

Doktori (PhD) értekezés tézisei

A RHEOPHERESIS KEZELÉS ANGIOLÓGIAI HATÁSAINAK TANULMÁNYOZÁSA HYPERVISCOSITÁSSAL SZÖVŐDŐ DIABETESES LÁB SYNDROMÁBAN

Dr. Gál Kristóf

Témavezető: Prof. Dr. Soltész Pál



DEBRECENI EGYETEM
Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2023

A RHEOPHERESIS KEZELÉS ANGIOLÓGIAI HATÁSAINAK
TANULMÁNYOZÁSA HYPERVISCOSITÁSSAL SZÖVŐDŐ
DIABETESES LÁB SYNDROMÁBAN

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a Klinikai Orvostudományok tudományágban

Írta: dr. Gál Kristóf okleveles orvosdoktor

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán doktori iskolája
(Kardiovaszkuláris megbetegedések programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Soltész Pál, az MTA doktora

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Antal-Szalmás Péter, az MTA doktora
Prof. Dr. Járai Zoltán, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Kiss Csongor, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Antal-Szalmás Péter, az MTA doktora
Prof. Dr. Járai Zoltán, PhD
Prof. Dr. Harangi Mariann, az MTA doktora
Dr. Nagy Gergely György, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” Épület előadóterme
2023. 07.05. 14:00

Bevezetés

A rheopheresis egy olyan extracorporalis, szelektív kettős kaszkádfiltráció alapján működő haematherápiás eljárás, amely során előzetes plazmaszeparációt követően a vérplazmát egy rheofilteren áramoltatják keresztül. A felhasznált rheofilter oly módon került kialakításra, hogy pórusain a 250-300 kDa-nál nagyobb fehérjék, illetve makromolekulák fennakadjanak. A kezelés során ennek köszönhetően lehetőség nyílik a vérviszkozitást fokozó, így a haemorheológiai státuszt kórosan megváltoztató plazmaalkotók vérplazmakoncentrációját jelentősen csökkenteni. A vizsgálataink során alkalmazott, poliszulfonból készült MONET filter, melyet a Fresenius Medical Care AG & Co. KGaA szabadalmaztatott, képes akár egyetlen kezelés alkalmával eltávolítani a vérben keringő LDL koncentrációját 70%-kal, a koleszterin és fibrinogén koncentrációját 50%-kal, a triglicerid szintjét 35-40%-kal csökkenteni. Mindezek mellett a kezelés képes eltávolítani a keringésből az α -2-makroglobulin, von Willebrand-faktor és a cirkuláló IgM jelentős hányadát is. A kezelés fontos és hasznos tulajdonsága, hogy az atherosclerosis elleni protektív hatással bíró HDL, a fontos transzportfunkciót betöltő és a normál kolloidozmotikus nyomás fenntartásáért felelős albumin és a total protein szintje is elhanyagolható mértékben változik a kezelés hatására.

Az American Society for Apheresis a kezelést jelenleg két betegség terápiájában javasolja, melyek az időskori száraz macula degeneratio és a sensorineuralis hallásvesztés. A rheopheresis kezelés Magyarországon elsőként DEKK Belgyógyászati Intézet „C” Épület Intenzív Osztály és Terápiás Aferezis Részlegének együttműködésében került alkalmazásra, az első kezelések indikációja időskori száraz macula degeneratio volt. Az új terápiás modalitás klinikai eredményei arra engedtek következtetni, hogy a kezelés más microcirculatiót érintő megbetegedésekben is alkalmazható, ha azok hyperviscositással társulnak, így etikai engedély birtokában (IVU/10026-4/2020EKU, ETT-TUKEB) a kezelés bevezetésre került diabetes indukált,

hyperviscositással társuló, microcirculatio károsodásból fakadó alsó végtagi ulcusok és diabeteses polyneuropathia terápiájában is.

A diabeteses láb syndroma felöleli mindazokat az alsó végtagi tüneteket, amelyek a diabetes mellitus szövődményeként megjelenhetnek. A macro- és microvascularis károsodásból fakadóan megjelenhetnek bőr- és körömváltozások, megváltozhat a láb statikája, alsó végtagi fekélyek és súlyos idegbántalom alakulhatnak ki. Ezen kóros eltérések egymást fokozva súlyosbítják a diabeteses láb syndromáját. A kórkép kialakulásában és minden tünet megjelenésében esszenciális szerepe van a microcirculatio károsodásának, vagyis az 500 μm -nél kisebb átmérővel rendelkező apró erek, a prekapillaris arteriolák és a capillarisok érdestrukciójának. A károsodás hátterében az intracelluláris hyperglycaemia miatt felborult mitokondriális folyamatok és az így keletkezett igen jelentős reaktív oxigéngyök felszabadulás áll. A felszabaduló szuperoxid a glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) enzim gátlásán keresztül összes 4 alternatív anyagcsere útvonalat aktivál: a poliol útvonalat, a fehérjék nem-enzimatikus glikációját, a hexózamin útvonalat, és a protein kináz C útvonalat. Ezen mechanizmusok során rendkívül nagymennyiségű szabadgyök képződik, ami igen jelentős intracelluláris oxidatív stresszt jelent az sejtek számára. A kóros prooxidáns folyamatok hatására károsodik az extracelluláris mátrix, megváltozik a haemorheológiai és antioxidáns státusz, fokozódik a káros vascularis mediátorok termelődése, subclínicus gyulladás indukálódik.

A károsodásra egyik legérzékenyebb sejtípus az ereket bélelő endothel sejtréteg. Az idegeket ellátó érhálózat, a vasa nervorum károsodásának és direkt neuronpusztulásnak az eredményeként alakul ki a diabeteses polyneuropathia. A legtöbb neuropathiás beteg kezdetben súlyos, gyakran tűrhetetlen fájdalmat tapasztal, amely a neuronok fokozatos pusztulásával fokozatosan elmarad, a fájdalom helyét zokni-szerűen a lábujjaktól kezdődő érzészavar veszi át. A szenoros károsodás eredményeként hamar izomatrophia alakul ki, mozgás-, tapintás-, és vibrációérzés, a lábfej haránt és hosszanti boltozata így kórosan megváltozik, létrejönnek a diabeteses

alsó végtagi fekélyeknek kedvező alsó végtagi kóros nyomáspontok. A neuropathia miatt a betegek a túlterhelt végtagon megjelenő sérülésekről gyakran sokáig nem vesznek tudomást, a folyamatos talpi nyomás és a stenoticus keringés hatására a fekély gyógyulni képtelen, a magas vércukorszint, az immunológiai abnormalitások, a lymphocita funkció zavarai pedig mind kiváló táptalajt biztosít a fekély elfertőződésének. Az alsó végtagon megjelenő fekélyek rendkívül gyakran vezetnek elkerülhetetlen alsó végtagi amputációhoz. A nem-traumás végtag amputációk közel 85%-át előzi meg az alsó végtag fekélyes elváltozása. Igen gyakran szükséges reamputáció és a betegek ötéves mortalitása is eléri a 39-65%-ot.

A diabeteses láb syndroma komplexitása miatt a kezelése során interdiszciplináris szemléletre van szükség és minden kínálkozó alkalmat szükséges megragadni a diabetesből fakadó alsó végtagi amputációk számának csökkentése érdekében. A magas mortalitás, a költséges egészségügyi kiadások, a hosszú kórházi kezelés, a jelentős életminőség romlás komoly terhet jelent mind a beteg páciens, mind a társadalom szintjén, amelyek indokolják a rheopheresis és hozzá hasonló terápiás alternatívák széleskörű kutatását.

Célkitűzés

I. Célunk volt, hogy a rheopheresis kezelés haemorheológiai státuszt helyreállító, microcirculatiót javító funkcióját a diabeteses láb syndroma azon eseteiben is igazoljuk, amelyek macrovascularis helyreállítást nem igényeltek, vagy intervenciós radiológiai, illetve érsebészeti revascularisatióra már nincs lehetőség, vagy neuropathia a domináló tünet. A kórkép különböző tüneteiben a közös kórok a hyperviscositás, ami károsodást fokozó tényezőként megjelenik.

II. Felállítani egy *in vitro* modellt, amelyen a diabetes mellitus endothelialis károsodást okozó hatásait monitorozni tudjuk az inflammáció és prooxidáns hatások tekintetében,

ezáltal olyan biokémiai markereket határozzunk meg, melyek az *in vivo* vizsgálatokban objektíven leírják a rheopheresis hatásait.

III. A meghatározott inflammatorikus citokinek vizsgálata a rheopheresis kezelés függvényében, a kezelés antiinflammatorikus hatásainak igazolása érdekében

IV. Komplettsztein pool analízis, mellyel igazolható a glutation háztartás jótékony irányú változása a rheopheresis kezelés hatására.

Anyagok és módszerek

Klinikai vizsgálatok

A betegek komplett angiológiai kivizsgálása során a tanulmányba való beválasztási kritériumok kivizsgálása érdekében minden beteg esetében meghatározásra került mindkét oldali Boka-Kar index, továbbá amennyiben indokolt volt, alsó végtagi artériás és vénás Color-Doppler vizsgálatot is végeztünk. Ezek során meghatározásra kerültek az alsó végtag artériáinak áramlási viszonyai, az áramlások sebessége. Analizáltuk továbbá az áramlási görbéket és vizsgáltuk az érlument szűkítő meszes plakkokat. A vénás ultrahang vizsgálatok célja a panaszok hátterében etiológiai faktorként esetlegesen fennálló felszínes vénás elégtelenség kizárása volt. Ennek érdekében áttekintésre került a felszínes vénás hálózat, kizárásra került a saphenofemorális reflux, illetve az elégtelenül működő perforátor vénák jelenléte. A vizsgálatokat Philips CX 50 ultrahang berendezés 5-10 MHz-es lineáris vascularis transducerét használtuk.

A neuropathiás panaszokkal érkező pácienseket ENG vizsgálatnak vetettük alá, ahol komplett képet kaptunk az alsó végtag idegeinek neurológiai státuszáról. Az ENG vizsgálatot minden esetben klinikai neurofiziológus végezte 9031A006401 Keypoint Clinical System segítségével.

Mindezek mellett általános (vérkép, vesefunkció) és immunológiai (Anti-béta-2-glikoprotein-I antitestek, anti-cardiolipin antitestek, Lupus antikoagulánsok, kriglobulin ellenes antitestek, anti-neutrofil citoplazmatikus antitestek) laborvizsgálatokat végeztünk. Megvizsgáltuk továbbá a vércukor- (HgbA1C) és lipidprofil (triglicerid, koleszterin, HDL-C, LDL-C).

A rheopheresis és a hyperviscositás

A terápia bevezetése óta 23 betegen alkalmaztuk a rheopheresist. 10 betegnek volt diabetes alsó végtagi fekélye, 10 beteg szenvedett diabeteses polyneuropathiától, 4 páciens esetében mindkét kórkép egyszerre fennállt, 3 beteg szenvedett macrovascularis helyreállításra alkalmatlan perifériás artériás érbetegségben, illetve az összes beteg esetén fennállt a hyperviscositas. A hyperviscositas diagnosztizálása a teljes vér és plazma viszkozitásának meghatározásával történt, melyet a DE Sebészeti Műtéttani Tanszéken történt. A vizsgálatok Hevimet-40 viscometer (Hemorex International Kft., Budapest, Magyarország) segítségével, capillaris viscosimetria módszerével történt. A vér viscositásának meghatározásánál 40%-os hematokritra is történt korrekció a Mátrai formula segítségével.

A betegek két egymást követő napon részesültek rheopheresis kezelésben, minden kezelés előtt fiziológiás sóoldatos infundálást követően. A betegek két perifériás vénáját kanüláltuk, majd az Art Universal rendszer segítségével elkülönítettük a vérplazmát az alakos elemektől. Az elkülönített vérplazma a MONET (Membrane filtration Optimised Novel Extracorporeal Treatment) (Fresenius SE and Co. KGaA, Bad Homburg vor der Höhe, Németország) filtert tartalmazó oszlopon áramolt keresztül, majd az alakos elemekkel együtt a perifériás vénakanül segítségével került vissza a páciensek keringésébe. A filtrálandó plazma mennyiségi meghatározásához a 40 ml/testsúlykilogrammos szabályt használtuk. Antikoagulánsként citrátot alkalmaztunk.

In vitro sejttényeszet:

A diabetes mellitus kóros hatásainak modellezése HUVEC sejtkultúrán történt, etikai engedély birtokában (RKEB/IKEB 317-2012). Ehhez vena umbilicalist kanuláltunk, vértelenítettük, majd töltöttünk fel kollagenáz oldattal. 37 °C-on inkubáltuk 20 percig, majd 8 perces centrifugálás után a felülúszót leszívtuk, a sejteket pedig M199 médiumban szuszpendáltuk. 0,5%-os zselatinoldattal 4-8 óráig inkubáltuk a sejttenyésztő flaskskákat, melyekre a sejteket szélesztettük a letapadáshoz. A tenyésztéshez folyamatos, 37 °C-os hőmérsékletet és 5%-os CO² atmoszférát biztosítottunk a sejtek tenyésztéséhez egy Galaxy 170 R inkubátor (Eppendorf, Hamburg, Németország) segítségével. Miután a konfluencia elérte a minimum 80%-ot, a sejteket kétszeres alapterületre passzáltuk. A letapadást megszüntettük tripszin-EDTA oldattal (Biosera, Nuaille, Franciaország) szüntettük, majd leállítottuk a reakciót M11 médiummal. Centrifugálást követően végső soron újabb szélesztés történt. A sejttenyésztést követően egy alkalommal Flow cytometriás analízist végeztünk fenotipizálás céljából, mely során az azonosításhoz az endothel sejteket megjelöltük fluorofórral konjugált egér monoklonális antitestekkel. Az analízis a sejtek 97%-át azonosította endothel sejtként. A sejteket ezután 24 órán keresztül 30 mM/L koncentrációjú glükózoldattal kezeltük, az intravasculáris hyperglycaemia szimulálásának érdekében.

Génexpressziós vizsgálatok a HUVEC modellen

A hyperglycaemiás szimulálást követően meghatározásra került az Il-6, Il-8, TNF-alfa, az endothelin konvertáz enzim, ET-1, illetve NO szintáz génexpresszió szintje, melyet kontroll csoporttal hasonlítottunk össze. Ehhez a sejteket feltárva, qRT-PCR analízist végeztünk. Reverz transzkriptázzal (LunaScript RT SuperMix kit-PCR Biosystems, London, UK) cDNS-t alkottunk, majd a TaqMan polimerázos hasítást követően a reporter molekulának fluoreszcenciáját detektáltuk, ezzel meghatározva a detektálási küszöbértékhez a ciklusszámot (Luna Universal Probe qPCR Master Mix -

PCR Biosystems, London, UK). Háztartási génként GAPDH-t alkalmaztunk. A relatív génexpressziós változás LIVAK módszerrel történt.

ROS felszabadulás vizsgálta HUVEC modellen

A reaktív oxigéngyögyök felszabadulását DCFDA festéssel (2',7'-dichlorofluorescein diacetát) vizsgáltuk (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Ehhez a sejteket 6 percig inkubáltuk 100 microMol-os festékoldattal, majd mértük a fluoreszcencia intenzitását (excitation = 485 nm, emission = 530 nm). Ehhez Clariostar microplate readert használtunk (BMG Labtech, Ortenberg, Németország). Az eredményeket itt is kontroll csoporthoz hasonlítva értékeltük.

Antioxidáns státusz vizsgálata HUVEC modellen

Meghatározásra került az endothel sejtek intracelluláris glutation koncentrációja is, melyet Glutathione Assay Kittel végeztünk (Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA). A glükóz oldattal való kezelés során a 0, 6, 12, 24, 48, végül 96 óra elteltével a sejteket feltártuk, majd deproteinálást követően vizsgáltuk a sejtek intracelluláris glutation koncentrációját, kontroll csoporttal összehasonlítva. A vizsgálat során 414 nm-en került meghatározásra a minta spektrofotometriás abszorbancia spektruma.

Gyulladásos markerek vizsgálata a rheopheresis kezelés függvényében

A betegektől kezelések előtt és után vett vérmintákból meghatároztuk a vérplazma IL-6, IL-8, és TNF- α koncentrációit. Ehhez a K-3 EDTA véralvadástgátlót tartalmazó steril vakuténerekbe levett mintákat 15 percig centrifugáltuk 3000 RPM-en, 4 °C majd dupla sandwich ELISA technikát alkalmaztunk. Ehhez az Abcam ELISA Kitjeit alkalmaztuk (Abcam PLC, Cambridge, UK). A mérés során standard-et állítottunk be, majd minden wellbe 100 μ L standard oldat és szérumminta került. A plate kétszeres lemosását követően a biotinizált humán antitestek hozzáadása történt

(100 μ L). 37 °C-on, 60 perces inkubálást követően háromszori lemosás történt. Az enzim-konjugált folyadékot a megfelelő wellékhez adtuk, majd a plate ötszöri lemosását végeztük el. 100 μ L Colour Regaent hozzáadását követően a mintát 37 °C-on, 14 percig inkubáltuk, majd 100 μ L Colour Reagent C wellékhez adását követően 450 nm-en mértük a színreakciót spektrofotométerrel. A vizsgálat során a mintákat 5x és 10x hígítás után vizsgáltuk. Az Il-6 teszt szenzitivitása 4,7 pg/mL, az Il-8 teszt szenzitivitása 1,8 pg/mL, míg a TNF- α szenzitivitása 4,32 pg/mL volt.

Vasoaktív komponenek vizsgálata a rheopheresis kezelés függvényében

A vizsgálat során meghatározásra kerültek az Endothelin-1 és tromboxán B2 vérplazma koncentrációi is a kezelések előtt és kezelések után. Mindkét esetben az Abcam (Abcam PLC, Cambridge, UK) releváns ELISA Kit-jeit használtuk, az Endothelin-1 esetében az ab133030, míg a tromboxán B2 esetében az ab133022 kódjelűt. A gyártó ajánlásait követve hígítási sort hoztunk létre, ötszöri lemosást végeztünk. Az Endothelin-1 vizsgálata esetén a mintákhoz 100 microliter endothelin-1 antitestet adva inkubáltuk azokat 30 percig. Ezt követően TMB szubsztrát oldatot adtunk hozzájuk és újabb 30 perces inkubálási időt követően 450 nm-en mértük az abszorbanciát. A tromboxán B2 esetében 5 microliter TXB2 Alkaline Phosphatase Conjugatum, majd 200 microliter pNpp szubsztrátot adtunk a mintákhoz, majd 45 perces szobahős inkubáció után, a STOP oldat hozzáadását követően 405 nm-en vizsgáltuk az abszorbanciát.

Vörösvértestek SOD enzim aktivitásának változása a rheopheresis kezelés függvényében

A meghatározáshoz Photochem berendezést és ACW Kitet (Analytik Jena, Jena, Németország) használtunk. 10 microliter vörösvértesthez 1.5 ml reagens 1-et, 1 ml reagens 2-t és 25 microliter reagens 3-at adtunk, a gyártó ajánlása szerint.

Standardként SOD enzimet (Superoxid Dismutase, Sigma Aldrich, Németország) használtunk.

Vérplazma glutation pooljának változása a rheopheresis kezelés függvényében

A vizsgálathoz a mintákat Fu és mtsai. által kidolgozott módszer alapján végeztük. Ennek érdekében cisztein, homocisztein, ciszteinil-glicin, γ -glutamil-cisztein, cisztin, illetve glutation standard keverékeket (168149 -25 mg, 69453-1016 mg, G0903 – 25 mg) C8630-1g, PHR1359-500 mg, Merck Life Science Kft., Magyarország) készítettük el, 10 μ g/ ml koncentrációra. 150 μ l standardhez ezután 300 μ l N-etil-maleimid oldatot (cc:100 μ g/ml), 1020 μ l vizet és 30 μ L hangyasavoldatot (0.01% V/V) adtunk. 30 perces termosztálást követően hét 0.1, 1, 5, 10, 25, 50 és 100 ng/ml koncentrációjú standard oldatot készítettünk. A méréseket ezután Dionex Ultimate 3000 RS UHPLC rendszerrel (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA), valamint egy Thermo Q Exactive Orbitrap hibrid tömegspektrométerrel végeztünk, amely egy Acclaim Mixed-Mode HILIC-1 (2,1 x 150 mm) analitikai oszloppal volt felszerelve. Az áramlási sebesség 0,3 ml/perc értéken zajlott. Az oszlopkolonna és az oszlophűtő sebessége 25 Celcius-fokra került beállításra. A mintákat ugyanilyen hőmérsékleten termosztáltuk. A mozgó fázis vízből (A), illetve metanolból (B) állt, amelyeket 0,1%-os hangyasavval savasítottunk. A gradiens program a következő volt: 0-1 perc, 95% A; 1-6 perc, $\rightarrow$ 0% A; 6-10 perc, 0% A; 10-10,5 perc, $\rightarrow$ 95% A; 10,5-20 perc, 95% A. Az injekció térfogata 5 μ l volt. A Thermo Q Exactive Orbitrap hibrid tömegspektrométer (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) HESI forrással volt felszerelve. A mintákat pozitív ion módban, Selected Ion Monitoring (SIM) technikával mértük a következő felvételi listával ([M + H]⁺): Cisztein-NEM (C₉H₁₅N₂O₄S): 247,07525, N-acetilcisztein-NEM (C₁₁H₁₇N₂O₅S): 282,08. Homocysteine-NEM (C₁₁H₁₇N₂O₅S): 261.09090, Cysteinylglycine-NEM (C₁₁H₁₈N₃O₅S): 304.09672, γ -Glutamylcysteine-NEM (C₁₄H₂₂N₃O₇S): 376.11785, Cystine (C₆H₁₃N₂O₄S₂): 241.03167, Glutathione-NEM (C₁₆H₂₅N₄O₈S): 433.13931, Glutathione disulfide (C₂₀H₃₃N₆O₁₂S₂): 613,15979. A kapilláris hőmérsékletet 320 °C-ra állítottuk be, és a permetezési feszültséget 4,0 kV-

ra állítottuk be. Felbontás: 35.000. A köpenygáz áramlási sebessége és a segédgáz áramlási sebessége 32 AU, illetve 7 AU volt. A mért és számított monoizotópos molekulatömegek közötti különbség minden esetben kisebb volt, mint 5 ppm. Az adatokat Thermo Xcalibur 4.0 szoftverrel (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) nyertük és dolgoztuk fel.

Statisztikai analízisek

A gyulladáshoz kapcsolódó markerek vizsgálatánál korlátozott statisztikaként a kezelés előtti és kezelés utáni értékeket páros t-teszt/Wilcoxon teszttel vizsgáltuk, $<0,05$ p-értéket tekintettünk szignifikánsnak. Az in vitro eredmények, az endothelin-1, tromboxán B2 plazmakoncentrációk statisztikai analízise során az adatokat három kísérlet átlagaként $\pm$ SEM fejeztük ki. Többszörös összehasonlításhoz végeztünk statisztikai elemzést, az eredményeket ANOVA-val, majd az ismételt mérésekhez Bonferroni-módszere szerint elemeztük. A szignifikancia küszöbértéke $p < 0,05$ volt. Az IL-6, IL-8, TNF- α , ET-1, TXB2, SOD enzimaktivitás kezelés előtti és kezelés utáni értékeit Wilcoxon rang-összeg nem-paraméteres tesztekkel is összevetettük. A statisztikailag szignifikáns küszöbértéke szintén $p < 0,05$ volt. A teljes vér és plazmaviscositás, illetve tiolos komponensek statisztikai analízise során Kruskal-Wallis és Wilcoxon tesztek alkalmaztak. A Shapiro-Wilk tesztet használtunk annak meghatározására, hogy a mért értékek normális eloszlásúak-e. Normál eloszlás esetén Welch t-próbáját alkalmaztuk a statisztikai szignifikancia tesztelésére. Egyébként Kruskal-Wallis és Wilcoxon rang-összeg nem-paraméteres tesztek alkalmaztak. A p értékeket a Benjamini-Hochberg módszerrel korrigáltuk. A szignifikancia küszöbértéket $p < 0,05$ -re állítottuk be.

Eredmények

Klinikai eredmények a diabeteses láb syndroma Rheopheresis kezelésével

A kezelések hatására a betegek teljes vér és plazma viszkozitása normál, vagy közel normál tartományba került. Az alsó végtagi fekélyek nélküli polyneuropathias betegcsoportot tekintve elmondható, hogy a rheopheresis kezelés hatására a páciensek szubjektív panaszai egyetlen esettől eltekintve jelentősen mérséklődtek. Olyan páciensek részesültek Rheopheresis kezelésben, akiknél az alkalmazott gyógyszeres terápia ellenére (gabapentin, illetve pregabalin) a panaszok nem, vagy nem kellő mértékben csökkentek. Az agresszív fájdalomcsillapítás ellenére a páciensek igen súlyos szúró, zsibbadó, égő fájdalomra panaszkodtak, amely több esetben is már egyetlen rheopheresis kezelés hatására csökkent, így a páciensek fájdalomcsillapító igénye is mérséklődött. A szubjektív panaszcsökkenést az elvégzett ENG vizsgálatok is alátámasztották. A kezeléseket követő ENG vizsgálatok összehasonlításra kerültek a kezelést megelőző vizsgálatokkal, ezek során megnövekedett amplitúdó és javuló vezetési sebességek igazolták a kezelés hatásosságát. Két páciens esetében javultak a motoros rostok amplitúdói, átlagosan 0,8 mV-tal, három páciensnél volt kimutatható a sensoros rostok javulása, ezekben az esetekben a vezetési amplitúdó átlagosan 2,06 μ V-tal növekedett. Egy esetben növekedett a sensoros rostok vezetési sebessége, mintegy 17,3 m/s-mal, ez 48,3%-os növekedést jelentett. Egy esetben a páciens panaszai nem mérséklődtek, a kezelést követő ENG nem mutatott változást. Az alsó végtagi fekélyektől szenvedő betegekről elmondható, hogy átlagosan 2 kezelést követően, a korábban gyógyhajlamos nem mutató láb és lábszárfekélyek szanálódni kezdtek. 10 esetben értünk el részleges, vagy teljes gyógyulást. Három esetben ugyan nem tudtuk elkerülni a páciensek részleges alsó végtagi amputációját, azonban mindkét esetben a betegek rossz compliance-e okozta a problémát, a kezeléssel kezdetben sikereket értünk el.

In vitro vizsgálatok eredményei

Az in vitro vizsgálatok eredményei alapján elmondható, hogy a 24 órán tartó 30 mmol/L koncentrációjú glükózoldattal való inkubáció szignifikánsan fokozza az endothel sejtek IL-6, IL-8, illetve TNF- α expresszióját. Kijelenthető továbbá, hogy mind az endothelin-1, mind az endothelin konvertáló enzim intracelluláris mRNS szintje is szignifikánsan fokozódott, míg a NO szintáz enzim expresszióját szignifikánsan gátolta az extrém hyperglycaemia. A 24 órás kezelés hatására a sejtek intracelluláris ROS gyök termelése szignifikánsan fokozódott. Az endothel sejtek redukált glutation koncentrációjának változásait vizsgálva elmondható, hogy a hyperglycaemia hatására a sejtekben mérhető intracelluláris glutation koncentrációja jelentősen csökken. Az idő függvényében vizsgálva elmondható, hogy az első 24 órában az extrém magas glükóz koncentrációjú minták és a kontroll csoport mintáit összehasonlítva, a redukált glutation koncentrációiban mérhető különbség fokozatosan növekszik, míg a 24. órától kezdődően, miután a hyperglycaemiát megszüntettük, a különbség fokozatosan csökkenni kezdett, habár így is is jelentős maradt.

Rheopheresis kezelés hatásai a gyulladásos citokinekre és vazoaktív anyagokra

A rheopheresis kezelés hatására a betegek vérplazmájában mérhető gyulladásos citokin koncentrációk jelentős csökkenést mutattak. Az IL-6 vérplazmában mérhető értéke a kezeléseket követően átlagosan 44,35%-kal csökkent, a Rheopheresiseket megelőző értékekhez képest (19. ábra). A változás 5 beteg esetén volt szignifikáns. A kezelés előtti és utáni vérplazmakoncentrációkat Wilcoxon párosított próbával összevetve a különbség szignifikáns ($p=0,02$). Az IL-8 vérplazma szintje 5 esetben szignifikánsan mértékben lecsökkent, átlagosan 61,76%-kal a Rheopheresis hatására (20. ábra.). Az elvégzett Wilcoxon teszt alapján a különbség szignifikáns ($p=0,0022$). A TNF- α extrém mértékben, átlagosan 78,56%-kal csökkent a kezelése hatására. A csökkenés minden esetben szignifikáns volt (21. ábra). Az elvégzett Wilcoxon rangösszegű nem-paraméteres teszt alapján a különbség szignifikáns

($p=0,022$). Az endothelin-1 plazmakoncentrációit mérve 7 betegből 6 esetén találtunk szignifikáns csökkenést a kezeléseket követően, míg a tromboxán B2 esetében mind a 7 betegnél kismértékű, de statisztikailag szignifikáns csökkenést tapasztaltunk.

Rheopheresis kezelés hatásai a SOD enzim aktivitására, illetve a total thiol és diszulfid komponensek szérum szintjeire

A SOD enzim aktivitásának mérése során ugyan 7 páciensből 5 esetében nagymértékű csökkenést tapasztaltunk (átlagosan 18,06%-s értékkel), azonban a 2. számú betegünk esetén 16%-os növekedést, míg 3. számú betegünk enzimaktivitása közel azonos mértékű volt (3,13%-os növekedés), így ezen vizsgálati eredményeinket nem értékeltük egyértelműnek. A thiolos komponensek vizsgálatával komplexen leírhatóvá vált a glutation háztartásban résztvevő prekursorok szérum szintjeinek változása. Elmondható, hogy a kezelés hatására a cisztein teljes ($p=0,04$) és fehérjéhez kötött ($p=0,044$) formái szignifikánsan csökkentek, míg a gamma-glutamil-cisztein szabad formája szignifikánsan növekedett ($p=0,044$). A szabad homocisztein tartalom is csökkenést mutatott. A cisztin és ciszteinil-glicin vérplazma koncentrációiban egy beteget kivéve egymáshoz viszonyított fordított arányosság fedezhető fel.

Megbeszélés

A diabetes mellitus rohamosan növekvő prevalenciája, a szövődmények súlyossága, azok komplexitása mind indokoltá teszik az új terápiás alternatívák bevezetését a klinikumba. A kutatócsoportunk által elvégzett klinikai és laboratóriumi eredmények igazolják, hogy a rheopheresis, mint extracorporalis haematherápia számos hasznos funkcióval bír a diabeteses láb syndromában megjelenő, mikrocirkulációs károsodásból fakadó alsó végtagi tünetek terápiájában. Kutatásaink első időszakában a klinikai vizsgálatokra összpontosítottunk. Ezek alapján elmondható, hogy a diabetes mellitushoz társuló hyperviscositás a meglévő alsó végtagi fekélyek gyógyhajlamát jelentősen rontja, míg a polyneuropathia tüneteit és azok súlyosságát

fokozza. A rheopheresis kezelés a teljes vér és plazmaviszkozitás normalizálásával képes javítani a mikorcirkulációt, melyet a korábban gyógyhajlamot nem mutató fekélyek szanálódása és az idegi funkciók javulása igazol. A neuropathiás páciensek szubjektív fájdalomérzete csökkent, az elvégzett ENG vizsgálatok pedig objektíven is igazolták a rheopheresis jótékony hatásait. A doktori értekezésben kevés szó esik a kezelés tartósságáról. A 2019-ben kirobbant COVID-19 világjárvány, és az ekkor bevezetett kizárólagos sürgősségi szakellátás jelentősen megnehezítette a betegeink ambuláns utógondozását, így jelen munkában csupán általánosságok megfogalmazhatók. Eddigi tapasztalataink szerint, az elvégzett rheopheresisek hyperviscositást csökkentő hatása 3-6 hónapig marad tartós a kezeléseket követően. A hatékonyság fokozása érdekében szükséges a páciensek szoros együttműködése, a szigorú diétás megkötések, a gyógyszeres terápia betartása. Fekélyes páciensek esetében elengedhetetlen a megfelelő rendszeres sebtörlés és az ortézises tehermentesítés. Mindezt összefoglalva azonban klinikai eredményeink alapján a kezelés messze túlmutatott a viszkozitási paraméterek normalizálásán, így vizsgálatainkat a diabetes indukálta endothelialis inflammáció és annak rheopheresissel történő kezelésére irányítottuk. Az ehhez szükséges in vitro HUVEC sejtmoldellen komplexen igazoltuk a hyperglycaemia gyulladást indukáló, vascularis mediator termelődést és antioxidáns státuszt kórosan megváltoztató hatásait. Habár az irodalomban ezen megállapítások már leírásra kerültek, elengedhetetlennek tartottuk a kóros folyamatok vizsgálatát egyetlen, complex modellen, ahol a folyamatok egymással összefüggésben vizsgálhatók. Tekintve, hogy a páciensek esetén az endothel sejtek közvetlenül nem vizsgálhatók, a szimulációval meghatározott biokémiai markerek monitorozhatóvá tették a kezelést. Kiemelendő, hogy a vizsgálat során a fehérjekoncentráció helyett génexpressziós változásokat végeztünk, melynek célja a diabetes hosszútávú károsító hatásainak feltárása volt. Ezek alapján a hyperglycaemia igen jelentős oxidatív stresszt jelent az endothel sejtek számára, jelentős inflammatív hatással bír, károsítja az antioxidáns rendszert. A gyulladáshoz citokinek szerepéről sok tanulmány született. A rheopheresisek előtt és után elvégzett vérplazma koncentráció

meghatározások alapján elmondható, hogy a kezelések szignifikánsan képesek csökkenteni az Il-6, Il-8 és TNF-alpha mennyiségét a vérben. Ezen citokinek molekulásúlya jóval kisebb tartományban mozog, mint amelyet az alkalmazott MONET filter szűrni tud, így elviekben a citokinek közvetlen filtrációja nem lehetséges. Azonban az inflammaotrikus citokinek érpályán belüli szállítása transportfehérjékkel történik, mint amilyen az alpha-2-macroglobulin is. Ennek molekulásúlya már kellően nagy ahhoz, hogy a filter pórusain képtelen legyen áthaladni. A vascularis mediatorok vizsgálata alapján a vasoconstrictor hatással bíró endothelin-1 és prothromboticus aktivitást jelző tromboxán B2 koncentrációját szintén képes jelentősen redukálni a rheopheresis, ami további jótékony hatásait indukálja. Az antioxidáns vizsgálatokat összegezve elmondható, hogy a SOD eznim aktivitásának mérése nem hozott szignifikáns eredményt, így részletesebb vizsgálatra volt szükség. A redukált glutation, mely a glutation peroxidáz kofaktoraként az egyik legjelentősebb antioxidáns tulajdonsággal bíró tripeptid funkcióját csak intracellulárisa képes ellátni, kényes egyensúlyt alkotva. Vérvizsgálataink azonban nem tették lehetővé a redukált glutation közvetlen mérését, így a teljes glutation ciklust és annak legfontosabb intermediereinek és prekursorainak feltérképezése volt feladatunk. Vizsgálataink eredményei alapján a rheopheresis filtrációs hatásainak köszönhetően a glutation ciklus egyértelműen a redukált glutation szintézisének irányába tolódik. Ezt igazolja a vérben szignifikánsan csökkent instabil és szabadgyökképző cisztein teljes mennyisége és fehérjéhez kötött formája. A kezelés mérsékli továbbá a hyperhomocysteinaemiát, mely az atherosclerosis egyik legismertebb független kofaktora. Ezzel szemben a szabad gamma-glutamil-cisztein, mely önmagában is antioxidáns tulajdonsággal bír, továbbá a redukált glutation egyik közvetlen prekursora szignifikáns növekedést mutatott. A vizsgálati eredmények alapján kijelenthető, hogy a rheopheresis képes szignifikánsan csökkenteni a vérben keringő kóros gyulladásoos citokinek, a vasoconstrictor, illetve prothromboticus hatású vascularis mediatorok koncentrációját. Az antioxidáns státuszban betöltött jótékony hatásását a glutation pool extracelluláris prekursor koncentrációinak változása bizonyítja. A kezelés hatására ezen prekursorok

koncentrációiban olyan változások mentek végbe, melyek az antioxidáns státusz javulását indukálják.

Az értekezésben szereplő új kutatási eredmények

I. A rheopheresis hatékonyan képes csökkenteni a teljes vér – és plazma viszkozitást diabetes láb syndromában szenvedő betegek esetében

II. A kezelés jótékony hatással bír a diabetes láb szindrómában megjelenő alsó végtagi sensorimotoros polyneuropathia terápiájában, az idegi funkciókat képes javítani, a neuropathiás fájdalmat mérsékelni.

III. A rheopheresis kezelés elősegíti a diabetes láb syndroma részeként megjelenő, microvascularis károsodásból fakadó alsó végtagi ulcusok gyógyulását azon esetekben, mikor alsó végtagi érsebészeti, vagy intervenciós radiológiai rekonstrukcióra nincs lehetőség.

IV. A gyulladásos citokinek filtrációjával a rheopheresis képes mérsékelni a diabetes láb syndromában megjelenő endothelialis inflammációt.

V. A kezelés csökkenti a vérben található káros vascularis mediatorok vérplazma koncentrációját, a prothromboticus hatásokkal bíró molekulák filtrációjával antithromboticus hatással is bír.

VI. A glutation ciklusban fontos szereppel bíró extracelluláris prekursorok és intermedierek koncentrációváltozásai bizonyítják, hogy a kezelés antioxidáns hatással bír, a diabetes mellitus során megjelenő extrém oxidatív stresszt és annak káros hatásait mérsékelni képes.

Publikációs lista



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

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

Nyilvántartási szám: DEENK/13/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Gál Kristóf
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Gál, K.**, Pesti-Asbóth, G., Vass, M., Biró, A., Markovics, A., Homoki, J., Fidler, G., Paholcsek, M., Cziáky, Z., Németh, N., Gálné Remenyik, J., Soltész, P.: Monitoring and recovery of hyperglycaemia-induced endothelial dysfunction with rheopheresis in diabetic lower extremity ulceration with hyperviscosity.
Diabetes and Vascular Disease Research. 19 (6), 1-14, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1177/14791641221131788>
IF: 3.541 (2021)
2. **Gál, K.**, Veres, K., Halmi, S., Bozoki-Beke, K., Fekete, K., Homoki, J., Gálné Remenyik, J., Baráth, B., Varga, Á., Németh, N., Soltész, P.: The effect of rheopheresis treatment on the cytokine profile in diabetic foot syndrome with hyperviscosity in the aspect of clinical changes: a preliminary study.
Clin. Hemorheol. Microcirc. 80 (2), 117-125, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-211188>
IF: 2.411 (2021)

További közlemények

3. Soltész, P., **Gál, K.**, Vass, M.: Rheopheresis.
Focus Med. 24 (1), 17-19, 2022.
4. Soltész, P., Németh, N., **Gál, K.**, Vass, M., Diószegi, Á., Mechler, F., Fekete, K., Somogyi, V., Módos, L.: A rheopheresiskezeléssel szerzett első hazai tapasztalatok.
Orv. hetil. 162 (10), 375-382, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/650.2021.31889>
IF: 0.707
5. Laczik, R., **Gál, K.**, Soltész, P.: Cardiovascularis betegségek és a COVID-19 fertőzés kapcsolata.
Értekezések. 28 (1), 5-8, 2021.





**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

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

6. Diószegi, Á., Vass, M., Flaskó, A., Gál, K., Mechler, F., Káplár, M., Csiba, L., Soltész, P.: Analysis of the Correlation between Microvascular Involvement and Neuropathy in Association with Metabolic Disorders in Case of Diabetic Leg Syndrome.
Annals atherosc. res. 1 (2), 1-6, 2018.

A közlő folyóiratok összesített impact faktora: 6,659

A közlő folyóiratok összesített impact faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 5,952

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, 2023.01.16.



Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Prof. Dr. Soltész Pálnak, mindazért a rengeteg támogatásért, amit egyetemi és PhD-tanulmányaim során tőle kaptam. Szakmai tudásának és emberi bölcsességének köszönhetően felbecsülhetetlen tapasztalatokra tehettem szert mind a betegellátás, mind a kutatás terén.

Hálával tartozom Dr. habil. Remenyik Judit, Tudományos Tanácsadónak. Végtelen anyai szeretetén és gondoskodásán túl köszönöm neki, hogy lehetőséget teremtett laboratóriumi kutatásaim elvégzéséhez, megismertetett a tudományos kutatás szépségeivel, megtanított a precíz laboratóriumi munka jelentőségére, és hogy a tudomány gyökere ugyan sokszor keserű, gyümölcse azonban mindig gyönyörűsége.

Köszönet illeti Prof. Dr. Németh Norbertet a haemorheológia terén nyújtott tanításaiért és értékes tanácsaiért. A viszkozitás vizsgálatokban nyújtott segítséget köszönöm a Sebészeti Műtétan Tanszék dolgozóinak.

Köszönettel tartozom Dr. habil. Fekete Klára Tanárnőnek az elektroneurográfiai vizsgálatokban nyújtott elvülhetetlen segítségért.

Szeretnék köszönetet mondani az Élelmiszertechnológia Intézet kutatóinak, Asbóth Georginának, Dr. Homoki Juditnak, Molnár Piroskának, Dr. Paholcsek Melindának, Dr. Bíró Attilának, Dr. Fidler Gábornak és Dr. Markovics Arnoldnak a rengeteg önzetlen szakmai segítségért, tanításért és türelemért, nélkülük PhD munkám soha nem készülhetett volna el.

Köszönettel tartozok Dr. Cziáky Zoltán Tanár Úrnak, aki a Nyíregyházi Egyetem Agrár és Molekuláris Kutató- és Szolgáltató Csoport kutatójaként segítséget nyújtott a kutatásaim egy részének elvégzéséhez és a vizsgálati módszertanokkal megismertetett.

Szeretném megköszönni a DEKK Belgyógyászati Intézet „C” Épület Intenzív Osztály és Terápiás Aferezis Részleg összes nővérének és asszisztensének segítségét, külön kiemelve Gelsi Eleonórát, Győri Tündét, Karácsony Zsuzsát, Szabó Angélát és Bozóki-Beke Krisztinát. A kezelésekből nyújtott segítségükért és támogatásukért hálás vagyok.

Végül, de nem utolsó sorban szeretnék köszönetet mondani családomnak és barátaimnak, hogy munkám során mindig mellettem álltak és számíthattam rájuk.