

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Korai és késői távoli szervi ischaemiás
preconditionálás hatásai parciális máj
ischaemia-reperfusio során patkánymodellben**

Dr. Magyar Zsuzsanna Sarolta

Témavezető: Prof. Dr. Németh Norbert



DEBRECENI EGYETEM

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2019

**Korai és késői távoli szervi ischaemiás preconditionálás hatásai
parciális máj ischaemia-reperfusio során patkánymodellben**

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

Írta: Dr. Magyar Zsuzsanna Sarolta, okleveles orvosdoktor

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

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

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Arató Endre, PhD
Dr. Varga Gabriella, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Illés Árpád, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Arató Endre, PhD
Prof. Dr. Sáy Péter, az MTA doktora
Dr. Jancsó Gábor, PhD
Dr. Varga Gabriella, PhD

Az értekezés védésének helyszíne, időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme,
2019. szeptember 5. 14 óra

1. BEVEZETÉS

Részleges, vagy teljes máj ischaemia számos patofiziológiai folyamat során kialakul, mint például trauma, sokk következtében, vagy a májon végzett különböző műtéti beavatkozások és májtranszplantáció során. E műtétek során a beavatkozás szükséges velejárója lehet az ischaemia és a reperfusio kialakulása, hiszen a májat ellátó érkepletek ideiglenes leszorítása sokszor nélkülözhetetlen a műtét sikeres elvégzéséhez.

Irodalmi adatok alapján jól ismert, hogy az ischaemia-reperfusio (I/R) komoly szöveti károsodást eredményezhet, ami jelentősen befolyásolja a postoperatív morbiditást és mortalitást. Az ischaemia hatására felborul az egyensúly az oxigén és tápanyag ellátás és szükséglet között, ami hypoxiához és acidosishoz vezet. Az anaerob metabolizmus következtében nő a laktát koncentráció, ami csökkent intracelluláris pH-t eredményez. Az ischaemiás inzultust követően, a véráramlás újraindulása paradox módon fokozza a károsodás mértékét és további gyulladásos reakciókat indukál. A folyamat következtében felszabadult szabadgyökök és mediátorok a mikrokeringést is befolyásolják. A micro-rheológiai paraméterek szoros összefüggésben állnak a mikrokeringés állapotával, a metabolikus változások, az oxidatív stressz pedig hatással lehetnek a vörösvérsejt aggregációra és vörösvérsejt deformabilitásra.

A parenchymás szervek sebészete során fellépő I/R károsodást követően a haemorheológiai paraméterek változást mutatnak. A következményes micro- és macro-rheológiai eltérések a mikrokeringés állapotának megváltozásához és csökkent perfúzióhoz vezetnek. A vörösvérsejtek csökkent deformabilitása a vérviszkozitás növekedését eredményezheti. A fokozott vörösvérsejt aggregatio szintén növeli a vérviszkozitást és növeli az áramlási ellenállást. A sebészeti beavatkozások során fellépő patofiziológias változások kutatása során is kiemelt jelentőségű lehet a haemorheológiai paraméterek változásainak megismerése.

Számos farmakológiai és sebészeti intervenciós módszer ismert az I/R károsodás és az ehhez kapcsolódó postoperatív komplikációk mértékének

megelőzésére és csökkentésére. A szövetek ischaemiás toleranciájának növelésének egyik módszere a távoli szervi ischaemiás preconditionálás (remote ischemic preconditioning-RIPC), mely rövid idejű ischaemia-reperfúziós ciklusok alkalmazását jelenti az ischaemiát megelőzően, az ischaemiának kitett szervtől távol eső másik szervben, jellemzően végtagon. Az eljárás kedvező hatásai a kísérletes sebészetben bizonyítottak, azonban a terápiás hatás a klinikai gyakorlatban továbbra sem tisztázott.

Ugyanakkor a folyamat hatásmechanizmusának részletei nem ismertek teljes mértékben. Nem rendelkezünk általánosan használható protokollal, nem ismert az sem, hogy mennyi idővel érdemes a célszervi ischaemia előtt végezni. Nem ismerünk irodalmi adatokat arra vonatkozóan sem, hogy milyen hatást gyakorol a távoli szervi ischaemiás preconditionálás a micro-rheologiai és a microcirculációs paraméterekre.

2. CÉLKITŰZÉSEK

1. Célunk volt olyan állatkísérletes modell kialakítása, ahol a parciális máj ischaemia-reperfúzió hatásai vizsgálhatóak.
2. Kísérleteinkben vizsgálni kívántuk patkánymodellen a 60 perc időtartamú 70%-os parciális máj ischaemia és az azt követő 120 perc reperfúzió vitális paraméterekre, hemodinamikai státuszra, mikrokeringésre, sav-bázis-, haematológiai-, micro-rheologiai paraméterekre kifejtett hatásait.
3. Kísérletünk célja volt az ischaemia-reperfúzió hatására kialakuló morfológiai változások elemzése, és a szövettani eltérések mikrokeringéssel való összefüggéseinek vizsgálata.
4. Célunk volt annak összehasonlítása, hogy milyen mértékű változások mutatkoznak az általunk vizsgált paraméterek esetében a korai és késői távoli szervi ischaemiás preconditionált csoportokban az ischaemia-reperfúzió átesett csoporthoz képest.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Kísérleti állatok, műtéti technika és mintavételi eljárás

A kísérlet a Debreceni Egyetemi Állatjóléti Bizottság (DEMÁB) által jóváhagyott és regisztrált engedély alapján került kivitelezésre (Engedélyszám: 20/2011; 25/2016 DEMÁB), összhangban az 1998. évi XXVIII. „Az állatok védelméről és kíméletéről” szóló törvény, a 40/2013. állatkísérletekről szóló Kormányrendelet és Európai Unió (2010/63 EU-Direktíva) előírásaival.

Huszonegy hím és nőstény Crl:WI patkányt (Toxicoop Kft., testtömeg: 386.5 ± 57 g) véletlenszerűen kiválasztva három kísérleti csoportba osztottunk, oly módon, hogy minden csoportba 5 hím és 2 nőstény állat kerüljön. A kísérleti állatokat ketrecben, szobahőmérsékleten tartottuk, vízhez és táplálékhoz szabad hozzáférést biztosítva. Azonos korú (14-16 hetes) patkányokat vontunk be a kísérletbe, hiszen a sebészeti beavatkozások során az életkor kritikus tényező lehet. A műtétet megelőző napon minden állat analgeticumként Flunixin (2,5 mg/kg s.c.) injekcióban részesült.

Az ischaemiás preconditionálási protokollt és a sebészeti beavatkozásokat általános anaesthesiában végeztük (60 mg/kg Thiopental, i.p.). Premedikációként atropin-szulfátot kaptak (0,06 mg/kg, s.c.). Az állatok szupinált testhelyzetben fűtött padon kerültek elhelyezésre az állandó testhőmérséklet fenntartása céljából.

A Kontroll csoportban (n=7) a bal inguinalis és abdominalis régiók teljesen leborotválásra kerültek, majd Betadine-os dezinficiálás történt. A bal lágyéki területen 1 cm-es horizontális metszést követően operáló mikroszkóp segítségével (Leica Wild 64 M650) az a. femoralis kipreparálásra került, majd kanülálás történt (BD Neoflon™ 26G). Median laparotomiát végeztünk, melynek során a metszést a sternum caudalis végétől a processus xiphoideustól a pecten ossis pubisig vezettünk, majd a beleket óvatosan a kísérleti állat bal oldalára helyeztük, és nedvesen tartás céljából, valamint a dehidrációt

megelőzendő műanyag lappal izoláltuk. Ezt követően 70%-os parciális máj ischaemiát hoztunk létre oly módon, hogy a bilio-vascularis nyél identifikálását követően vasculáris occlusiót létesítettünk. Atraumatikus, mikrosebészeti klippet helyeztünk fel 60 percre az érnyélre úgy, hogy a processus caudatus és a jobb alsó és felső lebeny vérellátása intakt maradt. A májlebenyek színében bekövetkező változás jelezte a leszorítás sikerességét. Az ischaemiás idő leteltével a klippet eltávolítottuk, majd 120 perc reperfúziós periódust figyeltünk meg. A 60 perces ischaemiás és a 120 perces reperfúziós időszak alatt a hasfali sebet két rétegben fedtük. Első réteggént műanyag lapot használtunk, ezzel minimalizálva az evaporizációból adódó folyadékvesztést. Második réteggént pedig gézlapot helyeztünk a hasfalra a hővesztés csökkentésére.

A preconditionált csoportokban 3x10 perc időtartamú ischaemiás periódusokat hoztunk létre 10 perces reperfúziós időszakokkal megszakítva. A bal hátsó végtagon a ligamentum inguinale magasságában az ischaemia indukálása céljából tourniquet került felhelyezésre. A preconditionálási protokollt 1 órával (RIPC-1 csoport, n=7), vagy 24 órával (RIPC-24 csoport, n=7) a máj ischaemia előtt végeztük.

A műtét kezdetén (Alap), valamint a reperfúzió 30., 60. és 120. percében (R-30, R-60, R-120) a kanülált a. femoralisból (Antikoaguláns: K₃-EDTA 1,5 mg/ml) vérvétel (~0,4-0,5 ml) történt laboratóriumi vizsgálatok céljából. Minden vérvételt követően a levett vérmennyiségnek megfelelő testhőmérsékletű fiziológiás sóoldattal pótoltuk a folyadékot.

A műtét kezdetén (Alap), valamint az ischaemia 60. (I-60), a reperfúzió 30., 60. és 120. percében (R-30, R-60, R-120) meghatározásra került a légzésszám, a rectalis hőmérséklet, a szervfelszíni hőmérsékletek (ischaemiás és nem-ischaemiás májlebeny) továbbá szöveti áramlásmérés (ischaemiás és nem-ischaemiás májlebeny, jejunum kacs, jobb vese) és hemodinamikai mérések történtek. A megfigyelt vizsgálati időszakot követően a májból szövettani mintavétel, majd a kísérleti állatok exsanguinációja történt.

3.2. Légzésszám, hőmérséklet

A kísérleti állat általános állapotának követésére rendszeresen meghatároztuk a légzésszámot. A rectalis hőmérséklet mérésére digitális hőmérőt, a szervfelszíni hőmérséklet értékek mérésére infravörös hőmérőt használtunk (Rudolf Riester GmbH, Németország).

3.3. Hemodinamikai paraméterek

A vérnyomás és a szívfrekvencia indirekt monitorozásra Apollo Amplifier non-invazív vérnyomásmérőt (IITC Inc.,USA) használtunk, melyhez a kísérleti állat farkára mandzsettát helyeztünk.

3.4. Microcirculatio monitorizálása

A mikrokeringésben bekövetkező változások monitorozására lézer Doppler szöveti áramlásmérőt (LD-01 Laser Doppler szöveti áramlásmérő, Experimetria Kft., Magyarország) használtunk.

A lézer Doppler áramlásmérő egy non-invazív, széles körben alkalmazott eszköz a mikrokeringésben bekövetkező változások és a szövetek életképességének diagnosztizálásában. A módszer a Doppler-shift jelenségen alapszik. Az emittált, koherens fény hullámhossza megváltozik, ha mozgásban lévő partikulumokkal találkozik, azonban változatlan marad, ha statikus szöveti elemekbe ütközik. A lézer Doppler áramlásmérő által száloptikán kibocsátott lézerefénynyaláb a mozgó vörösvérsejtek felszínéről visszaverődik, és hullámhosszában változás következik be. A visszaverődő fénynyalábot a készülék detektálja, ez az eltolódás pedig grafikusán konvertálható a számítógép képernyőjén. A módszer nagy előnye, hogy valós idejű, az eredmény közvetlenül értékelhető, így lehetővé teszi az azonnali beavatkozást.

A lézer Doppler áramlásmérés során rögzített hullám mintázatát számos faktor befolyásolhatja, például a hőmérséklet, a mérőfej instabilitása, légző- és

izommozgás, a szövetek kiszáradása, lokális vérnyomásváltozás, oxigenizáció mértéke, haemolysis, szérum lipidstátusza.

A készülék standard pencil fejét (MNP100XP, Oxford Optronics Ltd., Egyesült Királyság) az ischaemiás- és nem ischaemiás májlebeny, a jejunum kacs anti-mesenterialis szélén, valamint a jobb vese anterior felszínére helyeztük.

A készülék által kifejezett érték, a BFU (blood flux unit) egy relatív, dimenzió nélküli szám. A változás mértéke egyenesen arányos a mozgó vörösvérsejtek számával és sebességével, azonban független a mozgásuk irányától.

A mérőfej rögzítése és a jel stabilizációját követően 20 másodperces időintervallumon keresztül regisztráljuk a görbét, melyek off-line analizálása után kapjuk meg az eredményeket.

3.5. Laboratóriumi vizsgálatok

3.5.1. Sav-bázis paraméterek

A sav-bázis paraméterek mérésére, hordozható, vezeték nélküli kézi EPOC® Blood Analysing System készüléket használtunk (Siemens Healthcare GmbH, Németország), mellyel meghatározásra kerültek a vérgáz paraméterek, az elektrolit és metabolikus értékek. A méréshez megközelítőleg 0,1 ml vérmennyiség szükséges. Kísérletünkben vizsgáltuk a pH-t, a laktát koncentrációt valamint a pO_2 -t és pCO_2 -t.

3.5.2. Haematologiai paraméterek

Meghatároztuk a mennyiségi és minőségi haematologiai paramétereket (V_{vs} [T/l], Hgb [g/dl], Htc [%], MCH [pg], MCV [fl], MCHC [g/dl], F_{vs} [G/l], The [G/l]), melyhez Sysmex F-4500 (TOA Medical Electronics Corp., Ltd., Japán) haematologiai automatát használtunk. A készülék 70 μ l vérmennyiség aspirációját követően fotometriás elven határozza meg haemoglobin

koncentrációt (Hgb [g/dl]), majd impedancia-elven történő sejtszeparálás (leukocyták: ~ 30-300 fl, erythrocyták: ~ 25-250 fl, thrombocyták: ~ 2-30 fl) alapján ezekből származtatva adja meg a paramétereiket.

3.5.3. Vörösvérsejt deformabilitás

A vörösvérsejtek deformabilitását LoRRca MaxSis Osmoscan ektacytometer (Mechatronics BV, Hollandia) segítségével mértük, mely készülék a vörösvérsejtek nyírófeszültséggel (shear stress, tartomány: 0,5-30 Pa) szemben mutatott elnyújthatóságát méri lézer diffrakciós módszerrel.

A lézer diffrakciós ellipszometria vagy ektacytomertria széles körben használt eljárás a vörösvérsejtek elnyújthatóságának vizsgálatára. A készülékben a magas viszkozitású közegben szuszpendált vörösvérsejtek a nyírófeszültség hatására elnyúlnak, a felületükről szóródó lézersugár nyalábok létrehoznak egy diffraktogramot, melynek optikai analízise adja az elongációs indexet.

A mérések szempontjából fontos komponenst jelent a szuszpendáló közeg, hiszen egy magas viszkozitású közegre van szükség a nyírófeszültség vörösvérsejtekre történő átadásához, melynek következtében a vörösvérsejtek elongálódni tudnak. Az elnyújthatóság mértéke, így a mérések érzékenysége is függ a közeg viszkozitásától. Jelen munkában szuszpendáló közegként polyvinylpyrrolidone (PVP) – foszfát puffer (PBS) oldatot (PVP: 360 kDa, Sigma-Aldrich Co. USA) használtunk. A PVP-PBS oldat viszkozitása 22,5 mPas, osmolalitása 326 mOsmol/kg, pH-ja 7,1 volt. Méréseink során 10 μ l vért szuszpendáltunk 2 ml PVP-PBS oldatban.

Az alkalmazott 0,5-30 Pa nyírófeszültség (shear stress, SS [Pa]) függvényében rögzíthető az elongációs index profil, ahol a magasabb EI értékek a jobb vörösvérsejt deformabilitást tükrözik.

A kapott eredmények összehasonlítása történhet egy-egy kiválasztott nyírófeszültség értékhez rendelt EI összehasonlításával (pl. EI 3 Pa nyírófeszültségnél) vagy az egyszerűbb összehasonlíthatóság érdekében a görbét

leíró számított paraméterekkel. Az egyes EI-nyírófeszültség görbék elemzésére a Lineweaver-Burke analízist ($1/EI = SS_{1/2} / EI_{\max} \times 1/SS + 1/EI_{\max}$) használtuk, meghatározva a maximális elongációs index értéket (EI_{\max}), valamint annak feléhez tartozó nyírófeszültséget ($SS_{1/2}$ [Pa]).

3.5.4. Vörösvérsejt aggregatio

A vörösvérsejtek aggregációs készségének vizsgálatára a fénytranszmissziós elven működő Myrenne MA-1 Erythrocyta aggregometert (Myrenne GmbH, Németország) alkalmaztuk. A mérésekhez 20 μ l vérminta szükséges. Lehetőség van a vörösvérsejtek reverzibilis összekapcsolódásának vizsgálatára stasisnál, (0 s^{-1} , M index) és alacsony sebesség-grádiensnél (3 s^{-1} , M1 index). Az aggregatio folyamata időben követhető, a mérések 5 vagy 10 másodperccel az aggregatio megindulását követően történnek a készülékben. Ezek alapján a készülék négyféle aggregációs index paramétert határoz meg: M 5s, M1 5s, M 10s és M1 10s indexeket. A magasabb érték nagyobb mértékű vörösvérsejt aggregációra utal.

3.6. Szövetteni vizsgálat

A megfigyelt ischaemia-reperfüsiós periódus végén hisztopatológiai vizsgálatok céljából szövetteni mintavétel történt a bal lateralis májlebenyből. A szövetteni mintákat 10%-os formalinos fixálást követően a Debreceni Egyetem ÁOK Patológiai Intézetébe küldtük, ahol paraffinba ágyazás és mikrotómmal 4 μ m vastagságú szeletek metszése történt. Haematoxylin & eosin és PAS festés készült az ischaemia-reperfüsió okozta morfológiai eltérések és csoportok közötti különbségek analizálása céljából. A károsodás mértékének számszerű kiértékeléséhez az irodalomból ismert Suzuki pontrendszert alkalmaztuk. Tapasztalt patológus az ischaemia-reperfüsiós károsodás három különböző jellegzetes szövetteni jelét (sinusoidalis congestio, necrosis, vacuolizatio) kísérleti állatonként 0-tól 4-ig terjedő pontszámmal értékelt, az eltérés súlyosságától függően.

3.7. Statisztikai analízis

A statisztikai elemzések elvégzésére SigmaStat szoftvert alkalmaztunk (Systat software Inc., San Jose, California, USA).

A mérések során kapott adatok átlag és standard deviáció formájában lettek feltüntetve. Az adatok eloszlásának függvényében a csoporton belüli alaphoz viszonyított változások értékelésére ANOVA tesztet (Dunn- vagy Bonferroni módszer), valamint a csoportok közötti különbségek összehasonlítására Student féle t-tesztet vagy Mann-Whitney tesztet használtunk. Az eredményeket $p < 0,05$ mellett tekintettük szignifikánsnak.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Légzésszám, hőmérséklet

A légzésszám tekintetében nem mutatkozott szignifikáns különbség, bár mérsékelt emelkedést detektáltunk a Kontroll és az RIPC-24 csoportban a reperfusio ideje alatt.

A rectalis hőmérséklet közel azonos volt a különböző mérési időpontokban minden vizsgálati csoportban.

Az ischaemiás és nem ischaemiás májlebeny felszíni hőmérséklet értékeit elemezve megállapítható, hogy a nem ischaemiás májlebeny hőmérséklete emelkedett volt a Kontroll és az RIPC-1 csoportban a reperfusio végére (Kontroll vs. Alap $p=0,049$, RIPC-1 vs. Alap $p=0,012$). Az RIPC-24 csoport esetében az értékek nőttek a reperfusio 60. percére (RIPC-24 vs. Alap $p=0,002$). Összehasonlítva a különböző csoportok értékeit azonos mértékű változásokat találtunk. A reperfusio 60. percére szignifikáns különbség mutatkozott a Kontroll és az RIPC-24 csoport között ($p=0,032$ vs. Kontroll). Az ischaemiás és nem ischaemiás májlebeny adatai hasonlóak voltak és a megfigyelt változások is azonos mintázatot követtek a kísérlet időtartama alatt. Egy esetben szignifikáns eltérést regisztráltunk a Kontroll csoportban a reperfusio 30. percében ($p=0,015$ vs. Nem ischaemiás májlebeny).

4.2. Hemodinamikai paraméterek

A Kontroll csoportban a systolés vérnyomás értékek folyamatos csökkenést mutattak az ischaemia ideje alatt és a reperfusio 30. percére, majd a kiindulási értékekhez hasonló szintet értek el. A reperfusio 120. percére az értékek drámaian csökkentek, mely változás az alap értékekhez képest szignifikáns volt a Kontroll csoportban ($p=0,022$ vs. Alap). A systolés vérnyomás értékek mindkét preconditionált csoportban alacsonyabbak voltak a műtét kezdetén a Kontroll csoporthoz képest, majd mérsékelt csökkenés volt

megfigyelhető, azonban a reperfusio végére az értékek meghaladták a Kontroll csoportnál mért adatokat.

A szívfrekvencia változásai mérsékelt fluktuációt mutattak a Kontroll csoportban, az értékek szignifikánsan csökkentek az alap értékekhez viszonyítva ($p=0,045$ vs. Alap). Az RIPC-1 csoportban a szívfrekvencia csökkent a reperfusio 30. és 60. percére, majd a 120. percre ismét emelkedett. Az RIPC-24 csoportban megközelítőleg azonos szívfrekvencia értékeket mértünk a vizsgálati periódus alatt. Szignifikáns különbség azonban nem volt megfigyelhető.

4.3. Microcirculatio

Az ischaemiás májlebenyen mért BFU értékeket elemezve hasonló mintázatot figyeltünk meg a műtét kezdetén és az ischaemia végén minden csoportban. A reperfusio 30. percére az RIPC-24 csoportban az értékek szignifikánsan csökkentek ($p=0,021$ vs. Alap; $p=0,036$ vs. Kontroll). A reperfusio 120. percére a BFU értékek mérsékelten emelkedtek mindhárom kísérleti csoportban, de szignifikáns különbség nem volt.

A nem ischaemiás májlebeny BFU értékei nem mutatottak lényeges eltérést a Kontroll csoportban. Az RIPC-1 csoportban a BFU értékek mérsékelten emelkedtek az ischaemia végére, majd fokozatosan csökkentek a reperfusiós periódus végére, bár szignifikáns különbséget nem észleltünk. Az RIPC-24 csoportban a BFU paraméterek folyamatosan csökkentek a reperfusio 30. percéig ahol a különbség szignifikánsnak mutatkozott, mind az alap értékekhez, mind a Kontroll csoporthoz viszonyítva ($p=0,021$ vs. Alap; $p=0,036$ vs. Kontroll).

A Kontroll csoport esetében az ischaemiás májlebenynél mért BFU érték a nem ischaemiás májlebeny BFU szintjéhez viszonyítva szignifikánsan alacsonyabbnak mutatkozott a reperfusio 120. percében ($p=0,035$ vs. Nem ischaemiás májlebeny), az RIPC-1 csoportban pedig a reperfusio 60. percében

mértünk szignifikánsan alacsonyabb értékeket ($p=0,043$ vs. Nem ischaemiás májlebeny).

A vékonybél jejunum kacsának anti-mesenterialis szélén mért BFU paraméterek emelkedtek az ischaemiás periódus végére a Kontroll és az RIPC-24 csoportban, majd csökkentek a reperfusio ideje alatt, azonban szignifikáns különbség nem mutatkozott. A reperfusio 60. percében szignifikánsan alacsonyabb értéket mértünk az RIPC-1 csoportban a Kontroll csoporthoz képest ($p=0,038$ vs. Kontroll).

Az RIPC-1 és RIPC-24 csoport BFU értékeit összehasonlítva, a jobb vese mikrokeringésének monitorozása során az RIPC-1 csoportban magasabb értékeket regisztráltunk statisztikailag szignifikáns különbség nélkül. Az RIPC-24 csoport BFU értékeiben bekövetkezett változások szignifikánsak voltak az ischaemia 60. és a reperfusio 60. percében a Kontroll csoporthoz képest ($p=0,001$ vs. Kontroll I-60; $p=0,01$ vs. Kontroll R-60).

4.4. Laboratóriumi paraméterek

4.4.1. Sav-bázis paraméterek

A pH értékek vonatkozásában a megfigyelt reperfusiós periódusban minden csoportban mérsékelt változások mutatkoztak. Sem a csoportok közötti adatokban, sem az alap értékekhez viszonyított változásokban nem volt szignifikáns eltérés.

A vizsgált időszak végére a laktát koncentráció szignifikánsan nőtt a Kontroll és az RIPC-1 csoportokban (Kontroll: $p=0,01$; RIPC-1: $p=0,009$), bár a kísérleti csoportok között szignifikáns eltérés nem volt megfigyelhető. Ha a relatív értékeket, azaz az alaphoz viszonyított változás mértékét vizsgáljuk, úgy megállapítható, hogy az RIPC-1 csoportban magasabb értékek voltak megfigyelhetőek az RIPC-24 csoporthoz viszonyítva (Kontroll: $p=0,016$; RIPC-1: $p=0,002$; RIPC-24: $p=0,029$).

A reperfusio végére a pO_2 értékek mindhárom csoportban emelkedtek, bár szignifikáns eltérés nem volt megfigyelhető. A pCO_2 paraméterek minden vizsgálati csoportban csökkentek, szignifikáns változást mutatva a preconditionált csoportokban (RIPC-1: $p < 0,001$ vs. Alap; RIPC-24: $p < 0,001$ vs. Alap). Csoportok közötti összehasonlításban szignifikáns különbség nem volt.

4.4.2. Haematologiai paraméterek

A vörösvérsejtszám és a haematocrit (Htc [%]) értékek mérsékelt emelkedést mutattak a megfigyelt reperfúziós időszak ideje alatt a Kontroll és az RIPC-24 csoportban. Az RIPC-1 csoportban szignifikánsan alacsonyabb haematocrit értékeket mértünk a reperfusio 30. és 60. percében (RIPC-1: $p = 0,021$, $p = 0,039$). A műtétet megelőzően mért alap értékek tekintetében szignifikáns különbség mutatkozott a Kontroll és az RIPC-1 csoport között (RIPC-1: $p = 0,049$). Bár az eltérés mértéke nem volt szignifikáns, a haematocrit értékek folyamatos növekvő tendenciája volt megfigyelhető a követési periódusban a Kontroll csoportban.

4.4.3. Vörösvérsejt deformabilitás

Az elongációs index-nyírófeszültség görbéket elemezve megállapítható, hogy a vörösvérsejtek deformabilitási képessége javult az RIPC-1 csoportban, mivel az elongációs index értékek magasabbak voltak a reperfúziós periódus végére.

A 3 Pa-nál mért elongációs index értékek csökkenése szignifikáns volt a reperfusio 30. ($p = 0,031$ vs. Alap) és 120. ($p = 0,008$ vs. Alap) percére az RIPC-24 csoportban. Az értékek magasabbak voltak a reperfusio 30. perce után az RIPC-1 csoportban ($p = 0,041$ vs. Kontroll) és a reperfusio 60. percét követően az RIPC-24 csoportban ($p = 0,022$) a Kontroll csoporthoz viszonyítva.

A kalkulált paraméterek esetében az EI_{max} és $SS_{1/2}$ hányadosában ($EI_{max}/SS_{1/2}$) szignifikáns változás mutatkozott az RIPC-24 csoportban a reperfusio 30. és 120. percére ($p = 0,043$ vs. Alap; $p = 0,002$ vs. Alap).

4.4.4. Vörösvérsejt aggregatio

A Myrenne aggregometer segítségével négy vörösvérsejt aggregációs paraméter (M 5s, M1 5s, M 10s, M1 10s) került meghatározásra.

A Kontroll csoportban mérsékelt emelkedés volt megfigyelhető a reperfusio 30. és 60. percében, majd az aggregációs index paraméterek csökkentek a megfigyelt reperfúziós időszak végére.

Stasisnál az értékek csökkentek mindkét preconditionált csoportban a reperfusio ideje alatt, de érdekes módon az eredmények ellentétesek voltak az alacsony sebesség-grádiens mellett végzett mérési módban, ahol az aggregációs index értékek folyamatosan emelkedtek, legkifejezettebben az RIPC-24 csoportban.

A növekedés mértéke szignifikánsnak mutatkozott az RIPC-1 csoportban a reperfusio 30. (M1 5s: $p=0,011$ vs. Alap), 60. (M1 5s: $p<0,001$, M1 10s: $p=0,042$ vs. Alap) és 120. percében (M1 5s: $p=0,002$, M1 10s: $p<0,001$ vs. Alap).

Az aggregációs index értékek szignifikánsan alacsonyabbak voltak az RIPC-24 csoportban a Kontroll csoport értékeihez viszonyítva a műtét előtt (M 10s: $p=0,033$), valamint a reperfusio 30. (M 10s: $p=0,008$) és 60. (M5s: $p=0,031$) percében.

AZ RIPC-1 csoportban szignifikáns változásokat észleltünk a műtét kezdetén (M1 5s: $p=0,05$), R-60 (M 5s: $p=0,031$) és R-120 (M1 5s $p=0,048$) mérési időpontokban.

4.5. Szövetteni vizsgálatok

Jelen tanulmányban a következő szövetteni eltéréseket figyeltük meg ischaemia-reperfúziót követően: sinusoidalis congestio jelei, pericentralis desorganisatio, necrosis a pericentralis régióban, hepatocytá dilatatio, gyulladás

jelei, a centralis zónában a cytoplasma eosinophilabb és homogénebb volt. A hisztológiai változásokat számszerűsítve megállapítható, hogy az ischaemiás májlebeny szövettani metszeteiben mérsékelt sinusoidalis congestio, necrosis és a vizsgált minták 50%-ban enyhe vacuolisatio volt megfigyelhető a Kontroll csoport esetében.

Az RIPC-1 csoport metszeteit vizsgálva azt találtuk, hogy a szövetkárosodás mértéke kifejezettebb volt a Kontroll csoporthoz képest, hiszen a sinusoidok közvetlen közelében elhelyezkedő necrotizált hepatocyták száma magasabb volt, továbbá congestio és gyulladáisos sejtek jelenléte is igazolódott. Hasonló hisztopatológiai eltérések mutatkoztak az RIPC-24 csoportban, azonban a vacuolisatio mértéke erőteljesebb volt, és a Suzuki pontrendszer alapján kalkulált összpontszám is magasabb volt az RIPC-1 és Kontroll csoport értékeinél (Kontroll: $4,125 \pm 1,96$; RIPC-1: $5,83 \pm 1,6$; RIPC-24: $6,13 \pm 2,12$).

A megfigyelt morfológiai eltérések alapján az alkalmazott preconditionálási protokollok egyike sem mérsékelte az ischaemia-reperfusio okozta károsodás mértékét, melynek háttérében feltételezhetően az RIPC-24 csoportban az anaesthesia, és mindkét preconditionált csoportban az operáció előtt megkezdődött akut fázis reakció hatásai állhatnak.

5. FONTOSABB EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

1. Kialakítottunk egy olyan modellt, ahol a parciális máj ischaemia és reperfusio előtt alkalmazott távoli szervi ischaemiás preconditionálás hatásai jól vizsgálhatóak.
2. Az ischaemia-reperfusio hatására a hemodinamikai paraméterek stabilitása csökkent, a máj mikrokeringésében romlás mutatkozott, a laktát koncentrációban jelentős emelkedés volt megfigyelhető. Romlott a vörösvérsejt deformabilitás, a vörösvérsejt aggregációs index értékek egy kezdeti mérsékelt emelkedést követően csökkentek a kísérlet végére.
3. A preconditionált csoportokban a systolés vérnyomás és a szívfrekvencia ingadozása kisebb volt, mint a Kontroll csoport esetében, így kedvezően befolyásolhatja a kísérleti állatok hemodinamikai státuszát. Kimutattuk, hogy a mikrokeringési értékek a korai hatású távoli szervi ischaemiás preconditionált csoportban voltak magasabbak a reperfusio 60. percéig. A laktát koncentráció kisebb mértékben emelkedett a késői hatású távoli szervi ischaemiás preconditionált csoportban. A haemorheológiai paraméterek tekintetében a vörösvérsejt deformabilitásra kedvezőbb hatást gyakorolt a preconditionálást követő 1 órás várakozás. A vörösvérsejt aggregációs index mindkét preconditionált csoportban alacsonyabb volt a Kontroll csoporthoz viszonyítva.
4. A szövettani eredményeket elemezve megállapítható, hogy a hisztopatológiai eltérések kifejezettebbek voltak a preconditionált csoportokban. A kialakult

hisztológiai kép alapján nem egyértelmű, hogy a távoli szervi ischaemiás preconditionálás jótékony hatással rendelkezik-e a szövettani károsodás megelőzésében és csökkentésében.

A két különböző időben végzett távoli szervi ischaemiás preconditionálás kedvező hatásai eltérőek voltak a különböző vizsgált paraméterek esetén. További vizsgálatok szükségesek annak tisztázására, hogy melyik protokoll a kedvezőbb, és ez mennyi idővel előzze meg a tervezett szervi ischaemia-reperfusiót a máj vonatkozásában.

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/28/2019.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

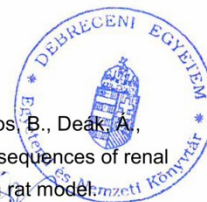
Jelölt: Magyar Zsuzsanna
Neptun kód: MHRDSL
Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10054040

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **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.
IF: 1.914 (2017)
2. **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: 0.933 (2017)

További közlemények

3. Mester, A., **Magyar, Z.**, Molnár, Á., Somogyi, V., Tánczos, B., Pető, K., Németh, N.: Age- and gender-related hemorheological alterations in intestinal ischemia-reperfusion in the rat. *J. Surg. Res.* 225, 68-75, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jss.2017.12.043>
IF: 2.051 (2017)
4. Pető, K., Németh, N., Mester, A., **Magyar, Z.**, Ghanem, S., Somogyi, V., Tánczos, B., Deák, Á., Bidiga, L., Frecska, E., Nemes, B. Á.: Hemorheological and metabolic consequences of renal ischemia-reperfusion and their modulation by N,N-dimethyltryptamine on a rat model.
Clin. Hemorheol. Microcirc. 70 (1), 107-117, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-170361>
IF: 1.914 (2017)





5. Mester, A., **Magyar, Z.**, Somogyi, V., Tánczos, B., Stark, Y., Cherniavsky, K., Bidiga, L., Pető, K., Németh, N.: Intestinal ischemia-reperfusion leads to early systemic micro-rheological and multiorgan microcirculatory alterations in the rat.
Clin. Hemorheol. Microcirc. 68 (1), 35-44, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-170278>
IF: 1.914 (2017)
6. **Magyar, Z.**, Molnár, Á., Nachmias, B. D., Mann, D., Somogyi, V., Mester, A., Pető, K., Németh, N.: Impact of groin flap ischemia-reperfusion on red blood cell micro-rheological parameters in a follow-up study on rats.
Clin. Hemorheol. Microcirc. [Epub ahead of print], 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-170277>
IF: 1.914
7. Németh, N., Kiss, F., **Magyar, Z.**, Miszti-Blasius, K., Furka, I.: Following-up hemorheological consequences of gonadectomy in male and female rats.
Clin. Hemorheol. Microcirc. 50 (4), 231-243, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-2011-1430>
8. Kiss, F., Sajtos, E., Mátyás, L., **Magyar, Z.**, Furka, I., Mikó, I., Németh, N.: Testing red blood cell deformability of laboratory animals by slit-flow ektacytometry in various viscosity media: inter-species and gender differences.
Korea-Aust. Rheol. J. 22 (2), 113-118, 2010.
IF: 0.948

A közzé tett folyóiratok összesített impakt faktora: 11,588

**A közzé tett folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
2,847**

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



Debrecen, 2019.02.14.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek Prof. Dr. Németh Norbert tanszékvezető Úrnak, aki még orvostanhallgatóként megismertette velem a kutatómunka szépségeit, megteremtette a kutatás lehetőségeit és feltételeit, szakmai útmutatásával, tanácsaival segítette munkámat.

Hálásan köszönöm Prof. Dr. Mikó Irénnek és Prof. Dr. Furka Istvánnak, hogy tanulhattam tőlük és sok éves szakmai tapasztalatukat megosztották velem.

Szeretnék köszönetet mondani munkatársamnak és barátnőmnek Dr. Mester Anita korábbi PhD hallgatónak, az együtt töltött felejthetetlen napokért, segítségéért, hasznos ötleteiért, támogató biztatásáért.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Somogyi Viktória tanársegéd Úrnőnek és Tánczos Bence PhD hallgatónak, akik időt és energiát nem kímélve nyújtottak fontos segítséget a laboratóriumi mérések során.

Köszönet illeti Dr. Pető Katalin egyetemi docens Úrnőt és Dr. Deák Ádám adjunktus Urat értékes tanácsaikért, észrevételeikért.

Köszönöm Dr. Mihai Oltean Tanár Úrnak (Göteborg, Svédország) a műtéti protokoll elsajátításában nyújtott segítségéért.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Bidiga Lászlónak (DE ÁOK Patológiai Intézet) a szövettani vizsgálatok kivitelezéséért és a hisztológiai elemzéséért.

Köszönettel tartozom Gödényné Szász Rozáliának a mikrosebészeti műtétek során nyújtott segítségéért.

Nagyon köszönöm a Sebészeti Műtéttani Tanszék valamennyi munkatársának a támogatást, a biztató kedves szavakat.

Hálás szívvel mondok köszönetet Édesanyámnak szeretetteljes támogatásáért, az eddigi tanulmányaimhoz nyújtott nyugodt háttér megteremtéséért, kitartó türelméért és biztatásáért.