

Bírálat dr Németh Norbert : „Haemorheologiai vizsgálatok a kísérletes sebészeti és mikrosebészeti kutatások szolgálatában ”” c doktori értekezéséről

Irta Prof. Dr Szirmai Imre

A doktori értekezés 91, a tárggyal kapcsolatos, tudományos közlemény anyagát összegzi, ezekre adott független idézetek száma 525. Scientometriai szempontból tehát az értekezés a követelményeknek megfelel, ezért ezek részletes értékelésétől eltekintek.

A haemorheológiával foglalkozók számára a múlt század 80-as éveiben evidencia volt, hogy parenchimas szerveink (szív, agy, vese, izmok) minden kórtani folyamatában a mikrocirkulatio zavara felfedezhető, ami lehet ok vagy következmény. Ez kiterjesztett fogalmazással azt jelentette, hogy minden lényeges patofiziológiai esemény a mikrocirkulatio területén zajlik. Ettől a felfogástól sem a belgyógyászatban, sem a vesegyógyászatban sem a neurológiában nem szakadtunk el, ennek ellenére 20-25 év alatt a figyelem a rheológiáról elterelődött. Annak ellenére történt ez, hogy az antikoaguláció és az érsebészet módszereinek hatásossága attól függ, hogy a rheológiai tényezőket és ezzel együtt a mikrocirkulatiót javítani tudják, vagy nem. A rheológiai méréseket azonban az embergyógyászatban diagnosztikai céllal egyre ritkábban végeztek, majd a kóros állapotok monitorozásában is csökkent a rheológiai mérések száma. A disszertáns értekezésének bevezetését olvasva megnyugodva vehetjük tudomásul hogy a tudománytörténetben jól ismert visszatérés jelensége megerősítéseként a kutatók ismét tanulmányozzák a beteg szervek mikrokeringését.

Természetesen azoknak, akik kitarítottak a kutatási területük mellett, mint pl Németh Norbert doktor, nem a visszatérés, hanem a saját és munkacsoportja figyelmének megtartása jelentett feladatot. A mérőműszerek megbízhatóságával nem foglalkozom. Tegyük fel, hogy az in vitro mérések hűségesen, de legalább megközelítően utánozzák az in-vivo körülményeket. A disszertáns a vizsgálatait állatokon végezte. A bevezetésben felvetett kérdések jól követik az embergyógyítás gyakorlati céljait.

Úgy tudom, hogy Malpighi tekinthető a mikrocirkuláció megfigyelésében elsőnek. Malpighivel a filozófus Leibniz Guglielmini révén ismerkedett meg és 1689-ben gyümölcsöző megbeszélést folytatott vele. Leibniz elégedetlen volt a mikroszkóp elterjedésével, mondván: „ *Gyakran bosszankodom az emberi tunyaságon, ami nem nyitja ki az emberi szemeket és egy már kész tudományt nem kegyeskedik tulajdonbavenni*”. Ilyesmi szerencsére nem történt a rheológiai műszerekkel, illetve nem mindenütt dobták ki ezeket. A történelmi visszatekintés élvezetes és tanulságos olvasmány. Megjegyzésem csak annyi, hogy sajnos nem találtam a Nobeldíjas August Krogh nevét.

A II. táblázatban „A vér viszkozitását meghatározó fő paraméterek...” felsorolásában a „vörösvérsejt deformabilitás” mellett hiányoltam a vér egyéb alakoselemeinek filtrációs sajátosságainak említését, ami fiziológiás körülmények között feltehetően nem lényeges eleme az egész vér viszkozitásának, azonban a reaktív fehérvérsejtek és ezek nagy száma releváns mikrocirkulatiozavarhoz vezethet. (Ezzel kapcsolatos közlemény: *Yarnell JWG et al.. Fibrinogen, viscosity, and white blood cell count are major risk factors for ischemic heart disease... Circulation . 1991;83:836 – 844*). A szerző a 23.-ik oldalon kitér arra, hogy minden ischemia-reperfusio modellben (vagy emberi betegségben) „gyulladásos válaszreakciók” alakulnak ki. A filtrációs változások arra utalnak, hogy a stress (vagy az immunológiai-gyulladásos folyamatok) miatt kiszabadult fehérvérsejtek rigiditása megnőtt.

A kérdésem ezzel kapcsolatban egyszerű: Megvizsgálták-e kenetekben az állatok fehérvérsejtjeit, az un. kvalitatív vérképet vagy csak megszámlálták az automatával?

A szerző a véráramlás fizikai modelljével kapcsolatban említi a *Fahreus - Lindqvist* (1931) effektust. Ezt a rheológusok számára fontos tételt a szerző helyesen értelmezi. A precapillaris területen a vérvizkozitás az előtte lévő szakaszhoz viszonyítva hirtelen lecsökken (apparent viscosity), ez teszi lehetővé hogy a 0-hoz közelítő perfúziós nyomás ellenére a szövetek vérátáramlása regulált marad. A kérdésem az, hogy elegendő magyarázat-e erre a jelenségre a vér „hígulása” vagy ismer-e olyan (nem fizikai) tényezőket, amik hozzájárulhatnak a jelenség magyarázatához.

A kifejtett Fahreus effectussal ellentétben a 26. oldalon írt állítás, mi szerint: „A mikrokeringés területén nagyobb energiára, nagyobb nyíróerőre van szükség...” Ez így nem állítható, mert a tapasztalat azt mutatja, hogy már a precapillarisokban csökken a nyíróerő, ennek ellenére a perfúzió megfelel a szöveti igénynek. A microcirculatio területén fiziológiás körülmények között nem nő az áramlási ellenállás, ugyanis a capillarisok össz-átmérője többszöröse az odavezető nagyerek átmérőjének. A szerző ezzel kapcsolatos véleményét kérdezem – röviden.

Az értekezés első harmadában, a kutatólabor érdeklődésének megfelelő, szigorúan tematikus vizsgálatokról olvashatunk. Kutyák és patkányok vérmintája tárolási idejének és hőmérsékletének hatása kifejezett volt a vörösvérsejtek elongációjára és az aggregációra. A megfigyeléseket emberi vizsgálatokkal is kiegészítették, Alvadásgátolt vénás vérmintákat tároltak 4, 6, 8, 12 és 24 óráig. A vérminták összehasonlító elemzéséhez az elongációs index – nyírófeszültség összefüggés jelzésére az un. SS1/2 értékeket használták. Ezek az értékek 6 óráig, a hőmérséklettől független, tárolás során sem változtak. A vvt aggregáció hűtéssel 12 óráig gátolható, a deformabilitás 6 órától jelentősen változik. A mechanikai ártalom (centrifugálás) az ember vérében a nyírófeszültséget a centrifugálás g értékétől függetlenül lényegesen nem változtatta, a patkány és sertés vérben viszont jelentősen növelte. Az aggregációs értékek a sertés vérben 500 g-nél megemelkedtek, az emberi vörösvérsejtek aggregációs értékei stabilak maradtak.

A deformabilitást általában a készülékek beállított programjának megfelelően 20 és 30 mPa nyírófeszültségen mérik. A disszertáns megváltoztatta a nyírófeszültséget és az alacsonyabb értékeken a az ektacytometria a különböző fajok vérében eltérő értékeket mutatott. Az Elongációs Index (EI) változásának pontosabb megítélésére arányszámokat használt, az alacsony nyírófeszültségen végzett vizsgálatoknál növekedtek nagyobb mértékben a fajok közötti különbségek. Az emberi vvt-k és patkányé adták alacsony nyírófeszültségen a legmagasabb értékeket.

A statisztika próbák arra utalnak, hogy ez biológiai okokkal függhet össze, azonban – azt hiszem, hogy nem tudjuk megmagyarázni. (A bírálóban felmerült, hogy a human evolúció a keringési rendszer végső elemeiben is nyomot hagyott...?)

Azt írja a disszertáns, hogy a glutáraldehid előkezelés rigidde tette a vörösvérsejteket. A kérdésem: Hogyan hat a vörösvérsejtekre a glutáraldehid? Miért van szükség a használatára? Nem lehetséges-e az, hogy erősen divergáló rendszerekben a szubsztrátok is eltérően hatnak?

Az egyes fajok között a vörösvérsejt aggregatio igen változatos értékeket mutat. Érdekes, hogy a viszkozitás és hematocrit pl. patkánynál az összvérvizkozitás sokkal jobban függ a hematocritértéktől, mint kutyánál. Ez nem függ össze az eltérő aggregációval; patkányok vérében a sejtek elongációs értékei magasabbak voltak, tehát a különbséget ezzel nem lehetett magyarázni. Az átlagos corpuscularis haemoglobin tartalom embernél legmagasabb a vizsgálat fajok között és ez nem arányos a HTC értékkel.

Mi lehet ennek a magyarázata?

A centrifugálással előidézett mechanikus stress hatására osmolaritástól függő deformabilitás különbségeket találtak. Hogyan javulhat a deformabilitás alacsony osmolaritású közegben, ha a mechanikus ártalom általában rontja.?

Haemorheológiai adatok függése az állatok nemétől: A vérképben (HTC thrombocytaszám, fehérvérsejtszám) a patkányok és kutyák hímjei és nőstényeinek értékei között mérték szignifikáns különbségeket, ugyanekkor a vér plasma viscositás és a fibrinogen valamint a nyírófeszültség értékeiben nem volt a nemek között lényeges különbség. Az aggregációs indexek patkány nőstényeknél magasabbak voltak, kutyáknál pedig fordítva.

A gonadectomia a reológiai parameterekben elsősorban a nőstényekben éreztette hatását a műtét után 2 és 3 hónappal, a hímeknél a testosteron szint csökkenése lényeges hatást a kontrolok és a preoperatív értékekhez viszonyítva nem gyakorolt.

A gonadektomizált patkányokon még egy órás vétagischemiát is előidéztek. Ez – véleményem szerint nagy megterhelést okoz a kísérleti állatoknak, aminek a hatására számos élettani működés megváltozik, beleértve a reológiai parametereket is. A kísérlet tervezésének indoklását kérdezem. Mi volt a hipotézis? A nőstényeknél a reperfusio után az elongációs indexek szignifikánsan alacsonyabban voltak, a hímeknél a 3. postoperatív napon szignifikáns romlást regisztráltak, ami a 7. napra normalizálódott. A vörösvérsejt aggregatio mindkét nemhez tartozó gonadektómias csoportban emelkedett.

M. latissimus dorsi ischemia: Embernél az a. subscapularis látja el az izmot, ami az a. axillarisból ered. Az izmot valóban számos rekonstrukciós sebészi beavatkozásra használják, a kiesett izmok (m. pectoralis, radikális mellműtétek után vagy a váll és felkarizmok traumája) pótlására. Ezekben a beavatkozásokban az izom vér és idegellátásának megóvása a cél, hogy az anatómiától elütő fizikai célra is alkalmazható legyen. A vénás elvezetést is biztosítani kell. A modellkísérlethez kiválasztott kutyákat a 7. napon reoperálták és vért vettek ismét a vena thoracodorsalisból, az állatokat megölték és az izombiopsziás anyagot szövettani módszerrel feldolgozták. Egy órás ischemia után a reperfusio 5 percében már emelkedett HTC fokozatosan nőtt a 60. percig az ép oldali izomhoz viszonyítva. Az ischemiás lebenyben a 7. napra leukocita infiltráció, és nekrotikus jelenségek alakultak ki.

Ebből a vizsgálatból hiányoltam a szövettani metszetek képének közlését.

Hasonlóan tervezett a vékonybél ischemia és reperfusio vizsgálata patkányokon. A modell vizsgálatával megállapították, hogy a vvt deformabilitás romlott, az aggregatio fokozódott, a v. portae-ból vett mintákban.

Az aorta infra és suprarenalis szakasza leszorítása patkányokban a sebészi gyakorlat modellje, az embereken végzett érműtéteknél, és a vesedaganatok kezelése során. A műtéti helyzet és a prioritások (elsősorban az éren végzett beavatkozás és a graft behelyezésének lehetőség szerint rövid időtartama) nem engedik meg, hogy az ischemia által előidézett pathofiziológiai változásokat kövessék. Az ischemiássá tett szervek túlélését az arteriás –vénás PH csökkenés és a laktát emelkedés nyilvánvalóan befolyásolja. Az eredmények alapján a reperfusio időszakában mért magas értékekre kellene figyelni. A kísérletekben a vörösvérsejt deformabilitás romlott leginkább és az aggregáció kevésbé. A here ischemiás kísérletekben az általános keringési hatások is megjelentek. Az aggregatio fokozódott.

Az agyi hypoperfuzió hatását a az agyi anyagcsere fontosabb parametereire és a rheologiai tényezőkre hyperventiláció hypotonia és gyógyszerrel indukált hipertonia körülményei között fejlett technikai mérőeszközök felhasználásával elemezték fiatal patkányokon.

A hypotensió közel kétszeres sejt-tranzit idő emelkedést idézett elő, amit a szerző egyetlen megjegyzéssel a laktát emelkedés hatásának tulajdonít.

Kérdéseim:(1) elegendő-e a laktát emelkedés a rheologiai változások magyarázatára?

(2) mi indokolta, hogy ezeket a vizsgálatokat fiatal patkányokon végezték?.

A kísérleti módszerre vonatkozó kérdésem az, hogy ezekben a mérésekben az agyi perfusio csökkenése elérte-e az ischemia határát? Milyen mértékben csökkent a felszínen mért agykéreg átáramlás és mennyi volt az állatok arteriális vérnyomása? Próbálkoztak-e agyi eletromos tevékenység regisztrálásával ezekben a vizsgálatokban? Ugyanis az EEG elvezetése nélkül az agyi ischemia nem ítéhető meg. A válasz remélhetően rávilágít az agyi hypoxia és az ischemia agyi következményeinek különbségére.

Arterio-vénás shuntök hatása a haemorheologiai parameterekre: Itt az a kérdésem, hogy a shunt készítés (ami önmagában jelentős trauma az állatnak) és az egyik oldali a. carotis feláldozása vérnyomásmérésre nem másíthatja-e meg az eredményeket - feltéve, hogy a patkány agyféltekéinek vérellátása lateralizált, a nyúlhoz, tengerimalchoz és emberhez hasonlóan? Mennyi ideig maradnak „nyitva a shuntök?

Az érgraft kísérletekben kutyákon az egyik oldali a. femoralis egy szakaszát helyettesítették embernél is használt graft beültetésével. Ilyen kísérleti körülmények között széria-angiográfiás vizsgálatokat nem lehet végezni, és az ultrahang vizsgálatok kivitelezése is nehézséget jelent. Ezek nélkül azonban nem tudható pontosan, hogy mikor záródott el a graft - anticoaguláns kezelés ellenére. A postoperatív napokon (3. 7. és 14.) az elongációs indexek csökkentek és ezzel összefüggésben a nyírófeszültségek növekedtek. Angiografiás vagy ultrahang mérés nélkül is valószínű a szerző állítása, hogy a beültetett graftok egy-hét nap alatt elzáródnak. Állatok nagyobb tápláló erein bármilyen manipuláció ami a perfusiót csökkenti és az endothelt sérti, igen rövid idő alatt az ér elzáródásához vezet. Saját tapasztalatom, hogy az intracranialis erek számára előkészített graftok nyúl femoralisában 1 nap alatt trombotizáltak. A kollaterális keringés rágcsálókban és ragadozóknál is gyorsan kifejlődik, ezért tünetmentes az erek thrombosisa, ezt a disszertáns helyesen állapítja meg. Kutyák mindkét carotisát el lehet zárni, súlyosabb következmények nélkül.

A szerző maga említi a diszkusszióban, hogy az ischemia-perfusio modellekben a rheologiai parametereken felül számos más is vizsgálni kellene ahhoz, hogy a mért változók hatását a mikrocirkulációra meg lehessen határozni.

A veseischaemia kutyakísérletekben allopurinol praeischaemiás adása után a vvt aggregáció az 1-2. napon kivédhető volt. Erről a gyógyszerről azt tudjuk, hogy csökkenti a húgysavat köszvényben és vesebajokban, vagy cytostatikus kezelések szövődményei esetén. Adagolják még májbajokban, diabetesben keringési elégtelenségben, magas vérnyomás betegségben. Végül megtaláltam a szerző kísérleti használatának előzményét egy Pethő és mtsai 1991-es és azután 2007-es (a szerző által idézett) cikkben. Ezt a szert a mikrokeringés javításának céljával adják. A 90-es évek elején (Palmer et al, 1993) az allopurinol agyi ischaemiát kivédő hatásáról számoltak be, szintén patkánykísérletekben. Az gondolom, hogy a vegyület népszerűsítése a kutatásban Schmidt-Schönbein-nek köszönhető, azonban azóta sem tisztázódott a hatásmechanizmusa. Kérdezem, hogy a disszertáns mit tud erről.

A szerző az új megállapításai

a vérminták kezelésével és a vizsgálatok időpontjával kapcsolatban elfogadhatók.

Kimutatta, hogy az egyes állatfajokban a vérsejtek rheologiai tulajdonságai mind fiziológiás, mind kórélettani körülmények között eltérők lehetnek.

Az osmotikus gradiens vizsgálatában az alacsony nyírófeszültségen a vvt deformabilitás a vizsgált fajok között növekedett, ennek kifejezésére számított paramétereket használtak.

A sejtek mechanikus ártalma (itt a centrifugálás szolgált a mechanikus „stressz” kiváltására) a közeg ozmolaritásától függően befolyásolja a vvt deformabilitást.

Az állatok neme a deformabilitást befolyásolja, patkányoknál a nőstények, kutyáknál a hímek vvt-jének elongációs ideje jobb, de az utóbbiak sejtjei fokozottabban aggregálódnak.

A hasi aorta supra és infrarenalis leszorításának metabolikus hatása kifejezettebb volt, mint a rheológiai hatása.

A graft vizsgálatokban a vvt deformabilitás a thrombosis kialakulásának indikátora lehet – az emeberi gyógyító beavatkozások során is.

A disszertáns precíz vizsgálati körülmények között állatkísérletek alapján rheológiai standardokat hozott létre, amelyeket kívánatos a kutatólaboratóriumokban figyelembe venni. A szervek ischemiájával járó rheologiai eltérések a gyógyító gyakorlat számára is hasznos adatokat szolgáltatnak, ezzel kifejezték a keringésfiziológiai hatások elemzésének fontosságát. Publikációs aktivitása és felmutatott specialis szakértelme alapján javaslom a doktori értekezés nyilvános vitára bocsájtását.

Budapest, máj. 30, 2017.

Dr Szirmai Imre
egyetemi tanár
prof. emeritus
Semmelweis Egyetem
Neurológiai Klinika