

**Metánnal dúsított transzplantációs oldat – lehetséges megoldás a szerv tartósítás
hatékonyságának javítására a transzplantáció során**

Szilágyi Ágnes Lilla

Ph.D. értekezés tézisei

**Szeged Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar
Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola**

Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Sebészeti Műtéttani Intézet



Témavezető: Dr. Hartmann Petra

Szeged

2021

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények listája

Szilágyi ÁL, Mátrai P, Hegyi P, Tuboly E, Pécz D, Garami A, Solymár M, Pétervári E, Balaskó M, Veres G, Czopf L, Wobbe B, Szabó D, Wagner J, Hartmann P (2018) Compared efficacy of preservation solutions on the outcome of liver transplantation: Meta-analysis. *World J Gastroenterol.* 24(16):1812-1824. doi: 10.3748/wjg.v24.i16.1812. Review. **IF: 3,411**

Jász DK, **Szilágyi ÁL**, Tuboly E, Baráth B, Márton AR, Varga P, Varga G, Érces D, Mohácsi Á, Szabó A, Bozó R, Gömöri K, Görbe A, Boros M (2021) Reduction of hypoxia-reoxygenation-induced myocardial mitochondrial damage with exogenous methane. *J Cell Mol Med.* Accepted for publication. **IF: 4,486**

Az értekezés alapjául szolgáló előadás kivonatok

Márton A, **Szilágyi ÁL**, Jász DK, Mohácsi Á, Boros M, Hartmann P (2017) Transzplantációs oldatok dúsítása metánnal. *Magyar Sebészet* 70(3): 261 doi: 10.1556/1046.70.2017.3.5

Szilágyi ÁL, Jász DK, Márton A, Pécz D, Baráth B, Ficzer Á, Görbe A, Boros M, Hartmann P (2017) In vitro szívizom iszkémia/reperfúzió által okozott mitokondriális diszfunkció kezelése metán gázzal. *Magyar Sebészet* 70(3): 261-262 doi: 10.1556/1046.70.2017.3.5

Jász DK, **Szilágyi ÁL**, Márton A, Pécz D, Baráth B, Tuboly E, Görbe A, Boros M, Hartmann P (2018) Az in vitro szívizom iszkémia/reperfúziós károsodása következtében kialakuló mitokondriális diszfunkció kezelése metán gázzal. http://erbetegsegek.com/image/archivum/2018_3_absztrakt.pdf

Vida N, Márton A, Jász DK, **Szilágyi ÁL**, Diószegi P, Szabó M, Csonka CS, Szabó A, Mohácsi Á, Boros M, Hartmann P, Tuboly E (2018) Metánnal dúsított perfúziós folyadék protektív hatásainak feltérképezése ex vivo patkány szív iszkémia-reperfúziós modellben. http://erbetegsegek.com/image/archivum/2018_3_absztrakt.pdf

Szilágyi ÁL, Tuboly E, Márton A, Jász DK, Diószegi P, Szabó M, Csonka CS, Szabó A, Mohácsi Á, Boros M, Hartmann P (2018) Metánnal dúsított perfúziós folyadék hatása szív iszkémia-reperfúzió során kialakuló mitokondriális diszfunkcióra ex vivo patkány modellben. http://www.regio10.hu/uploads/eloadas_es_poszter_absztraktok.pdf

Egyéb, teljes terjedelmű közlemények

Érces D, Varga G, **Kovács ÁL**, Fülöp F, Vécsei L, Boros M, Kaszaki J (2011) N-Methyl D-aspartate receptor antagonist therapy in experimental colitis. In: Functional and Motility Disorders of the Gastrointestinal Tract. Proceedings of the Humboldt Kolleg Neurogastro pp. 41-49. (Romania, Iasi, Editura Medicală Universitară "Iuliu Hațieganu)

Mészáros AT, **Szilágyi ÁL**, Juhász L, Tuboly E, Érces D, Varga G, Hartmann P (2017) Mitochondria As Sources and Targets of Methane. Front Med (Lausanne). 4: 195. doi: 10.3389/fmed.2017.00195. **IF: 2,438**

Hartmann P, Butt E, Fehér Á, **Szilágyi ÁL**, Jász DK, Balázs B, Bakonyi M, Berkó SZ, Erős G, Boros M, Horváth GY, Varga E, Csányi E (2018) Electroporation-enhanced transdermal drug delivery into the knee joint in a rat model of acute arthritis. Drug Des Devel Ther. 12: 1917-1930. doi: 10.2147/DDDT.S161703. eCollection 2018. **IF: 3,265**

Nagy A, Mátrai P, Hegyi P, Alizadeh H, Bajor J, Czopf L, Gyöngyi Z, Kiss Z, Márta K, Simon M, **Szilágyi ÁL**, Veres G, Mosdósi B (2019) TNF-alpha Inhibitor Therapy Increases the Incidence of Infection in JIA Children: A Meta-analysis. Pediatric Rheumatol Online J. 17: 4. doi: 10.1186/s12969-019-0305-x. **IF: 2,719**

Németh N, Mátrai P, Hegyi P, Czeh B, Czopf L, Hussain A, Pammer J, Szabó I, Solymár M, Kiss L, Hartmann P, **Szilágyi ÁL**, Kiss Z, Simon M (2018) Theory of Mind Disturbances in Borderline Personality Disorder: A Meta-analysis. Psychiatry Res 270: 143-153. **IF: 2,298**

Benke K, Jász KD, **Szilágyi ÁL**, Baráth B, Tuboly E, Márton RA, Varga P, Mohácsi Á, Szabó A, Széll ZS, Ruppert M, Radovits T, Szabó G, Merkely B, Hartmann P, Boros M (2020) Methane supplementation improves graft function in experimental heart transplantation. J Heart Lung Transplant 40(3):183-192. doi: 10.1016/j.healun.2020.11.003. **IF: 7,865**

Összesített IF: 26,482

1. BEVEZETÉS

1.1. A transzplantált szerv iszkémia-reperfúziós (I/R) károsodása

A szervátültetés ma az egyetlen rendelkezésre álló kezelés végstádiumban lévő szervelégtelenség esetén. Az elmúlt évtizedekben rutinszerű beavatkozássá vált, amelyet világszerte folyamatosan növekvő számban végeznek. Ennek ellenére, ez az eljárás még mindig számos veszéllyel jár (Song et al., 2014). Az átültetett szerv (graft) a donorból való eltávolítás és tárolás során többszörös meleg és hideg iszkémiás perióduson megy keresztül, amit a keringés helyreállása során tovább súlyosbít a reperfúziós károsodás (Brisson et al., 2017). A hideg iszkémia során az oxigén-, és tápanyag ellátás megszűnik, az anaerob anyagcsere pedig az energia raktárak kimerüléséhez és ezzel együtt savas környezet kialakulásához vezet. A reperfúziós szakaszban a beültetett graftot további biokémiai és metabolikus károsodások érik, többek között a reaktív oxigéngyökök (ROS) képződése, a DNS károsodása és a helyi gyulladási reakciók kialakulása (Hearse et al., 1991). A gyulladási kaszkádok és az oxidatív stressz később citokin-vihart gerjeszthetnek, amely végül a szövetben sejthalálhoz vezet.

1.2. Tartósítási technikák

Számos módszert fejlesztettek ki a graftok tárolása és szállítása során bekövetkező iszkémiás károsodás csökkentésére, valamint a szövetek életképességének fenntartására (Brisson et al., 2017, Jia et al., 2015). Jelenleg két technika áll rendelkezésre a transzplantálható szervek tartósítására: statikus vagy dinamikus tárolás. A statikus tárolás fő módszere az egyszerű statikus hűtőtárolás (SCS), míg a dinamikus tartósítás módszereihez tartozik a hipotermikus gépi perfúzió (HMP) és más perfúzió alapuló módszerek, mint például a normoterm gépi perfúzió (NMP) és az oxigénperszuffláció.

Ezen módszerekhez több tartósító oldat áll rendelkezésre, melyeket összetételük szerint intracelluláris és extracelluláris típusokba oszthatók. A University of Wisconsin (UW) és az Institut Georges Lopez (IGL-1) oldatok a magas K^+ és alacsony Na^+ koncentrációjú intracelluláris tartósító oldatok közé sorolhatók, míg a hisztidin-triptofán-ketoglutarát (HTK) és a Celsior (CS) oldatok, extracelluláris tartósító oldatok.

1.3. A metán (CH_4) kémiai tulajdonságai és bioaktivitása

A CH_4 a legkisebb szénhidrogén, mely színtelen, szagtalan, gáznemű molekula. A CH_4 légköri szerepe jól ismert az ózonképződés mechanizmusában (hidroxilgyökökkel való reakciók); azonban az állati vagy emberi szervezetben lezajló fizikai-kémiai reakciói még nincsenek teljesen feltérképezve. Számos tanulmány vizsgálta az endogén CH_4 biológiai szerepét eukarióta organizmusokban, ezek közül több is bizonyította, hogy gombák, algák, növények és

állatok is képesek CH₄ termelésre aerob anyagcsere folyamatok eredményeként (Keppler et al., 2006, Althoff et al., 2014). Több kutatócsoport bizonyította az exogén CH₄ gasztointesztinális hatásait is (Pimentel et al., 2006, Mathur et al., 2016), emellett számos tanulmányban igazolták a CH₄-dúsított fiziológiás sóoldat védőhatását az I/R által kiváltott károsodások során. Munkacsoportunk írta le elsőként, hogy normoxiás CH₄-nal történő lélegeztetéssel csökkenteni lehet a szövetek I/R károsodását kis- és nagyállat modellekben (Boros et al., 2012). Ezeket az alapvető megállapításokat számos további kísérleti adat támasztja alá, amelyek együttesen igazolták a CH₄ inhalációs vagy CH₄-dúsított folyadékterápiák anti-oxidatív, anti-apoptotikus és gyulladáscsökkentő hatásait (Boros et al., 2012). Mindezek ellenére eddig még nem vizsgálták a transzplantációs folyadékban oldott CH₄ hatását a graftok működésére.

1.4. A CH₄ mitokondriumokra gyakorolt hatása I/R károsodás során

A CH₄ kedvező eloszlási tulajdonságokkal rendelkezik *in vivo*, azon tulajdonságának köszönhetően, hogy képes áthatolni a biológiai membránokon. Ezért felvetődött, hogy a CH₄ potenciális hatást fejthet ki a mitokondriális légzésre is. A mitokondriumok speciális intracelluláris struktúrák, amelyek alapvető sejtéleti folyamatokban játszanak szerepet, mint például az energiatermelés, a ROS képződés, a Ca²⁺ homeosztázis és az apoptózis. Korábbi adataink arra utaltak, hogy ezek a funkciók az exogén CH₄ célpontjai lehetnek I/R károsodás során, valószínűleg a foszfolipid membránok nem specifikus fizikai-kémiai megváltoztatásával (Strifler et al., 2016). További *in vivo* és *in vitro* hipoxiás vizsgálatokban is bizonyították a CH₄ modulációs hatását a mitokondriális légzésre I/R során (Chen et al. 2016, Wang et al., 2017).

1.5. A mitokondriumok szerepe az apoptózis folyamatában

A mitokondrium nemcsak a sejt anyagcseréjét, hanem halálát is irányítja. A mitokondrium által vezérelt apoptotikus folyamat szabályzásában fontos szerepet játszanak a Bcl-2 család fehérjéi. Ezek két osztályba oszthatók: anti-apoptotikus Bcl-2 családfehérjékre (mint pl. Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1, A1, Bcl-Rambo, Bcl-L10 és Bcl-G) és pro-apoptotikus fehérjékre (pl. Bcl-2 asszociált X fehérje (Bax), Bak, és Bok). A Bcl-2 elsődlegesen a citokróm c felszabadulását blokkolja, így fejt ki anti-apoptotikus szerepét. Ezzel szemben, a Bcl-2 család pro-apoptotikus tagjainak (Bak vagy Bax) stressz okozta aktiválása a mitokondriális külső membrán permeabilizációjához és az intermembrán tér fehérjéinek felszabadulásához vezet. (Brenner et al., 2000, Cui et al., 2017, Fan et al., 2016). Ezen fehérjék közé tartoznak pl. a prokaspázok, az apoptózis indukáló faktor (AIF), az adenilát-kináz 2, pár hősokk fehérje (Hsp10, Hsp60), Smac / Diablo (nemrégiben felfedezett kaspáz-koaktivátor) és még a légzési lánc fehérjéi is, mint például a citokróm c. A citokróm c lazán kapcsolódik a belső mitokondriális membrán

külső oldalához, és a III és IV légzési komplex között szállít elektronokat. A membrán károsodása során a citokróm c felszabadul a citoszolba, itt elindítja a kaspáz-kaskád által irányított apoptózóma képződését, mely végül a sejt apoptózisához vezet (Mészáros et al., 2017).

2. A TANULMÁNYOK CÉLJAI

Vizsgálataink fő célja egy olyan módszer kidolgozása volt, amely növeli a jelenleg rendelkezésre álló transzplantációs oldatok hatékonyságát.

Első lépésként a szervátültetés során általánosan alkalmazott oldatok hatékonyságának összehasonlítását tűztük ki célul. Erre a célra egy meta-analízist végeztünk el, melyben összehasonlítottuk a négy legszélesebb körben alkalmazott transzplantációs oldat hatékonyságát (HTK, UW, Celsior and IGL-1) (**1. tanulmány**).

Ezután egy olyan transzplantációs oldat megtervezését tűztük ki célul, mely a hideg tárolás során hosszabb ideig és nagyobb hatékonysággal képes megőrizni a graft életképességét. Ezért a **2. tanulmányban** összeállítottunk egy olyan rendszert, mellyel vizsgálhattuk a CH₄ oldhatóságának és stabilitásának hőmérséklet- és nyomásfüggését különféle oldatokban, valamint optimalizáltuk a CH₄-dúsított HTK tárolás hatékonyságát.

Végül az oldott CH₄ hatását teszteltük a transzplantáció által kiváltott I/R károsodás releváns *in vitro* modelljében. Így a **3. kísérletes tanulmány** során megvizsgáltuk az oldott CH₄ hatásait újszülött patkány szívizomsejtek túlélésére és mitokondriális működésére, szimulált I/R (sI/R) során.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. 1. tanulmány: Szervtartósító oldatok hatékonyságának összehasonlítása májtranszplantáció során. Meta-analízis

3.1.1. Keresési stratégia

Szisztematikus szakirodalmi keresést végeztünk az EMBASE/MEDLINE, a PubMed, a Scopus és a Cochrane adatbázisok felhasználásával 2017. január 31-ig bezáróan. Az adatbázis-kereséseket MeSH kulcsszavakkal végeztük, a szervátültetés és a szervtartósító oldatok kifejezéseinek különféle kombinációjával. Nyelvi limitációt nem alkalmaztunk.

Vizsgáltunk minden olyan randomizált kontrollvizsgálatot, amelyben két vagy több tartósító oldatot hasonlítottak össze. Beválasztási kritérium volt, hogy az oldatok SCS során lettek felhasználva, elhunytból származó donormáj (DDLs) tartósítására. A DDLs felnőtt és gyermek donorból egyaránt származhatott. Az élő donoros szervátültetést, a multi és retranszplantációt, illetve az állatokon végzett vagy kontroll nélküli vizsgálatokat kizártuk.

3.1.2. Vizsgált paraméterek

Az elsődleges kimeneti eredmény a primary non-function (PNF) volt. A PNF olyan életveszélyes állapot a transzplantáció után, amely halálhoz vagy az átültetés megismétléséhez vezethet a transzplantációt követő hét napon belül.

A másodlagos kimeneti eredmény a transzplantáció utáni egyéves graft túlélés (OGS-1) volt, mivel egy szakértői konszenzus véleménye alapján a transzplantáció után egy éven belüli eltérések elemzése a legalkalmasabb a tartósító oldatok hatásának értékelésére.

3.1.3. Statisztikai analízis

A statisztikai elemzést a Stata 11 SE (Stata Corp) és a Comprehensive Meta-analízis Software (Version 3, Biostat, Englewood) alkalmazásával végeztük. Véletlenszerű hatás modellt alkalmaztunk minden elemzés során DerSimonien-Laird becsléssel.

3.2. 2. tanulmány. CH₄ oldhatóságának vizsgálata transzplantációs oldatban

3.2.1. CH₄ koncentráció meghatározása

A CH₄ kimutatására szolgáló fotoakusztikus spektroszkópiás (PAS) technikát társ munkacsoportunk fejlesztette (Tuboly et al, 2013). A CH₄ oldhatóságának meghatározását 20 cm³ térfogatú küvettában végeztük. A bemeneti nyíláshoz a CH₄-tartalmú gázpalack, a kimeneti nyíláshoz pedig a CH₄-érzékelő rendszer volt csatlakoztatva. Az oldatok perszufflálását 2,2% CH₄ – mesterséges levegő keverékkel, 200 ml/perc áramlási sebességgel végeztük.

3.2.2. Kísérleti protokollok

Két protokollt alkalmaztunk a CH₄ folyadékfázisban való oldhatóságának és stabilitásának

meghatározására. Különböző áramlási idő használatával (10 és 60 perc) vizsgáltuk a CH₄ oldhatóságát desztillált vízben (H₂O), fiziológiás sóoldatban (NaCl) és HTK oldatban. A második lépésben, 4 és 21 °C-os hőmérsékleten határoztuk meg a CH₄ oldhatóságát és stabilitását NaCl és HTK oldatokban. A minták CH₄-tartalmát 10 perc, 1 óra, 3 óra, 6 óra és 24 óra inkubálás után kétféle módon határoztuk meg.

3.3.3. tanulmány. Miokardiális I/R által kiváltott mitokondriális károsodás, a CH₄ *in vitro* hatásai.

3.3.1. Újszülött patkány szívizomsejtek izolálása és tenyésztése

A szívizomsejteket Görbe és mtsai módszere szerint, a korábbiakban kialakított protokoll alapján izoláltuk (Görbe et al., 2010).

3.3.2. Kísérleti protokoll

A kísérleteket intakt szívizomsejtek alkalmazásával végeztük. Az I/R csoportban három napos szívizomsejteket 4 órán keresztül szimulált iszkémiának vetettük alá, ez idő alatt a sejteket hipoxiás oldatban és hipoxiás kamrában tároltuk. Majd 2 órás reoxigenációs periódus során a sejteket tápoldatban, normoxiás levegővel vagy CH₄-mesterséges levegő keverékével áramoltatott kamrában tároltuk. A kontroll csoportokat normoxiás inkubátorban tároltuk 4 órán keresztül, amelyet 2 órás reoxigenációs periódus követett a normoxikus inkubátorban CH₄-mesterséges levegő keverékével vagy anélkül.

3.3.3. A mitokondriumok funkciójának vizsgálata nagy felbontású respirometriával (HRR)

HRR során (Oxygraph-2k, Oroboros Instruments, Innsbruck, Ausztria) a szívizomsejtek és az izolált szív mitokondriumok oxigénfogyasztását vizsgáltuk különböző metabolikus állapotokban. A mitokondriális metabolikus állapotok vizsgálata előtt a szívizomsejteket permeabilizáltuk a respirométer kamrában, ezután kapcsoltság vizsgálati protokollt alkalmaztunk.

3.3.4. Citokróm c-oxidáz aktivitás kimutatása

A citokróm c-oxidáz aktivitást a citokróm c 550 nm-en történő időfüggő oxidációja alapján számoltuk, a korábban leírtak szerint (Szarka et al., 2004).

3.3.5. A szívizomsejtek apoptózisának és életképességének vizsgálata

A szívizomsejtek túlélését calcein viabilitás meghatározással és LDH szint méréssel, az apoptózist TUNEL festéssel vizsgáltuk.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Az 1. tanulmány eredményei

Tanulmányunkba 15 db közlemény adatait vontuk be, melyekből meta- és subgroup analízisekkel hasonlítottuk össze a transzplantációs oldatok hatékonyságát. Elsődleges kimeneti eredményünk a PNF volt, melynek vizsgálata során nem mutatunk ki szignifikáns különbséget az UW és CS, valamint az UW és HTK oldatok között. Az IGL-1 oldat hatékonyságával csak egy RCT foglalkozott, ami nem volt elegendő a meta-analízishez. Mindezek alapján a négy oldatot subgroup analízissel hasonlítottuk össze, szignifikáns különbség nem volt kimutatható. A második kimeneti eredményünk az OGS-1 volt, melynek meta-analízis vizsgálata nem mutatott szignifikáns különbséget az UW és CS, illetve az UW és HTK oldatok között. A négy oldat összehasonlítására az OGS-1 tekintetében is subgroup analízist végeztünk, szignifikáns különbséget itt sem mutattunk ki.

Publikációs torzítás nem volt kimutatható.

4.2. A 2. tanulmány eredményei

Három különböző oldatban (H₂O, NaCl és HTK) vizsgáltuk a CH₄ oldhatóságát, melyet az áramlási idő változtatása nem befolyásolt. Eredményeink alapján a CH₄ koncentráció minden vizsgált időpontban szignifikánsan magasabb volt 4 ° C-os tárolás során, mint 21 ° C-on, mely a vizsgálati időszak alatt folyamatosan csökkent. Ennek ellenére 24 órás, 4 ° C-on történő tárolás után még mindig terápiás koncentrációban volt jelen a CH₄ a transzplantációs oldatban. Ugyanakkor 3 óra elteltével 21 °C-on tárolva már nem volt kimutatható mennyiségű CH₄ az oldatokban.

4.3. A 3. tanulmány eredményei

Az inkubációs kamrák légterében a háttér CH₄ koncentrációja $1,46 \times 10^4 \pm 94,95$ ppm volt. A 2,2% CH₄-mesterséges levegő keverékkel végzett perszuffláció megkezdése után gyors koncentráció növekedést detektáltunk ($1,5 \times 10^6 \pm 58,12$ ppm). Ez a koncentráció a 2 órás reoxigenizációs periódus alatt folyamatosan fennmaradt. Az oldott CH₄ koncentráció $1,46 \times 10^6 \pm 76381$ ppm volt a sejtenyészti tápoldatban 5 perccel a CH₄ perszuffláció után.

A kapcsoltság vizsgálati protokoll lehetőséget nyújt a mitokondrium leak respirációjának elemzésére. Ennek eredményeként szignifikánsan alacsonyabb OxPhos-értéket mértünk az sI/R csoportban a normoxia csoporthoz képest. A CH₄ kezelés az sI/R+CH₄ csoportban szignifikánsan növelte az oxigénfogyasztást. A leak respiráció csökkent sI/R során; azonban az sI/R+CH₄ csoportban a CH₄-kezelés hatására ez a csökkenés mérséklődött. Az sI/R szignifikánsan csökkentette a maximális légzési kapacitást a normoxia csoporthoz képest. A

CH₄ kezelés nem befolyásolta a maximális légzési kapacitást sI/R alatt.

A várakozásoknak megfelelően a normoxia és normoxia+CH₄ csoportban csak kevés TUNEL-pozitív sejtet figyeltünk meg. A szimulált I/R fokozott TUNEL pozitivitással járt, amely a CH₄ inkubáció következtében jelentősen csökkent. A mitokondriális citokróom c-oxidáz aktivitást spektrofotometriás analízissel határoztuk meg. I/R során mitokondriális membránból származó citokróom c felszabadulás mutatható ki a citoszolban; ez az esemény a mitokondriális membrán károsodásának indikátorának tekinthető. A normoxia+CH₄ csoportban a CH₄ inkubáció hatására az enzimaktivitás nem változott a normoxiás csoporthoz képest. Ezzel szemben az sI/R-t fokozott citokróom c-oxidáz aktivitás kísérte, amely a CH₄ kezelés hatására szignifikánsan csökkent.

A szívizomsejtek életképességét kalcein-viabilitás vizsgálattal határoztuk meg. A normoxiás csoporthoz képest a normoxia+CH₄ csoportban a CH₄ kezelés az életképesség kismértékű csökkenéséhez vezetett. Az sI/R hatására az élő sejtek száma csökkent, viszont az sI/R+CH₄ csoportban a CH₄ kezelés ezt a sejtpusztulás megakadályozta.

Az LDH aktivitás vizsgálatával nem volt kimutatható különbség a két normoxiás csoport között, ugyanakkor az LDH koncentráció szignifikánsan alacsonyabb volt az sI/R+CH₄ csoportban, mint az sI/R esetében.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. Szervtartósító oldatok hatékonyságának összehasonlítása májtranszplantáció során.

Kutatómunkánk első lépéseként a jelenleg forgalomban lévő transzplantációs oldatok összehasonlítására meta-analízist végeztünk. A kezelési csoportok a donorok és a recipiensek tulajdonságait tekintve homogének voltak. Az elsődleges és másodlagos paraméterek (azaz a PNF és az OGS-1) függetlenek voltak az egyéni kockázati változóktól. A paraméterek elemzése jó bizonyítékot szolgáltatott arra vonatkozóan, hogy az UW-hoz képest a CS, a HTK és az IGL-1 oldatok nem hatékonyabbak a szerv életképességének megőrzésében a hideg tárolás során.

A PNF elsősorban a szerv tárolásának módszerétől függ (Rutger et al., 1993). A transzplantációk 2–6% -ában fordul elő, és nincs összefüggésben semmilyen közvetlen műtéti, immunológiai vagy egyéb komplikációval (Uemora et al., 2007). Meta-analízisünk 15 olyan vizsgálatot tartalmazott, amelyekben az UW oldat hatékonyságát értékelték a CS vagy a HTK oldatokhoz képest. Az irodalmi adatokkal összhangban a PNF általános aránya nagyon alacsony volt, egy tanulmány kivételével (13%) (Nardo et al., 2005). Az egyes vizsgálatok elemzése során két olyan vizsgálatot találtunk, amelyekben magasabb volt a PNF előfordulási

gyakorisága az UW csoportban, mint a HTK csoportban, de a meta-analízis során szignifikáns különbséget nem tudtunk kimutatni (Kuznetsov et al., 2002, Meine et al., 2006). Hozzá kell tenni, hogy az ELTR adatok friss elemzése azt mutatta, hogy a HTK használata egyéni kockázati tényezőt jelent a PNF kialakulásában, az UW oldattal való összehasonlítás során (Adam et al., 2015). Az ellentmondásos következtetések az adatbázis-elemzés szelekciós torzításával magyarázhatók (Nashan et al., 2015). A PNF kockázatának elemzése során egyik esetben sem találtunk különbséget az UW és a többi oldat között. Az IGL-1 és a HTK tekintetében két prospektív randomizált klinikai vizsgálatot elemeztünk, melyek 356 beteg bevonásával, azonos eredményeket közöltek (Rutger et al., 1993, Uemora et al., 2007). Hasonló eredményt mutattak ki egy 140 beteggel végzett klinikai vizsgálat során, melyben az IGL-1 oldatot hasonlították össze az UW oldattal (Dondéro et al., 2010). Ezt a jelenlegi vizsgálatunk is megerősítette, mivel az IGL-1 subgroup analízisünkben hasonló PNF-kockázatot mutatott, mint az UW és a HTK.

Vizsgálatunkban az OGS-1 volt a másodlagos kimeneti eredmény. A graft túlélési arányait egy, három és öt évvel a májtranszplantáció után értékelték a tanulmányokban. A meta-analízis elvégzéséhez az egyéves időszakot választottuk a megfelelő időszaknak a tartósító oldatok hatásának értékelésére, mivel az ezt követő időszakban más tényezők nagyobb hatást gyakorolhatnak erre az eredményparaméterre. Egy többváltozós statisztikával kimutatták az ELTR adatbázis retrospektív elemzése során, hogy a HTK oldat használata függetlenül más hatásoktól, magasabb mortalitással járt, mint az UW, CS és IGL-1 oldatok használata (Adam et al., 2015). Egy másik elemzés, mely egy nagyméretű nemzeti nyilvántartási adatbázist vizsgált (United Network for Organ Sharing, UNOS) szintén kimutatta a HTK és az UW oldatok közötti eltéréseket a graft túlélési arányában (Stewart et al., 2009). Azonban a donorok közötti fontos kockázati tényezőket nem vették figyelembe az ELTR elemzés során, és a másik elemzésben a transzplantált betegek kiválasztott csoportjai sem voltak homogének: a HTK-ban tárolt graftokat kedvezőbb tulajdonságokkal rendelkező recipienseknél használták fel, valamint rövidebb hideg iszkémiás időtartamban (CIT) alkalmazták (Nashan et al., 2015, Stewart et al., 2009). Számos klinikai vizsgálat eredményeivel összhangban a tanulmányunk meta- és subgroup analízisei nem mutattak szignifikáns különbséget az OGS-1 kockázatában az UW és a vizsgált oldatok bármelyike között. Hasonlóképpen, a subgroup analízisek sem mutattak ki különbséget az IGL-1 és az UW, valamint az IGL-1 és a HTK oldatok között.

Tanulmányunknak vannak bizonyos korlátai. Eddig csak három kisebb RCT hasonlította össze az IGL-1-et az UW-vel, vagy a HTK-val. Ezért nem tudtunk meta-analízis segítségével

összehasonlítani az IGL-1-et bármelyik más oldattal. A PNF-re vonatkozó négy oldat kockázatának összehasonlításához subgroup analízist kellett elvégeznünk. Ezenkívül a műtéti idő és a befogadó koagulációs problémák miatti hemoderivatív transfúziók gyakran nem szerepelnek a tanulmányokban, mint a negatív kimenetel előrejelzője (Mangus et al., 2007). Ezt a tényezőt nem vették figyelembe a kiválasztott vizsgálatokban sem. Ezenkívül a különböző tanulmányok némi eltérést mutattak az operatív eljárás tekintetében is. Illetve a mellékelt RCT-k homogének voltak a donor és a recipiens paramétereit tekintve, mely egyrészt lehetőséget adott a szelekciós torzítás kizárására, másrészt a tartósító oldatok hatásait a hosszabb CIT és a kibővített kritériumokkal rendelkező donorok bevonása esetén nem lehetett értékelni.

Összefoglalva, a májtranszplantáció kimenetelét bonyolítja a klinikai eljárás összetettsége, mely a tartósító oldatok szerepének tisztázását is befolyásolja. Így elmondható, hogy ez az áttekintés a jelenleg elérhető legjobb elemzéseket foglalta össze a leggyakrabban használt négy tartósító oldat összehasonlításáról. Tanulmányunkban meta-analízist végeztünk, mely során a vizsgált tanulmányok mintanagysága elég nagy volt ahhoz, hogy helyesen megbecsülhessük az alacsony előfordulási arányú kockázatok, például a PNF vagy az OGS-1 előfordulási valószínűségét. Eredményeink alapján bebizonyítottuk, hogy az UW, a CS, a HTK és az IGL-1 oldatok közel azonos hatékonysággal képesek megőrizni a szerv életképességét a transzplantáció során. További vizsgálatok elvégzése szükséges nagyobb betegpopuláció bevonásával, ideértve a marginális donorokat, a hosszabb hideg iszkémiás időt, a többszerves transzplantációkat és a gazdasági szempontokat, hogy értékelni lehessen bármely alternatív oldat felsőbbrendűségét az UW-vel szemben.

5.2. CH₄ gáz oldhatósága transzplantációs oldatban

Több, korábbi vizsgálat és kutatás igazolta a CH₄ biológia hatásait. Ezek közül számos tanulmányban vizsgálták a CH₄-nal dúsított fiziológiás sóoldat hatását I/R károsodások során. Ezekben a kísérletekben CH₄-nal szuperszaturált fiziológiás sóoldatot használtak (Song et al., 2015, Fan et al., 2016, Brenner et al., 2000, Meng et al., 2018, Liu et al., 2012). Mindeddig transzplantációs oldatokkal nem végeztek kísérleteket, ezért vizsgálataink során meghatároztuk a CH₄ gáz oldékonyságát és stabilitását különböző oldatokban, PAS technológia segítségével. Kísérletünkben a biztonságos, inhalációra és graft prezervációra is használható, megfelelő oxigénkoncentrációval bíró 2,2%-os CH₄-mesterséges levegő gázkeveréket használtuk. Első körben meghatároztuk az általunk használt gázkeverékben lévő CH₄ oldékonyságát különböző oldatokban. Irodalmi adatok alapján, túlnyomáson, 99,9%-os CH₄-nal való dúsítást követően 3,5 mg CH₄ gáz oldódik 100 ml 21°C-os vízben (F.S. Structures, F. Damp, PubChem CID: 297

Structure:, 1800.). Eredményünk alapján a hosszabb perszufflációs idő használatával a CH₄ koncentrációjának növelése nem volt lehetséges. A NaCl CH₄ koncentrációja pedig kisebb volt, mint a H₂O és a HTK oldaté. E jelenség hátterében az áll, hogy a magasabb sótartalom csökkenti a gázok oldékonyságát, míg a magasabb fehérje tartalom és alacsonyabb hő növeli azt (Clever et al., 2005). Adataink alapján, ha tiszta (99,9%) CH₄ gázt használtunk volna az oldatok dúsításához gázkeverék helyett, akkor 4,5 mg/100 ml koncentrációt lehetett volna elérni NaCl-ban és 4,9 mg/100 ml koncentrációt HTK-ban.

Következő lépésként vizsgáltuk a CH₄ oldékonyságának és stabilitásának hőmérsékletfüggését. A dúsított HTK oldatokat különböző hőmérsékleten 1 napig tároltuk és megadott időközönként vizsgáltuk a CH₄ tartalmat. Az eredmények azt mutatták, hogy az alacsonyabb hőmérsékletű HTK oldatnak nem csak az oldékonysága, hanem stabilitása is szignifikánsan jobb, mint a 21°C-os CH₄ dúsított HTK oldaté. A maximális CH₄ koncentráció 586 ppm volt a 4°C-os HTK oldatban, ami az inkubációs idővel arányosan csökkent. Azonban 24 h elteltével még kimutatható mennyiségben (3 ppm) volt jelen CH₄. Az eredmények alapján a CH₄-nal dúsított HTK oldat még 24 h inkubáció után is rendelkezhet megfelelően protektív biológiai hatással az I/R károsodás befolyásolására.

5.3. A miokardialis I/R által kiváltott mitokondriális károsodás csökkentése exogén CH₄ alkalmazásával

Ebben a tanulmányban felvázoltuk a CH₄ *in vivo* biológiai hatékonyságához kapcsolódó lehetséges mechanizmusokat. A CH₄ várható mitokondriális hatásait HRR-rel jellemeztük, és kimutattuk, hogy beadása csökkenti az sI/R-vel kapcsolatos mitokondriális ETC-zavarokat és enyhíti a későbbi apoptotikus következményeket. Fontos, hogy a CH₄ csökkentette a citokróm c felszabadulását (a külső mitokondriális membrán integritásának jele) is.

A jelenlegi ismeretek szerint a CH₄ nem vesz részt az eukarióta sejt katabolikus vagy metabolikus biokémiai folyamataiban. Érdekes módon a miokardialis infarktus (MI) preklinikai modelljében a CH₄-kezelés jelentősen javította a szív működést és csökkentette a szívizom sejtek apoptózisát (Chen et al., 2016). Anti-apoptotikus és antioxidáns hatásait más I/R modellekben is bizonyították (Boros et al., 2012, Strifler et al., 2016, Chen et al., 2016). Ezek az adatok mind azt sugallják, hogy a mögöttes hatásmechanizmus szorosan kapcsolódik a mitokondriális funkciókhoz.

A túlzott oxidatív stressz az sI/R egyik fő alkotóeleme, és a mitokondriális ETC a ROS képződésének elsődleges forrása. Hasonlóképpen, a reperfüzió korai szakaszában a szuperoxid-termelés nagy része az I. komplexhez kapcsolódik (Korge et al., 2017, Votyakova et al., 2001,

Gorenkova et al., 2013, Babot et al., 2014). Ezt az elképzelést alátámasztották olyan tanulmányok, amelyekben kimutatták, hogy az iszkémiás prekondicionálás vagy a reverzibilis I komplex gátlókkal történő előzetes kezelés mérsékelheti a ROS keletkezését és a szív I/R károsodását (Ringe et al., 2005, Meng et al., 2018). Ebben a tanulmányban igazoltuk, hogy az I komplexel való kölcsönhatás minden bizonnyal kulcsfontosságú a CH₄ kezelés során, vagyis az I/R károsodás elleni védekező mechanizmusban. Eredményeink alapján valószínűsíthető, hogy a kezelés során a CH₄ nem kapcsolódik közvetlenül az I komplex membrán asszociált kötési helyére, hanem hatását közvetve az I komplex konformációjának megváltoztatásával fejt ki.

6. AZ ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

- Bizonyítékokat szolgáltatunk arra, hogy a jelenleg általánosan alkalmazott szervtartósító oldatok közül a HTK, UW, Celsior és IGL-1 azonos hatékonysággal képesek megakadályozni a graft károsodását; ugyanakkor egyik tartósító oldat sem nyújt teljeskörű védelmet az átültetett graftok I/R sérülései ellen.
- Bebizonyítottuk, hogy az Európában leggyakrabban használt tartósító oldat, a HTK hatékonyan dúsítható 2,2% CH₄ gázzal. Ezen túl, a kifejlesztett oldat CH₄ koncentrációja 4 ° C-on tárolva 24 óra elteltével is kellően magas lehet, ami védőhatást gyakorolhat az I/R károsodások ellen.
- Kimutattuk a CH₄ kezelés védőhatását szívizom sejt kultúra I/R sérülése során. A védőhatást a sejtek életképességének növekedése és az apoptotikus sejtek számának csökkenése bizonyította. A CH₄ hatásmechanizmusa a belső mitokondriális membrán integritásának megőrzésén alapul.

Összefoglalva, kifejlesztettünk egy új módszert, amely lehetőséget adhat a jelenleg alkalmazott transzplantációs oldatok hatékonyságának növelésére.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálás vagyok Boros Mihály professzor úrnak, aki támogatott tudományos pályám megkezdésében, és lehetőséget biztosított számomra, hogy értékes tudományos irányítása mellett és segítségével a Sebészeti Kutató Intézetben végezhessem kutatásaimat. Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Hartmann Petrának, hogy segített a magasabb szintű kísérleti készségek elsajátításában, és minden nap korlátlan segítséget nyújtott a vizsgálatok kivitelezésében és a publikációk megírásában. Köszönettel tartozom Dr. Varga Gabriellának is, aki segített az alapvető kísérleti készségek elsajátításában, és akihez bármikor fordulhattam segítséget kérni. Továbbá hálás vagyok Dr. Tuboly Eszternek, aki szakértelmével segített a kutatásomban. Szeretném megköszönni a TDK hallgatóinknak a lelkiismeretes és lelkes munkájukat. Köszönet illeti Zádoriné Beretka Nikolettet, Mester Csillát, Andrásiné Ágneszt és Bús Andreát is a kísérletekben és biokémiai vizsgálatokban nyújtott segítségükért. Végül, de nem utolsó sorban köszönettel tartozom a családomnak, különösen édesanyámnak és anyósomnak. Nélkülük ez a tézis nem születhetett volna meg.