

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Dr. Varga Gábor

**Korai és késleltetett távoli szervi ischaemiás preconditionálás hatásai a vese
ischaemia-reperfúziós károsodás mértékére patkány modellben**

Témavezető:

Prof. Dr. Németh Norbert



DEBRECENI EGYETEM

KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2021

KORAI ÉS KÉSLELTETETT TÁVOLI SZERVI ISCHAEMIÁS PRECONDITIONÁLÁS
HATÁSAI A VESE ISCHAEMIA-REPERFUSIÓS KÁROSODÁS MÉRTÉKÉRE
PATKÁNY MODELLBEN

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Varga Gábor, okleveles orvosdoktor

Készült a Debreceni Egyetem Klinikai Orvostudományok Doktori Iskolája
(Klinikai vizsgálatok programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Németh Norbert, az MTA doktora

A bírálóbizottság:

elnök:	Prof. Dr. Illés Árpád, MTA
bírálok:	Dr. Tóth Dezső, PhD
	Dr. Jancsó Gábor, PhD
tagok:	Dr. Szabó Andrea, PhD
	Dr. Ferencz Andrea, PhD

Az értekezés védésének helyszíne és időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, In Vitro Diagnosztikai Tömb előadóterme

2021. szeptember 03. 13:00

1. BEVEZETÉS

A vesék ischaemia-reperfusio (I/R) okozta károsodása az akut veseelégtelenségek gyakori oka. Számos szív-, és érrendszeri műtét során szükséges az aorta arteria renalisok feletti szakaszán történő beavatkozás, emiatt annak részleges vagy rövid idejű, teljes kirekesztése, mely miatt a vesék vérellátása, és ezáltal oxigén ellátása károsodást szenvedhet. A renalis perfusio csökkenése egyéb műtétek során is bekövetkezhet, mely krónikus veseelégtelenség esetén fokozza a károsodás esélyét. A károsodás mértékétől függően vesetranszplantáció lehet szükséges. A szervátültetés során fellépő hypoxaemiás állapot, majd hirtelen visszatérő keringés szintén I/R károsodást okoz, ami ronthatja az átültetett vese funkcióját, késői graft elégtelenséghez vezethet.

Az ischaemiás állapotok a csökkent vagy teljesen megszűnt oxigén és tápanyag ellátottság, illetve az elégtelen sejttanyacsere melléktermékek eltávolítása miatt a sejtek károsodásához, elhalásához vezethetnek. A keringés helyreállítása, azaz a reperfusio mielőbbi megkezdése a sejtek túlélése szempontjából kiemelkedő fontosságú, azonban paradox módon a sejtek károsodását is okozza. A megváltozott sejttanyacsere miatt a sejtek nagyobb eséllyel vannak kitéve oxidatív károsodásoknak, mely a frissen megjelenő, oxigénben gazdag vér megjelenésével be is következik. Ezt a két folyamatot együttesen ischaemia-reperfusiós károsodásnak nevezzük, és számos változó befolyásolja a mértékét.

Ischaemia-reperfusiós károsodást követően nem csak a károsodott szervben, hanem szisztémásan is számos változás figyelhető meg. Rövid-, illetve hosszútávon ható mediátorok szabadulnak fel és különböző idegi pályák aktiválódnak. A keringési rendszer, azon belül is a vér és annak áramlása jelentősen érintett. A véráramlással és annak befolyásoló tényezőivel foglalkozó tudományterület a haemorheologia. A haemorheológiai változások jobb megértése az I/R károsodás alatt jelentős mértékben segíthet a károsodás mértékének megítélésében,

illetve pontosabb monitorozásában, befolyásolásukkal lehetőség nyílt a károsodás mérséklésére.

Az ischaemia-reperfúziós károsodás megelőzése lenne a legideálisabb, mely csak ritkán megoldható. Számos farmakológiai, illetve sebészi módszer ismeretes, melyek a károsodást mértékét mérsékelik. A kondicionáláson alapuló eljárások lényege a sejt „hozzászoktatása” az I/R károsodáshoz, rövid, ischaemiás és repfúziós szakaszok egymást követő váltakozásával. Ismeretes a célszerven, illetve attól távolabb eső területen végzett kondicionálás, valamint az az I/R károsodás előtt, közben vagy után végzett beavatkozás is. A távoli szervi ischaemiás preconditionálás (RIPC) a kísérletes sebészetben kedvezőnek bizonyult az I/R károsodás mérséklésében számos szerv esetén, míg a klinikumban kevésbé egyértelmű a hatásossága.

A távoli szervi ischaemiás preconditionálás hatásmechanizmusa és ideális protokollja nem ismert. A beavatkozás kapcsán két időablak is van, melyek eltérő mechanizmuson alapulnak. Vese ischaemia-reperfúzió kapcsán kevés irodalmi adat áll rendelkezésre az ischaemia-reperfúziós károsodás kapcsán bekövetkező haemorheológiai és microcirculációs változásokról.

2. CÉLKITŰZÉSEK

1. Létrehozni egy patkánymodell 45 perces unilaterális veseischaemia, illetve az azt követő 120 perces repfúzió hatásainak vizsgálatára.
2. Az ischaemia-reperfúziós károsodás mértékének megítélése haemorheológiai, haematológiai, mikrokeringési, vitalis, illetve sav-bázis paraméterek és szövettani vizsgálat alapján.
3. Az ischaemia-reperfúzió okozta károsodás mérséklése korai, 1 órás (RIPC-1), illetve késleltetett, 24 órás (RIPC-24) távoli szervi preconditionálási technikák segítségével.
4. A korai és a késleltetett távoli szervi preconditionálási protokollok hatásosságának összehasonlítása a fenti paraméterek segítségével.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Kísérleti állatok, kísérleti csoportok, műtéti technika

Kutatásunkat a hazai (1998. évi XXVIII. - Az állatok védelméről és kíméletéről, a 40/2013. kormányrendelet), valamint az Európai Unió által kiadott (2010. évi EEC 63 direktíva) szabályozásokat betartva, a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottság (DE MÁB) által nyilvántartásba vett, a Hajdú-Bihar megyei Állategészségügyi- és Élelmiszer Ellenőrzési Állomás által kiadott hatósági engedély birtokában (engedély nyilvántartási szám: 25/2016/DEMÁB) végeztük. A kísérleti állatokat szobahőmérsékleten, konvencionális ketrecekben tartottuk, száraz tápot és ivóvizet *ad libitum* biztosítottunk.

Huszonhét hím, Crl:WI, outbred patkányt (Toxicoop Kft., testtömeg: 301.6 ± 38.6 g) vontunk be a kutatásba, melyek kora 12-14 hét volt. A kísérleti állatokat véletlenszerűen 4 csoportra osztottuk, a kezelési protokolloknak megfelelően. A műtét előtt 24 órával minden állat általános anesthesiában részesült (40 mg/ttkg Thiopental i.p.), valamint a műtét napján 1,5 órával a beavatkozás előtt ismételt általános anaesthesiát végeztünk (60 mg/ttkg Thiopental i.p.) az adott csoportokban tervezett preconditionálás, illetve műtét miatt. Valamennyi beavatkozást fűthető padon végeztük, az állatokat szupinált testhelyzetben, végtagjaiknál kirögzítettük.

A Kontroll csoport esetén (n=7) a műtétet megelőző napi altatás során beavatkozás nem történt. A műtétet közvetlenül megelőző altatás során a bal inguinofemoralis, valamint abdominalis régió leborotválását követően egy óra várakozás után Braunol-oldattal szabályosan dezinficiáltuk, steril gézlapokkal izoláltuk, majd a bal femoralis artériát egy kb. 1 cm hosszú metszésből felkerestük és kanüláltuk (BD NeoflonTM, 26 G) operáló mikroszkóp segítségével (Leica Wild M650). A sebészeti beavatkozásokat steril, standard mikrosebészeti eszközök segítségével végeztük. A kanülálást követően medián laparotomiát végeztünk, a processus xiphoideustól a pecten ossis pubisig. Felkerestük a bal vesét, illetve atraumatikusan

kipreparáltuk annak ereit. A beleket a preparálás idejére testmeleg, fiziológias sóoldattal átitatott gézlappal izoláltuk, majd visszahelyeztük a hasüregbe és hasonlóan fedtük azt. A megfigyelési idő alatt méréseket végeztünk, a kanülált artériából vért vettünk. A kontroll csoportban egyéb sebészeti, vagy ischaemia-reperfúziós beavatkozás nem történt.

Az Ischaemia-reperfúziós csoport (I/R, n=7) protokollja a bal vese kipreparálásáig megegyezett a kontroll csoportéval. A bal vese ereinek atraumatikus kipreparálása után az a. renalis sinistra-ra egy mikrosebészeti klippet helyeztünk, így létrehozva unilaterális veseischaemiát, melyet a makroszkópos színváltozás is igazolt. 45 perc ischaemiát követően a klippet eltávolítottuk, és 120 perces reperfúziós időszak után az állatokat exsanugináltuk.

A távoli szervi preconditionált csoportokban általános anaesthesiában a jobb hátsó végtagot leszorítottuk a ligamentum inguinalis magasságában atraumatikus tourniquet segítségével 3x10 percre, az ischaemiás szakaszok után 10 perces reperfúziós időszakokkal. A korai távoli szervi preconditionált csoportban (RIPC-1, n=7) a műtétet megelőzően 1 órával végeztük el a preconditionálást, míg a késleltetett távoli szervi preconditionált csoportban (RIPC-24, n=6) a műtétet megelőzően 24 órával történtek a leszorítások. A preconditionált csoportok protokollja a preconditionálás kivételével megegyezett az I/R csoportéval.

3.2. Mérési protokoll

A műtét kezdetén (alap), valamint a reperfúzió 30., 60. és 120. percében (R30, R60, R120) vérvétel történt (0,3-0,5 ml) a kanülált bal artéria renalisból K₃-EDTA (1,5 mg/ml) antikoagulánst tartalmazó vérvételi csövekbe, melyekből laboratóriumi vizsgálatokat végeztünk. Vérvételeket követően a levett volumennel azonos mennyiségű, testhőmérsékletű, fiziológias sóoldattal pótoltuk a keringő térfogatot. Méréseket a vérvételi időpontokban, valamint az ischaemiás időszak végén (I45) végeztünk.

A 120 perces reperfúziós időszak leteltével a szövettani vizsgálat céljából mintavétel történt a májból, illetve eltávolításra kerültek a vesék, majd az állatokat exsanugináltuk.

3.3. Vitalis paraméterek

A pulzust, valamint az artériás középnyomást invazív módon mértük a kanülált artériához csatlakoztatott HaemoSys rendszer (Experimetria Kft., Magyarország) segítségével. A légzésfrekvencia meghatározása 60 másodpercen keresztüli direkt számlálással történt. A testhőmérsékletet a rectumban mértük digitális hőmérő (Rudolf Riester GmbH, Németország) használatával, míg a szervfelszíni hőmérsékletet a májon, illetve a veséken kijelölt anatómiai pontokon határoztuk meg.

3.4. Microcirculatio

A vizsgált szervek mikrokeringésének vizsgálata lézer Doppler effektus alapján működő eszközzel (LD-01 Laser Doppler szöveti áramlásmérő, Experimenta Kft., Magyarország) standard pencil fej (MNP100XP, Oxford, Optironics Ltd., Egyesült Királyság) segítségével az operáló orvos által, megtámasztott kézzel történt.

Lézer-Doppleres mérés során az adott szövet perfúziójáról, vagyis egy, az életképességet jelentősen befolyásoló microrheologiai paraméterről kapunk valós idejű, számszerűsíthető információt. A módszer alapja a Doppler-shift jelenség, melynek lényege, hogy az emittált, koherens lézer sugárnyaláb egy része a mozgó vörösvértestekről visszaverődik és hullámhossz változáson megy keresztül. A változás mértéke a mozgásban lévő erythrocyták számával és sebességével egyenesen arányos, azonban nem korrelál a mozgás irányával. A visszaverődő lézerfényt az eszköz detektálja és a frekvenciában bekövetkezett eltolódás S.P.E.L. Advanced Kymograph szoftver (Experimetria Kft., Magyarország) segítségével grafikusan ábrázolható a mikrokeringésre jellemző paraméter, amit a rendszer relatív áramlási egységben (blood flux unit, BFU) ad meg. Az alkalmazott frekvenciától függően nagyságrendileg 1 mm² felületen 1-1,5 mm mélyre hatol a lézernyaláb, így a vizsgált szövet mintegy 1-1,5 mm³-ének keringését vizsgálhatjuk

A mérést befolyásolhatja az adott szerv hőmérséklete, a szövet oxigenizációja, a légző- és izommozgások, az esetleges közeli nagyerek pulzációja, az emelkedett szérum lipid szint, a haemolysis, a külső zavaró fényforrások, illetve a mérést végző személy kezének tremorja

A befolyásolható paraméterek lehetőség szerinti standardizálását követően egy kb. 40 másodperces szakasz került rögzítésre a májon, illetve a vesék anterior felszínének középső harmadában. A szervre jellemző jellegzetes mintázatú görbékből később 10 másodperces intervallumok kerültek „off-line” analízisre a görbeszakaszok parametrizálását követően.

3.5. Laboratóriumi paraméterek

3.5.1. Vérgáz analízis

Az ischaemiát megelőzően, illetve a 120 perces reperfúziós időszak leteltével artériás vérvizsgálatot végeztünk EPOC Blood Analysing System (Siemens Healthcare GmbH, Németország) készülék segítségével. A készülék 100-200 µl antikoaguláns nélküli vérből határozza meg a sav-bázis paramétereket, az elektrolit-, valamint a metabolit értékeket (pH, pO₂ [Hgmm], pCO₂ [Hgmm], HCO₃⁻ [Hgmm], bázis hiány (BE(ecf)) [mmol/L], O₂ szaturáció [%], nátrium (Na⁺) [mmol/L], kálium (K⁺) [mmol/L], kalcium (Ca²⁺) [mmol/L], klorid (Cl⁻) [mmol/L], laktát [mmol/L], kreatinin [mg/dL], glükóz [mmol/L]).

3.5.2. Haematologiai paraméterek

Mennyiségi és minőségi haematologiai paramétereket: vörösvérsejtszám (Vvs) [T/L], haemoglobin koncentráció (Hgb) [g/dL], haematocrit (Htc) [%], átlagos vörösvérsejt térfogat (MCH) [pg], átlagos vörösvérsejt térfogat (MCV) [fl], MCHC [g/dL], fehérvérsejtszám (Fvs) [G/L], Vérlemezkeszám (Thr) [G/L] határoztunk meg Sysmex K-4500 (TOA Medical electronics Corp., Ltd., Japán) haematologiai automata használatával.

3.5.3. Vörösvérsejt deformabilitás

LoRRca MaxSis Omoscan ektacytometer (Mechatronics BV, Hollandia) segítségével, lézer diffrakciós módszerrel mértük a vörösvérsejtek deformabilitását, azaz nyírófeszültség (shear stress, SS [Pa]) hatására bekövetkező elnyújthatóságát. A mérésekhez 10 µl vérmintát szuszpendáltunk 2 ml izotóniás polyvinylpyrrolidone (PVP) – foszfát puffer (PBS) oldatban (Sigma-Aldrich Co. USA; PVP-PBS viszkozitás: 33,6 mPas, osmolalitás: ~300 mOsmol/kg, pH = 7.3), majd a szuszpenziót a mérőkamrába pipettáztuk. A Couette-rendszerű mérőkamra egy egyenes falú, forgatható, cilindrikus hengerköpenyből (cup) és egy beleillő statikus hengerből (bob) áll. A „bob” és a „cup” között egy körülbelül 0,3 mm széles, gyűrű alakú rés található a minta számára. A mérés kezdetekor a „cup” a henger körül forogni kezd, ezáltal nyíróerőt fejt ki a sejtekre, melynek következtében a vörösvérsejtek megnyúlnak. A mérés az alacsonyabb nyírófeszültség felől a magasabb nyírófeszültség irányába történtek (0,5-30 Pa) temperált körülmények között (37 °C). Forgás közben az elongálódott vörösvérsejtekre lézer vetül (hullámhossz: 670 nm). Az elnyúlás mértékétől függően a diffrakció szöge változik, melyet egy CCD kamera rögzít, majd egy kapcsolt szoftver elemzi. A diffrakciós minta hosszából (A) és szélességéből (B) számíthatjuk a dimenzió nélküli elongációs indexet (EI) a $(A-B) / (A+B)$ képlet alapján. Ha koordináta rendszerben ábrázoljuk az EI értékeket a hozzájuk tartozó SS értékekkel megkapjuk a vörösvérsejtek deformabilitását leíró görbét. Minél magasabb az EI értéke adott SS mellett, annál jobb a sejtek elnyújthatósága, azaz jobb a deformabilitásuk. A kapott görbe Linewaver-Burke analízis segítségével $(1/EI = SS_{1/2} / EI_{max} \times 1/SS + 1/ EI_{max})$ számítható a maximális EI (EI_{max}), illetve ezen érték feléhez tartozó nyírófeszültség ($SS_{1/2}$) [Pa], melyek a deformabilitás jellemzésére tradicionálisan használt mutatók. Az illesztéshez lineáris transzformációt alkalmaztunk.

3.5.4. Vörösvérsejt ozmotikus grádiens deformabilitás

A vörösvérsejtek ozmotikus grádiens deformabilitásának (osmoscan) meghatározása a LoRRca MaxSis Omoscan ektacytometer (Mechatronics BV, Hollandia) segítségével történt. Mérésként 250 μ l vérmintát szuszpendáltunk 5 ml PVP-PBS oldatban. Az osmoscan mérés elve a hagyományos vörösvérsejt deformabilitási méréssel megegyező, azonban ilyenkor az alkalmazott nyírófeszültség konstans (pl.: $SS=30$ Pa), míg a szuszpendáló közeg osmolalitását (O) [mOsm/kg] a készülék 0-tól 500 mOsm/kg-ig növeli. Koordináta rendszerben ábrázolva az EI-O értékpárokat, jellegzetes görbét kapunk a vörösvérsejtek ozmotikus grádiens deformabilitását jól leíró, és pontosan definiálható paraméterekkel: a legkisebb elongációs index, melyet alacsony osmolalitású közegben mértünk (EI min), a maximalis elongációs index (EI max, mely nem azonos a fentebb leírt $EI_{max-xal}$), az EI max érték fele, hyperosmolalitású közegben (EI hyper), valamint az ezekhez tartozó osmolalitás értékek (O min, O(EI max), O hyper, [mOsm/kg]) és a számított görbe alatti terület (AUC). Fenti paraméterekből tovább számítható az EI min és EI max különbsége (ΔEI), a hozzájuk tartozó osmolalitás értékek különbsége (ΔO), valamint ezek hányadosa ($\Delta EI/\Delta O$).

3.5.5. Vörösvérsejt aggregatio

A vörösvérsejt aggregatio meghatározása Myrenne MA-1 fénytranszmissziós elven működő aggregométer használatával történt (Myrenne GmbH, Németország). 20 μ l anticoagulált vérmintát egy 2° domborulatú lencsére vittünk fel, majd a mintatér fedelén lévő üveglap a vércseppet lehajtáskor széttéríti a lencsén. A mintára a tárgylemez felett lévő dióda infravörös fény bocsájt ki, miközben a készülék 600 s^{-1} sebesség-gradiens forgómozgással disaggregálja a mintát. A rotáció leáll (M mód), vagy 3 s^{-1} sebesség-gradiens értékre csökken (M1 mód), majd az aggregációs folyamat 5. (5s) vagy 10. másodpercében (10s) a lencse alatt elhelyezkedő detektor érzékeli az átengedett infravörös fény intenzitását, és a készülék meghatározza az aggregációs index értékét. Az aggregációs index annál magasabb, minél több fény jut át a mintán, vagyis minél fokozottabb az aggregatio, hiszen az aggregatio

kialakulásával a sejtek és aggregátumok közötti tér kiszélesedik, ezáltal a fény-transzmisszió fokozódik. Egy mintából összesen négyféle aggregációs index határozható meg (M 5s, M 10s, M1 5s, M1 10s). Az indexszámok meghatározásához 4-4 párhuzamos mérést végeztünk, és ezek átlagait használtuk statisztikáinkban.

3.6. Szövettan

Szövettani vizsgálat céljából mintavétel történt a májból, valamint eltávolításra került az ischaemiás és az ép vese is, melyeket parafin oldatos fixálást követően perjódsv-Schiff (PAS) festéssel vizsgáltunk. A veséből készült metszetek szövettani értékelésekor vizsgáltuk a tubuláris hámsejtek (TH) sejtmagjának festődését, a hyalin globulusok mennyiségét a TH-ben, a hydropicus degeneratiót a TH-ben, a tubularis necrosist, a glomerularis pangást, a peritubularis kapillarisok pangását, vasa recta pangását, valamint a kefeszegélyek állapotát, minden paramétert 0-3 ponttal értékelve, úgy, hogy a magasabb pontszám, a kedvezőtlenebb szövettani képhez társul. A máj minták metszetei a máj sinusokban észlelt pangás, a sejt necrosis, illetve a vacuolisatio alapján kerültek értékelésre, paraméterenként 0 és 3 pont közti értékkel, úgy hogy a 0 a legkedvezőbb, a 3 a leginkább károsodott értéket jelöli.

3.7. Statisztika

Eredményeink átlag $\pm$ szórás (SD) formában kerültek feltüntetésre. A statisztikai elemzéshez GraphPad Prism szoftvert (GraphPad Software Inc., California, USA) használtunk. Az adatok eloszlásának függvényében két csoport adatainak összehasonlítására Student félé t-próbát vagy Mann-Whitney tesztet használtunk, míg több csoport közti, valamint csoporton belüli adatok összehasonlítását egyirányú, vagy ismétléses varianciaanalízissel (ANOVA) végeztük, Dunn, Bonferroni, vagy Student–Newman–Keuls ellenőrző módszereket alkalmazva. A szignifikancia szintet $p < 0,05$ értéknél állapítottuk meg.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Vitális paraméterek

4.1.1. Pulzusszám

Az I/R csoportban mértük a legalacsonyabb pulzusszámot, mely az ischaemia végére szignifikánsan megemelkedett az alaphoz képest ($p=0,0112$), és tovább fokozódott a reperfusio alatt ($p<0,0001$ vs. R30, R60, R120). A Kontroll csoportban is megfigyelhető volt egy enyhébb emelkedés a reperfusio 60. percétől ($p=0,096$ vs. R60, $p=0,0085$ vs. R120). A preconditionált csoportok értékei a kísérlet ideje alatt nem változtak.

4.1.2. Artériás középnyomás

Az artériás középnyomás stabil volt a műtét ideje alatt az RIPC-1 csoport kivételével mindhárom másik csoportban. A korai preconditionált csoport értékei emelkedtek a kísérlet alatt, a reperfusio végére szignifikánsan a legmagasabbak voltak. (I45: $p=0,0154$ vs. I/R; R30: $p=0,0074$ vs. Kontroll, $p=0,0013$ vs. I/R, $p=0,0228$ vs. RIPC-24, $p=0,0262$ vs. alap; R60: $p=0,036$ vs. RIPC-24; R120: $p=0,0115$ vs. I/R, $p=0,0153$ vs. RIPC-24, $p=0,0139$ vs. alap).

4.1.3. Légzésszám

A legalacsonyabb légzésszámot végig az RIPC-24 csoportban mértük (alap: $p<0,0001$ vs. Kontroll, RIPC-1, $p=0,0003$ vs. I/R; I45: $p=0,0012$ vs. Kontroll, $p=0,0359$ vs. I/R, $p=0,0048$ vs. RIPC-1; R30: $p=0,0006$ vs. Kontroll, $p=0,0487$ vs. RIPC-1; R60: $p=0,0006$ vs. Kontroll, $p=0,0279$ vs. I/R; R120: $p=0,0046$ vs. Kontroll, $p=0,0149$ vs. I/R). Csekély mértékű emelkedés volt megfigyelhető a Kontroll, illetve az RIPC-24 csoportokban. A másik két csoport értékei stabilak voltak.

4.1.4. Hőmérséklet

A rectalis hőmérséklet stabil volt a kísérlet alatt a Kontroll és az I/R csoportban, míg az RIPC-24 csoport értékei a reperfusio 30. percéig szignifikánsan alacsonyabbak voltak a többi csoportnál (alap: $p=0,0073$ vs. Kontroll, $p=0,0057$ vs. I/R, $p=0,0053$ vs. RIPC-1; I45: $p=0,0388$

vs. I/R; R30: $p=0,016$ vs. Kontroll, $p=0,0033$ vs. I/R, $p=0,0141$ vs. RIPC-1). A reperfüziós időszak végére az RIPC-1 csoportnak voltak a legalacsonyabb értékei ($p=0,0071$ vs. alap, $p=0,0002$ vs. I45, $p<0,0001$ vs. R30, Kontroll, $p=0,0179$ vs. R60, $p=0,0008$ vs. I/R, $p=0,0139$ vs. RIPC-24).

A szerv felszíni hőmérsékletekben nem találtunk szignifikáns eltérést a csoportokon belül, vagy a csoportok között egyik mért szerv esetén sem. Csekély, de folyamatos emelkedés megfigyelhető volt az RIPC-24 csoportban, míg az I/R és az RIPC-1 csoport értékei mindvégig stabilak voltak.

4.2. Microcirculatio

A máj mikrokeringését leíró BFU értékek relatív változásai tekintetében a Kontroll és az I/R csoportok között különbség mutatkozott, mely R30 időpontban szignifikáns volt ($p=0,0205$), míg a preconditionált csoportok értékei nem változtak.

Az ischaemia-reperfüziós károsodásnak ki nem tett, jobb oldali vese esetén nem mértünk szignifikáns változást egyik csoportban sem. A bal, ischaemiás vesében az I/R és az RIPC-24 csoportokban, mérsékelt emelkedés volt észlelhető a reperfüzio alatt. Az RIPC-24 csoportban a BFU érték emelkedése a reperfüzio 60. percéig tartott ($p=0,0085$ vs. I45), majd közel az alap értékre csökkent, míg az I/R csoport értékei tovább emelkedtek a reperfüzio végéig ($p=0,0011$ vs. I45, $p=0,0322$ vs. RIPC-1).

4.3. Laboratóriumi paraméterek

4.3.1. Vérgáz analízis

A Kontroll csoport alap- és reperfüzio leteltével mért pH értékei között nem szignifikáns találtunk eltérést. Az alap értékekhez képest R120 időpontban mérsékelt csökkenés volt megfigyelhető az I/R csoportban, illetve jelentősebb az RIPC-1 esetén ($p=0,014$), míg az RIPC-24 csoportban szignifikáns emelkedés látszott ($p=0,024$). A pO_2 értékeiben szignifikáns eltérést nem tapasztaltunk, csupán az I/R és RIPC-1 csoportokban mértünk kis mértékű

csökkenést, illetve az RIPC-24 csoportban enyhe emelkedést. Ezzel megegyezően a késleltetett preconditionált csoportnak volt a legmagasabb a respiratorikus kompenzációja, a respirációs ráta 120-140%-ra nőtt az állatok alap értékeihez képest. A $p\text{CO}_2$ értékek közül az RIPC-24 csoport alapértéke emelkedett volt más csoportokhoz képest ($p=0,028$ vs. Kontroll, $p=0,014$ vs. I/R), míg a kísérlet végére az RIPC-1 csoport kivételével minden csoportban csökkenés mutatkozott az alapértékekhez képest (Kontroll: $p=0,004$; I/R: $p<0,001$; RIPC-24: $p<0,001$). A bikarbonát szint alaphoz képest mért csökkenése minden csoportban megfigyelhető volt (Kontroll: $p=0,003$; I/R: $p<0,001$; RIPC-1: $p=0,011$; RIPC-24: $p<0,001$), legenyhébb mértékben az RIPC-24 csoportban ($p=0,041$ vs. Kontroll, $p=0,014$ vs. I/R, $p=0,019$ vs. RIPC-1). A legnagyobb mértékű bázishiány az I/R és az RIPC-1 csoportokban mutatkozott.

A reperfusio 120. percében mért elektrolitszintek alapértékhez viszonyított relatív változásokat vizsgáltuk. A Na^+ értékekben jelentős változás nem mutatkozott, azok fiziológiás tartományban maradtak. A K^+ szint ezzel szemben minden csoportban megemelkedett, legjelentősebb mértékben az I/R csoportban ($p<0,001$ vs. alap), a legalacsonyabb emelkedés pedig az RIPC-24 csoportban volt megfigyelhető ($p=0,008$ vs. alap, $p=0,03$ vs. I/R). A mért Ca^{2+} értékek enyhén csökkentek minden csoportban, a legalacsonyabb adatokat az I/R csoportban mértük ($p<0,001$ vs. alap), míg az RIPC-24 csoportban ehhez képest szignifikánsan magasabb maradt a kalcium ion szintje ($p=0,015$ vs. I/R). A Cl^- szint szignifikánsan emelkedett az alapértékekhez képest az I/R ($p<0,001$) és az RIPC-1 ($p<0,001$) csoportokban, mely nem mutatkozott az RIPC-24 protokollal kezelt csoportban ($p=0,005$ vs. I/R, $p=0,007$ vs. RIPC-1).

Az R120 méréskor kapott metabolit szintekben tapasztalt alapértékekhez viszonyított relatív változásokat a 2. ábrában tüntettük fel. A laktát koncentráció szignifikáns mértékben emelkedett az I/R ($p<0,001$ vs. alap, $p=0,011$ vs. Kontroll), az RIPC-1 ($p=0,013$ vs. alap, $p=0,03$ vs. Kontroll) és legkisebb, de még mindig szignifikáns mértékben az RIPC-24 ($p=0,013$ vs. alap, $p=0,03$ vs. Kontroll) csoportokban is. A Kreatinin koncentráció szignifikánsan emelkedett

mindhárom ischemia-reperfüziós károsodásnak kitett csoportban (I/R: $p=0,008$; RIPC-1: $p=0,021$; RIPC-24: $p=0,014$). A glükóz koncentráció emelkedése csupán az RIPC-24 csoportban volt megfigyelhető ($p=0,016$ vs. alap).

4.3.2. Haematologiai paraméterek

A legmagasabb vörösvérsejtszámot az RIPC-24 csoportban mértük (alap, R30, R60, R120: $p<0,0001$ vs. Kontroll, I/R; R30, R60: $p<0,0001$ vs. RIPC-1), míg a Kontroll csoportban voltak a legalacsonyabbak az értékek (alap, R30, R60, R120: $p<0,0001$ vs. RIPC-24; R30, R60: $p<0,0001$ vs. RIPC-1; R30: $p=0,0003$ vs. I/R; R60: $p=0,0002$ vs. I/R).

A haematocrit értékek hasonlóan változtak, a RIPC-24 csoportban voltak a legmagasabbak az értékek (alap: $p=0,0053$ vs. I/R; R30: $p<0,0001$ vs. I/R, $p=0,0011$ vs. RIPC-1, R60: $p<0,0001$ vs. I/R; R120: $p=0,0010$ vs. I/R, $p=0,0339$ vs. RIPC-1).

A legstabilabb fehérvérsejtszámot a preconditionált csoportokban mértük, míg egy-egy kiugrás volt megfigyelhető a Kontroll (R60: $p=0,0307$ vs. alap, $p=0,039$ vs. RIPC-1), illetve az I/R csoportokban (R30: $p=0,0102$ vs. alap, $p=0,0006$ vs. R120, $p=0,0004$ vs. Kontroll, $p<0,0001$ vs. RIPC-1, $p=0,0005$ vs. RIPC-24).

A legalacsonyabb vérlemezke értékeket az RIPC-24 csoportban tapasztaltuk (alap: $p<0,0001$ vs. I/R, $p=0,0416$ vs. RIPC-1; R30: $p=0,0043$ vs. I/R, $p=0,0279$ vs. RIPC-1; R60: $p=0,0161$ vs. I/R). Az I/R csoportban is megfigyelhető volt egy csökkenő tendencia, mely a reperfusio végére szignifikánssá vált ($p=0,0465$ vs. alap).

4.3.3. Vörösvérsejt deformabilitás

A 3 Pa nyírófeszültségen mért elongációs indexet, valamint a deformabilitást jól jellemző $SS_{1/2}$ és EI_{max} hányadosát (deformabilitás index) a 3. ábrán ábrázoltuk. A 3 Pa-on mért EI értékekben esetén már az alapméréskor is mutatkozott szignifikáns eltérés a csoportok között. Az RIPC-1 csoport értékei szignifikánsan alacsonyabbak voltak a Kontroll csoporthoz képest ($p=0,002$), és a megfigyelt időszak végére egy szignifikáns emelkedést észleltünk az

alap értékhez képest (R120: $p=0,013$). Az RIPC-24 csoportban ezzel szemben csökkenés mutatkozott a többi csoport értékeihez képest, mely R60-tól szignifikáns volt a Kontroll csoporthoz viszonyítva ($p=0,043$). Ez a differencia tovább fokozódott az R120 időpontra ($p=0,001$ vs. Kontroll; $p=0,015$ vs. RIPC-1).

Az $SS_{1/2}/EI_{max}$ hányadosok elemzésekor a változások jelentősebbek voltak. A kezdeti értékek közül a preconditionált csoportok értékei magasabbak voltak a Kontroll csoport értékeinél (RIPC-1: $p<0,001$; RIPC-24: $p<0,00$), illetve a korai preconditionált csoport esetén az I/R csoporttól is ($p=0,014$). A kezeletlen ischaemiás csoport értékei emelkedtek a kontroll csoport értékeihez képest a reperfusio ideje alatt, mely szignifikáns volt a reperfusio 60. percétől ($p=0,041$). A preconditionált csoport értékei szintén emelkedtek a reperfusio alatt. R120 méréskor a legmagasabb értékeket az RIPC-24 csoportban kaptuk ($p<0,001$ vs. alap; $p=0,001$ vs. I/R; $p=0,002$ vs. RIPC-1).

4.3.4. Vörösvérsejt ozmotikus grádiens deformabilitás

Az osmotikus grandiens ektacytometria (osmoscan) értékei közül jelentős eltérés kevés paraméterben mutatkozott. Az O (EI max), az O hyper és az AUC alap értékekben szignifikáns eltéréseket találtunk a Kontroll és az RIPC-24 csoport között. Ezek a különbségek megfigyelhetőek voltak a reperfúziós időszak végén is, az AUC esetén szignifikánssá vált a többi csoporthoz képest is. ($p=0,004$ vs. Kontroll; $p=0,026$ vs. I/R; $p=0,017$ vs. RIPC-1).

A ΔO értékek a reperfusio végén szignifikánsan alacsonyabbak voltak az RIPC-24 csoportban az I/R csoport értékeihez képest ($p=0,019$), mely különbség a ΔEI kapcsán nem mutatkozott szignifikánsnak.

4.3.5. Vörösvérsejt aggregatio

Az aggregációs index változásai a különböző beállítások használatakor (M 5s, M 10s, M1 5s, M1 10s) a 4. ábrán láthatóak. M 5s mód esetén a legalacsonyabb alapértéket az RIPC-24 csoportban kaptuk ($p=0,008$ vs. Kontroll), ezzel szemben a reperfusio ideje alatt ebben

a csoportban voltak a legmagasabbak az értékek. (R30: $p < 0,001$ vs. alap, $p = 0,004$ vs. I/R, $p = 0,003$ vs. RIPC-1; R60: $p < 0,001$ vs. alap, $p = 0,03$ vs. Kontroll; R120: $p < 0,001$ vs. alap, $p = 0,0027$ vs. Kontroll, $p < 0,001$ vs. RIPC-1).

M 10s beállítás esetén szintén az RIPC-24 csoport alapértékei voltak a legalacsonyabbak ($p < 0,001$ vs. Kontroll, I/R, RIPC-1), azonban szignifikánsan emelkedtek reperfusio alatt (R60: $p = 0,004$ vs. alap; R120: $p < 0,001$ vs. alap; $p = 0,013$ vs. R30).

Az M1 5s mérések közül is az RIPC-24 csoport értékei voltak a legmagasabbak a reperfusio alatt (R30: $p = 0,0018$ vs. alap, $p < 0,001$ vs. Kontroll, I/R; R60: $p = 0,0018$ vs. alap, $p = 0,0022$ vs. Kontroll, $p = 0,0007$ vs. I/R; R60: $p = 0,008$ vs. alap, $p = 0,0022$ vs. Kontroll, $p = 0,0007$ vs. I/R; R120: $p = 0,0008$ vs. alap, $p = 0,015$ vs. Kontroll, $p = 0,046$ vs. I/R).

Az M1 10s értékek a reperfusio második felében az RIPC-24 csoportban voltak a legmagasabbak (R60: $p = 0,0024$ vs. Kontroll; R120 $p = 0,0003$ vs. alap, $p = 0,0073$ vs. Kontroll). Szignifikáns emelkedés mutatkozott az I/R csoportban is a 120 perces reperfusio végére ($p = 0,027$ vs. Kontroll, $p = 0,042$ vs. R30).

4.4. Szövettani vizsgálatok

A bal, ischaemiás vese esetén szignifikánsan magasabb pontszámokat kaptunk az ellenoldali, ép veséhez képest az I/R ($p < 0,0001$) és az RIPC-1 ($p < 0,05$) csoportok esetén. A legalacsonyabb pontszámot a bal, ischaemiás vese adatai közül a Kontroll csoportban találtuk ($p < 0,0001$ vs. I/R and RIPC1, $p = 0,0025$ vs. RIPC-24), míg az I/R csoportban pontszámai voltak a legmagasabbak ($p = 0,0017$ vs. RIPC-24). Az I/R károsodásnak kitett csoportok közül az RIPC-24 csoportnak voltak a legalacsonyabb pontértékei ($p = 0,0025$ vs. RIPC-1).

A tubularis hámsejtek legnagyobb mértékű hyalin degradációja és a legtöbb hyalin globulus, illetve sérült glomerulus az I/R csoportban volt. A vasa rectában tapasztalt pangás az RIPC-1 csoportban volt kifejezettebb, míg pathologias kefeszegélyt mindhárom I/R károsodásnak kitett csoportban megfigyeltünk. A tubularis hámsejtek magfestődése csökkent,

míg a tubularis nekrosis fokozódott az I/R hatására, míg ezen változások kisebb mértékben voltak megfigyelhetők az RIPC csoportokban. Az ischaemiának kitett vesékben fokozódott a hyalin degradációja és habos léziók jelentek meg a tubularis hámsejtek citoplazmájában, melyek az RIPC csoportokban enyhébb mértékben jelentek meg. A Kontroll csoportban nem volt jelentősebb glomerularis, peritubularis kapilláris, illetve vasa recta pangás egyik oldali vesében sem, míg az I/R csoport metszeteiben enyhe, illetve közepes mennyiségű pangás mutatkozott az ischaemiás vesékben. Az ép vese eltérés nélküli volt. Az RIPC-1 csoportnál ezzel szemben jelentős pangást észleltünk mindkét oldali vesében, míg az RIPC-24 csoportban alig volt detektálható pangás. A proximális hámsejtek kefeszegélye teljesen ép volt a Kontroll csoport mindkét oldali veséjében, míg az I/R és az RIPC-1 csoportokban subtotalisan, illetve intermittálóan hiányzott a kefeszegély az ischaemiás vesében. Az RIPC-24 csoportban csupán kisebb gap-eket találtunk az ischaemiás vese kefeszegélyének folytonosságában.

A legmagasabb szövettani pontot a máj metszetei közül az RIPC-1 csoportban találtuk, ahol a legkifejezettebb eltérés a hepaticus sinusoidokban észlelt pangás volt. A legalacsonyabb pontszámot az RIPC-24 csoportban kaptuk.

5. FŐBB EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

1. Az általunk alkalmazott vese-ischaemia modell alkalmas volt az ischaemia-reperfusio okozta károsodás rövidtávú vizsgálatára, valamint a különböző alkalmazott távoli szervi preconditionálási protokollok összehasonlítására a vizsgált paraméterek segítségével.
2. A 45-perces vese ischaemia hatására jelentős mértékű romlást észleltünk a vörösvérsejtek deformabilitásában, a sav-bázis, illetve metabolit értékekben, valamint szignifikáns leukocytaszám emelkedés alakult ki az I/R csoportban a Kontroll csoporthoz képest. Szövettani vizsgálat alapján ezen csoportban volt legnagyobb a károsodás. A mikrokeringés az ischaemiás, bal vesében fokozódott. A vörösvérsejt aggregációban, illetve a vitalis paraméterekben számottevő eltérést nem észleltünk.
3. A preconditionálási protokollok valamennyi I/R hatására bekövetkező változást mérsékeltek. A haematologiai paraméterek közül a thrombocytaszámban csökkenést, míg az erythrocyta számban emelkedést okoztak, a leukocytaszám ezen csoportokban nem változott jelentősen. A deformabilitási értékeket a preconditionálási protokollok nem javították, míg a szövettani pontszámok kedvezőbbnek mutatkoztak az I/R csoporthoz képest. A bal vesében megfigyelhető fokozott keringést mindkét RIPC protokoll mérsékelte.
4. A két preconditionálási protokollt összehasonlítva számos paraméter esetén mindkét eljárás kedvezően hatott. A haemorheologiai paraméterek esetében a korai protokoll bizonyult kedvezőbbnek, míg a metabolit értékek és szövettani vizsgálatok esetén a késleltetett preconditionált csoport eredményei voltak jobbak.

A vese-ischaemia reperfusio során alkalmazandó optimális távoli szervi ischaemiás preconditionálási protokoll meghatározásához további vizsgálatok szükségesek, melyek hosszabb távú után követést tesznek lehetővé.

6. PUBLIKÁCIÓS LISTA



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

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

Nyilvántartási szám: DEENK/85/2021.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Varga Gábor
Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10064254

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Varga, G.**, Ghanem, S., Szabó, B., Nagy, K., Pál, N., Tánczos, B., Somogyi, V., Baráth, B., Deák, Á., Matolay, O., Bidiga, L., Pető, K., Németh, N.: Which remote ischemic preconditioning protocol is favorable in renal ischemia-reperfusion injury in the rat?
Clin. Hemorheol. Microcirc. 76 (3), 439-451, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-200916>
IF: 1.741 (2019)
2. **Varga, G.**, Ghanem, S., Szabó, B., Nagy, K., Pál, N., Tánczos, B., Somogyi, V., Baráth, B., Deák, Á., Pető, K., Németh, N.: Renal ischemia-reperfusion-induced metabolic and micro-rheological alterations and their modulation by remote organ ischemic preconditioning protocols in the rat.
Clin. Hemorheol. Microcirc. 71 (2), 225-236, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-189414>
IF: 1.741

További közlemények

3. Németh, N., Pető, K., Magyar, Z., Klárik, Z., **Varga, G.**, Oltean, M., Mantas, A., Czigány, Z., Tolba, R. H.: Hemorheological and Microcirculatory Factors in Liver Ischemia-Reperfusion Injury - An Update on Pathophysiology, Molecular Mechanisms and Protective Strategies
Int. J. Mol. Sci. 22 (4), 1-24, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22041864>
IF: 4.556 (2019)
4. Mátrai, Á. A., **Varga, G.**, Tánczos, B., Baráth, B., Varga, Á., Horváth, L., Bereczky, Z., Deák, A., Németh, N.: In vitro effects of temperature on red blood cell deformability and membrane stability in human and various vertebrate species.
Clin. Hemorheol. Microcirc. "Accepted by Publisher", 2021.
IF: 1.741 (2019)





5. Magyar, Z., Mester, A., Nadubinszky, G., **Varga, G.**, Ghanem, S., Somogyi, V., Tánczos, B., Deák, Á., Bidiga, L., Mihai, O., Pető, K., Németh, N.: Beneficial effects of remote organ ischemic preconditioning on micro-rheological parameters during liver ischemia-reperfusion in the rat. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 70 (2), 181-190, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-170351>
IF: 1.642
6. Magyar, Z., **Varga, G.**, Mester, A., Ghanem, S., Somogyi, V., Tánczos, B., Deák, Á., Bidiga, L., Pető, K., Németh, N.: Is the early or delayed remote ischemic preconditioning the more effective from a microcirculatory and histological point of view in a rat model of partial liver ischemia-reperfusion?
Acta Cir. Bras. 33 (7), 597-608, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-865020180070000005>
IF: 0.931
7. Németh, N., Pető, K., Deák, Á., Somogyi, V., **Varga, G.**, Tánczos, B., Balog, K., Csiszkó, A., Godó, Z., Szentkereszty, Z.: Hemorheological factors can be informative in comparing treatment possibilities of abdominal compartment syndrome.
Clin. Hemorheol. Microcirc. 64 (4), 765-775, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-168027>
IF: 1.679

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 14,031

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
3,482**

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

Debrecen, 2021.03.09.



7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek **Prof. Dr. Németh Norbert** Tanszékvezető Úrnak, aki bátorított, hogy merjek belekezdeni a PhD képzésbe, támogatott a kutatásom alatt, valamint türelemmel és megértéssel állt hozzám a nehezebb időszakokban. Szakmai tudása és segítségével nélkül aligha jöhetett volna létre ezen értekezés. Professzor Úr segítségével lehetőségem volt eljutni számos hazai és nemzetközi konferenciára, ahol mind szakmai és baráti kapcsolatok is kötődtek. Köszönöm, hogy bizalommal fordulhattam Professzor Úrhoz bármikor!

Őszinte köszönet illeti **Prof. Dr. Mátyus László** Dékán Urat, aki támogatott és tanácsokkal látott el képzésem megkezdésétől.

Szeretném kifejezni köszönetemet **Prof. Dr. Mikó Irénnek** és **Prof. Dr. Furka Istvánnak**, akik mindig jószándékkal álltak hozzám képzésem alatt, segítettek tanácsaikkal.

Köszönöm a segítséget **Dr. Pető Katalin** egyetemi docensnek, valamint **Dr. Deák Ádám** adjunktusnak, hogy segítettek kutatásomban.

Szeretném megköszönni **Dr. Szabó Baláznak** és **Dr. Souleiman Ghanemnek**, hogy részt vettek a kísérletekben és segítettek mikrosebészeti ismereteim elmélyítésében.

Köszönöm **Dr. Somogyi Viktóriának**, **Baráth Barbarának**, **Tánczos Bencének** a laboratóriumi mérésekben való segítséget, illetve támogató hozzáállásukat.

Köszönettel Tartozok **Dr. Bidiga Lászlónak** és **Dr. Matolay Orsolyának** a szövettani vizsgálatokért, és a szövettani képekért!

Hálával tartozom továbbá **Mándy Zsuzsannának**, és **Dr. Sasi Szabó László** Osztályvezető Úrnak, hogy támogattak PhD képzésem megkezdésétől.

Köszönöm **családomnak**, és **barátaimnak**, hogy kitartottak mellettem és türelmesek voltak velem és támogattak, hogy elérjem a kitűzött célt.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm a **Sebészeti Műtéttani Tanszék** korábbi és jelen munkatársainak, hogy befogadtak és részese lehettem a családi közösségüknek.