodením

Patologický histologický obraz sme zaznamenali vo všetkých experimentálnych skupinách s IR poškodením, bez podania antioxidačne pôsobiacich látok (I_{1R_3} , I_{1R_6} , I_{1R_9} , $I_{1R_{12}}$, $I_{1R_{24}}$, $I_{1R_{48}}$), pričom s narastajúcou dobou reperfúzie boli známky poškodenia svalového tkaniva v zmysle nárastu hrúbky svalových vlákien výraznejšie. Morfometricky sme zaznamenali signifikantný nárast hrúbky svalových vlákien vo všetkých skupinách I_{1R_3} . Štatistická významnosť $**p < 0,01$ pri porovnaní experimentálnych skupín I_{1R_3} , I_{1R_6} , I_{1R_9} vs. FK a $***p < 0,001$ pri porovnaní $I_{1R_{24}}$, $I_{1R_{48}}$ vs. FK.

V skupinách $I_{1R_{24}}$ a $I_{1R_{48}}$ došlo k zreteľnej hypertrofii svalových vlákien, ale aj k miernej atrofii vlákien, pyknóze bunkových jadier, edematizácii endomýzia a perimýzia a dilatácii ciev s venostázou.

Pri farbení H&E sme sa v experimentálnych skupinách s IR poškodením zamerali na sledovanie zmien intenzity priečneho pruhovania sarkoplazmy svalových vlákien. V skupinách I_{1R_6} , I_{1R_9} , $I_{1R_{12}}$ sme semikvantitatívne zaznamenali signifikantné zníženie stupňa zreteľnosti priečneho pruhovania ($**p < 0,01$ I_{1R_6} vs. FK; $*p < 0,05$ I_{1R_9} vs. FK $I_{1R_{12}}$ vs. FK). Vo všetkých týchto skupinách bol

Graf 1. Morfometrické zmeny hrúbky svalových vlákien (μm) v skupinách s IR poškodením

v perimýziu prítomný zápalový infiltrát prevažne tvorený populáciou PMNL. Najvýraznejšie zmeny nastali po 6 hodinách reperfúzie, kedy dochádzalo k lokálnemu rozpadu celistvosti svalových vlákien, postupne k vymiznutiu priečného pruhovania sarkoplazmy, miestami k vzniku izolovaných diseminovaných ložísk s nekrozou. (** $p < 0,01$ I₁R₆ vs. FK). V skupinách I₁R₂₄ a I₁R₄₈ sme však opäť vo vyhodnocovanom bioptickom materiáli nezaznamenali výrazné rozdiely voči FK v zmysle zníženia zreteľnosti priečného pruhovania sarkoplazmy svalových vlákien. V rámci ďalšieho histologického hodnotenia sme sa zamerali na semikvantitatívnu analýzu zmien bazofilie bunkových jadier svalových vlákien v skupinách s IR poškodením, bez podávania antioxidantne pôsobiacich látok. Zaznamenali sme vo všetkých skupinách s ischemickým poškodením, bezohľadu na dĺžku reperfúzie, nárast intenzity bazofilie voči zdravým jedincom (FK), u ktorých žiadne zmeny bazofilie pozorované neboli. V skupine I₁R₃ zmeny intenzity ešte neboli štatisticky významné, ale v skupinách s dlhšou dobou reperfúzie (6, 9, 12, 24 a 48 hod.) bol pozorovaný histologicky významný nárast intenzity bazofilie (* $p < 0,05$ I₁R₆ vs. FK; * $p < 0,05$ I₁R₉ vs. FK; * $p < 0,05$ I₁R₁₂ vs. FK; * $p < 0,05$ I₁R₂₄ vs. FK; * $p < 0,05$ I₁R₄₈ vs. FK), zaznamenali sme taktiež v týchto skupinách pyknotizáciu jadrového chromatinu, čiže došlo k regresívnym zmenám bunkového jadra.

Skupiny s IR poškodením a pridaním antioxidantne pôsobiacich látok

V skupinách s IR poškodením po podávaní vitamínu C sme morfometricky zaznamenali štatisticky významný nárast hrúbky svalových vlákien (μm) jedine v skupine I₁R₃ v porovnaní s fyziologickou kontrolou (** $p < 0,01$ I₁R₃ C vs. FK). Farbením H&E sme v skupine I₁R₃ C na priečnom reze zaznamenali iba ojedinelú prítomnosť hypertrofických svalových vlákien. Po 3 hodinách reperfúzie došlo prechodne k vzniku opuchu svalových vlákien, ten mal však tendenciu s narastajúcou reperfúznou periódou ustupovať.

Vo všetkých ostatných experimentálnych skupinách s aplikáciou vitamínu C (I₁R₆ C, I₁R₉ C, I₁R₁₂ C, I₁R₂₄ C, I₁R₄₈ C) sa hrúbka svalových vlákien pohybovala vo fyziologickom rozmedzí. Až 46 %-nú redukciu hrúbky svalových vlákien sme detegovali po 24 a 48 hodinách reperfúzie (I₁R₂₄ C, I₁R₄₈ C) pri vzájomnom porovnaní s experimentálnou skupinou (IR) bez aplikácie antioxidantov. Na základe uvedených výsledkov našich analýz môžeme usúdiť, že **aplikáciou vitamínu C došlo k zabráneniu rozvoja morfometrických zmien hrúbky svalových vlákien**, a teda k zmierneniu následkov IR poškodenia.

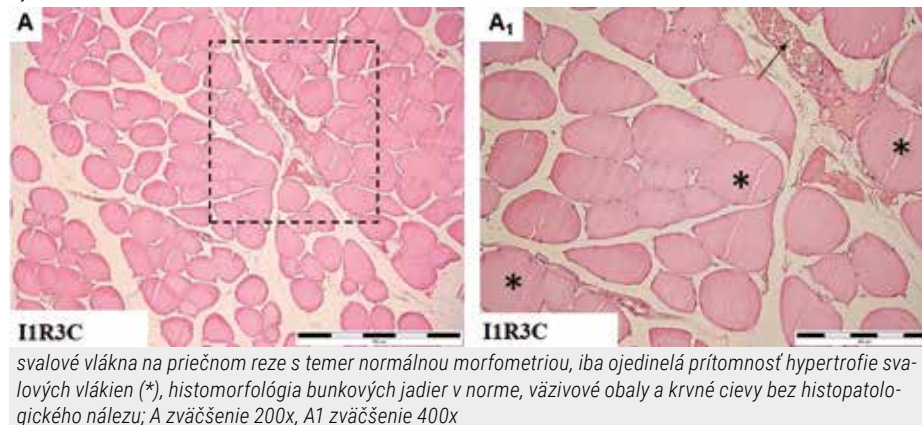
Svalové vlákna na priečnom reze v skupinách I₁R₆ C, I₁R₉ C, I₁R₁₂ C, I₁R₂₄ C, I₁R₄₈ C vykazovali normálnu morfometriu, nepozorovali sme hypertrofiu svalových vlákien, histomorfológia bunkových jadier bola v norme. Vázivové obaly a krvné cievy boli histologicky intaktné.

V rámci semikvantitatívnej analýzy priečného pruhovania sarkoplazmy svalových vlákien sme zaznamenali po 3 hodinách reperfúzie v skupine I₁R₃ C signifikantné zníženie stupňa zreteľnosti priečného pruhovania a prítomnosť ojedinelých PMNL v perimýziu. V tejto skupine dochádzalo k fragmentácii celistvosti sarkolemy a sarkoplazmy svalových vlákien, až k vymiznutiu priečného pruhovania sarkoplazmy. Tieto zmeny boli štatisticky významné (** $p < 0,01$ I₁R₃ C vs. FK). V skupine I₁R₆ C došlo taktiež k zníženiu stupňa zreteľnosti priečného pruhovania, úplné vymiznutie priečného pruhovania sme však už nespozorovali a prítomnosť populácie PMNL v perimýziu bola len ojedinelá (* $p < 0,05$ I₁R₆ C vs. FK). V experimentálnych skupinách s narastajúcou časovou periódou reperfúzie - I₁R₉ C, I₁R₁₂ C, I₁R₂₄ C a I₁R₄₈ C už bolo priečne pruhovanie opäť mikroskopicky viditeľné a zreteľné. Histologický obraz v skupine I₁R₄₈ C bol obdobný ako v skupinách zdravých jedincov (FK).

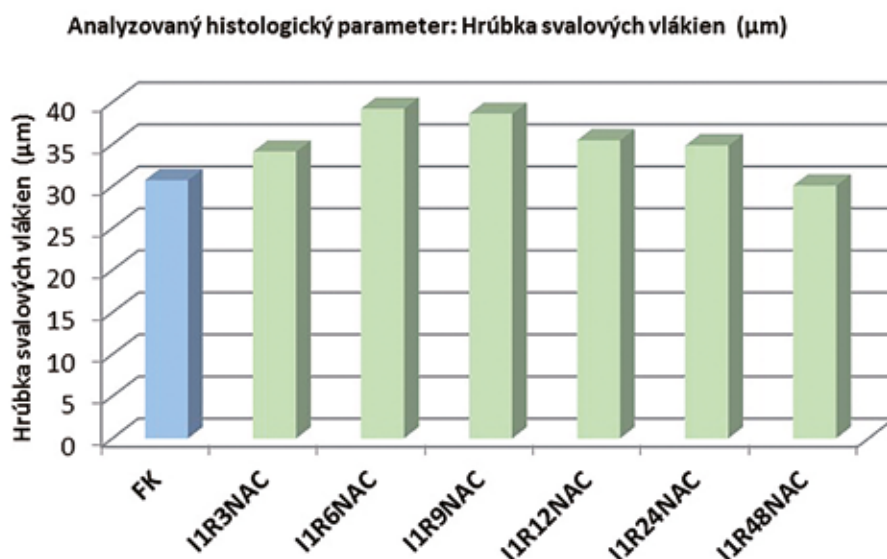
V rámci semikvantitatívneho hodnotenia sme u experimentálnych skupín s IR poškodením a aplikáciou vitamínu C najmenej výrazné zmeny pozorovali v zmene intenzity bazofilie bunkových jadier svalových vlákien. K signifikantnému nárastu intenzity bazofilie až pyknotizácii bunkového jadra voči zdravým jedincom (u ktorých neboli prítomné žiadne zmeny bazofilie) došlo po 3 a 6 hodinách reperfúzie (* $p < 0,05$ I₁R₃ C vs. FK; I₁R₆ C vs. FK). Po 9, 12, 24 a 48 hodinách reperfúzie tieto zmeny neboli štatisticky významné.

V skupinách s IR poškodením po podávaní N-acetylcysteínu po hodinovej ischémii a následnej 3 hodinovej reperfúzii (I₁R₃ NAC) sme zaznamenali hrúbku svalových vlákien, ktorá sa pohybovala vo fyziologickom rozmedzí. Na rozdiel od skupín s aplikáciou vitamínu C, ku vzniku výraznej hypertrofie svalových vlákien dochádzalo až po 6 hodinách reperfúzie (skupina I₁R₆ NAC). V histologickom obraze bola prítomná aj pyknóza bunkových jadier. Rovnaké zmeny boli pozorované aj v skupine I₁R₉ NAC (** $p < 0,01$ I₁R₆ NAC vs. FK; ** $p < 0,01$ I₁R₉ NAC vs. FK). V týchto experimentálnych skupinách sme však nepozorovali výrazné regresívne zmeny morfometrie svalových vlákien, ako tomu

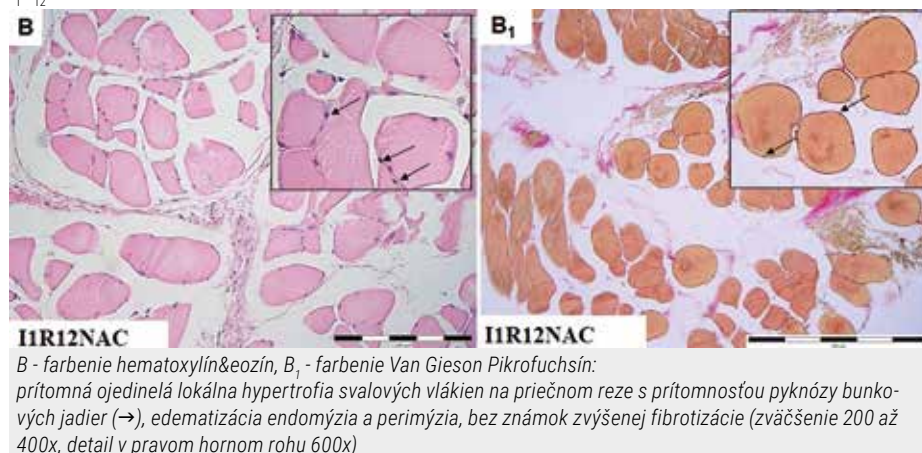
Obrázok 2. Mikrofotografie histologickej analýzy v experimentálnej skupine I1R3C, farbenie hematoxylin&eožín



Graf 2. Morfometrická analýza hrúbky svalových vlákien (μm) v skupinách s IR poškodením po aplikácii N-acetylcysteínu



Obrázok 3. Reprezentatívne mikrofotografie histologického hodnotenia v experimentálnej skupine I1R12NAC



bolo v skupinách s IR poškodením bez podávania antioxidantov.

Po 12 hodinách reperfúzie (I1R12NAC) sme zaznamenali mierny pokles hrúbky svalových vlákien, prítomná bola len ojedinelá lokálna hypertrofia

svalových vlákien na priečnom reze, pravdepodobne ako súčasť adaptačných reakcií svalového tkaniva. S pribúdajúcou dobou reperfúzie (I1R24NAC, I1R48NAC) mala hrúbka svalových vlákien celkovo klesajúcu tendenciu, nezaznamenali

sme hypertrofiu a namerané hodnoty dosiahli fyziologické parametre. Pričom v skupinách IR bez podávania antioxidačných látok v rovnakom reperfúznom období bola prítomná výrazná hypertrofia, ale aj atrofia svalových vlákien, pyknóza bunkových jadier, edém endomýzia a perimýzia s dilatáciou ciev so stázou krvi. Numerický rozdiel v hrúbke svalových vlákien pri vzájomnom porovnaní experimentálnych skupín I1R24NAC, I1R48NAC so skupinami I1R24 a I1R48 dosiahol až 45%. Na základe výsledkov našich analýz môžeme skonštatovať, že **podávanie N-acetylcysteínu taktiež zmiernilo následky IR poškodenia** v zmysle zlepšenia celkového histologického obrazu kostrovej svaloviny.

Semikvantitatívnym hodnotením priečného pruhovania sarkoplazmy svalových vlákien experimentálnych skupín po IR poškodení s podaním N-acetylcysteínu sme mikroskopicky pozorovali v skupine I1R3NAC zreteľné priečne pruhovanie, po 3 hodinovej reperfúzii nedošlo k zníženiu zreteľnosti priečného pruhovania, bunkové jadrá svalových vlákien na pozdĺžnom reze boli bez dystrofických zmien, s normálnou morfológiou a nespozorovali sme v tejto skupine ani prítomnosť zápalového infiltrátu vo väzivových obaloch.

Po 6, 9 a 12 hodinovej reperfúzii sme v experimentálnych skupinách I1R6NAC, I1R9NAC a I1R12NAC zaznamenali zníženie zreteľnosti priečného pruhovania a pozorovali sme ojedinelé PMNL v histologickom obraze, pričom štatisticky významné zmeny priečného pruhovania boli detegované v skupine I1R12NAC (* $p < 0,05$ I1R12NAC vs. FK). K úplnému vymiznutiu priečného pruhovania sarkoplazmy však nedošlo. Po 24 hodinovej reperfúzii dochádzalo k normalizácii zreteľnosti priečného pruhovania a nezaznamenali sme už prítomnosť zápalového infiltrátu. Najzreteľnejšie priečne pruhovanie sarkoplazmy svalových vlákien bolo pozorované v skupine I1R48NAC a dosiahlo normálny obraz porovnateľný s fyziologickou kontrolou zvierat.

Semikvantitatívnym hodnotením zmien intenzity bazofilie bunkových jadier svalových vlákien sme u experimentálnych skupín s IR poškodením a aplikáciou N-acetylcysteínu pozorovali štatis-

tický významný nárast intenzity bazofilie a regresívne hypobiopické zmeny bunkového jadra voči FK iba v skupine po 3 hodinách reperfúzie (* $p<0,05$ I_{1R3}NAC vs. FK). Po 6, 9, 12, 24 a 48 hodinách reperfúzie boli tieto zmeny nevýrazné a štatisticky nevýznamné.

Vzájomné porovnanie jednotlivých experimentálnych skupín

Prehľadné porovnanie výsledkov jednotlivých histologických analýz je vyobrazené v Tab. 3, 4 a 5.

Štatistické hodnotenie:

Hrúbka svalových vlákien na priečnom reze:

**** $p<0,001$:** I_{1R24} a I_{1R48} vs. FK; I_{1R24} vs. I_{1R24}C; I_{1R48} vs. I_{1R48}C; I_{1R24} vs. I_{1R24}NAC, I_{1R48} vs. I_{1R48}NAC

**** $p<0,01$:** I_{1R3}, I_{1R6}, I_{1R9}, I_{1R12}, I_{1R3}C, I_{1R6}NAC a I_{1R9}NAC vs. FK; I_{1R12} vs. I_{1R12}C, I_{1R6}NAC a I_{1R9}NAC vs. I_{1R48}NAC

Zmeny intenzity priečného pružovania sarkoplazmy svalových vlákien:

**** $p<0,01$:** I_{1R6} a I_{1R6}C vs. FK

*** $p<0,05$:** I_{1R9}, I_{1R12}, I_{1R3}C a I_{1R12}NAC vs FK; I_{1R6}, I_{1R9} a I_{1R12} vs. I_{1R24}; I_{1R6}, I_{1R9} a I_{1R12} vs. I_{1R48}; I_{1R3}C vs. I_{1R48}C

Zmeny bazofilie bunkových jadier svalových vlákien:

*** $p<0,05$:** I_{1R3}, I_{1R6}, I_{1R9}, I_{1R12}, I_{1R48}, I_{1R6}C a I_{1R3}NAC vs. FK

Diskusia

Hlavným cieľom tejto práce bolo preskúmať protektívny účinok antioxidantov – vitamínu C a N-acetylcysteínu na priečne pružované svalstvo dolných končatín v reperfúznom období a ich vplyv na zmiernenie IR poškodenia v experimente u potkanov kmeňa Wistar. Očakávali sme zmiernenie poškodenia vyvolané reaktívnymi formami kyslíka.

Ako základný experimentálny model sme si zvolili použité 1 hodínovej ischémie vyvolanej úplnou oklúziou abdominálnej aorty cievnou svorkou a následné vyhodnocovanie zmien po 3, 6, 9, 12, 24 a 48 hodinách reperfúzie. Staško (18) vo svojej dizertačnej práci

Tabuľka 3. Morfometrická analýza priemeru svalových vlákien (μm) v jednotlivých experimentálnych skupinách

Analyzovaný histoparameter: Hrúbka svalových vlákien (μm)

Ischémia/reperfúzia M $\pm$ S.E.M.		Aplikácia vitamínu C M $\pm$ S.E.M.		Aplikácia N-acetylcysteínu M $\pm$ S.E.M.	
I1R3	41,88 $\pm$ 1,39**	I1R3C	38,76 $\pm$ 2,57**	I1R3NAC	34,14 $\pm$ 0,39
I1R6	47,83 $\pm$ 1,19**	I1R6C	37,62 $\pm$ 1,73	I1R6NAC	39,20 $\pm$ 1,21**##
I1R9	47,75 $\pm$ 1,15**	I1R9C	36,94 $\pm$ 3,10	I1R9NAC	38,60 $\pm$ 1,21**##
I1R12	49,92 $\pm$ 2,01**	I1R12C	30,50 $\pm$ 2,97	I1R12NAC	35,44 $\pm$ 0,38
I1R24	59,68 $\pm$ 3,15***	I1R24C	32,38 $\pm$ 0,70	I1R24NAC	34,84 $\pm$ 1,61
I1R48	54,56 $\pm$ 1,62***	I1R48C	30,42 $\pm$ 1,64	I1R48NAC	30,08 $\pm$ 0,13##
FK	30,72$\pm$2,62**/***				

(Štatistická významnosť pri porovnaní experimentálnych skupín s FK: ** $p<0,01$, *** $p<0,001$; časovo závislé zmeny v rámci jednotlivých experimentálnych skupín: ## $p<0,01$, ### $p<0,01$)

Tabuľka 4. Porovnanie zmien priečného pružovania sarkoplazmy svalových vlákien medzi jednotlivými experimentálnymi skupinami

Analyzovaný histoparameter: Zmeny priečného pružovania sarkoplazmy svalových vlákien

Ischémia/reperfúzia M $\pm$ S.E.M.		Aplikácia vitamínu C M $\pm$ S.E.M.		Aplikácia N-acetylcysteínu M $\pm$ S.E.M.	
I1R3	0,66 $\pm$ 0,21	I1R3C	1,50 $\pm$ 0,22*#	I1R3NAC	0,90 $\pm$ 0,10
I1R6	1,66 $\pm$ 0,21**#	I1R6C	1,10 $\pm$ 0,10**	I1R6NAC	1,30 $\pm$ 0,30
I1R9	1,50 $\pm$ 0,22*#	I1R9C	0,80 $\pm$ 0,12	I1R9NAC	1,20 $\pm$ 0,13
I1R12	1,50 $\pm$ 0,22*#	I1R12C	0,90 $\pm$ 0,10	I1R12NAC	1,30 $\pm$ 0,12*
I1R24	0,50 $\pm$ 0,22#	I1R24C	0,70 $\pm$ 0,12	I1R24NAC	1,10 $\pm$ 0,10
I1R48	0,40 $\pm$ 0,24#	I1R48C	0,50 $\pm$ 0,16#	I1R48NAC	0,50 $\pm$ 0,16
FK	0,20$\pm$0,12*/**				

(Štatistická významnosť pri porovnaní experimentálnych skupín s FK: * $p<0,05$, ** $p<0,01$; časovo závislé zmeny v rámci jednotlivých experimentálnych skupín: # $p<0,05$)

Tabuľka 5. Porovnanie zmien bazofilie bunkových jadier svalových vlákien medzi jednotlivými experimentálnymi skupinami

Analyzovaný histoparameter: Zmeny bazofilie bunkových jadier svalových vlákien

Ischémia/reperfúzia M $\pm$ S.E.M.		Aplikácia vitamínu C M $\pm$ S.E.M.		Aplikácia N-acetylcysteínu M $\pm$ S.E.M.	
I1R3	0,40 $\pm$ 0,30	I1R3C	0,80 $\pm$ 0,20	I1R3NAC	1,10 $\pm$ 0,10*
I1R6	0,83 $\pm$ 0,31*	I1R6C	0,90 $\pm$ 0,10*	I1R6NAC	1,00 $\pm$ 0,27
I1R9	1,15 $\pm$ 0,26*	I1R9C	0,70 $\pm$ 0,12	I1R9NAC	0,80 $\pm$ 0,12
I1R12	1,10 $\pm$ 0,31*	I1R12C	0,50 $\pm$ 0,16	I1R12NAC	0,90 $\pm$ 0,10
I1R24	0,80 $\pm$ 0,31*	I1R24C	0,70 $\pm$ 0,12	I1R24NAC	0,90 $\pm$ 0,10
I1R48	1,00 $\pm$ 0,01*	I1R48C	0,30 $\pm$ 0,30	I1R48NAC	0,50 $\pm$ 0,16
FK	0,10$\pm$0,10*				

(Štatistická významnosť pri porovnaní experimentálnych skupín s FK: * $p<0,05$)

porovnával jednotlivé modely ischémie u potkanov kmeňa Wistar. Ako prvý zvolil model hodinovej ischémie s následnou 3 hodinovou reperfúziou (I1R3AO), pričom ischémii navodil úplnou oklúziou aorta abdominalis. Ako druhý použil model I1R3AO+AF, kde dĺžka ischémie a reperfúzie bola rovnaká ako v prvom prípade, avšak ischémii navodil úplným uzáverom aorta abdominalis a zároveň oklúziou oboch aa. femorales com-

munes. V tretej skupine I1R3L ischémii navodil oklúziou distálnej časti laloka m. gracilis po jeho mobilizácii a resekcií proximálnej časti. Rovnaký spôsob navodenia ischémie použili vo svojej práci aj Lakyová a kol. (11), kedy kolektív skúmal použitie LLLT pri IR poškodení. Model úplnej ischémie musculus gracilis u 24 psov použil vo svojom experimente aj Vajó (20), keď dĺžka ischémie trvala 4 hodiny.

Staško (18) použil základné histologické farbenia a v skupinách IIR3AO a IIR3AO+AF pozoroval IR poškodenie. Medzi skupinami IIR3AO vs IIR3AO+AF však signifikantný rozdiel v IR poškodení nezaznamenal. V skupine IIR3L v porovnaní s oboma predchádzajúcimi spôsobmi navodenia ischémie došlo k signifikantnejšiemu IR poškodeniu a degenerácii svalových vlákien. Aj napriek tomuto faktoru, z nášho pohľadu model IIR3AO vernejšie simuluje reálny stav, ku ktorému dochádza u pacientov s ALI pri uzávere abdominálnej aorty (zachovanie čo i len minimálneho pôvodného kolaterálneho riečiska). Z uvedeného dôvodu sme v našom experimente zvolili postup navodenia ischémie úplnou oklúziou aorta abdominalis.

Sener et al. (16) vo svojej práci hodnotili účinky melatonínu (MEL) a N-acetylcysteínu pri ischemicko-reperfúznom poškodení pečene v experimente u potkanov kmeňa Wistar. Navodzovali 45 minútovú ischémiu, po ktorej nasledovalo 60 minútové obdobie reperfúzie. V experimente používali MEL v dávke 10mg/kg a NAC v dávke 150mg/kg. Antioxidanty aplikovali intraperitoneálne, buď samostatne alebo v kombinácii. Za účelom posúdenia funkcie pečene vyhodnocovali hladiny AST a ALT v sére, z tkaniva pečene stanovovali hodnoty malondialdehydu (MDA), ktorý je produktom lipidovej peroxidácie, ďalej hladiny GSH, koncentráciu karbonylov proteínov (PO) - špecifického markera oxidačného poškodenia proteínov a aktivitu myeloperoxidázy (MPO), ktorá je nepriamym ukazovateľom infiltrácie neutrofilmi. V tejto práci dospeli k záveru, že obe látky, melatonín a taktiež N-acetylcysteín majú priaznivý efekt pri IR poškodení pečene. Poukázali na to, že ak sú aplikované súčasne, môžu mať oveľa výraznejší protektívny účinok na pečeň.

Sener et al. (16) v ich experimente aplikovali melatonín aj N-acetylcysteín potkanom či už samostatne alebo v kombinácii, vo dvoch dávkach. Prvú podávali 15 minút pred samotným navodením ischémie, druhú tesne pred navodením reperfúzie. Bolcal et al. (23) skúmali protektívny účinok koenzýmu Q₁₀, β-glukánu a N-acetylcysteínu pri

IR poškodení dolných končatín v experimente u 44 novozélandských bielych králikov, pričom koenzým Q₁₀ podávali experimentálnej skupine králikov perorálne v dávke 15mg/kg 2x denne počas 10 dní pred samotným navodením ischémie, ďalšej skupine aplikovali β-glukán intraperitoneálne 1x denne po dobu 10 dní pred navodením ischémie a experimentálnej skupine s použitím N-acetylcysteínu aplikovali samotný NAC v dávke 50mg/kg intravenózne ešte pred navodením anestézie u pokusných zvierat, čiže pred navodením ischémie samotnej. V našom experimente sme sa rozhodli pre jednorazovú aplikáciu antioxidantu - podávali sme intravenózne vitamín C v dávke 150mg/kg a N-acetylcysteín v dávke 250mg/kg, avšak podanie sme realizovali až po 50. minútach ischemickej fázy, 10 minút pred plánovaným navodením reperfúzie a nie pred samotným navodením ischémie. Ak má mať náš experiment prínos pre klinickú prax u pacientov s ALI, tak sme vychádzali z faktu, že do zdravotníckeho zariadenia sa dostane pacient až po vzniku akútnej končatinovej ischémie, t.j. v ischemickej fáze. Preto sme sa rozhodli pre aplikáciu nami zvolených antioxidantov až v tomto období a našim cieľom bolo zistiť, aká bude účinnosť vitamínu C a NAC, ak je už ischémia rozbehnutá. Podanie látky pred samotným navodením ischémie by znamenalo, že každý zdravý človek by musel preventívne užívať vitamín C a N-acetylcysteín.

U pacientov po úspešnom obnovení toku krvi do ischémiou postihnutej končatiny ako prvé pozorujeme vznik reperfúzneho edému svalstva končatiny s výraznou palpačnou citlivosťou. Poškodenie tkanív v zmysle opuchu po ischémii popísali aj Sagara et al. (26). Pri ťažších a protrahovaných formách ischémie dochádza bezprostredne po obnove cirkulácie až k vzniku kompartment syndrómu s nevyhnutnou okamžitou realizáciou fasciotómie (21). Preto bolo úlohou tohto experimentu preskúmať vitamín C a N-acetylcysteín z hľadiska jeho protektívneho účinku na rozvoj opuchu.

V rámci histologického vyšetrenia sme sa preto v tomto experimente zamerali ako prvé na hodnotenie zmien

hrúbky svalového vlákna pri ischemicko-reperfúznom poškodení bez a po podaní antioxidantne pôsobiacich látok. Ďalej sme sa pri semikvantitatívnom hodnotení zamerali na sledovanie zmien intenzity priečného pruhovania sarkoplazmy svalových vlákien a zmien bazofilie bunkových jadier svalových vlákien.

Vo všetkých experimentálnych skupinách s IR poškodením bez podania antioxidantne pôsobiacich látok sme zaznamenali patologický histologický obraz v zmysle výrazného nárastu hrúbky svalových vlákien, pričom s narastajúcou reperfúznou periódou boli známky poškodenia svalového tkaniva výraznejšie. Ischémia bola vo všetkých experimentálnych skupinách v trvaní jednej hodiny a sledovali sme zmeny hrúbky svalových vlákien po 3, 6, 9, 12, 24 a 48 hodinách reperfúzie. Morfometricky sme zaznamenali signifikantný nárast hrúbky svalových vlákien vo všetkých skupinách s IR poškodením, čo potvrdzuje fakt, že pri IR poškodení dochádza ku vzniku edému (13, 14, 21, 25).

Farbením H&E sme v experimentálnej skupine I₁R₃C zaznamenali len ojedinelú prítomnosť hypertrofických svalových vlákien. Po 3 hodinách reperfúzie došlo prechodne k vzniku opuchu svalových vlákien. To znamená, že aplikáciou vitamínu C síce nedošlo k úplnému zabráneniu vzniku edému, avšak opuch mal pri podaní vitamínu C (na rozdiel od skupín s IR poškodením a bez podania antioxidantu) tendenciu s narastajúcou dobou reperfúzie ustupovať. Už po 6 hodinách reperfúzie sa hrúbka svalových vlákien pohybovala vo fyziologickom rozmedzí. Až 46%-nú redukciu hrúbky svalových vlákien sme zaznamenali po 24 a 48 hodinách reperfúzie, v skupinách I₁R₂₄C a I₁R₄₈C, pri vzájomnom porovnaní s experimentálnou skupinou (IR) bez aplikácie antioxidantov. Na základe týchto výsledkov usudzujeme, že aplikáciou vitamínu C došlo k zabráneniu rozvoja morfometrických zmien hrúbky svalových vlákien, a teda k zmierneniu následkov IR poškodenia. V skupinách s IR poškodením po podávaní N-acetylcysteínu po hodinovej ischémii a následnej 3 hodinovej reperfúzii (I₁R₃NAC) sme zaznamenali hrúbku svalových vlákien vo fyziologickom roz-

medzí. Na rozdiel od skupín s aplikáciou vitamínu C, ku vzniku výraznej hypertrofie svalových vlákien, čiže vzniku edému dochádzalo až po 6 hodinách reperfúzie (skupina I_1R_6NAC), čo si vysvetľujeme možným neskorším nástupom účinku N-acetylcysteínu, nakoľko s pribúdajúcou dobou reperfúzie mala hrúbka svalových vlákien taktiež klesajúcu tendenciu. Numerický rozdiel v hrúbke svalových vlákien pri vzájomnom porovnaní experimentálnych skupín $I_1R_{24}NAC$, $I_1R_{48}NAC$ so skupinami I_1R_{24} a I_1R_{48} dosiahol až 45 %. Na základe výsledkov môžeme konštatovať, že podávaním N-acetylcysteínu došlo taktiež k regresii hrúbky svalových vlákien, a teda k zmierneniu následkov IR poškodenia.

Pri farbení H&E sme v experimentálnych skupinách s IR poškodením bez podania antioxidantu pôsobiacich látok sledovali zmeny intenzity priečného pružovania sarkoplazmy svalových vlákien. Po 6, 9 a 12 hodinách reperfúzie sme semikvantitatívne zaznamenali signifikantné zníženie stupňa zreteľnosti priečného pružovania, prítomnosť zápalového infiltrátu, najmä PMNL v perimýziu. Najvýraznejšie zmeny sme pozorovali po 6 hodinách reperfúzie, kedy dochádzalo k lokálnemu rozpadu celistvosti svalových vlákien až k vymiznutiu priečného pružovania sarkoplazmy, miestami až k vzniku izolovaných diseminovaných ložísk s nekrozou. Po 24 a 48 hodinách sme však opäť vo vyhodnocovanom biotickom materiáli nezaznamenali výrazné rozdiely voči FK v zmysle zníženia zreteľnosti priečného pružovania sarkoplazmy svalových vlákien. Tento nález si vysvetľujeme tým, že morfológické zmeny, ktoré nastali po hodinovej ischémii a následnej reperfúzii neboli ireverzibilné. Pravdepodobne došlo v skupinách s IR poškodením k adaptačným zmenám s nástupom regeneračného procesu. V experimentálnej skupine s IR poškodením a aplikáciou vitamínu C došlo po 3 hodinách reperfúzie (I_1R_3C) k fragmentácii celistvosti sarkolemy a sarkoplazmy svalových vlákien, až k vymiznutiu priečného pružovania sarkoplazmy. V skupine I_1R_6C došlo taktiež k zníženiu stupňa zreteľnosti priečného pružovania, úplné vymiznutie priečného pružovania sme však už nespozorovali.

V experimentálnych skupinách s narastajúcou časovou periódou reperfúzie - I_1R_3C , $I_1R_{12}C$, $I_1R_{24}C$ a $I_1R_{48}C$ už bolo priečne pružovanie opäť mikroskopicky viditeľné a zreteľné. Histologický obraz v skupine $I_1R_{48}C$ bol rovnaký ako v skupinách zdravých jedincov (FK). U experimentálnych skupín po IR poškodení s podaním N-acetylcysteínu sme mikroskopicky po 3 hodinovej reperfúzii nepozorovali zníženie zreteľnosti priečného pružovania, bunkové jadrá svalových vlákien boli s normálnou morfológiou a nespozorovali sme v tejto skupine ani prítomnosť zápalového infiltrátu vo väzivových obaloch. Po 6, 9 a 12 hodinovej reperfúzii sme v experimentálnych skupinách I_1R_6NAC , I_1R_9NAC a $I_1R_{12}NAC$ zaznamenali zníženie zreteľnosti priečného pružovania, prítomnosť ojedinelých PMNL v histologickom obraze. Štatisticky významné zmeny priečného pružovania boli detegované v skupine $I_1R_{12}NAC$, pričom rovnaké zmeny sme zaznamenali v skupine s aplikáciou vitamínu C, ale v 6. a nie 12. hodine reperfúzie (I_1R_6C). Po 24 hodinovej reperfúzii dochádzalo k normalizácii zreteľnosti priečného pružovania a nezaznamenali sme už prítomnosť zápalového infiltrátu. Najzreteľnejšie priečne pružovanie sarkoplazmy svalových vlákien bolo pozorované v skupine $I_1R_{48}NAC$ a dosiahlo normálny obraz porovnateľný s fyziologickou kontrolou zvierat. Z uvedeného nám vyplýva, že k normalizácii zmien v zmysle znovuoobjavenia sa priečného pružovania v skupinách s IR poškodením a aplikáciou N-acetylcysteínu dochádzalo pomalšie ako v experimentálnych skupinách s aplikáciou vitamínu C. Pre možný neskorší nástup účinku NAC by bolo vhodné aplikovať ho skôr ako vitamín C.

V rámci semikvantitatívneho histologického hodnotenia zmien bazofilie bunkových jadier svalových vlákien došlo vo všetkých skupinách s ischemickým poškodením bez podávania antioxidantných látok, bez ohľadu na dĺžku reperfúzie, k nárastu intenzity bazofilie voči zdravým jedincom (FK), u ktorých žiadne zmeny bazofilie pozorované neboli. V experimentálnych skupinách s dobou reperfúzie 6, 9, 12, 24 a 48 hod. sme pozorovali histologicky významný nárast intenzity bazofilie, zaznamenali

li sme v týchto skupinách pyknotizáciu jadrového chromatinu, a to znamená, že došlo k regresívnym zmenám bunkového jadra. U experimentálnych skupín s IR poškodením a aplikáciou vitamínu C k signifikantnému nárastu intenzity bazofilie až pyknotizácii bunkového jadra došlo po 3 a 6 hodinách reperfúzie (I_1R_3C a I_1R_6C), pričom u experimentálnych skupín s IR poškodením a podávaním N-acetylcysteínu sme štatisticky významný nárast intenzity bazofilie a regresívne zmeny bunkového jadra pozorovali iba v skupine po 3 hodinách reperfúzie (I_1R_3NAC). Po 9, 12, 24 a 48 hodinách reperfúzie (u NAC už aj po 6 hodinách) v skupinách s IR poškodením a aplikáciou antioxidantov neboli prítomné žiadne zmeny bazofilie - histologický obraz ako u zdravých jedincov (FK). Opäť sa teda prejavil kladný účinok nami skúmaných antioxidantov.

Záver

Akútna končatinová ischémia patrí medzi urgentné stavy v medicíne, ktoré si vyžadujú urýchlenu diagnostiku a následnú adekvátnu liečbu. Pre zabránenie nezvratného poškodenia tkaniva je nevyhnutné obnovenie toku krvi do ischemickej oblasti. Následná reperfúzia však môže vyústiť do lokálneho a systémového zápalu, ktorý môže prehĺbiť tkanivové poškodenie ešte viac ako ischémia samotná (ischemicko - reperfúzne poškodenie). Najčastejšie sa v klinickej praxi v rámci pracoviska cievnej chirurgie stretávame s ALI v štádiu R IIb, u ktorej je indikovaná okamžitá chirurgická revaskularizácia. Jedná sa buď o mladších pacientov, ktorí nemajú dostatočne rozvinutý kolaterálny obeh, druhou skupinou sú pacienti, u ktorých samotná ischémia trvala príliš dlho. Aj po úspešnej revaskularizácii sa tak pomerne často stretávame s následkami IR poškodenia, ktorých zvládnutie pre pacienta je mnohokrát ťažšie ako prekonanie ischémie samotnej. Preto je nevyhnutné neustále hľadať možnosti zmiernenia následkov IR poškodenia. V tomto experimente sme skúmali protektívny účinok vybraných antioxidantov na svalstvo dolných končatín a dokázali sme, že podávaním antioxidantov, vitamínu C aj N-acetylcysteínu dochádza k výraznej redukcii hrúbky sva-

lových vlákien, čo je dôležité v klinickej praxi pre zmiernenie reperfúzneho edému. Zároveň by stálo za zváženie podávanie týchto látok synergicky.

Literatúra

1. Baker S, Diercks D. Acute limb arterial ischemia. In *Emergency Medicine*. 2018; 50 (3):65-71.
2. Bancroft, J.D., Gamble, M. Theory and practice of histological techniques. 6th ed. Philadelphia: Elsevier, 2008. 725 p. ISBN 0443102791.
3. Baril, D.T. et al. Outcomes of lower extremity bypass performed for acute limb ischemia. In *J Vasc Surg* [online]. 2013, vol. 58, no. 4 [cit 2013-05-25]. Dostupné na internete: <<https://ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3930450>>.
4. Collard, Ch.D., Gelman, S. Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Prevention of Ischemia-Reperfusion Injury. In *Anesthesiology*. 2001; 94 (6):1133-1138.
5. Cowled, P., Fitridge, R. Pathophysiology of Reperfusion Injury. In *Fitridge, Thompson. Mechanisms of Vascular Disease: A Reference Book for Vascular Specialists*. [online]. Adelaide: University of Adelaide Press, 2011. Dostupné na internete: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534267/>>. ISBN 978-19-2206-400-4.
6. Cronenwett, J.L., Johnston, W. Rutherford's Vascular Surgery, 7th ed. Philadelphia: Saunders, 2010. 2448 s. ISBN: 978-1-4160-5223-4.
7. Darwood, R. Acute limb ischaemia. In *RCEM Learning* [online]. 2018 [cit 2018-10-26]. Dostupné na internete: <<https://www.rcemlearning.co.uk/reference/acute-limb-ischaemia/>>.
8. Dormandy, J. et al. Acute limb ischemia. In *Semin Vasc Surg*, 1999, vol. 12, no. 2, p. 148-153.
9. Hallet, J. et al. Comprehensive Vascular and endovascular surgery. Philadelphia: Mosby Ltd. Elsevier, 2009. 932 p. ISBN: 978-0-323-05726-4.
10. Hoch, J., Leffler, J. Speciální chirurgie. 3.vyd. Praha: Maxdorf Jessenius, 2011. ISBN 978-80-7345-253-7. Kapitola 21, Cévná chirurgie, s. 247-249.
11. Lakýová, L. a kol. LowLevel Laser Therapy for Protection Against Skeletal Muscle Damage After Ischemia – Reperfusion Injury in Rat Hindlimbs. In *Lasers in Surgery and Medicine*, 2010, vol. 42, no. 9, p. 665–672.
12. Menke, J. et al. Thromboembolism in Atrial Fibrillation. In *The American Journal of Cardiology*, 2010, vol. 105, no. 4, p. 502-510.
13. Nečas, E. a kol. Obecná patologická fyziologie. 1. vyd. Praha: Univerzita Karlova, 2005. 377 s. ISBN 80-246-0051-X.
14. Reis, N.D., Better, O.S. Mechanical muscle-crush injury and acute muscle-crush compartment syndrome: with special reference to earthquake casualties. In *J Bone Joint Surg Br.*, 2005, vol. 87, no. 4, p. 450–453.
15. Santistevan, J.R. Acute Limb Ischemia: An Emergency Medicine Approach. In *Emerg Med Clin North Am* [online]. 2017, vol. 35, no. 4 [cit 2017-08-23]. Dostupné na internete: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28987435>>.
16. Sener, G. et al. Melatonin and N-acetylcysteine have beneficial effects during hepatic ischemia and reperfusion. In *Life Sci*, 2003, vol. 72, no. 24, p. 2707-2718.
17. Singh, G. et al. Acute renal infarction secondary to left ventricular thrombus, masquerading as a renal calculus: A case report and brief review of literature. In *Angiology*, 2001, vol. 52, no. 10, p. 717–720.
18. Staško, P. Detekcia ischemicko-reperfúzneho poškodenia priečne pruhoanej svaloviny dolných končatín po akútnej končatinovej ischémii v experimente: dizertačná práca. Košice: LF UPJŠ, 2013. 106 s.
19. Šefránek, V. Ochorenia končatinových artérií a ich chirurgická liečba. Bratislava: Slovak Academic Press, 2001. 240 s. ISBN 80-88908-82-5.
20. Vajó, J. Náhle príhody angiochirurgické a akútnej ischemicko-reperfúzneho syndrómu v klinike a experimente: dizertačná práca ku dosiahnutiu hodnosti doktora lekárskych vied. Košice: Univerzita Pavla Jozefa Šafárika, 1993. 261 s.
21. Walters, T.J. et al. Poloxamer-188 reduces muscular edema after tourniquet-induced ischemia-reperfusion injury in rats. In *J Trauma*, 2011, vol. 70, no.5, p. 1192-1997.
22. Zavacká, M. Akútna končatinová ischémia. In *Frankovičová a kol. Cievna chirurgia*. Košice: Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, 2018. ISBN 978-80-8152-599-5, s. 45.
23. Bolcal, C. et al. Protective effects of antioxidant medications on limb ischemia reperfusion injury. In *J Surg Res.*, 2007, vol. 139, no. 2, p. 274-279.
24. Gilliland, CH. et al. Acute Limb Ischemia. In *Tech Vasc Interv Radiol* [online]. 2017, vol. 20, no. 4 [cit2017-10-12]. Dostupné na internete: <<https://europepmc.org/article/med/29224661>>.
25. Orrapin, S. et al. Predictive factors for post-ischemic compartment syndrome in non-traumatic acute limb ischemia in a lower extremity. In *Ann Vasc Dis.*, 2017, vol. 10, no. 4, p. 378-385.
26. Sagara, G. et al. Comparison of effects of ischemia period in rat limb ischemia/reperfusion injury. In *Nagoya Med. J.*, 2009, vol. 50, p. 83-91.

MUDr. Tatiana Granda, PhD.

Klinika cievnej chirurgie LF UPJŠ a VÚSCH, a.s.
Ondavská 8, 040 11 Košice
tatianagrand@gmail.com

