

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

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

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK	3
1. BEVEZETÉS	4
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
2.1. A vese rövid áttekintése	6
2.1.1. <i>A vese anatómiája</i>	6
2.1.2. <i>A vese funkciója</i>	8
2.1.3. <i>Vesetranszplantáció</i>	9
2.2. Ischaemia-reperfusio	11
2.3. Preconditionálás	14
2.4. Haemorheologia	16
2.4.1. <i>Vörösvérsejt deformabilitás</i>	17
2.4.2. <i>Vörösvérsejt aggregatio</i>	18
2.5. Microcirculatio	19
CÉLKITŰZÉSEK	21
3. ANYAG ÉS MÓDSZER	22
3.1. Kísérleti állatok, kísérleti csoportok, műtéti technika	22
3.2. Mérési protokoll	24
3.3. Vitalis paraméterek	25
3.4. Microcirculatio	25
3.5. Laboratóriumi paraméterek	27
3.5.1. <i>Vérgáz analízis</i>	27
3.5.2. <i>Haematologiai paraméterek</i>	27
3.5.3. <i>Vörösvérsejt deformabilitás</i>	28
3.5.4. <i>Vörösvérsejt ozmotikus grádiens deformabilitás</i>	29
3.5.5. <i>Vörösvérsejt aggregatio</i>	30
3.6. Szövettan	31
3.7. Statisztika	32
4. EREDMÉNYEK	33
4.1. Vitális paraméterek	33
4.1.1. <i>Pulzusszám</i>	33
4.1.2. <i>Artériás középnyomás</i>	33
4.1.3. <i>Légzésszám</i>	33
4.1.4. <i>Hőmérséklet</i>	34
4.2. Microcirculatio	35

4.3. Laboratóriumi paraméterek	36
4.3.1. <i>Vérgáz analízis</i>	36
4.3.2. <i>Haematologiai paraméterek.....</i>	39
4.3.3. <i>Vörösvérsejt deformabilitás.....</i>	41
4.3.4. <i>Vörösvérsejt ozmotikus grádiens deformabilitás.....</i>	42
4.3.5. <i>Vörösvérsejt aggregatio</i>	43
4.4. Szövetteni vizsgálatok	44
5. MEGBESZÉLÉS	48
FŐBB EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK.....	55
6. ÖSSZEFOGLALÁS	56
7. AZ IRODALOMJEGYZÉK	58
7.1. <i>Hivatkozott közlemények jegyzéke.....</i>	58
7.2. <i>Az értekezés alapjául szolgáló és egyéb in extenso közlemények hitelesített listája</i>	64
8. TÁRGYSZAVAK.....	66
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	67
10. FÜGGELÉK	68

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

AI	aggregációs index
BFU	szöveti áramlási egység (blood flux unit)
CVP	centrális vénás nyomás (central vein pressure)
EI	elongációs index
Fvs	fehérvérsejtszám
Hgb	haemoglobin
HR	szívfrekvencia (heart rate)
Htc	haematocrit
I/R	ischaemia-reperfusio
IL	interleukin
MAP	artériás középnyomás
pCO ₂	parciális széndioxid nyomás
pO ₂	parciális oxigén nyomás
PVP	polyvinyl-pyrrolidon
RIPC	távoli szervi ischaemiás preconditionálás
SS	nyírófeszültség (shear stress)
Thr	vérlemezkeszám
Vvs	vörösvérsejtszám
iNOS	indukálható nitrogén-oxid-szintáz (inducible nitric oxide synthase)
mPTP	mitokondriális permeabilitás tranzíciós pórus (mitochondrial permeability transition pore)
ROS	reaktív oxigéngyök (reactive oxygen species)
PKC	protein-kináz C
sKATP	ATP szenzitív K ⁺ csatorna (ATP-sensitive K ⁺ channel)
mKATP	mitokondriális ATP szenzitív K ⁺ csatorna (mitochondrial ATP-sensitive K ⁺ channel)

*„Tudásunk egy csepp.
Amit nem tudunk,
az egy egész óceán.”
(Isaac Newton)*

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 (Versteilen és mtsai, 2004; Zuk és Bonventre, 2019).

Az ischaemiás állapotok a csökkent vagy teljesen megszűnt oxigén és tápanyag ellátottság, illetve az elégtelen sejttanyagcsere 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 sejttanyagcsere 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-reperfusiók károsodásnak nevezzük, és számos változó befolyásolja a mértékét (Bonventre és Yang, 2011; Eltzschig és Eckle, 2011).

Ischaemia-reperfusiók 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 haemorheologiai változások jobb megértése az I/R károsodás alatt jelentős mértékben segíthet a károsodás mértékének megítélésében, illetve pontosabb monitorozásában, továbbá befolyásolásukkal lehetőség nyílna a károsodás mérséklésére (Baskurt és mtsai, 2007; Selzner és mtsai, 2012).

Az ischaemia-reperfüziós károsodás megelőzése lenne a leginkább ideális, azonban ez csak ritkán megoldható. Számos farmakológiai, illetve sebészi módszer ismeretes, melyek a károsodást mértékét mérsékelik. A conditionáláson alapuló eljárások lényege a sejt „hozzászoktatása” az I/R károsodáshoz, rövid, ischaemiás és reperfüziós 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 (Solomon, 2011; Selzner és mtsai, 2012; Wever és mtsai, 2011; Pedersen és mtsai, 2011; Johnsen és mtsai, 2016; Krogstrup és mtsai, 2017).

A távoli szervi ischaemiás preconditionálás hatásmechanizmusa és ideális protokollja nem ismert. A beavatkozás kapcsán két időablak is van, melyek eltérő mechanizmuson alapulnak. Vese ischaemia-reperfüzió kapcsán kevés irodalmi adat áll rendelkezésre az ischaemia-reperfüziós károsodás kapcsán bekövetkező haemorheologiai és microcirculációs változásokról is (Gassanov és mtsai, 2014; Saxena és mtsai, 2010; Zarbock és Kellum, 2016).

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A veséről röviden

2.1.1. A vese anatómiája

A vesék retroperitonealisán helyezkednek el, a gerincoszlop két oldalán, felső pólusuk a tizenkettedik háti csigolya, az alsó pólusuk pedig a harmadik ágyéki csigolya szintjén van. A vesék körülbelül 12 cm hosszúak és súlyuk 150 gramm. Minden vese mediális felületén található egy nyílás, a hilus, amelyben megtalálható a vese artéria és véna, a nyirokerek, a vesét beidegző ideg és az ureter tölcsér alakú felső vége, a vesemedence. Az egyes vesék vérellátása általában az arteria renalis által történik, amely a hasi aorta zsigeri oldalága. Előfordulhat azonban, hogy további erek (arteria renalis accessoria) is részt vesznek a vesék vérellátásában, melyek eredhetnek arteria mesentericából, suprarenalisból, illetve a spermaticus vagy ovarialis artériákból is. A vesét hosszában kettévágva két különálló rész látható, egy sötét külső réteg, mely a kéreg, illetve egy halványabb belső, a medulla. Utóbbi számos kúpos területre, a vese piramisokra oszlik. Minden piramis csúcsa a vesemedence felé nyúlik, papillát képezve. A vese piramisokon sávozottság figyelhető meg, mely medullaris sugarakat, az egyenes tubularis elemek, vagyis a Henle-csatornák és hurkok alkotnak a vasa recta ereivel. A vese medencék az ureterek kitágult felső résznek tekinthetőek. A medence calyx-jai az egyes piramisok papillája felé nyúlnak, és összegyűjtik a belőlük elfolyó vizeletet, melyet az ureterek a húgyhólyagba vezetnek (Lote, 2012).

A vese alapvető funkcionális egysége a nephron. Minden emberi vesében 1–1,5 millió nephron található. A nephron egy vakon végződő tubularis képlet, amelynek vak vége a Bowman-kapszulát képezi a csomószerűen összetömörült kapilláris erek, a glomerulus körül. A nephron további részei a proximalis tubulus, a Henle-kacs és a distalis tubulus. Több distalis tubulus összekapcsolódva összekötő tubulusokat hoz létre, melyekből, más összekötő tubulusokkal együtt gyűjtőcsatornákat alkotnak (Lote, 2012).

A glomerulusok, a proximalis tubulusok és a distalis tubulusok a kéregben helyezkednek el, míg a Henle-kacs és a gyűjtőcsatornák a medullába nyúlnak le. A nephron Henle-kacsának hossza a glomerulus helyétől függ, és ez alapján az emberi vese nephronjait két csoportba oszthatjuk. Azokat a nephronokat, amelyek glomerulusai a kéreg külső kétharmadában vannak, kérgi nephronoknak nevezzük, és nagyon rövid Henle-kacccsal rendelkeznek, amelyek csak csekély mértékben nyúlnak a medullába. A másik csoportot azok a nephronok alkotják, amelyek glomerulusai a kéreg belső egyharmadába, juxtamedullarisán helyezkednek el. Ezen nephronok hosszú Henle-kacccsal rendelkeznek, amelyek mélyen benyúlnak a medullába. Az emberben a nephronok körülbelül 15%-a, míg a patkányoknál körülbelül 30%-a juxtamedullaris. A glomerulus állítja elő a plazma ultrafiltrátumát, amely bejut a nephronokba. Az emberi glomerulus átmérője körülbelül 200 μm . Mindegyik glomerulust az afferens arteriola csomószerű capillaris hálózata alkotja, melyek egyesülve az efferens arteriolát hozzá létre.

A proximális tubulus a nephron Bowman-kapszulából kilépő része. Kezdeti szakasza, a kanyargó pars convoluta, mely egy egyenes szakaszként, a pars rectaként fut a medullába, ahol a Henle-kacs leszálló részét képezi. Az emberi proximalis tubulus hossza 12-25 mm, külső átmérője körülbelül 70 μm .

A Henle-kacs vékony felszálló szegmense legfeljebb 15 mm hosszú, a külső átmérő pedig körülbelül 20 μm , melyet a vastag felszálló szegmense követ. A nephron ezen része disztális tubulusként folytatódik a kéregben. A hurok felszálló szárának egy része a kéregben szorosan kapcsolódik a glomerulushoz, az afferens arteriolához, és a juxtaglomerularis apparatus kialakításában vesz részt.

A distalis tubulusokból összekötő-, majd gyűjtőcsatornák lesznek. A kéregben minden gyűjtőcsatornához körülbelül hat összekötő tubulus csatlakozik, és amikor a csatornák belépnek a medullába, egymás után párosulva csatlakoznak egymáshoz, létrehozva az akár 200 μm széles calyxokhoz vezető Bellini-csatornát (Lote, 2012).

2.1.2. A vese funkciója

A vesének kiemelkedően fontos szerepe van a homeosztázis fenntartásában. „*Végső elemzésben a vese képes gyorsan és pontosan reagálni a testnedvek térfogatának és összetételének eltéréseire, ami lehetővé teszi számunkra, hogy belső környezetünk állandóságát megőrizzük*” (H.W. Smith). Ezen fontos szerepét csak megfelelő idegi és hormonális szabályozottság mellett képes tökéletesen ellátni. Amennyiben akár a szabályozást, akár a vesét magát károsodás éri, különböző kórképek alakulhatnak ki. A vese számos anyagcseretermék, idegen anyagot, illetve túlzott mennyiségben jelenlévő iont távolít el a szervezetből. A nitrogén-anyagcsere kapcsán létrejövő kreatinin, húgysav és urea a vesén keresztül ürülnek, csak úgy, mint a xenobiotikumok, de a túl nagy mennyiségben jelenlévő glükóz, illetve ketontest is a vesén keresztül távozik. A vese naponta átlagosan 180 liter filtrátumot készít glomerulusai segítségével, melyből a tubulus rendszer közel 99%-ot visszaszív, és csupán mintegy 1,5 liter vizelet fog termelődni (Christopher, 2012; Douglas és mtsai, 2018; Kurtz, 2019).

A veséknek kiemelkedően fontos szerepe van a sav-bázis egyensúly fenntartásában is. Az emberi szervezetben a pH érték, vagyis a vér H^+ koncentrációja számos puffer-rendszeren keresztül szabályozott, és igen keskeny, 7,39-7,43 tartományban mozog. Az egyik legfontosabb puffer a H_2CO_3 , vagyis a szénsav, mely igen könnyen bomlik HCO_3^- , illetve H^+ ionokra. A CO_2 -t vesztés szabályozó ventiláción kívül a vese is kiemelkedően fontos szerepet játszik a sav-bázis egyensúly fenntartásában. A vese visszaszívja a vizelettel elvesztett bikarbonát ionokat oly módon, hogy Na^+/H^+ cserével H^+ -ok jutnak a tubulusok lumenébe, ahol a pH-érték lecsökken, ennek következtében a H^+ -okkal azonos mennyiségű HCO_3^- reabszorbeálódik az interstitiumon keresztül, megóvva így a szervezetet bázis-, illetve Na^+ veszteségtől. A gyűjtőcsatornák sejtjei H^+ -pumpákkal rendelkeznek, melyek jelentős H^+ -gradiens létrehozására képesek. A víz disszociációja során keletkező H^+ iont kipumpálják a tubulusba, míg a visszamaradó OH^- -t szénsav-anhidráz segítségével CO_2 -vel kötik, így HCO_3^- -okat képeznek,

melyek a véráramba jutnak. A vesék által képzett bikarbonát a szervezet fontos báziskészlete, mely nélkül a homeosztázis fenntarthatatlan lenne.

Amennyiben a szervezetben bázistöbblet áll fenn, a vese képes a bikarbonát ionok eltávolítására. A gyűjtőcsatornák β -típusú köztes sejtjeinek H^+ -pumpái a basolateralis membránban helyezkednek el, és az interstitiumba választanak ki H^+ -okat. A szénsavból visszamaradó bikarbonát ion egy HCO_3^-/Cl^- cserélő segítségével kerül a lumenbe. A fiziológias sav-bázis egyensúly fenntartásához a vese képes HCO_3^- -okat szintetizálni, vagy kiválasztani a vizeletbe, melynek pH értéke akár 4,0-8,2 között is mozoghat. Acidózis, illetve alkalózis esetén a szervezet először a ventiláció módosításával kompenzál, mely szinte azonnali változást okozhat, míg a veséknek 1-2 órára is szükségük van, hogy elkezdjenek kompenzálni. Az előbbit nevezzük respiratórikus, az utóbbit pedig metabolikus kompenzációnak.

Fontos megemlíteni a vese kiválasztó működésein kívüli szerepeit is. Részt vesz a vérnyomás szabályozásban, a folyadékmegőrzés, valamint a renin termelés révén is. A vesében eritropoetin és trombopoetin képződik, melyeknek a sejtkezésben fontos szerepe van, és nem utolsósorban a D-vitamin szintézisében is szerepet tölt be, ezáltal a Ca^{2+} anyagcserét is szabályozza (Christopher, 2012; Douglas és mtsai, 2018; Kurtz, 2019).

2.1.3. Vesetranszplantáció

Végstádiumú veseelégtelenségben, illetve bizonyos krónikus vesebetegségekben, súlyos akut veseelégtelenséget követően legtöbbször a veseátültetés az egyetlen kuratív terápiás eljárás (Zuk és Bonventre, 2019; Chertow és mtsai, 2005; Yarlagadda és mtsai, 2009; Murugan és Kellum, 2011; Hu és mtsai, 2016). A kezelés nemcsak a túlélés esélyét növeli, de jobb életminőséget is jelent a dialízisek számának csökkentésével (Jiang és mtsai, 2018). Sajnálatos módon a vese-allograftok élettartama véges, ezért kiemelten fontos az optimális graft-funkció

biztosítása a lehető leghosszabb ideig, valamint a graft-kilökődés elkerülése (Matas, 2006). Az elmúlt évtizedekben szerencsére jelentős mértékben javult a graftok középhosszú élettartama, hiszen javult a perioperatív ellátás, fejlődött az immunszuppresszív terápia, és fokozottabb lett a szív-érrendszeri betegségek prevenciója is (Coemans és mtsai, 2018). Azonban az allograftok hosszútávú várható élettartama nem növekedett (Legendre és mtsai, 2014; Uffing és mtsai, 2018; Gunay és mtsai, 2019). Míg az akut kilökődés gyakorisága kétségtelenül csökkent, az elsődleges vesebetegség kiújulása, amelyet egykor az allograft kimenetelében kisebb jelentőségűként tartottak számon, mára a harmadik leggyakoribb oka az allograft vesztésnek az immunológiai kilökődés és a működő grafttal bekövetkezett halál után (Jiang és mtsai, 2018; Salvadori, 2017).

Vesetranszplantáció, illetve bizonyos kardiovaszkuláris beavatkozások vagy artériás elzáródás során a veséket ischaemia-reperfúziós károsodás érheti, melynek következtében akut vesekárosodás alakulhat ki, amely a fokozza a mortalitást, illetve allograft-vesztést okozhat. (Versteilen és mtsai, 2004; Zuk és Bonventre, 2019, Tilney és Gluttmann, 1997; Zuk és Bonventre, 2019; Chertow és mtsai, 2005; Yarlalagadda és mtsai, 2009).

Az első transzplantációs programok kezdetén a donort és a recipienst ugyanabban a központban műtötték, mivel a donor vese megőrzésének egyetlen módszere a vese vérrel, vagy Ringer-laktáttal való átmosása, majd a vese felszínének jeges vízzel való hűtése volt. Ezen módszer lényege a hypothermiának a metabolizmus csökkentésével járó kedvező tulajdonsága. Az állatkísérletek, illetve a kezdeti ikerműtétek alapján 1 óránál rövidebb ischaemiás időre volt szükség, de 3 órán túl visszafordíthatatlan károsodások következtek be. Később a donor vesék szállítása miatt megőrző rendszert fejlesztettek ki, mely a fejlettebb áramoltatás és hűtés kapcsán, akár 12 óráig is képes volt a donorvese életképességének megőrzésére. Az az első módszer a Belzer által kifejlesztett gépmegőrző rendszer volt, mely folyamatosan áramoltatta a vesében a lehűtött folyadékot. Az 1960-as évek végén fejlesztettek ki olyan tartósító

folyadékokat, amelyek folyamatos perfúzió nélkül képesek voltak a donorvese megfelelő hűtésére (Calne és mtsai, 1963; Collins és mtsai, 1969).

A donorszerveket a termelő gyulladáshoz vezető citokinek károsítják. Kifejezetten fontos a vesék túlélése kapcsán, hogy mennyi ideig volt kitéve a szerv hideg, illetve meleg ischaemiás károsodásnak. Hideg ischaemiának nevezzük a donorszerv hűtött kondicionáló folyadékkal való feltöltésétől és a recipiensben történő saját vérrel perfundált állapotig eltelt időt. Meleg ischaemiás állapotban a donorszervben a donor testmeleg vére kering. Már a 20 óránál hosszabb hideg ischaemiás idő fokozott késői graft funkcióvesztéssel jár (Quiroga és mtsai, 2006; Ojo és mtsai, 1997).

Hideg ischaemia esetén, amikor a vesét eltávolítják a donor testéből, a perfúzió teljesen megszűnik, ami az oxigén és a tápanyagok szállításának megszűnéséhez, illetve súlyos anyagcsere-problémákhoz vezet. Az anyagcsere visszaszorítása ezért elengedhetetlen a szerv életképességének megőrzéséhez a megőrzési időszak alatt. A vese maghőmérsékletének $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ alá történő csökkentése az anyagcserét 5-8%-ra csökkenti. Az egyszerű jégűtés koncepciója sikeresnek bizonyult; azonban hosszabb megőrzési időszakokra alkalmatlan volt. Az egyszerű hideg statikus tárolási módszert több munkacsoport is vizsgálta, új megoldásokat eredményezve, és betekintést nyújtva az ischaemia mellékhatásaiba a megőrzött szervben. A jelenlegi klinikai gyakorlatban számos tartósító folyadékot használnak. Mind az elhunyt donorban, mind a műtőasztalon a veséket tartósító folyadékkal öblítik át a veseartérián keresztül, amíg a donor véréből teljesen meg nem tisztul (Levy, 1959; Downes és mtsai, 1973; Belzer és mtsai, 1988).

2.2. Ischaemia-reperfusio

Az ischaemia-reperfusió károsodás akkor lép fel, amikor a vérellátás tartósan lecsökken vagy megszűnik a szervezet egy adott területén, majd a keringés újból helyreáll. Ez

létrejöhet különböző kóros állapotok (thrombus, embolia, érszűkület) révén, de iatrogén módon például sebészeti beavatkozások közben is kialakulhat (Nanobashvili és mtsai, 2002; Gori és mtsai, 2006).

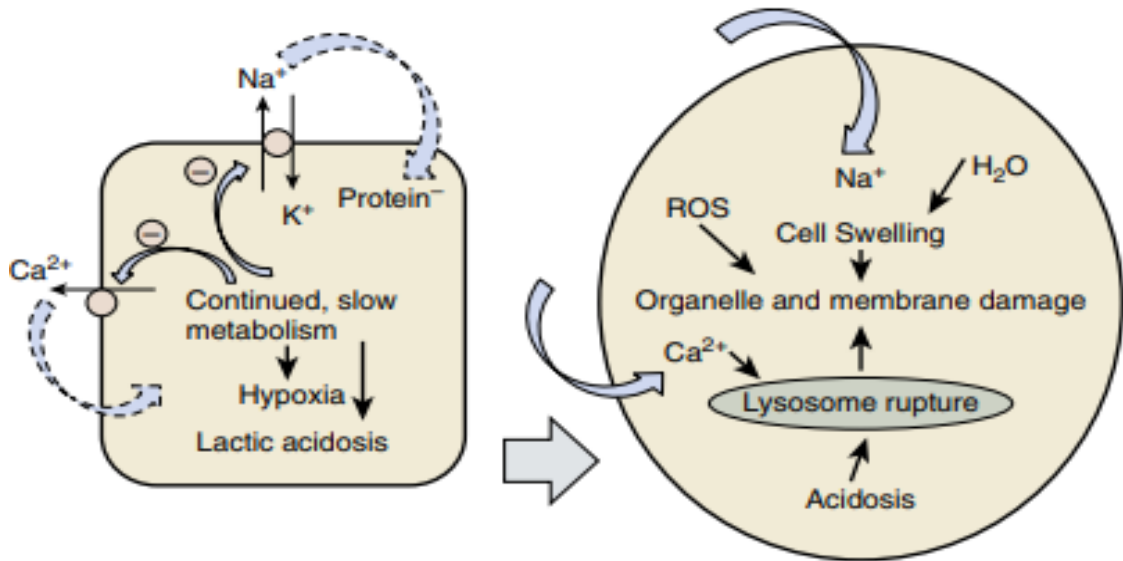
Az ischaemia-reperfusio pathomechanizmusa rendkívül összetett. A sejtet az ischaemia alatt hypoxiás károsodás éri, melyet a véráramlás helyreállításával, vagyis a reperfúsióval megjelenő, oxigénben gazdag vér tovább károsíthat. A folyamat részeként számos gyulladásozó folyamat indul be. Az addig elzárt érszakaszon kialakult endothel-károsodás, a citokin felszabadulás, a makrofág, komplement rendszer és neutrophil aktiváció a természetes immunválasszal együtt okozzák az I/R károsodást (Nanobashvili és mtsai, 2002; Gori és mtsai, 2006; Brandao és mtsai 2003; Collard és Gelman, 2001).

Ischaemia során, megfelelő vérellátás hiányában a sejtek ATP szintje csökkenni fog, így a membránban elhelyezkedő Na^+/K^+ ATP-áz aktivitása is, mely a megfelelő sejt működés elengedhetetlen eleme. A sejtben Ca^{2+} akkumuláció történik, az ionháztartás felborul, melynek következtében számos strukturális fehérje sérül, az enzimaktivitás megváltozik a sejtben, károsító szabadgyökök képződnek, fokozódik a glikolízis és csökken a pH. A folyamat egy bizonyos idő után irreverzibilissé válik. Ez az idő a „point of no return”. Ischaemia során sérülnek a lizoszómák, a kiáramló enzimek a sejt szerkezetét jelentős mértékben roncsolják, a sejt felszínre kerülő antigének következtében az immunrendszer válaszreakciót indít a sejt ellen. Ezen pont elérése előtt, a keringés helyreállításával a sejt általában elkerülhető, a folyamat reverzibilis. A kialakuló gyulladásozó folyamatban az ereket bélelő endothelnek fontos szerepe van, ugyanis enzimjei segítségével képes különböző vazodilatátor anyagokat (NO), illetve szignáltranszdukciós molekulákat (interleukinek, prosztaciklinek) termelni és ezáltal befolyásolni a keringést. Ischaemia alatt ezek az endothel mediálta folyamatok is zavart szenvednek, a vasodilatatio és vasoconstrictio közti egyensúly megszűnik, csakúgy, mint a pro-

illetve antiinflammatorikus faktorok aránya, mely jelenséget együttesen endothel diszfunkciónak nevezzük (Granger, 1988 és 1999; Popel és Johnson, 2005).

A reperfusio elengedhetetlen az ischaemia megszüntetéséhez. Helyreállítja a szövetek oxigén- és tápanyag ellátottságát, valamint elszállítja a termelődött toxikus metabolitokat. Fontos megemlíteni azonban, hogy ezeknek a termelődött metabolitoknak, mennyiségüktől függően szisztémás károsító hatása lehet. A keringés helyreállása nem minden szempontból kedvez a reverzibilisen sérült sejteknek, ugyanis a hirtelen megjelenő nagymennyiségű oxigént a sejtek nem képesek megfelelő módon kezelni, szabadgyökök képződnek, mely paradox módon további károsodást okoznak (Kvietys és mtsai, 1997; Carden és Granger, 2000; Szokoly és mtsai, 2005). Az ischaemia alatt megnövekedett Ca^{2+} szint miatt, a Ca-függő proteáz a xantin-dehidrogenázt xantin-oxidázzá alakítja, melynek a nukleotid károsodásában meghatározó szerepe van. A hipoxantin xantinná alakítása közben szuperoxid anion és hidrogénperoxid keletkezik, melyet a sejtek csak bizonyos mértékig képesek kompenzálni (Babior és Peters, 1995; Granger és Korthuis, 1995). A túlzott mennyiségű reaktív oxigén szabadgyökök a sejtmembrán és strukturális fehérjék további károsodását okozzák, megváltozik az enzimaktivitás és sérülhet a DNS. A folyamat akár olyan mértékű is lehet, hogy a sejteket a tartós ischaemiás állapothoz hasonlóan, irreverzibilis károsodás érheti. A mitokondriumok membránjában található mitokondriális permeabilitási tranzíciós pórusok (mPTP) kulcsszerepet játszanak az I/R kapcsán bekövetkező sejthalálban. Reperfusio során a mPTP-k fokozatosan megnyílnak a magas intracelluláris Ca^{2+} szint, valamint oxigén szabadgyökök együttes hatására, mely végső soron sejthalálhoz vezet. A mPTP-k vizsgálata az I/R károsodás csökkentésére irányuló kutatások egyik fontos eleme (Hoek és mtsai, 1997; Nanobashvili és mtsai, 2003; Popel és Johnson, 2005; Granger és mtsai, 2015). A xantin-oxidáz a reperfúziót követően fokozatosan visszaalakul xantin-dehidrogenázzá és nem termel több reaktív oxigén szabadgyököt. A felszabaduló szabadgyökök az endothelen található

receptorokon keresztül fehérvérsejt aktivációt váltanak ki. A megjelenő fehérvérsejtek aktiválódnak, majd NADPH-oxidáz enzim segítségével további szuperoxid aniont és hidrogénperoxidot termelnek, így végső soron kialakul egy lokális gyulladás (Kurose és Granger, 1994) (1. ábra).



1. ábra

Ischaemia-reperfúziós károsodás cellularis történései
(Knechtle S, Marson L, Morris P. Kidney Transplantation - Principles and Practice
8th Edition, 2020, Elsevier)

2.3. Preconditionálás

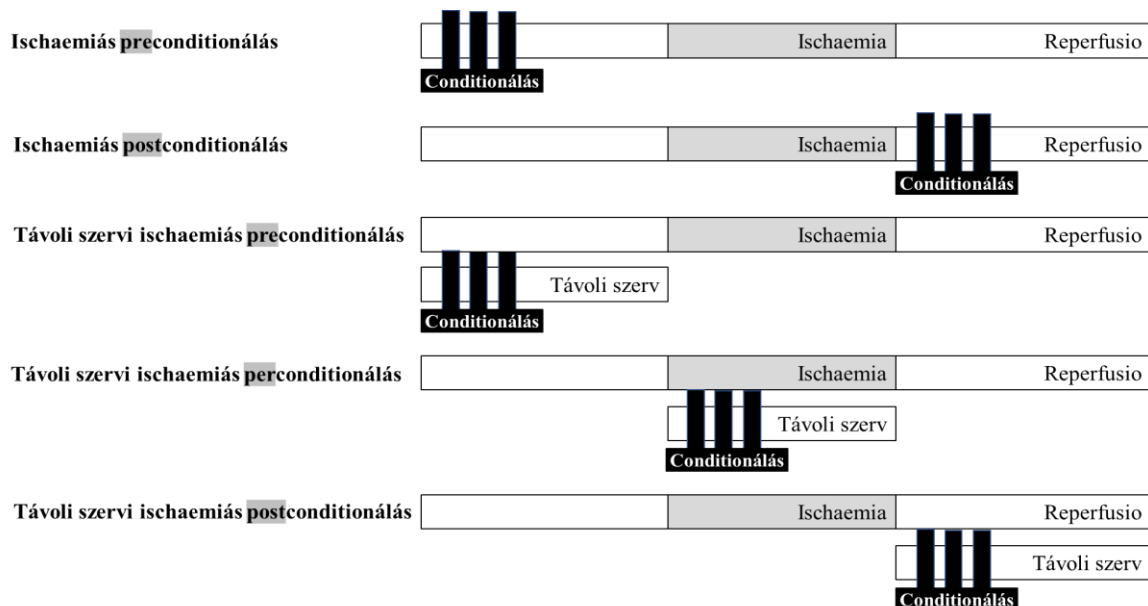
Az ischaemia-reperfúziós károsodás mérséklése napjainkig nehézséget jelent az orvoslás számos területén. A kardiológiában, neurológiában, traumatológiában, illetve a transzplantációs és érsebészeti beavatkozásokban sokszor elkerülhetetlen az I/R kialakulása. A károsodás mérséklésére számos módszer található az irodalomban. Alapvetően sebészi és farmakológiai beavatkozásokra oszthatjuk őket (Antonio és mtsai, 2018; Afonso és mtsai, 2019).

A farmakológiai módszerek vizsgálata leginkább akut myocardialis ischaemiában és ischaemiás stroke-ban jellemző, de vannak kutatások vese és máj esetén is. A különböző hatóanyagok eltérően hatnak valamennyi szervben, azonban elmondható, hogy az antioxidáns terápia, a gyulladáscsökkentő gyógyszerek és a rheológiai paramétereket befolyásoló készítmények kedvezően hatnak a legtöbb esetben (Caricati-Neto és mtsai, 2019; Vinciguerra és mtsai, 2018; Gilbo és mtsai, 2016; Li és mtsai, 2017).

A sebészeti beavatkozások közül is több módszer ismeretes az irodalomban. A legegyszerűbbnek tekinthető egyszerű hűtésen kívül alkalmazhatunk kontrollált reperfúsiót, vagy különböző tolerancia fokozó eljárásokat. Ez utóbbi nem más, mint az erek rövid idejű, egymás utáni részleges, vagy teljes leszorításának és felengedésének sorozata, azaz ischaemiás és reperfúziós időszakok váltakozása. A különböző módszereket az alkalmazott ischaemiás periódusok, valamint a károsodás egymáshoz viszonyított ideje alapján pre-, azaz károsodást megelőző, per-, vagyis a károsodással egyszerre zajló, illetve postconditionálásnak, tehát a definitív ischaemiát követő beavatkozásnak nevezzük. A kondicionálást végezhetjük a károsodásnak kitett szöveten, illetve attól távolabb eső szöveten, szervben, vagy végtagon is. Az előbbi a lokális, míg utóbbi a távoli szervi kondicionálás. Összesen tehát 5 különböző kondicionálási módszer ismert, mivel a lokális preconditionálás nem kivitelezhető. Valamennyi eljárás belüli eltérő protokollok találhatóak az alkalmazott ischaemia-reperfúziós ciklusok száma, illetve hossza alapján (2. ábra).

Az ischaemiás preconditionálást (IPC), mint ischaemia-reperfúziós károsodást csökkentő eljárást Murry és munkatársai írták le 1986-ban (Murry és mtsai, 1986). Jóllehet az eljárás kisállat modellekben kifejezetten hatásosnak bizonyult, klinikai beavatkozások során még nem terjedt el, és egyértelmű protokoll sem lett kidolgozva humán alkalmazásra [Saxena és mtsai 2010]. Egy 2016-os publikáció alapján azonban az IPC csökkentette a mortalitást májtranszplantált páciensek esetén (Robertson és mtsai, 2016). 1993-ban Przyklenk és

munkatársai megfigyelték, hogy kísérletes körülmények között, a myocardialis infarctus mérete csökkenthető távolabbi coronaria ereken alkalmazott preconditionálási protokollal, és elsőként közölték a távoli szervi preconditionálást (RIPC) (Przyklenk és mtsai, 1993). IPC és RIPC esetén megfigyelték, hogy van egy korai, illetve egy késleltetett periódus, amikor a preconditionálás kifejti hatását. A korai hatás a preconditionálást követően 3 órán keresztül figyelhető meg, míg a késleltetett védőmechanizmus 12-72 órával a beavatkozás végeztével észlelhető (Robertson és mtsai, 2017).



2. ábra
Ischaemiás conditionálási eljárások

2.4. Haemorheologia

A haemorheologia nem más, mint „a vér sejtes és plazmatikus komponensei makro- és mikroszkópikus dimenziójú áramlásának, valamint a vérrel kontaktusban lévő érfal rheológiájának összefoglaló megjelölése” (Alfred L. Copley, 1951). A vér a nem-newtoni folyadékok közé tartozik, azaz viszkozitása függ a sebesség-grádiénstól.

A teljes vér viszkozitást számos paraméter befolyásolja, melyek közül kiemelkedően fontos a plazma viszkozitása, a haematocrit érték, a vörösvérsejtek deformabilitási, illetve aggregációs tulajdonsága, valamint a mikrokeringés morfológiája. Továbbá közvetlenül befolyásolják a teljes vér viszkozitást az egyéb alakos elemek, mint vérlemezkék és fehérvérsejtek mennyisége és aggregációs készsége is. Számos paraméter közvetve, vagy közvetlenül, de egymásra is hatást gyakorol. A mikrokeringést jelentősen befolyásolja a keringő vörösvérsejtek aggregációja és deformabilitása, ugyanakkor az alacsonyabb áramlási sebesség fokozza a vörösvérsejtek aggregációját, ezáltal növeli a teljes vér viszkozitást (Lipowsky és mtsai, 2005; Baskurt és mtsai, 2004; Németh és mtsai, 2014).

2.4.1. Vörösvérsejt deformabilitás

A vörösvérsejt deformabilitás az erythrocyták nyírőerők hatására bekövetkező passzív alakváltoztató képességét jelenti. Ez minden erythrocyta individuális tulajdonsága, melyet egyedi bikonkáv alakjuk, speciális felépítésük és egyedi mechanikus tulajdonságaik tesznek lehetővé, így képesek a legszűkebb kapillárisokon is keresztülhaladni. Bár a folyamat általában reverzibilis, túlzott mértékű erőbehatás esetén irreverzibilis károsodás érheti a sejteket (Evans és La Celle, 1975; Bhattacharya, 2011).

A vörösvérsejtek alakváltoztatásához szükséges viszkoelaszticitás mértéke függ a sejtterfogatától, a sejtfelszíntől, a kettő egymáshoz viszonyított arányától, a citoskeleton összetételétől, illetve a sejtmembrán viszkozitásától, tehát annak alkotóitól. Valamennyi fenti tényező együttesen teszi lehetővé az erythrocyták számára, hogy bikonkáv alakjukat megváltoztassák, majd újra visszanyerjék azt, anélkül, hogy megváltozna a sejtmembránban található lipidek mennyisége (Chasis és Shohet, 1987).

A sejtmembránban közel 1:1 arányban található phospholipidek és cholesterol közül, csupán utóbbi oszlik el egyenletesen mind a külső és belső lipidrétegben, míg a különböző

phospholipidek aszimmetrikus eloszlást mutatnak. Ezt az egyenlőtlen eloszlást a sejt speciális transzportfehérjékkel tarja fent, mely elengedhetetlen a cytoskelettonnal való kapcsolódás és a megfelelő membránstabilitás fenntartása érdekében. Az aszimmetrikus phospholipid eloszlás sérülése bizonyos esetekben a sejt makrofágok általi eliminálásához vezet (Manno és mtsai, 2002; Mohandas és Gallagher, 2008; Mohandas és Chasis, 1993).

Az emberi testben keringő erythrocyták normál esetben sejtmaggal nem rendelkeznek ezért a cytoplasma viszkozitását a hidráltság és a haemoglobin tartalom határozzák meg. Ha nő a hidráltság, megnő a sejttérfogat, melyet a sejtmembrán növekedés nem követ, így az erythrocyta deformálhatósága csökken. A deformabilitás dehidráció esetén is romlik, mivel a sejt haemoglobin koncentrációja megemelkedik, a viszkozitás a cytoplasmában megnő. A megfelelő haemoglobin fenntartása, ezért kiemelkedően fontos, melyet a sejt különböző transzporterek segítségével biztosít (Mohandas és Gallagher, 2008; Mohandas és Chasis, 1993; Baskurt és Meiselman, 2003).

A vörösvérsejt deformabilitása a keringés fontos befolyásoló tényezője. A nagyobb átmérőjű erekben csökkenése a viszkozitás emelkedéséhez vezethet, a néhány μm átmérőjű kapillárisokban a rigid erythrocyták képtelenek lehetnek az áthaladásra (Meiselman, 1981).

2.4.2. Vörösvérsejt aggregatio

A vörösvérsejtek másik kiemelkedően fontos rheologiai tulajdonsága az aggregációs készségük, vagyis összekapcsolódási képességük. Alacsony nyírófeszültség, illetve stasis esetén a vörösvérsejtek egymáshoz kapcsolódnak és rouleaux-nak nevezett, pénztekerccszerű formákat hoznak létre. A folyamatban fontos szerepet játszik az erythrocyták deformabilitási képessége, illetve a plazmában jelenlévő makromolekulák jelenléte (Baskurt, 2003; Baskurt és mtsai, 2012; Cicha és mtsai, 2003).

A folyamat pontos mechanizmusa nem tisztázott, két különböző modell is létezik a pénztekercsek képződésének magyarázatára: A „bridging modell” szerint az egymáshoz közel kerülő erythrocytákat a plazmában jelenlévő makromolekulák segítik összekapcsolódni. Ezen modell mellett szól azon megfigyelés, miszerint a vörösvérsejtek aggregációja nem jön létre sem fiziológiás sóoldatban, sem pufferben szuszpendált erythrocyták esetén. A „deplációs modell” szerint a plazmában található makromolekulák a sejtfelszíni glycocalyx réteg miatt nem képesek az erythrocyták felszínéhez közel kerülni, ezért egy deplációs réteg fog kialakulni. Az egymáshoz közel kerülő vörösvérsejtek deplációs zónái, valamint a plazmában található makromolekulák között létrejövő ozmotikus gradiens fogja az aggregatumok kialakulását okozni. A nagyobb makromolekula koncentráció erősebb gradienst hoz létre, ezáltal fokozottabb lesz az aggregatio (Baskurt és mtsai, 2012; Neu és Meiselman, 2007).

Az aggregációs folyamat számos tényezőtől függ. Kisebb koncentrációban jelenlévő vörösvérsejtek, vagyis alacsonyabb haematocrit érték esetén (<20%) az erythrocyták kisebb eséllyel kerülnek kapcsolatba egymással és csökkenni fog az aggregatio mértéke, míg egy bizonyos érték feletti haematocrit (>60%), már nem fogja tovább fokozni az aggregatiót. Befolyásolja továbbá a vérplazma makromolekuláinak koncentrációja, a vörösvérsejtek deformabilitási tulajdonságai, az erythrocyták membránjának összetétele és a lokális áramlási viszony is (Baskurt és mtsai, 2012).

2.5. Microcirculatio

A vér biomechanikai szempontból a nem-newtoni folyadékok közé tartozik. Newtoni folyadékok esetén a nyírófeszültség és a sebesség-grádiens linearis viszonyban áll és független a viszkozitástól, míg a nem-newtoni folyadékoknál sebesség-grádiens függő a viszkozitás.

A vérkeringés áramlástani szempontból három fő részre osztható. Tömeges áramlás, ha az érátmérő nagyobb, mint 300 μm , tranziens áramlás 300-8 μm érátmérő esetén és egyenkénti áramlás, 8 μm -nél kisebb átmérőjű erekben (Tóth és mtsai, 1999; Baskurt és Meiselman, 2003).

Tömeges áramlás esetén a magas nyírófeszültség mellett a sejtek elongálódnak, így egymás áramlását alig befolyásolják. Ekkor a keringés meghatározásában a haemodinamikai tényezők fognak dominálni.

A tranziens, vagy átmeneti áramlás kapcsán a keringést egyéb paraméterek is jelentősen befolyásolják, mint az érfal-vörösvérsejt és a vörösvérsejt-vörösvérsejt közti súrlódás hatása. A laminaris áramlás kialakulásával megjelenik a parabolikus áramlási sebesség-profil, vagyis a folyadék az ér axisa mentén nagyobb sebességgel fog áramolni, mint az érfalhoz közelebbi területeken. A vér sejtjes elemei az axis közelében tömörülnek, a vörösvérsejtek aggregálódnak, a haematocrit megnő, az érfal mentén kialakul egy sejtsezegény plazma réteg, melyet Poiseuille zónának nevezünk. Az érátmetszetben tehát sem a sebesség, sem a sejtjes elemek eloszlása nem egyenletes. Fåhræus 1928-ben arról számolt be, hogy amikor egy nagy átmérőjű csőből a vér egy kapilláris csövön keresztül áramlik, a kapilláris vér átlagos haematocrit értéke kisebb, mint a nagyobb csőben lévő vére (Fåhræus, 1928). A jelenség neve Fåhræus effektus. Később Lindqvisttel együtt leírták, hogy a 10-100 μm átmérőjű erekben, az átmérő csökkenésével a látszólagos viszkozitás is csökken (Fåhræus–Lindqvist-effektus) (Fåhræus és mtsai, 1931).

A mikrokeringés is az átmeneti áramlás zónájában jelenik meg először, a 100 μm átmérőnél kisebb erekben, de szűkebb definíció szerint a 20 μm alatti erek terminalis vascularis hálózata értendő mikrokeringés alatt (Copley, 1990; Baskurt és Meiselman, 2003).

Az egyenkénti áramlás zónájába tartozik a capillarisok hálózata, amely közel 1000 m^2 -nyi felületet jelent. Ilyen kis érátmérőn keresztül a legtöbbször csupán egyetlen sejt képes áthaladni, ezért a vörösvérsejtek aggregációja kevésbé lesz megfigyelhető, míg a deformabilitási képességeik előtérbe kerülnek az áramlás kapcsán (Baskurt és Meiselman, 2003).

A keringést a zónáktól függő mértékben, de befolyásolja az érfal vörösvérsejtekkel való kölcsönhatása, valamint saját rugalmassága révén. Fontos megjegyezni, hogy az áramlás profil megváltozása visszahat az érfalra, és különböző jelátviteli mechanizmusokat indíthat el.

CÉLKITŰZÉSEK

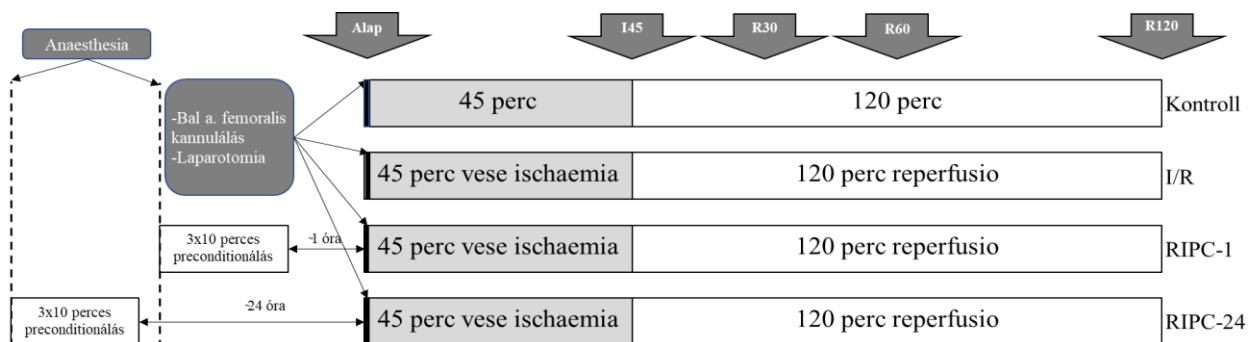
1. Létrehozni egy patkánymodell 45 perces unilaterális vese-ischaemia, illetve az azt követő 120 perces reperfusio hatásainak vizsgálatára.
2. Az ischaemia-reperfusió károsodás mértékének megítélése haemorheológiai, haematológiai, mikrokeringési, vitalis, illetve sav-bázis paraméterek és szövettani vizsgálat alapján.
3. Az ischaemia-reperfusio 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.

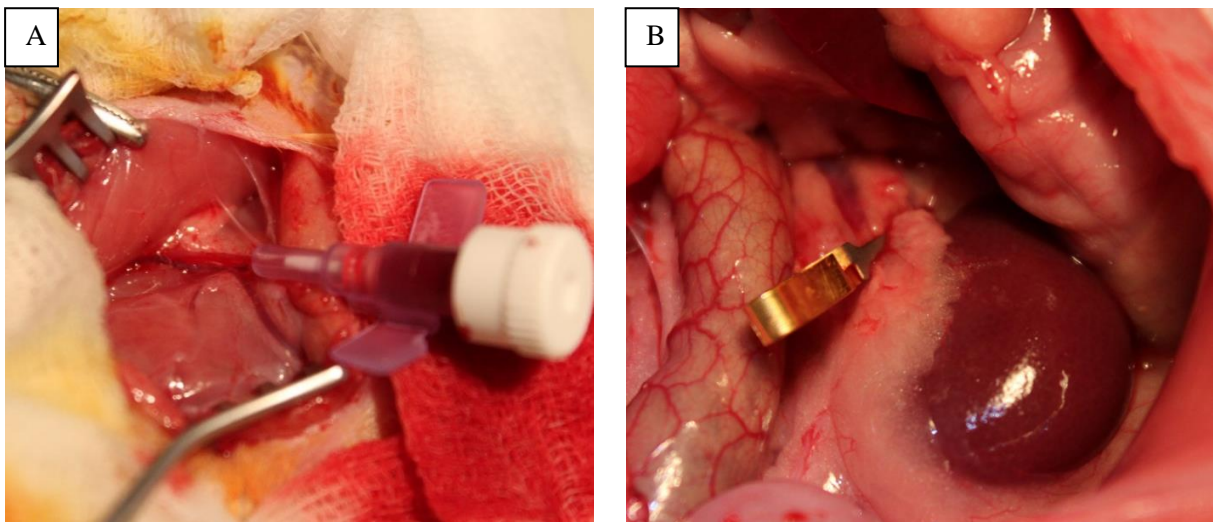
Huszonhét hím, Crl:WI, outbred patkányt (Toxicoop Kft., testtömeg: $301,6 \pm 38,6$ g) vontunk be a kutatásba, melyek kora 12-14 hét volt. A kísérleti állatokat véletlenszerűen 4 csoportra osztottuk, a kezelési protokolloknak megfelelően (3. ábra). A műtét előtt 24 órával minden állat általános anaesthesiában 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.



3. ábra

A kísérleti csoportok és a kísérleti protokoll

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 Neoflon™, 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 átítatott gézlappal izoláltuk, majd visszahelyeztük a hasüregbe és hasonlóan fedtük azt. A megfigyelési idő alatt méréseket végeztünk, a kanülált artériából vért vettünk (4. ábra, A). A kontroll csoportban egyéb sebészeti, vagy ischaemia-reperfüsiós beavatkozás nem történt.



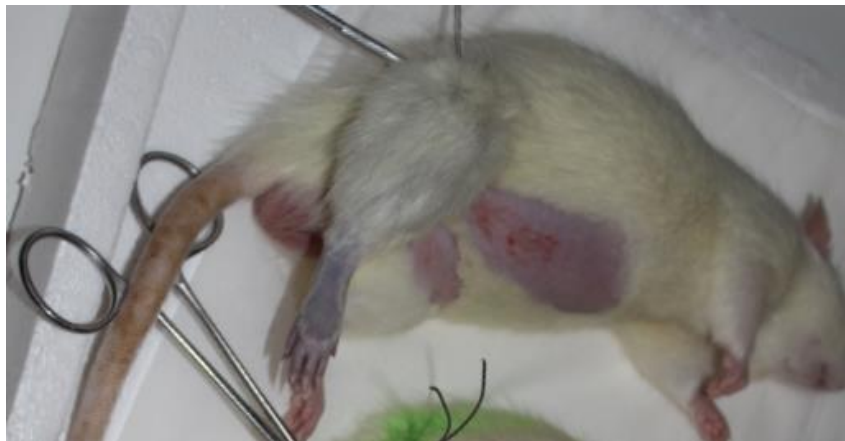
4. ábra

A bal oldali a. femoralis kanülálása (A), és a bal oldali vese ereinek leszorítása mikroklippel (B)

Az ischaemia-reperfüsiós 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 (4. ábra, B), így létrehozva unilaterális

vese-ischaemiát, melyet a makroszkópos színváltozás is igazolt. 45 perc ischaemiát követően a klippet eltávolítottuk, és 120 perces reperfúziós időszak után az állatokat exsanguináltuk.

A távoli szervi preconditionált csoportokban általános anaesthesiában a jobb hátsó végtagot leszorítottuk a ligamentum inguinale magasságában atraumatikus tourniquet segítségével 3x10 percre, az ischaemiás szakaszok után 10 perces reperfúziós időszakokkal (5. ábra). A korai távoli szervi preconditionált csoportban (RIPC-1, n=7) a műtét megelőzően 1 órával végeztük el a preconditionálást, míg a késleltetett távoli szervi preconditionált csoportban (RIPC-24, n=6) a műtét megelőzően 24 órával történtek a leszorítások. A preconditionált csoportok protokollja a preconditionálás kivételével megegyezett az I/R csoportéval.



5. ábra

A jobb hátsó végtag atraumatikus leszorítása (tourniquet)

3.2. Mérési és mintavételi protokoll

A mérési és mintavételi protokollt az I. táblázat foglalja össze. 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, fiziológiás 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.

I. táblázat: A mérési protokoll összefoglalása

	Alap	I45	R30	R60	R120
Vitalis paraméterek	o	o	o	o	o
Mikrokeringés	o	o	o	o	o
Sav-bázis, metabolitok, ionok	o	-	-	-	o
Haematologiai paraméterek	o	-	o	o	o
Szövettan	-	-	-	-	o

3.3. Vitalis paraméterek

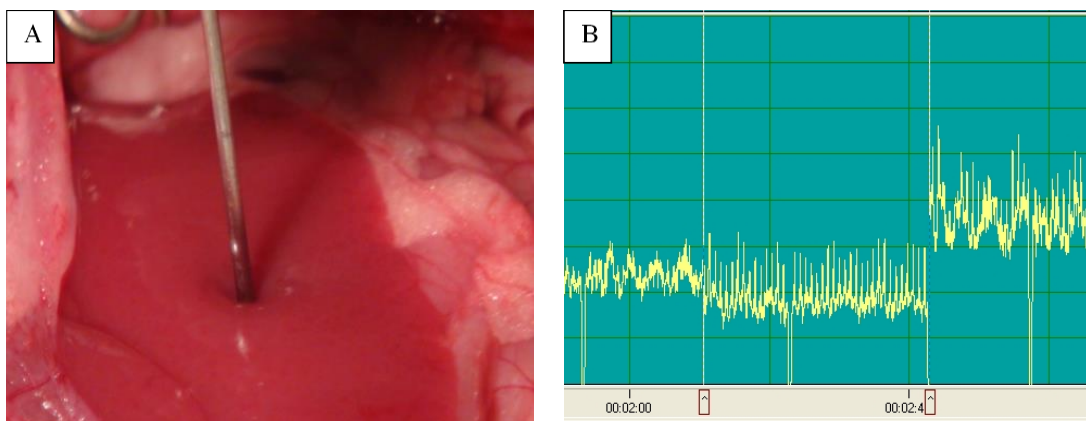
A pulzust, valamint az artériás középnyomást invazív módon mértük a kanülált artériához csatlakoztatott HaemoSys rendszer (Experimetria Kft., Magyarország) segítségével. A légzésfrekvencia meghatározása 60 másodpercen keresztül direkt számlálással történt. A testhőmérsékletet a rectumban mértük digitális 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 (6. ábra).

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,

hogyan 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 grafikusán 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 (Holloway és mtsai, 1977; Stern és mtsai, 1975, Obeid és mtsai, 1990).



6. ábra

Mikrokeringés mérés standard pencils fej segítségével a máj felszínén (A), és a jellegzetes mintázatú keringési görbe szoftveres alkalmazásban (B)

A mérést befolyásolhatja az adott szerv hőmérséklete, a szövet oxigenizációja, a légző- és izommozgások, az esetleges közeli nagyerek pulzációja, az emelkedett szérumban lévő lipid szint, a haemolysis, a külső zavaró fényforrások, illetve a mérést végző személy kezének tremorja (Leahy és mtsai, 2012).

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 (6. ábra, B) 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]).

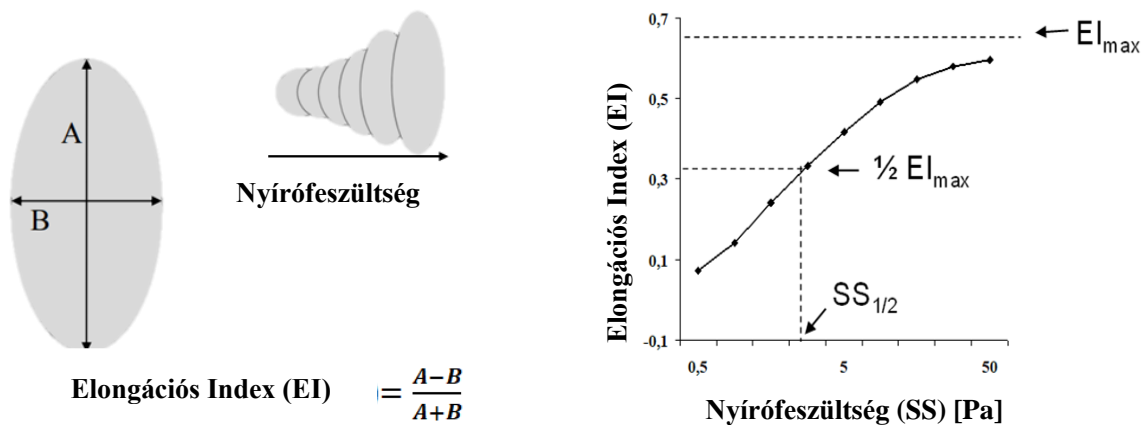
3.5.2. Haematologiai paraméterek

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], átlagos vörösvérsejt hemoglobin koncentráció (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 Osmoscan 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, ozmolalitás: ~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 (Hardeman és mtsai, 2007). 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 (7. ábra). Az illesztéshez lineáris transzformációt alkalmaztunk (Baskurt és mtsai, 2009, Baskurt és Meiselman, 2013).

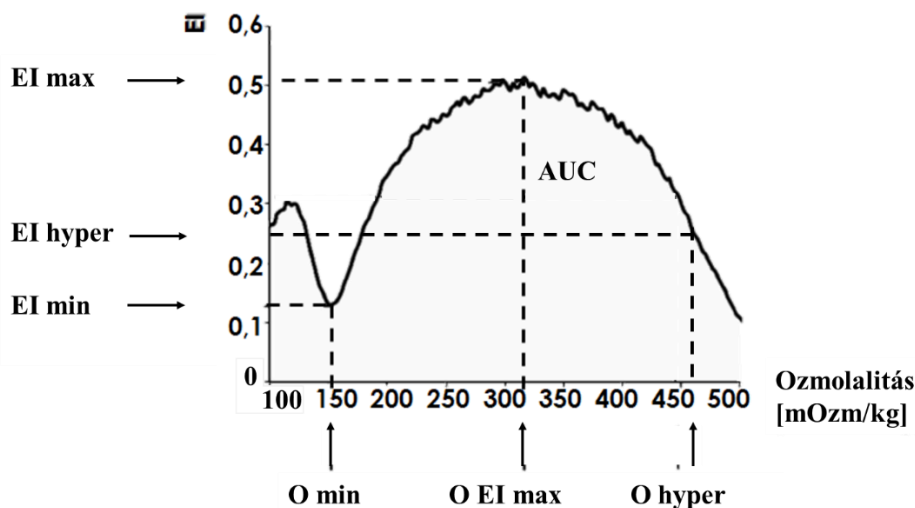


7. ábra

Az elongációs index (EI) számítása és az EI-nyírófeszültség görbe parametrizálása

3.5.4. Vörösvérsejt ozmotikus grádiens deformabilitás

A vörösvérsejt ozmotikus grádiens deformabilitásának (osmoscan) meghatározása a LoRRca MaxSis Osmoscan ektacytometer (Mechatronics BV, Hollandia) segítségével történt. Mérésenként 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. A mérés során jellegzetes alakú elongációs index – osmolalitás görbét kapunk (Clark és mtsai, 1983). A görbe nevezetes paraméterei a maximális EI, ennek feléhez tartozó EI a hyperozmolaris tartományban, a minimális EI a hypoozmolaris tartományban, az ezekhez tartozó oszmolaritás értékek, valamint a görbe alatti terület (8. ábra). Fenti paraméterekből tovább számítható az EI min és EI max különbsége (ΔEI), a hozzájuk tartozó oszolalitás értékek különbsége (ΔO), valamint ezek hányadosa ($\Delta EI/\Delta O$) (Németh és mtsai, 2015).

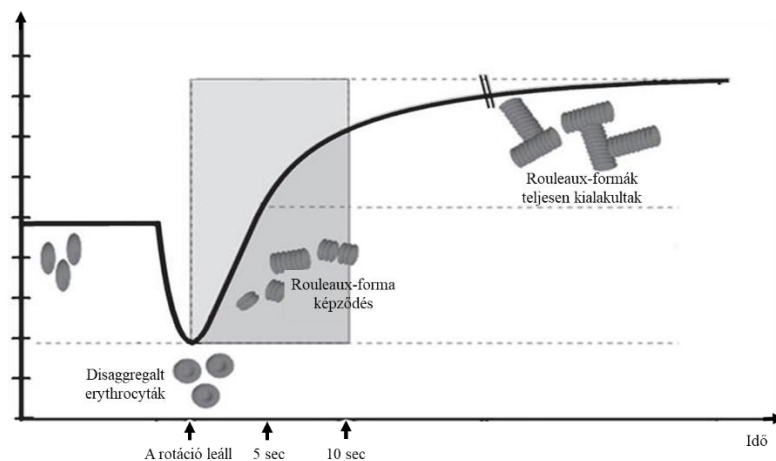


8. ábra

A vörösvérsejt ozmotikus grádiens deformabilitást jellemző görbe.

3.5.5. Vörösvérsejt aggregatio

A vörösvérsejt aggregatio meghatározása Myrenne MA-1 fényttranszmissziós 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 lehajtasakor széttéríti a lencsén. A mintára a tárgylemez felett lévő dióda infravörös fény bocsájt ki, miközben a készülék 600 s^{-1} sebesség-gradiens forgómozgással diszaggregálja 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, ami révén a sejtek és aggregátumok közötti tér kiszélesedik, ezáltal a fény-transzmisszió fokozódik (9. ábra). 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 (Hardeman és mtsai, 2007).



9. ábra

A vörösvérsejt aggregációt leíró intenzitás – idő görbe.

3.6. Szöveti vizsgálatok

Szöveti vizsgálat céljából mintavétel történt a májból, valamint eltávolításra került az ischaemiás és az ép vese is, melyeket parafin oldatos fixálást követően perjódsvav-Schiff (PAS) festéssel vizsgáltunk.

A veséből készült metszetek szöveti értékelésekor vizsgáltuk a tubuláris hámsejtek (TH) sejtmagjának festődését, a hyalin globulusok mennyiségét a TH-ben, a hydropicus degenerációt 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 szöveti 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. Statisztikai elemzés

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 féle t-próbát vagy Mann-Whitney tesztet használtunk, míg több csoport közti, valamint csoporton belüli adatok összehasonlítását egyirányú, vagy ismételt méréses 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 (10. ábra, A).

4.1.2. Artériás középnyomás

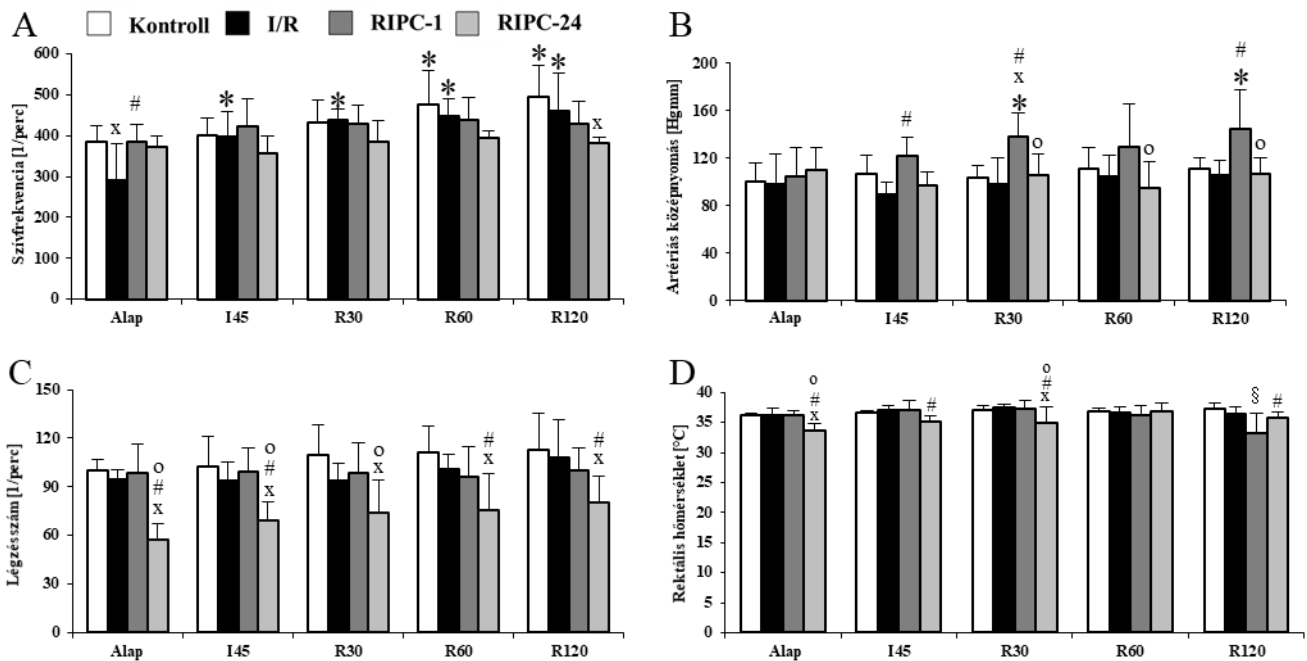
Az artériás középnyomás stabil volt a műtét ideje alatt az RIPC-1 csoport kivételével mindhárom másik csoportban. A korai preconditionált csoport értékei emelkedtek a kísérlet alatt, a reperfusio végére szignifikánsan a legmagasabbak voltak (I45: $p=0,0154$ vs. I/R; R30: $p=0,0074$ vs. kontroll, $p=0,0013$ 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) (10. ábra, B).

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 (10. ábra, C).

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 reperfúziós 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) (10. ábra, D).

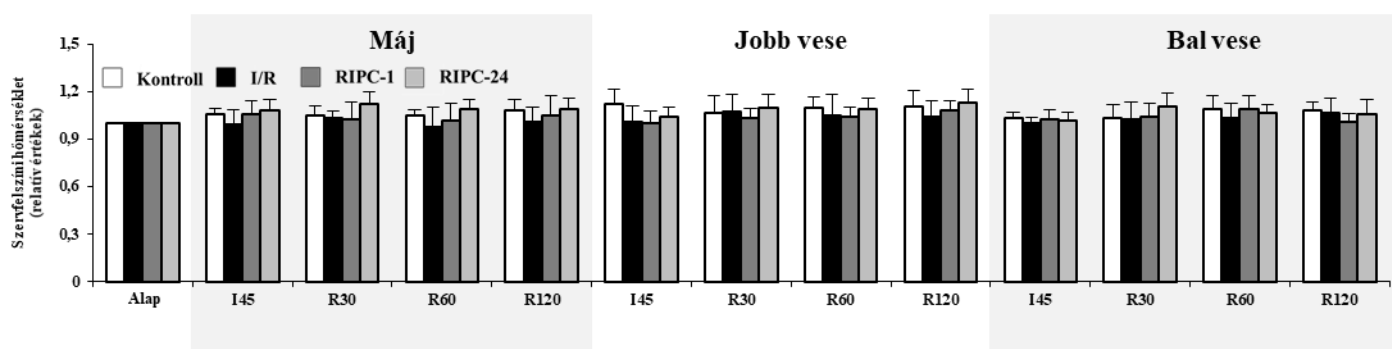


10. ábra

Változások a szívfrekvenciában (A), az artériás középnyomásban (B), a légzésszámban (C), illetve a rectalis hőmérsékletben (D)

Alap: laparotomiát követően, I45: ischaemia 45. perc, R30: reperfusio 30. perc, R60: reperfusio 60. perc, R120: reperfusio 120. perc. I/R: ischaemia-reperfusio csoport; RIPC-1: korai távoli szervi preconditionált csoport; RIPC-24: késleltetett távoli szervi preconditionált csoport
 Átlag ± SD; * $p<0,05$ vs. Alap, + $p<0,05$ vs. I45, x $p<0,05$ vs. kontroll, # $p<0,05$ vs. I/R, ° $p<0,05$ vs. RIPC-1, § $p<0,05$ vs. Összes

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 (11. ábra).



11. ábra

A szervfelszíni hőmérséklet változás relatív értékei, az értékek Alap értékkel való hányadosaként. Alap: laparotomiát követően, I45: ischaemia 45. perc, R30: reperfusio 30. perc, R60: reperfusio 60. perc, R120: reperfusio 120. perc. I/R: ischaemia-reperfusio csoport; RIPC-1: korai távoli szervi preconditionált csoport; RIPC-24: késleltetett távoli szervi preconditionált csoport.

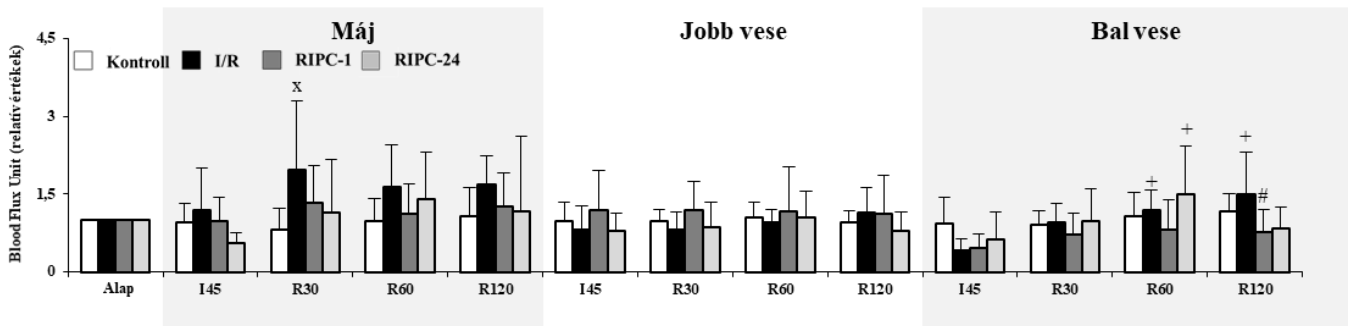
Átlag \pm SD

4.2. Microcirculatio

A máj mikrokeringését leíró BFU értékek relatív változásait a 14. ábra mutatja. 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 (12. ábra).

Az ischaemia-reperfusió 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 reperfusio alatt. Az RIPC-24 csoportban a BFU érték emelkedése a reperfusio 60. percéig tartott ($p=0,0085$ vs. I45), majd

közel az alap értékre csökkent, míg az I/R csoport értékei tovább emelkedtek a reperfusio végéig ($p=0,0011$ vs. I45, $p=0,0322$ vs. RIPC-1) (12. ábra).



12. ábra

A szöveti mikrokeringés változás relatív értékei (vs. alap).

Alap: laparotomiát követően, I45: ischaemia 45. perc, R30: reperfusio 30. perc, R60: reperfusio 60. perc, R120: reperfusio 120. perc. I/R: ischaemia-reperfusio csoport; RIPC-1: korai távoli szervi preconditionált csoport; RIPC-24: késleltetett távoli szervi preconditionált csoport

Átlag \pm SD; + $p < 0,05$ vs. I45, x $p < 0,05$ vs. kontroll, # $p < 0,05$ vs. I/R

4.3. Laboratóriumi paraméterek

4.3.1. Véggáz analízis

A kontroll csoport alap- és reperfusio 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 kismértékű 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 pCO_2 értékek közül az RIPC-24 csoport alapértéke emelkedett volt más csoportokhoz képest ($p=0,028$ vs. kontroll, $p=0,014$ vs. IR), 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: $p<0,001$).

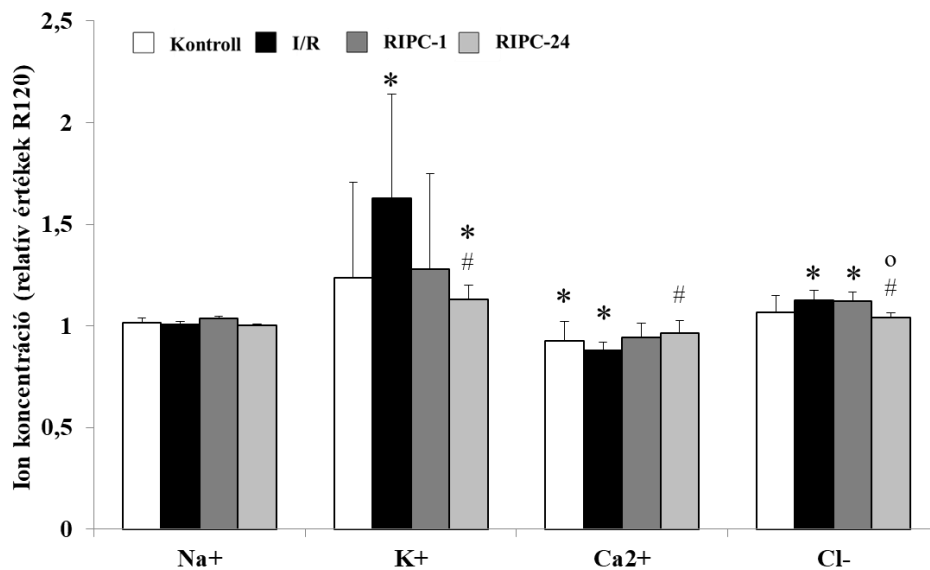
A bikarbonát szint alaphoz képest mért csökkenése minden csoportban megfigyelhető volt (kontroll: $p=0,003$; I/R: $p<0,001$; RIPC-1: $p=0,011$; RIPC-24: $p<0,001$), legenyhébb mértékben az RIPC-24 csoportban ($p=0,041$ vs. kontroll, $p=0,014$ vs. I/R, $p=0,019$ vs. RIPC-1). A legnagyobb mértékű bázishiány az I/R és az RIPC-1 csoportokban mutatkozott a kísérlet végén (II. táblázat).

II. táblázat. Véggáz és sav-bázis paraméterek változásai

Változó	Csoport	Alap	R120
pH	Kontroll	7,43 ± 0,05	7,44 ± 0,06
	I/R	7,42 ± 0,04	7,34 ± 0,22
	RIPC-1	7,46 ± 0,05	7,26 ± 0,14 *
	RIPC-24	7,39 ± 0,04	7,45 ± 0,02 *
pO_2 [Hgmm]	Kontroll	94,31 ± 9,7	97,24 ± 23,61
	I/R	88,51 ± 4,28	84,74 ± 15,71
	RIPC-1	92,23 ± 6,62	81,75 ± 39,81
	RIPC-24	88,4 ± 10,48	94,63 ± 7,77
pCO_2 [Hgmm]	Kontroll	41,58 ± 6,84	27,5 ± 5,81 *
	I/R	46,42 ± 7,74	26,64 ± 7,71 *
	RIPC-1	37,25 ± 8,8	36,05 ± 23,02
	RIPC-24	51,18 ± 5,61 ^{x#}	33,98 ± 4,51 *
HCO_3^- [mmol/l]	Kontroll	27,52 ± 1,87	17,56 ± 5,62 *
	I/R	30,15 ± 2,16	15,25 ± 6,01 *
	RIPC-1	26,28 ± 4,28	15,35 ± 6,38 *
	RIPC-24	31,34 ± 1,41	23,63 ± 2,56 ^{**x#o}
BE(ecf) [mmol/l]	Kontroll	3,28 ± 1,53	-7,3 ± 7
	I/R	5,78 ± 1,81	-10,38 ± 9,04
	RIPC-1	2,65 ± 3,65	-11,65 ± 6,76
	RIPC-24	6,5 ± 1,73	-0,18 ± 2,36
O ₂ szaturáció [%]	Kontroll	97,41 ± 0,82	96,36 ± 4,17
	I/R	96,82 ± 0,56	91,8 ± 14,49
	RIPC-1	97,51 ± 0,76	78,35 ± 38,43
	RIPC-24	96,18 ± 2,06	97,71 ± 0,59

Alap: laparotomiát követően, R120: reperfusio 120. perc. I/R: ischaemia-reperfusio csoport; RIPC-1: korai távoli szervi preconditionált csoport; RIPC-24: késleltetett távoli szervi preconditionált csoport
 Átlag ± S.D.; * $p<0,05$ vs. Alap, x $p<0,05$ vs. kontroll, # $p<0,05$ vs. I/R, ° $p<0,05$ vs. RIPC-1

A reperfusio 120. percében mért elektrolitok alapértékükhöz viszonyított relatív változásait az 13. ábra mutatja. 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) (13. ábra).



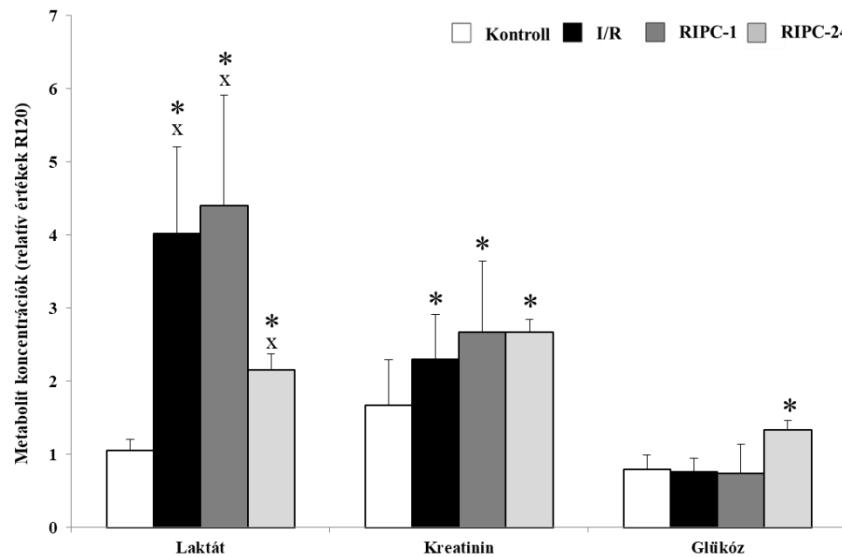
13. ábra

Az ion koncentrációk (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^-) alapértékhez viszonyított változásai a reperfusio 120. percében.

kontroll: kontroll csoport, I/R: ischaemia-reperfusio csoport; RIPC-1: korai távoli szervi preconditionált csoport; RIPC-24: késleltetett távoli szervi preconditionált csoport

Átlag \pm S.D.; * $p < 0,05$ vs. Alap, # $p < 0,05$ vs. I/R, ° $p < 0,05$ vs. RIPC-1

Az reperfusio 120. percében kapott metabolit szintekben az alapértékekhez viszonyított változásokat a 14. ábrán 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 ischaemia-reperfúziós 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) (14. ábra).



14. ábra

A metabolit koncentrációk (laktát, kreatinin, glükóz) alapértékhez viszonyított relatív változásai a reperfusio 120. percében
 I/R: ischaemia-reperfúzió csoport; RIPC-1: korai távoli szervi preconditionált csoport;
 RIPC-24: késleltetett távoli szervi preconditionált csoport
 Átlag ± S.D.; * $p < 0,05$ vs. Alap, + $p < 0,05$ vs. kontroll

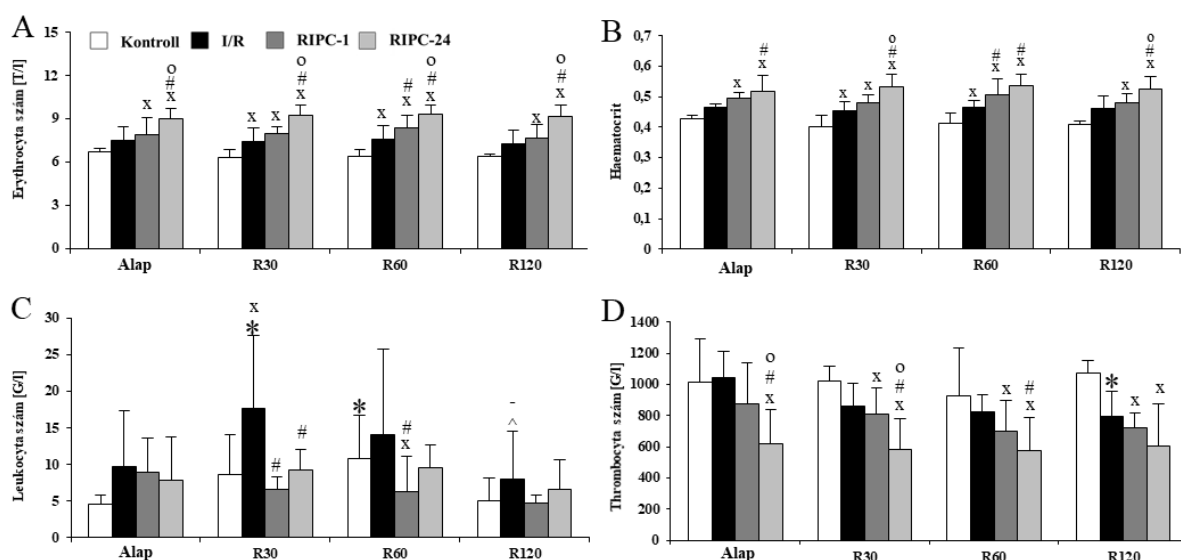
4.3.2. Haematologiai paraméterek

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) (15. ábra, A).

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) (15.ábra, B).

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) (15.ábra, C).

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) (15.ábra, D).



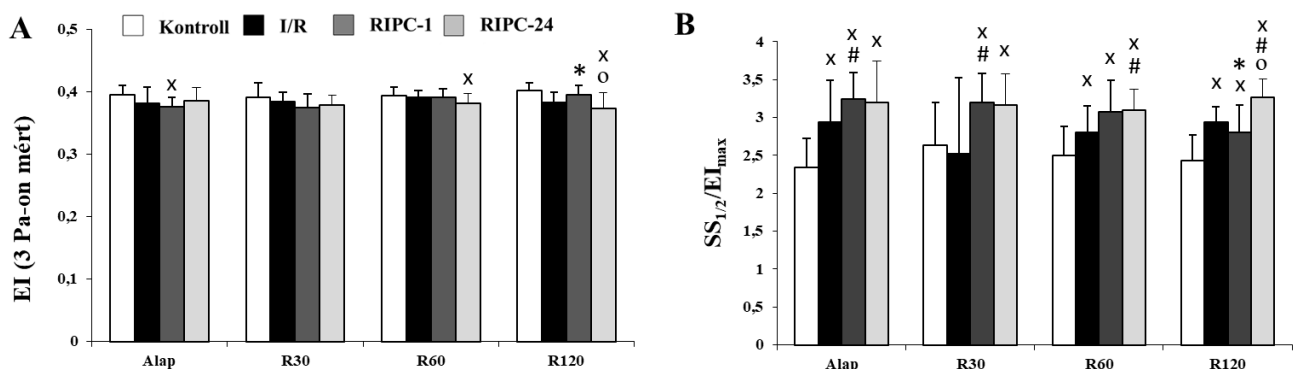
15. ábra

Haematologiai paraméterek változásai: erythrocytaszám (A), haematocrit (B), leukocytaszám (C) és thrombocytaszám (D).

Alap: laparotomiát követően, I45: ischaemia 45. perc, R30: reperfusio 30. perc, R60: reperfusio 60. perc, R120: reperfusio 120. perc. I/R: ischaemia-reperfusio csoport; RIPC-1: korai távoli szervi preconditionált csoport; RIPC-24: késleltetett távoli szervi preconditionált csoport
 Átlag \pm SD; * $p<0,05$ vs. Alap, ^ $p<0,05$ vs. R30, - $p<0,05$ vs. R60, x $p<0,05$ vs. kontroll, # $p<0,05$ vs. I/R, o $p<0,05$ vs. RIPC-1

4.3.3. Vörösvérsejt deformabilitás

A 3 Pa nyírófeszültségen mért elongációs indexet, valamint a deformabilitást jól jellemző $SS_{1/2}$ és EI_{max} hányadosát a 16. 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) (16. ábra, A).



16. ábra

A vörösvérsejt deformabilitás változásai. A 3 Pa-on mért elongációs index (A), valamint a maximális EI (EI_{max}) feléhez tartozó nyírófeszültség ($SS_{1/2}$) hányadosa.

Alap: laparotomiát követően, I45: ischaemia 45. perc, R30: reperfusio 30. perc, R60: reperfusio 60. perc, R120: reperfusio 120. perc. I/R: ischaemia-reperfusio csoport; RIPC-1: korai távoli szervi preconditionált csoport; RIPC-24: késleltetett távoli szervi preconditionált csoport
 Átlag \pm SD; * $p<0,05$ vs. Alap, x $p<0,05$ vs. kontroll, # $p<0,05$ vs. I/R, o $p<0,05$ 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 (16. ábra, B).

4.3.4. Vörösvérsejt ozmotikus grádiens deformabilitás

Az ozmotikus gradiens ektacytometria (osmoscan) értékeit a III. táblázatban foglaltuk össze. 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 megfigyelhetők voltak a reperfusiós 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 szignifikánssá.

III. táblázat. A vörösvérsejt ozmotikus grádiens deformabilitás változásai

Változó	Csoport	Alap	R120
EI min [au]	Kontroll	$0,139 \pm 0,01$	$0,138 \pm 0,009$
	I/R	$0,136 \pm 0,013$	$0,141 \pm 0,014$
	RIPC-1	$0,136 \pm 0,008$	$0,143 \pm 0,007$
	RIPC-24	$0,147 \pm 0,007$	$0,151 \pm 0,01$
EI max [au]	Kontroll	$0,554 \pm 0,023$	$0,559 \pm 0,009$
	I/R	$0,553 \pm 0,005$	$0,563 \pm 0,008$
	RIPC-1	$0,557 \pm 0,012$	$0,557 \pm 0,005$
	RIPC-24	$0,554 \pm 0,007$	$0,552 \pm 0,008$
EI hyper [au]	Kontroll	$0,277 \pm 0,011$	$0,279 \pm 0,004$
	I/R	$0,276 \pm 0,002$	$0,282 \pm 0,004$
	RIPC-1	$0,278 \pm 0,006$	$0,279 \pm 0,002$
	RIPC-24	$0,277 \pm 0,003$	$0,276 \pm 0,004$

III. táblázat. Folyt.

O min [mOsm/kg]	Kontroll	150,67 ± 3,72	154,2 ± 2,38
	I/R	150,42 ± 5,71	154,3 ± 7,76
	RIPC-1	148,16 ± 2,56	150,2 ± 2,16
	RIPC-24	145,8 ± 4,6	149,3 ± 6,28
O (EI max) [mOsm/kg]	Kontroll	305,4 ± 7,16	308,4 ± 12,66
	I/R	304,5 ± 8,8	317,83 ± 19,7
	RIPC-1	296,14 ± 9,04	304,4 ± 6,18
	RIPC-24	287,17 ± 14,41 x	294 ± 16,81 #
O hyper [mOsm/kg]	Kontroll	470 ± 6,68	476,5 ± 5,06
	I/R	453,75 ± 9,46	459,67 ± 9,61
	RIPC-1	449,14 ± 4,29	456,8 ± 2,38
	RIPC-24	434,3 ± 9,14 x	429,5 ± 27,61 x
AUC [au]	Kontroll	157,82 ± 7,87	158,7 ± 0,99
	I/R	152,9 ± 5,04	156,46 ± 4,72
	RIPC-1	155,71 ± 5,03	156,06 ± 2,39
	RIPC-24	150,71 ± 3,65 x	146,58 ± 11,01 x#o

Alap: laparotomiát követően, R120: reperfusio 120. perc. I/R: ischaemia-reperfusio csoport; RIPC-1: korai távoli szervi preconditionált csoport; RIPC-24: késleltetett távoli szervi preconditionált csoport
 Átlag ± SD; * p<0,05 vs. Alap, x p<0,05 vs. kontroll, # p<0,05 vs. I/R, o p<0,05 vs. RIPC-1

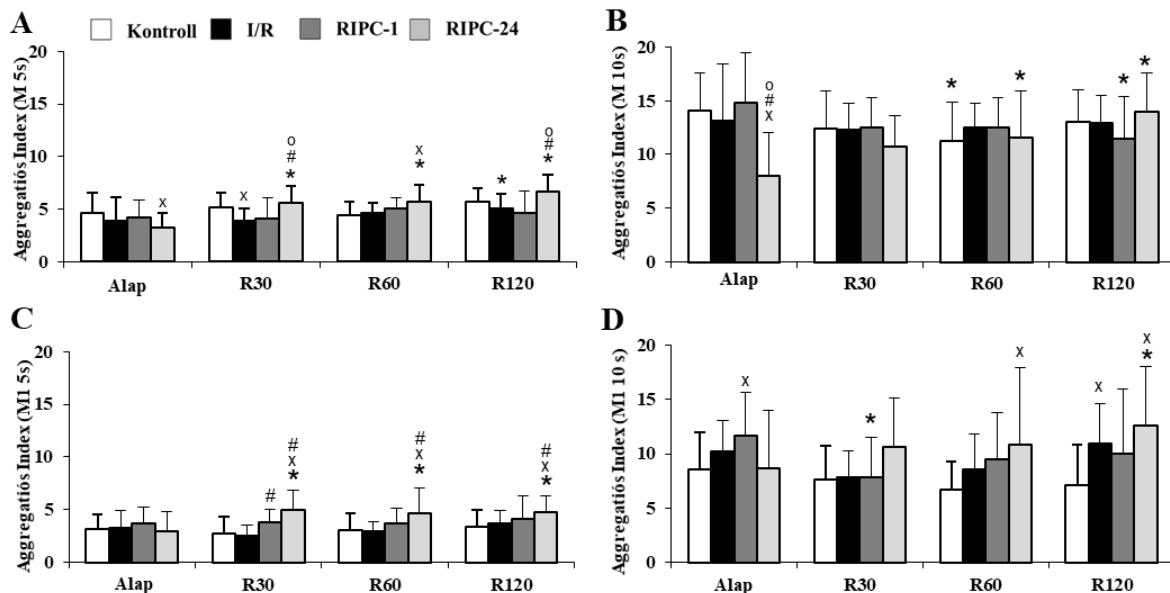
4.3.5. Vörösvérsejt aggregatio

Az aggregációs index változásai a különböző beállítások használatakor (M 5s, M 10s, M1 5s, M1 10s) a 17. 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) (17. ábra, A).

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) (17. ábra, B).

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) (17. ábra, C).

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) (17. ábra, D).



17. ábra

A vörösvérsejt aggregatio változásai M 5s (A), M 10s (B), M1 5s (C) and M1 10s (D) Alap: laparotomiát követően, R120: reperfusio 120. perc. I/R: ischaemia-reperfusio csoport; RIPC-1: korai távoli szervi preconditionált csoport; RIPC-24: késleltetett távoli szervi preconditionált csoport
 Átlag \pm SD; * $p<0,05$ vs. Alap, x $p<0,05$ vs. kontroll, # $p<0,05$ vs. I/R, o $p<0,05$ vs. RIPC-1

4.4. Szöveti 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

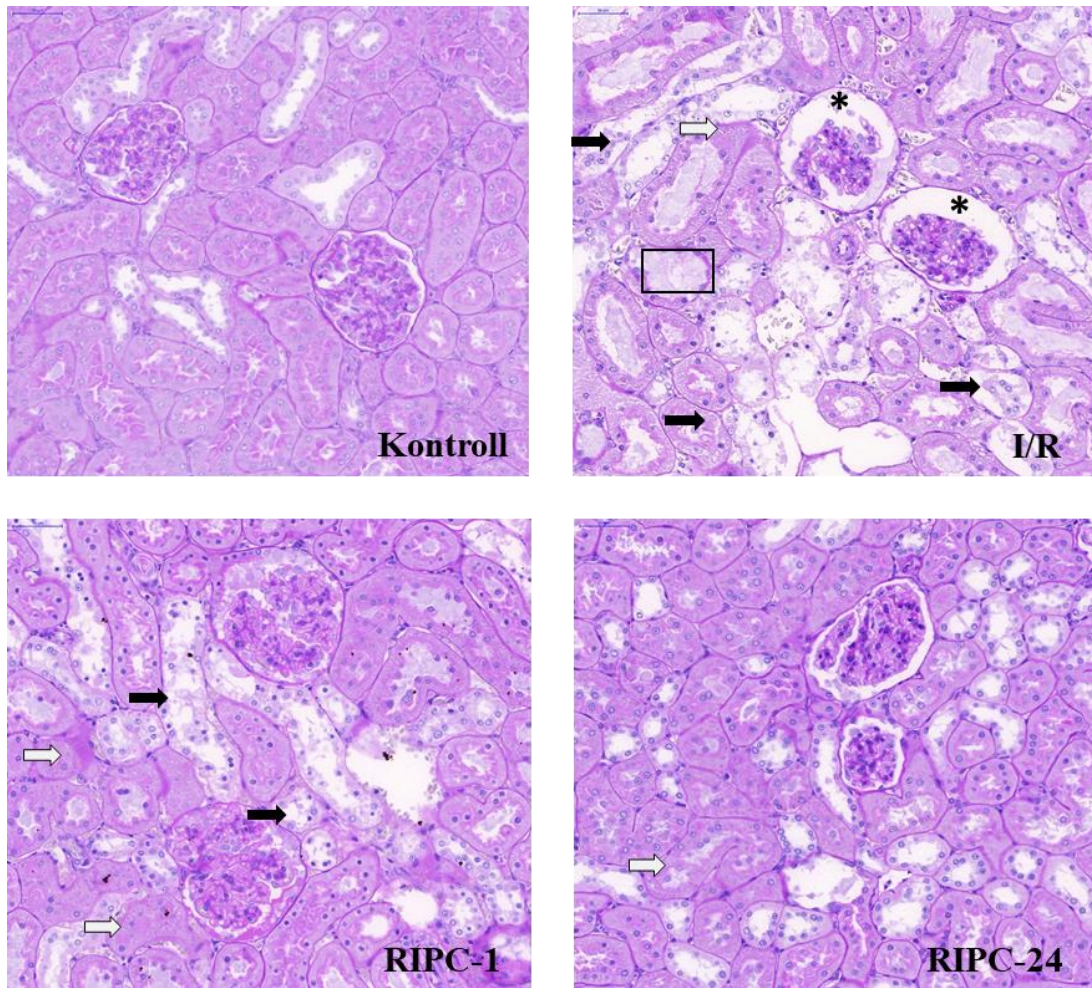
a legmagasabbak ($p=0,0017$ vs. RIPC-24). Az ischaemia-reperfúziós károsodásnak kitett csoportok közül az RIPC-24 csoportnak voltak a legalacsonyabb pontértékei ($p=0,0025$ vs. RIPC-1) (18. ábra, A és 19. ábra).

A tubularis hámsejtek legnagyobb mértékű hyalin degradációja és a legtöbb hyalin globulus az I/R csoportban volt, csakúgy, mint a legtöbb sérült glomerulus is. A vasa rectában tapasztalt pangás az RIPC-1 csoportban volt kifejezettebb, míg pathológiás kefeszegély mindhárom ischaemia-reperfúziós károsodásnak kitett csoportban megfigyelhető volt. A tubularis hámsejtek magfestődése csökkent, míg a tubularis nekrosis fokozódott az ischaemia hatására, míg ezen változások kisebb mértékben voltak megfigyelhetők preconditionált csoportokban. Az ischaemiának kitett vesékben fokozódott a hyalin degradációja és habos léziók jelentek meg a tubularis hámsejtek citoplazmájában, melyek a preconditionált csoportokban enyhébb mértékben jelentek meg.

A kontroll csoportban nem volt jelentősebb glomerularis, peritubularis kapilláris, illetve vasa recta pangás egyik oldali vesében sem. Az I/R csoport metszeteiben enyhe, vagy közepes mennyiségű pangás mutatkozott az ischaemiás vesékben.

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 (IV. táblázat, 19. ábra).

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 (19. ábra, B).

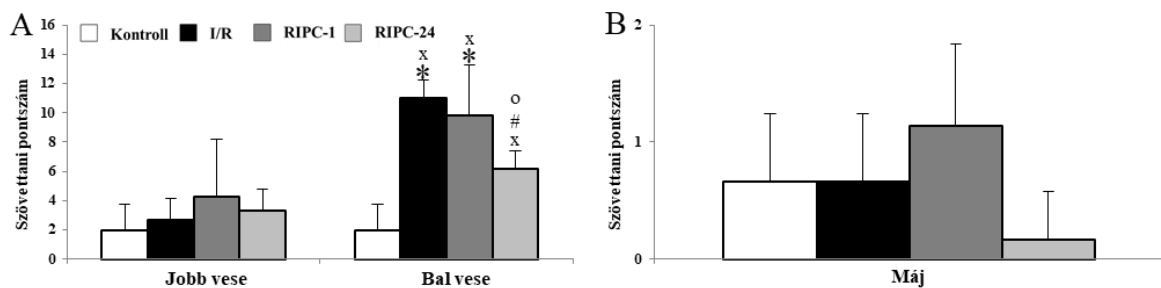


18. ábra

Perjódsva Schiff festés a vese szövettani mintákon

kontroll: kontroll csoport, I/R: ischemia-reperfusio csoport; RIPC-1: korai távoli szervi preconditionált csoport; RIPC-24: késleltetett távoli szervi preconditionált csoport

Fekete nyíl: tubularis necrosis, Fehér nyíl: hyalin globulusok, Bekeretezett rész: integritás csökkenés, *:sérült glomerulus



19. ábra

Összesített szövettani pontszámok a vesék (A) és máj (B) esetén

Kontroll: Kontroll csoport, I/R: ischaemia-reperfusio csoport; RIPC-1: korai távoli szervi preconditionált csoport; RIPC-24: késleltetett távoli szervi preconditionált csoport

Átlag ± (SD); * p<0,05 vs. Jobb vese, x p<0,05 vs. Kontroll, # p<0,05 vs. I/R, o p<0,05 vs. RIPC-1

IV. táblázat A vesék részletes szövettani pontszámai

Mért paraméter	Kontroll		I/R		RIPC-1		RIPC-24	
	<i>jobb vese</i>	<i>bal vese</i>	<i>jobb vese</i>	<i>bal vese</i>	<i>jobb vese</i>	<i>bal vese</i>	<i>jobb vese</i>	<i>bal vese</i>
Tubuláris hámsejt magfestődés	0	0	0	1,67 ± 0,58	0	1,43 ± 0,53	0	0,83 ± 0,41
Tubularis necrosis	0	0	0	1,67 ± 0,58	0	1,43 ± 0,53	0	0,83 ± 0,41
Hyalin glubulusok a tubularis hámsejtekben	1,33 ± 0,58	1,33 ± 0,58	1,67 ± 1,15	0,33 ± 0,58	1,29 ± 0,49	0,29 ± 0,49	1,5 ± 0,55	0,83 ± 0,76
Hydropicus degeneráció a tubularis hámsejtekben	0,33 ± 0,58	0,33 ± 0,58	0,67 ± 0,58	3 ± 0	0,29 ± 0,49	2 ± 0	0	0,83 ± 0,41
Glomeruláris pangás	0	0	0	0,67 ± 0,58	1,14 ± 1,21	0,86 ± 0,9	1,3 ± 0,52	1,17 ± 0,76
Peritubuláris kapilláris pangás	0	0	0	0,33 ± 0,58	0,57 ± 0,79	0,71 ± 0,76	0,17 ± 0,41	0
Vasa recta pangás	0,33 ± 0,58	0,33 ± 0,58	0	0,67 ± 0,58	0,86 ± 1,07	1,29 ± 0,76	0,17 ± 0,41	0,17 ± 0,41
Kefeszegély	0	0	0,33 ± 0,58	2,67 ± 0,58	0,14 ± 0,38	1,86 ± 0,38	0,17 ± 0,41	1,5 ± 0,84
<i>Összesített</i>	<i>2 ± 1,73</i>	<i>2 ± 1,73</i>	<i>2,67 ± 1,53</i>	<i>11 ± 1,73 *^x</i>	<i>4,29 ± 3,4</i>	<i>9,86 ± 1,86*^x</i>	<i>3,33 ± 1,21</i>	<i>6,17 ± 1,47^{x,#,o}</i>

Alap: laparotomiát követően, R120: reperfusio 120. perc.

I/R: ischaemia-reperfusio csoport; RIPC-1: korai távoli szervi preconditionált csoport; RIPC-24: késleltetett távoli szervi preconditionált csoport

Átlag ± SD; * p<0,05 vs. Jobb vese, x p<0,05 vs. kontroll, # p<0,05 vs. I/R, o p<0,05 vs. RIPC-1

5. MEGBESZÉLÉS

Ischaemia-reperfüsiós károsodás akkor jön létre, amikor egy szerv, vagy szövet vérellátása tartósan lecsökken, vagy megszűnik, majd ezt követően helyreáll. A kialakuló ischaemia alatt hypoxiás károsodás történik, majd a reperfüsió alatt megjelenő oxigén következtében szabad gyökök keletkeznek és gyulladási folyamatokat indukálnak. Az ischaemia-reperfüsió okozta károsodás pathomechanizmusával számtalan kutatás foglalkozott, azonban továbbra is vannak megválaszolatlan kérdések (Eltzschig és mtsai, 2011; Solomon és mtsai, 2011; Kanagasundaram és mtsai, 2015;).

Számos betegség vezet végstádiumú veseelégtelenséghez, melyben az egyetlen kuratív kezelési lehetőség a vesetranszplantáció, melynek súlyos szövődménye lehet a graft kilökődés, valamint a krónikus graft elégtelenség. Mindkét esetben fontos szerepet játszik a transzplantáció alatt bekövetkező ischaemia-reperfüsiós károsodás is (Tilney és Gluttmann 1997; Yarlagadda és mtsai, 2009; Selzner és mtsai, 2012; Ponticelli és mtsai, 2015). A vesét ér- illetve szívsebészeti, valamint traumatológiai beavatkozások során is érheti I/R károsodás, mely veseelégtelenséghez vezethet.

A károsodás csökkentése érdekében számos kísérletes eljárás létezik, melyeket sebészi, illetve nem sebészi csoportra oszthatunk. Utóbbiban olyan farmakológiai szerek tartoznak, melyek mérséklék a keletkező reaktív oxigéngyökök és egyéb károsító citokinek számát, fokozzák a keringést, illetve elősegítik különböző protektív faktorok termelődését. A sebészi beavatkozások, melyeket conditionálásnak nevezünk, több csoportra bonthatóak. Az ischaemiás célszervhez viszonyítva helyi, illetve távoli, míg az ischaemia és a conditionálás egymáshoz viszonyított időbelisége alapján pre-, per- és postconditionálást különböztetünk meg. Számos kutatás igazolta a távoli szervi ischaemiás preconditionálás kedvező hatását különböző szerveken kísérletes körülmények között (Tapuria és mtsai, 2008; Gassanov és mtsai, 2014; Kloner és mtsai, 2018; Magyar és mtsai, 2018), azonban a klinikai eredmények

ellentmondásosak, melynek háttérben számos tényező lehet (Lazaris és mtsai, 2009; Pedersen és mtsai, 2011 és 2012; Wever és mtsai, 2011; Kksal és mtsai, 2012; Veighey és mtsai, 2015; Zarbock és Kellum, 2016 Krogstrup és mtsai, 2017).

Ismert, hogy a kísérletes állatmodellek nem tudják tökéletesen szimulálni a humán szervezetben végbemenő komplex folyamatok összességét, és a klinikai kutatásokban is nehezen vizsgálható társbetegségeket, és más változók is szerepet játszanak a kísérletes és klinikai eredmények közötti eltérésben. A számos kutatás ellenére nincs egységes protokoll az RPC alkalmazásának időzítésére, azaz, hogy mennyi idővel a tervezett I/R károsodás előtt történjen a preconditionálás. Ennek egyik magyarázata lehet az, hogy az RPC-nek van egy korai, illetve egy késleltetett periódusa, amikor protektív hatást fejt ki és nem tisztázott, hogy melyik a kedvezőbb. A késleltetett RPC protokollokat 12, 24, 48, illetve 72 órával az I/R előtt is vizsgálták (Lim és mtsai, 2012). Fontos tényező ezen kívül az alkalmazott ischaemiás és reperfüziós ciklusok száma, illetve hossza, valamint a leszorított szerv, vagy szövet fajtája és a mennyisége.

Az RPC mechanizmusa felosztható egy effektorra, különböző mediátorokra, illetve célsejtekre. A mediátorok különböző folyamatokat indítanak el a célsejtekben, amelyek eredményeként bekapcsolnak a sejtek védőmechanizmusai. Az effektor maga a preconditionálási manőver, a különböző számban és ideig alkalmazott rövid ischaemia-reperfüziós periódusok, melyek következtében a sejtekből felszabaduló mediátorok bejutnak a keringésbe, illetve választ váltanak ki a neuralis hálózatban. Ez a célsejteken meghatározott szignál útvonalakat indít el, így a mitokondriális permeabilitási tranzíciós pórus (mPTP) záródását fogja okozni, ezáltal védve a manifeszt I/R károsodástól (Kharbanda és mtsai, 2009). A humoralis és neuralis útvonal egyaránt érintett, iNOS aktiváció történik, megváltozik a ROS és PKC- ϵ mennyisége, mKATP és sKATP csatorna moduláció következik be, antioxidáns

enzimek termelődnek (Kharbanda és mtsai, 2009; Lim és mtsai 2012; McCafferty és mtsai, 2014).

Kutatásunk célja egy korai, illetve egy késleltetett RIPC protokoll összehasonlítása volt 45 perces unilateralis veseischaemia, illetve azt követő 120 perces reperfüziós periódus esetén. Mindkét protokoll esetén a jobb hátsó végtagot szorítottuk le 3x10 percre, 10-10 perces reperfüziós időszakokkal, korai protokoll esetén 1 órával, késleltetett RIPC esetén 24 órával a vese I/R előtt. Feltételeztük, hogy a vese I/R jelentős károsodást fog okozni, a kísérleti állatok vitalis, haemodinamikai, haematologiai, haemorheologiai és microcirculációs paramétereiben, mely változásokat szövettani vizsgálattal is alá tudunk támasztani. Vizsgálni kívántuk, hogy hogyan befolyásolja az általunk alkalmazott korai, illetve késleltetett RIPC protokoll ezen paramétereket, illetve össze kívántuk hasonlítani, hogy mely protokoll bizonyul kedvezőbbnek a károsodás mértékében.

A reperfüziós periódus végén fiziológiás pH értékeket mértünk az RIPC-1 kivételével minden csoportban, azonban az I/R csoport értékei a fiziológiás tartomány alsó, az RIPC-24 csoportéi pedig annak felső határánál helyezkedtek el, míg a korai preconditionált csoport acidotikussá vált. A HCO_3^- szint minden csoportban szignifikánsan csökkent a kiindulási értékhez képest, a legcsekélyebb mértékben a RIPC-24 csoportban, mely arra enged következtetni, hogy metabolikus acidózis kezdett kialakulni mind a négy csoportban, melyet a respiratorikus mechanizmus kompenzált az RIPC-1 csoport kivételével. A légzésszám enyhe emelkedését a kontroll és az RIPC-24 csoportokban figyeltük meg. A légzésszám emelkedése a respiratorikus kompenzáció fokozódásával, így a $p\text{CO}_2$ szint csökkenésével jár, mely szignifikáns csökkenés megfigyelhető is volt valamennyi csoportban az RIPC-1 csoport kivételével. Az RIPC-1 csoport csökkent respiratorikus kompenzációjának egyik eleme lehet a nem szignifikáns mértékű oxigén szaturáció esés is. A laktát és K^+ koncentráció mindhárom I/R-nek kitett csoportban emelkedett, az RIPC-24 csoportban jelentősen kisebb mértékben,

mint az I/R, illetve korai csoportokban. A laktát szint emelkedés megfigyelhető anaerob folyamatokban, míg a K^+ koncentráció emelkedése a sejtkárosodás mértékével függ össze. Ezen paraméterekben tapasztalt eltérések a sejt anyagcsere folyamatain kívül hatással vannak a sejt morfológiájára, mely kedvezőtlenül befolyásolja a vörösvérsejtek aggregációját, illetve deformabilitását (Murry és mtsai, 1986; Ramesh és mtsai, 2004; Solomon és mtsai, 2011; Singh és mtsai, 2017).

A máj mikrokeringése a reperfusio ideje alatt különböző mértékben emelkedett az I/R károsodásnak kitett csoportokban, legjelentősebben az I/R csoportban. A jobb oldali I/R károsodás nélküli vesék esetén nem tapasztaltunk jelentősebb eltérést egyik csoportban sem, a vizsgált időszak alatt, míg a bal, ischaemiás vese esetén a BFU értékek emelkedése volt megfigyelhető az I/R és RIPC-24 csoportokban a reperfusio 60. percében, mely az I/R csoport esetén tovább emelkedett az elkövetkező 1 órában, míg az RIPC-24 csoport esetén normalizálódott a reperfusio végére. A kontroll és az RIPC-1 csoportokban jelentős eltérést nem tapasztaltunk. Korábbi kutatásban megfigyelték, hogy reperfusio során lokálisan hyperfusio következik be, valamint fokozódik a májban is a perfúzió, illetve, hogy az RIPC protokollok képesek csökkenteni ezen hyperfusiót (Tapuria és mtsai 2009).

Saját kutatási eredményeink is korrelálnak ezen megfigyelésekkel, azonban nem kizárható az altatáshoz használt altatószer hatása sem (Wada és mtsai, 1996). Egyes barbiturátokról ismert, hogy megváltoztatják a kapillárisok denzitását, valamint perfusioját arterio-venosus shuntok megnyitása révén (Franke és mtsai, 1982). A thiopental csökkenti a szisztémás vérnyomást, továbbá a légzésszámot is, valamint megfigyelték, hogy oxidatív stresszt okoz (Kavanagh és mtsai, 1991; Koshy és mtsai, 2003; Ahiskalioglu és mtsai, 2016). Bizonyították továbbá, hogy a thiopental direkt hatással bír a mikrokeringésre az erekben található simaizom szimpatikus, illetve paraszimpatikus beidegzésének befolyásolása révén (Gargiulo és mtsai, 2013).

A vörösvérsejt deformabilitás, illetve aggregatio mérésekor az alap értékek között is szignifikáns eltéréseket észleltünk. Fontos megemlíteni a preconditionálás szerepét, hiszen a rövid ischaemiás periódusok, mint a preconditionálásként alkalmazott 3x10 perc leszorítás képes befolyásolni a haemorheologiai paramétereket, illetve a mikrokeringést is (Lazaris és mtsai, 2008; Patschan és mtsai, 2012; Johnsen és mtsai, 2016). A preconditionálás miatt az összes kísérleti állat két alkalommal részesült altatásban. Egyszer a műtétet megelőző napon, egyszer pedig a tervezett beavatkozást megelőzően. Mind az anaesthesia, mind a preconditionálás akut fázis reakciót indíthat el a szervezetben, mely a szabadgyökök, illetve a kialakuló gyulladós reakció révén a vörösvérsejtek deformabilitásának romlásával, illetve fokozott aggregációs készségével jár, mely részben magyarázhatja a csoportok eltérő aggregációs, illetve deformabilitási mintázatát a kutatás ideje alatt (Murry és mtsai, 1986; Solomon és mtsai, 2011).

A leukocytaszám a legtöbb esetben fiziológiás tartományban mozgott (6-18 G/l), bár szignifikáns különbségek megfigyelhetőek voltak a kísérlet alatt. Az I/R csoportban egy fokozottabb, a kontroll csoportban pedig egy ehhez képest enyhébb, de szignifikáns emelkedés látszott a reperfusio első felében, mely az alap értékekhez tért vissza a reperfusio végére. Az RIPc csoportok értékei mindvégig stabilak voltak. Az emelkedés hátterében számos tényező állhat. Az állatok előkészítése, a metszés, preparálás és az erek kanülálása, akut fázis reakciót okozhatnak, továbbá maga az I/R károsodás, illetve a preconditionálásként végzett leszorítások is lokális gyulladós választ okozhatnak, azonban a preconditionálás összességében a szisztémás gyulladás csökkenésével jár (Singh és mtsai, 2017).

A vese I/R károsodást követő postischaemiás gyulladásban jelentős szerepet játszanak a károsodott endothel-, és tubularis sejtek, melyek különböző gyulladós mediátorokat szabadítanak fel (IL-1 β , IL-6, and IL-8, TNF- α , TGF- β , and MCP-1) (Ramesh és mtsai, 2004; Patschan és mtsai, 2012). A kutatási eredmények eltérőek az RIPc protokollok gyulladós

mediátorokra gyakorolt hatását illetően. MacAllister és mtsai nem találtak szignifikáns eltérést a szérumban IL-1 β , IL-6, TNF- α és INF- γ értékekben az RIPC, illetve a kontroll csoport között, míg Zapata-Chayira és mtsai a gyulladásos mediátorok szignifikáns csökkenését tapasztalták. (MacAllister és mtsai, 2015; Zapata-Chayira és mtsai, 2019). Pan és mtsai tanulmánya a késleltetett RIPC-t renoprotektívnek találták szeptikus akut veseelégtelenségben, az miR-21 gyulladáscsökkentő hatása révén (Pan és mtsai, 2019).

A máj szövettani vizsgálata nem mutatott szignifikáns eltérést a csoportok között. A kontroll és az I/R csoport értékei hasonlóak voltak, míg ehhez képest az RIPC-1 csoportban magasabb, az RIPC-24 csoportban pedig alacsonyabb értékeket kaptunk. Az ép, jobb vesék kapcsán jelentősebb eltérés nem volt, az RIPC csoportokban tapasztaltunk enyhe változásokat. A bal, ischaemiás vesék vizsgálatakor mindhárom I/R károsodásnak kitett csoport szignifikánsan magasabb pontszámmal rendelkeztek, mind a kontroll csoport, mind a jobb oldali vesékhez viszonyítva. Legnagyobb pontszámmal az I/R csoport rendelkezett, ehhez képest az RIPC-24 csoport értékei szignifikánsan alacsonyabbak voltak. A szövettani vizsgálat alapján a késleltetett protokoll mérsékelte az I/R okozta vesekárosodást, míg a korai preconditionálás nem befolyásolta szignifikánsan azt. Oral és mtsai tanulmányukban vizsgálták a korai távoli szervi preconditionálás hatását patkány vese I/R károsodás kapcsán, azonban ők azt találták, hogy a korai protokoll a kedvező szövettani vizsgálatok alapján (Oral és mtsai, 2018). A két kutatás különböző eredménye származhat az eltérő kutatási protokolltól, hiszen Oral és mtsai 4 órás reperfüziós időszakot figyeltek. Ezt a hypothesiszt erősíti Motta és mtsai kutatása, akik I/R vizsgálata kapcsán, 15 perces reperfüziós periódust követően nem találtak semmilyen szövettani eltérést az RIPC és I/R csoportok között (Motta és mtsai, 2018).

Az RIPC protokollok hatásossága függ az I/R károsodásnak kitett szervtől. Magyar és mtsai hasonló RIPC protokollokat alkalmaztak patkány partialis máj I/R modellen, azonban kutatásunktól eltérő szövettani eredményeket kaptak (Magyar és mtsai, 2018).

Az I/R okozta károsodás teljes pathomechanizmusa rendkívül összetett és számos pontja ismeretlen. A bekövetkező csökkenés a véráramlásban lokálisan hypoxiát, metabolit accumulációt, acidosist okoz. Szabad oxigényökök kerülnek a keringésbe, a vörösvérsejteket ért trauma következtében megváltoznak azok rheologiai paraméterei, melyek micro, illetve macrocirculációs szinten is csökkenést eredményeznek, így a véráramlás tovább csökken, kialakul egy magát erősítő „ördögi” kör (Baskurt és mtsai, 2007). Ezek alapján jól érthető az általunk vizsgált paraméterek szerepe a károsodás súlyosságának megítélésében.

Kutatásunk limitáló tényezői közé tartozik, hogy csupán 120 perces reperfúziós időszakot vizsgáltunk. A számos vizsgált paraméter a korai fázis jobb megértését teszi lehetővé, azonban a nagymennyiségű levett vér miatt meghatározza a vizsgálható reperfúzió hosszát. Ha tovább kívántuk volna növelni a vizsgált időszakot, és ez idő alatt mérni valamennyi paramétert, úgy értékeinket jelentősen torzította volna a csökkent vérmennyiség és a következményes kompenzációs folyamatok. Kutatásunkat közel azonos korú, hím patkányokon végeztük. Ismert, hogy a kísérletes állatok kora, illetve neme hatással van a haemorheologiai paraméterekre, illetve azok változására (Somogyi és mtsai, 2018).

A klinikai kutatásokban tapasztalt eltérések hátterében számos magyarázat állhat. Kísérletes állatmodellekben hiányzik a komorbiditás, limitált az alkalmazott gyógyszerek száma, illetve a legjobban hasonlító kísérleti állatmodellek esetén is eltérő lehet a collateralis hálózat, valamint a szöveti ischaemiás tolerancia is (Baskurt és mtsai, 2008; Németh és mtsai, 2018). Az optimális preconditionálási protokoll elkészítéséhez tehát további, jól megtervezett, hosszabb reperfúziós periódusú kísérletes kutatások szükségesek.

FŐBB EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK ÖSSZEGZÉSE

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. Szövetteni 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 thrombocyta számban 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. ÖSSZEFOGLALÁS

A vese ischaemia-reperfúziós károsodása napjainkig jelentős problémát jelent. A távoli szervi ischaemiás preconditionálásról ismert, hogy kísérletes körülmények között mérsékli az I/R okozta károsodást, azonban az ideális protokoll nem tisztázott. Alapvetően kétféle protokoll ismert: a korai, illetve a késleltetett RIPC, ezért célul tűztük ki ezen protokollok vizsgálatát patkány vese ischaemia-reperfúziós modellben, vitalis, haematológiai, haemorheológiai, haemodinamikai, sav-bázis, valamint szövettani vizsgálatok segítségével.

Általános anaesthesiában CrI:WI patkányokon laparotomia, a bal vese kipreparálása, valamint bal a. femoralis kanülálás történt. A kontroll csoportban egyéb beavatkozást nem végeztünk. Az I/R csoportban a bal vese ereit 45 percre leszorítottuk, majd 120 perces reperfúziót vizsgáltunk. Az RIPC csoportokban az ischaemia előtt 1 (RIPC-1), illetve 24 órával (RIPC-24), a jobb hátsó végtagot 3x10 percre leszorítottuk, 10-perces reperfúziós időközökkel. Műtét előtt, valamint a reperfúzió 30., 60. és 120. percében haematológiai, haemorheológiai paramétereket határoztunk meg. A reperfúzió 120. percében sav-bázis paramétereket, metabolit- és elektrolit-koncentráció értékeit mértük. Meghatároztuk az artériás középnyomást, szívfrekvenciát, légzésszámot, rectalis hőmérséklet, a máj és a vesék felszíni hőmérsékletét és mikrokeringését. A műtétet követően szövettani mintavétel történt.

Összefoglalásként elmondható, hogy az alkalmazott vese ischaemia jelentős romlást okozott valamennyi vizsgált paraméterben. Az RIPC-1 és az RIPC-24 protokollok különböző mértékben, de mérsékelték valamennyi változást. Bár a vizsgált laboratóriumi, hemodinamikai és vitalis paraméterek alapján nehezen eldönthető, hogy melyik távoli szervi preconditionálási protokoll a kedvezőbb az alkalmazott vese ischaemia-reperfúziós károsodás csökkentésére, a szövettani vizsgálatok jelentősen kedvezőbb eredményeket mutattak a késleltetett preconditionált csoportban. Az optimális protokoll meghatározásához további, hosszabb távú kutatások szükségesek.

SUMMARY

Renal ischemia-reperfusion injury is a significant problem till nowadays. Remote organ ischemic preconditioning is a known procedure to reduce I/R injury under experimental conditions, however, the ideal protocol is unclear. Basically, two types of protocols are known: early and delayed RIPC, so we aimed to investigate these protocols in a rat renal ischemia-reperfusion model using vital, hematological, hemorheological, hemodynamic, acid-base, and histological examinations.

In general anesthesia in Crl:WI rats laparotomy, left kidney dissection, and left a. femoral cannulation was performed, in addition, no other intervention was performed in the Control group. In the I/R group, the vessels of the left kidney were clamped for 45 min and then reperfusion was examined for 120 min. In the RIPC groups, 1 (RIPC-1) and 24 h (RIPC-24) before ischemia, respectively, the right hind limb was clamped for 3x10 min with 10-min reperfusion intervals. Hematological and hemorheological parameters were determined before surgery and at 30, 60, and 120 minutes of reperfusion. Acid-base parameters, metabolite, and electrolyte concentrations were measured at 120 minutes of reperfusion. Mean arterial pressure, heart rate, respiratory rate, rectal temperature, liver and kidney surface temperature, and microcirculation were determined. Histological sampling was performed after surgery.

In summary, the renal ischemia used caused significant deterioration in all parameters examined. Both the RIPC-1 and RIPC-24 protocols in varying levels, but moderated all changes. Although it is difficult to determine which remote organ preconditioning protocol is more favorable to reduce renal ischemia-reperfusion injury based on the laboratory, hemodynamic, and vital parameters studied, histological examinations showed significantly better results in the delayed preconditioned group. Further, longer-term research is needed to develop the optimal protocol.

7. AZ IRODALOMJEGYZÉK

7.1. Hivatkozott közlemények jegyzéke

1. Ahiskalioglu EO, Aydin P, Ahiskalioglu A, Suleyman B, Kuyruklyildiz U, Kurt N, et al. The effects of ketamine and thiopental used alone or in combination on the brain, heart, and bronchial tissues of rats. *Arch Med Sci.* 2018;14(3):645-54.
2. Babior BM, Peters WE. The superoxide producing enzyme of human neutrophils: further properties. *J Biol Chem.* 1981;256:2321-3.
3. Baskurt OK, Hardeman MR, Rampling MW, Meiselman HJ, Mechanisms of blood rheology alterations. In: *Handbook of Hemorheology and Hemodynamics* Amsterdam, The Netherlands: IOS Press; 2007. pp. 170-90.
4. Baskurt OK, Hardeman MR, Uyuklu M, et al. Parameterization of red blood cell elongation index - shear stress curves obtained by ektacytometry. *Scand J Clin Lab Invest.* 2009;69(7):777-88.
5. Baskurt OK, Meiselman HJ. Blood rheology and hemodynamics. *Semin Thromb Hemost.* 2003;29:435-50
6. Baskurt OK, Meiselman HJ. Data reduction methods for ektacytometry in clinical hemorheology. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2013;54(1):99-107.
7. Baskurt OK, Neu B, Meiselman HJ. Determinants of red blood cell aggregation. In: Baskurt OK, Neu B, Meiselman HJ, eds. *Red Blood Cell Aggregation*, CRC Press, Boca Raton, 2012. pp. 9–29.
8. Baskurt OK, Yalcin O, Meiselman HJ: Hemorheology and vascular control mechanisms. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2004;30:169-78.
9. Belzer FO, Southard JH. Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation* 1988;45(4):673–6
10. Bhattacharya A. Red blood cell mechanics. *J Indian Med Assoc.* 2011;109(9):668-70
11. Bonventre JV, Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *J Clin Invest.* 2011;121(11):4210-21.
12. Brandao ML, Roselino JES, Piccinato CE, Cherri J. Mitochondrial alterations in skeletal muscle submitted to total ischemia. *J Surg Res* 2003;110:235–40.
13. Calne RY, Pegg DE, Brown FL. Renal preservation by ice cooling: an experimental study relating to kidney transplantation from cadavers. *Br Med J* 1963;2(5358):651–5.
14. Carden DL. and Granger DN. Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury. *Journal of Pathology*; 2000;190: 255-66.
15. Chasis JA, Shohet SB. Red cell biochemical anatomy and membrane properties. *Annu Rev Physiol.* 1987;49:237-48.
16. Chertow GM, Burdick E, Honour M, Bonventre JV, Bates DW. Acute kidney injury, mortality, length of stay, and costs in hospitalized patients. *J Am Soc Nephrol.* 2005 Nov;16(11):3365-70.
17. Cicha I, Suzuki Y, Tateishi N, Maeda N. Changes of RBC aggregation in oxygenation-deoxygenation: pH dependency and cell morphology. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;284(6):H2335-42.
18. Clark MR, Mohandas N, Shohet SB. Osmotic gradient ektacytometry: comprehensive characterization of red cell volume and surface maintenance. *Blood.* 1983;61(5):899-910.
19. Coemans M, Susal C, Dohler B, et al. Analyses of the short- and long-term graft survival after kidney transplantation in Europe between 1986 and 2015. *Kidney Int.* 2018; 94:964–73.

20. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology* 2001;94:1133–8.
21. Collins GM, Bravo-Shugarman M, Terasaki P. Kidney preservation for transportation: initial perfusion and 30 hours' ice storage. *Lancet* 1969;294(7632):1219–22.
22. Copley AL. Fluid mechanics and biorheology. *Clin Hemorheol.* 1990;10(3):315-31.
23. Downes G, Hoffman R, Huang J, Belzer FO. Mechanism of action of washout solutions for kidney preservation. *Transplantation* 1973;16(1):46–53.
24. Eltzschig H, Eckle T. Ischemia and reperfusion – from mechanism to translation. *Nat Med.* 2011;17(11):1391-401.
25. Evans EA, La Celle PL. Intrinsic material properties of the erythrocyte membrane indicated by mechanical analysis of deformation. *Blood.* 1975;45(1):29-43
26. Fåhræus R, Lindqvist T., „The viscosity of the blood in narrow capillary tubes”. *Am J Physiol* 1931;96,5628.
27. Fåhræus R. „Die Strömungsverhältnisse und die Verteilung der Blutzellen im Gefäßsystem”. *Klinische Wochenschrift* 7, 1928. pp. 100-6.
28. Franke N, Endrich B, Laubenthal H, Peter K, Messmer K. The effect of pentobarbital on the microcirculation of skeletal muscles and the subcutis. An animal-experimental study. *Anasth Intensivther Notfallmed.* 1982;17(1):11-4.
29. Gargiulo S, Gramanzini M, Liuzzi R, Greco A, Brunetti A, Vesce G. Effects of some anesthetic agents on skin microcirculation evaluated by laser Doppler perfusion imaging in mice. *BMC Vet Res.* 2013;17;9:255. doi: 10.1186/1746-6148-9-255.
30. Gassanov N, Nia AM, Caglayan E, Er F. Remote ischemic preconditioning and renoprotection: from myth to a novel therapeutic option? *J Am Soc Nephrol.* 2014;25(2):216-24.
31. Gori T, Lisi M, Forconi S. Ischemia and reperfusion: the endothelial perspective. A radical view. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2006;35(1-2):31-4.
32. Granger DN, Korthuis RJ. Physiologic mechanism of postischemic tissue injury. *Annu Rev Physiol.* 1995;57:311-32.
33. Granger DN, Kvietys PR. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biol.* 2015;6:524-51.
34. Granger DN. Ischemia reperfusion: mechanisms of microvascular dysfunction and the influence of risk factors for cardiovascular disease. *Microcirculation;* 1999;6:167-78.
35. Granger DN. Role of Xantine oxidase and granulocytes in ischaemia reperfusion injury. *Am J Physiol.* 1988;255:H1269-75.
36. Günay E, Çelebi T, Şen S, Aşçı G, Sarsik Kumbaracı B, Gökalp C, Yılmaz M, Töz H. Investigation of the Factors Affecting Allograft Kidney Functions: Results of 10 Years. *Transplant Proc.* 2019;51(4):1082-5. doi: 10.1016/j.transproceed.2019.02.014.
37. Hardeman MR, Goedhart PT, Shin S. Methods in hemorheology. In: Baskurt OK, Hardeman MR, Rampling MW, Meiselman HJ, editors. *Handbook of Hemorheology and Hemodynamics.* Amsterdam: IOS Press; 2007. p. 242-66.
38. Hoek JB, Walajtys Rode E, and Wang X. Hormonal stimulation, mitochondrial Ca²⁺ accumulation, and the control of the mitochondrial permeability transition in intact hepatocytes. *Mol. Cell Biochem;* 1997;74:173-9.
39. Holloway GA Jr, Watkins DW. Laser Doppler measurement of cutaneous blood flow. *J Invest Dermatol.* 1977;69(3):306-9.
40. Hu J, Liu S, Jia P, Xu X, Song N, Zhang T, et al. Protection of remote ischemic preconditioning against acute kidney injury: a systematic review and metaanalysis. *Crit Care.* 2016;20(1):111.

41. Jiang SH, Kennard AL, Walters GD. Recurrent glomerulonephritis following renal transplantation and impact on graft survival - Europe PMC Article - Europe PMC. *BMC Nephrol* 2018; 19:344–55.
42. Johnsen J, Pryds K, Salman R, Løfgren B, Kristiansen SB, Bøtker HE. The remote ischemic preconditioning algorithm: effect of number of cycles, cycle duration and effector organ mass on efficacy of protection. *Basic Res Cardiol*. 2016;111(2):10.
43. Kanagasundaram NS. Pathophysiology of ischaemic acute kidney injury. *Ann Clin Biochem*. 2015;52(Pt 2):193-205.
44. Kavanagh B, Ryan M, Cunningham A: Myocardial contractility and ischaemia in the isolated perfused rat heart with propofol and thiopentone. *Can J Anaesth* 1991;38(5): 634-9.
45. Kharbanda RK, Nielsen TT, Redington AN. Translation of remote ischaemic preconditioning into clinical practice. *Lancet*. 2009;374(9700):1557-65.
46. Kksal C, Ercan M, Bozkurt AK. Hemorheological variables in critical limb ischemia. *Int Angiol*. 2002;21(4):355-9.
47. Kloner RA: Clinical Application of Remote Ischemic Preconditioning. *Circulation*. 2009;119:776–8.
48. Koshy TA, Mahabala TH, Srikantu J, Sanmathi S: Thiopentone-midazolam mixture as an induction agent for general anesthesia on ‘in-patients’. *Indian J Anesth* 2003;47(4): 129–33.
49. Krogstrup NV, Oltean M, Nieuwenhuijs-Moeke GJ, Dor FJ, Møldrup U, Krag SP et al. Remote ischemic conditioning on recipients of deceased renal transplants does not improve early graft function: a multicenter randomized, controlled clinical trial. *Am J Transplant*. 2017;17(4):1042-9.
50. Kurose I, Granger DN. Evidence implicating xanthine-oxidase and neutrophils in reperfusion-induced microvascular dysfunction. *Ann NY Acad Sci*. 1994;723:158-79.
51. Kurtz I. Renal Tubular Acidosis: H⁺/Base and Ammonia Transport Abnormalities and Clinical Syndromes. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2018;25(4):334-50.
52. Kviety PR, Granger DN. Endothelial cell monolayers as a tool for studying microvascular pathophysiology. *Am J Physiol*. 1997;273: 1189-99.
53. Lazaris AM, Maheras AN, Vasdekis SN, Karkaletsis KG, Charalambopoulos A, Kakisis JD et al. Protective effect of remote ischemic preconditioning in renal ischemia/reperfusion injury, in a model of thoracoabdominal aorta approach. *J Surg Res*. 2009;154(2):267-73. doi: 10.1016/j.jss.2008.06.037.
54. Leahy MJ, *Microcirculation Imaging*. Hoboken: Wiley-Blackwell; 2012
55. Legendre C, Canaud G, Martinez F. Factors influencing long-term outcome after kidney transplantation. *Transpl Int*. 2014; 27:19–27.
56. Levy MN. Oxygen consumption and blood flow in the hypothermic, perfused kidney. *Am J Physiol* 1959;197(5):1111–4.
57. Lim SY, Hausenloy DJ. Remote ischemic conditioning: from bench to bedside. *Front. Physiol*. 2012;3:27.
58. Lipowsky HH: *Microvascular rheology and hemodynamics*. *Microcirculation* 2005;12:5-15.
59. Lote CJ. (2012). *Principles of Renal Physiology*. Springer.
60. MacAllister R, Clayton T, Knight R, Robertson S, Nicholas J, Motwani M et al. Remote preconditioning for Protection Against Ischaemia – Reperfusion in renal transplantation (REPAIR): a multicentre, multinational, double-blind, factorial designed randomised controlled trial. Southampton (UK): NIHR Journals Library; 2015
61. Magyar Zs, Mester A, Nadubinszky G, Varga G, Ghanem S, Somogyi V, Tanczos B, Deak A, Bidiga L, Oltean M, Peto K, Nemeth N. Beneficial effects of remote organ

- ischemic preconditioning on micro-rheological parameters during liver ischemia-reperfusion in the rat. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2018;70(2):181-90. doi: 10.3233/CH-170351.
62. Magyar Zs, Varga G, Mester A, Ghanem S, Somogyi V, Tanczos B, Deak A, Bidiga L, Peto K, Nemeth 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.* 2018;33(7):597-608.
 63. Manno S, Takakuwa Y, Mohandas N. Identification of a functional role for lipid asymmetry in biological membranes: Phosphatidylserine-skeletal protein interactions modulate membrane stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:1943–8.
 64. Matas AJ. Recurrent disease after kidney transplantation: it is time to unite to address this problem! *Am J Transplant* 2006; 6:2527–8.
 65. McCafferty K, Forbes S, Thiemermann C, Yaqoob MM. The challenge of translating ischemic conditioning from animal models to humans: the role of comorbidities. *Dis Model Mech.* 2014;7(12):1321-33
 66. Meiselman HJ, Morphological determinants of red cell deformability. *Scand J Clin Lab Invest.* 1981;Suppl 156:27-34.
 67. Mohandas N, Chasis JA. Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids. *Semin Hematol* 1993;30:171–92.
 68. Mohandas N, Gallagher PG. Red cell membrane: past, present, and future. *Blood* 2008;112:3939–48.
 69. Motta GL, Souza PC, Santos EBD, Bona SR, Schaefer PG, Lima CAT et al. Effects of remote ischemic preconditioning and topical hypothermia in renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Acta Cir Bras.* 2018;33(5):396-407.
 70. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 1986;74(5):1124-36.
 71. Murugan R, Kellum JA. Acute kidney injury: what's the prognosis?. *Nat Rev Nephrol.* 2011;7(4):209-17. doi: 10.1038/nrneph.2011.13.
 72. Nanobashvili J, Neumayer C, Fuegl A, Blumer R, Prager M, Sporn E, Polterauer P, Malinski T, Huk I. Development of 'no-reflow' phenomenon in ischemia/reperfusion injury: failure of active vasomotility and not simply passive vasoconstriction. *Eur Surg Res.* 2003;35(5):417-24.
 73. Nanobashvili J, Neumayer C, Fuegl A, Sporn E, Prager M, Polterauer P, Malinski T, Huk I. Ischaemia/reperfusion injury of skeletal muscle: mechanism, morphology, treatment strategies, and clinical applications. *Eur Surg* 2002;34:83–9.
 74. Nemeth N, Deak A, Szentkereszty Zs, Peto K. Effects and influencing factors on hemorheological variables taken into consideration in surgical pathophysiology research. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2018;69(1-2):133-40.
 75. Nemeth N, Kiss F, Miszti-Blasius K. Interpretation of osmotic gradient ektacytometry (osmoscan) data: a comparative study for methodological standards. *Scand J Clin Lab Invest.* 2015;75(3):213-22.
 76. Neu B, Meiselman HJ. Red blood cell aggregation. In: Baskurt OK, Hardeman MR, Rampling MW, Meiselman HJ, eds. *Handbook of Hemorheology and Hemodynamics.* IOS Press, Amsterdam, 2007, pp. 114–136.
 77. Obeid AN, Barnett NJ, Dougherty G, Ward G. A critical review of laser Doppler flowmetry. *J Med Eng Technol.* 1990;14(5):178-81.
 78. Ojo AO, Wolfe RA, Held PJ, Port FK, Schumouder RL. Delayed graft function: risk factors and implications for renal allograft survival. *Transplantation* 1997;63(7):968–74.

79. Oral K, Akan M, Özkardeşler S, Boztaş N, Ergür BU, Güneli ME et al. Comparison of Direct and Remote Ischaemic Preconditioning of Renal Ischaemia Reperfusion Injury in Rats. *Turk J Anaesthesiol Reanim.* 2018;46(6):453-61.
80. Pan T, Jia P, Chen N, Fang Y, Liang Y, Guo M, Ding X. Delayed Remote Ischemic Preconditioning Confers Renoprotection against Septic Acute Kidney Injury via Exosomal miR-21. *Theranostics.* 2019;9(2):405-23.
81. Patschan D, Patschan S, Müller GA. Inflammation and Microvasculopathy in Renal Ischemia Reperfusion Injury. *J Transplant.* 2012;2012:7641-54.
82. Pedersen KR, Ravn HB, Povlsen JV, Schmidt MR, Erlandsen EJ, Hjortdal VE. Failure of remote ischemic preconditioning to reduce the risk of postoperative acute kidney injury in children undergoing operation for complex congenital heart disease: A randomized single-center study. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2012;143(3):576-83.
83. Popel AS, Johnson PC Microcirculation and hemorheology. *Ann Rev Fluid Mech.* 2005;37:43-69.
84. Quiroga I, McShane P, Koo DD, et al. Major effects of delayed graft function and cold ischaemia time on renal allograft survival. *Nephrol Dial Transplant* 2006;21:1689–96.
85. Ramesh G, Reeves WB. Inflammatory cytokines in acute renal failure. *Kidney Int Suppl.* 2004;(91):S56-61.
86. Abbas F, El Kossi M, Jin JK, Sharma A, Halawa A. Recurrence of primary glomerulonephritis: Review of the current evidence. *World J Transplant.* 2017;7(6):301-16. doi:10.5500/wjt.v7.i6.301
87. Saxena P, Newman MA, Shehatha JS, Redington AN, Konstantinov IE. Remote ischemic conditioning: evolution of the concept, mechanisms, and clinical application. *J Card Surg.* 2010;25(1):127-34. doi: 10.1111/j.1540-8191.2009.00820.x.
88. Selzner N, Boehnert M, Selzner M. Preconditioning, postconditioning, and remote conditioning in solid organ transplantation: basic mechanisms and translational applications. *Transplant Rev.* 2012;26(2):115-24.
89. Singh L, Randhawa PK, Singh N, Jaggi AS. Redox signaling in remote ischemic preconditioning-induced cardioprotection: Evidences and mechanisms. *Eur J Pharmacol.* 2017;809:151-5.
90. Solomon H. Opportunities and challenges of expanded criteria organs in liver and kidney transplantation as a response to organ shortage. *Mo Med.* 2011;108(4):269-74.
91. Somogyi V, Peto K, Deak A, Tanczos B, Nemeth N. Effects of aging and gender on micro-rheology of blood in 3 to 18 months old male and female Wistar (CrI:WI) rats. *Biorheology.* 2018;54(5-6):127-40.
92. Stern MD. In vivo evaluation of microcirculation by coherent light scattering. *Nature* 1975;254(5495):56–8.
93. Szokoly M, Nemeth N, Brath E, Acs G, Hamar J, Miko I, Furka I. Experimental "functional amputate model" in ischemia-reperfusion. *Magy Seb.* 2005;58 (2): 138-43.
94. Tapuria N, Junnarkar SP, Dutt N, Abu-Amara M, Fuller B, Seifalian AM et al. Effect of remote ischemic preconditioning on hepatic microcirculation and function in a rat model of hepatic ischemia reperfusion injury. *HPB (Oxford).* 2009; 11(2): 108–17.
95. Tapuria N, Kumar Y, Habib MM, Abu Amara M, Seifalian AM, Davidson BR. Remote ischemic preconditioning: a novel protective method from ischemia reperfusion injury - a review. *J Surg Res.* 2008;150(2):304-30.
96. Tilney NL, Guttman RD. Effects of initial ischemia/reperfusion injury on the transplanted kidney. *Transplantation.* 1997;64(7):945-7.
97. Toth K, Juricskay I. Rheologiai alapfogalmak. In Bernath SI, Pongracz E. (szerk) *A klinikai haemorheologia alapjai.* Budapest Kornetas Kiado, 1999. pp. 13-24.

98. Uffing A, Pérez-Sáez MJ, la Manna G, et al. A large, international study on posttransplant glomerular diseases: the TANGO project. *BMC Nephrol.* 2018;19:236–9
99. Veighey K, MacAllister R: Clinical applications of remote ischaemic preconditioning in native and transplant acute kidney injury. *Pediatr Nephrol.* 2015;30(10):1749-59.
100. Versteilen AM, Di Maggio F, Leemreis JR, Groeneveld AB, Musters RJ, Sipkema P. Molecular Mechanisms of Acute Renal Failure following Ischemia/Reperfusion. *Int J Artif Organs.* 2004;27(12):1019-29.
101. Wada DR, Harashima H, Ebling W, Osaki EW, Stanski DR. Effects of thiopental on regional blood flows in the rat. *Anesthesiology.* 1996;84(3):596-604.
102. Wever KE, Warle MC, Wagener FA, van der Hoorn JW, Masereeuw R, van der Vliet JA et al. Remote ischaemic preconditioning by brief hind limb ischaemia protects against renal ischaemia-reperfusion injury: The role of adenosine. *Nephrol Dial Transplant.* 2011;26(10):3108-2117.
103. Yarlagadda SG, Coca SG, Formica Jr RN, Poggio ED, Parikh CR. Association between delayed graft function and allograft and patient survival: A systematic review and meta-analysis. *Nephrol Dial Transplant.* 2009;24(3):1039-47.
104. Zapata-Chavira H, Hernández-Guedea M, Jiménez-Pérez JC, Pérez-Rodríguez E, Muñoz-Espinosa L, Muñoz-Maldonado Get al. Modulation of Remote Ischemic Preconditioning by Proinflammatory Cytokines in Renal Transplant Recipients. *J Invest Surg.* 2019;32(1):63-71.
105. Zarbock A, Kellum JA. Remote Ischemic Preconditioning and Protection of the Kidney--A Novel Therapeutic Option. *Crit Care Med.* 2016;44(3):607-16.
106. Zuk A, Bonventre JV. Recent advances in acute kidney injury and its consequences and impact on chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2019;28(4):397-405. doi: 10.1097/MNH.0000000000000504.

7.2. Az értekezés alapjául szolgáló és egyéb *in extenso* közlemények hitelesített listája



**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.



8. TÁRGYSZAVAK

ischaemia-reperfüsiós károsodás

vese ischaemia

ischaemiás conditionálás

távoli szervi preconditionálás

mikrokeringés

haemorheologia

haematologia

ischemia-reperfusion injury

renal ischemia

ischemic preconditioning

remote organ preconditioning

microcirculation

haemorheology

hematology

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek **Prof. Dr. Németh Norbert** Tanszékvezető Úrnak, aki bátorított, hogy merjek belekezdeni a PhD képzésbe, támogattott 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 támogattott 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.

10. FÜGGELÉK

Az értekezés alapját képező *in extenso* közlemények másolatai