

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Dr. Gál Kristóf

**A RHEOPHERESIS KEZELÉS ANGIOLÓGIAI
HATÁSAINAK TANULMÁNYOZÁSA
HYPERVISCOSITÁSSAL SZÖVŐDŐ DIABETESSES
LÁB SYNDROMÁBAN**

DEBRECENI EGYETEM

LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2023

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**A RHEOPHERESIS KEZELÉS ANGIOLÓGIAI
HATÁSAINAK TANULMÁNYOZÁSA
HYPERVISCOSITÁSSAL SZÖVŐDŐ DIABETESSES
LÁB SYNDROMÁBAN**

Dr. Gál Kristóf

Témavezető: Prof. Dr. Soltész Pál



DEBRECENI EGYETEM

LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2023

„A tudomány izgalmas kaland. Ajtókat nyitogatunk,
keressük az igazságot, s egyszerre ott van előttünk,
mint mesebeli kincs, a maga kézzelfogható,
tündöklő valóságában.”

Kosztolányi Dezső

Tartalom

Rövidítések listája	5
I. Bevezetés és irodalmi áttekintés	7
I./1.: Történelmi áttekintés	7
I./2. A Rheopheresis ismert hatásai	8
I./3.: A Rheopheresis módszertana	9
I./4.: A Rheopheresisel elért korábbi kutatási eredmények	12
I./5: A diabetes láb syndroma pathológiája	13
I./6.: A diabeteses láb syndroma klinikai képének kialakulása	17
I./7: A diabetes mellitus és szövődményeinek előfordulása, társadalmi terhei	19
II. Célkitűzések	21
III. Anyag és módszer 1. – Betegcsoport meghatározás, betegadatok, előzetes kivizsgálás	22
III./1./a Rheopheresis kezelésen átesett betegek	22
III./1./b Előzetes klinikai vizsgálatok: boka-kar index meghatározása, alsó végtagi Color-Doppler vizsgálat	24
III./1./c: Laboratóriumi vizsgálatok	25
III. Anyag és módszer 2. – A Rheopheresis és hatásainak monitorozása	27
III./2/a: A Rheopheresis kezelés	27
III./2/b: Klinikai vizsgálatok a Rheopheresis kezelés függvényében: alsó végtagi fekélyek terület számítása és elektroneurographia	28
III. Anyag és módszer 3. – <i>In vitro</i> vizsgálatok	29
III./3/a: HUVEC modell	29
III./3/b: Flow cytometriás analízis	30
III./3/c: Génexpressziós vizsgálatok HUVEC modellen (Il-6, Il-8, TNF- α , endothelin-konvertáz enzim, ET-1, NO-szintáz)	31
III./3/d: ROS szintjének vizsgálata HUVEC modellen	32
III./3/e: Antioxidáns státusz vizsgálata HUVEC modellen	32
III. Anyag és módszer 4. – Gyulladásos markerek vizsgálata	32
III. Anyag és módszer 5. – Vasoaktív komponensek vizsgálata	33
III./5/a: Rheopheresis kezelés hatása az Endothelin-1 vérplazma koncentrációjára	33
III./5/b: Rheopheresis kezelés hatása a Thromboxán B ₂ vérplazma koncentrációjára	33
III. Anyag és módszer 6. – Antioxidáns státusz vizsgálata	34
III./6/a: Rheopheresis kezelés hatása a vörösvértestek SOD enzim aktivitására	34
III./6/b: Rheopheresis kezelés hatása a vérplazma glutation pooljának változására	34
III. Anyag és módszer 7. – Statisztikai analízisek	36
III./7/a: <i>In vitro</i> eredmények, Il-6, Il-8, TNF- α , ET-1, TXB ₂ plazmakoncentrációk, SOD enzimaktivitás statisztikai elemzése	36

III./7./b: A teljes vér és plazma viszkozitás változásának, illetve teljes tiol és diszulfid vizsgálatok statisztikai elemzése	36
IV. Eredmények 1. – Rheopheresis kezelések klinikai eredményei.....	37
IV./1./a: Haemorheológiai paraméterek változása a rheopheresis függvényében	37
IV./1./b: Neuropathiás páciensek klinikai eredményei.....	39
IV./1./b: Fekélyes betegek klinikai eredményei	41
IV. Eredmények 2. – <i>In vitro</i> vizsgálatok	46
IV./2./a: Génexpressziós vizsgálatok	46
IV./2./b: ROS szint változásai HUVEC modellen.....	46
IV./2./c.: Endothel sejtek redukált glutation koncentrációjának változásai HUVEC modellen.....	46
IV. Eredmények 3. – Rheopheresis kezelés hatása a gyulladásos citokinek vérplazma koncentrációira.....	49
IV. Eredmények 4. – Rheopheresis kezelés hatása a vascularis mediátorokra és antioxidáns ágensekre.....	51
IV./4./a: Rheopheresis kezelés hatása az Endothelin -1 vérplazma koncentrációira.....	51
IV./4./b: Rheopheresis hatása a Tromboxán B2 vérplazma koncentrációira	52
IV./4./c: Rheopheresis kezelés hatása a SOD enzim aktivitásra.....	53
IV./4./d: Rheopheresis kezelés hatása a total tiol és diszulfid komponensek szérum szintjeire	53
V. Megbeszélés 1. - Klinikai eredmények megbeszélése.....	56
V. Megbeszélés 2. – <i>In vitro</i> eredmények megbeszélése.....	57
V. Megbeszélés 3. – Gyulladásos citokinek vérplazma koncentráció változásainak megbeszélése	58
V. Megbeszélés 4. – Vasoaktív ágensek vérplazma koncentráció változásainak és az antioxidáns változások eredményeinek megbeszélése.....	59
VI. Összefoglalás	62
VI. Summary	63
VII. Az értekezés új eredményei, megállapításai, klinikai jelentőségei	64
VIII. A vizsgálat limitáló tényezői.....	65
IX. Irodalomjegyzék	66
XI. Köszönetnyilvánítás	77
XII. Hitelesített publikációs lista.....	78
XIII. Függelék.....	80

Rövidítések listája

AGE: advanced glycation end product

AMD: age-related macular degeneration

COX-2: ciklooxygenáz-2

CRP: C-reaktív protein

(c)DNS: (cirkuláris) dezoxiribonukleinsav

EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav

eGFR: estimated glomerulus filtration rate

ELISA:enzyme-linked immunosorbent assay

eNOS: endothelialis nitrogén-monoxid szintáz

GFAT: glutamin fruktóz-6-foszfát amidotranszferáz

GSH: l-γ-glutamil-l-ciszteinilglicin

GSSG: glutation-diszulfid

HDL: high-density lipoprotein

HUVEC: human umbilical endothelial cell

IgM: Immunglobulin M

Il: Interleukin

LDL: Low-density lipoprotein

Lp(a): Lipoprotein (a)

MMP: mátrix metalloproteináz

NADP⁺: nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát

NF κ B: Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NO: nitrogén-monoxid

OCT: optical coherence test

PAI-1: plazminogén aktivátor inhibitor-1

PAD: peripheral arterial disease

PKC: proteinkináz C

qRT-PCR: quantitative reverse transcription polymerase chain reaction

RAGE: receptor of advanced glycation end product

RNS: ribonukleinsav

ROS: reactive oxygen species

SOD: szuperoxid-dizmutáz

SP-1: specificity protein 1

TGF- β : transforming growth factor beta

TNF- α : tumor necrosis factor alpha

TXB₂: tromboxán B₂

UDP- Glc-NAc: uridin-difoszfát N-acetil-glükózamin

VEGF: vascular endothelial growth factor

VSM: vena saphena magna

vWF: von Willebrand – faktor

I. Bevezetés és irodalmi áttekintés

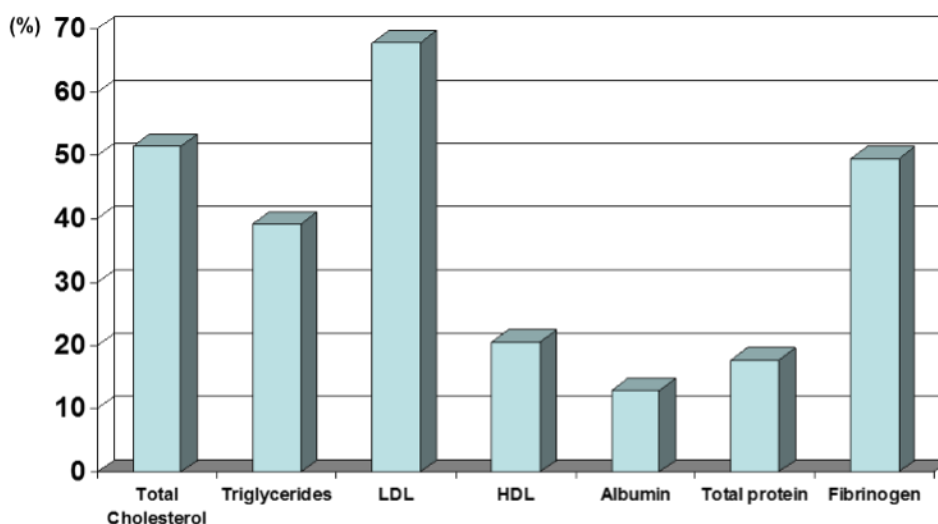
I./1.: Történelmi áttekintés

A vérből való patológiás eltéréseket okozó anyagok eltávolítása mindig szerves részét képezte az orvostudománynak. Történelme több évezredre nyúlik vissza, hiszen már az időszámítás előtti 16. század környékén íródott, egyiptomi, sérülések sebészeti kezeléséről szóló Éber Papiruszokon is megjelent a szkarifikáció (bőr felületen bemetszése), mely bevett gyakorlatnak számított az ókori Egyiptomban számos kórkép ellen, legyen szó a bőr aknés gyulladásáról, vagy a pestisről. A görög gyógyászatban, Hippocrates idejében (Kr. e. 500) az érmetszés módszere volt, mely az artériák és vénák anatómiai elkülönítéséhez vezetett. A latin phlebotómia (phlebos = vénák, temnein = vágni) elnevezés is ekkorra datálható. A gyakorlat évezredek óta hódított, használták a legkülönbözőbb betegségek gyógyítására, legyen szó encephalitisről, strokeról, vagy felső légúti fertőzésektől. Az eljárás fejlődése során, a rosszul megválasztott indikációk alapján elvégzett kezelések rengeteg ember halálát okozták, a phlebotomia egyik leghíresebb áldozata George Washington, akit rekedtség és köhögés miatt kezeltek. Érmetszése során mintegy 2300 mL vért távolítottak el érrendszeréből körülbelül 12 óra leforgása alatt. Az érmetszés tekinthető a mai modern aferezis (apheresis: erővel elvenni) technikák őseinek(1-6). A technika fejlődésének egyik mérföldköve Albert Hustinhoz köthető, aki 1914-ben először használta antikoagulánsként a citrátot.(7) Még ugyanebben az évben John Ábel végrehajtotta az első definitív plazmaferesist veseeltávolításon átesett kutyákon.(8) Az eljárás Dr. Josep Antoni Grífols Lucas által tovább fejlődött az 1950-es években, neki köszönhetően a donációs plazmaferézis biztonságossá és rendszeresen végrehajthatóvá vált.(9) Az első terápiás felhasználása 1959-ben történt Michael Rubinstein által, aki egy TTP-ben szenvedő fiúnál, illetve Paul J. Schwab és John Fahey által, akik egy Waldenström-macroglobulinémiás páciensnél alkalmazták a plazmaferézis kezelést.(10, 11) Ezen eredmények ösztönözték a mérnököket, akik 1963 és 1968 között egy korai tejüzemben használatos szeparációs technológiát felhasználva gépesítették a plazmaszeparációt. 1972-ben Herb Cullis, egy amerikai orvosi mérnök felfedezte és elkészítette az első szelektív apheresis apparátust. (12)

I./2. A Rheopheresis ismert hatásai

A Rheopheresis egy extracorporális, szelektív kettős kaszkád membránfiltrációs eljárás, egyike az 5 jelenleg létező haemorheoterápiának a specifikus immunadszorpció, a heparin-indukált extracorporális lipoprotein (LDL-) precipitáció (HELP), a dextrán szulfát adszorpció és direkt lipoprotein adszorpció (DALI) mellett.(13) Az immunadszorpció számos autoimmun-mediált neurológiai megbetegedésben, illetve transzplantáció előtt, ABO-inkompatibilitás esetén használható eljárás. Az extracorporális kezelés során az alkalmazott filteroszlop képes a vérben található kóros antitestek és immunkomplexek specifikus filtrációjára. A piacon számos gyártó, számos oszlopa elérhető.(14) A HELP kezelés során az apolipoprotein B-t tartalmazó lipoproteinek alacsony pH-n (4,85), heparinnal történő kicsapásával a lipoproteinek, illetve a fibrinogén intravasculáris koncentrációja 50-60%-kal csökkenthető.(15) A dextrán-szulfát adszorpció során a rendszer két LDL adszorpciós oszlopot használ negatív töltésű dextrán-szulfát cellulóz gyöngyökkel, mely képes a pozitív töltésű apo B-t tartalmazó lipoproteineket eltávolítani a keringésből.(16) A DALI kezelés során a vér egy adszorbeáló oszlopon áramlik keresztül, mely szelektíven filtrálja az LDL-C és a Lp(a)-t a teljes vérből. Egyetlen kezeléssel az LDL-C 70%-kal, míg a Lp(a) mennyisége 65%-kal csökken.(17)

A membrán differenciós filtráció, mely gyakorlatilag megegyezik a dupla filtrációs plasmapheresissel, az 1980-as években került bevezetésre Agishi és társai által, melynek fontos



1. ábra: A Rheopheresis kezelés filtrációs hatása a viszkozitást fokozó plazmaalkotókra (Az y tengelyen az eltávolított komponensek százalékos mennyisége van feltüntetve)

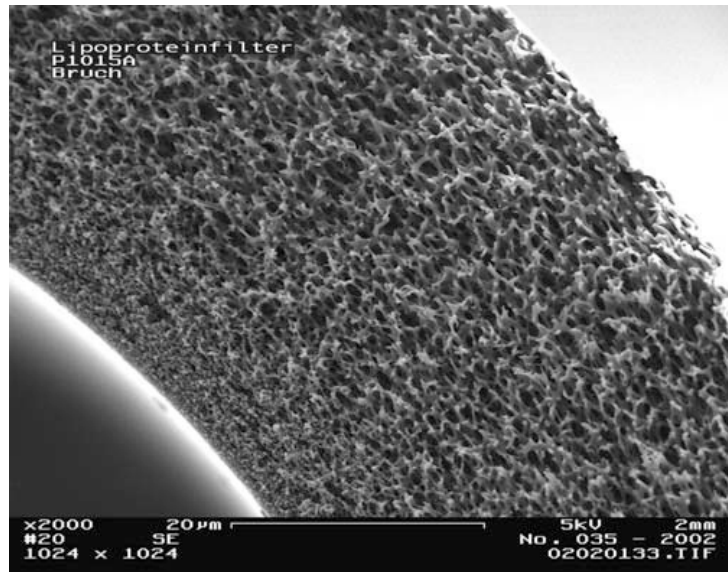
Az ábra a Fresenius SE & Co. KGaA hivatalos MONET termékismertetőjéből származik

mérföldköve volt, hogy biztonságossá tették az extracorporális kezeléseket a folyamatos vérvolumen monitorizálással.(18) A XX. század második felétől, hála a különböző filtrációs technológiák dinamikus fejlődésének, lehetőség nyílt az extracorporális eljárások egyre inkább specifikussá, szelektívvé válásának, megnyitva az utat az apheresis terápiák igen széleskörű felhasználása előtt.(19) A Rheopheresis során alkalmazott rheofilter képes a 250-300 kDa-nál nagyobb molekulasúlyú, vér- és plazmaviszkozitást fokozó nagyméretű fehérjék hatékony eltávolítására. A Fresenius Medical Care AG & Co. KGaA által szabadalmaztatott poliszulfonból készült MONET filter (Membranefiltration Optimised Novel Extracorporeal Treatment) az LDL, Lp(a), triglicerid, koleszterin, fibrinogén, α 2 macroglobulin, vWF, IgM eltávolításával képes normalizálni a hyperviscositásban szenvedő páciensek haemorheológiai státuszát, ezáltal pedig javítani a microcirculatiót. Irodalmi adatok és a gyártó ajánlása alapján, már egyetlen Rheopheresis kezelés csökkenteni képes az LDL szintjét körülbelül 70%-kal, a total koleszterinszintet mintegy 50%-kal, a triglicerid szintjét átlagosan 35–40%-kal, a fibrinogén szintjét körülbelül 50%-kal. (1.ábra) Előnye és fontos pozitív tulajdonsága a kezelésnek, hogy a kezelés során az érlemezsedés ellen protektív funkciót ellátó HDL, a normál kolloid ozmotikus nyomás fenntartásáért felelős, rendkívül fontos transzportfunkciókkal rendelkező albumin és a total protein szintje is csak csekély mértékben változik. (20-22)

Az ASFA (American Society for Apheresis) ajánlása szerint a kezelés nagy sikerrel alkalmazható microcirculációs zavar által indukált betegségekben, mint az időskori száraz macula degeneratio és a sensorineuralis hallásvesztés. Ezen megbetegedések kezelésében, a Rheopheresis első-, illetve mint másodvonalbeli terápiaként alkalmazható.(23)

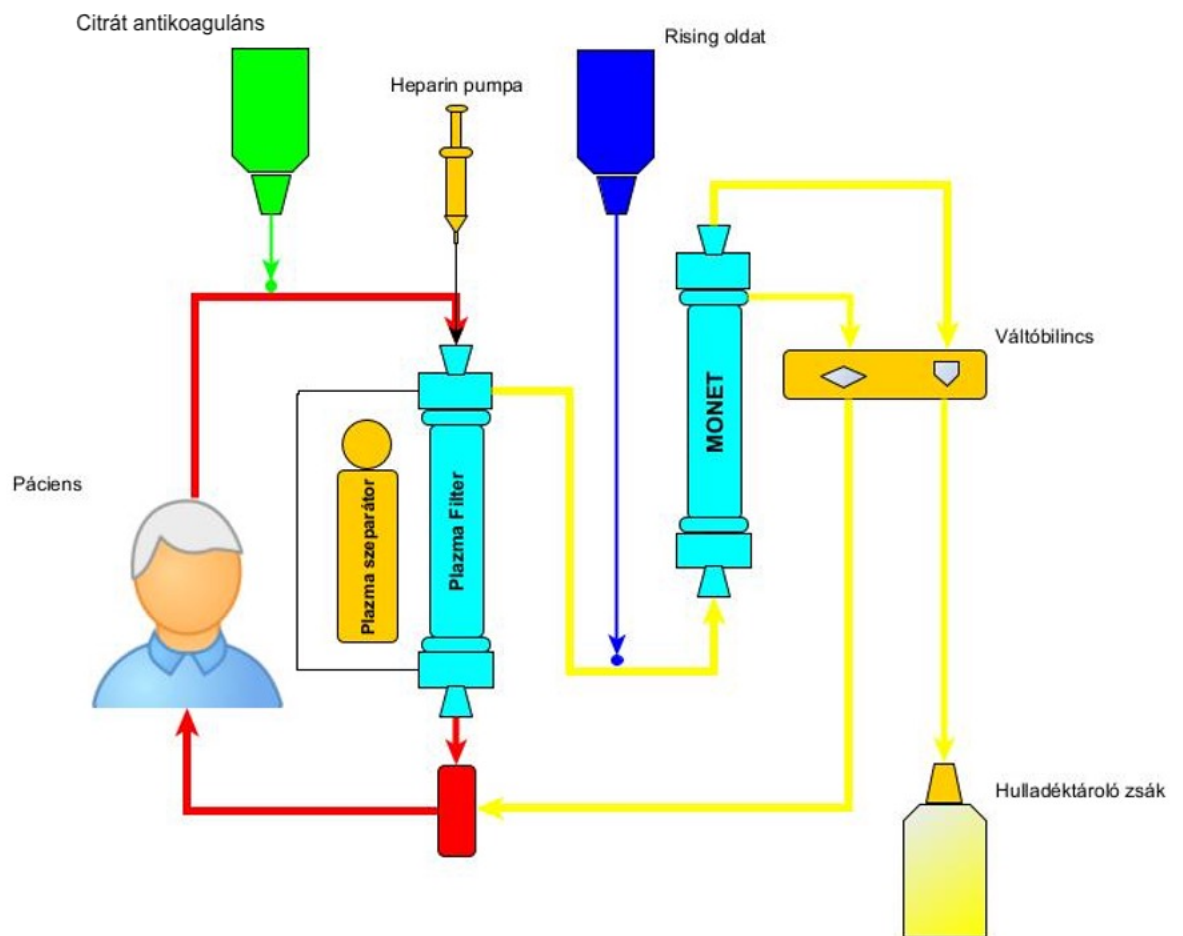
I./3.: A Rheopheresis módszertana

Az eljárás során, a beteg két perifériás vénájának kanülálását követően, első lépésként a vérplazma elválasztásra kerül az alakos elemektől, mely történhet centrifugálással (COM. Tec rendszer), vagy citráttal történő antikoagulálást követő plazmafiltrációval, amely során egy 0.2 és 0.6 μ m átmérő közötti pórusokkal rendelkező membránon áramoltatják keresztül a vért. (2.ábra)(24) Ezeknek a pórusoknak az átmérője a vérplazma átáramlásához elegendő, azonban az alakos elemek fennakadnak a filteren (Art Universal rendszer).(25) Második lépésként a vérplazma a rheofilteren áramlik keresztül, ezt követően az alakos elemekkel együtt kerül vissza a páciens keringési rendszerébe. (3. ábra) Egy kezelés során 2500-3000 mL plasma kerül feldolgozásra. A pontos mennyiség meghatározásához a következő képlet használható: becsült



2. ábra: A MONET filter és elektronmikroszkópos képe (20)

plazmamennyiség (literben) = $0.07 \times \text{testsúlykilogramm} \times (1 - \text{hematocrit [Hct]})$.(26, 27) A Rheopheresis, mint általában a terápiás aferezis eljárások, egy biztonságos eljárás, amelyet a páciensek jól tolerálnak, azonban mint minden kezelésnél, itt is előfordulhatnak mellékhatások. Ezek közül a hypotonia és a citráttal történő antikoagulálás okozhat leggyakrabban mellékhatást. A Citrát megköti a szabad ionizált calciumot, ami a vérben található ionizált Calcium hiányát okozhatja, így előidézve tetaniát, izomrángásokat, izomgörcsöket. A mellékhatás kialakulása 10-20 mL 10%-os calcium-glükonát, vagy calcium-klorid 15-30 perc alatt történő intravénás adagolásával megelőzhető. A kezelés kontraindikált septikus állapotban, haemodinamikai instabilitás, vagy aktív vérzés esetén.(27-30)



3. ábra: A Rheopheresis kezelés sematikus ábrája

Szerkesztette: Gál Kristóf

I./4.: A Rheopheresis elért korábbi kutatási eredmények

Az eljárás újdonságából fakadóan a Rheopheresis kezelésről viszonylag kevés átfogó klinikai elemzés jelent meg az irodalomban. 2014-ben, Magyarors gon először a Debreceni Egyetem Belgyógyászati Intézet Angiológia Tanszékének és a DEKK Belgyógyászati Intézet „C”  p let Intenzív Osztály  s Terápiás Aferezis Részlegének együttműködésében került alkalmazásra, egy 68 éves időskori száraz macula degeneratioban szenvedő f rfin l.(20, 31) Ezen betegség jellemzően időskorban fordul elő, az 50  v feletti k k r lbel 1/6-a szenved benne és a látáscsökkenés egyik leggyakoribb oka. A betegség során a sárgafolt idegsejteinek komplex pusztulása zajlik. A patomechanizmus során, nagy mennyiségű intracelluláris lipofuscin és extracelluláris drusen lerakódás zajlik, amely k vekezm nyes retina atrophiat és photoreceptor pusztulást eredményez. Az irodalom oki tényezőként az oxidatív stresszt, inflammatorikus folyamatokat és a mitochondriális diszf ncti t is megjelöli.(32-34) A retinát ellátó és az alatt elhelyezkedő igen s r  capillaris réteg microcirculati ja rendkívüli fontossággal b r a betegség progressziójában,  gy a megfelelő rheológiai viszonyok biztosítása, a hyperviscositas csökkentése jelenleg az egyetlen hatékony terápia ezen betegek számára.(35-38) A DE Klinikai Központjában kezelt páciens tünetei közé tartozott az olvasási, tájékozódási és közlekedési nehezítettség. 2014 és 2016 között összesen 11 kezelésben részesült Terápiás Aferezis Centrumunkban, a kezelés hatásosságát folyamatosan monitorozva. A Debreceni Egyetem Szemészeti Tanszékével együttműködésében, kutatócsoportunk igazolta a Rheopheresis jótékony hatásait, melyet alátámasztottak az elvégzett OCT vizsgálatok, a haemorheologiai és lipidparam terek változásai, továbbá a CD14+/CD16+ sejtpopuláció és a thrombocyta aggregáció normalizálódása, továbbá a thrombocyta P-selectin expressziójának csökkenése. Eredményeinket a Clinical Hemorheology and Microcirculation című lapban publikáltuk. Ezen páciensen kívül az elmúlt 5 évben 4 további AMD-ben szenvedő pácienset részesítettünk Rheopheresis kezelésben, összesen 14 alkalommal. A páciensek átlagéletkora 64,4 életév volt. A kezelés sikerességét igazolja, hogy az esetek 100%-ban javult a sz bj kt v látásérzet, amelyet minden esetben objektív szemészeti kontroll is alátámasztott. A szemészeti kontrollok alapján elmondható, hogy a legjobbban korrigált látóélesség minden esetben javult, az eredményeket összegezve az  t beteg 10 szem n 0,2-r l 0,35-re nőtt ($p=0,06$). A centrális macula vastagság kezelés előtt átlagosan 251,4 m volt, amely Rheopheresis után 245,4 m-re csökkent ($p=0,09$). A betegségre jellemző tünetek, úgymint hom lyosl t s, csökkent látásélesség és látótérben  sz  sötét foltok minden páciensnél jelentősen csökkentek, ezáltal nagy mértékben növelve az életminőségüket.(20, 31)

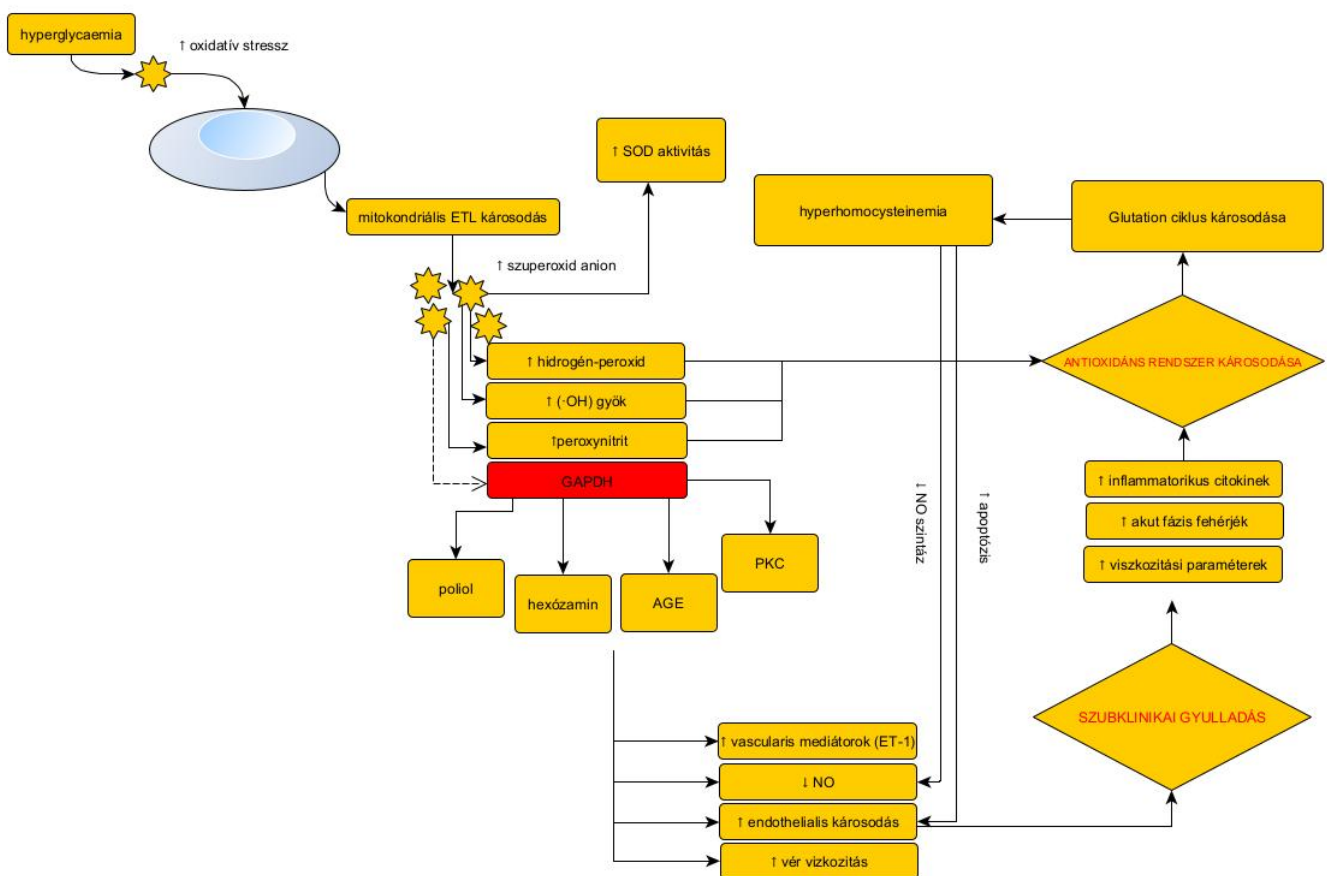
Az AMD-vel kapcsolatos eredményeink arra engedtek következtetni, hogy a Rheopheresis kezelés egyéb hyperviscositással együtt járó, microcirculatiót érintő kórképekben is megjelenhet terápiás alternatívaként, úgymint a cukorbetegség következtében kialakuló hyperviscositással járó diabeteses láb syndromája.

I./5: A diabetes láb syndroma pathológiája

A diabeteses láb syndroma egy rendkívül összetett és komplex kórkép. A syndroma felöleli mindazon szimptomákat, amelyekért a cukorbetegség és annak komplikációi tehetők felelőssé. Ezen mozgásszervi kóros eltérések közé tartozik a macro- és microangiopathia, az alsó végtagon megjelenő fekélyek, az alsó végtagi neuropathia, a bőr- és körömelváltozások. Ezen patológiás eltérések igen gyakran kéz a kézben jelentkeznek, egymást potencírozva, mintegy circulus vitiosus létrehozva. Jól ismert és széleskörben kutatott tény, hogy a syndroma kialakulásában és a tünetek fokozódó progressziójában a microcirculatio károsodása, vagyis az 500 μm -nél kisebb átmérővel rendelkező prekapilláris arteriolákat és kapillárisokat érintő érdestrukció központi szerepet tölt be. Ennek háttere ma már szélesen feltárt, ezáltal világossá vált, hogy a hyperglycaemia extrém mértékű oxidatív stresszt jelent a teljes vascularis rendszer számára.(39-42) Brownlee és mts-ai által elvégzett széleskörű kutatásoknak köszönhetően, a diabetes pathogeneze során megjelenő kóros folyamatok manapság már egy közös, egymással összefüggést mutató rendszerben tárgyalandók.(43) Elmélete alapján azáltal, hogy a vérben keringő cukor nem tud az endothel sejt intracelluláris normál metabolikus folyamatain keresztül hasznosulni, alternatív anyagcsere útvonalak aktiválódnak és kerülnek előtérbe. A hyperglycaemia a mitokondriális elektron transzport lánc zavarát okozza, ezáltal blokkolja a légzési transzport láncot és az oxidatív foszforilációt.(44) Ennek eredményeképpen jelentős szuperoxid anion felszabadulás történik. Ez a nagymennyiségű szuperoxid gátolja glicerin-aldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) enzimet, amely hatására a glükóz sejten belüli metabolizmusa 4 alternatív anyagcsere útvonalra terelődik. Nem elhanyagolható továbbá a szuperoxid anionnak azon tulajdonsága, hogy hidrogén-peroxiddá és hidroxilgyökké képes alakulni, továbbá az endothel sejtek által termelt nitrogén-monoxid szabadgyökökkel való reakcióján keresztül peroxinitrit felszabadulást eredményez. A peroxinitrit a fehérjék nitrálásán és oxidálásán keresztül gátolja azok normális funkcióját, károsítja a DNS-t, továbbá a NO felszabadulását is megakadályozza, míg a hidroxilgyök rendkívül agresszív hatásai közé tartozik a lipidekben indukált mutációs folyamat, a lipid peroxidáció.(43, 45) Az előtérbe kerülő 4 alternatív útvonal patológiás hatásai a következőképp foglalhatók össze:

- Poliol útvonal: Az útvonal egy két lépésből álló metabolikus út, ahol a glükóz előbb szorbittá redukálódik, majd ebből fruktóz keletkezik. Ezen reakciók azonban jelentős NADP+ és NADPH felhasználásával járnak, ami a redukált glutation szint csökkenésével jár, ennek köszönhetően az oxidatív stressz fokozódik. További káros hatása az ozmotikus stressz generálása, tekintve, hogy sem a keletkező szorbit, sem a fruktóz számára nem átjárható a sejtmembrán.(46, 47)
- Hexózamin útvonal: Az útvonalon aktiválódása során a fruktóz-6-foszfát kilép a normál metabolikus rendszerből és glutamin felhasználásával glükózamin-6-foszfáttá alakul. A reakcióút végső soron UDP-GlcNAc szintéziséhez vezet. A folyamat kulcsfontosságú enzime, a glutamin:fruktóz-6-foszfát amidotranszferáz (GFAT). A végtermékként megjelenő UDP-GlcNAc szubsztrátként szolgál a sejtmag és a citoszol fehérjéinek O-glikozilációs poszttranszlációs módosításaihoz, például az Sp-1 transzkripció faktor glikolizációjához, amely megnövekedett TGF- β és PAI-1 szinteket eredményez.(48, 49)
- PKC útvonal: Az intracelluláris hyperglycaemia hatására a 11 különböző izoformával rendelkező PKC enzimes család aktiválódik, ezen belül is a PKC- β és a PKC- δ izoformák elsősorban, melyeknek az elsődleges aktivátora a DAG. A diacilglicerol intracelluláris szintje jelentősen növekedik a hyperglycaemia hatására. A PKC enzim aktiválódásának köszönhetően az eNOS foszforilációján keresztül csökkenti a nitrogén monoxid (NO) termelődését, rontja a vérátáramlást. További káros hatása, hogy serkenti a VEGF termelését, ezáltal fokozva az endothel sejtek áteresztő képességét. Növekszik a PAI-1 és a von Willebrand faktor termelődése, mely növeli a vér viszkozitását. Az NF κ B útvonal aktiválásával proinflammatorikus és procoaguláns aktivitás fokozó hatása ismert. A PKC továbbá a TGF- β termelődésének elősegítésével kórosan befolyásolja az extracelluláris mátrix szerkezetét is. Hatására felhalmozódik a fibronectin, illetve a IV-es típusú kollagén, melyek a basalmembrán megvastagításával kapilláris okklúzióhoz vezetnek. Szintén patológiás útvonalat eredményez a NAD(P)H-oxidáz aktivációja, amely további szuperoxid anionok felszabadításával fokozza az oxidatív stresszt. Gátolja továbbá a Na⁺/K⁺ ATP-áz működését is.(50, 51)
- AGE útvonal: Az AGE útvonalon keletkező késői glikációs termékek prekursorainak intracelluláris felhalmozódása háromféle módon tud patológiás eltérést okozni.

Egyrészt a sejten belül történő fehérje kapcsolódással képesek károsítani azok rendeltetészerű működését. Másrészt az extracelluláris mátrix glikációján keresztül is képes diszfunkciót okozni, például az 1-es típusú kollagénen keresztkötéseket kialakítva képes a molekula hajtogatásának megváltoztatására, ezzel vascularis szerkezeti eltéréseket okozni. Harmadrészt, az AGE prekursorok az oldható fehérjékkel összekapcsolódva, majd az endothelen és egyéb sejteken található receptoraikba bekötődve (RAGE) reaktív szabadgyököket képesek felszabadítani, illetve gyulladásos útvonalakat indítanak el (4.ábra). (52, 53)



4. ábra: A diabetes mellitus által indukált endothelialis inflammáció; ETC (elektrontranszport lánc), GAPDH (gliceraldehyd-3-foszfát dehidrogenáz), AGE (késői glikációs termékek), PKC (protein kináz C), NO (nitrogén-monoxid) SOD (szuperoxid-diszmutáz)

Szerkesztette: Gál Kristóf

Ezen folyamatok eredményezik a fokozott vascularis mediátorok termelődést, a felborult antioxidáns homeosztázist, a normál endotheliális funkciók károsodását, amelyek a cukorbeteg microcirculációs státusznak nagymértékű romlásához vezetnek. A diabetes mellitus a metabolikus eltéréseken kívül szubklinikus inflammációt is okoz, amit a gyulladásos citokinek, akut fázis fehérjék és chemokinek elevált szérumszintjei indikálnak a diabetes láb szindrómájában.(54) Jól kirajzolódik, hogy a diabetes következtében kialakuló low-grade gyulladás jelentős kockázati tényezőként funkcionál mind a macro-, mint a microcirculációt tekintetbe véve, számos publikáció foglalkozik a citokinek diabéteses láb szindrómájában betöltött pontos szerepével. (55) (56)

A korábbi kutatások említenek olyan citokineket, melynek megnövekedett plazmakoncentrációja súlyos patológiás folyamatokat indukál a diabéteses láb szindrómában szenvedő betegeknél. Irodalmi adatok alapján az IL-6, mint akut fázis fehérje, gyulladást mediáló citokin és a fibrinogén szintézis fő regulátora, jelentősen magasabb koncentrációt mutat diabéteses láb szindrómás páciensek keringésében. Az elevált IL-6 szint egyértelműen hozzájárul a szubklinikus gyulladásos állapot létrehozásához, amely vasculáris károsodást indukál és eredményezi a diabéteses láb komplikációnak megjelenését. A T-lymphociták és macrophagok által nagy mennyiségben termelt IL-6 stimulálja továbbá a csontvelő neutrofil termelését és a B lymphociták proliferációját.(57) A leginkább macrophagok által termelt TNF- α , mint a szisztémás gyulladás egyik központi szerepet játszó mediátora többek között a MMP serkentésével károsítja a mátrixfehérjét, mindemellett gátolja a VEGF termelődését, így a vasculáris remodellizációs és neovascularizációs folyamatokat is gátolja. *In vitro* kutatások alapján, a megnövekedett TNF- α fibroblastok, keratinociták és endotheliális sejtek apoptózisának stimulálásával gátolja a meglévő fekélyek gyógyulását. Mint az inflammatorikus folyamatok kardinális mediátora, a TNF- α egyértelműen hozzájárul a diabéteses neuropathia progressziójához is az idegsejtek apoptózisának indukciójával. A TNF- α gén transzkripciójával a neuropathia progressziójában szerepet játszó NF-KB útvonal aktiválódik, ami kifejezett ROS felszabaduláshoz vezet mind direkt, mind indirekt úton, továbbá elősegíti a COX-2 dependens prostanooid termelést, ezáltal a diabéteses neuropathia során megjelenő fájdalom egyik fő felelőse. A megnövekedett IL-6 és TNF- α együttesen igen erőteljes CRP, komplement és egyéb akut fázis fehérje stimuláló hatással is bír, tovább súlyosbítva az endotheliális diszfunkciót. (58-60) Az IL-8, mely jelentősen magasabb szintet mutat az atherosclerosis során az érfalban mind intra- és extracellulárisan, neutrofil kemotaktikus faktor ROS indukciós hatással bír, amely krónikus gyulladásához vezetve gátolja a diabéteses alsó végtagi fekélyek gyógyulását.(61) Ezen

citokinek termelését elsősorban a fehérvérsejteknek, azon belül is a macrofágoknak tulajdonítják, kevés szó esik azonban az endothelről, mely szintén forrása lehet ezen citokineknek. Az endothelialis gyulladás okozta szélsőséges oxidatív stressz és a reaktív oxigén gyökök felhalmozódása a sejtek redukált glutation tartalmának csökkenéséhez vezet.

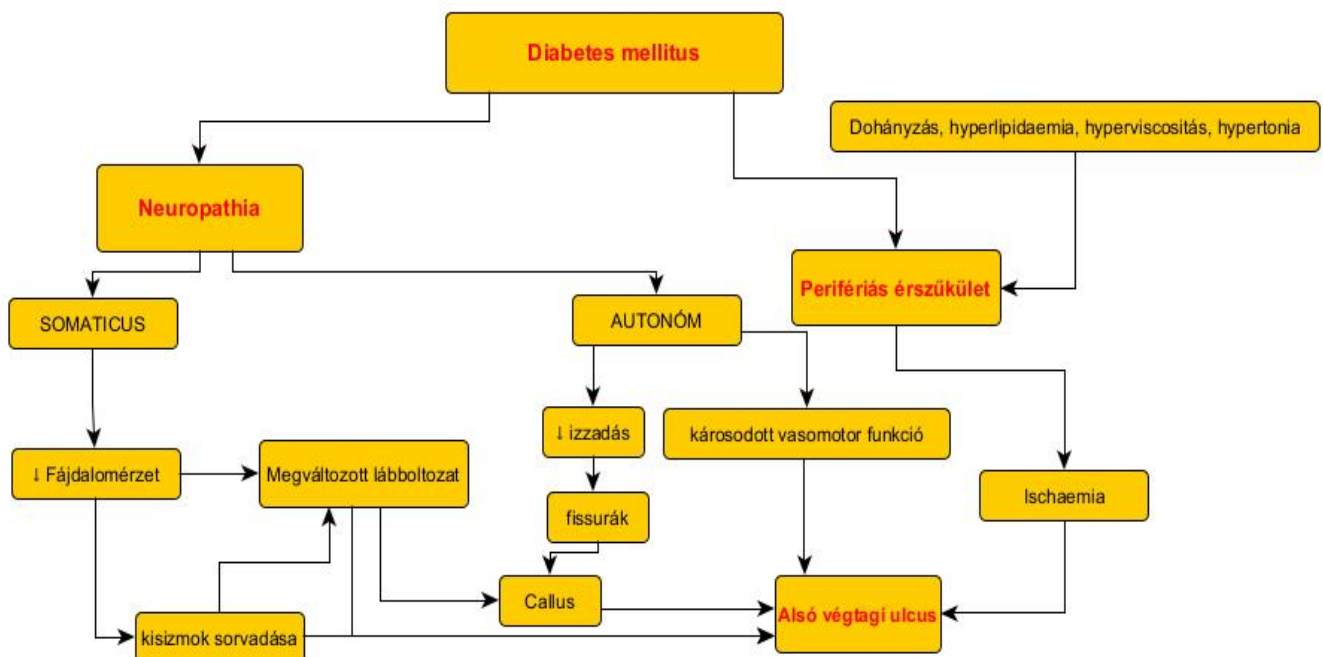
A glutation peroxidáz enzim legfontosabb kofaktora a redukált glutation, így a GSH-GSSG rendszer igen szenzitíven befolyásolja a szervezet antioxidáns státuszát. A redukált glutation (GSH) egy glicinből, ciszteinből és glutaminsavból álló tripeptid, szabad thiolcsoportjának köszönhetően erős redukáló szer, ennek köszönhetően semlegesíteni képes a reaktív szabadgyököket és hidrogénperoxidot. A redukált glutation reakciója során két glutation diszulfid hídon keresztül összekapcsolódik, így alkotva oxidált termékét, a GSSG-t. Az oxidált glutation a glutation-reduktáz enzimmal képes visszaalakulni eredeti, redukált formájává. A GSH:GSSG arány az egészséges emberi szervezetben kényes egyensúlyt alkot. A GSH:GSSG eltolódása az utóbbi javára, a lecsökkent redukált glutation koncentráció a szervezet nagyfokú oxidatív stressznek való kitettségét jelezheti.(62, 63) Mindezek mellett a vasoaktív tulajdonságú anyagok expressziója is kórosan megváltozik a diabetes károsító mechanizmusainak köszönhetően. A vasoconstrictióért felelős endothelin-1 és ennek szintéziséhez szükséges endothelin-1 konvertáz enzim expressziója nagy mértékben fokozódik, míg az *in vivo* intakt endothel sejtréteg esetén vasodilatációért felelős NO szintetizáló enzime, a NO-szintáz expressziója jelentősen lecsökken. A vasoaktív anyagok kóros irányú változásának fontos szerepe van a diabetes okozta microcirculációs szövődmények progressziójában.(64, 65) Mindezen patológias változások mellett a cukorbetegség haemorheológiai állapota is gyakran károsodik. Csökken a vörösvértestek deformabilitása, és nagymértékben megnő a viszkozitást növelő plazmafehérjék szintje, ami abnormális teljes vér és a plazma viszkozitáshoz vezet. A leromlott haemorheológiai státusz növeli a véráramlás rezisztenciáját, ami tovább destruálja a szövetek vérellátását, fokozva a microkeringési rendellenességeket.(66-69)

I./6.: A diabeteses láb syndroma klinikai képének kialakulása

Az emberi szervezet egyik legérzékenyebb értípusa az idegeket behálózó és azokat tápláló érrendszere, a *vasa nervorum*.(70, 71) Ennek károsodása az idegek epi- és perineuriumában arteriovenosus shuntök megnyílását eredményezi. Az ebből fakadó szöveti maldisztribúció anyagcsere és nutritív károsodáshoz vezet, melynek eredménye a cukorbetegség következtében kialakuló diabeteses neuropathia.(72) A cukorbeteg páciensek esetében leggyakrabban a

polyneuropathia olyan formája van jelen, mely mind a szomatikus, mind az autonóm idegi működésben egyaránt zavart okoz. Az idegbántalomtól szenvedő páciensek tünettana igencsak szerteágazó. Míg a korai stádiumokban a beteg kifejezett zsibbadást, gyakran éjszaka, nyugalomban jelentkező súlyos fájdalmat tapasztal, addig a betegség progressziójával megegyezően ezen pozitív tünetek egyre inkább elmaradnak. A késői stádiumokban, a korábbiakban tapasztaltakkal ellentétben negatív tünetek dominálnak, a páciens alsó végtagja gyakorlatilag érzéketlenné válik. Az érzészavar leginkább szimmetrikusan, kesztyű-, vagy zokni-szerűen kezdődik, leggyakrabban distalisan, a lábujjakban, majd folyamatosan proximalis irányba progrediál. A sensoros idegek károsodása következtében, a páciens mozgása, járása gyakran bizonytalanná válik, alsó végtagját túlterheli, az esetleges sérülésekről nem vesz tudomást. Ezzel párhuzamosan a motoros idegrostok károsodása a lábfej kóros statikai változásaihoz vezet, ebből fakadóan a talp bőre nagyobb felületen érintkezik a talajjal, elsősorban az I-es, II-es, V-ös metatarsus fejecse, a hallux és a talus felszínén. Ezen kóros nyomáspontok létrejötte nagy mértékben kedvez az alsó végtagi fekélyek kialakulásának. A cukorbetegség talaján kialakuló ulcusok gyakran igen gyenge gyógyhajlamot mutatnak, köszönhetően a leromlott keringési viszonyok miatti csökkent oxigén szaturációnak. Az általános hyperglycaemia és az immunrendszer cukorbetegség okozta patológiai változásai a fekélyek bakteriális fertőzésének esélyét is nagyban növelik, amelyek súlyosabb esetekben gyakran polymicrobiális eredetűek (5. ábra).(73-76)

Ezen microcirculációs eltérések invazív beavatkozással (intervenciós radiológiai és érsebészeti technikák) nem megoldhatóak. Ezen esetekben logikusan kerülhet felhasználásra célzottan a microcirculációs státuszt javító, vérátáramlást fokozó kezelés, a Rheopheresis.



5. ábra: A diabeteses láb syndroma kialakulása

Szerkesztette: Gál Kristóf

I./7: A diabetes mellitus és szövődményeinek előfordulása, társadalmi terhei

A diabetes mellitus civilizációs népbetegségnek tekinthető, amely mára az egyik legtöbb embert érintő betegséggé vált.(77) 2016-os becslések szerint 422 millió cukorbeteg ember él a világon, a szám pedig a mozgásszegény, stresszes életmódnak, illetve az elhízottak arányának növekedésének köszönhetően folyamatosan emelkedik.(78) Magyarországon különösen elterjedté vált a betegség, 2014-ben 727 ezer ember volt jogosult cukorbetegséghez köthető gyógyszer kiváltására, azonban a betegség jóval több embert érinthet, hiszen a betegek 94%-a 2-es típusú diabetesben szenved, aminek jellemzője, hogy a betegség korai stádiumaiban tünetmentes. Az egészségügyi rendszer számára elérhető források korlátozottsága következtében kiemelt hangsúlyt kell fektetni a magas prevalenciájú, nagy embertömeget érintő betegségek megfelelő kezelésére. Ilyen betegség a diabetes is, amelynek prevalenciája a 20-69 éves magyar emberek 8,65% volt, ami a teljes populációra vetítve 7,47% súlyozott előfordulási gyakoriságot jelent. 60 éves kor felett a betegség minden 5. embert érint. Több neves nemzetközi tanulmány is kimutatta, hogy a cukorbetegség gazdasági terhe igen nagy, amely fokozatosan növekszik. 2014-ben, Magyarországon a cukorbetegség következtében a betegek 4,53 millió munkanapot töltöttek kórházi ellátás keretei között, a cukorbeteg teljes egészségügyi ellátása 215,7 milliárd forintba kerül, melynek jelentős hányadát a cukorbetegség

következtében kialakuló szövődmények kezelése emésztette fel. Kijelenthető tehát, hogy a cukorbetegség szövődményeinek kezelése sokkal nagyobb gazdasági terhet jelent, mint az alapbetegség magas szintű kezelése.(79)

Ezen belül a diabeteses láb szindrómája az egyik leggyakoribb manifesztálódó szövődmény. Igencsak súlyos állapot, melynek gyógyítása csak többirányú terápiás erőfeszítéssel lehetséges. A cukorbeteg mintegy negyedénél jelenik meg a betegség következtében kialakult alsó végtagi ulcus. Ma Magyarországon évente közel 5000 lábamputációs beavatkozást végeznek, amelyeknek több, mint 85%-át előzi meg a diabetes következtében kialakuló neuroischémiás ulcusos elváltozás. A páciensek 28-49%-ánál reamputációt is végeznek. 2009-es kutatások kimutatták, hogy amennyiben egy átlagos diabeteses páciens életminőségét egy 0-tól 100%-ig tartó kardinális skálán pontozzuk, ahol 0% a halál, 100% pedig a teljes egészség, úgy a diabeteses lábszárfekély és a következtében elvégzendő amputáció 34,6%-os egészségtőke vesztesét okozta. Amennyiben forintosítani akarjuk ezt az ábrát, úgy kimutatható, hogy a neuropathia társadalmi terhe –amely magába foglalja az egészségügyi költséget, az egészségtőke veszteségének értékét, továbbá az össztársadalmi terhet- átlagosan 8,3 millió forint/fő a szövődmény megjelenését követő 5 évben, míg ugyanezen paramétereket figyelembe véve a lábszárfekély esetében a társadalmi teher 12,4 millió forint/fős összegre rúg. Jól látható tehát, hogy a hosszú gyógyulási idő, a költséges kezelések, az amputációkból fakadó mozgáskorlátozottság és az életminőség általános romlása nagy megterhelést jelent mind a betegnek, mind a társadalomnak. (80, 81)

II. Célkitűzések

- I. A Rheopheresis kezelés már ismert, haemorheológiai státuszt helyreállító és microcirculációs károsodást javító hatásainak klinikai igazolása a diabeteses láb syndroma azon eseteiben, amelyekben a kórkép hyperviscositással társul és macrovascularis helyreállításra nincs lehetőség.
- II. *In vitro* endothel modell felállítása, melynek vizsgálatával a diabetes által indukált endothelialis inflammáció és kórosan megváltozott antioxidáns státusz részletesen tanulmányozható. Az intravascularis hyperglycaemia szimulálásával az endothelialis státuszt monitorozható biokémia paraméterek meghatározása, melyek függvényében a Rheopheresis kezelés addicionális jótékony hatásai objektíven leírhatók.
- III. Az *in vitro* modellen meghatározott inflammatorikus citokinek *in vivo* vizsgálata a Rheopheresis kezelés függvényében, melyekkel igazolható a Rheopheresis kezelés endothelialis gyulladást mérséklő hatásai.
- IV. Komplet cistein pool *in vivo* analízise, mellyel igazolható a Rheopheresis kezelés antioxidáns státuszt javító funkciója a glutation poolra kifejtett jótékony hatásaival.

III. Anyag és módszer 1. – Betegcsoport meghatározás, betegadatok, előzetes kivizsgálás

III./1./a Rheopheresis kezelésen átesett betegek

A Rheopheresis kezelés a DEKK Belgyógyászati Klinika „C” Épület Intenzív Osztály és Terápiás Aferezis Részlegen 2014-ben került bevezetésre (6.ábra). Az ASFA (American Society for Apheresis) ajánlása alapján Magyarországon elsőként egy hyperviscositással szövődő időskori száraz macula degenerációban szenvedő páciensnél alkalmazta kutatócsoportunk a kezelést. A mikrocirculációs zavar következtében kialakuló időskori száraz maculadegeneratio és a sensorineuralis hallásvesztés mellett a Rheopheresis kezelés logikusan alkalmazható egyéb microcirculációt érintő megbetegedésekben. 2014 és 2019 között, etikai engedély birtokában (IVU/10026-4/2020EKU, ETT-TUKEB) összesen 23 betegen alkalmaztunk, mintegy 80 kezelést időskori száraz macula degenerációban, macrovascularis helyreállításra alkalmatlan hyperviscositással szövődő perifériás artériás érbetegség, valamint igazolt hyperviscositással szövődő, microcirculációs károsodásból fakadó diabeteses ulcus és/vagy súlyos polyneuropathia eseteiben. (31)

A 23 betegből 18 férfi (átlagéletkoruk 60,7) és 5 nő (átlagéletkoruk 63,28) páciensünk volt. A betegek közül 10 páciensnek volt diabetes alsó végtagi fekélye, míg 10 beteg neuropathiás panaszoktól szenvedett. 4 páciens esetében a mindkét kórkép fennállt. 3 beteg macrovascularis helyreállításra alkalmatlan érstatusú, hyperviscosításban szenvedő perifériás artériás érbeteg volt. Átlagéletkoruk a kezeléseik időpontjában 62,2 életév volt. Az egy páciens esetében alkalmazott legtöbb Rheopheresis diabeteses láb syndroma esetén 7, míg a legkevesebb 1 volt. Átlagosan 3 kezelésben részesültek a páciensek. A betegek alapadatait, antidiabetikus, ill. vasodilatator terápiás leírását, HgbA1C értékeit a kezeléseket megelőzően, illetve az alkalmazott kezeléseik számát az 1. táblázatban foglaltuk össze. A táblázatban a további részletes vizsgálatban részt vevő pácienseket félkövér betűtípussal jelöltük.

	Nem	Kor	Diagnózis	Gyógyszeres terápia	HgbA1c	Reopheresisek száma
Beteg 1 (G.M.)	férfi	65	diabeteses polyneuropathia, diabeteses alsó végtagi ulcus	Novorapid 32E-28E-36E, Levemir 40E-40E, Merckformin 750 mg	7.6%	7
Beteg 2 (E.J.)	férfi	55	diabeteses polyneuropathia	Liprolog 12E-12E-30E, Tresiba 36E, Ozempic 1 mg, Merckformin 1000 mg, Forxiga 10 mg	8%	7
Beteg 3 (L.I.)	férfi	43	diabetes alsó végtagi ulcus, többszörösen stentelt PAD	Humulin R 30-20-26E, Humulin N 50 E, Sinjardy 2x5mg/1000mg, Noclaud 100 mg	11.1%	5
Beteg 4 (P.J.)	férfi	68	diabeteses alsó végtagi ulcus	Actrapid 16E-12E-14E, Insulatard 22 E, Jardiance 10 mg	7.7%	4
Beteg 5 (K.K.)	férfi	56	diabeteses polyneuropathia, diabeteses alsó végtagi ulcus	Xigduo 2x5/1000 mg	6.6%	2
Beteg 6 (K.B.)	nő	73	diabeteses polyneuropathia, diabeteses alsó végtagi ulcus	Metformin 1000 mg	7.0%	2
Beteg 7 (S.J.)	nő	75	diabetes alsó végtagi ulcus	Diaprel 2x60 mg, Synjardy 2x12.5mg/1000mg	7.0%	2
Beteg 8 (Cs.Z.)	férfi	62	diabeteses polyneuropathia	Metfogamma 1000 mg, Gliprex 2x4 mg, Glucobay 50 mg	7.8%	2
Beteg 9 (M.I.)	férfi	59	diabeteses polyneuropathia	Actrapid 3x24E, Insulatard 34E	10.6%	2
Beteg 10 (Cs.L.)	férfi	66	diabeteses polyneuropathia	Actrapid 18E-12E-12E, Insulatard 29 E, Metformin 2x1000 mg	6.9%	3
Beteg 11 (T.Cs.)	férfi	63	diabeteses polyneuropathia	Metformin 1000 mg	7.1%	2
Beteg 12 (B.J.)	férfi	59	diabeteses polyneuropathia, diabeteses alsó végtagi ulcus	Insuman Basal 23 E, Metformin 1000 mg	9.2%	4
Beteg 13 (N.I.)	férfi	67	diabeteses alsó végtagi ulcus, macrovascularis rekonstrukcióra alkalmatlan PAD	Lantus 12 E, Metformin 2x1000 mg, Diaprel 60 mg, Antacast 2x100 mg	8.4%	1
Beteg 14 (Sz.E.) †	férfi	64	macrovascularis rekonstrukcióra alkalmatlan PAD	Noclaud 2x100 mg		2

Beteg 15 (T.Cs.)	férfi	52	diabeteses polyneuropathia	Apidra 7E-8E-6E, Toujeo 21 E, Doximum 500 mg	7.9%	2
Beteg 16 (T.T.)	férfi	65	diabeteses alsó végtagi ulcus	Apidra 4E-4E-4E, Synjardy, 6 E Toujeo, 2x12.5mg/1000 mg	6.7%	2
Beteg 17 (F.É.)	nő	62	diabeteses alsó végtagi ulcus	Actrapid 8E-8E-8E, Insulatard 16 E, Merckformin 2x500 mg	10.4%	2
Beteg 18 (P.I.) †	férfi	66	macrovascularis rekonstrukcióra alkalmatlan PAD	Noclaud 2x100 mg		3

1. táblázat: Rheopheresisen átesett alsó végtagi panaszos betegek adatai

A kezelést olyan betegek esetében alkalmaztuk, akiknek a macroangiopathiájuk alkalmatlan volt revascularizációra, vagy arra nem szoruló, microangiopathiás circulációs elégtelenségük és/vagy súlyos ENG alapján diagnosztizált polyneuropathiájuk volt, teljes vér és/vagy plasma hyperviscosítással. A betegek Rheopheresis kezelésbe való bevonása a DEKK Belgyógyászati Klinika „C” Épületében zajló angiológiai szakrendelés keretei között zajlott, ahol az alsó végtagi panaszokkal rendelkező páciensek komplett angiológiai kivizsgáláson estek át a szükséges terápia pontos meghatározásának érdekében.

III./1./b Előzetes klinikai vizsgálatok: boka-kar index meghatározása, alsó végtagi Color-Doppler vizsgálat

A komplett kivizsgálás során első lépésként meghatároztuk a beteg boka-kar indexét, mely rendkívül jól használható módszer a perifériás érbetegség kimutatásához.(82) A vizsgálat során a beteg mindkét oldali arteria brachialisában, és mindkét oldali arteria dorsalis pedisben és arteria tibialis posteriorban meghatározásra került a systolés vérnyomásérték. A vizsgálat során a Rextra Orvosi Műszer Kereskedelmi Kft. által forgalmazott Sphygmomanometer manuális vérnyomásmérőt, és Medi-CAD Kft. által gyártott „Doppy” kézi érdoppler készüléket alkalmaztuk. Mindkét oldali alsó végtagi erekben mért vérnyomásértékek közül a magasabbat kiválasztva, illetve mindkét oldali felső végtagi vérnyomásértékből hányadost képezve kaptuk meg a boka-kar index eredményét. A vizsgálat során az European Society of Cardiology 2017-es irányelveiben megfogalmazott vizsgálati metódust és kiértékelési rendszert alkalmaztuk. (83)

Azokban az esetekben, amikor a boka-kar index eredménye kisebb volt, mint 0,9, vagy nagyobb, mint 1,4, alsó végtagi artériás Color-Doppler ultrahang vizsgálatot végeztünk. Ennek során az iliacalis, femoralis, poplitealis, tibialis és peronealis alsó végtagi artériákban vizsgáltuk az áramlási viszonyokat, áramlási sebességet, elemeztük az áramlási görbéket, vizualizáltuk az erekben megjelenő, azokat szűkítő meszes plakkokat, vizsgáltuk méretüket, kiterjedésüket. Ehhez a Philips CX 50 ultrahang készülék 5-10 MHz-es lineáris vascularis transducerét alkalmaztuk. A komplex angiológiai kivizsgálás során a felszínes vénás hálózat is áttekintésre került. A Duplex ultrahang elvégzésével a felszínes vénás elégtelenség, mint etiológiai faktor kizárásának érdekében.(84, 85) Amennyiben a vascularis ultrahang vizsgálat során panaszokat magyarázó macrovascularis eltérést találtunk, úgy a betegeket a Rheopheresis kezelés lehetőségéből kizártuk, az eseteket multidiszciplináris vascularis bizottság elé tártuk. Ezen páciensek csak intervenciós radiológiai módszerrel, vagy érsebészeti rekonstrukcióval történő macrovascularis helyreállítást és újbóli angiológiai kivizsgálást követően, vagy macrovascularis rekonstrukciós lehetőség teljes hiánya esetén eshettek át Rheopheresis kezelésre.

III./1./c: Laboratóriumi vizsgálatok

A kezelést megelőzően általános laborvizsgálat történt. Általános laborparaméterek: vérkép (Advia 2120i hematológiai automata, Siemens), vesefunkció (urea, ref.:3,6-6,0 mmol/L; kreatinin, ref.: 2,8-8,0 µl/L; eGFR, ref: >90 mL/p/1.73m²), lipid profil vizsgálata (triglicerid, ref: <1,7 mmol/L; koleszterin, ref.: 2,0-5,20 mmol/L; HDL-C, ref.: >1,30 mmol/L; LDL-C, ref.: 1,00-3,40 mmol/L) vércukor (ref.: 3,6-6,0 mmol/L) (Cobas 8000 modular analyzer, Roche); valamint a hemoglobin A1c érték (ref.: 4,2-6,1%) (Tosoh Analyzer G11, Sysmex) meghatározása a DE KK Laboratóriumi Medicina Intézetben történt. A fekélyek immunológiai hátterét cáfolja, hogy a betegek antifoszfolipid syndroma ellenanyagai, az anti-béta-2-glikoprotein-I antitestek (ref.: 0,0-20,0 U/ml), anti-cardiolipin antitestek (ref:0,0-20 U/ml) (ELISA vizsgálatok, BIO-FLASH Chemiluminescent Analyzer, Werfen), Lupus antikoagulánsok (drVVT vizsgálatok, ref.: <1,2: ACL TOP 550 CTS koagulometer, aPTI-LA, aPTI-La keverék vizsgálatok, ref.: <1,2: Diagnostica Stago Start 4 Hemostasis Analyzer) negatívak voltak. A krioglobulin-pozitivitás, (krioglobulin protein ELFO: HYDRASYS 2 Electrophoresis Systems (Sebia), pozitivitás esetén RF és IgG meghatározás: Cobas 8000 modular analyzer, Roche) és az anti-neutrofil citoplazmatikus antitest-pozitivitás szintén

kizárásra került (kitapasztott neutrophil sejtek indirekt immunfluoreszcens jelölésével, FITC festékkel, mikroszkóp: Eurostar immunfluoreszcens mikroszkóp, Euroimmun).

A hyperviscositás diagnózisának megállapításához, illetve a Rheopheresis kezelés hatásának monitorozásához elvégzett haemorheologiai vizsgálatokat a Sebészeti Műtéttani Tanszéken végezték. A betegek vérmintáinak teljes vér és plasma viscositásának meghatározása capillaris viscosimetria módszerrel történt (Hevimet-40 viscometer). A vér viscositas meghatározásánál 40%-os hematokritra korrigált értékek is kiszámításra kerültek a Mátrai és munkatársai által ajánlott matematikai formula segítségével:

$$\frac{TVV_{40\%}}{PV} = \left(\frac{TVV_{Htc}}{PV} \right)^{\frac{40\%}{Htc}}$$

A teljes vér viscositásának fiziológiás felső értéke 4,4 mPas 90 s⁻¹ sebesség-grádiensnél, a plasma viscositasé 1,4 mPas.(86, 87)

III. Anyag és módszer 2. – A Rheopheresis és hatásainak monitorozása

III./2/a: A Rheopheresis kezelés

A hyperviscositas tényének megállapítását követően a betegek a kezelés előtti napon fiziológiás sóoldatos infundálásban részesültek, majd két egymást követő napon, összesen két alkalommal részesültek Rheopheresis kezelésben. A kezelés kivitelezéséhez a beteg két perifériás vénáját kanuláltuk a vételi és visszaadó szár működtetéséhez. A kezelések során az előzetes plazmaszeparációt követően, melyet az Art Universal rendszerével végeztük, az alakos



**6. ábra: Rheopheresis kezelés a DEKK
Belgyógyászati Klinika "C" Épületének Intenzív
Osztályán**

elemektől elkülönített vérplazma a Fresenius SE által forgalmazott MONET (Membrane filtration Optimised Novel Extracorporeal Treatment) filteren keresztül került filtrációra. A megtisztított vérplazmát az alakos elemekkel együtt visszajuttattuk a páciens keringési rendszerébe. A filtrálandó plazma mennyiségének meghatározásánál a 40 mL/testsúlykilogrammos szabályt követtük.(88) Antikoagulánsként citrát került alkalmazásra.

III./2/b: Klinikai vizsgálatok a Rheopheresis kezelés függvényében: alsó végtagi fekélyek terület számítása és elektroneurographia

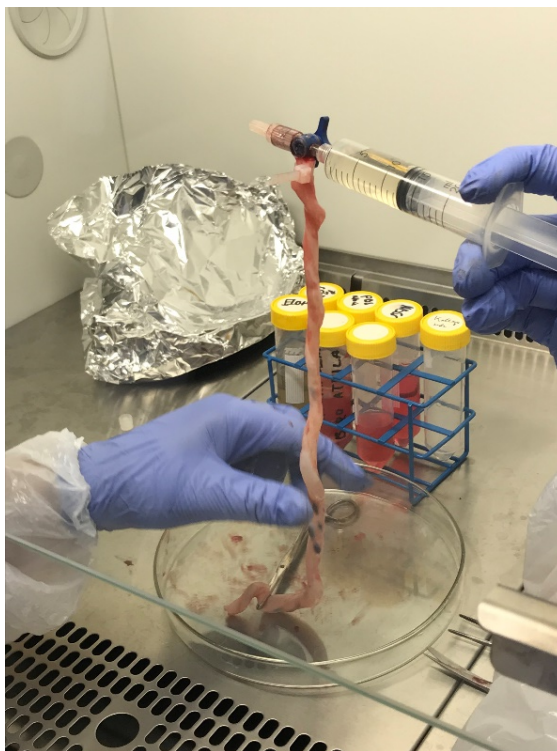
Az alsó végtagi fekélyek státuszát és méreteik változásait a Rheopheresis függvényében terület meghatározással monitoroztuk. A számításokat a National Institutes of Health és a Laboratory for Optical and Computational Instrumentation közös fejlesztéseként ingyenesen elérhető Java-alapú képfeldolgozó szoftver, az ImageJ segítségével végeztük. A vizsgálatok során a fekélyek kezelés előtt és után készült fényképes dokumentációját felhasználva végeztük el fekélyek méreteinek meghatározását. Ennek érdekében az ambuláns lapokon rögzített fekélyméretek alapján, illetve a fekély legnagyobb átmérője alapján határoztuk meg a fotódokumentáción a skálákat, majd a fekélyek sebalapjától vett 10 pixelnyi távolságra, szabadkézzel kontúroztuk a seb területét 3 egymást követő alkalommal, ezt követően a fekélyek area számításához az ImageJ szoftvert alkalmaztuk.

A betegek neuropathiás státuszának monitorozása a kezelések függvényében elektroneurográfiás vizsgálat felhasználásával történt. Az elektroneurographiai méréseket a 9031A006401 Keypoint Clinical System segítségével végeztük. A vizsgálatok a Neurológia Tanszék Elektrofiziológia Laboratóriumában történtek, melyek során mindkét alsóvégtagon a nervus peroneus motoros válaszait, a nervus peroneus superficialis, nervus suralis sensoros válaszait regisztráltuk, továbbá vizsgáltuk a peronealis F-hullám válaszokat. A vizsgálat során ezen idegek konduktanciája, vezetési latenciája, amplitúdója, illetve vezetési sebessége került meghatározásra. A sensoros rostok vizsgálata során antidrom (a normál terjedési iránnyal ellentétes) irányú, az érzőküszöb másfélszeresével történő ingerlést, míg a motoros rostok esetében szintén antidrom irányú, supramaximális ingerlést alkalmaztunk. A regisztrált paramétereket hőmérsékletre és korra korrigáltuk.(31, 89) A vizsgálatokat minden esetben klinikai neurofiziológus szakorvos értékelte.

III. Anyag és módszer 3. – *In vitro* vizsgálatok

III./3./a: HUVEC modell

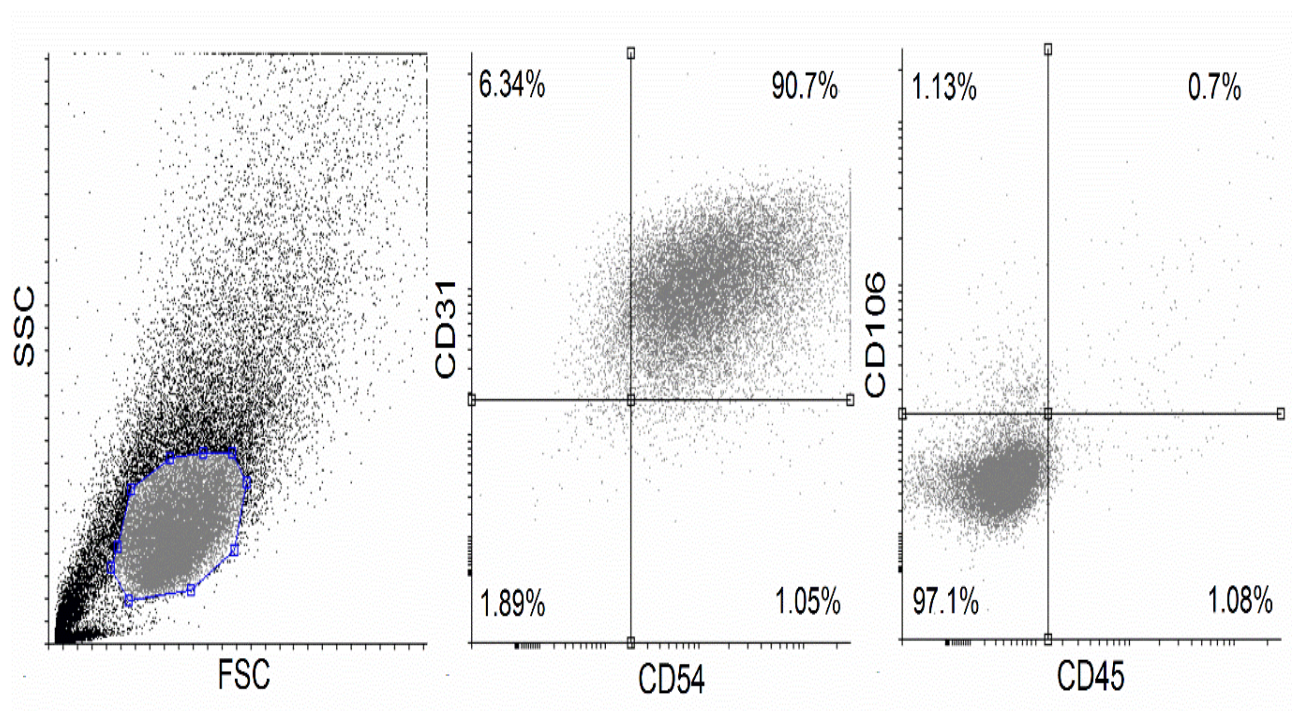
A diabetes mellitus okozta kóros endothelialis elváltozások modellezését HUVEC sejtkultúrán végeztük, etikai engedély birtokában (RKEB/IKEB 3712-2012). Ehhez a vena umbilicalist kanülálása, vértelenítése, majd kollagenáz oldattal való feltöltése után 20 percig 37 °C-on inkubáltuk (7.ábra). Az enzimés emésztést követően a sejtsuszpenziót 8 percig centrifugáltuk, a felülúszó leszívása után a sejteket M199 médiumban szuszpendáltuk, majd sejtenyészítő flaskákba szélesztettük, melyeket 0,5%-os zselatinoldattal 4-8 óráig inkubáltuk a sejtek letapadásának biztosítása céljából. A tenyésztés során az 5%-os CO₂ atmoszférát és a 37 °C-os hőmérsékletet egy Galaxy 170 R inkubátor (Eppendorf, Hamburg, Németország) biztosította. A megfelelő 80-100%-os konfluencia elérését követően, kétszeres alapterületre sejt passzálás történt. A sejtek letapadását tripszin-EDTA (Biosera, Nuaille, Franciaország) oldattal szüntettük meg, majd a reakció leállítása történt négyszeres térfogatú M199 médiummal. A sejtek 50 mL-es centrifugacsövekbe kerültek és 1000 min⁻¹ sebességgel centrifugáltuk őket, végső soron újabb szélesztés történt.



7. ábra: Vena umbilicalis kanülálása és kollagenáz oldatos injektálása

III./3./b: Flow cytometriás analízis

Egy alkalommal flow cytometriás analízissel fenotipizálást végeztünk, azon meggyőződés céljából, hogy a sejtenyésztés során valóban endothelialis sejtek szaporítását végeztük. Az azonosításhoz az endothel sejteket fluorofórral konjugált, egér monoklonális antitestekkel jelöltük. (FITC-CD31 (+), PE-CD54 (+), APC-CD106 (-), PerCP-Cy5.5-CD45(-)) Az elvégzett flow cytometria alapján a sejtek közel 97%-a expresszálta a pozitív markereket és nem expresszálta a negatív markereket, amely igazolja az izolálás hatékonyságát és pontosságát, valamint standardizált körülményeket teremt a további – *in vitro* – vizsgálatokhoz (8.ábra).(90) A sejteket ezután 24 órán keresztül 30 mM koncentrációjú glükóz oldattal kezelve szimuláltuk a cukorbeteg páciensek esetén előforduló intravasculáris hyperglycaemiát.



8. ábra: Endothel sejtek áramlási citometriás elemzése.

Az izolált endothel sejteket specifikus antitestek alkalmazásával ellenőriztük pozitív CD54 és CD31, valamint negatív CD45 és CD106 markerfehérjékre (84)

A sejtenyésztést érintő kísérletek során használt médiumok és pufferek összetétele:

- PBS (Phosphate Buffered Saline) (Biosera, Nuaille, Franciaország): 200 mg/L kálium-klorid, 200 mg/L kálium-foszfát, 8000 mg/L nátrium-klorid, 1150 mg/L nátrium-foszfát.
- HBSS (Hank's Balanced Salts Solution) (Biosera, Nuaille, Franciaország): 185 mg/L kalcium-klorid, 97,67mg/L magnézium-szulfát, 400 mg/L kálium-klorid, 60 mg/L kálium-foszfát, 350 mg/L nátrium-hidrogén-karbonát, 8000 mg/L nátrium-klorid, 47,88 mg/L nátrium-foszfát, 1000 mg/mL D-glükóz, 11 mg/L fenolvörös nátrium sója
- EBM-2 komplett médium: EBM-2 alap táptalaj (katalógusszám: CC-3156) + EGM-2 SingleQuots, különböző faktorokat tartalmazó kit (katalógusszám: CC-4176)
- Szupplementált M199 médium; továbbiakban M199 médium: M199 sejttenyésztő tápoldat (Biosera, Nuaille, Franciaország), ami tartalmaz: 10% hőinaktivált FBS, 10% EBM-2 komplett médiumot, 2 mM glutamint, 59,88 mg/mL penicillin G-t, 100 mg/mL sztreptomicint, 2,5 mg/L amphotericin B-t.

III./3./c: Génexpressziós vizsgálatok HUVEC modellen (Il-6, Il-8, TNF- α , endothelin-konvertáz enzim, ET-1, NO-szintáz)

A génexpressziós vizsgálatokat a hyperglycaemia függvényében qRTPCR analízissel végeztük. A sejteken 24 órán keresztül 30 mM glükózkonzentrációjú oldattal való kezelést végeztünk, majd feltárást követően azokból RNS-t vontunk ki. Az RNS izolálás konvencionális módszerrel történt. A sejtek kaparását trizollal végeztük. Kloroformmal, izopropanollal, illetve etanollal történő lemosást követően az oldás DNÁz/RNÁz mentes vízben történt. A totál RNS-eket reverz transzkriptázzal cDNS-sé alakítottuk (LunaScript RT SuperMix kit - PCR Biosystems, London, UK), majd TaqMan polimeráz által hasított reporter molekula fluoreszcenciájának detektálásával határoztuk meg a detektálási küszöbhez szükséges ciklusszámot (Luna Universal Probe qPCR Master Mix - PCR Biosystems, London, UK). A kapott eredményeket kontroll csoporthoz viszonyítottuk. Háztartási génként GAPDH-t alkalmaztunk. A relatív génexpressziós változást LIVAK módszerrel vizsgáltuk.

III./3./d: ROS szintjének vizsgálata HUVEC modellen

A reaktív oxigéngyökök felszabadulásának vizsgálata 2',7'-dichlorofluorescein diacetát (DCFDA) festéssel történt (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Az intracelluláris reaktív oxigéngyökök jelöléséhez a sejtek 60 percen keresztüli inkubálása történt 100 μ M koncentrációjú DCFDA oldattal, majd fluoreszcencia intenzitás mérést végeztünk Clariostar microplate reader (BMG Labtech, Ortenberg, Németország) felhasználásával (excitation = 485 nm; emission = 530 nm). A vizsgálat során az eredményeket kezeletlen kontroll csoporthoz viszonyítva értékeltük.

III./3./e: Antioxidáns státusz vizsgálata HUVEC modellen

A redukált glutation endothel sejtekben mérhető koncentrációját a Cayman Chemical (Ann Arbor, Michigan, USA) Glutathione Assay Kitjével végeztük. Az endothel sejteket 30 mM koncentrációjú glükóz oldattal kezeltük, majd 0, 6, 12, 24, 48 és 96 óra elteltével a sejteket feltárva, majd a mintákat deproteinálva mértük a redukált glutation sejtekben mérhető koncentrációját, normoglikémiás oldattal kezelt kontroll csoporttal összehasonlítva. A vizsgálat során 414 nm-en vizsgáltuk a minta abszorbancia spektrumát spektrofotometriával (Clariostar).

III. Anyag és módszer 4. – Gyulladásos markerek vizsgálata

A kezelések előtt és után a betegektől vérmintát vettünk, K-3 EDTA véralvadásgátlót tartalmazó steril csöveket felhasználva. A vérmintákat 15 percig centrifugáltuk 3000 RPM-en, 4 °C-on, majd direkt, dupla sandwich ELISA technikával mértük az IL-6, IL-8 és TNF- α vérplazma szintjét az Abcam ELISA gyári Kitjeivel (Abcam PLC, Cambridge, UK) a gyártó által ajánlott lépéseket követve. A mérés során standard-et állítottunk be, majd minden wellbe 100 μ L standard oldat és szérumminta került. A plate kétszeres lemosását követően a biotinilált humán antitestek hozzáadása történt (100 μ L). 37 °C-on, 60 perces inkubálást követően háromszori lemosás történt. Az enzim-konjugált folyadékot a megfelelő wellekhez adtuk, majd a plate ötszöri lemosását végeztük el. 100 μ L Colour Regaent hozzáadását követően a mintát 37 °C-on, 14 percig inkubáltuk, majd 100 μ L Colour Reagent C wellekhez adását követően 450 nm-en mértük a színreakciót spektrofotométerrel. A vizsgálat során a mintákat 5x és 10x hígítás után vizsgáltuk. Az IL-6 teszt szenzitivitása 4,7 pg/mL, az IL-8 teszt szenzitivitása 1,8 pg/mL, míg a TNF- α szenzitivitása 4,32 pg/mL volt.

III. Anyag és módszer 5. – Vasoaktív komponensek vizsgálata

III./5./a: Rheopheresis kezelés hatása az Endothelin-1 vérplazma koncentrációjára

A vérplazma minták Endothelin-1 koncentrációjának vizsgálatához az Abcam ab133030 Endothelin-1 ELISA Kitjét használtuk (Abcam PLC, Cambridge, UK), a mérés során a gyártó ajánlott lépéseit követve. A mérési standard beállítását követően a wellkekhez 100 μ L standardot és szérummintát adtunk, majd ötszöri lemosást végeztünk, 400 μ L Wash Buffer hozzáadásával. A mintákhoz 100 μ L endothelin-1 antitestet adtunk, és a mintákat 30 percig inkubáltuk. Újbóli lemosást követően, a mintákhoz 100 μ L TMB szubsztrát oldatot adtunk, majd az újabb 30 perces inkubálási időt követően, 100 μ L STOP oldat hozzáadása után vizsgáltunk az abszorbanciát 450 nm-en. A mérés során 5x, illetve 10x hígítású mintákat mértünk. A teszt szenzitivitása 0,41 pg/mL volt.

III./5./b: Rheopheresis kezelés hatása a Thromboxán B₂ vérplazma koncentrációjára

A thromboxán B₂ vérplazma koncentrációinak meghatározásához az Abcam ab133022 Tromboxán B₂ ELISA Kitjét alkalmaztuk (Abcam PLC, Cambridge, UK), a gyártó ajánlásai alapján. Mérési standardot állítottunk be, majd 100 μ L standardot és hígított szérummintát adtunk a wellkekhez. Ezek után 50 μ L TXB₂ Alkaline Phosphatase Conjugate oldatot, illetve 50 μ L TXB₂ antitestet adtunk a megfelelő wellkekhez. A mintákat szobahőmérsékleten inkubáltuk 2 órán keresztül és plate shakert alkalmaztunk 500 RPM-en. Háromszori lemosás történt 400 μ L Wash Buffer oldattal, majd 200 μ L pNpp szubsztrát oldat hozzáadását követően a mintákat 45 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Végül 50 μ L STOP oldat hozzáadását követően 405 nm-en vizsgáltuk az abszorbanciát. A mérés során 5x, illetve 10x hígítású mintákat mértünk. A teszt szenzitivitása 10,50 pg/mL volt.

III. Anyag és módszer 6. – Antioxidáns státusz vizsgálata

III./6./a: Rheophereis kezelés hatása a vörösvértestek SOD enzim aktivitására

A SOD enzim antioxidáns kapacitásának vizsgálatához a betegek vérmintáiból származó erythrocytákban vizsgáltuk az enzim aktivitását Photochem berendezéssel, ACW kit (Analytik Jena, Jena, Németország) felhasználásával. 10 µL-nyi vörösvértesthez 1.5 mL reagens 1-et, 1 mL reagens 2-t és 25 µL reagens 3-at (photosensitizer) adtunk. Standardként SOD enzimet (Superoxid Dismutase, Sigma Aldrich, Németország) alkalmaztunk.

III./6./b: Rheopheresis kezelés hatása a vérplazma glutation pooljának változására

A minták előkészítése a total tiol és diszulfid mérésekhez Fu és mtsai. módszere szerint történt. (91)

Cisztein, homocisztein, ciszteinil-glicin, γ -glutamil-cisztein, cisztin, glutation standard keveréket (koncentráció: 10 µg/mL minden vegyületre) készítettünk (Merck Life Science Kft., Budapest). Az N-acetilcisztein forgalmazója (A15409.14) a VWR International Kft., Debrecen, Magyarország. 150 µL standard keverékhez 300 µL N-etil-maleimid (NEM) oldatot (koncentráció: 100 µg/mL), 1020 µL vizet és 30 µL hangyasavoldatot (0,01%, V/V) adtunk. A reakcióelegyet 37 °C-on 30 percig termosztáltuk. Lehűlés után hét 0,1, 1, 5, 10, 25, 50 és 100 ng/mL koncentrációjú standard oldatot készítettünk vízzel hígítva.

LC-MS analízis: Az elemzéseket Dionex Ultimate 3000RS UHPLC rendszerrel (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) végeztük, egy Thermo Q Exactive Orbitrap hibrid tömegspektrométerrel, amely Acclaim Mixed-Mode HILIC-1 (2,1 x 150 mm) analitikai oszloppal volt felszerelve (3 µm szemcseméret). Az áramlási sebességet 0,3 mL/perc értéken tartottuk. Az oszlopkollona és az oszlophűtő hőmérsékletét 25 °C $\pm$ 1 °C-ra állítottuk be. A mintákat 25 °C $\pm$ 1 °C hőmérsékleten termosztáltuk. A mozgó fázis vízből (A) és metanolból (B) állt (mindkettőt 0,1%-os hangyasavval savasítottuk). A gradiens program a következő volt: 0-1 perc, 95% A; 1-6 perc, $\rightarrow$ 0% A; 6-10 perc, 0% A; 10-10,5 perc, $\rightarrow$ 95% A; 10,5-20 perc, 95% A. Az injekció térfogata 5 µl volt. A Thermo Q Exactive Orbitrap hibrid tömegspektrométer (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) HESI forrással volt felszerelve. A mintákat pozitív ion módban, Selected Ion Monitoring (SIM) technikával mértük a következő

felvételi listával ($[M + H]^+$): Cisztein-NEM ($C_9H_{15}N_2O_4S$): 247,07525, N-acetilcisztein-NEM ($C_{11}H_{17}N_2O_5S$): 282,08. Homocysteine-NEM ($C_{11}H_{17}N_2O_5S$): 261.09090, Cysteinylglycine-NEM ($C_{11}H_{18}N_3O_5S$): 304.09672, γ -Glutamylcysteine-NEM ($C_{14}H_{22}N_3O_7S$): 376.11785, Cystine ($C_6H_{13}N_2O_4S_2$): 241.03167, Glutathione-NEM ($C_{16}H_{25}N_4O_8S$): 433.13931, Glutathione disulfide ($C_{20}H_{33}N_6O_{12}S_2$) : 613,15979. A kapilláris hőmérsékletet 320 °C-ra állítottuk be, és a permetezési feszültséget 4,0 kV-ra állítottuk be. Felbontás: 35.000. A köpenygáz áramlási sebessége és a segédgáz áramlási sebessége 32 AU, illetve 7 AU volt. A mért és számított monoizotópos molekulatömegek közötti különbség minden esetben kisebb volt, mint 5 ppm. Az adatokat Thermo Xcalibur 4.0 szoftverrel (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) gyűjtöttük be és dolgoztuk fel.

III. Anyag és módszer 7. – Statisztikai analízisek

III./7./a: *In vitro* eredmények, Il-6, Il-8, TNF- α , ET-1, TXB2 plazmakoncentrációk, SOD enzimaktivitás statisztikai elemzése

Minden kísérletet három párhuzamosban végeztünk. Az adatokat három egyedi kísérlet átlaga $\pm$ SEM értékében fejeztük ki. Statisztikai elemzést végeztünk többszörös összehasonlításhoz, az eredményeket ANOVA-val elemeztük, majd módosított t-teszttel az ismételt mérésekhez Bonferroni módszere szerint. A statisztikailag szignifikáns küszöbértéke $p < 0,05$ volt.

Az Il-6, Il-8, TNF- α , ET-1, TXB2, SOD enzimaktivitás kezelés előtti és kezelés utáni értékeit Wilcoxon rang-összeg nem-paraméteres tesztekkel is összevetettük. A statisztikailag szignifikáns küszöbértéke szintén $p < 0,05$ volt.

III./7./b: A teljes vér és plazma viszkozitás változásának, illetve teljes tiol és diszulfid vizsgálatok statisztikai elemzése

A Shapiro–Wilk tesztet használtunk annak meghatározására, hogy a mért értékek normális eloszlásúak-e. Normál eloszlás esetén Welch t-próbáját alkalmaztuk a statisztikai szignifikancia tesztelésére. Egyébként Kruskal–Wallis és Wilcoxon rang-összeg nem-paraméteres tesztekkel alkalmaztuk. A p értékeket a Benjamini–Hochberg módszerrel korrigáltuk. A szignifikancia küszöbértéket $p < 0,05$ -re állítottuk be.

IV. Eredmények 1. – Rheopheresis kezelések klinikai eredményei

IV./1./a: Haemorheológiai paraméterek változása a rheopheresis függvényében

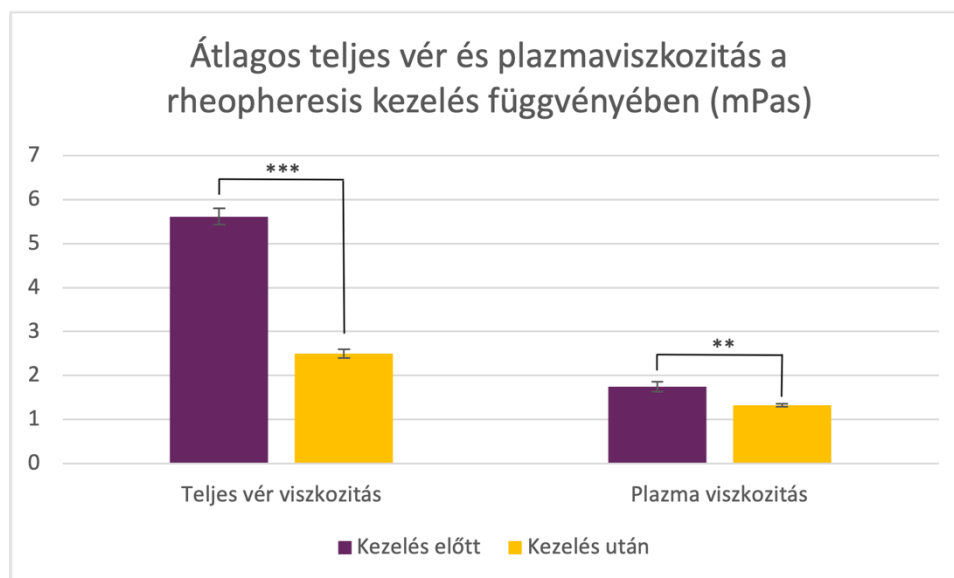
A rheopheresis kezelés hatására a neuropathiás, illetve alsó végtagi fekélyben szenvedő páciensekben egyaránt jelentős javulást mutatott mind a teljes vér, mind a plazma viszkozitás. A haemorheológiai paraméterek változásai neuropathiás páciensek esetében a 2. táblázatban, míg az alsó végtagi fekélyben szenvedő betegek teljes vér és plazma viszkozitásának változásait a 3. számú táblázatban foglaltuk össze. A viszkozitási paraméterek átlagos változását a rheopheresis kezelés függvényében, illetve az elvégzett statisztikai analízis eredményeit a 9. ábrán mutatjuk be.

	Kor	Nem	Rheopheresisek száma	Teljes vér viszkozitás kezelés előtt és után (mPas)		Plazma viszkozitás kezelés előtt és után (mPas)	
Beteg 1 (G.M.)	65	férfi	7	5,34	3,97	1,59	1,04
Beteg 2 (E.J.)	55	férfi	6	4,79	4,19	2,36	1,27
Beteg 8 (Cs.Z.)	62	férfi	2	5,56	4,46	1,36	1,19
Beteg 9 (M.I.)	59	férfi	2	4,92	4,34	1,34	1,28
Beteg 10 (Cs.L.)	66	férfi	3	6,03	4,6	1,69	1,28
Beteg 11 (T.Cs.)	63	férfi	2	6,06	3,29	1,79	1,45

2. táblázat: Diabeteses neuropathiában szenvedő páciensek teljes vér- és plazmaviszkozitásnak változása a Rheopheresis függvényében(31)

	Kor	Nem	Rheopheresisek száma	Teljes vér viszkozitás a kezelés előtt és után (mPas)		Plazma viszkozitás a kezelés előtt és után (mPas)	
Beteg 3 (L.I.)	43	férfi	5	5,43	4,26	1,43	1,17
Beteg 4 (P.J.)	68	férfi	4	7	4,52	1,44	1,17
Beteg 5 (K.K.)	56	férfi	2	5,07	4,62	1,45	1,4
Beteg 6(K.B.)	73	nő	2	5.95	4,68	1,94	1,51
Beteg 7 (S.J.)	75	nő	2	5,98	3,62	1,94	1,36
Beteg 12 (B.J.)	59	férfi	4	6	4,04	2,23	1,24
Beteg 13 (N.I.)	67	férfi	1	4,15	4,0	1,55	1,51
Beteg 14 (Sz.F.) †	64	férfi	2	mérhetetlen	4,34	mérhetetlen	1,54
Beteg 15 (T.M)	52	férfi	2	4,85	4,49	1,5	1,39
Beteg 16 (T.T.)	65	férfi	2	5,27	3,63	1,54	1,37
Beteg 17 (F.É.)	62	nő	2	6,63	3,29	1,7	1,45
Beteg 18 (P.I.) †	66	férfi	3	4,9	3,31	1,57	1,19

3. táblázat: Diabeteses, illetve PAD talaján kialakult alsó végtagi fekélyben szenvedő páciensek teljes vér- és plazmaviszkozitásának változása a Rheopheresis kezelés függvényében(31)



9. ábra: Az átlagos teljes vér és plazma viszkozitás változása és statisztikai elemzése, a Rheopheresis kezelés függvényében. Az adatokat a betegek egyedi vizsgálatának átlagaként $\pm$ SEM fejezzük ki. **, és * szignifikáns ($p < 0,005$, $0,0005$) különbséget jelez (Kruskal–Wallis és Wilcoxon rangösszegű nem-parametrikus tesztek).**

IV./1./b: Neuropathiás páciensek klinikai eredményei

Vizsgálatainkba olyan páciensek kerültek beválasztásra, akiknél a beállított fájdalomcsillapító gyógyszeres terápia ellenére a polyneuropathiás panaszok nem, vagy nem kellő mértékben mérséklődtek. A betegeknél a neuropathia az irodalmi tünettannak megfelelően égő, szúró, zsibbadó, sokszor tűrhetetlen alsó végtagi panaszokat okozott, melyek általában éjszaka jelentkeztek, pihenéskor fokozódtak, mozgás esetén mérséklődtek. Az alsó végtagi fekélyben nem szenvedő polyneuropathiás csoportunkba 6 páciens került. A klinikánkon elvégzett Rheopheresis kezelések hatására egy páciens kivételével minden esetben kifejezett panaszcsökkenésről számoltak be pácienseink, több esetben egyetlen Rheopheresist követően is mérséklődött a neuropathiás fájdalom. A fájdalom változását numerikus fájdalomskálán rögzítettük. A kezelés hatására a páciensek gyógyszeres fájdalomcsillapító igénye szintén csökkent. (4. táblázat). A szubjektív javulás minden esetben objektíven is alátámasztható volt. A kezeléseket követő ENG vizsgálatok összehasonlításra kerültek a kezelést megelőző vizsgálatokkal, ezek során megnövekedett amplitúdó és javuló vezetési sebességek igazolták a kezelés hatásosságát. Két páciens esetében javultak a motoros rostok amplitúdói, átlagosan 0,8 mV-tal, három páciensnél volt kimutatható a sensoros rostok javulása, ezekben az esetekben a vezetési amplitúdó átlagosan 2,06 μ V-tal növekedett. Egy esetben növekedett a sensoros rostok vezetési sebessége, mintegy 17,3 m/s-mal, ez 48,3%-os növekedést jelentett. Egy esetben a páciens panaszai nem mérséklődtek, a kezelést követő ENG nem mutatott változást (5. táblázat).(31)

	Kor	Nem	Fájdalomérték a kezelés előtt és után		Szükséges fájdalomcsillapító dózis kezelés előtt és után	
Beteg 1 (G.M.)	65	férfi	10	6	Cymbalta 60 mg, Lyrica 4x150 mg, Gordius 5x300 mg, Thiogamma 600 mg	Lyrica 3x150, Thiogamma 600 mg
Beteg 2 (E.J.)	55	férfi	9	6	Cymbalta 60 mg, Lyrica 2x150 mg, Thiogamma 600 mg	Thiogamma 600 mg
Beteg 8 (Cs.Z.)	62	férfi	8	4	Lyrica 2x150 mg	
Beteg 9 (M.I.)	59	férfi	7	7	Apranax Dolo 220 mg, Thiogamma 600 mg	Apranax Dolo 220 mg, Thiogamma 600 mg
Beteg 10 (Cs.L.)	66	férfi	9	5	Lyrica 2x150 mg, Thiogamma 600 mg	Lyrica 2x75 mg, Thiogamma 600 mg
Beteg 11 (T.Cs.)	63	férfi	6	2	Lyrica 2x150 mg, Thiogamma 600 mg	Thiogamma 600 mg

4. táblázat: Panaszok és fájdalomcsillapító igény változása a Rheopheresisek függvényében

	ENG változása a Rheopheresisek függvényében			
Beteg 1 (G.M.)	Mko. nervus peroneus motoros rostjaiban amplitúdó növekedés			
	Bal oldali nervus peroneus motoros amplitúdói kezelés előtt és után:		Jobb oldali nervus peroneus motoros amplitúdói kezelés előtt és után:	
	Boka - EDB: 1,64 mV	Boka - EDB: 2,1 mV	Boka - EDB: 1,24 mV	Boka - EDB: 1,79 mV
Beteg 2 (E.J.)	Jobb nervus peroneus superficialis sensoros vezetésének javulása			
	Jobb nervus peroneus superficialis sensoros vezetése kezelés előtt és után:			
	Calf -Ankle lat.: 35,8 m /s		Calf -Ankle lat.: 53,1 m /s	
	Mko. nervus suralis sensoros rostjaiban amplitúdó növekedés			
	Bal oldali nervus suralis sensoros amplitúdói kezelés előtt és után:		Jobb oldali nervus suralis sensoros amplitúdói kezelés előtt és után:	
	Calf - Ankle lat.: 0 μV	Calf - Ankle lat.: 1,57 μV	Calf - Ankle lat.: 0 μV	Calf - Ankle lat.: 3,8 μV
Beteg 8 (Cs.Z.)	Mko. nervus peroneus superficialis sensoros rostjaiban amplitúdó növekedés			
	Bal oldali nervus peroneus superficialis sensoros amplitúdói kezelés előtt és után:		Jobb oldali nervus peroneus superficialis sensoros amplitúdói kezelés előtt és után:	
	Tib. lat. - Ankle: 0,62 μV	Tib.lat. - Ankle: 3.8 μV	Tib. lat. - Ankle: 3,1 μV	Tib. lat. - Ankle: 4,1 μV
	Mko. nervus suralis sensoros rostjaiban amplitúdó növekedés:			
	Bal oldali nervus suralis sensoros amplitúdói kezelés előtt és után:		Jobb oldali nervus suralis sensoros amplitúdói kezelés előtt és után:	
	Calf – Ankle lat.: 3,7 μV	Calf – Ankle lat.: 4,3 μV	Calf – Ankle lat.: 4,0 μV	Calf – Ankle lat.: 7,1 μV
Beteg 9 (M.I.)	ENG változást nem mutatott			
Beteg 10 (Cs.L.)	Jobb nervus peroneus superficialis sensoros rostjaiban amplitúdó növekedés			
	Jobb oldali nervus peroneus superficialis sensoros amplitúdói a kezelés előtt és után:			
	Tib lat. – Ankle: 3.0 μV		Tib. lat. – Ankle: 4. 2 μV	
Beteg 11 (T.Cs.)	Mko. nervus peroneus motoros rostjaiban amplitúdó növekedés			
	Bal oldali nervus peroneus motoros amplitúdói kezelés előtt és után:		Jobb oldali nervus peroneus motoros amplitúdói a kezelés előtt és után	
	Calf – Ankle lat.: 0 mV	Calf – Ankle lat.: 1.27 mV	Calf – Ankle lat.: 0 mV	Calf – Ankle lat.: 0.92 mV

5. táblázat: ENG változása a Rheopheresisek után a diabeteses neuropathiás páciensek eseteiben (31)

IV./1./b: Fekélyes betegek klinikai eredményei

A 13 fekélyes betegből 10 beteg szenvedett diabetestől, 4 betegnél egyaránt fennállt a polyneuropathia diagnózisa. A korábban gyógyhajlamot nem mutató alsó végtagi ulcusok legtöbbször 2 kezelés után kezdtek el szanálódni. 10 páciens esetében részleges, vagy teljes gyógyulást értünk el a diabetes által indukált fekélyek Rheopheresis kezelésével. A három macrovascularis helyreállításra alkalmatlan, hyperviscositással társuló perifériás artériás érbeteg páciens esetében az alsó végtagi amputációt elkerülni nem tudtuk, azonban fontos kiemelni, hogy ezen casusokban a betegek compliance-e nem volt megfelelő, ami igen nagy mértékben nehezítette a probléma orvoslását. A három páciens közül két beteg onkológiai megbetegedés következtében 2021-ben elhunyt. (6. táblázat). A páciensek fekélyeinek gyógyulásáról szóló fotódokumentációt a 10-15. ábrán mutatjuk be.

	Panaszok változása a kezelés előtt (E) és után (U)
Beteg 2 (G.M.)	E: Jobb lábszáron 2 db 2x2x0,8 cm nagyságú pörkkel fedett fekély, $A_{area}=272,739 \text{ mm}^2$ U: Gyógyult fekély
Beteg 3 (L.I.)	E: Jobb I-II-III. lábujj amputációt követő hegben 4x2x1 cm-es gennyes fekély $A_{area}=523,004 \text{ mm}^2$ U: Gyógyult fekély
Beteg 4 (P.J.)	E: Bal oldali gyógyhajlamot nem mutató 3x1x0,5 cm-es fekély azó bal I-es metartus fölött $A_{area}=430,326 \text{ mm}^2$ U: Gyógyult fekély
Beteg 5 (K.K.)	E: Jobb sarkon gyógyhajlamot nem mutató 6x6x1 cm-es fekély $A_{area}=1966,421 \text{ mm}^2$ U: Fekély 1x1x0,5 cm-re zsugorodott $A_{area}=564,781 \text{ mm}^2$
Beteg 6 (K.B)	E: Jobb oldali 3x2x0,5 cm nagyságú lábszárfekély $A_{area}=445,14 \text{ mm}^2$ U: Gyógyult fekély
Beteg 7 (S.J.)	E: Jobb oldali 6x4x0,5 cm nagyságú gyógyhajlamot nem mutató lábszárfekély $A_{area}=1740,637 \text{ mm}^2$ U: Gyógyult fekély
Beteg 12 (B.J.)	E: Bal I.-es lábujj 0,5x0,5x0,5 cm nagyságú fekélye U: Gyógyult fekély
Beteg 13 (N.I.)	E: Bal I-II-III. lábujj necrotikus sebek U: I-II. lábujj fekély átmenetileg gyógyult, majd amputáció
Beteg 14 (Sz.F.) †	E: Bal IV-V. lábujj necroticus sebek U: Amputáció
Beteg 15 (T.M.)	E: Bal talpi 3x2x1 cm nagyságú fekély U: Fekély 1x1x0,5 cm-re zsugorodott
Beteg 16 (T.T.)	E: Jobb I-es lábujj 0,5x0,5x0,5 cm nagyságú fekélye U: Gyógyult fekély
Beteg 17 (F.É.)	E: Bal sarkán megjelenő 2x3x1 cm nagyságú neuropathiás fekély U: Gyógyult fekély
Beteg 18 (P.I.) †	E: Jobb belboka feletti gyógyhajlamot nem mutató fekély U: Amputáció

6. táblázat: Fekélyes panaszok változása a Rheopheresis kezelés függvényében(31)
 A_{area} : átlagos fekélyterület



10. ábra: Beteg 1 fekélyeinek gyógyulása



11. ábra: Beteg 3 fekélyének gyógyulása

A Beteg 3 fotódokumentációját készítette: Dr. Diószegi Ágnes



12. ábra: Beteg 4 fekélyének gyógyulása



13. ábra: Beteg 5 fekélyének gyógyulása



14. ábra: Beteg 6 fekélyének gyógyulása



15. ábra: Beteg 7 fekélyének gyógyulása

IV. Eredmények 2. – *In vitro* vizsgálatok

IV./2./a: Génexpressziós vizsgálatok

A gyulladásos citokinek expresziójával kapcsolatos méréseink azt mutatták, hogy a 24 órán át tartó 30 mM koncentrációjú glükózoldattal való inkubáció a kontrollcsoportéhoz képest szignifikánsan fokozta mind a TNF- α , IL-6 és IL-8 génjeinek expresszióját. Az endothelin-1 és a preproendothelinből lehasadó aktív endothelin-1 képződés sebességmeghatározó katalizátora, az endothelin konvertáló enzim génjeiről átíródott intracelluláris mRNS mennyiség is szignifikáns növekedést mutatott a magas glükóz koncentráció hatására, ezzel szemben a NO szintáz enzim expresszióját nagy mértékben gátolta az extrém magas extracelluláris glükóz szint által okozott stressz. A génexpressziós vizsgálatok eredményei 16. ábrán láthatóak.

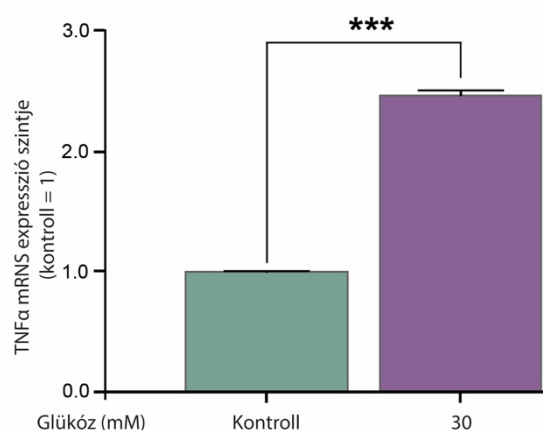
IV./2./b: ROS szint változásai HUVEC modellen

A szabadgyökök vizsgálatával kapcsolatos eredményeink azt mutatták, hogy a hyperglycaemia elősegíti az endothel sejtek reaktív oxigén származékok termelését. A 24 órán keresztül tartó perzisztens pathológiás glükózkoncentráció hatására a sejtek ROS tartalma jelentősen fokozódik. (17. ábra)

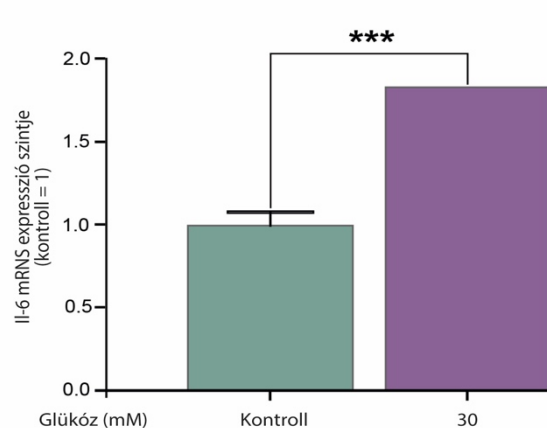
IV./2./c.: Endothel sejtek redukált glutation koncentrációjának változásai HUVEC modellen

Eredményeink azt mutatták, hogy a magas koncentrációjú glükózoldattal kezelt minták esetében a redukált glutation fehérje koncentrációja messze elmarad a kontroll csoportokéhoz képest. Az idő függvényében az látszik, hogy az első 24 órában az extrém magas glükózkoncentrációjú minták és a kontroll csoport közötti GSH koncentrációban mérhető különbség fokozatosan növekszik. A 24. órától kezdve, - amikor a kezelt mintákban a legalacsonyabb volt a GSH koncentráció – a különbség fokozatosan csökkenni látszik, bár így is jelentős. (18. ábra)

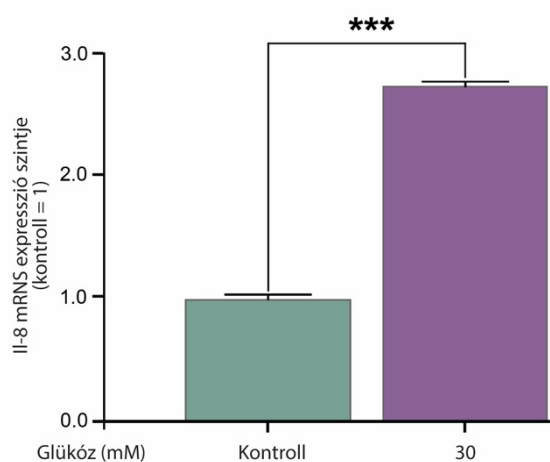
16./a



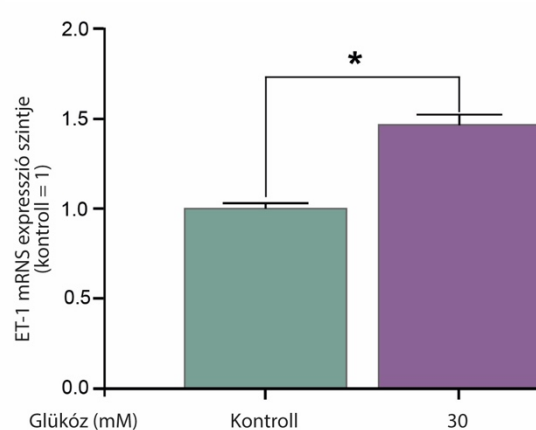
16./b



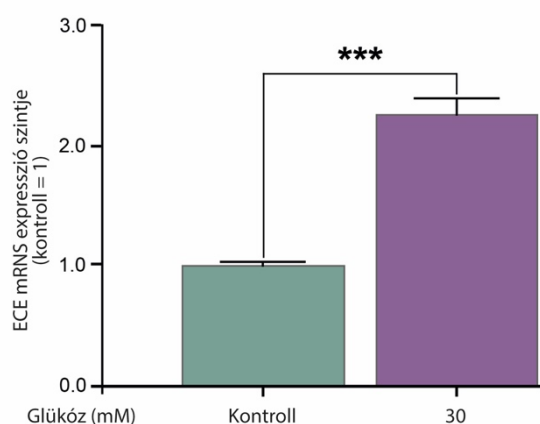
16./c



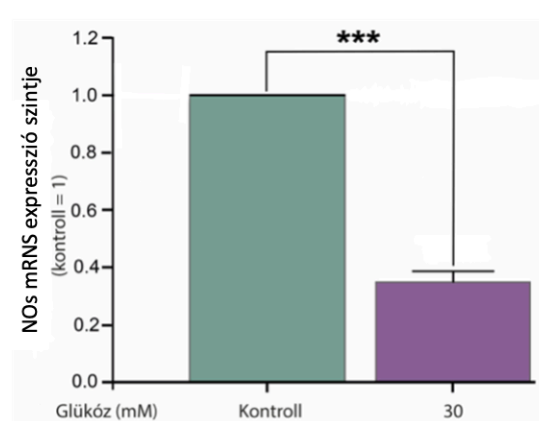
16./d



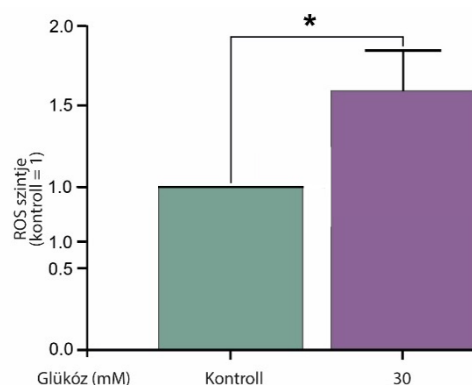
16./e



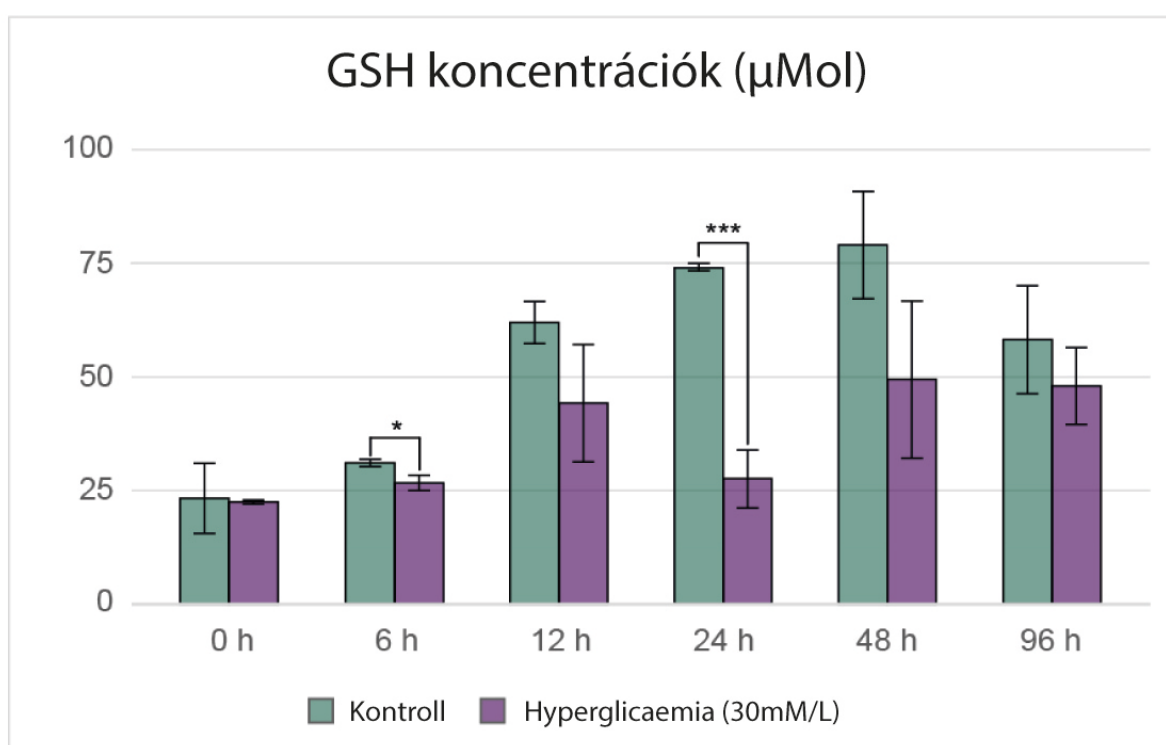
16./f



16. ábra: Változások a TNF- α (16./a) IL-6, (16./b) IL-8 (16./c), ET-1 (16./d), ECE (16./e) és NOS (16./f) gének endothelialis expressziójában, HUVEC-modellen, 30 mM glükózzal végzett 24 órás kezelés után. Minden kísérletet három párhuzamosban végeztünk. Az adatokat három egyedi kísérlet átlagaként $\pm$ SEM fejezzük ki. *, és * szignifikáns ($p < 0,05$, 0,0005) különbséget jelez a kontrollhoz képest (módosított t-próba).**



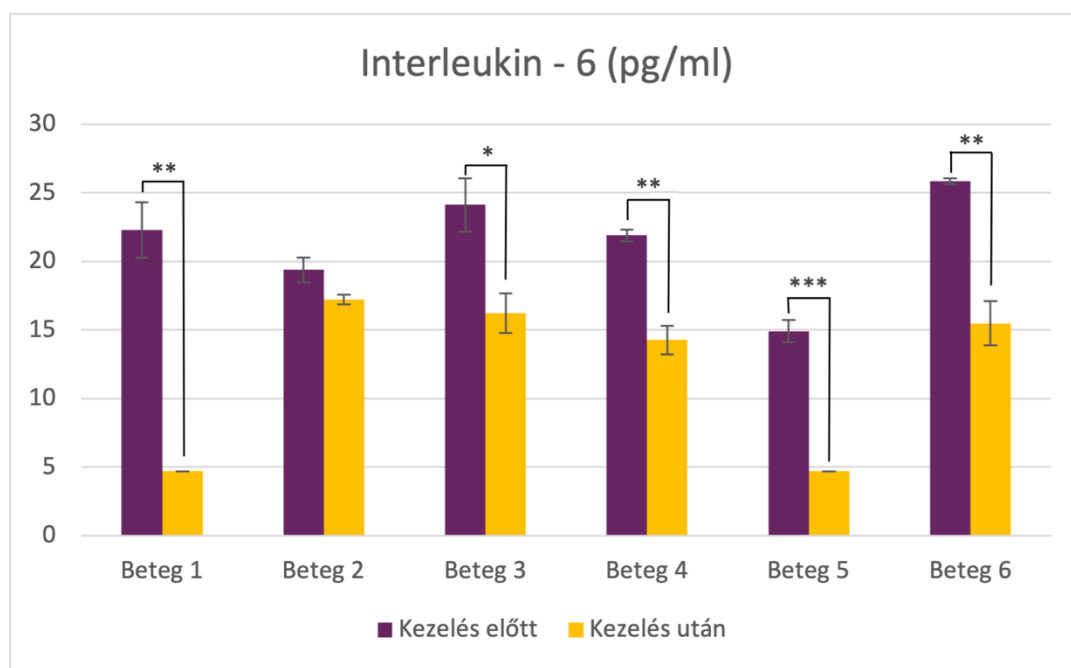
17. ábra: A reaktív oxigéngyök szintek változása HUVEC modellen 30 mM glükózzal végzett 24 órás kezelés után. Minden kísérletet három párhuzamosban végeztünk. Az adatokat három egyedi kísérlet átlagaként $\pm$ SEM fejezzük ki. * szignifikáns ($p < 0,05$) különbséget jelez a kontrollhoz képest (módosított t-próba).



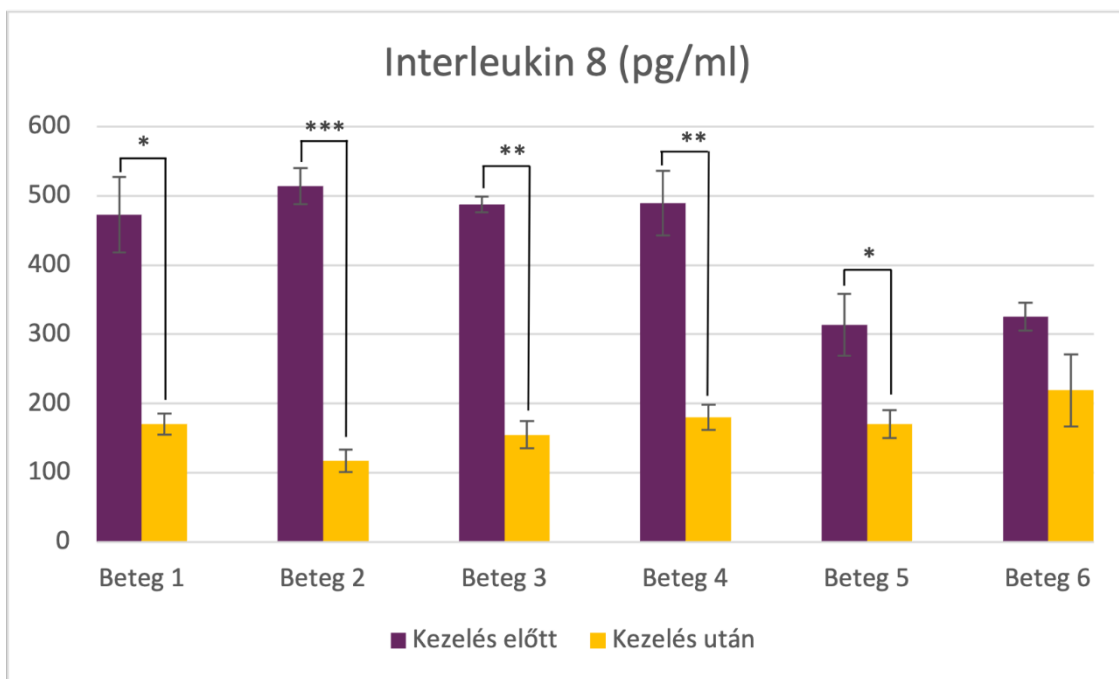
18. ábra: A sejtek GSH-koncentrációjának változása 30 mM glükóz hatására a kezelés megkezdése után 6, 12, 24, 48 és 96 órával. Minden kísérletet három párhuzamosban végeztünk. Az adatokat három egyedi kísérlet átlagaként $\pm$ SEM fejezzük ki. *, ** és * szignifikáns ($p < 0,05$, $0,0005$) különbséget jelez a kontrollhoz képest (módosított t-próba).**

IV. Eredmények 3. – Rheopheresis kezelés hatása a gyulladásos citokinek vérplazma koncentrációira

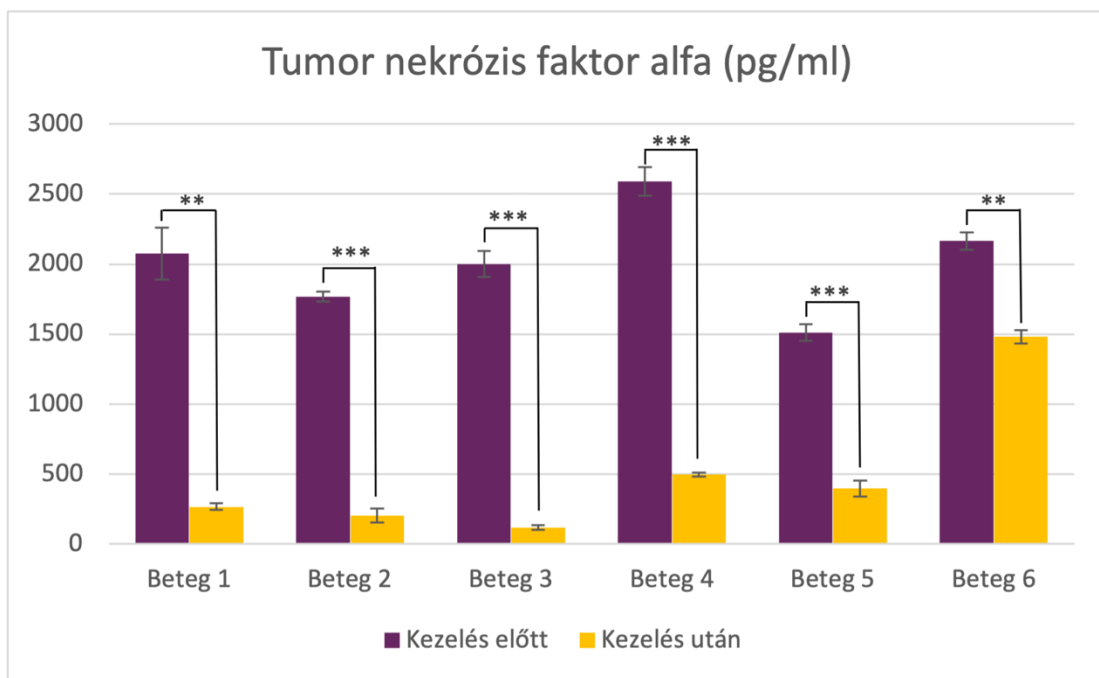
Az IL-6 vérplazmában mérhető értéke a kezeléseket követően átlagosan 44,35%-kal csökkent, a Rheopheresiseket megelőző értékekhez képest (19. ábra). A változás 5 beteg esetén volt szignifikáns. A kezelés előtti és utáni vérplazmakoncentrációkat Wilcoxon párosított próbával összevetve a különbség szignifikáns ($p=0,02$). Az IL-8 vérplazma szintje 5 esetben szignifikánsan mértékben lecsökkent, átlagosan 61,76%-kal a Rheopheresis hatására (20. ábra.). Az elvégzett Wilcoxon teszt alapján a különbség szignifikáns ($p=0,0022$). A TNF- α extrém mértékben, átlagosan 78,56%-kal csökkent a kezelések hatására. A csökkenés minden esetben szignifikáns volt (21. ábra). Az elvégzett Wilcoxon rangösszegű nem-paraméteres teszt alapján a különbség szignifikáns ($p=0,022$).



19. ábra: IL-6 vérplazma koncentrációinak változása a Rheopheresisek hatására. Minden kísérletet három párhuzamosban végeztünk. Az adatokat három egyedi kísérlet átlagaként $\pm$ SEM fejezzük ki. *, ** és * szignifikáns ($p < 0,05$, $0,005$, illetve $0,0005$) különbséget jelez a kezelés előtti és a kezelés utáni vérplazma között (módosított t-próba)**



20. ábra: IL-8 vérplazma koncentrációjának változása a Rheopheresisek hatására. Minden kísérletet három párhuzamosban végeztünk. Az adatokat három egyedi kísérlet átlagaként $\pm$ SEM fejezzük ki. *, ** és * szignifikáns ($p < 0,05$, $0,005$, illetve $0,0005$) különbséget jelez a kezelés előtti és a kezelés utáni vérplazma között (módosított t-próba)**

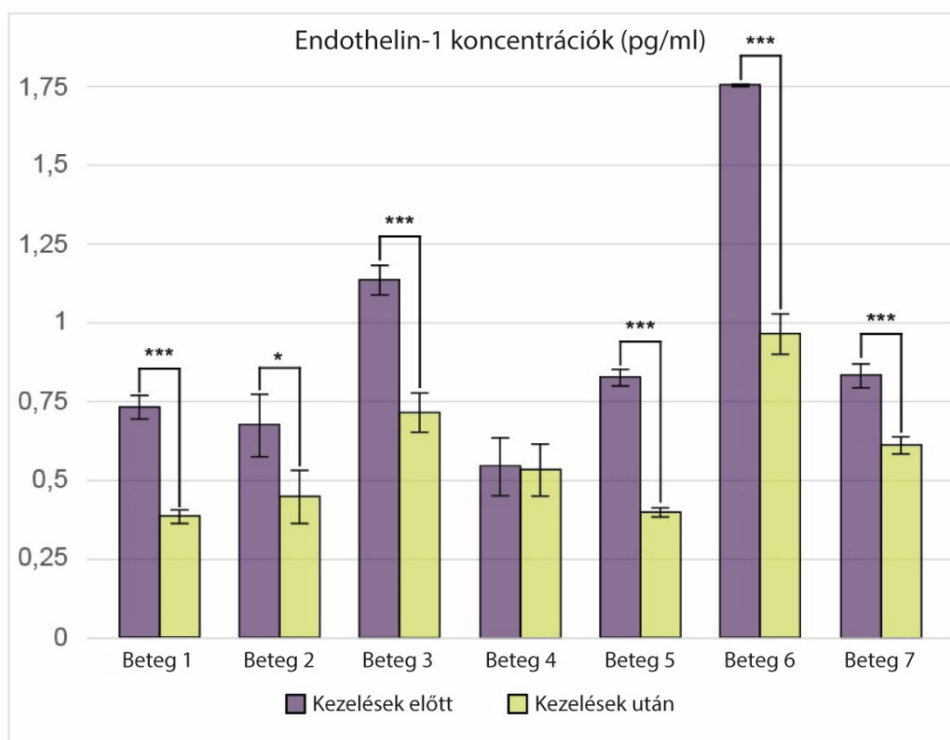


21. ábra: Tnf- α vérplazma koncentrációjának változása a Rheopheresisek hatására. Minden kísérletet három párhuzamosban végeztünk. Az adatokat három egyedi kísérlet átlagaként $\pm$ SEM fejezzük ki. ** és * szignifikáns ($p < 0,005$, illetve $0,0005$) különbséget jelez a kezelés előtti és a kezelés utáni vérplazma között (módosított t-próba)**

IV. Eredmények 4. – Rheopheresis kezelés hatása a vascularis mediátorokra és antioxidáns ágensekre

IV/4./a: Rheopheresis kezelés hatása az Endothelin -1 vérplazma koncentrációira

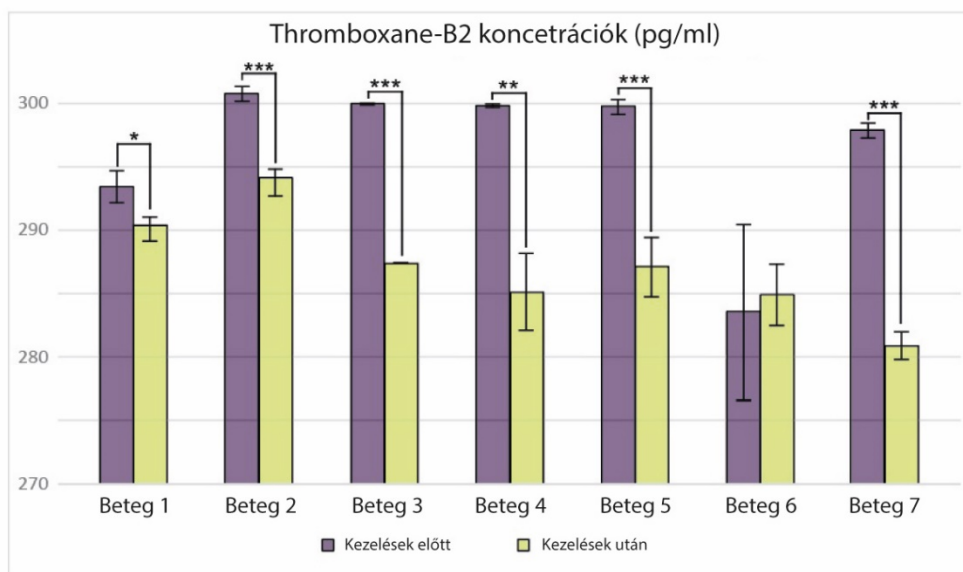
A kezelések előtt és után vett vérminták endothelin-1 koncentrációját összehasonlítva azt találtuk, hogy 2 Rheopheresis után a vérminták endothelin-1 koncentrációja a 7 beteg közül 6 esetében volt jelentősen alacsonyabb a kezelés előtti állapothoz képest. (22.ábra) A kezelés előtti és utáni adatok Wilcoxon párosított próbával való összevetése alapján a különbség szignifikáns ($p=0.038$).



22. ábra: Az endothelin-1 plazmakoncentrációjának változása a Rheopheresis kezelésekre hatására. Minden kísérletet három párhuzamosan végeztünk. Az adatokat három egyedi kísérlet átlagaként $\pm$ SEM fejezzük ki. *, és * szignifikáns ($p<0,05$, illetve $0,0005$) különbséget jelez a kezelés előtti és a kezelés utáni vérplazma között (módosított t-próba)**

IV./4./b: Rheopheresis hatása a Tromboxán B2 vérplazma koncentrációira

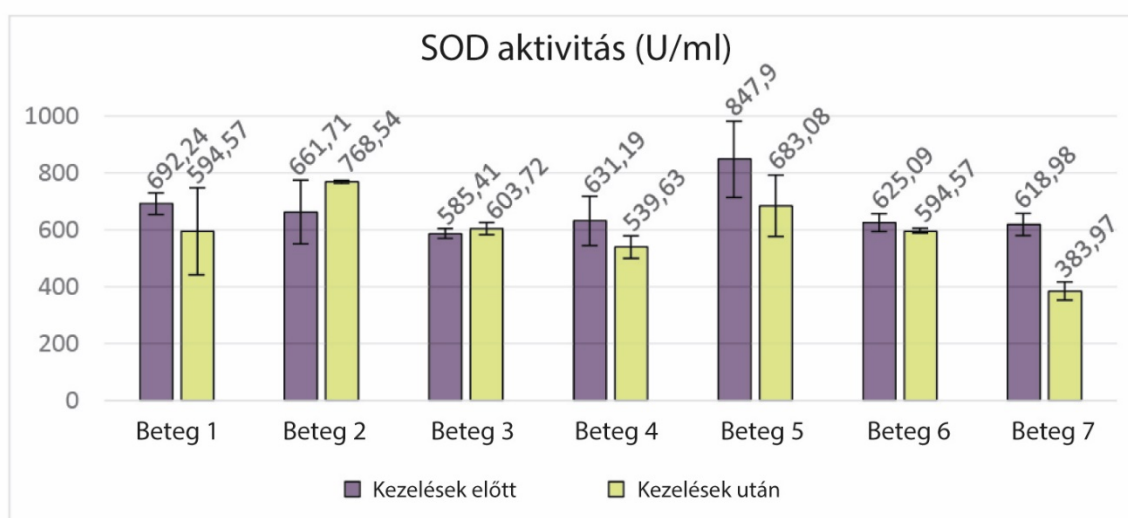
A 7 beteg vérmintáin elvégzett ELISA vizsgálatok azt mutatták, hogy 2 Rheopheresis kezelés hatására 6 beteg esetében kis mértékben, de szignifikánsan lecsökkent a vérplazma Tromboxán-B₂ koncentrációja. (23. ábra) A kezelés előtti és kezelés utáni értékeket Wilcoxon rangösszegű nem-paraméteres próbával összevetve a különbség szignifikáns ($p=0,017$)



23. ábra: A tromboxán B2 plazmakoncentrációjának változása a Rheopheresis kezelése hatására. A kísérletet három párhuzamosban végeztük. Az adatokat három egyedi kísérlet átlagaként $\pm$ SEM fejezzük ki *, ** és *, amelyek szignifikáns ($p<0,05$, $p<0,005$ és $p<0,0005$) különbséget jeleznek a kezelés előtti és a kezelés utáni vérplazma között. (módosított t-próba).**

IV./4./c: Rheopheresis kezelés hatása a SOD enzim aktivitásra

Hét beteg vérmintáiban a SOD enzim aktivitásának mértékét meghatározva, méréseink nem mutattak egyértelmű eredményeket. Habár a 7 páciensből 5 esetében nagy mértékű csökkenést tapasztaltunk, átlagosan 18,06%-os értékkel, azonban a 2-es betegünk esetén a SOD enzim aktivitásának 16%-os fokozódást mutatott, míg a 3-as számú betegünk enzimének aktivitása a kezelést követően közel azonos volt a kezelés előtti állapottal, itt csupán 3,13%-os növekedést tapasztalunk. (24.ábra) Habár az eredmények statisztikailag nem mutattak szignifikáns változást, a vizsgálati eredménynek a további kutatás szempontjából kiemelt szerepe volt.

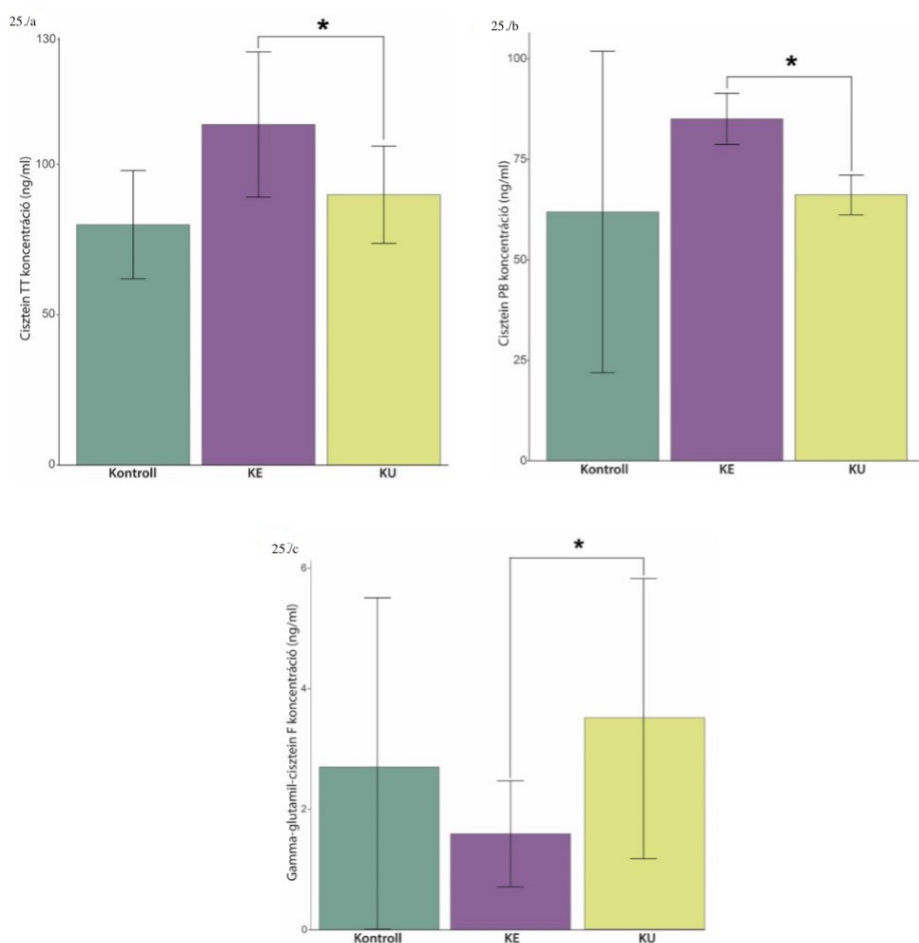


24. ábra: SOD enzim aktivitás változása a Rheopheresis kezelése hatására

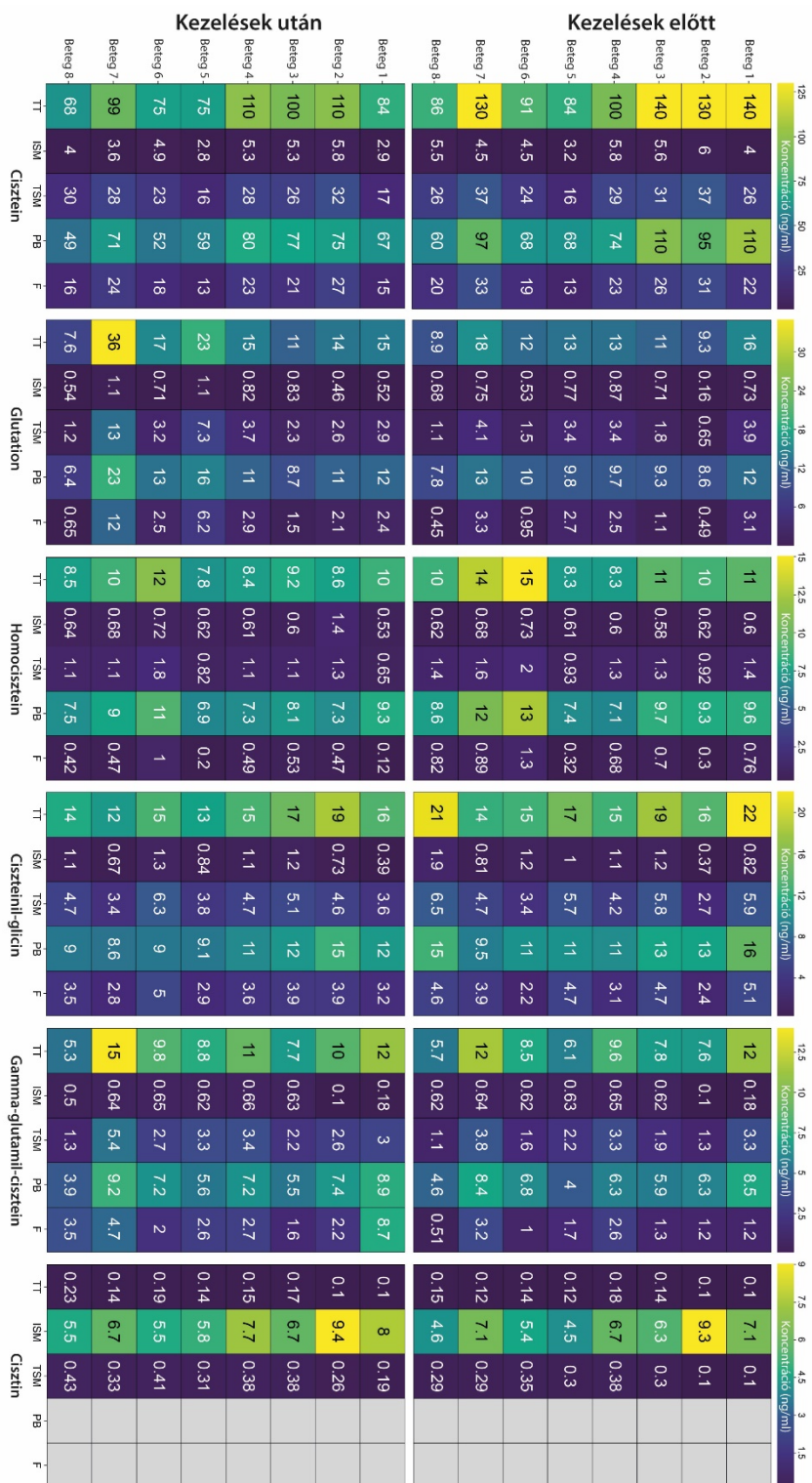
IV./4./d: Rheopheresis kezelés hatása a total thiol és diszulfid komponensek szérumszintjeire

A thiolos komponensek vizsgálata során komplex képet kaptunk a glutation poolban meghatározó szerepet betöltő prekursorok szérumszintjeinek változásáról a Rheopheresis kezelés függvényében. A vizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy a kezelés hatására szignifikánsan csökkentek a cisztein teljes ($p = 0,04$) és fehérjéhez kötött ($p = 0,03807$) formáinak szintjei. A vérplazmában mérhető szabad homocisztein tartalom is csökkenést mutatott. Ezzel szemben a glutation közvetlen prekurozának, a szabad formájú gamma-glutamil-cisztein szérumszintjeinek esetében szignifikáns mértékű növekedés ($p = 0,044$) volt

kimutatható minden páciens esetében a Rheopheresis kezelés hatására. A cisztin és ciszteinil-glicin vérplazma szintjeinek változásaiban egy beteget kivéve, egymáshoz viszonyított fordított arányosság fedezhető fel. A vérplazmában mérhető redukált glutation (gamma-glutamil-cysteinil-glicin) esetében egyértelmű tendencia 8 beteg vizsgálata alapján nem realizálható. (25., 26. ábra.)



25. ábra: A total cisztein (25./a), a fehérjéhez kötött cisztein (25./b) és a szabad gamma-glutamil cisztein (25./c) változásának statisztikai elemzése. A kísérletet három párhuzamosban végeztük. * szignifikáns ($p < 0,05$) különbséget jelez a kezelés előtti és a kezelés utáni vérplazma között (Welch-t-teszt; Kruskal–Wallis és Wilcoxon rangösszegű nem-parametrikus tesztek).



26. ábra: A glutation pool változása a Rheopheresis kezelések hatására (TT: total thiol (total tiol), ISM: individual small molecules (egyedi kis molekula), TSM: total small molecules (total kis molekula), PB: protein-bound F: free form (szabad forma))

V. Megbeszélés 1. - Klinikai eredmények megbeszélése

A cukorbetegség folyamatosan növekvő prevalenciája, a diabeteses láb szindrómájának széles tünettana és súlyos, életminőséget jelentősen rontó szövődményei miatt elengedhetetlen, hogy a kórképet a klinikum interdiszciplináris szemlélettel kezelje.(92) A kórkép komplexitása és a terápiás lehetőségek limitáltsága miatt a kezelés meglehetősen komplikált.(93) A kutatásaink során tapasztalt fekélyek gyógyhajlamának javulása és a regenerálódó idegi funkciók igazolják, hogy a Rheopheresis kezelésnek helye van a diabeteses láb szindrómájának terápiájában. Mind a fekélyek gyógyulásában, mind a neuropathiában károsodott idegi funkciók esetében elengedhetetlen a szöveti microcirculatio helyreállítása.(39, 94) Különösen igaz ez polyneuropathia esetén, tekintve, hogy az idegbántalom kezelésében a vasa nervorum keringése kritikus az idegek sejtszintű táplálásában, illetve alsó végtagi ulcusok esetén, ha intervenciós radiológiai revascularisatióra, illetve érsebészeti rekonstrukcióval a keringés javítására nincs lehetőség. Figyelembe véve, hogy a diabetes indukálta vascularis inflammáció sok esetben a haemorheológiai státuszt kórosan módosító fehérjék felszaporodásával is együtt jár, így a Rheopheresis kezelés során alkalmazott oszlop filtrációs technika sikerrel alkalmazható a teljes vér és plazma viszkozitás helyreállításában.(20, 95, 96) Ahogyan azt eredményeink is mutatják vérvizkozitási paraméterek csökkenésével és a microcirculatio javulásával nő a szöveti oxigén és tápanyag ellátottság, melyeknek köszönhetően az addig korábban gyógyhajlamot nem mutató alsó végtagi fekélyek szanálódnak, továbbá az idegi funkciók javulnak, a szubjektív fájdalomérzet csökken. Eredményeink azonban szintén rávilágítanak arra, hogy macrovascularis keringés hiányában a microvasculatura helyreállítása az alsó végtagi fekélyek gyógyítására önmagában nem elegendő, melyet 3 macrovascularis helyreállításra alkalmatlan, hyperviscositasban szenvedő, perifériás artériás érbeteg kezelési eredményei bizonyítanak. A klinikai eredmények megbeszélése során fontos kitérni a diabeteses láb szempontjából atípusosan elhelyezkedő fekélyekre is. Az atípusos elhelyezkedések ellenére, a lábszár fekélyek hátterében a diabetest feltételeztük elsődleges etiológiai faktorként abban az esetben, ha az ultrahang vizsgálat során VSM reflux, varicosus felszínes vénák és elégtelenül működő perforátor vénák nem voltak detektálhatóak. Ezzel együtt teljes bizonyossággal a postcapillaris venulák és detektálási küszöb alatti átmérőjű felszínes vénák szintjén már megjelenő dilatáció az ultrahang vizsgálatnál nem kizárható, így a kezdődő felszínes varicositast, mint etiológiai faktort kizárni nem lehet. Hipotézisünk szerint, ha az etiológiai faktorok keverednek is, a postcapillaris venulák szintjén megjelenő diabetes indukálta endothelialis inflammáció és

hyperviscositás a microcirculatio további károsodását és a sebgyógyulási zavar súlyosbodását indukálja, így a diabetes ezekben az esetekben is kulcsfontosságú etiológiai faktorként kezelendő. (79) Definitív felszínes vénás elégtelenség hiányában, a páciensek kompressziós terápiában nem részesültek. A fekélyek konzervatív kezelése során intelligens kötszereket alkalmaztunk, melyek nagy felületű felszívóképességgel rendelkeznek, illetve fizikai, vagy kémiai reakció útján a sebváladékkal érintkezve biztosítják az ideális sebkörnyezetet (Autrauman Ag - ezüsttartalmú kötszer, Sorbalgon - kalcium-alginát tartalmú kötszer, Zetuvit-E – nedvszívó sebpárna).

A betegek utógondozását és rendszeres kontrollját a 2019-ben kitört COVID világjárvány nagymértékben nehezítette. Általánosságban elmondható, hogy két egymást követő napon alkalmazott kezelés elegendő a vérviszkozitás optimalizálásához, amely a beteg complianctól függően 3-6 hónapig tartósan fennáll. A kezelés hatékonyságának növelése érdekében elengedhetetlen a megfelelő antidiabetikus terápia és a diétás megkötések szigorú betartása. A kezelés 3-6 havonta történő ismétlésének kontraindikációja nincs.

V. Megbeszélés 2. – *In vitro* eredmények megbeszélése

A klinikai eredményeink messze túlmutattak azon a tényen, hogy a Rheopheresis képes a microcirculatio javítására a haemorheológiai paraméterek normalizálásával, amennyiben a diabeteses láb szindrómája hyperviscositással társul. Ezen megállapítás megfelelő alapot biztosított a további kutatások lefolytatásához. Habár az *in vitro* endothel modell közvetlenül nem kapcsolódik a Rheopheresis kezeléshez, az intravascularis hyperglycaemia és az így létrejött endothelialis károsodás vizsgálatának fontos szerepe van a hatástanulmányozásban. Betegeink HgbA1C értékei alapján az érpályán belül jellemzően hyperglycaemia áll fenn, mely folyamatos oxidatív stresszt jelent az endothel sejtek számára. Tekintve azonban, hogy a Rheopheresis kezelés függvényében a beteg endothel sejtjeit közvetlenül vizsgálni nem tudjuk, így elengedhetetlen volt olyan vérmintákban kvantitatívan mérhető biokémiai paraméterek meghatározása, amellyel a Rheopheresis kezelés hatása objektíven monitorozható. Az endothel sejtek *in vitro* modellezésével és az érpályán belül megjelenő extrém magas glükózkoncentráció szimulációjával egyetlen modellen, komplexen igazoltuk a hyperglycaemia indukálta endothelialis inflammációt és a következményes antioxidáns rendszer károsodást, mindemellett meghatározásra kerültek mindazon biokémiai markerek, amelyek segítségével a Rheopheresis kezelés működési mechanizmusa részletesen feltárható. Fontos megjegyezni, hogy ugyan a kísérletek során végezhattünk volna fehérjekoncentráció meghatározást a felülúszó

vizsgálatával, azonban ez csak egy rövidtávú információt adott volna a vezikuláris transzporttal extracelluláris térbe juttatott citokinek mennyiségéről. A hosszútávú, elemi változások vizsgálata indokoltá tette a génexpressziós kísérleteket, amelyek alapján elmondható az extrém magas glükózoldattal való kezelés hatására szignifikánsan fokozódik a reaktív szabadgyökök termelése, igen jelentős az inflammatorikus citokinek, az endothelin-1 és az endothelin konvertáz enzim expresszió fokozódása, míg a NO szintáz expressziója csökken. Az intracelluláris glutation koncentráció a kezeléssel párhuzamosan folyamatosan csökken a kontrollhoz viszonyítva, azonban a glükóz oldattal való kezelés megszűnésével a GSH koncentrációja újra növekedik, amely az endothel regenerációs képességét bizonyítja.(97) Eredményeink a nemzetközi irodalomban publikált eredményekkel megegyeznek. Számos kutatás foglalkozott már hyperglycaemiás állapot *in vitro* modellezésével.(98) A vizsgálatok során leírták az Il-8 és TNF- α expresszió fokozódását, továbbá egyértelmű kapcsolatot írtak le az Il-6 és az eNOS szignál károsodása között, mindemelett a megnövekedett superoxid termelést is validálták.(99, 100) Diabeteses retinakárosodást modellezve, endothel sejtek *in vitro* vizsgálatával igazolták a hyperglycaemia apoptózis fokozó hatását.(101) Aorta endothel sejteit vizsgálva kimutatták továbbá az Il-8 expresszió fokozódásán túl, a megnövekedett vWf és PAI-1 szekréciót hyperglycaemia szimulációjának hatására.(102, 103) Vena saphena magna-ból származó endothel sejtek *in vitro* vizsgálata során a megnövekedett Il-6, Il-8 koncentráció mellett kóros solubilis adhéziós molekulák kifejeződését is igazolták.(104)

V. Megbeszélés 3. – Gyulladásos citokinek vérplazma koncentráció változásainak megbeszélése

A gyulladásos citokinek szerepe az endothelialis diszfunkció folyamatában, továbbá a diabeteses láb szindrómának progressziójában részletesen feltárt a nemzetközi irodalomban. Kutatócsoportunk korábban már vizsgálta a Rheopheresis kezelés hatását a gyulladásos folyamatokra időskori száraz macula degenerációban, amely során a CD14+/CD16+ sejtpopuláció normalizálódását sikerült bizonyítani.(20) *In vitro* vizsgálatainkkal továbbá igazoltuk, hogy a cukorbetegekben a gyulladást mediáló citokinek expressziója jelentősen fokozódik.(97) A Rheopheresis kezeléseket elvégezve kijelenthető, hogy a vérplazma filtrációjával a vizsgált gyulladásos citokinek koncentrációja (Il-6, Il-8, TNF- α) jelentősen csökken a páciensek vérplazmájában.(95) Ezen citokinek molekulásúlya 5-20 kDa-os mérettartományban mozog, míg a Rheopheresis a 250-300 kDa molekulású plazmaalkotókat képes megszűrni, így a citokinek filtrációja közvetlenül nem lenne lehetséges.(105) Lehetséges

magyarázat ezen fehérjék koncentráció-csökkenésének, hogy az inflammatorikus citokinek intravascularis transzportációja carrier molekulákkal történik, pl. a vérviszkozitást is jelentősen fokozó alpha-2-macroglobulinhoz való kötődéssel. Az alpha-2-macroglobulin molekulásúly 720 kDa, amely a MONET filter pórusain áthaladni nem képes, így ennek eltávolításával az inflammációt mediáló citokinek is kikerülnek a páciens keringési rendszeréből.(106, 107)

V. Megbeszélés 4. – Vasoaktív ágensek vérplazma koncentráció változásainak és az antioxidáns változások eredményeinek megbeszélése

Tekintve, hogy a diabetes mellitus jelentős prothromboticus hatással bír, így a vizsgálatainkat kiterjesztettük egy a prothrombotikus állapotot egyaránt jelző markerre is.(108) Az endothelin-1 vérplazma koncentrációit megvizsgálva minden beteg esetén kismértékű csökkenést tapasztaltunk. Az endothelin-1 oxidatív stressz általi overexpressziója jól ismert a diabetes kapcsán.(65) Tekintve, hogy az endothel sejtek által termelt endothelin-1 kórosan magas szintje a potens vasoconstrictiós hatások mellett az oxidatív stressz mértékét circulus vitiosusként potenciózza, így Rheopheresis kezelés jótékony hatással bír a vérplazma endothelin-1 koncentrációjára. A tromboxán B2 vérplazma koncentrációban mért csökkenés szintén a Rheopheresis hasznos hatásait indikálja. A thrombociták által termelt aktív tromboxán A2 prothromboticus és vasoconstrictor hatásokkal bír, féléletideje meglehetősen rövid (30 min), így mérése igen nehézkes. Azonban ennek degradációs terméke, a tromboxán B2 jóval stabilabb formula, mérése könnyebben kivitelezhető és átfogó képet ad a beteg tromboxán A2 ellátottságával kapcsolatban.(109) A kezelést követő állapotban a TXB2 vérplazma szintjének csökkenése az endothelialis státusz javulásáról ad információt.

A vizsgálat komplexitásának fontos eleme volt a kezelés hatására létrejövő antioxidáns státusz monitorizálása. Az antioxidáns státuszról lényegi információt adó egyik legfontosabb paraméter a superoxid dismutase enzimaktivitása. A SOD enzim képes a szervezetben keletkező superoxid szabadgyököket H_2O_2 -dá és molekuláris oxigénné alakítani. A H_2O_2 , mely szintén igen erős oxidatív hatással bír, katalázzal, illetve glutation peroxidázzal történő reakciót követően eliminálódik a szervezetből.(110) Azonban a SOD aktivitás változása nem adott egyértelmű, szignifikáns eredményeket, amelyeket tovább limitál a kis betegpopuláció. Méréseink eredményeinek részletezését azonban fontosnak találtam, tekintve, hogy az eredmények tendenciája indokoltta tette, a mélyebb irodalmi áttekintést. Az eredményekből az

feltételezhető, hogy a páciensekben a kezelés hatására a reaktív oxigén gyökök mennyiségével párhuzamosan a SOD aktivitása is csökken.

Az antioxidáns ellátottsággal kapcsolatban részletesebb információt szolgáltatnak a Rheopheresis glutation háztartásra gyakorolt hatásai. A redukált glutation azonban az extracellulárisan csak igen kis mennyiségben található meg, antioxidáns funkcióját pedig csak intracellulárisan tudja ellátni. Vizsgálatainkban így azon glutation prekuzurokat és degradációs termékeit vizsgáltuk, amelyek fontos alkotói a glutation ciklusnak és vérplazma koncentrációjukból következtetni tudunk a komplett glutation poolra. A cisztein egy nem esszenciális aminosav, a glutation egyik fontos alkotója. Szabad tiol csoportjának köszönhetően kulcsfontosságú szerepet tölt be a fehérjék szerkezeti és funkciós elemeként. Szabad formájában, az extracelluláris térben igen reakcióképes, ezáltal önmagában is szabadgyök képző, extrém instabil szabad cisztein forma, mely potenciálisan toxikus, minden páciens esetén határozott csökkenést mutatott. Tekintve, hogy a fehérje-kötött cisztein önmagában is fontos indikátora az antioxidáns státusznak, a csökkent extracelluláris protein kötött és teljes cisztein szint az extracelluláris térben az antioxidáns státusz pozitív irányú változását jelzi.(91) A redukált glutation extracelulláris formáját mérve nem tapasztaltunk konzekvens változást, habár nem ad érdemi információt a szervezet antioxidáns ellátottságával kapcsolatban.(62) A cisztein analóg homocisztein, mely methioninból képződik, transzszulfurációs útvonalon képes ciszteinné alakulni, vagy remetilálódva visszaalakulni metioninná. A homocisztein az atherosclerosis független kofaktoraként ismert, a hyperhomocysteinaemia jól ismert endothel károsító, az így létrejövő krónikus gyulladás egyértelmű atherogenesiszt provokáló hatással bír.(111, 112) A Rheopheresis kezelés hatására, minden beteg esetén a plazmában mérhető totál homocisztein szint, mely kóros állapotok kialakulásában a legnagyobb jelentőségű, a kezelések hatására lecsökkent. A csökkent homocisztein szint egyértelműen a gyulladás mérséklődését, a glutation pool pozitív irányú változását indikálja. A redukált glutation bomlása során keletkező ciszteinili-glicin, illetve a cisztein oxidált dimer formájaként megjelenő cisztin vérplazma szintjei között érdekes összefüggést tapasztaltunk. Eredményeink azt mutatták, hogy a Rheopheresis kezelés hatására a szabad cisztein és a különböző formájú ciszteinili-glicin vérplazma szintjei egymással fordított arányosságban változnak. Tekintve, hogy ezen formák rendkívül értékes cisztein donorként funkcionálnak a gamma glutamil ciklus során, azonban jóval stabilabb formák, mint a szabad cisztein, és plazmaszintjük változása nem befolyásolta kórosan a szabad cisztein formák mennyiségét, így változásukat pozitív irányúnak tekinthetjük.(113, 114) A redukált glutation közvetlen intracelluláris prekuzora a gamma-

glutamil-cisztein, mely a glutation peroxidáz közvetlen prekurzoraként is funkcionál. Habár a legújabb irodalmi adatok már kételkednek abban, hogy a gamma-glutamil-cisztein képes lenne közvetlenül a sejtbe transzportálódni, in vivo kísérletek alapján az orálisan adagolt gamma-glutamil-cisztein jelentősen növelte az intracellulárisan mérhető redukált glutation mennyiségét. (115-117) A Rheopheresis kezelések hatására a minden beteg esetén a gamma-glutamil-cisztein szabad formája szignifikáns növekedést mutatott a vérplazmában, így az antioxidáns státusz egyértelmű pozitív irányú változásának indikátoraként tekinthető.

VI. Összefoglalás

Jelen kutatásunk célja volt, hogy egy új, szelektív terápiás aferezis technikának, a Rheopheresisnek hatásait tanulmányozzuk egy nehezen kezelhető, egészséget súlyosan károsító, magas prevalenciájú megbetegedésben, a hyperviscositással szövődő diabeteses láb szindrómában. A kezelés egy kettős kaszkád membránfiltrációs eljárás, mely a vérviszkozitást fokozó paraméterek szűrésével (úgy mint LDL, Lp(a), triglicerid, koleszterin, fibrinogén, α_2 macroglobulin, vWF, IgM) képes javítani a microcirculatiót, normalizálni a haemorheológiai státuszt, így a kezelés egyéb kórképekben már sikeresen alkalmazásra került.

Kutatásaink során jelentős klinikai sikereket értünk el a diabetes talaján kialakult alsó végtagi, gyógyhajlamot nem mutató, microvascularis károsodásból fakadó fekélyek, és a terápiaerezisztens, progrediáló sensomotoros polyneuropathia terápiájában. A kezelések hatására a fekélyek szanálódtak, a neuropathiás panaszok mérséklődtek, a fájdalomcsillapító igények csökkentek, az idegi funkciók javultak. Klinikai eredményeink azonban túlmutattak a Rheopheresis már ismert hatásain, amely szükségessé tette a Rheopheresis kezelés hatásainak széleskörűbb feltérképezését.

A kutatás érdekében *in vitro* HUVEC sejtmoddelt hoztunk létre, amelyen az intravascularis hyperglycaemiát szimulálva vizsgáltuk az endothel sejtekben végbemenő inflammációs folyamatokat és az antioxidáns státusz változását. A kísérlet során egyetlen modellen, összefüggéseiben írtuk le a diabetes indukálta endothelialis inflammációt, az extrém hyperglycaemia hatására végbemenő prooxidáns folyamatokat és kóros vascularis mediátorok felszabadulását. *In vitro* vizsgálataink segítségével olyan biokémiai paraméterek és markerek kerültek meghatározásra, melyekkel a Rheopheresis kezelés hatásait monitorozni tudtuk.

A Rheopheresis kezelés hatásvizsgálata során a már ismert, viscositást normalizáló hatásokon túl, a gyulladásos citokinek (Il-6, Il-8, TNF- α) jelentős csökkenését tapasztaltuk, ezáltal bizonyítottuk a Rheopheresis antiinflammatorikus hatását, igazoltuk a kezelés jótékony hatásait a kórosan felszabaduló vascularis mediátorokra (ET-1 TXB-2) és komplett cisztein pool analízisünkkel validáltuk a kezelés antioxidáns hatásait. A káros proteinek filtrációjával az extracelluláris térben található teljes és szabad cisztein, illetve total homocisztein szint csökkent, míg a gamma-glutamil-cisztein koncentráció emelkedett. Mindezen változások az antioxidáns státusz javulását indikálják.

VI. Summary

The aim of our present research was to study the effects of a new, selective therapeutic apheresis technique, Rheopheresis, in a difficult-to-treat, high-prevalence disease that seriously harms health, the diabetic foot syndrome complicated by hyperviscosity. The treatment is a double cascade membrane filtration procedure, which by filtering parameters that increase blood viscosity (such as LDL, Lp(a), triglyceride, cholesterol, fibrinogen, α 2 macroglobulin, vWF, IgM) can improve microcirculation, normalize hemorheological status, so the treatment it has already been successfully used in diseases.

In the course of our research, we have achieved significant clinical success in the treatment of lower extremity ulcers that do not show a tendency to heal, resulting from microvascular damage, and therapy-resistant, progressive sensorimotor polyneuropathy. As a result of the treatments, the ulcers healed, the neuropathic complaints decreased, the need for painkillers decreased, and the nerve functions improved. However, our clinical results went beyond the already known effects of Rheopheresis, which necessitated a more extensive mapping of the effects of Rheopheresis treatment.

For the purpose of the research, we created an in vitro HUVEC cell model, on which we investigated the inflammatory processes taking place in the endothelial cells and the changes in the antioxidant status by simulating intravascular hyperglycemia. During the experiment, we described diabetes-induced endothelial inflammation, pro-oxidant processes and the release of abnormal vascular mediators as a result of extreme hyperglycemia on a single model. With the help of our in vitro tests, biochemical parameters and markers were determined with which we could monitor the effects of the Rheopheresis treatment.

During the evaluation of the effect of the Rheopheresis treatment, in addition to the already known viscosity-normalizing effects, we experienced a significant decrease in inflammatory cytokines (Il-6, Il-8, TNF- α), thereby proving the anti-inflammatory effect of the Rheopheresis, and confirming the beneficial effects of the treatment on the abnormally released vascular mediators (ET-1 TXB-2) and we validated the antioxidant effects of the treatment with our complete cysteine pool analysis. With the filtration of harmful proteins, the total and free cysteine and total homocysteine levels in the extracellular space decreased, while the gamma-glutamyl-cysteine concentration increased. All these changes indicate an improvement in the antioxidant status.

VII. Az értekezés új eredményei, megállapításai, klinikai jelentőségei

- A Rheopheresis kezelés hatékonyan képes csökkenteni hyperviscositás esetén a teljes vér és plazma viszkozitást.
- A kezelés jótékony hatással bír az érsebészeti rekonstrukcióval és intervenciós radiológiai beavatkozásokkal nem kezelhető, microvascularis károsodásból fakadó alsó végtagi ulcusok terápiájában.
- A Rheopheresis hatására polyneuropathia esetén a terápiarezisztens neuropathiás fájdalom csökken, az idegi funkciók javulnak, az életminőség nő.
- A Rheopheresis antiinflammatorikus hatással bír a gyulladásos citokinek filtrációján keresztül, szignifikánsan képes csökkenteni a vérben található Il-6, Il-8, és TNF- α vérplazmakoncentrációját.
- A diabetes mellitusban szenvedő páciensek vérplazmájában csökkenteni képes a kóros vascularis mediátorok koncentrációját, javítani a vasomotor funkciót és csökkenti a prothromboticus aktivitást.
- A Rheopheresis antioxidáns hatással bír. A kezelés hatására a vérplazmában található glutation ciklusban fontos szereppel bíró extracelluláris prekursorok és intermedierek koncentráció változásai bizonyítják, hogy a kezelés hatására az antioxidáns státusz pozitívan változik, a glutation pool a redukált glutation szintézisének irányába tolódik.

VIII. A vizsgálat limitáló tényezők

- Habár a Rheophoresissal számottevő klinikai eredmények érhetőek el, a kezelés hatásfokának növeléséhez elengedhetetlen a megfelelő beteg compliance. Ez magába foglalja az előírt gyógyszeres terápia, és diétás megkötések szigorú betartását, fekélyes betegek esetén az ortézis megfelelő viselését, a rendszeres sebtoilettet, mindezek mellett az esetleges káros szenvedélyek azonnali elhagyását és a társbetegségek megfelelő kontrollálását. Tekintve, hogy a diabetes mellitus nem gyógyítható betegség, így kulcsfontosságú ezen szabályok betartása, amely a vizsgálat során nem minden beteg esetén teljesült.
- Eredményeinket limitálja a kis betegpopuláció. Ennek hátterében egyik okként a 2020-ban kirobbant COVID járvány áll. A veszélyhelyzettel együtt bevezetett kizárólagos sürgősségi szakellátás jelentősen megnehezítette a betegszám növelését.
- Jelen dolgozatban kevés szó esik a kezelés hatásainak tartósságáról, a betegek hosszútávú utánkövetése további, részletes vizsgálatot és statisztikai analízist igényel.

IX. Irodalomjegyzék

1. Kim KH, Oh KY. Clinical applications of therapeutic phlebotomy. *Journal of blood medicine*. 2016;7:139-44.
2. Moriarty PM. CHAPTER 30 - Low-Density Lipoprotein Apheresis. In: Ballantyne CM, editor. *Clinical Lipidology*. Philadelphia: W.B. Saunders; 2009. p. 363-75.
3. Parapia LA. History of bloodletting by phlebotomy. *British journal of haematology*. 2008;143(4):490-5.
4. Srikanth KK, Lotfollahzadeh S. Phlebotomy. *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.; 2022.
5. Kambic HE, Nosé Y. Historical perspective on plasmapheresis. *Therapeutic apheresis : official journal of the International Society for Apheresis and the Japanese Society for Apheresis*. 1997;1(1):83-108.
6. Butrous G, Maron B, Yacoub M. The lamp of medicine of Ancient Egypt is still burning. *Global cardiology science & practice*. 2020;2020(1):e202016.
7. Mollison PL. The introduction of citrate as an anticoagulant for transfusion and of glucose as a red cell preservative. *British journal of haematology*. 2000;108(1):13-8.
8. Abel JJ, Rowntree LG, Turner BB. Plasma removal with return of corpuscles (Plasmapheresis). First paper. 1914;5(6):625-41.
9. Grifols-Lucas JA. Use of plasmapheresis in blood donors. *British medical journal*. 1952;1(4763):854.
10. Shaik M, Asif S. "Therapeutic Apheresis" Plasmapheresis- A Review. *Journal of Oral Research and Review*. 2010;vol 2:48-54.
11. Schwab PJ, Fahey JL. Treatment of Waldenstrom's macroglobulinemia by plasmapheresis. *The New England journal of medicine*. 1960;263:574-9.
12. McLeod BC. Therapeutic apheresis: history, clinical application, and lingering uncertainties. *Transfusion*. 2010;50(7):1413-26.
13. Klingel R, Fassbender C, Fassbender T, Erdtracht B, Berrouschot J. Rheopheresis: rheologic, functional, and structural aspects. *Therapeutic apheresis : official journal of the International Society for Apheresis and the Japanese Society for Apheresis*. 2000;4(5):348-57.
14. Gjørstrup P, Watt RM. Therapeutic protein A immunoadsorption. A review. *Transfusion Science*. 1990;11(3):281-302.

15. Seidel D. H.E.L.P. apheresis therapy in the treatment of severe hypercholesterolemia: 10 years of clinical experience. *Artificial organs*. 1996;20(4):303-10.
16. Parker TS. Dextran-sulfate cellulose adsorption for lowering Lp[a]. *Chemistry and Physics of Lipids*. 1994;67-68:331-8.
17. Dräger LJ, Julius U, Kraenzle K, Schaper J, Toepfer M, Zygan K, et al. DALI-the first human whole-blood low-density lipoprotein and lipoprotein (a) apheresis system in clinical use: procedure and clinical results. *European journal of clinical investigation*. 1998;28(12):994-1002.
18. Agishi T, Kaneko I, Hasuo Y, Hayasaka Y, Sanaka T, Ota K, et al. Double filtration plasmapheresis. *Transactions - American Society for Artificial Internal Organs*. 1980;26:406-11.
19. Schwartz J, Padmanabhan A, Aqui N, Balogun RA, Connelly-Smith L, Delaney M, et al. Guidelines on the Use of Therapeutic Apheresis in Clinical Practice-Evidence-Based Approach from the Writing Committee of the American Society for Apheresis: The Seventh Special Issue. *Journal of clinical apheresis*. 2016;31(3):149-62.
20. Melinda V, Agnes D, Norbert N, Viktoria S, Sandor B, Eszter S, et al. Rheopheresis in vascular diseases. *Clinical hemorheology and microcirculation*. 2016;64(4):977-87.
21. Ferrannini M, Vischini G, Staffolani E, Scaccia F, Miani N, Parravano MC, et al. Rheopheresis in vascular diseases. *The International journal of artificial organs*. 2007;30(10):923-9.
22. Kosmadakis G. Rheopheresis: A narrative review. *The International journal of artificial organs*. 2022;45(5):445-54.
23. Padmanabhan A, Connelly-Smith L, Aqui N, Balogun RA, Klingel R, Meyer E, et al. Guidelines on the Use of Therapeutic Apheresis in Clinical Practice - Evidence-Based Approach from the Writing Committee of the American Society for Apheresis: The Eighth Special Issue. *Journal of clinical apheresis*. 2019;34(3):171-354.
24. Rimmelé T, Kellum JA. Clinical review: blood purification for sepsis. *Critical care (London, England)*. 2011;15(1):205.
25. Waitz G, Atiye S, Gauly A. Comparison of plasma separation using centrifugation or filtration for MONET lipoprotein apheresis in patients with cardiovascular disease and severe dyslipidemia. 2022;26(6):1281-8.
26. Schmidt JJ, Asper F, Einecke G, Eden G, Hafer C, Kielstein JT. Therapeutic plasma exchange in a tertiary care center: 185 patients undergoing 912 treatments - a one-year retrospective analysis. *BMC Nephrology*. 2018;19(1):12.

27. Bambauer R, Bambauer C, Lehmann B, Latza R, Schiel R. LDL-Apheresis: Technical and Clinical Aspects. *The Scientific World Journal*. 2012;2012:314283.
28. Lee G, Arepally GM. Anticoagulation techniques in apheresis: from heparin to citrate and beyond. *Journal of clinical apheresis*. 2012;27(3):117-25.
29. Durst R, Rund D, Schurr D, Eliav O, Ben-Yehuda D, Shpizen S, et al. One year experience with a low density lipoprotein apheresis system. *The Israel Medical Association journal : IMAJ*. 2002;4(9):677-80.
30. Kayikcioglu M. LDL Apheresis and Lp (a) Apheresis: A Clinician's Perspective. *Current atherosclerosis reports*. 2021;23(4):15.
31. Soltész P, Németh N, Gál K, Vass M, Diószegi Á, †Mechler F, et al. A rheopheresiskezeléssel szerzett első hazai tapasztalatok. *Orvosi Hetilap OH*. 2021;162(10):375.
32. Hernández-Zimbrón LF, Zamora-Alvarado R, Ochoa-De la Paz L. Age-Related Macular Degeneration: New Paradigms for Treatment and Management of AMD. 2018;2018:8374647.
33. Nowak JZ. Age-related macular degeneration (AMD): pathogenesis and therapy. *Pharmacological reports : PR*. 2006;58(3):353-63.
34. Bowes Rickman C, Farsiu S, Toth CA, Klingeborn M. Dry age-related macular degeneration: mechanisms, therapeutic targets, and imaging. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2013;54(14):Orsf68-80.
35. Koss MJ, Kurz P, Tsobanelis T, Lehmacher W, Fassbender C, Klingel R, et al. Prospective, randomized, controlled clinical study evaluating the efficacy of Rheopheresis for dry age-related macular degeneration. Dry AMD treatment with Rheopheresis Trial-ART. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie*. 2009;247(10):1297-306.
36. Klingel R, Fassbender C, Fischer I, Hattenbach L, Gumbel H, Pulido J, et al. Rheopheresis for age-related macular degeneration: a novel indication for therapeutic apheresis in ophthalmology. *Therapeutic apheresis : official journal of the International Society for Apheresis and the Japanese Society for Apheresis*. 2002;6(4):271-81.
37. Lip PL, Blann AD, Hope-Ross M, Gibson JM, Lip GY. Age-related macular degeneration is associated with increased vascular endothelial growth factor, hemorheology and endothelial dysfunction. *Ophthalmology*. 2001;108(4):705-10.
38. Borberg H, Tauchert M. Rheohaemapheresis of ophthalmological diseases and diseases of the microcirculation. *Transfusion and apheresis science : official journal of the World*

Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis. 2006;34(1):41-9.

39. Chawla A, Chawla R, Jaggi S. Microvascular and macrovascular complications in diabetes mellitus: Distinct or continuum? Indian journal of endocrinology and metabolism. 2016;20(4):546-51.

40. Khalil H. Diabetes microvascular complications-A clinical update. Diabetes & metabolic syndrome. 2017;11 Suppl 1:S133-s9.

41. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. Circulation research. 2010;107(9):1058-70.

42. Johansen JS, Harris AK, Rychly DJ, Ergul A. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: Linking basic science to clinical practice. Cardiovascular Diabetology. 2005;4(1):5.

43. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. Diabetes. 2005;54(6):1615-25.

44. Sivitz WI, Yorek MA. Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities. Antioxidants & redox signaling. 2010;12(4):537-77.

45. Pacher P, Szabó C. Role of peroxynitrite in the pathogenesis of cardiovascular complications of diabetes. Current opinion in pharmacology. 2006;6(2):136-41.

46. Lee AY, Chung SS. Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 1999;13(1):23-30.

47. Yan LJ. Redox imbalance stress in diabetes mellitus: Role of the polyol pathway. Animal models and experimental medicine. 2018;1(1):7-13.

48. Schleicher ED, Weigert C. Role of the hexosamine biosynthetic pathway in diabetic nephropathy. Kidney international Supplement. 2000;77:S13-8.

49. Fantus IG, Goldberg HJ, Whiteside CI, Topic D. The Hexosamine Biosynthesis Pathway. In: Cortes P, Mogensen CE, editors. The Diabetic Kidney. Totowa, NJ: Humana Press; 2006. p. 117-33.

50. Gerald P, King GL. Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications. Circulation research. 2010;106(8):1319-31.

51. Rask-Madsen C, King GL. Proatherosclerotic mechanisms involving protein kinase C in diabetes and insulin resistance. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2005;25(3):487-96.

52. Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation*. 2006;114(6):597-605.
53. Singh VP, Bali A, Singh N, Jaggi AS. Advanced glycation end products and diabetic complications. *The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*. 2014;18(1):1-14.
54. Dinh T, Veves A. Microcirculation of the diabetic foot. *Current pharmaceutical design*. 2005;11(18):2301-9.
55. Pitsavos C, Tampourlou M, Panagiotakos DB, Skoumas Y, Chrysoshoou C, Nomikos T, et al. Association Between Low-Grade Systemic Inflammation and Type 2 Diabetes Mellitus Among Men and Women from the ATTICA Study. *The review of diabetic studies : RDS*. 2007;4(2):98-104.
56. Dinh T, Tecilazich F, Kafanas A, Doupis J, Gnardellis C, Leal E, et al. Mechanisms involved in the development and healing of diabetic foot ulceration. *Diabetes*. 2012;61(11):2937-47.
57. Qu D, Liu J, Lau CW, Huang Y. IL-6 in diabetes and cardiovascular complications. *British journal of pharmacology*. 2014;171(15):3595-603.
58. Purwata TE. High TNF-alpha plasma levels and macrophages iNOS and TNF-alpha expression as risk factors for painful diabetic neuropathy. *Journal of pain research*. 2011;4:169-75.
59. Xu F, Zhang C, Graves DT. Abnormal cell responses and role of TNF- α in impaired diabetic wound healing. *BioMed research international*. 2013;2013:754802.
60. Mu ZP, Wang YG, Li CQ, Lv WS, Wang B, Jing ZH, et al. Association Between Tumor Necrosis Factor- α and Diabetic Peripheral Neuropathy in Patients with Type 2 Diabetes: a Meta-Analysis. *Molecular neurobiology*. 2017;54(2):983-96.
61. Cimini FA, Barchetta I, Porzia A, Mainiero F, Costantino C, Bertoccini L, et al. Circulating IL-8 levels are increased in patients with type 2 diabetes and associated with worse inflammatory and cardiometabolic profile. *Acta diabetologica*. 2017;54(10):961-7.
62. Lu SC. Glutathione synthesis. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1830(5):3143-53.
63. Wu G, Fang Y-Z, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione Metabolism and Its Implications for Health. *The Journal of Nutrition*. 2004;134(3):489-92.
64. Assmann TS, Brondani LA, Bouças AP, Rheinheimer J, de Souza BM, Canani LH, et al. Nitric oxide levels in patients with diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *Nitric oxide : biology and chemistry*. 2016;61:1-9.

65. Kalani M. The importance of endothelin-1 for microvascular dysfunction in diabetes. *Vascular health and risk management*. 2008;4(5):1061-8.
66. Le Devehat C, Khodabandehlou T, Vimeux M. Impaired hemorheological properties in diabetic patients with lower limb arterial ischaemia. *Clinical hemorheology and microcirculation*. 2001;25(2):43-8.
67. Cho YI, Mooney MP, Cho DJ. Hemorheological disorders in diabetes mellitus. *Journal of diabetes science and technology*. 2008;2(6):1130-8.
68. Arita T, Maruyama T, Yokoyama T, Hieda M, Fukata M, Fujino T, et al. Impaired deformability and association with density distribution of erythrocytes in patients with type 2 diabetes mellitus under treatment. *Clinical hemorheology and microcirculation*. 2020;76(1):73-83.
69. Wang X, Zhao H, Zhuang FY, Stoltz JF. Measurement of erythrocyte deformability by two laser diffraction methods. *Clinical hemorheology and microcirculation*. 1999;21(3-4):291-5.
70. Beggs J, Johnson PC, Olafsen A, Watkins CJ. Innervation of the vasa nervorum: changes in human diabetics. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 1992;51(6):612-29.
71. Van Dam PS, Cotter MA, Bravenboer B, Cameron NE. Pathogenesis of diabetic neuropathy: focus on neurovascular mechanisms. *European journal of pharmacology*. 2013;719(1-3):180-6.
72. Uccioli L, Mancini L, Giordano A, Solini A, Magnani P, Manto A, et al. Lower limb arterio-venous shunts, autonomic neuropathy and diabetic foot. *Diabetes research and clinical practice*. 1992;16(2):123-30.
73. Feldman EL, Callaghan BC, Pop-Busui R, Zochodne DW, Wright DE, Bennett DL, et al. Diabetic neuropathy. *Nature reviews Disease primers*. 2019;5(1):41.
74. Callaghan BC, Cheng HT, Stables CL, Smith AL, Feldman EL. Diabetic neuropathy: clinical manifestations and current treatments. *The Lancet Neurology*. 2012;11(6):521-34.
75. Salvotelli L, Stoico V, Perrone F, Cacciatori V, Negri C, Brangani C, et al. Prevalence of neuropathy in type 2 diabetic patients and its association with other diabetes complications: The Verona Diabetic Foot Screening Program. *Journal of diabetes and its complications*. 2015;29(8):1066-70.
76. Diószegi Á, Vass M, Flaskó A, Gál K, Mechler FA, Káplár M, et al. Analysis of the Correlation between Microvascular Involvement and Neuropathy in Association with Metabolic Disorders in Case of Diabetic Leg Syndrome. *Annals atherosclerotic res*. 2018;1(2):1-6.

77. Tabish SA. Is Diabetes Becoming the Biggest Epidemic of the Twenty-first Century? *International journal of health sciences*. 2007;1(2):V-viii.
78. Noor S, Khan RU, Ahmad J. Understanding Diabetic Foot Infection and its Management. *Diabetes & metabolic syndrome*. 2017;11(2):149-56.
79. Kempler Péter dr. PZd, Kiss Zoltán dr., Wittmann István dr., Abonyi-Tóth Zsolt RGd, Jermendy György dr. A 2-es típusú diabetes előfordulása és költségterheinek alakulása Magyarországon 2001–2014 között – az Országos Egészségbiztosítási Pénztár adatbázis-elemzésének eredményei. *Diabetologia Hungarica*. 2016;XXIV. évfolyam(3. szám):177-88.
80. Vokó Z, Nagyjánosi L, Kaló Z. A cukorbetegség közvetlen egészségügyi költségei Magyarországon. *Lege artis medicinae: új magyar orvosi hírmondó*. 2009;19:775-80.
81. Kaló Z, Jermendy G, Winkler G. The social burden of diabetes mellitus and the reasons for being a health priority [in Hungarian]. *Diabetologia Hungarica*. 2011;19:245-51.
82. Rac-Albu M, Iliuta L, Guberna SM, Sinescu C. The role of ankle-brachial index for predicting peripheral arterial disease. *Maedica*. 2014;9(3):295-302.
83. Aboyans V, Ricco JB, Bartelink MEL, Björck M, Brodmann M, Cohnert T, et al. Editor's Choice - 2017 ESC Guidelines on the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases, in collaboration with the European Society for Vascular Surgery (ESVS). *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery*. 2018;55(3):305-68.
84. Hwang JY. Doppler ultrasonography of the lower extremity arteries: anatomy and scanning guidelines. *Ultrasonography (Seoul, Korea)*. 2017;36(2):111-9.
85. Chalazonitis AN, Condilis N, Tzovara J, Ptohis N, Laspas F, Neofytou I, et al. Lower limb veins color and spectral Doppler ultrasonography examination. An examination protocol. *Annali italiani di chirurgia*. 2008;79(4):273-80.
86. Hardeman MR GP, Shin S. Methods in hemorheology. In: Baskurt OK HM, Rampling MW, Meiselman HJ, editor. *Handbook of Hemorheology and Hemodynamics*. Amsterdam: IOS Press; 2007. p. 242-66.
87. Nemeth N, Alexy T, Furka A, Baskurt OK, Meiselman HJ, Furka I, et al. Inter-species differences in hematocrit to blood viscosity ratio. *Biorheology*. 2009;46(2):155-65.
88. Reimann PM, Mason PD. Plasmapheresis: technique and complications. *Intensive care medicine*. 1990;16(1):3-10.
89. Chen S, Andary M, Buschbacher R, Del Toro D, Smith B, So Y, et al. Electrodiagnostic reference values for upper and lower limb nerve conduction studies in adult populations. *Muscle & nerve*. 2016;54(3):371-7.

90. Biró A, Markovics A, Fazekas M, Fidler G, Szalóki G, Paholcsek M, et al. Allithiamine Alleviates Hyperglycaemia-Induced Endothelial Dysfunction. *Nutrients*. 2020;12(6).
91. Fu X, Cate SA, Dominguez M, Osborn W, Özpólat T. Cysteine Disulfides (Cys-ss-X) as Sensitive Plasma Biomarkers of Oxidative Stress. 2019;9(1):115.
92. Klonoff DC. The increasing incidence of diabetes in the 21st century. *Journal of diabetes science and technology*. 2009;3(1):1-2.
93. Wang A, Lv G, Cheng X, Ma X, Wang W, Gui J, et al. Guidelines on multidisciplinary approaches for the prevention and management of diabetic foot disease (2020 edition). *Burns & Trauma*. 2020;8.
94. Chao CY, Cheing GL. Microvascular dysfunction in diabetic foot disease and ulceration. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2009;25(7):604-14.
95. Gal K, Veres K, Halmi S, Bozoki-Beke K, Fekete K, Homoki J, et al. The effect of rheopheresis treatment on the cytokine profile in diabetic foot syndrome with hyperviscosity in the aspect of clinical changes: A preliminary study. *Clinical hemorheology and microcirculation*. 2022;80(2):117-25.
96. Klingel R, Mumme C, Fassbender T, Himmelsbach F, Altes U, Lotz J, et al. Rheopheresis in patients with ischemic diabetic foot syndrome: results of an open label prospective pilot trial. *Therapeutic apheresis and dialysis : official peer-reviewed journal of the International Society for Apheresis, the Japanese Society for Apheresis, the Japanese Society for Dialysis Therapy*. 2003;7(4):444-55.
97. Gál K, Asbóth G, Vass M, Biró A, Markovich A, Homoki J, et al. Monitoring and recovery of hyperglycaemia-induced endothelial dysfunction with rheopheresis in diabetic lower extremity ulceration with hyperviscosity. *Diabetes and Vascular Disease Research*. 2022;19(6):14791641221131788.
98. Vorotnikov AV, Khapchaev AY. In Vitro Modeling of Diabetes Impact on Vascular Endothelium: Are Essentials Engaged to Tune Metabolism? 2022;10(12).
99. Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Matheis E, Hartmann M, et al. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circulation research*. 2001;88(2):E14-22.
100. Yuen DY, Dwyer RM, Matthews VB, Zhang L, Drew BG, Neill B, et al. Interleukin-6 attenuates insulin-mediated increases in endothelial cell signaling but augments skeletal muscle insulin action via differential effects on tumor necrosis factor-alpha expression. *Diabetes*. 2009;58(5):1086-95.

101. Wang Q, Zhang X. An In Vitro Model of Diabetic Retinal Vascular Endothelial Dysfunction and Neuroretinal Degeneration. 2021;2021:9765119.
102. Srinivasan S, Bolick DT, Hatley ME, Natarajan R, Reilly KB, Yeh M, et al. Glucose regulates interleukin-8 production in aortic endothelial cells through activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in diabetes. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(30):31930-6.
103. Simionescu M. Implications of early structural-functional changes in the endothelium for vascular disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2007;27(2):266-74.
104. Münzel D, Lehle K, Haubner F, Schmid C, Birnbaum DE, Preuner JG. Impact of diabetic serum on endothelial cells: an in-vitro-analysis of endothelial dysfunction in diabetes mellitus type 2. *Biochemical and biophysical research communications*. 2007;362(2):238-44.
105. Stenken JA, Poschenrieder AJ. Bioanalytical chemistry of cytokines--a review. *Analytica chimica acta*. 2015;853:95-115.
106. LaMarre J, Wollenberg GK, Gonias SL, Hayes MA. Cytokine binding and clearance properties of proteinase-activated alpha 2-macroglobulins. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1991;65(1):3-14.
107. Matsuda T, Hirano T, Nagasawa S, Kishimoto T. Identification of alpha 2-macroglobulin as a carrier protein for IL-6. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1989;142(1):148-52.
108. Grant PJ. Diabetes mellitus as a prothrombotic condition. *Journal of internal medicine*. 2007;262(2):157-72.
109. Patrono C, Ciabattoni G, Pugliese F, Pierucci A, Blair IA, FitzGerald GA. Estimated rate of thromboxane secretion into the circulation of normal humans. *The Journal of clinical investigation*. 1986;77(2):590-4.
110. Rosa AC, Corsi D, Cavi N, Bruni N. Superoxide Dismutase Administration: A Review of Proposed Human Uses. 2021;26(7).
111. Guthikonda S, Haynes WG. Homocysteine: role and implications in atherosclerosis. *Current atherosclerosis reports*. 2006;8(2):100-6.
112. Ducros V, Candito M, Caussé E, Couderc R, Demuth K, Diop ME, et al. [Plasma homocysteine measurement: a study of pre-analytical variation factors for conditions for total plasma homocysteine concentration]. *Annales de biologie clinique*. 2001;59(1):33-9.
113. Gukasyan HJ, Kannan R, Lee VH, Kim KJ. Regulation of L-cystine transport and intracellular GSH level by a nitric oxide donor in primary cultured rabbit conjunctival epithelial cell layers. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2003;44(3):1202-10.

114. Thompson GA, Meister A. Utilization of L-cystine by the gamma-glutamyl transpeptidase-gamma-glutamyl cyclotransferase pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1975;72(6):1985-8.
115. Bachhawat AK, Yadav S. The glutathione cycle: Glutathione metabolism beyond the γ -glutamyl cycle. *IUBMB life*. 2018;70(7):585-92.
116. Zarka MH, Bridge WJ. Oral administration of γ -glutamylcysteine increases intracellular glutathione levels above homeostasis in a randomised human trial pilot study. *Redox biology*. 2017;11:631-6.
117. Yang Y, Li L, Hang Q, Fang Y, Dong X, Cao P, et al. γ -glutamylcysteine exhibits anti-inflammatory effects by increasing cellular glutathione level. *Redox biology*. 2019;20:157-66.

X. Tárgyszavak

Apheresis

Apheresis

Rheopheresis

Rheopheresis

Diabeteses láb syndroma

Diabetic foot syndrome

Diabeteses alsó végtagi ulcus

Diabetic lower extremity ulceration

Diabeteses polyneuropathia

Diabetic polyneuropathy

Hyperviscositás

Hyperviscosity

Endothel

Endothel

Inflammatorikus citokinek

Inflammatory cytokines

Vasoaktív ágensek

Vasoactive agents

Antioxidáns státusz

Antioxidant status

XI. Köszönetnyilvánítás

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

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

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

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

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

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

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

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

XII. Hitelesített publikációs lista



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

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

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

Jelölt: Gál Kristóf
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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

További közlemények

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





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

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 6,659

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

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

Debrecen, 2023.01.16.



XIII. Függelék

A függelék az értekezés alapját képező közlemények másolatait tartalmazza.