

# Kísérleti eszközök és módszerek fejlesztése a hipoxia és annak sportra gyakorolt hatásának vizsgálatára

Doktori értekezés

**Bagó Marcell**

Testnevelési Egyetem  
Sporttudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Lacza Zsombor tudományos főmunkatárs, DSc

Hivatalos bírálók: Dr. Pavlik Gábor professor emeritus, DSc  
Dr. Holnapy Gergely egyetemi adjunktus, PhD

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Pavlik Gábor professor emeritus, DSc  
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Sós Csaba egyetemi tanár, PhD  
Dr. Sántha Hunor egyetemi docens, PhD

Budapest  
2021

# Tartalomjegyzék

<b>1</b>	<b>Rövidítések jegyzéke .....</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>Ábrák és táblázatok jegyzéke .....</b>	<b>6</b>
2.1	A dolgozatban található táblázatok jegyzéke .....	6
2.2	A dolgozatban található ábrák jegyzéke.....	6
<b>3</b>	<b>Bevezetés .....</b>	<b>8</b>
<b>3.1</b>	<b>Problémafelvetés .....</b>	<b>9</b>
3.1.1	<i>In vitro</i> iszkémia modell .....	10
3.1.2	<i>In vivo</i> iszkémia és hipoxia modell.....	12
<b>3.2</b>	<b>A hipoxiás kamrák áttekintése .....</b>	<b>13</b>
3.2.1	Hőmérséklet szabályozás.....	14
3.2.2	Páratartalom szabályozás.....	15
3.2.3	Szén-dioxid-szint .....	16
3.2.4	Oxigénszint.....	17
3.2.5	Fertőzés elleni védelem .....	17
3.2.6	Üzem módok .....	18
<b>3.3</b>	<b>Humán vizsgálatok .....</b>	<b>19</b>
3.3.1	Hipoxiás edzés módszerek.....	20
3.3.2	Apnea.....	21
<b>4</b>	<b>Hipotézisek.....</b>	<b>25</b>
<b>5</b>	<b>Célkitűzések.....</b>	<b>26</b>
<b>6</b>	<b>Módszerek.....</b>	<b>28</b>
<b>6.1</b>	<b>Oxigén-glükóz deprivációs modell, eszköze fejlesztés .....</b>	<b>28</b>
6.1.1	Termoelektromos elem fogalma.....	29
6.1.2	Kamraméretezés .....	29
6.1.3	Disszipált hő .....	34
6.1.4	Hőmérséklet szabályozás.....	34
6.1.5	Gázáramlás .....	35
6.1.6	Oxigén szenzor .....	36
6.1.7	Vezérlés .....	38
6.1.8	Moduláris felépítés .....	38
6.1.9	Szövetkultúra .....	39

6.1.9.1	<i>Izoláció</i> .....	39
6.1.9.2	<i>Növesztés</i> .....	40
6.1.10	Kísérletindítás.....	40
6.1.11	Szövet viabilitás mérés.....	40
<b>6.2</b>	<b>Alvási apnoe modell (OSA), eszközfejlesztés</b> .....	<b>41</b>
6.2.1	Kamraválasztás.....	42
6.2.2	Pneumatika.....	42
6.2.3	Elektronika.....	46
6.2.4	Vezérlés.....	49
6.2.5	PID szabályzó.....	50
6.2.6	Állatok.....	52
6.2.6.1	<i>TLR2 receptor</i> .....	52
6.2.7	Használati protokoll.....	53
<b>6.3</b>	<b>Hipoxia tűrőképesség</b> .....	<b>53</b>
6.3.1	Csoportok meghatározása.....	54
6.3.2	A csoportok apnea teljesítménye.....	54
6.3.3	Élettani vizsgálatok képalkotó módszerekkel.....	56
6.3.3.1	<i>Ultrahang</i> .....	56
6.3.3.2	<i>Mágneses rezonancia</i> .....	57
6.3.3.3	<i>Elasztográfia</i> .....	57
6.3.4	Spirometriai vizsgálat.....	58
<b>6.4</b>	<b>Statisztikai módszerek</b> .....	<b>58</b>
<b>6.5</b>	<b>Kutatásetikai engedélyszámok</b> .....	<b>58</b>
<b>7</b>	<b>Eredmények</b> .....	<b>59</b>
<b>7.1</b>	<b>OGD modell</b> .....	<b>59</b>
7.1.1	Műszaki paraméterek.....	59
7.1.2	<i>In vitro</i> OGD eredmények.....	61
<b>7.2</b>	<b>Obstruktív alvási apnoe modell</b> .....	<b>62</b>
7.2.1	Műszaki paraméterek tesztelése (OSA).....	62
7.2.2	Biolumineszcens kiértékelés.....	64
<b>7.3</b>	<b>Hipoxia tűrőképesség</b> .....	<b>64</b>
7.3.1	Statikus apnea.....	64
7.3.2	Dinamikus apnea.....	66

7.3.3	Ultrahang vizsgálat.....	67
7.3.4	Mágneses rezonancia vizsgálat.....	68
7.3.5	Elasztográfia.....	70
7.3.6	Spirometria.....	71
<b>8</b>	<b>Megbeszélés.....</b>	<b>73</b>
8.1	Oxigén-glükóz depriváció.....	73
8.2	Obstruktív alvási apnoe.....	78
8.3	Hipoxia tűrőképesség.....	84
<b>9</b>	<b>Következtetések.....</b>	<b>94</b>
<b>10</b>	<b>Összefoglalás.....</b>	<b>97</b>
<b>11</b>	<b>Summary.....</b>	<b>99</b>
<b>12</b>	<b>Irodalomjegyzék.....</b>	<b>101</b>
<b>13</b>	<b>Saját publikációk jegyzéke.....</b>	<b>119</b>
13.1	A dolgozathoz kapcsolódó saját publikációk: .....	119
13.2	A dolgozattól független saját publikációk: .....	119
<b>14</b>	<b>Köszönetnyilvánítás .....</b>	<b>120</b>
<b>15</b>	<b>Függelék .....</b>	<b>122</b>

# 1 Rövidítések jegyzéke

$\Delta T$  – Hőmérséklet különbség

ADC – Analóg-digitális átalakító (*Analog-to-digital converter*)

c – Fajhő

CIBR – Horvát Agykutató Intézet (*Croatian Institute for Brain Research*)

COP – Teljesítmény együttható (*Coefficient of performance*)

CTRL – Kontrol

DAC – Digitális-analóg átalakító (*Digital-to-analogue converter*)

DC-DC konverter – Egyenfeszültség átalakító eszköz

DMEM – Szövettenyésztő oldat (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

FBS – Magzati borjú savó (*Fetal bovine serum*)

FPGA – Programozható logikai kapumátrix (*Field-programmable gate array*)

FVC – Erőltetett kilégzési vitálkapacitás (*Forced vital capacity*)

GFP – Zölden fluoreszkáló fehérje (*Green fluorescent protein*)

HEPA – Nagy hatékonyságú részecskeszűrő (*High-efficiency particulate arrestance filter*)

HIF – Hipoxia indukálta faktor (*Hypoxia-inducible factor*)

IH – Szakaszos hipoxia (*Intermittent hypoxia*)

IP – Nemzetközi védettség jelölés (*International protection marking*)

IR – Infravörös (*Infrared*)

LDH – Laktát dehidrogenáz

Luc – Luciferáz enzim

m – Tömeg

MCAO – Artéria cerebri media elzáródás (*Medial cerebral artery occlusion*)

MRI – Mágneses rezonancia képalkotás (*Magnetic resonance imaging*)

MTT – Kolorimetriás sejtleletkéesség teszt (MTT Colorimetric Tetrazolium Assay)

n – Esetszám

Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATP-áz – Nátrium-kálium adenozin trifoszfátáz

OGD – Oxigén-glükóz megvonás (*Oxygen-glucose deprivation*)

OSA – Alvási apnoe (*Obstructive sleep apnoea*)

P – Teljesítmény

PID – Proporciónális integráló-deriváló folyamatszabályzó típus

Q – Hőmennyiség

RPM – Fordulatszám (*Revolutions per minute*)

SpO<sub>2</sub> – Perifériás kapilláris oxigénszaturáció

t – idő

TLR2 – Toll like receptor 2, egy membrán protein

UH – Ultrahang

UV – Ultraibolya (*Ultraviolet*)

V – Térfogat

VC – Vitálkapacitás (*Vital capacity*)

VHDL – Hardver leíró nyelv (*VHSIC Hardware Description Language*)

XTT – Kolorimetriás sejtleletkéesség teszt (XTT cell proliferation assay)

$\varphi$  – Sűrűség

## 2 Ábrák és táblázatok jegyzéke

### 2.1 A dolgozatban található táblázatok jegyzéke

<b>1. táblázat</b>	Az AIDA és CMAS rendszerek által elfogadott versenyszámok összesítő táblázata a mért paraméterek és a felhasználható felszerelés alapján.	22
<b>2. táblázat</b>	Hűtőrendszerek hatékonysága.	28
<b>3. táblázat</b>	Hűtőrendszer paraméterek összehasonlítása a fejlesztéshez rendelkezésre álló források alapján.	29
<b>4. táblázat</b>	Lép térfogatváltozás statikus apnea közben.	67

### 2.2 A dolgozatban található ábrák jegyzéke

<b>1. ábra</b>	<i>Az iszkémiás-reperfúziós sérülés folyamata.</i>	10
<b>2. ábra</b>	<i>OGD kamra.</i>	30
<b>3. ábra</b>	<i>A standard sejttenyésztő edény méretei.</i>	31
<b>4. ábra</b>	<i>A TEC-12710 típusú Peltier-modul adatlapja.</i>	33
<b>5. ábra</b>	<i>Pneumatikai hangtompító.</i>	35
<b>6. ábra</b>	<i>Az OGD rendszer blokk vázlat.</i>	35
<b>7. ábra</b>	<i>Az oxigénkoncentráció kijelzése.</i>	36
<b>8. ábra</b>	<i>Az oxigénszint kijelző áramkör tervezett működése.</i>	37
<b>9. ábra</b>	<i>Az OGD modell.</i>	38
<b>10. ábra</b>	<i>Az OGD protokoll időbeli lefutása.</i>	40
<b>11. ábra</b>	<i>Az OSA modellhez számított oxigén koncentráció értékek a nitrogén áramlás függvényében.</i>	42
<b>12. ábra</b>	<i>Az obstruktív alvási apnoe modell pneumatikai felépítése.</i>	44
<b>13. ábra</b>	<i>Az obstruktív alvási apnoe modell elektronikai felépítése.</i>	45
<b>14. ábra</b>	<i>Az obstruktív alvási apnoe modellt irányító FPGA fejlesztőkártya.</i>	47
<b>15. ábra</b>	<i>A proporcionális szelepeket meghajtó erősítő.</i>	47
<b>16. ábra</b>	<i>Az oxigénszenzorok tápellátása és a szenzor feszültség előállítása.</i>	48

<b>17. ábra</b>	<i>A szelepek vezérlő jelét előállító szabályzó működési elve.</i>	50
<b>18. ábra</b>	<i>A megvalósult obstruktív alvási apnoe modell.</i>	50
<b>19. ábra</b>	<i>A statikus apnea teljesítménymérés során alkalmazott protokoll.</i>	54
<b>20. ábra</b>	<i>Az OGD kamra oxigénkoncentráció változása a kísérlet indításakor.</i>	59
<b>21. ábra</b>	<i>A kamra és a tenyésztő oldat hőmérsékletváltozása hűtés esetén.</i>	59
<b>22. ábra</b>	<i>A kamra és a tenyésztő oldat hőmérsékletváltozása fűtés esetén.</i>	60
<b>23. ábra</b>	<i>A csontszövet iszkémia tűrőképessége 37 és 4 °C hőmérsékleten.</i>	61
<b>24. ábra</b>	<i>Az OSA modell oxigén koncentráció karakterisztikája.</i>	62
<b>25. ábra</b>	<i>Az obstruktív alvási apnoe kísérlet biolumineszcens kiértékelése.</i>	63
<b>26. ábra</b>	<i>Statikus apnea teljesítmény.</i>	64
<b>27. ábra</b>	<i>Véroxigén szint változás statikus apnea közben.</i>	64
<b>28. ábra</b>	<i>A véroxigén szint változás mintázata statikus apnea közben.</i>	65
<b>29. ábra</b>	<i>Dinamikus apnea.</i>	66
<b>30. ábra</b>	<i>Az ultrahang vizsgálat során mért relatív hílushossz és -átmérő (lépkaputól a lép konvexitására mért átmérő) értékek.</i>	66
<b>31. ábra</b>	<i>A bűvár és a kontroll csoportnál mért térfogatváltozási adatok.</i>	68
<b>32. ábra</b>	<i>Lép volumetria az MR felvételek alapján.</i>	68
<b>33. ábra</b>	<i>A lép rugalmasság vizsgálata során mért adatok.</i>	69
<b>34. ábra</b>	<i>Elasztográfiás felvétel statikus apnea közben.</i>	69
<b>35. ábra</b>	<i>Spirometriai eredmények.</i>	70



### 3 Bevezetés

A dolgozatban bemutatott kutatás témája több tudományágat érint. A sportvonatkozások mellett mérnöki fejlesztések és orvosi célú kísérletek is bemutatásra kerülnek. A munka egyik alapvető célja, olyan eszközök és protokollok kialakítása, amelyek alapját képezhetik más, speciálisabb célú vizsgálatoknak is. A tapasztalatok alapján sok esetben hátráltató tényező az eszközhány (Lányi és mtsai 2007). Fejlesztésre, illetve beszerzésre általában nincs elegendő forrás. Ehhez hasonló akadályok megoldása lehetne az adott téma moduláris felosztása, akár több különböző képzést, egyetemet bevonva. A doktori munka során megvalósított hideg iszkémia- és szakaszos hipoxia kamrák erre kiváló példát nyújtanak. A kutatások több fázisban vizsgálták a hipoxiás, illetve iszkémiás állapotok hatását. Elsőként egy hűtött iszkémia modellt alakítottunk ki, majd teszteltünk állati eredetű csontszövetek felhasználásával. Ezt követően *in vivo* állatkísérletben tanulmányoztuk a szakaszos hipoxiának kitett egerek agyszövetében bekövetkező stresszhatást. Végül, a munka utolsó szakaszában, humán mérésekkel kerestük azokat az élettani paramétereket, amelyek hatással vannak a hipoxia tűrőképességre.

Későbbi gyakorlati felhasználást tekintve a kutatás egyik célja, hogy – például transzplantáció esetén – növeljük az egyes szervek iszkémiás idejét, illetve olyan sérüléseknél, amelyek iszkémiás állapotot okoznak (stroke, infarktus) a penumbra sejtek regenerációját elősegítsük, és ezzel minimalizáljuk az iszkémia, illetve hipoxia által okozott szövetkárosodást. Az egészségügyi vonatkozásokon felül a sportteljesítmény és a hipoxia összefüggése is a dolgozat témája.

A megoldandó feladatok sok részből tevődtek össze, így nélkülözhetetlen, hogy a kapcsolódó alapfogalmak tárgyalásra kerüljenek. A további fejezetek bemutatják a kutatómunka főbb részeit érintő fogalmakat, illetve a modellek kidolgozása közben alkalmazott megfontolásokat, ismertetik az iszkémiás sérüléseket és azok következményeit.

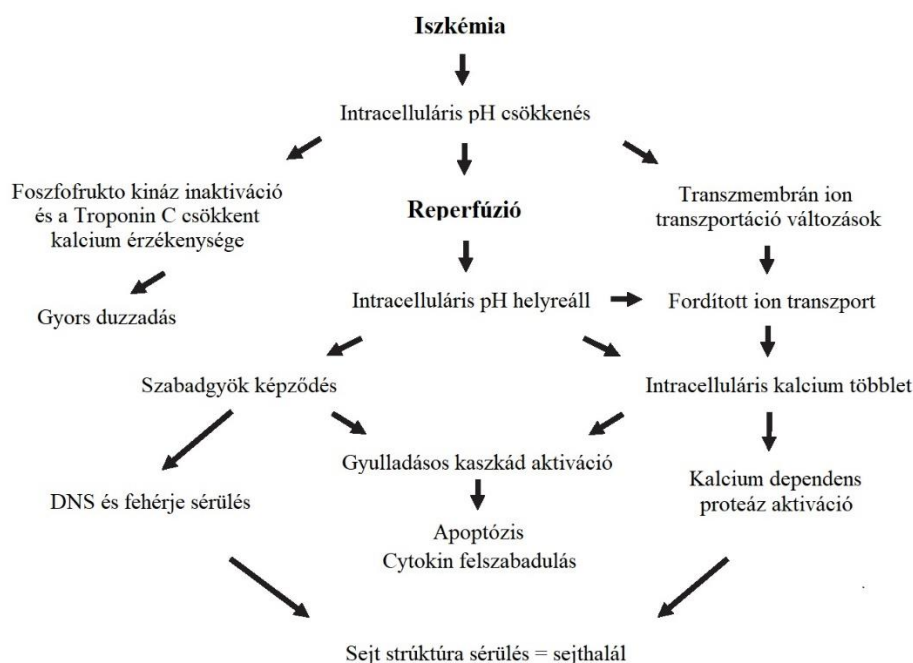
### 3.1 Problémafelvetés

A vérellátási zavarból eredő halálozási okokat gyakoriságuk miatt sejt, szövet és állatmodellek széles körében vizsgálják (Eurostat 2019). Az Európai Unióban 2016-ban több mint 1,8 millió ember hunyt el szívroham vagy az agyat érintő iszkémiás elváltozás miatt. Szerencsére a szám évről évre csökken az egyre fejlettebb prevenciók és ellátási rendszernek köszönhetően, de Magyarország még mindig a halálozási listák élén van a többi Uniói országhoz képest. Ezek alapján kiemelten fontos a keringési rendszert érintő elváltozásokból eredő károsodások megfelelő vizsgálata. Ebben nyújtanak segítséget azon kísérleti modellek, amelyek sejt, szövet vagy szerv szinten teszik elérhetővé a hipoxia és iszkémia vizsgálatát.

Iszkémiáról akkor beszélünk, ha valamilyen oknál fogva csökken, vagy teljesen megszűnik a szövetek vérellátása. Ebben az esetben a sejtek nem jutnak elegendő mennyiségű oxigénhez és glükózhhoz. A vérellátás csökkenését követően iszkémiás kaskádnak nevezett folyamatlánc indul el, amely egymást követő lépések során a sejtek metabolizmusának leállításához, vagyis sejtpusztuláshoz vezet (Sontheimer 2015). Ilyen zavarokat okozhat például az ateroszklerózis (Teiger és Castaigne 1999), a hipoglikémia (Desouza és mtsai 2003) vagy az embólia (Lyaker és mtsai 2013). A különböző típusú sejtek eltérő mértékben képesek tolerálni ezt az állapotot (Siemionow és Arslan 2004). Erősen aerob szövetek esetén, mint például az agy vagy a szív, akár néhány perc elteltével végleges károsodást okozhat az iszkémiás állapot (Lee és mtsai 2000, Pflugfelder és mtsai 1991). A károsodás sebessége csökkenthető, ha a sejtek test hőmérséklet alá hűlnek, mivel ekkor a metabolikus folyamatok jelentősen lelassulnak (Schulte 2015).

Az oxigén- és a tápanyaghiánnyal szembeni érzékenység fontos tényező a transzplantációs eseteknél is. Az egyes szervek károsodásának mértékét az iszkémiás idővel jellemzik. Az adott szerv csak akkor transzplantálható, ha nem lépte túl a hozzá tartozó iszkémiás időt (Watson és Dark 2012). A reperfüzió tovább növelheti a sérülés mértékét az iszkémiás állapot megszűnése után (Cowled és Fitridge 2011). Ennek oka, hogy az iszkémia ideje alatt hipoxiássá vált sejtekben a hirtelen reoxigenizáció nagymértékű enzimef szabadulással jár, az iszkémiás metabolitok kimosódnak és

szabad gyökök képződnek, amelyek végül szerkezeti károsodást okoznak (1. ábra) (Sanada 2011).



**1. ábra** Az iszkémiás-reperfúziós sérülés folyamata. Az ábra az iszkémia hatására bekövetkező sejtszintű folyamatokat mutatja be, ami a reperfúziót követően sejthalálhoz vezet (Sanada 2011)

### 3.1.1 *In vitro* iszkémia modell

Az oxigén-glükóz depriváció (OGD) széleskörben alkalmazott *in vitro* eljárás, amely többek közt alkalmas sejtszintű iszkémia és hipoxia (Meloni és mtsai 2011), hipoxiás előkondicionálás (Kanazawa és mtsai 2017), gyulladással kapcsolatos folyamatok (Kong és mtsai 2014), infarktus (Yang és mtsai 2018), stroke (Holloway és Gavins 2015), angiogenezis (Wang és mtsai 2015), hipoxémia, anaemia, oxidatív stressz vizsgálatokra (Almeida és mtsai 2002).

Az eljárás népszerűségét jól mutatja, hogy a PubMed keresője több mint 7 ezer találatot ad az „oxygen glucose deprivation” kifejezésre. Ha a kereséshez hozzávesszük a „neuron” vagy „brain” szavakat, akkor 6000, illetve 6500 találatot kapunk. Ez azt jelenti, hogy az OGD kutatások jelentős része idegsejtek, illetve idegi funkciók vizsgálatára fókuszál.

A protokoll két alapvető paramétert határoz meg: glükózmentes tenyésztő oldat és oxigénmentes környezet (<0,5%) (Cselenyák és mtsai 2010). A kétdimenziós

sejtkultúra használatának előnye, hogy akár szubcelluláris szinten figyelhető meg a reakciók, hátránya, hogy kevésbé modellezi jól az *in vivo* 3 dimenziós körülményeket (Kapalczyńska és mtsai 2018). A reakciók megfigyelésén kívül a modell segítségével különböző hatóanyagok vizsgálata is lehetővé válik.

Az iszkémia testhőmérsékleten széles körben vizsgált folyamat. (Kerrigan és Stotland 1993) Ezzel szemben a hideg iszkémia kevésbé dokumentált jelenség, amelynek két orvosi területen is fontos jelentősége van:

1. iszkémia-reperfúzió kezelése, ahol a hűtést már alkalmazzák újszülöttek esetében (Seetha 2009, Lemyre és Chau 2018, Gulczynska és mtsai 2019)
2. transzplantált szövetek és szervek konzerválása, amelyeket a beültetésig hűtve tárolnak, ezzel csökkentve a károsodás mértékét (Guibert és mtsai 2011)

Az alacsony hőmérséklet iszkémiás szövetekre gyakorolt hatása a testhőmérsékleten végzett iszkémiához képest kevésbé vizsgált tudományterület, ugyanakkor a mindennapos orvosi beavatkozások között szerepel, ezért több tudományos ismeretre van szükség a megértéséhez.

A hideg iszkémiáról rendelkezésre álló legtöbb tudományos irodalom a szervek vagy szövetek 4 °C-on történő szállítása közben bekövetkező hatásokat vizsgálja (Simpkins és mtsai 2007, Totsuka és mtsai 2002). Az iszkémiás idő hűtéssel meghosszabbítható, mivel csökkenti a sejtek anyagcseréjét és az oxigénigényt (Francel és mtsai 1992). Másfelől az alacsony hőmérséklet károsítja is a szöveteket, mivel megváltoztatja a sejtjellemzőket, például a metabolikus utakat és befolyásolja a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATP-áz működését.

A szövetek transzplantációja kevésbé ismert, de gyakoribb, mint a hasonló körülmények között történő szervátültetés. A vér után a csont az egyik leginkább transzplantált szövet évente körülbelül 2 millió eljárással, és egyre növekszik a kereslet a graftok iránt, pl. fogászati vagy ízületi pótlásokhoz (Schandl és mtsai 2016). Az egyéb szövetekre, szervekre is nagy igény van, évről évre nő a transzplantációs várólistán lévők száma (Organdonor 2020). Így egyre fontosabbá válik az élő szövet minél jobb

megőrzése és hatékony szállítása. A szervtartósítási protokollok fejlődése mára lehetővé tették a kiváló minőségű funkcionális szervek szállítását (Guibert és mtsai 2011).

### **3.1.2 *In vivo* iszkémia és hipoxia modell**

A sejt és szövetszintű *in vitro* modelleken kívül *in vivo* állatkísérletek is vizsgálják az iszkémia, illetve a hipoxiás környezet szervezetre gyakorolt hatását. A módszer előnye, hogy lehetőség nyílik, teljes szervek tanulmányozására, amely modellezi az emberi szervezetben zajló folyamatokat is. Az állatkísérletes modellek főleg agyra gyakorolt hatást, illetve tumor oxigenizációs folyamatokat vizsgálnak (De Bruycker és mtsai 2018). Az egyik leggyakrabban használt eljárás az artéria cerebri média okklúzió (MCAO) patkányokban és egerekben (Dobrivojević és mtsai 2013, Shimizu és mtsai 2002). A módszert stroke modellként alkalmazzák, amely lehetővé teszi, hogy a különböző mértékű iszkémiás károsodások hatását megfigyeljük. A módszer hátránya, hogy invazív, valamint nagy gyakorlatot és szakértelmet kíván a kutatótól.

Léteznek azonban noninvazív vizsgálatok is, amelyek szintén alkalmasak az agyi expozíció tanulmányozására. Egyes beszámolók szerint az alvási apnoe a kardiovaszkuláris betegségek, mint például a szisztémás és pulmonális hipertónia, pangásos szívelégtelenség és a stroke egyik fő, független kockázati tényezője (Kent és mtsai 2011).

Ezzel szemben, az enyhe alvási apnoe kedvező előkondicionáló hatású lehet a cerebrovaszkuláris betegség kapcsán (Rosenzweig és mtsai 2014), de ide sorolható még a miokardiális infarktus, cerebrovaszkuláris diszfunkció és idiopátiás hirtelen halál is (Bradley és Floras 2009). Az alvási apnoe (OSA – Obstructive Sleep Apnoea) egy krónikus, széles körben alul diagnosztizált állapot, amelyet az alvási fázisok megzavarása és a légzés rövid leállása miatti időszakos (szakaszos) hipoxia jellemez. Az OSA a középkorú és az idősebb korosztályt érinti: becslések szerint az előfordulás mértéke körülbelül 22% férfiaknál és 17% nőknél (Franklin és Lindberg 2015).

Az alvási apnoe és a különféle klinikai rendellenességek közötti kapcsolat megértéséhez olyan állatkísérletes modellre van szükség, amely a lehető legpontosabban szimulálja az alvási apnoe állapotát, hogy tisztázza mind a következményeket, mind a lehetséges terápiás stratégiákat. A rendelkezésre álló jelenlegi rendszerek közül a

legtöbb drága vagy terjedelmes. Annak ellenére, hogy alkalmasak egyedi igényeknek megfelelő hipoxiás mintázat kialakítására méretüknél fogva túl lassúak ahhoz, hogy a kívánt oxigénszinteket az előírt idő alatt elérjék pl.: BioSpherix kamrák (Silva és Schreihofner 2011). Ezért nem elég pontosak a kísérleti protokollok meghatározásához, amelyek lehetővé teszik az enyhe, közepes és súlyos alvási apnoe közötti finom különbségek tanulmányozását. Ezen felül, gyakran előfordul, hogy a rendszer nem kompatibilis az állatok eredeti ketrecével, így mozgatni kell őket, ami fokozhatja az állatok stressz szintjét és ezzel befolyásolhatja a vizsgálat eredményét.

### **3.2 A hipoxiás kamrák áttekintése**

Egy hipoxiás kamra valójában egy olyan inkubátor, amelyben az oxigénkoncentráció 0,5% alá csökkenthető. Azonban van néhány olyan változó, amelyek kritikus hatással lehetnek a vizsgált mintára. Ennek alapján lényeges kérdés, hogy mekkora kamráról és milyen jellegű kutatásról van szó.

A piacon számos labortechnikai és egyéb profilú cég kínál különböző megoldásokat hipoxiás környezet kialakítására. A legszélesebb palettával a BioSpherix és a Coy Laboratories cégek rendelkeznek (BioSpherix 2019, CoyLab 2019). Termékeik között megtalálhatók kisméretű hipoxiás kamrák (Hypoxia incubator subchamber), de elérhetők zárt, aszeptikus, kesztyűs szekrényben kialakított, beépített mikroszkóppal rendelkező komplett munkaállomások is. A termékek egymással teljes mértékben kompatibilisek, számos kombináció kialakítására alkalmasak. Ennek köszönhetően a Google Scholar keresőjében több mint 2000 olyan találat adódik, ahol ezeket a termékeket használták a hipoxiás környezet előállítására.

Billups-Rothenberg Inc. a fenti példákhoz képest egy sokkal egyszerűbb terméket hozott létre a Modular Incubator Chamber (MIC-101) formájában (Billups-Rothenberg Inc. 2018). Egy polikarbonát dobozról van szó, amely megfelelő szigeteléssel és két gázáramoltatásra való csomaggal van ellátva. Bármilyen sejt kultúrás edénnyel lehet használni (különböző tenyésztő lemezek, flaskák, Petri-csészék). Külön gázkeverő modullal 0-25% között szabályozható az oxigéntartalom. Ezen kívül kérhető CO<sub>2</sub> (0-20%), páramérő (0-100%), hőmérő (-40-125 °C) és nyomásmérő modul. A páratartalom

fenntartását a kamrában elhelyezhető víztartály biztosítja. Az eszköz közel 100 közleményben szerepel.

A fejezet elején megfogalmazott definícióhoz talán a ThermoFisher Scientific által gyártott Trigas Incubator készülék áll a legközelebb (Thermofisher 2019). Egy már meglévő inkubátor technológiát és terméket egészítettek ki úgy, hogy alkalmas legyen 1-14% oxigénkoncentráció fenntartására. Ebben az esetben inkább a különböző sejtek növesztését elősegítő környezetről van szó, mint valódi hipoxiás kamráról. Sok esetben az alacsony oxigénszint gyorsítja a sejtek fejlődését, tovább élnek és kevesebb stresszhatás figyelhető meg (Wenger és mtsai 2015).

Az Oxford Optronix Ltd. HypoxyLab™ Hypoxia Workstation terméke mindenképp említést igényel (Oxford Optronix 2019). Teljeskörű, zárt rendszerről van szó, amelyet kesztyűs szekrénybe alakítanak ki. Az egyetlen olyan kamra a piacon, amiben szabályozzák az oxigén parciális nyomását. Saját mérőeszközükkel képesek az oldott oxigénkoncentráció figyelésre is.

Végül, de nem utolsó sorban az általunk korábban használt kamrát is tárgyaljuk. A Pecon GmbH cég által gyártott rendszer egy moduláris inkubátor (Pecon 2019). Ezzel a megoldással valós idejű, mikroszkópos megfigyelésre is lehetőség van. A cég külön kínál O<sub>2</sub>, illetve CO<sub>2</sub> vezérlő modult, amellyel a kamra hipoxiás állapot vizsgálatára is alkalmas. Önálló rendszer, nem igényel külső inkubátort. Testhőmérsékleten és 0-21% oxigén közötti tartományban használható.

Az említett eszközök három nagy kategóriába sorolhatók: egyszerű kamrák, amelyek kiegészítőkkkel együtt működnek; önálló berendezések; moduláris, speciális egyedi igényre szabható laborpark. Látható, hogy a választék igen széles és az egyes berendezések által kínált funkciók is ennek mintájára változnak. Ennek ellenére van néhány olyan alapelvárás, amelyeknek minden esetben meg kell felelni.

### **3.2.1 Hőmérséklet szabályozás**

*In vitro* mérések esetén sejt, illetve szövetkultúrák életképessége szempontjából kritikus a megfelelő hőmérséklet szinten tartása. Ideális esetben ez a testhőmérséklet értéke, 37 °C (Watanabe és Okada 1967). Speciális témaválasztásnál természetesen ettől

el lehet térni. Optimális esetben a kamra előfűtött állapotban fogadja a mintákat és a folyamat közben végig zárt a rendszer. Sok olyan hipoxiás kamra létezik a piacon, amelyek önmagukban nem biztosítanak fűtési lehetőséget, használatuk inkubátor szekrényhez kötött. Ennek előnye, hogy maga az eszköz egyszerűbb, kisebb akár olcsóbb is lehet. Hátránya, hogy inkubátorra van szükség, ami általában drága, nagyméretű és közös használatban van így nem feltétlen biztosított a kísérlet zavartalan menete.

A folyamatos ajtónyitás a hőmérsékletingadozás mellett jelentős CO<sub>2</sub> változásokat okoz, amely befolyásolhatja a minták állapotát (Zhou és mtsai 2009, ESBE Scientific 2016). Ezen felül, ha keringetésre van szükség, akkor az inkubátoron szükséges be és kimeneti nyílást biztosítani, vagy olyan rendszert használni, amely teljes egészében az inkubátorba helyezhető. Léteznek olyan inkubátor szekrények, ahol a polcok külön zárható rendszerűek, illetve a kísérlet érdekében további megoldást jelenthet a dedikált, csak hipoxiás kísérletre használt inkubátor alkalmazása.

További fontos szempont, hogy a minták ne legyenek kitéve közvetlen hőhatásnak. Megfontolandó, hogy a hőmérséklet csökkenése jelentősen növeli az oxigén oldhatóságát. A kutatásaink során vizsgált hőmérséklet tartományban közel duplájára nő az oldott oxigénkoncentrációja (Walczynska és Sobczyk 2017).

### **3.2.2 Páratartalom szabályozás**

A hipoxiás kamrák kivétel nélkül valamilyen mesterséges, sűrített forrásból származó gázzal működnek (kompresszor által sűrített levegő, sűrített nitrogén stb.). Közös jellemzője ezen forrásoknak, hogy a nagy nyomás miatt minimális páratartalommal rendelkeznek (Engineering ToolBox 2008). Kritikus fontosságú az átáramló gáz megfelelő páratartalmának biztosítása, hogy elkerülhető legyen a minták kiszáradása. Párásítás nélkül a száraz, keringetett gáz a minták nedvességtartalmát fogja felvenni, emiatt a szövettenyésztő oldat (továbbiakban: médium) relatív összetétele változik, amely torzítja a kísérleti eredményeket, vagy esetleg a minták kiszáradásához vezet. Tenyésztő lemez esetén a külső perem és a sarkok a legkritikusabbak. Ezekre a pontokon akár 15-20% is lehet a páratartalom veszteség (Evoluted New Media 2011, Wagener és Plennevaux 2014). Az újabb tenyésztő lemezekben (96 lyuk) a lemez kerete



mentén kialakítottak egy sávot, amely tenyésztő oldattal vagy vízzel feltöltve védi a szélső helyzetben lévő mintákat (YouTube 2016). Bizonyos kamrák úgy védekeznek a jelenség ellen, hogy nem használnak folyamatos gázkeringetést. Néhány perc átöblítést követően lezárják a csapokat, és a szigetelés tartja fent az alacsony oxigénkoncentrációt (Billups-Rothenberg, Inc. MIC-101).

Nagyobb inkubátor szekrények vízzel teli tálcát alkalmaznak, amely párolgása biztosítja a szükséges nedvességet. Kisebb, inkubátor független rendszerekben gyakori megoldás a buborékoltatás. Egy úgynevezett horzsakövet tesznek a gázáramlás útjába, amelyet vízbe merítenek. A kő apró pórusai nagy felületen osztják szét az áramló gázt, ami heves buborékolással jár. Ez fokozza a párolgást, amit végül az áramló gáz elszállít a rendszerben. Az újabb inkubátorok már figyelik a vízszintet és jeleznek, ha utántöltés szükséges.

### **3.2.3 Szén-dioxid-szint**

A  $\text{CO}_2$  szerepet játszik a sejt/szövetkultúrák normál kémhatás (pH) tartományának fenntartásában (Lo és mtsai 1994). A kamrák/inkubátorok sűrített  $\text{CO}_2$  forrásból szenzor és vezérelhető szelep segítségével tartják fenn a kívánt értéket. Túl sok  $\text{CO}_2$  savas, túl kevés lúgos hatást eredményez. A szenzor kiválasztása kritikus az ilyen rendszerekben. A magas páratartalom és hőmérséklet befolyásolhatja a szenzor érzékenységét és torzítja a mért értéket. Két fő típust alkalmaznak hővezetési (hőellenállás) és infra (IR)  $\text{CO}_2$  szenzor (Hartmann és Wagener 2019). Az első olcsóbb, de pontatlanabb is. Nagyon érzékeny a hőmérsékletváltozásra, amíg az nem tökéletesen stabil, addig értékelhetetlen a mérés (Zheng és mtsai 2002). Olyan esetekben használható, ahol hosszútávú inkubációról beszélünk. Az IR szenzor a  $\text{CO}_2$ -ra specifikus spektrumban méri az áteresztett fény mennyiségét. Minél több  $\text{CO}_2$  van, annál kevesebb fény jut át a gázkeveréken. Nagy előnye, hogy nem függ a hőmérséklettől és páratartalomtól. Újabb változatokban úgynevezett single- és dual beam szenzorokat alkalmaznak. Előbbi levegőt használ a kalibrációra adott időszakonként, míg utóbbi képes valós időben, leállítás nélkül megtenni a beállítást.

### 3.2.4 Oxigénszint

A kísérletek során alkalmazott oxigénkoncentráció függ a vizsgált paramétertől, illetve a sejtek, szövetek típusától. Bizonyos sejtek már 5% oxigénszint esetén hipoxiás állapotba kerülnek, míg más típusoknál ez 1% alatt következik be (Wu és Yotnda 2011). Az oxigén érzékenység összefügg a szöveti perfúzióval, így az agy és a szív sokkal hamarabb reagál a hipoxiás környezetre, mint a csont, amely esetében 1%-os oxigéntartalom mellett még 5 nap elteltével is mérhető a sejtaktivitás (Volkmer és mtsai 2008).

A fentiek, illetve az irodalmi közleményekben (Cselenyák és mtsai 2010, Ryou és Mallet 2018, Webster és mtsai 1995) szereplő OGD protokollok alapján az általunk alkalmazott OGD modellben 0,5% maximális O<sub>2</sub>-koncentrációt határoztunk meg. Az oxigén mennyiség a hipoxiás kísérletek fő paramétere, így elengedhetetlen, hogy ne legyen folyamatos visszajelzés az értékről a kísérlet teljes ideje alatt. A szenzor megválasztását a CO<sub>2</sub> részben leírtak szerint kell végezni, hasonló szempontok alapján. Pára, nyomás, hőmérséklet és gáz szelektivitási tulajdonságokat (N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, illetve állatkísérletek esetén altató gázok stb.) kell elemezni a megfelelő típus kiválasztásához. A Coy Laboratories termékei például nitrogén helyett hidrogént használnak az oxigénszint szabályozáshoz. A kalibrációt száraz levegővel a gyártó által javasolt hőmérsékleten végzik. Az inkubációhoz használt gázkeverék többlet vízgőzt és CO<sub>2</sub>-t tartalmaz, Place és munkatársainak számításai szerint ilyen esetben a valós oxigénkoncentráció a normál 20,95% helyett 18,6%-ra csökken (Place és mtsai 2017). Amennyiben csak OGD mérésre használjuk a kamrát, elegendő a monitorozás. Ha beállítható O<sub>2</sub>-szintet szeretnénk, akkor beavatkozó elemekre, úgynevezett aktuátorokra és vezérlő egységre is szükség lesz.

### 3.2.5 Fertőzés elleni védelem

Fontos, hogy a rendszert fertőtleníteni lehessen (UV, magas hőmérséklet, alkohol, speciális gáz). Átáramlás esetén HEPA szűrő alkalmazása, párologtatáshoz desztillált víz használata javasolt. A kamrát minden kísérlet előtt fertőtleníteni és tiszta állapotba kell hozni. Saját eszközök esetén ajánlott a réz használata az antibakteriális tulajdonságai miatt (Wikipédia (b) 2020).

### 3.2.6 Üzem módok

A modern készülékek előre beállított, illetve a felhasználó által definiált üzemmódok szerint képesek az oxigénkoncentrációt változtatni a kísérlet során. Ennek megfelelően alkalmas hipoxiás, szakaszos, fokozatosan változó, illetve teljesen egyéni beállításokra is. Például sejt implantáció esetén egyedi beállítások mellett hipoxiás prekondicionálással és fokozatos hőmérséklet csökkentéssel növelhető a minták túlélési esélye (BioSpherix 2019).

Vitatott kérdés, hogy a sejt kísérletek során alkalmazható-e normoxiás levegő a sejtek növesztéséhez, illetve a hipoxiás kondicionálást követő reoxigenizációs fázishoz. Tények támasztják alá, hogy a sejtek normál környezetben olyan szabályozó géneket is expresszálnak, amelyek légköri oxigénkoncentráció mellett nem funkcionálnak (HIF) (Place és mtsai 2017). A legújabb nézetek szerint az *in situ* körülmények modellezésére 10%-nál alacsonyabb O<sub>2</sub>-koncentrációt kell alkalmazni (Zoran 2009).

Ezen igények a ma elérhető kamrákkal teljes mértékben kielégíthetők. A BioSpherix a következő beépített programot kínálja a már fentebb említett prekondicionáláson kívül: lépésszerű O<sub>2</sub>-koncentráció csökkentés, amelyben hasonlóan a magassági akklimatizációhoz a sejteket fokozatosan kondicionáljuk a növekvő génexpresszióra. Ezzel a technikával minden paraméter szabadon állítható (O<sub>2</sub>-szintek, időparaméterek).

Az Oxycycler GT4181CN lehetővé teszi az oxigén mérgezés modellezését bármely sejtenyészetben, hasonlóan a sportolók által végzett szabadidős oxigén-belélegzésből, terápiás kezelésből, illetve bármilyen hirtelen magas oxigén expozícióból származó toxicitáshoz (BioSpherix 2019).

Egy-egy kutatási projekthez (diplomamunka) sok esetben nincs szükség ekkora kapacitással bíró eszközökre. Egyedi méréseknél ritkán fordul elő, hogy „ipari” mennyiségű mintákat kell kezelni. Illetve a feladat jól definiált keretek között zajlik, amit egyszerűbb, olcsóbb dedikált eszközökkel is meg lehet valósítani, nincs szükség komplex, univerzális funkciókkal rendelkező költséges berendezésekre. A hallgatói munka általában részfeladatokra terjed ki, amely során adott paraméterek, hatások

vizsgálata folyik. A kezdeti szakaszban elegendő olyan eszköz használata, amely csak a vizsgált értékekre fókuszál. Így elkerülhető, hogy a rengeteg beállítási lehetőség elterelje a meghatározott kutatási irányt. Nem szokatlan igény az egyedi kísérletieszköz fejlesztés. Egy a kaliforniai egyetemen, illetve Saroj és munkatársai által fejlesztett hipoxiás kamrák is remek példái annak, hogy a meglévő egyetemi infrastruktúrát felhasználva könnyen lehet olyan egyedi eszközöket készíteni, amelyek más hallgatók kutatási igényeit kielégíti, és így segíti haladásukat (Saroj és mtsai 2016, UCSD Department of Bioengineering 2012). Új feladatot, témát tesz lehetővé, amely új hallgató bevonását jelenti, egyedi igényeket lehet megfogalmazni és a folyamat végén a labor új berendezéssel gazdagodhat.

### **3.3 Humán vizsgálatok**

Jelen kutatásban megvalósult humán vizsgálatok főleg a sporttevékenység közben előforduló hipoxiára terjednek ki. Ilyenkor hipoxiás és stagnáló hipoxia állapotokról beszélhetünk (Pavlik 2019). A hipoxiás hipoxia főleg olyan sportok esetében jelenik meg ahol a sportoló szabályozott módon jut levegőhöz (pl.: vízi sportok). Stagnáló hipoxiáról ebben a vonatkozásban pedig akkor beszélhetünk, ha a terhelés olyan magasra emelkedik, hogy a sportoló szív- keringési rendszer már nem képes a szervezet igényeit kielégíteni. A legtöbb sportágban magas intenzitás mellett elérhető az anaerob tartomány.

Az aerob és anaerob küszöbértékeket a vérben mérhető tejsavkoncentrációval jellemzik. Az általánosan használt aerob küszöbérték kb.  $2 \frac{mmol}{l}$  koncentrációig tart, inentől a laktát szint a nyugalmi fölé emelkedik. Megközelítőleg  $4 \frac{mmol}{l}$  laktát érték felett fokozódik az anaerob energiatermelés és a tejsavkoncentráció meredeken emelkedni kezd. Ezt a pontot hívjuk anaerob küszöbnek. Ebben a tartományban a terhelhetőség ideje folyamatosan csökken. Speciális edzésekkel fejleszthető a sportolók aerob és anaerob kapacitása, ezzel növelve a sportteljesítményt és az állóképességet.

### 3.3.1 Hipoxiás edzés módszerek

Él sportolók esetében gyakori módszer a magaslati edzés (Khodaei és mtsai 2016). A magasság szempontjából több kategóriája létezik, de a lényege, hogy alacsony oxigénkoncentráció mellett történik a terhelés. A hatások között megjelenik az emelkedett vörösvértest szám, nő a maximális aerob kapacitás, javul a kapillarizáció és gazdaságosabb lesz a szervezet oxigénfelhasználása (Sinex és Chapman 2015).

A sportteljesítményre gyakorolt előnyös hatásokon kívül számolnunk kell az úgynevezett magaslati betegséggel is. Az alacsonyabb oxigénszint miatt szaporább és mélyebb légzésre van szükség. Ennek következménye, hogy több CO<sub>2</sub> távozik a szervezetből, amely megváltoztatja a vér kémhatását (Murdoch 2010). A csökkenés az ion háztartásra is hatással van, amely végsősoron befolyásolja a szervezet víz eloszlását és ödéma kialakulásához vezet. Súlyos esetben tüdő-, illetve agyödémát okozhat. Több kutatás is vizsgált olyan lehetséges prekonkicionáló módszereket, amelyek enyhíthetik a magaslati betegséget. Érdekes módon a legkézenfekvőbb, normobár hipoxiás edzéssel nem sikerült kialakítani a ventilációs adaptációt. Az ezt követő magaslati edzés közben is megfigyelhető volt a teljesítménycsökkenés. Az eredmények alapján az alacsony nyomáson történő hipoxiás edzés gyakorlatban nem ugyanolyan hatást fejt ki, mint a normobár nyomáson végzett (Beidleman és mtsai 2009, Fulco és mtsai 2013).

A fentiek figyelembevételével nem mindegy, hogy milyen módon alkalmazunk magaslati, hipoxiás edzést a felkészülés során. Lényeges paraméter a szervezet vastartalma, amely nélkülözhetetlen a vörösvértest és hemoglobin termeléshez. Vashiányos állapotban nem történik emelkedés az említett értékekben (Govus és mtsai 2015).

Léteznek alternatívák, amelyek tengerszinten próbálnak a magashegyi edzéshez hasonló körülményeket generálni (Hypoxico 2019). Ezen eszközök, módszerek lényege, hogy az elérhető oxigén mennyiséget csökkentik, de a környezeti nyomás a normálszinten marad. Az egyik ilyen kiegészítő az edző maszk, amely cserélhető szelepek segítségével korlátozza a beáramló levegő mennyiségét (Training mask 2020). A csökkent szellőzés magas CO<sub>2</sub> és alacsonyabb O<sub>2</sub>-koncentrációt okoz a maszk térfogatán belül, ezzel segítve az aerob kapacitás fejlődését, az állóképesség növekedést és a tüdőfunkció javulását. John. és munkatársai szignifikáns eltérést mutattak ki a maszkot használó alanyok és a kontroll csoport között (Porcari és mtsai 2016). Fontos

tényező, hogy a maszk használata közben kialakuló hipoxiás környezetet a kilélegzett levegő okozza. Ennek mértéke elmarad a magaslati edzéseken tapasztaltaktól tekintve, hogy minden beléggzéssel, oxigénnel teli levegő járja át a maszkot. A hatása inkább a légzőizmok fejlesztésére irányul, használatával növelhető a ventilációs kapacitás, a maximális be- és kiléggzési nyomás (Porcari és mtsai 2018). Mindezen változások jótékony hatással bírnak az állóképességre és így a sportteljesítményre is.

Elérhetőek olyan eszközök is, amelyek képesek csökkentett oxigéntartalmú „levegőt” előállítani (Higher Peak 2020). Ezek a magaslati generátor készülékek jellemzően 9-21% O<sub>2</sub>-koncentrációk képesek szolgáltatni. Az előzőkhez hasonlóan ebben az esetben is egy maszkot kell viselni, de a légzőnyíláson keresztül a készülék által generált gázkeveréket lélegezzük be. Itt már sokkal inkább hipoxiás kondicionálásról van szó tekintve, hogy nincs légzési ellenállás a rendszeren belül. A generátort többféle módon lehet használni. Az egyik a már említett maszkos kialakítás. Ennél komolyabb rendszer esetén lehetőség van egy zárt edzőterem kialakítására is, amelyhez a generátort csatlakoztatva az egész helyiségben szabályozható az oxigénkoncentráció. Úszáshoz külön ajánlanak úgynevezett úszófolyosót, amit a sáv fölé helyezve hipoxiás légkört hozhatunk létre (Hypoxico 2019). Ezen kívül otthoni felhasználásra szánt alvó sátrakat is alkalmazhatunk a felkészülés során.

Látható, hogy sok megoldás létezik az edzések ilyen fajta kiegészítésére, valamint továbbra is aktív kérdés, hogy hogyan kell optimálisan megválasztani a hipoxiás edzések jellemzőit (a felkészülés mely szakaszában alkalmazzuk, mennyi ideig, milyen formában stb.). Ezen kérdések már inkább az edzésmetodika területéhez tartoznak. A dolgozatban bemutatott kutatómunka során inkább arra voltunk kíváncsiak, hogy mely élettani paraméterek határozzák meg a hipoxia tűrőképességet.

### **3.3.2 Apnea**

A szabadtüdős búvárkodás (apnea, freediving) a víz alá merülés egy olyan formája, ahol a búvár egy levegővétellel tartózkodik a víz alatt. A búvárkodás legegyszerűbb és legősibb formájáról van szó, amelyet már az ókori görögök is alkalmaztak, hogy élelmet, illetve egyéb javakat (szivacs, gyöngy, elsüllyedt értékek) tudjanak víz alól felhozni. A japán ama búvárok több mint 2000 éve kezdték a

gyöngyhalászatot. Skandalopetra-nak nevezett technikát alkalmazták, ahol a bűvár egy körülbelül 15kg tömegű követ használt a gyorsabb merülés érdekében és így közel 30 méteres mélységbe tudott ereszkedni (Hendrikse és Merks 2009). Később a hadviselésben is megjelentek a szabadtüdős bűvárok (Engelbrecht 2009). Az ellenséges hajókon okoztak sérüléseket, valamint víz alatti akadálymentesítés volt a feladatuk. A technikai fejlődés során megjelentek olyan eszközök, melyekkel lehetővé vált a víz alatti légzés, ami feloldotta az egy levegős merülés korlátait.

Ezt követően vált az apneából rekreációs, illetve versenysport. Jelenleg a két legnagyobb szabadtüdős bűvár szervezet (AIDA, CMAS) összesen tizenegy versenyszámot ismer el hivatalosan (Wikipedia (e) 2021).

**1. táblázat** Az AIDA és CMAS rendszerek által elfogadott versenyszámok összesítő táblázata a mért paraméterek és a felhasználható felszerelés alapján. STA: statikus apnea, amely során a bűvár arccal a vízbe fordulva mozdulatlanul tartja vissza a levegőt a lehető legtöbb ideig. DNF: dinamikus uszony nélküli úszás, ahol a bűvár segédeszköz nélkül, saját erővel úszik a lehető legnagyobb távolságot. DYN és DYN-BI: monofin, illetve vadászuszony használatával történő úszás. CNF: uszony nélküli, saját erőből történő merülés, ahol a cél, hogy a bűvár az előre meghatározott mélységet elérje. FIM: uszony nélküli merülés, ahol a bűvár a kötél mentén húzza le magát az előre meghatározott mélységbe. CWT: uszony használatával történő merülés előre meghatározott mélységbe. VWT: szán vagy más merülést segítő szerkezettel történő merülés, majd saját erőből történő felúszás.

	<b>Idő</b>	<b>Táv</b>	<b>Mélység</b>
<b>Uszony nélküli</b>	STA	DNF	CNF, FIM
<b>Uszonnal</b>	x	DYN, DYN-BI	CWT, VWT

Három nagy csoportba oszthatók az egyes számok aszerint, hogy mit mérnek a verseny alatt (1. táblázat). Ez alapján az első csoportba az úgynevezett statikus apnea tartozik, ahol az egy levegővel víz alatt töltött idő számít. A második csoportban az egy levegővel megtett legnagyobb távolságot mérik. Ide sorolható a dinamikus apnea uszonyos, illetve uszony nélküli változata. Az összes többi versenyszámnál az elért legnagyobb mélység számít. Az eredményeket tekintve az elmúlt 50 évben hatalmas fejlődés látható a sportban. 1976-ban Jacques Mayol francia bűvár volt az első ember, aki egy levegővel 100 méter alá tudott merülni (Wikipedia (d) 2021). Az akkori mérések és vizsgálatok alapján az orvosok azt feltételezték, hogy az emberi szervezet

nem képes elviselni a 100 méter alatti nyomást. Jelenleg Herbert Nitsch No Limit kategóriában (csak AIDA rendszerben) 253 méteres mélységgel tartja a világrekordot. A többi versenyszámot tekintve is egyre extrémebb eredményeket láthatunk. Branco Petrovic 11 perc 54 másodperces idővel tartja a levegő-visszatartás (STA) Guinness rekordját (Whelan 2014) vagy említhetjük Mateusz Malinát, aki 2016-ban egymást követő két nap állított fel világrekordot a dinamikus apnea uszonyos (DYN: 300 méter), illetve uszony nélküli (DNF: 244 méter) számában (AIDA World Records 2020).

A téma irodalmi háttere sportvonatkozásban nem túl nagy. A PubMed keresőjében a „freediving, breath holding” kulcsszavak használatával 200 alatti a találatok száma. A képzett búvárokon történt fiziológiai vizsgálatokat tekintve a következő főbb témákat érintik az egyes kutatások: csökkent savasodás, oxidatív stressz (Joulia és mtsai 2003, Joulia és mtsai 2002) és alacsonyagcsere; növekedett hematokrit érték, eritropoetin-koncentráció, hemoglobin-koncentráció és erőltetett kilégzési vitálkapacitás (Lemaître és mtsai 2010); szívfrekvencia variabilitás vizsgálata (Kiviniemi és mtsai 2012), valamint a lép térfogatváltozása apnea hatására (Schagatay és mtsai 2005).

Lemaître és munkatársai cikkükben (Lemaître és mtsai 2010) egy érdekes hipotézist mutatnak be, amely szerint az apnea alkalmas lehet más sportokat kiegészítve az aerob teljesítmény fokozására. Állításukat a témában megjelent más cikkek eredményeinek összefoglalásával magyarázzák. Elsőként említik, hogy három hónapos apnea edzés hatására csökken a szervezet savasodása, valamint csökken az oxidatív stressz is. A fent említett vizsgálatok mentén folytatva a gondolatmenetet arra a következtetésre jutottak, hogy az apnea hatására olyan folyamatok játszódnak le a szervezetben, amelyek mindegyike az oxigénszállító kapacitást növelik (Lemaître és mtsai 2010). Ennek következménye, hogy növekedhet az aerob sportteljesítmény. A hematokrit és hemoglobin-koncentráció változását jól magyarázza a lépen MRI-vel megfigyelt térfogatváltozás, továbbá az eritropoetin hormon koncentrációjának növekedése (Schagatay és mtsai 2012).

Más kutatások a bűvárreflex hatására bekövetkező szívfrekvencia változást vizsgálták (Hayashi és mtsai 1997). A folyamat teljesen még nem felderített, így az sem, hogy pontosan mi indítja el a szívfrekvencia csökkenést, illetve, hogy apnea alatt hogyan történik a szabályozás. Schipke és munkatársai arra hívták fel a figyelmet, hogy



a képzett bűvárok által használt "levegőnyeléses" technika, amely segítségével 1-2 liter extra levegőt képesek a tüdőbe préselni, hátrányos következménnyel járhat. A megnövekedett tüdő térfogat, valamint az intratorakális nyomás miatt közel egyharmadára csökken a perctérfogat (Schipke és mtsai 2015).

Az apnea sportág természetéből adódóan az elváltozások tekintetében a tüdő vizsgálata merül fel elsőként, azonban érdekes módon a tüdő térfogatvizsgálata nincs a kutatások fókuszában. Ennek oka feltehetően az, hogy a normálisnál nagyobb vitálkapacitás önmagában nem elegendő a megemelkedett apnea teljesítményhez.

Joggal merül fel a kérdés, hogy milyen élettani folyamatok teszik lehetővé, hogy egyesek ilyen extrém mértékű hipoxiát el tudjanak viselni? Van-e esetleg adaptációs hatása a sportnak vagy veleszületett adottságra van szükség az ilyen teljesítmény eléréséhez? Továbbá érdekes kérdés, hogy meddig fokozható a fejlődés, hol van az élettani határ? Az itt bemutatásra kerülő munka célja, hogy e kérdéseket vizsgálja, hogy az eredmények alapján jobban megértsük a háttérben zajló folyamatokat.

## 4 Hipotézisek

1. Egyedi fejlesztésű, hőmérséklet vezérléssel ellátott hipoxiás kamra alkalmas a szöveti iszkémia modellezésére.
2. Az alacsony hőmérséklet kedvező hatású az OGD modellben vizsgált csont graftok túlélésére.
3. Egyedi fejlesztésű, szakaszos hipoxiás kamrával állatkísérletekben modellezhető az alvási apnoe (OSA).
4. Az OSA modell alkalmas mérhető agyi stresszhatás kiváltására.
5. Az edzett szabadtüdő bűvároknál mérhető élettani változások történnek a hipoxiás és hiperkapniás adaptáció során, amelyek magyarázzák a nagyobb sportteljesítményt.

## 5 Célkitűzések

A bevezetőben bemutatott kérdések és információk alapján a kutatás három fő területen zajlott: szövetszintű oxigén-glükóz megvonásos (OGD) modell fejlesztése, *in vivo* állatkísérletre alkalmas alvási apnoe (OSA) modell létrehozása, illetve humán vizsgálatok a hipoxia tűrőképesség és annak sportteljesítményre gyakorolt hatásának tanulmányozására. A témaválasztás és munka célja miatt elsősorban módszertani, és a szükséges készülékek fejlesztésének ismertetése kerül előtérbe. Az egyes területen megfogalmazott céljaink a következők voltak:

1. Olyan OGD kísérletre alkalmas kamra fejlesztése, amely a következő tulajdonságokkal rendelkezik:
  - a. 0 és 37 °C között szabályozható hőmérséklet tartomány
  - b. 0,5% alatti O<sub>2</sub>-koncentráció biztosítása a kísérlet teljes ideje alatt
  - c. szabályozható áramlás a gázfogyasztás optimalizálása érdekében
  - d. 90% feletti páratartalom a minták kiszáradása ellen
  - e. moduláris felépítés, legalább két minta befogadására alkalmas, amelyek szükség esetén egymástól független hőmérsékleten és időben indíthatók
  - f. a kísérleti eszköz és protokoll validálása *in vitro* sejt és szövetminták felhasználásával
  
2. Olyan szakaszos hipoxiás kamra létrehozása, amely alkalmas az obstruktív alvási apnoe egereken történő modellezésére. Az eszközzel szemben támasztott követelmények a következők:
  - a. az állatok eredeti tároló ketrecének módosításával legyen kialakítva a modell, hogy elkerüljük az új környezet okozta stresszhatást
  - b. alkalmas legyen a gyors O<sub>2</sub>-koncentráció változtatásra a következő protokoll szerint: 90 s 21% O<sub>2</sub> / 90 s 5.7% O<sub>2</sub> folyamatosan váltakozva 8 órán keresztül
  - c. igény szerint módosítható legyen az időzítés és az O<sub>2</sub>-koncentráció értéke
  - d. az áramló gáz páratartalma legyen 50±10% tartományban
  - e. az áramló gáz homogén módon keringjen a zárt dobozban

f. a modell biológiai hatásának kimutatása

3. Edzett szabadtüdő bűvárok és edzetlen kontroll személyek közti különbségek vizsgálata hipoxia alatt. Olyan élettani paraméterek kutatása, amelyek befolyásolják a hipoxia tűrőképességet. A mérések során a következő értékek monitorozását végeztük: véroxigén szaturáció; lépméret, volumetria és elasztográfiai változások; FVC (Forced Vital Capacity – Erőltetett kilégzési vitálkapacitás). A következő kérdésekre kerestük a választ:
- a. Kimutatható-e szignifikáns különbség a két csoport apnea teljesítménye között?
  - b. Mérhető-e szignifikáns különbség a csoportoknál a fent említett élettani paraméterekben?

Összefoglalva a jelen munka egyik célja, hogy olyan fejlesztéseket mutasson be, amelyek az említett tudományos kutatási célokat szolgálják és felhasználhatók az *in vitro* iszkémia különböző hőmérsékleteken történő tanulmányozására, valamint az alvási apnoe állatkísérletes modellezésére. Másfelől a további kísérletek a hipoxiás edzés humán vonatkozásait vizsgálják, amely során az adaptációs folyamatok tanulmányozása kerül előtérbe.

## 6 Módszerek

A modellek tervezése és megvalósítása a kutatás alapját alkotják, így szükséges az egyes lépések részletes ismertetése, hogy a későbbiekben elvégzett kísérletek eredményeit megfelelően tudjuk értékelni. A dolgozat kellő mértékben tárgyalja az eszközök és protokollok fejlesztési fázisait, azonban a terjedelemre és a szerteágazó témákra való tekintettel nem tér ki a módszertani fejezetekben ismertetett megoldások alapszintű fizikai, elektronikai magyarázatára. A műszaki tervezés pontjait bemutatva a biológiai vizsgálatok részletei is tárgyalásra kerülnek.

### 6.1 Oxigén-glükóz deprivációs modell, eszközfejlesztés

A hűtőrendszer kiválasztásánál az elsődleges szempont volt, hogy 0 °C körüli hőmérsékletet tudjunk előállítani. Két féle megoldás adódott: hűtőkompresszor vagy termoelektromos (Peltier) elem. A feladat tulajdonságait tekintve, egyik módszer sem ad optimális megoldást. A kompresszoros hűtésnél a rendszer mérete túl nagy, továbbá a hűtés elérheti a -20 °C-os értéket is, ami jelen esetben felesleges. A Peltier-elem esetén a 0 °C eléréséhez nagy teljesítményű tápegységet kell használni és megfelelően méretezni a hűtő felületet. További hátrányt jelent, hogy ekkora hőmérsékletkülönbség előállítása esetén a Peltier-elem hatékonysága jelentősen romlik. A hűtőrendszerek hatékonyságát az úgynevezett COP (Coefficient of Performance) értékkel jellemzik (2. táblázat), amit úgy kapunk meg, hogy a hűtési teljesítményt elosztjuk a rendszer által felvett teljesítménnyel. A 2. táblázat alapján látszik, hogy a Peltier-elem hatékonysága maximális teljesítmény közben elmarad a többi módszerhez képest, azonban a 3. táblázatban összegyűjtött szempontok alapján mégis ezt a megoldást választottuk.

**2. táblázat** *Hűtőrendszerek hatékonysága.* A táblázat a különböző elveken működő, hűtésre alkalmas eszközök hatékonyságát mutatja (Cool Chips 2019).

Hűtőrendszer	Hatékonyság (%)
Peltier-elem	6-8
Kompresszor	40
Cool Chips	50

Az oszlopokban "+" jelzi, hogy az adott szempontnak, melyik megoldás felel meg jobban. Fontos megjegyezni, hogy a 3. táblázat a kísérlethez szükséges követelményeknek és körülményeknek megfelelően hasonlítja össze a két lehetőséget. Azonban, ezzel a megoldással sem triviális az igényeknek megfelelő rendszert készíteni.

**3. táblázat** *Hűtőrendszer paraméterek összehasonlítása a fejlesztéshez rendelkezésre álló források alapján.* A táblázatban látható paraméterek alapján osztályoztuk a kompresszor, illetve a Peltier-elemmel történő megvalósítás előnyeit (+) és hátrányait (-).

<b>Paraméterek</b>	<b>Kompresszor</b>	<b>Peltier-elem</b>
Méret	-	+
Zaj	-	+
Hűtési teljesítmény	+	-
Fogyasztás	+	-
Komplexitás	-	+
Ár	-	+
COP	+	-
Spec. eszköz igény	-	+
Szakmai ismeret	-	+

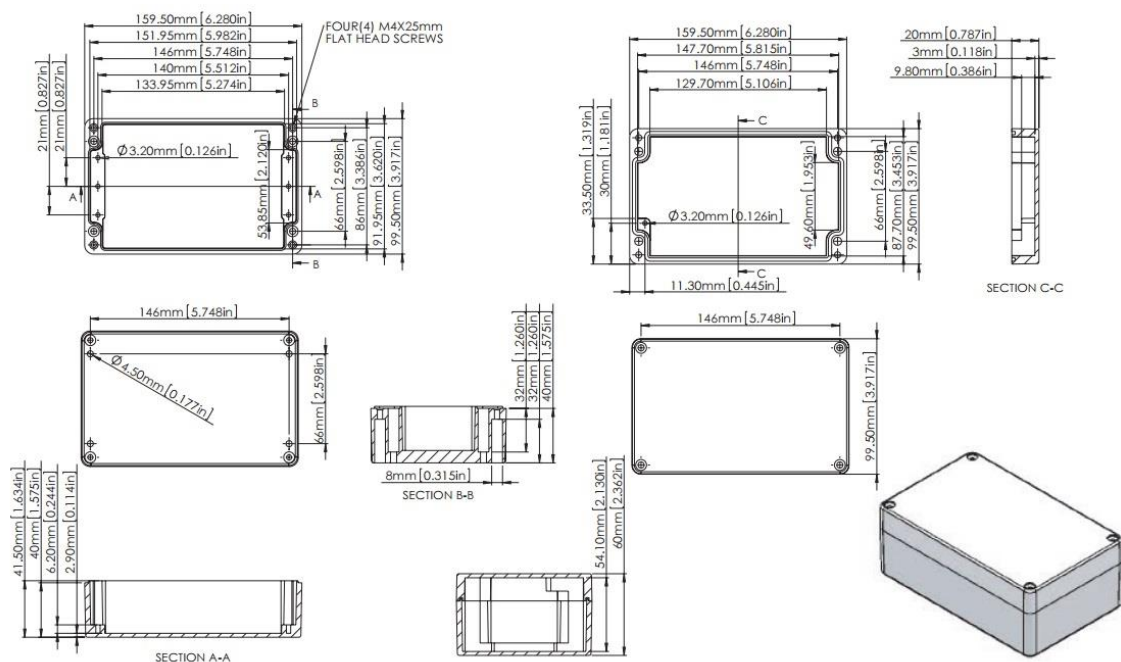
### 6.1.1 Termoelektromos elem fogalma

A termoelektromos hatást már a 19. században Thomas Seebeck és Jean Peltier felfedezték (Wikipedia (a) 2020). A folyamat lényege, hogy két különböző fémek összekapcsolva, hőmérséklet gradiens hatására, elektromos áram folyik a fémeken keresztül. A jelenség fordítva is igaz, vagyis, ha feszültségkülönbség jelenik meg a fémek között, akkor az egyik fém elkezd hűlni, amíg a másik melegszik. Az az elem, amelyik hűl, energiát von ki a rendszerből. Az energiát elektronok nyelik el, amelyek az alacsony energiaállapotból (lehűlt p-típusú vezető) átjutnak a magas energiaállapotba (melegedő n-típusú vezető). A tápegység biztosítja az elektronok mozgásához szükséges energiát (Gurevich és Logvinov 2005).

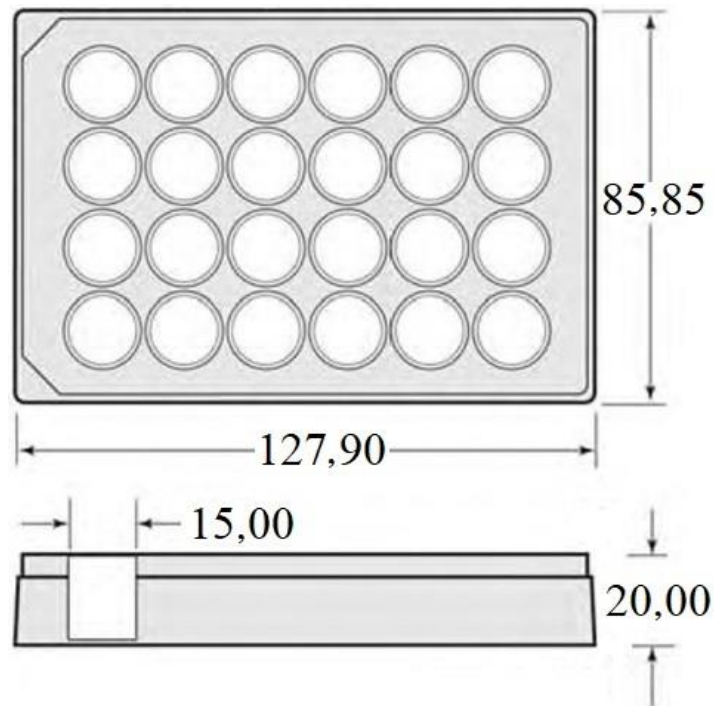
### 6.1.2 Kamraméretezés

Első lépésként felmértük a kísérletes modellel szemben támasztott követelményeket. A kísérletek többnyire tenyésztő lemezen történtek, ezért alapvető követelmény volt, hogy ezek az eszközök beférjenek a kamrába. A hővezetés miatt rozsdamentes fémnek, valamint hasonló méretűnek kell lennie, mint a tenyésztő lemez

(3. ábra). Ha a kamra túl nagy, akkor több nitrogént kell használnunk az átszellőztetéshez és a hőmérséklet beállítás is lassabban, kevésbé homogén módon történik. A másik kritikus paraméter a szigetelés volt. Tekintve, hogy a kísérlethez 0,5% alatti O<sub>2</sub>-koncentrációt kell biztosítani, fontos, hogy a kamra megfelelően zárt legyen. Műszaki boltokban elérhetőek olyan alumínium műszerdobozok, amelyek alkalmasak erre a célra. A Gainta Industries Ltd. által gyártott termékek neoprén szigeteléssel vannak ellátva és megfelelnek az IP65 (nemzetközi védettség jelölés), illetve IP67 szabványoknak. A kamra méreteit a 2. ábra mutatja. A standard tenyésztő lemezek alapterülete 127,9 x 85,85 mm (3. ábra), amely pontosan elfér a választott kamrában. A tenyésztő lemez magassága 20 mm azonban gondolnunk kell az átszellőztető gáz csatlakozására is. A kamra 54,1 mm magassága éppen alkalmas még a szükséges nyílások kialakítására. A kamra külső része egy vastag festékréteggel van bevonva, amely rontja a hővezetést, 3-4 °C-os eltérést mértünk a festett és nem festett dobozok hőmérséklete között, emiatt eltávolítottuk a festékréteget az alsó felületről.



**2. ábra** OGD kamra. A modellhez választott kamra méreteit (mm) mutatja az ábra. A fő szempont, hogy a kamra belső mérete a lehető legközelebb legyen a szabványos sejttenyésztő edények méretéhez. Erre a célra az ábrán látható kamra a legalkalmasabb.



**3. ábra** A standard sejtenyésztő edény méretei. A csont iszkémiás vizsgálatokhoz használt szabványos 24 lyukas tenyésztő edény méretei (mm) láthatóak az ábrán.

A Peltier-modulok szükséges teljesítményének meghatározásához ki kell számítani, hogy mekkora hőt kell kivonni a rendszerből. A hőmennyiség a 4.1. képlet segítségével számítható:

$$4.1. \quad Q = c * m * \Delta T$$

ahol  $Q$  a hőmennyiség,  $c$  a fajhő,  $m$  a tömeg és  $\Delta T$  a hőmérsékletkülönbség. A kamra anyaga alumínium, amelynek fajhője  $0,91 \frac{kJ}{kg \cdot K}$  és a tömege 600g. A laborban standard szobahőmérsékletet ( $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ), és a kísérlet közben kívánt  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ -ot feltételezve a hőmérséklet különbség  $21 \text{ }^\circ\text{C}$  (a képletben Kelvin dimenzióval számolunk, de hőmérséklet különbség esetén a Kelvin és Celsius skála megegyezik). A 4.1. képlet alapján  $11466 \text{ J}$  hőt kell a kamrából elvonni a hűtés során. Ehhez még hozzá kell vennünk a mintákból elvonandó hőmennyiséget és az átáramló nitrogén terhelését. 24 lyukú tenyésztő lemezzel számolva a minták folyadéktartalma  $48 \text{ mL}$  ( $2 \text{ mL}/\text{tégely}$ ). Szoba hőmérsékletet feltételezve a  $\Delta T_m = 25 - 4 = 21 \text{ }^\circ\text{C} = 21 \text{ K}$ . Ebben az esetben:



$$4.2. \quad Q_{minta} = c_m * m_m * \Delta T_m$$

$$4.3. \quad Q_{minta} = 4,18 \frac{J}{g * K} * 48g * 21K$$

$$4.4. \quad Q_{minta} = 4213 J$$

A rendszer túlméretezéséből és a tenyésztő lemez minimális hatása miatt az anyagra vonatkozó számításokat elhanyagoltuk. Az átáramló nitrogén hőterhelését a 4.5. képlettel számíthatjuk:

$$4.5. \quad P_n = c_n * \rho_n * \Delta T_n * V_n$$

ahol  $P_n$  a teljesítményt,  $c_n$  a nitrogén fajhőt,  $\rho_n$  a nitrogén sűrűségét,  $\Delta T_n$  a hőmérsékletkülönbséget és  $V_n$  az áramlási sebességet jelöli. Az értékeket behelyettesítve:

$$4.6. \quad P_n = 1,04 \frac{J}{g} * 1,25 \frac{g}{l} * 21K * 0,016 \frac{l}{s} = 0,455 W$$

teljesítményt kapunk. A kamrákat hőszigetelő borítással láttuk el, így a környezeti hőterhelést elhanyagoltuk a számítások során. A fentiek alapján maximum 30 perc beállási idővel számolva meghatározható, hogy mekkora hűtési teljesítményre van szükség.

$$4.7. \quad P = \frac{Q}{t}$$

ahol  $P$  a teljesítmény,  $Q$  a hőmennyiség és  $t$  az idő.

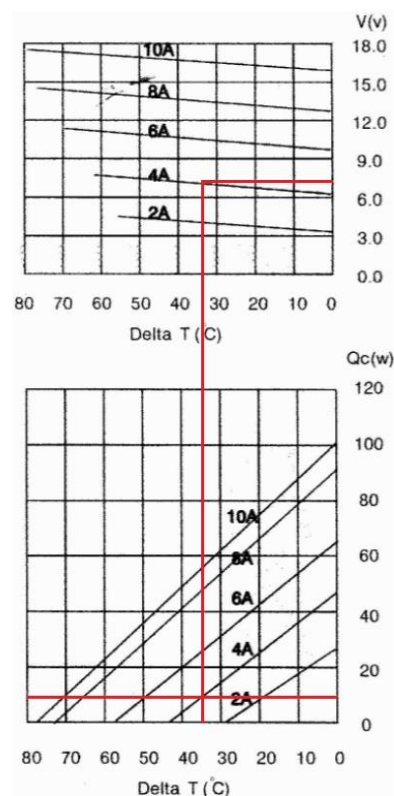
$$4.8. \quad P = \frac{(11466+4213)J}{1800s} = 8,7 W$$

$$4.9. \quad P_{sum} = 8,7W + 0,455W = 9,155 W$$

A fenti számítások alapján egy kamra hűtéséhez, felfelé kerekítve körülbelül 10 W teljesítményre (4.9. egyenlet) lesz szükség. Ezek alapján a Peltier-modul adatlapjából (4. ábra) meghatározható, hogy mekkora feszültséget és áramerősséget kell alkalmazni. Egy kamrához 2 darab Peltier-elemet használtunk a homogén hűtés, illetve a rendszer túlméretezése miatt. Így összesen 10 W/Peltier-elem értékkel számoltunk. A 4. ábrán a diagram alsó része mutatja a Peltier-modul két oldala közti hőmérsékletkülönbség ( $\Delta T$ ) és a hűtési teljesítmény ( $Q_c$ ) közti összefüggést. Ha a meleg oldal 35 °C-nál nem lesz magasabb és a hideg oldal 0 °C-nál nem lesz alacsonyabb, akkor az ábrán a piros

vonalak kijelölik a megfelelő feszültség és áram értékeket. Ebben az esetben 7,5 V feszültséget és 4 A körüli áramerősséget kell alkalmazni.

A rendszerbe összesen 2 darab kamrát terveztünk ennek megfelelően 4 darab Peltier-modul szükséges. A meghatározott 7,5 V és 4 A elektromos paraméterek alapján 1 darab Peltier-modul üzemeltetéséhez 30 W teljesítményre lesz szükség. Négy modul esetében ez 120 W összesen. A tápellátás biztosítására a Mean Well RS-150-12 kapcsolóüzemű tápegységét választottuk. 12 V feszültség mellett 12,5 A leadásra képes, ami 150 W teljesítményt jelent. A tápegység gyárilag rendelkezik rövidzár- és túlfeszültség elleni védelemmel is, ami a Peltier-modulok szempontjából lényeges hiszen helytelen használat során a modulban rövidzár alakul ki. A moduloknak szükséges 7,5 V feszültséget 2 darab DC-DC konverter segítségével oldottuk meg oly módon, hogy a tápegység 12 V-os feszültségét konvertáltuk 15 V-ra, amit két sorba kötött modulra kapcsolunk.



**4. ábra** A TEC-12710 típusú Peltier-modul adatlapja. A piros vonalak jelölik a kívánt 10 W hűtőteljesítmény eléréséhez szükséges áram és feszültség értékeket. A kijelölés során 35 °C körüli hőmérséklettel számolunk a modulok „meleg” oldalán.

A kamrák fűtéséhez szintén a Peltier-elemeket használjuk csak fordított polaritással. Ennek hatására a modulok hideg és meleg oldala felcserélődik. A fűtő teljesítmény sokkal nagyobb mint a hűtési, mivel az alkalmazott tápellátás a meleg oldalon disszipálódik. Emiatt a fűtés tervezését külön nem számítjuk, a hűtéshez alkalmazott beállítások elegendőek a fűtés üzemmód esetén is.

### **6.1.3 Disszipált hő**

A Peltier-modul a hideg oldalról elvont hőt és a tápellátást a meleg oldalon disszipálja. Ez azt jelenti, hogy minél nagyobb hűtési teljesítményt szeretnénk, a modul annál jobban fog melegedni. Az adatlap alapján látható, hogy a Peltier-elemek nem állandó hőmérséklettel számolnak, hanem a két oldal közti hőmérséklet különbséggel. Ez azt jelenti, hogy ha az egyik oldal hőmérséklete változik, az hatással van a másik oldalra is. Emiatt kritikus, hogy a disszipált hő elvezetése megfelelő legyen, hiszen, ha ez az oldal túlmelegszik, akkor a hideg oldal hőmérséklete is emelkedni fog. Jelen esetben egy Peltier-modul 10 W hűtési és 30 W ( $7,5 \text{ V} * 4 \text{ A}$ ) elektromos teljesítményt disszipál. Ez kamránként 80 W a teljes berendezésre vonatkozóan 160 W fűtési teljesítményt jelent. Ennek hatékony elvezetésére vízhűtő rendszert alkalmaztunk. A számítástechnikában alkalmazott termékek hőelvezető kapacitása bőven a szükséges teljesítmény felett vannak. Ennek megfelelően a következő elemeket használtunk: Phobya DC12-220 szivattyú, 400 mm plexi víztartály, hűtőradiátor (240 mm x 120 mm x 60 mm), 2 darab 80 x 50 mm vizes blokk, 2 darab 12 cm, 12 V ventilátor, szilikon csövek, csatlakozók, desztillált víz. A szivattyú és a ventilátorok többleteljesítményével már a tápegység határait feszegettük volna így a vízkeringető rendszerhez egy segéd tápegységet alkalmaztunk szintén a Mean Well termékei közül (12 V / 4 A).

### **6.1.4 Hőmérséklet szabályozás**

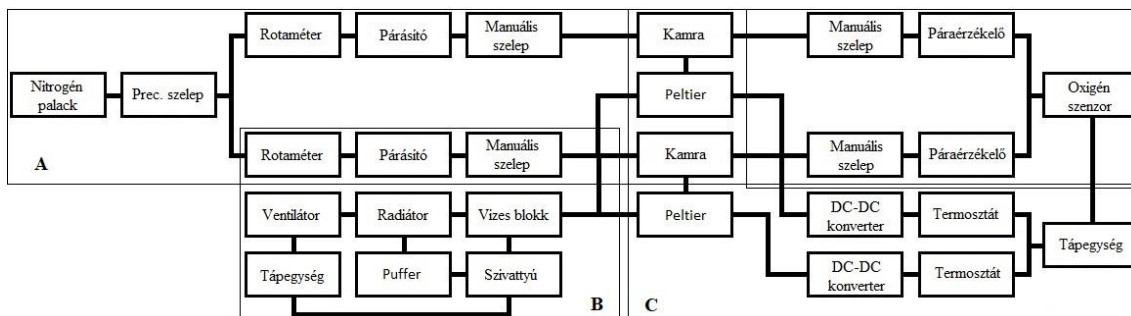
A kamrák hőmérsékletét 2 darab TMS-125 típusú termosztáttal lehet szabályozni. A hőmérsékletmérő szenzorok a kamrák aljához vannak rögzítve. A kamrák, illetve a beállított hőmérsékletnek megfelelően ki-be kapcsolja a Peltier-modulokat.

### 6.1.5 Gázáramlás

A magas nyomású nitrogént nyomás csökkentő regulátorral, körülbelül 2 bar nyomásra állítjuk. A készülék hátoldalára felhelyeztünk egy precíziós szelepet, amellyel 0-1 bar között finomhangolható a nyomás értéke. A szelepből két külön szabályozható rotaméterbe csatlakozik a nitrogén. Itt lehet a végleges áramlási sebességet ( $\sim 1 \frac{l}{perc}$ ) beállítani. Ezt követően történik a párasítás két 100 mm-es plexi víztartállyal, amelybe horzsakövön keresztül juttatjuk a nitrogént. A bevezetőben már ismertetett buborékoltatással biztosítjuk a szükséges páratartalmat. A hideg kamra esetében nem alkalmaztunk párasítást a kondenzvíz és a jegesedés megelőzése érdekében. A dobozokon két csatlakozó nyílást alakítottunk ki az átáramláshoz. A csatlakozáshoz pneumatikai gyorscsatlakozókat használtunk. A homogén szellőztetés biztosításához a bejövő oldalon hangtompítót (5. ábra) alkalmaztunk, ami gömbszerűen szórja a rajta áthaladó gázt. A modularitás érdekében a kamrák bemeneti és kimeneti ágába egy-egy elzáró szelepet építettünk. Ezek segítségével egymástól függetlenül lehet a kamrákat használni. A páratartalmat a kamrák kimeneti ágába helyezett szenzorokkal mérjük és a készülék előlapján lévő kijelzők mutatják. A rendszer felépítését a 6. ábra szemlélteti.



**5. ábra** *Pneumatikai hangtompító.* A hangtompító az átáramló gázt gömbszerűen szórja ezzel csökkentve az áramlási zajt a kamrán belül.

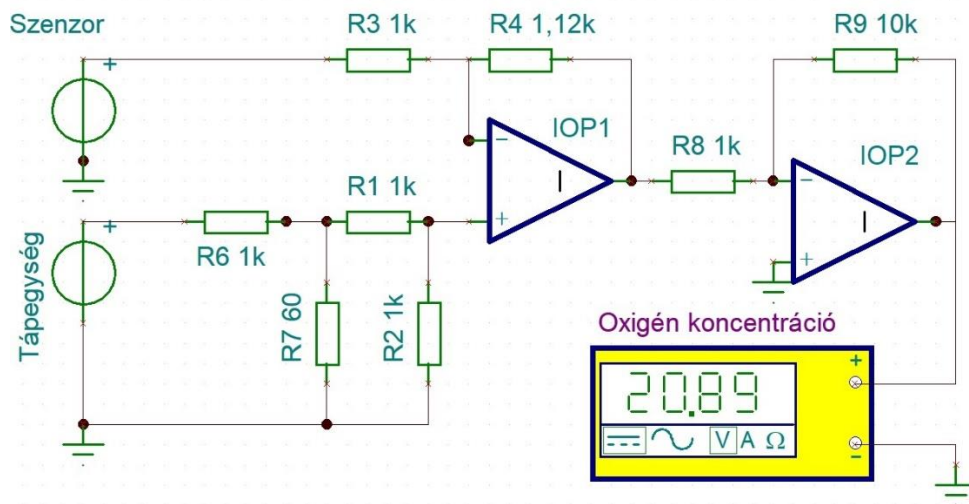


**6. ábra** Az OGD rendszer blokk vázlatja. Az A-val jelölt részen látható az átáramló gáz útvonala az egyes pneumatikai elemeken. A B rész jelöli a vízűtés egyes elemeit. A C rész az elektronikai összeköttetést mutatja.

### 6.1.6 Oxigén szenzor

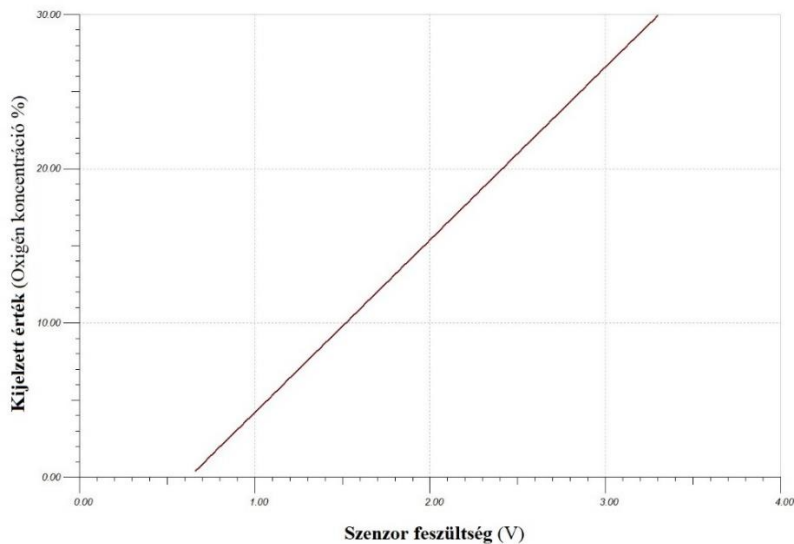
Az oxigénkoncentráció mérésre az Alphasense Ltd. O2-A2 típusú oxigénszenzort választottuk a kis méret és könnyű szerelhetőség miatt. Az érzékelőhöz külön kérhető transzmitter áramkör, ami a szenzorból érkező nanoamperes jelet felerősíti milliamperes tartományba. A szenzor mérési tartománya 0-30% között van és a koncentrációnak megfelelően 4-20 mA között változik a kimeneti áramerősség. Ebből az értékből kell a készüléken megjeleníthető értéket kijelezni.

Erre a célra egy feszültségmérő áramkört alkalmaztunk, amely képes 0-30 V közötti feszültséget mérni és megjeleníteni. Ebben az esetben a feladat, hogy a 4-20 mA áramtartományt átalakítsuk 0-30 V közötti feszültségre. A szenzor áramát egy ellenállással könnyen feszültséggé tudjuk alakítani. Erre a célra egy precíziós 165  $\Omega$ -os, 0,1% tűrésű ellenállást alkalmaztunk. Az érzékelő értéke alapján ekkor az ellenálláson eső feszültség 0,66-3,3 V között változik. A kísérlet során 0% közeli koncentrációt használunk így fontos, hogy a kijelzés valóban 0 pontról induljon. A tápegységből könnyedén ki lehet alakítani egy 0,66 V-os referencia feszültséget, amit műveleti erősítő segítségével ki tudunk vonni a szenzor feszültségéből. A tartomány így 0-2,64 V közé esik. Az utolsó lépés, hogy egy szorzó áramkörrel a 2,64 V-ot 30 V-ra alakítsuk. A tervezett áramkört a 7. ábra mutatja.



**7. ábra** Az oxigénkoncentráció kijelzése. Az ábra az oxigénkoncentráció kijelzését biztosító áramkör kapcsolási rajzát mutatja. A szenzorból érkező, az oxigénkoncentrációval arányos feszültségből műveleti erősítők segítségével kivonjuk a tápegységből előállított referencia feszültséget. Ezzel a szenzor 0% oxigén koncentrációnál megjelenő feszültségét 0V-ra korrigálja az áramkör. Végül egy szorzó áramkörrel a felső 30V-os (30% O<sub>2</sub>) feszültséget alakítjuk ki.

Az áramkör tervezett működését a 8. ábra szemlélteti. A vízszintes tengely mutatja a szenzor kimenetére csatolt ellenálláson mérhető feszültséget. A függőleges tengely pedig a feszültségmérővel kijelzett oxigénkoncentrációt jelenti.



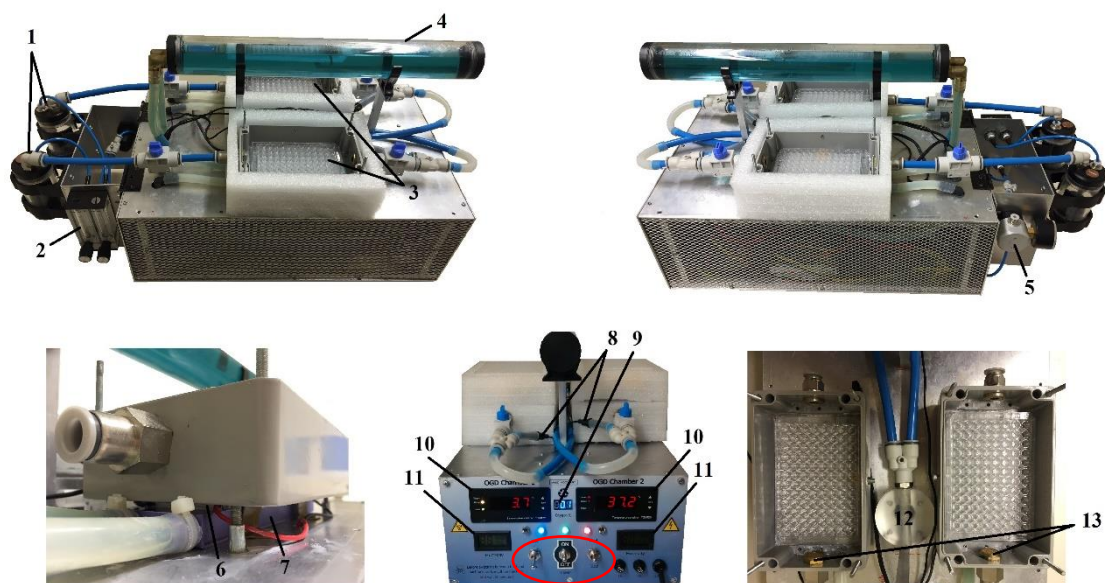
**8. ábra** Az oxigénszint kijelző áramkör tervezett működése. A vízszintes tengelyen a szenzorból érkező feszültséget, a függőleges tengelyen a kijelzőn látható értéket mutatja az ábra.

### **6.1.7 Vezérlés**

A készülék előlapján három kapcsoló található (9. ábra): 1 darab kétállású, amivel ki és bekapcsolható a rendszer, illetve 2 darab 3 állású, amivel az egyes kamrák Peltier-elemeit lehet fűtésre, hűtésre vagy kikapcsolt állapotra állítani. A két termosztát is az előlapon kapott helyet. A kamrák hőmérséklete egymástól függetlenül szabályozható. Nagyon fontos, hogy a Peltier kapcsolójával kiválasztott (hűtés vagy fűtés) üzemmóddal összhangban legyen a termosztát beállítása. A rendszert károsíthatja az ellentétes beállítás.

### **6.1.8 Moduláris felépítés**

A nitrogén áramlási sebességét külön rotaméterekkel tudjuk szabályozni, hogy egymástól független módon is lehessen a kamrákat mindkét üzemmódban használni. A kamráknak saját párasító tartálya van, valamint a be- és kimeneti pontokon szelepek segítségével leválaszthatók a rendszerről. A különböző hőmérsékleten történő kísérletek eltérő páratartalmat igényelnek így két páraszenzort alkalmaztunk. A Peltier-elemek is külön be- és kikapcsolhatók az egyes kamrák alatt. A fentiek alapján indíthatunk hideg-hideg; hideg-meleg; meleg-meleg OGD vizsgálatokat akár egymástól független időben is, vagy csak az egyik kamrát használva. Az elkészült rendszert, illetve a főbb alkotórészeket a 9. ábra szemlélteti (Bago és mtsai 2018).



**9. ábra** Az OGD modell. 1. párasító tartályok, 2. rotaméter, 3. kamrák, 4. puffer tartály, 5. precíziós szelep, 6. Peltier-modul, 7. vizes blokk, 8. páraérzékelők, 9. oxigénszint kijelző, 10. termosztát, 11. páratartalom kijelző, 12. oxigénszenzor, 13. hangtompító. Pirossal jelölve a fő kapcsoló (középen), illetve a funkciókapcsolók (hűtés, fűtés) láthatók.

### 6.1.9 Szövetkultúra

A szövetkultúrák vizsgálatokat patkányból izolált calvaria csont graftokon végeztük. A minták begyűjtése 3-4 hónapos, ~350 g tömegű hím Wistar patkányokból történt (Bago és mtsai 2018).

#### 6.1.9.1 Izoláció

Az állat szén-dioxiddal végzett feláldozása után a fejrész eltávolításra került. Középvonali bemetszéssel feltártuk a koponyacsontot ügyelve, hogy minimális sérülést okozzunk a szöveten. Ezt követően egy egyedileg készített sztereotaxiás keretben rögzítettük a mintát, majd állványos fúróba helyezve 4 mm-es trepán fúróval 4 darab csontpogácsát izoláltunk a parietális és frontális régiókból. A fúrás során ügyeltünk, hogy a koponyavarratokat ne érintse a fúrás, tekintettel arra, hogy itt más fajta és funkciójú sejtek találhatóak. Az irodalmi adatok alapján a fúrás sebességét 850 RPM-re állítottuk (Reingewirtz és mtsai 1997). Ezzel optimalizáltuk a fúrás időt, illetve minimalizáltuk a folyamat közben termelődő hőt, amely károsíthatja az izolált szövetet.



#### 6.1.9.2 *Növesztés*

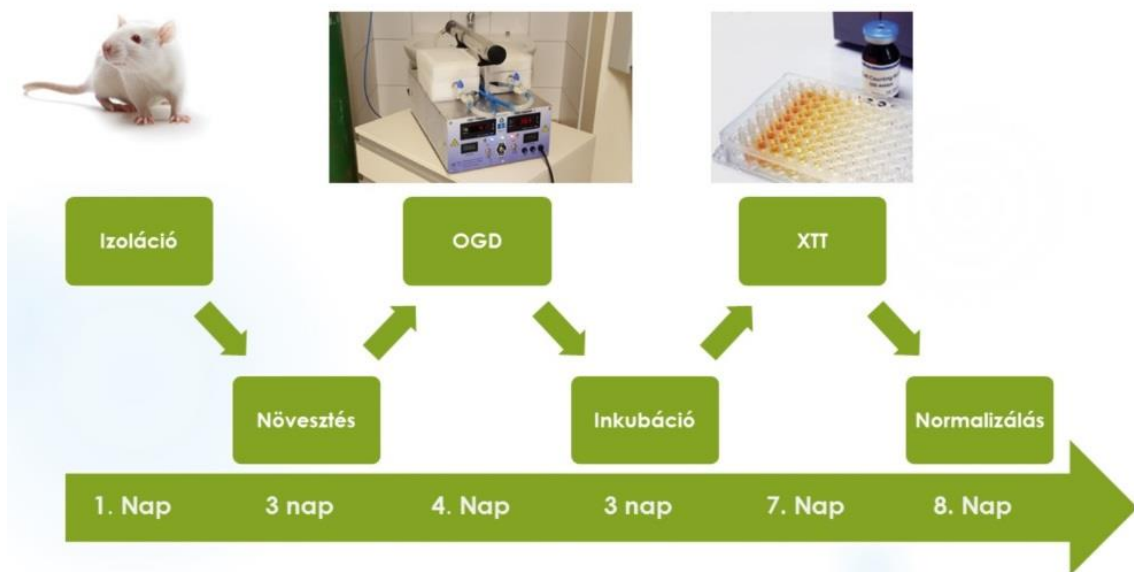
A mintákat 37 °C-os összejtmediumban (DMEM, 10% FBS, 5% L-glutamine, 1% penicillin-streptomycin, Lonza) gyűjtöttük az izoláció végéig, majd az inkubáció előtt ollóval eltávolítottuk a peremen lévő csontszilánkokat és egyéb törmelékeket. Ezzel biztosítva a csont graftok egységes átmérőjét és tömegét. Ezt követően 3 napig inkubáltuk a mintákat 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> környezetben, összejttenyésztő mediumban.

#### 6.1.10 **Kísérletindítás**

Párhuzamosan végeztünk hideg (4 °C) és meleg (37 °C) OGD vizsgálatot csoportonként n=12 mintán. A meleg OGD esetében 37 °C-ra melegített glükózmentes, tenyésztő oldatot használtunk, míg hideg OGD-nél melegítés nélkül adtuk a mintákhoz a médiumot, ezzel modellezve a transzplantáció során alkalmazott hűtőfolyadék hatását. A mintákat 24 lyukú tenyésztő lemezbe helyeztük az előmelegített, illetve előhűtött kamrákba. Az OGD-t követően a minták friss tenyésztő oldatba kerültek és 3 napos inkubációval (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) modelleztük a reperfüziós időszakot. A kísérlet menetét a 10. ábra szemlélteti (Bago és mtsai 2018).

#### 6.1.11 **Szövet viabilitás mérés**

A kísérletek kiértékelésére elterjedt módszer a különböző kolorimetriás tesztek alkalmazása (MTT, XTT) (Fan és mtsai 2016, Wang és mtsai 2011, Prakash és mtsai 2019). Ennek megfelelően a sejtek életképességének mérését kolorimetriás XTT (sárga tetrazolium) vizsgálattal végeztük a gyártó utasításai szerint (Roehm és mtsai 1991). A mintákat 96 lyukú tenyésztő lemezre tettük és hozzá adtuk az XTT médiumot majd 4 órára inkubáltuk (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>). Az inkubációt követően a mintákat szárító kamrába helyeztük 1 napra, majd egyenként lemértük a csontpogácsák tömegét. A szárítás előtt az XTT oldat optikai denzitását mértük 460/620 nm hullámhosszon spektrofotométerrel (BioTek PowerWave XS, Gen5 software). A sejtek metabolikus aktivitását abszorbanciaként, száraz tömegre normalva fejeztük ki.



**10. ábra** Az OGD protokoll időbeli lefutása. A kísérlet ideje 8 nap az ábrán látható beosztással: 1. nap minta izoláció, majd 3 nap inkubáció; a 4. napon történik az OGD, amit ismét 3 napos inkubáció követ; a 7. napon a sejtek túlélési arányát kolorimetriás alapon, XTT-teszttel határozzuk meg, amelynek végén a mintákat szárító kamrába helyezzük; 1 nap szárítás után a 8. napon lemérjük a száraz csontminták tömegét és normalizáljuk a kolorimetriás adatokat.

## 6.2 Alvási apnoe modell (OSA), eszköze fejlesztés

Az alvási apnoe modellezéséhez Xu és munkatársai által használt protokoll paramétereit vettük alapul:  $\sim 60 \frac{l}{perc}$  áramlási sebesség, 90 s periódus idő, amely során az  $O_2$  értéke 5,7, illetve 21%,  $\sim 50\%$  páratartalom, 22-24 °C hőmérséklet (Xu és mtsai 2004). Az igényeknek megfelelően folyamatosan változó  $O_2$ -koncentrációt kell biztosítani a kísérlet alatt. Két módszer lehetséges: 1. előre kevert gázokkal dolgozunk, és egy időzítővel kapcsoljuk, hogy melyik periódusban, melyik keverékkel szellőztetjük a rendszert, 2. automatikus módon szelepekkel és vezérlő rendszerrel állítjuk elő a beállított keveréket. Mindkét megoldásnak van előnye és hátránya. Az első esetben nagy pontossággal és stabilan tudjuk az  $O_2$ -szintet fenntartani, de a rendszer csak a kikevert koncentrációkkal tud dolgozni. Továbbá az egyedi keverékek általában jóval költségesebbek, mint a standard gázok. A második esetben a rendszer szabadon beállítható, de bonyolultabb vezérlő elektronikát igényel. Összegezve a lehetőségeket az automata kialakítás mellett döntöttünk, ezzel is elősegítve a kamra univerzális használhatóságát.

A rendszer programozható logikai kapu mátrix (FPGA) fejlesztői kártyán (Digilent Basys2) alapul, és szakaszos vagy folyamatos hipoxia funkciót biztosít, beépített zajcsökkentéssel (állatkísérlethez). A beállított oxigénkoncentrációt a nitrogén és levegő megfelelő keverésével lehet előállítani. A folyamat folytonos és PID vezérlővel szabályozott. Manuálisan csak a gázforrások nyomásértékét kell beállítani ezt követően a vezérlő irányítja a szelepeket. Alkalmas ciklikusan ismétlődő protokoll használatára is.

### **6.2.1 Kamraválasztás**

A korábban megfogalmazott igényeknek megfelelően olyan kamrára volt szükség, amelyben minimális stresszhatás éri az állatokat, elegendő hely van 6-8 egeres kísérlethez, megfelelően szigetelt, valamint az ivóvíz és tápellátás biztosított. Ezek alapján úgy döntöttünk, hogy már meglévő laboratóriumi állat ketrecet választunk és alakítunk át a modell szerint. Nagyobb állatházakban, illetve érzékeny kísérletek esetén az állatokat steril környezetben tartják. Kifejezetten erre a célra gyárt ketreceket a Tecniplast cég, amely szigeteléssel és szűrőbetéttel ellátva biztosítja a kamrák környezettől független, homogén szellőztetését. A modellünkhöz a GM500 típusú ketrec bizonyult a legalkalmasabbnak. A doboz felső részéből eltávolítottuk a szűrőbetétet és lezártuk egy plexi lappal. Később ebbe a lapba ültettük be a kamrai oxigénszenzort, illetve az elektronika is itt került rögzítésre. Az eredeti csatlakozókat eltávolítottuk és a saját rendszerünknek megfelelő átalakítókat helyeztünk a nyílásokba. A kamra szerkezetén más módosítás nem történt.

### **6.2.2 Pneumatika**

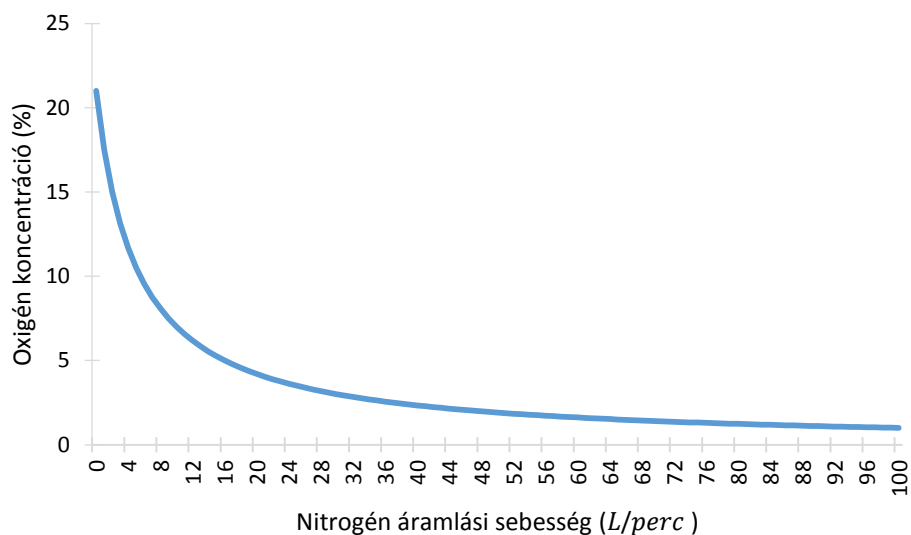
Az előző fejezetben bemutatott OGD modell fejlesztéséhez képest ennél az eszköznél jóval bonyolultabb pneumatikai és szabályozó rendszert kellett alkalmaznunk a tetszőlegesen beállítható oxigénkoncentráció miatt. OGD üzemmód esetén a korábbi kamrához hasonlóan ebben az esetben is tiszta nitrogént áramoltatunk át a kamrán. Ebben a funkcióban a rendszer nem igényel pneumatikai szabályozást. Az obstruktív alvási apnoe kísérlethez használt oxigénszintet a nitrogén és a levegő adott arányú keverésével tudjuk előállítani. A szabályozást egy fixen beállított paraméterhez képest

végezzük. Jelen esetben ez azt jelenti, hogy egy folyamatos alacsony sebességű ( $5 \frac{l}{perc}$ ) levegőáramláshoz igazítjuk a nitrogén átfolyást.

A modell további kritériuma, hogy minimális idő alatt történjen meg az  $O_2$ -koncentrációk közti átállás. A szelepválasztást előzetes számítások alapján végeztük. A szabályozás miatt alkalmazott  $5 \frac{l}{perc}$  levegő áramlás esetén tudnunk kell, hogy mi az a minimális nitrogén áram, amivel a kívánt  $O_2$ -koncentráció elérhető. A számításhoz a 4.10. képletet használtuk:

$$4.10. \quad O_2 = 100 - \left[ \frac{v_{nitrogén}}{v_{teljes}} + \left( \frac{v_{levegő}}{v_{teljes}} \right) * 0,79 \right] * 100$$

ahol  $O_2$  az egyensúlyi oxigénkoncentrációt,  $v_{nitrogén}$  a nitrogénáramlás sebességét,  $v_{levegő}$  a levegőáramlás sebességét,  $v_{teljes}$  a teljes gázáramlás sebességét jelöli. A zárójelben a gázáramban lévő tiszta nitrogén arányát számoljuk. Százalékos formában a különbségből kapjuk a keverékben lévő oxigén mennyiségét. A 11. ábra szemlélteti a különböző nitrogén áramokkal elérhető minimális oxigénkoncentrációt.



**11. ábra** Az OSA modellhez számított oxigén koncentráció értékek a nitrogén áramlás függvényében. A 4.10. képlet alapján kiszámolt oxigénkoncentráció értékek, különböző nitrogén áramok és az állandó, szabályzó levegőáramlás ( $5 \frac{l}{perc}$ ) mellett.

A 4.10. képlet és a 11. ábra alapján látható, hogy az obstruktív alvási apnoe modellhez szükséges 5,7%  $O_2$ -szint eléréséhez legalább  $14 \frac{l}{perc}$  nitrogénáramra van

szükségünk. A következő kérdés, hogy mennyi idő alatt érhetjük el a beállított értéket a fenti paraméterekkel? Az egyensúlyi koncentráció kialakulásához szükséges időt a 4.11. képlettel közelítettük:

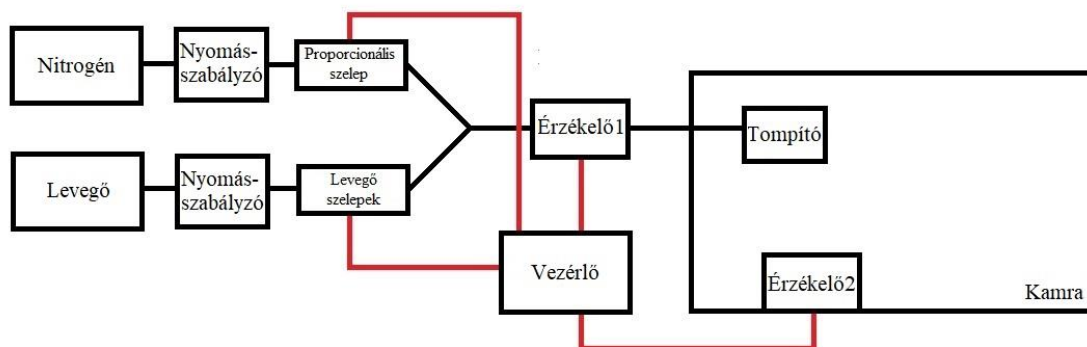
$$4.11. \quad t = \frac{V_{kamra}}{v_{teljes}/60} * \ln\left(\frac{21}{O_2}\right)$$

ahol  $t$  az időt,  $V_{kamra}$  a doboz térfogatát,  $v_{teljes}$  a teljes gázáramlás sebességét ( $v_{nitrogén} + 0,79 * v_{levegő}$ ),  $O_2$  az elérni kívánt oxigénkoncentrációt jelöli. A 4.11. képlet tiszta, oxigénmentes gázárammal számol így az alkalmazott folyamatos levegőáramlás miatt a rendszer sebessége valamivel lassabb lesz a számolt értéknél. A korábban meghatározott paramétert behelyettesítve a következő időtartamot kapjuk:

$$4.12. \quad t = \frac{11l}{\left(14\frac{l}{perc} + 3,95\frac{l}{perc}\right)/60} * \ln\left(\frac{21}{5,7}\right) \cong 48 \text{ s}$$

A tervezett 90 s periódus több mint 50%-a alatt lenne elérhető a beállított szint és a szabályzáshoz szükséges időt még nem számoltuk bele. Mindenképp nagyobb nitrogén áramot kell használnunk a gyorsabb gázcsere érdekében. Az állatokra és a rendszer szerkezeti tulajdonságaira való tekintettel a maximális gázáramlást  $60 \frac{l}{perc}$ -ben határoztuk meg. Ennél az értéknél a 4.12. képlet alapján 15 s körüli idővel számolhatunk. A normoxiás periódusban sűrített levegőt használunk az oxigénszint helyreállításához. A szükséges levegőt kompresszorral állítjuk elő, szabályozásra nincs szükség olyan értelemben, mint a nitrogén esetében. A kompresszor miatt a gázforrás korlátlanul tekinthető így az üzemi nyomást és áramlási paramétereket empirikus úton állítjuk be, úgy, hogy a gáz csere ideje megegyezzen a hipoxiás fáziséval.

A pneumatikai rendszer ezen megfontolások alapján három szelepből áll: 2 darab proporcionális (24 V SMC PVQ13 0,8 mm átmérő, PVQ31 2,3 mm átmérő) és 1 darab „on-off” szelep (230 V szolenoid). A hipoxiás periódusban a két proporcionális szelep állítja elő a megfelelő keveréket. Az előzőek szerint az egyik proporcionális szelep fixen alacsony beállításon eresztí át a sűrített levegőt. Ez a mennyiség azonban nagyon lassan állítaná vissza a normoxikus szintet így erre a célra egy nagy áteresztésű „on-off” szelepet alkalmaztunk. A pneumatikai rendszer vázlatát a 12. ábra szemlélteti (Polšek és mtsai 2017).



**12. ábra** Az obstruktív alvási apnoe modell pneumatikai felépítése. A gázforrások (nitrogén, levegő) nyomás szabályzókon keresztül kapcsolódnak a szabályozható szelepekhez. A szelepek vezérlésével a kívánt oxigéntartalmú gáz előállítható, amit az „Érzékelő 1” szenzor ellenőriz. A kamrában a hangtompító rendszer biztosítja a halk és homogén gázáramlást. Az „Érzékelő2” szenzorral a kamrában kialakuló valós koncentrációt mérjük és csatoljuk vissza a „Vezérlőhöz” (piros színnel jelölt összeköttetések) (Polšek és mtsai 2017).

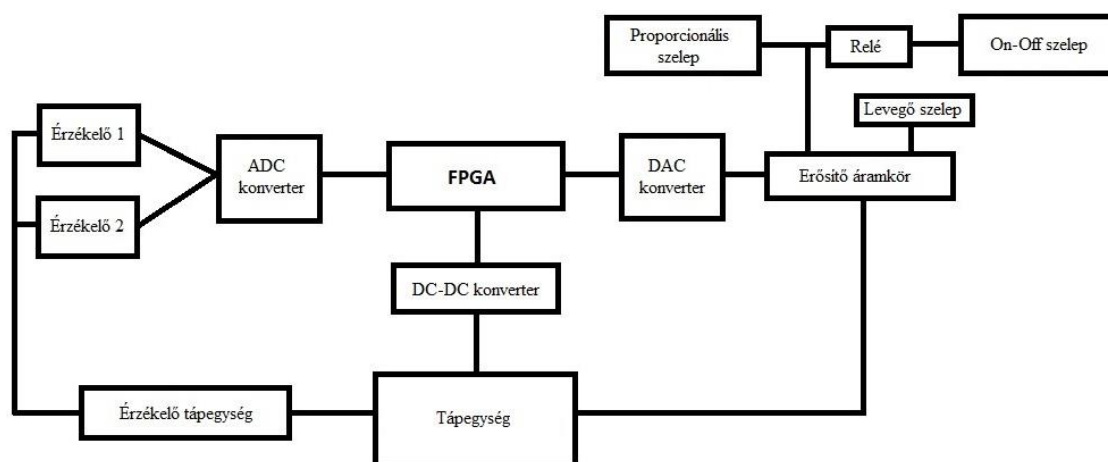
A nitrogén esetében 2 bar nyomás mellett teljesen nyitott szelepnél  $50 \frac{l}{perc}$  átfolyás érhető el. A levegőt kompresszor segítségével állítottuk elő (SAI2088, SMC, USA) 1,8 bar nyomáson. A kompresszor beépített olajsűrővel volt ellátva. A szelepek bemeneti ágába folytószelepeket és manométereket építettünk a finomszabályozás érdekében.

Állatkísérleteknél a kívánt páratartalom 50-60% körül van. Ennek előállítását úgy valósítottuk meg, hogy a nitrogén ágban nem alkalmaztunk párasítást, viszont a levegő szelepek kimenetére párasító tartály került az OGD modellhez hasonló buborékolató megoldással. Az egységes 90s periódusok alatt az állatok felváltva kaptak párást, illetve száraz gázkeveréket.

Ezt követően a nitrogén és levegő ágakat egyesítettük és oxigénérzékelőt (12. ábra - Érzékelő 1) építettünk a közös csőbe. Ennek célja, hogy csökkentsük a késleltetést, amit a kamrában „lassan” kialakuló koncentrációváltozás okoz. Az érzékelő csőből a keverék a kamrába jut, ahol egy pneumatikai elosztóban 4 darab hangtompítón keresztül áramlik ki a dobozba. A hangtompítók biztosítják az alacsony zajszintet és a homogén áramlást. A rendszer nyomásmentes környezetre lett tervezve, így a doboz kimenete folyamatosan nyitott. A második oxigénérzékelő a kamrán belüli oxigénszintet méri.

### 6.2.3 Elektronika

A modell elektronikai felépítését a 13. ábrán látható blokkdiagramm szemlélteti. Már említett módon két darab oxigénérzékelőt (Alphasense O2-A2) használtunk a szabályozás késleltetésének csökkentésére. Könnyen belátható, hogy a szelepek utáni csőrendszer térfogata sokkal kisebb, mint a kamra űrtartalma így az egyensúlyi állapot is előbb jön létre. A kamrában történő változások jelentős késleltetéssel jutnak vissza a szabályozóhoz így a finomhangolás nehézkessé vagy akár lehetetlenné válik egy darab szenzor alkalmazásával. A rendszer gázcsere közben engedi, hogy a beállítottnál alacsonyabb oxigéntartalmú keverék jusson a kamrába, azonban ahogy a kamrán belüli érzékelő is közeledik a beállított értékhez a csőben is ennek megfelelően emelkedik az oxigénkoncentráció.



**13. ábra** Az obstruktív alvási apnoe modell elektronikai felépítése. A rendszer vezérlését egy programozható logikai kapu mátrix (FPGA) végzi. Az oxigénszenzorok digitalizált (ADC konverter) jelét fogadja, majd az értékek és a programkód alapján digitális vezérlő jelet állít elő. A DAC konverter alakítja analógjellé és küldi tovább a vezérlő jelet. A két csatornás erősítő a szelepeknek megfelelő tartományra erősíti a vezérlő jel feszültségét. A nitrogént és a levegőt szabályzó (Proporcionális és On-Off szelepek) szelepeket egy relé köti össze az On-Off szelep eltérő feszültség szintje (230 V) miatt. A tápegység a szelepeknek megfelelő 24 V-ot állít elő. Az FPGA kártya 5 V-os feszültségét DC-DC átalakítóval hozzuk létre, illetve a szenzor 12 V-os tápellátását külön áramkörrel valósítjuk meg.

Az érzékelőkből érkező jelet egy precíziós ellenálláson ( $165 \Omega$  0,1%) vezetjük át és a rajta megjelenő feszültséget a 16. ábra szerint (0,66-3,3 V) kapcsoljuk az analóg-digitális átalakító kártyára (ADC). Az ADC kártya (Digilent Pmod AD1) az FPGA

modul bővítő kártya csatlakozóihoz kapcsolódik (14. ábra). A szenzorok analóg jelét digitális formában továbbítja az FPGA processzor felé. A fejlesztőkártyára írt VHDL kód feldolgozza a beérkező adatot, majd a beállítások és a PID szabályzó alapján előállítja a szelepeket vezérlő jelet. A digitális értéket egy digitális-analóg átalakító (DAC) kártyára (Digilent Pmod DA2) küldi, melynek kimenetén analóg feszültség formájában jelenik meg, 0-3,3 V tartományban. Természetesen ez nem elegendő a szelepek meghajtásához így szükség van egy erősítő áramkörre, ami a 0-3,3 V feszültségből 0-24 V tartományban mozgó vezérlő jelet állít elő.

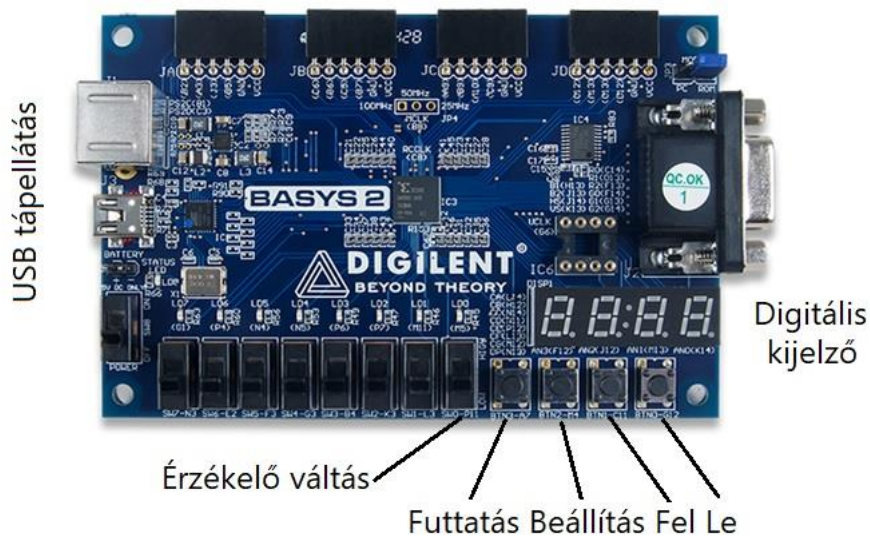
A kapcsolat egyik csatornáját a 15. ábra mutatja a szimulált működési karakterisztikával. Az SMC PVQ31 proporcionális szelep 24 V-on maximálisan 165 mA áramot vesz fel, de a kapcsolást a biztonság és a későbbi módosíthatóság kedvéért 500 mA-re terveztük. Az áramkörben használt tranzisztor (IRF9540) bőven elegendő ilyen teljesítmény esetén. A kapcsolatban  $R_t$  ellenállás modellezi a szelepet ( $24 \text{ V} / 500 \text{ mA} = 48 \Omega$ ).

A kisebb PVQ13-as szelep biztosítja a szabályozó levegőáramot. 1 bar nyomás mellett a szelep teljesen nyitott állapotban ( $24 \text{ V} / 80 \text{ mA}$ ) körülbelül  $5 \frac{\text{l}}{\text{perc}}$  áramlást szolgáltat. A szakaszos hipoxia üzemmód alatt a szelep folyamatosan nyitott állapotban üzemelt. A levegőáramlás esetén nincs szükség szabályozásra, hiszen nem tudjuk „túl” tölteni a rendszert. Az egyetlen paraméter a nyomás, ami a gázcsere idejét fogja meghatározni. Ennek megfelelően elegendő egy sima on-off típusú szelep. Egy 230 V-os szolenoiddal szerelt változatot használtunk, amit az erősítő áramkör, illetve a DAC kártya nem tud közvetlenül meghajtani. A szelep ki-be kapcsolását egy 230 V-os relével oldottuk meg. A relé tekercse a PVQ31 szelep feszültségét figyelte DC-DC konverteren keresztül, 0 V esetén nyitotta egyéb esetben zárta a levegőáramlást.

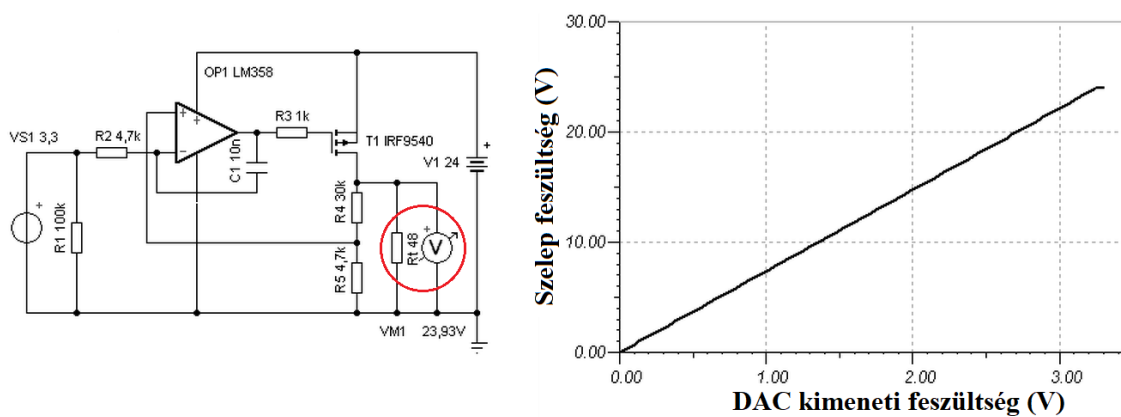
A rendszer tápellátását a Mean Well 24 V / 2 A / 48 W egység biztosította. DC-DC konverterrel állítottuk elő az FPGA működéséhez szükséges 5 V feszültséget, illetve az oxigénérzékelők 7812 típusú feszültség szabályozón keresztül üzemeltek (16 ábra). Az elektronika dobozolását egy számítógép tápegységházában valósítottuk meg. A szelepek és a hálózati csatlakozók a hátlapon kaptak helyet. Az előlapon 2 darab feszültségmérő mutatja az aktuális szelepfeszültségeket. A vezérlőegység a fedőlapon keresztül elérhető.



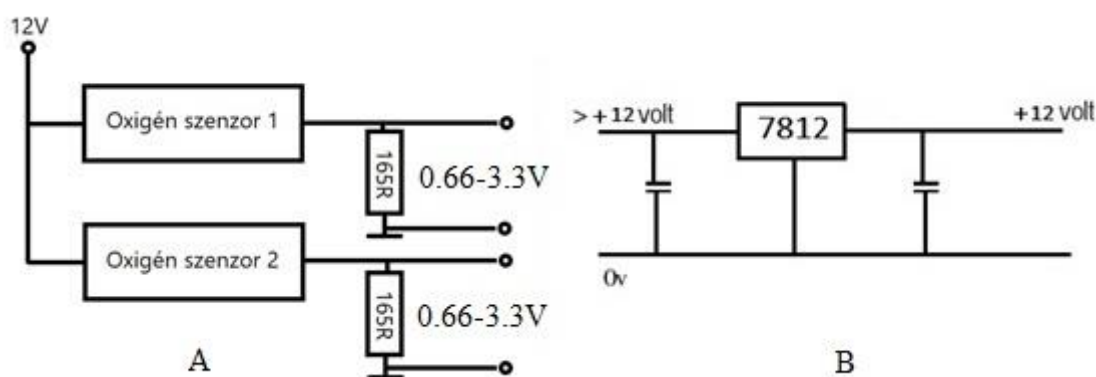
## Bővítő kártyák csatlakozása ADC/DAC



**14. ábra** Az obstruktív alvási apnoe modellt irányító FPGA fejlesztőkártya. A kártya felső részéhez csatlakoznak az ADC és DAC modulok, a bal oldalon található a tápellátás és programozó csatlakozók (USB), az alsó részen lévő nyomógombok, kapcsolók és 7 szegmenses kijelző biztosítja a paraméterbeállítást.



**15. ábra** A proporcionális szelepeket meghajtó erősítő. A DAC kártya kimeneti feszültségét (VS1 0-3,3 V) a proporcionális szelepek működési tartományra (0-24 V) erősítő áramkör egyik csatornája látható az ábrán. Az áramkör pirossal jelölt része modellezi a szelep terhelését. A jobb oldali ábra az áramkör szimulált működését mutatja. A vízszintes tengelyen a DAC konverter kimeneti, a függőleges tengely a szelep feszültsége látható.



**16. ábra** Az oxigénszenzorok tápellátása és a szenzor feszültség előállítása. **A**; A szenzorok a mért koncentráció alapján 4-20 mA áramerősséget vesznek fel a tápegységből. A precíziós ellenállásokkal ezt 0,66-3,3 V feszültséggé alakítva kapcsoljuk az ADC konverterhez. **B**; Az oxigénszenzorok tápfeszültségét előállító kapcsolás. Az áramkör bemenetére a rendszer tápfeszültségét (24 V) kapcsolva a kimeneten stabil 12 V feszültség jelenik meg.

#### 6.2.4 Vezérlés

A rendszer alkalmas folyamatos hipoxiás (OGD kísérletekhez) és szakaszos hipoxiás működésére is. A beállítás során választhatunk a funkciók közül. Az FPGA kártyán lévő software tartalmaz egy menürendszert, amelyben beállítható az adott periódus oxigénkoncentrációja, hossza és a teljes program időtartama. A programkód VHDL nyelven íródott a Xilinx ISE fejlesztő környezetben. A menü rendszer hat pontot tartalmaz:

1. Aktuális oxigénkoncentráció kijelzése (a kijelzőn „A o2” felirat jelenik meg 3 s ideig).
2. Az első periódus alatti oxigénkoncentráció (a kijelzőn „o2 1” felirat jelenik meg 3 s ideig).
3. Az második periódus alatti oxigénkoncentráció (a kijelzőn „o2 2” felirat jelenik meg 3 s ideig).
4. Az első periódus hossza (a kijelzőn „t1” felirat jelenik meg 3 s ideig).
5. Az második periódus hossza (a kijelzőn „t2” felirat jelenik meg 3 s ideig).
6. Ismétlés száma (a kijelzőn „Loop” felirat jelenik meg 3 s ideig).

Az első menüponton maradván látható az érzékelők valós időben mért jele. A fejlesztőkártyán lévő kapcsolóval lehet a két szenzor között váltani. A paraméter

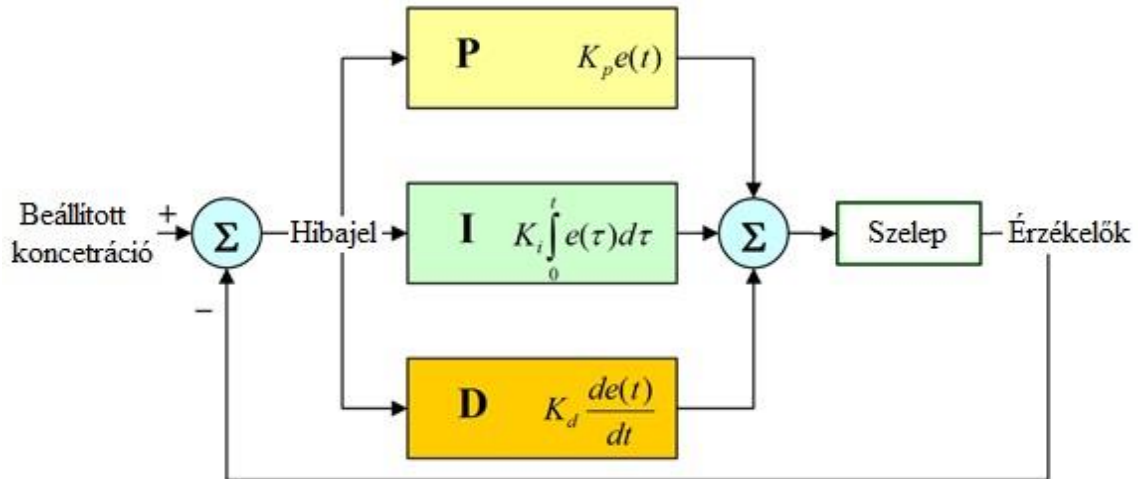
beállítás alatt ez a funkció nem elérhető. A fejlesztőkártya „beállítás” nyomógombját (14. ábra) hosszan lenyomva jutunk a beállítás üzemmódba, amit a kijelző villogása jelez. Ekkor beállítható az első és második periódus oxigénszintje (00,00-30,00% között), illetve a hossz másodpercben megadva (0000-9999 s között). A program indításához legalább az egyik periódus időt és az ismétlés számot nagyobb, mint 0-ra kell állítani. Az ismétlés beállítható tartománya a periódus időhöz hasonlóan 0001-9999 között választható. A megadható értékekből könnyen kiszámolható, hogy a leghosszabb szakaszos program több mint 6 év 4 hónapig futna, ami már összevethető a kísérleti állatok várható élettartamával.

Amennyiben csak egy periódust használunk a rendszer a hozzárendelt oxigénszintet fogja beállítani és fenntartani (OGD modell-re alkalmas üzemmód). Természetesen elérhető ugyanez az üzemmód, ha mindkét periódus oxigénkoncentrációját ugyanarra az értékre állítjuk. Ettől eltérő esetben a kamra szakaszos hipoxiás üzemmódban van (a tervezett felhasználás mellett az egyik periódus mindig normál oxigénkoncentrációra van állítva). A beállítás végén a rendszer automatikusan kilép a beállítás üzemmódból, ha 3 s-ig nem nyomunk gombot. A beállított program az „indítás” nyomógomb hosszú megnyomásával indítható. Az indítást követően a rendszer mindig az első periódusnak megfelelő értékekre áll be. Az elkészült rendszert a 18. ábra szemlélteti (Polšek és mtsai).

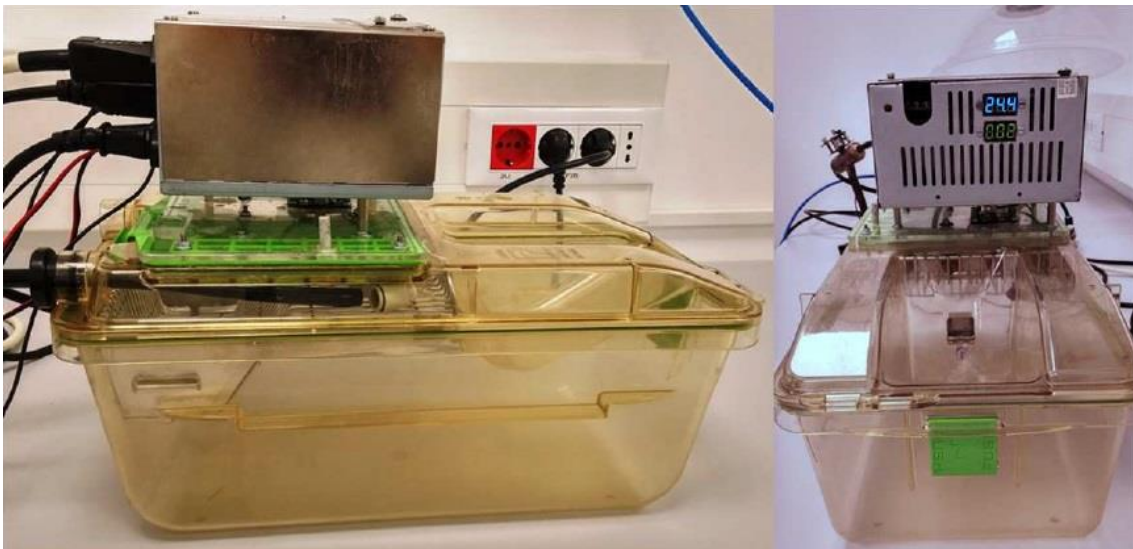
### **6.2.5 PID szabályzó**

A szelepek vezérlését az FPGA kódban lévő PID modul (17. ábra) végzi. A hiba jelet a két szenzor közti eltérésből, illetve a kamra oxigénkoncentrációja és a beállított szint különbségéből számoljuk. Ennek megfelelően, amíg a kamrában nem érjük el a beállított értéket addig a rendszer lehetővé teszi, hogy a beáramló gáz oxigéntartalma a tervezettnél alacsonyabb legyen a gyorsabb gázcsere érdekében. A vezérlő kikapcsol, ha a kamrában lévő szenzor jele a beállított érték  $\pm 0,5\%$ -os tartományában van. A működés lényege, hogy a bejövő gázkeveréket finoman hangoljuk a második szenzor jele alapján. Vagyis, ahogy közelít a kamrai oxigénszint a beállított értékhez úgy közelítjük a beáramló gázkeverék koncentrációját is. A folyamat eredménye, hogy a beáramló gáz és a kamra oxigénkoncentrációja a hibahatáron belül azonos értékű lesz, ami éppen a beállított oxigénszint. A takarékoság miatt, ha a koncentráció stabil (nem változik 3 s

alatt a tőrésatár felett), akkor a rendszer elmenti a szelep beállítást és lekapcsolja az átáramló gázt. Amint eltérés tapasztalható a szelep újra nyit a mentett paraméterekkel.



**17. ábra** A szelepek vezérlő jelét előállító szabályzó működési elve. A rendszer a beállított és a szenzorok segítségével mért jelekből hiba jelet számol (eltérés az aktuális és a beállított O<sub>2</sub> értékek között). A hiba jelet három modul dolgozza fel: proporciónális (P), integráló (I), deriváló (D). A modulok paramétereivel K<sub>p</sub>, K<sub>i</sub>, K<sub>d</sub> finom hangolható a szabályzás. A modulok kimenetét összegezve áll elő a szelepek vezérlőjele.



**18. ábra** A megvalósult obstruktív alvási apnoe modell. A vezérlő egység előlapján a proporciónális szelepek feszültsége látható. A modell egy szabványos állatketrecből lett kialakítva (Polšek és mtsai 2017).

A szabályzó paramétereinek megválasztása kritikus. Rosszul beállított értékekkel a rendszer instabil vagy oszcilláló állapotba is kerülhet. A paraméterekkel a rendszer beállási karakterisztikája is meghatározható (beállási idő, túllövés mértéke). A PID típusú szabályzók irodalma igen széles körű így a dolgozat nem tér ki a részletes ismertetésre (Bansal és mtsai 2012). Jelen munka során a  $K_p$ ,  $K_i$ ,  $K_d$  értékeket empirikus módon határoztuk meg.

## 6.2.6 Állatok

A kísérletben TLR2-luc-GFP transzgenikus egereket használtunk a hipoxia hatására bekövetkező TLR2 aktiváció vizualizációjára (Szakaszos (intermittent) hipoxiás csoport (IH),  $n=7$ ; Kontroll csoport (CTRL),  $n=7$ ). Az állatokat a Zágrábi Orvostudományi Egyetem Agykutató Intézetének (Croatian Institute for Brain Research) állatháza biztosította. A nappali és éjszakai ciklusok 12-12 órák voltak (7:00-19:00-7:00). Az itatás és etetés ad libitum módon zajlott (a kísérlet közben is). Az állatok ketrece alommal és búvóhelynek alkalmas tárgyakkal volt ellátva. A tároló helyiségek hőmérséklete és páratartalma szabályozott volt. Hím,  $85\pm 20$  napos egerek közül véletlenszerűen válogatva alakítottunk ki két csoportot (IH  $n=7$ , CTRL  $n=7$ ). A kontroll csoportban lévő állatok a kísérlet alatt ugyanabban a helységben ugyanakkora dobozban voltak, így a környezeti paraméterek mindkét csoportnál megegyeztek. Ennek célja, hogy a kísérlet során megjelenő tényezők zaj, stressz, egyéb zavarok ugyanolyan hatással legyenek mindkét csoportra.

### 6.2.6.1 TLR2 receptor

A TLR2 (Toll-like receptor 2) egy membrán fehérje, amely fontos szerepet játszik az immunrendszer működésében (Wikipédia (c) 2021). Többek közt mikroglia-sejteken, Schwann-sejteken és monocitákon expresszálódik. Iszkémiás károsodás, gyulladásos vagy immunfolyamatok hatására aktiválódik (Lalancette-Hébert és mtsai 2017). A génmódosított állatokban a TLR2 gén transzkripciója luciferáz enzimhez csatoltan jön létre. A szubsztrát anyag (D-luciferin) hasítása közben biolumineszcens fény keletkezik. A folyamat segítségével kimutatható a hipoxiás károsodás mértéke. A vizsgálat során biolumineszcens molekuláris képalkotó kamerával (Xenogen IVIS-200, Caliper LifeSciences) jelenítettük meg az élő állatok agyában stresszhatására létrejövő TLR2 transzkripció aktivitást.

### 6.2.7 Használati protokoll

A hipoxiás csoportban lévő állatokat napi 8 órában 21 napig kezeltük. A kísérlet közben 90 s periódusonként változtattuk az oxigénkoncentrációt (5,7% / 21%). A megfelelő gyorsaság érdekében a nitrogén áramlási sebességét  $50 \frac{l}{perc}$  értékre, nyomását 2 bar-ra állítottuk. A kompresszor 1,2 Bar nyomáson csatlakozott a rendszerbe.

A kezelést követően a fent említett módon Xenogen IVIS 200 típusú kamerával vizsgáltuk a hipoxia agyra gyakorolt hatását. A rendszer alkalmas *in vivo*, illetve *in vitro* képalkotásra is. Egyszerre akár 5 egeret is vizsgálhatunk. A készülék egy rendkívül érzékeny kamerával van ellátva, amely speciális optikai szűrők segítségével képes fluoreszcens, illetve lumineszcens fénydetektálásra. A szekvenciális felvételek alapján a fényforrás térbeli helyzete is meghatározható. A felvételek kiértékelését az IVIS 200 software-el végeztük (OICF 2017).

25 perccel a felvétel előtt az egereknek intraperitoneális úton D-luciferint fecskendeztük be ( $150 \frac{mg}{kg}$ ,  $20 \frac{mg}{ml}$  D-luciferin 0,9%-os sóoldatban). Ezt követően az állatokat 2% izoflurán és 100% oxigén keverékével altattuk  $1,5 \frac{l}{perc}$  áramlás mellett. A felvétel előtt az állatok fejrészéről és egy szabadon választott referencia pontról (hát alsó szakasza) eltávolítottuk a szőrt. A felvétel közben az állatok fűtött lemezen voltak és folyamatos altatásban részesültek. Ezt követően az állatok visszakerültek a ketrecükbe és a korábban említett módon tartottuk őket az intézet állatházában.

### 6.3 Hipoxia tűrőképesség

A sejt- és szövettani kísérleteken túl kíváncsiak voltunk a hipoxiás állapot adaptációs folyamataira is. Ehhez humán vizsgálatokat folytattunk, ahol az egyes szervrendszerek reakcióját mértük levegő megvonás közben. A mérésbe olyan szabadtüdős bűvárokat vontunk be, akik rendszeresen végeznek hipoxiás edzéseket. A kontrol csoportba szabadtüdős bűvármúlittal nem rendelkező egyének kerültek.

Ezt követően olyan módszert kerestünk, amely alkalmas lehet a hipoxia tűrőképességet bizonyos élettani paraméterek közti különbség formájában kimutatni a kontroll és a bűvár csoportok között. A mért jellemzők: véroxigén szint, erőltetett

kilégzési vitálkapacitás. Ezen felül különböző képkalkoló eljárásokkal a hipoxia hatására bekövetkező lépreakciókat is vizsgáltuk.

### **6.3.1 Csoportok meghatározása**

Először is definiálni kellett, hogy mi alapján alakítjuk ki a vizsgálati csoportokat. Az irodalomkutatás során talált közleményekben a képzett búvárcsoportba azon sportolók tartoznak, melyek rendszeresen és régóta üzik ezt a sportot (jellemzően 4-5 alkalom/hét és legalább 3 év) (Schagatay és mtsai 2012). Itthon jelenleg a nOxygen Apnea Club csapata végez rendszeres szabadtüdős edzéseket, azonban ilyen szigorú megkötések mellett még közülük is nehezen tudtunk volna alanyokat válogatni. Ezen kívül az edzésmúlt hossza nem minden esetben arányos a teljesítménnyel. Így arra a következtetésre jutottunk, hogy inkább a hipoxiás teljesítmény alapján soroljuk be az alanyokat.

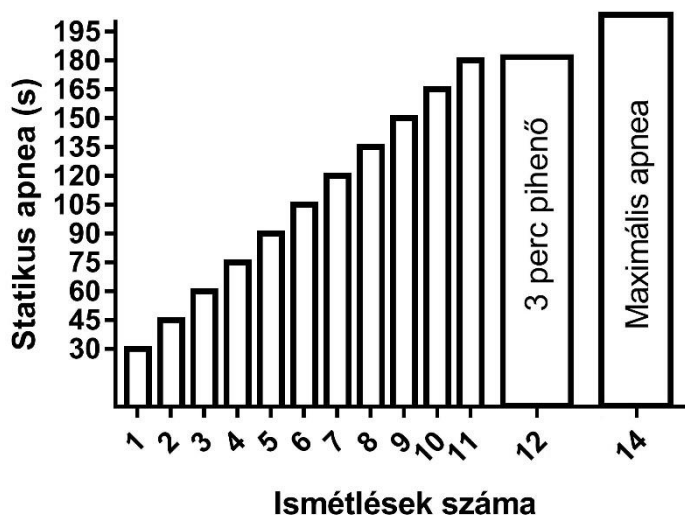
Ez alapján a búvár csoportba azok kerültek, akik felkészítés nélkül képesek legalább 3 perc statikus apnea, illetve legalább 75 m-es uszony nélküli víz alatti úszás teljesítményre. A kontroll csoportba olyanok jelentkezését vártuk, akik nem rendelkeznek szabadtüdős sportolói múlttal. Ezen megfontolások alapján a búvárcsoportba összesen 10 (2 nő, 8 férfi,  $35\pm 5$  év,  $BMI < 27$ ), a kontroll csoportba 27 fő (7 nő, 20 férfi,  $27\pm 6$  év,  $BMI < 30$ ) került. Fontos megjegyezni, hogy mindkét csoportban fiatal, sportos (aktívan sportoló) jelentkezők voltak az alanyok.

### **6.3.2 A csoportok apnea teljesítménye**

A kísérlet első lépése volt, hogy igazoljuk az apnea teljesítmény-beli különbséget a két csoport között. Erre két vizsgálatot terveztünk egy statikus, illetve egy dinamikus apnea felmérőt. A teljesítmény mérésekhez megfelelő körülményeket kellett biztosítani. A kontroll csoportba jelentkezőket fel kellett készíteni a feladatra, illetve ismertetni kellett (esetleg betanítani) a szükséges technikát. Jelen esetben a statikus apnea felmérő előtt a kontroll csoport tagjait megtanítottuk a helyes levegővételi technikára, illetve ismertettük a folyamat során várható reakciókat (légzési inger, rekeszizom-kontrakció). A kontroll csoport tapasztalata csekély ilyen feladatok terén, így jól felépített gyakorlatsort kellett alkalmazni, hogy az alanyok rövidtávú

adaptációval megtanulják kezelni a légzési inger okozta stresszt. A kísérlethez nyugalomra és csendre volt szükség, amit egy üres vizsgáló laborban alakítottunk ki.

Először egy úgynevezett oxigén táblás edzést végeztek a résztvevők. Ennek lényege, hogy egységes pihenőidő mellett adott mértékben növeljük a levegővisszatartás idejét. A levegővisszatartást ágyon, hanyatt fekvé végezték orrcsipesszel nyugodt körülmények között, felügyelet alatt. Az időt a mérés vezetője mérte és dokumentálta. Az edzést 30 s apneával kezdték az alanyok, majd egy perces pihenőt követve 15 s-el növelték az apnea időt (19. ábra). Ezt addig folytatták, amíg tudták teljesíteni az adott lépcsőt. Ezt követően 3 perc pihenőt kaptak a résztvevők, majd az egyéni maximális teljesítményüket mértük.



**19. ábra** A statikus apnea teljesítménymérés során alkalmazott protokoll. Az alanyok 30 s levegővisszatartással kezdték az edzést, majd minden ismétlésnél 15 s-el növelték az apnea idejét. Az ismétlések között 60 s pihenőt tartottunk. A folyamat addig tartott, amíg az alany az adott ismétlést teljesíteni tudta. 3 perc pihenő után az alany maximális levegővisszatartást végzett.

A vizsgálatot egy másik időpontban megismételtük úgy is, hogy az egyéni maximális levegő visszatartás előtt minimális, összesen 2 bemelegítést végeztek az alanyok. Mindkét vizsgálat során pulzoximéterrel (Contec CMS 50D+) pulzus és véroxigén szint adatokat gyűjtöttünk.

A dinamikus apnea-vizsgálatot egy 25 méteres medencében hajtottuk végre. A felméréshez felszerelés szempontjából a legegyszerűbb, uszony nélküli úszást



választottuk. A mérést közös 20 perces bemelegítővel kezdtük, annak ellenére, hogy az aktuális trendek szerint a maximális dinamikus apnea-teljesítményt bemelegítő nélkül teljesítik a versenyzők. Ez a kontroll alanyoktól nem volt elvárható. Ezt követően ismertetésre került a helyes úszástechnika, majd nyaksúly segítségével beállítottuk a semleges lebegőképességet. 10 perc pihenőt követően egyesével minden résztvevő az uszony nélküli dinamikus apnea kategóriának megfelelően próbált egyéni maximális távot úszni. Az úzás folyamatos felügyelet mellett zajlott.

### **6.3.3 Élettani vizsgálatok képalkotó módszerekkel**

Fentebb már említésre került, hogy több apneával foglalkozó kutatás is vizsgálta a hipoxiás kondicionálásra bekövetkező lépvolumen változást (Schagatay és mtsai 2005, Lodin-Sundström és Schagatay 2010, Schagatay és mtsai 2005, Lindholm és Lundgren 2009). Többféle módszer eredményeiről számoltak be, valamint eltérést találtak a képzett búvár, illetve a kontroll csoport között (Schagatay és mtsai 2012). Az irodalom alapján szeretnénk volna mi is megvizsgálni a jelenséget. Erre végül három különböző módszert alkalmaztunk.

#### *6.3.3.1 Ultrahang*

Az első mérés során ultrahang vizsgálattal két tengely mentén végeztünk mérést a lép hílsi vastagságának és hossz tengelyének megfelelően. A vizsgálat a nyugalmi értékek felvételével kezdődött. Az alany mély levegőt vett (mintha kezdené az apneát) ezzel biztosítva, hogy ugyanabban a pozícióban mérjük a nyugalmi felvételt, mint az apnea alattiakat. Ezt követően az alany többször ismételt statikus apnea gyakorlással felkészült, majd megkezdte a 2 perces levegő visszatartást. A folyamat alatt 60, illetve 120 s-nél készültek felvételek, majd 1 és 2 perc pihenőt követően a nyugalmi felvételhez hasonlóan ismét. Abban az esetben, ha valaki nem tudta teljesíteni a 2 percet megkértük, hogy jelezzen az utolsó felvétel elkészítéséhez. A vizsgálatot képzett radiológus segítségével végeztük, a mérés során az ultrahang fej folyamatosan a lép hílusának megfelelő helyzetben volt.

#### 6.3.3.2 *Mágneses rezonancia*

Az MR mérések célja, hogy 3 dimenziós modellt alkotva pontosabban meg tudjuk határozni a lép térfogatát az apnea egyes fázisaiban (T1 Dixon szekvencia, Philips Ingenia 3T, Koninklijke Philips, Hollandia). A mérést egy a levegővisszatartást megelőző felvétellel kezdtük, hogy a lép hipoxiás expozíció mentes térfogatát meg tudjuk határozni. Ezt követően az alanyok bemelegítő statikus apnea gyakorlatokkal készültek a vizsgálatra. A bemelegítő idő utolsó 8-10 percében már nem történt levegő visszatartás ezzel biztosítva, hogy a felkészülés minimális hatással legyen a felvételekre.

A kontroll csoport esetében alkalmazott protokoll alapján a felvételeket a következő időpontokban készítettük: 0, 30, 60 s apnea alatt számolva, majd 2 perc pihenőt követően készült az utolsó mérés. A bűvároknál az apnea időt meghosszabbítottuk 120 s-ig, illetve megkértük az alanyokat, hogy egyéni szubmaximális levegő visszatartást csináljanak. Az első kontrakciónál (légzési inger) jeleztek. Ennek célja, hogy artefakt mentes felvételeket kapjunk, illetve, hogy 2 perc apnea idő felett is vizsgáljunk lép volumetriát.

A kiértékelésére a MIPAV szoftvert használtuk. A felvételeket betöltve minden metszeten meg kellett állapítani a lépkontúrt és körbe rajzolni azt. Ezt követően a kontúrvonalakból a program egy maszkot készített és a bejelölt területek, illetve az MR beállítások alapján kiszámolta a lép térfogatát. A mérést szakképzett személyzet segítségével és felügyeletével végeztük. Az eredményeket képzett radiológus is ellenőrizte.

#### 6.3.3.3 *Elasztográfia*

A harmadik mérés során 2D shear-wave elasztográfiával (Toshiba Aplio 500, Toshiba Medical Systems, Japán) vizsgáltuk a lép rugalmasságát az MR mérésnél alkalmazott protokoll szerint. A kontroll csoportnál 60 s-t, míg a bűvárcsoport esetén 120 s-t követően folyamatosan készültek a felvételek. A mérés addig tartott, amíg az alanyok légzési inger miatt kiváltott rekeszizom kontrakciója nem zavarta a folyamatot. Utána 2 perc pihenőt követően az előző mérésekhez hasonlóan ismét felvételt készítettünk.

#### **6.3.4 Spirometriai vizsgálat**

A spirometriai vizsgálat során a következő paramétereket mértük: FVC, VC. A méréshez digitális spirométert használtunk. Az alanyok először egy mély belégzést követően erőltetett kifújással a spirométerbe fújták a beszívott levegőt. Ezt követően a spirométeren keresztül 3-4 nyugodt levegővétel után ismét mély belégzés, majd erőltetett kifújás történt. A bűvárok esetében, akik tudták a levegőnyeléses technikát alkalmazni azok kétszer vettek részt a mérésben így mérhető volt a többlet levegő mennyisége, amit ezzel a módszerrel be tudtak juttatni a tüdőbe. Ennek lényege, hogy a maximális levegő vételt követően a szájüregbe szívott kis mennyiségű levegőt egy határozott nyelvmozdulattal a tüdőbe préselik. Gyakorlott bűvárok akár 2-3 liter extra levegőt is képesek felvenni ezzel a módszerrel. A vitálkapacitás értéke függ a testmagasságtól (Pavlik 2019), így a kiértékeléshez a testmagasságra vonatkoztatott Lorentz indexet (vitálkapacitás/magasság) használtuk.

#### **6.4 Statisztikai módszerek**

A statisztikai kiértékelést GraphPad Prism programmal végeztük, egy utas ANOVA és Tukey post hoc teszt, illetve t-teszt segítségével. A szignifikancia határt 5% alatti p értéknél határoztuk meg.

#### **6.5 Kutatásetikai engedélyszámok**

Oxigén-Glükóz deprivációs kísérletek: 22.1/2960/003/2009

Alvási apnoe állatkísérletek: 380-59-10106-14-55/230

Humán, hipoxiás vizsgálatok: SE RKEB szám: 30/2021

## 7 Eredmények

Ebben a fejezetben tárgyaljuk a módszerek bemutatásakor ismerttetett modellek, vizsgálatok eredményét. A műszaki fejlesztést igénylő feladatok esetében a biológiai kísérletet megelőzően validáltuk az eszközöket és meggyőződünk arról, hogy valóban képesek-e a kívánt beállítások szerint üzemelni. Ezt követően vizsgáltuk az egyes modellekkel végzett mérések ismételhetőségét és hatását.

### 7.1 OGD modell

A kamra tervezése során a kritikus számításokat elvégeztük azonban az elhanyagolt hatások és a számítási kerekítések miatt szükséges volt a műszaki validáció és a végleges paraméterek beállítása. A rendszer finomhangolása és a protokoll kialakítása ismételhető és biológiai hatást kiváltó vizsgálatokat tett lehetővé.

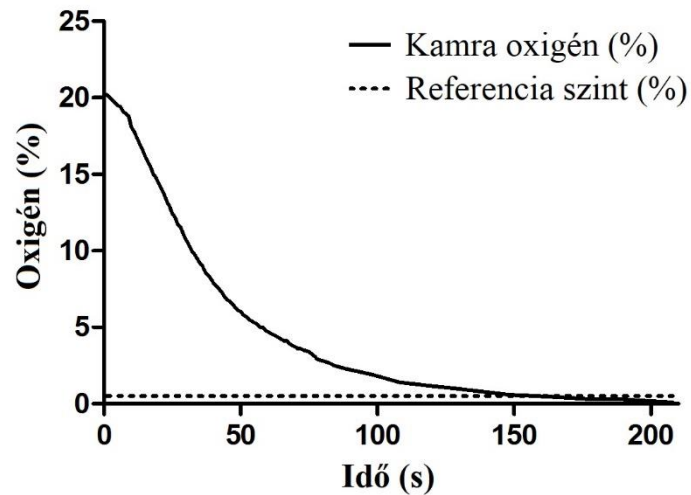
#### 7.1.1 Műszaki paraméterek

A készülék műszaki jellemzéséhez négy mérést végeztünk. A nitrogénfogyasztást a rotaméterrel beállított érték alapján számítottuk. A minimális átfolyást 1 liter/perc/kamra értékben határoztuk meg, hogy a szükséges oxigénkoncentrációt stabil módon fenn tudjuk tartani. Két kamrával számolva 120 liter/óra gázfogyasztással kellett tervezni a kísérleteket. Az oxigénszint kezdetben meredeken, közel lineárisan csökken, majd egyre lassul, ahogy közelítjük az OGD-szintet (20. ábra). Nagyjából 2,5 perc alatt áll be a rendszer, ezt követően a kamrák stabilan tartják az alacsony oxigénszintet.

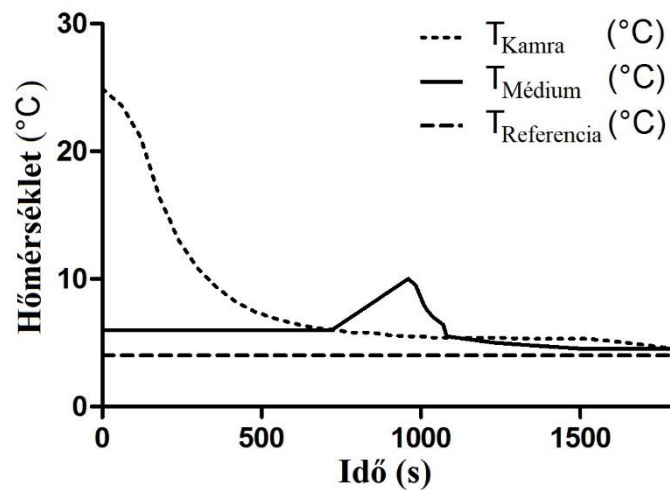
A kamra hőmérsékleti jellemzői hasonló mintát követnek, azonban a kívánt értékeket sokkal lassabban éri el a rendszer. Az 21. ábrán látható, hogy a hűtési idő körülbelül 20 perc, mire a kamra 4 °C-os lesz. A mintákat a protokoll szerint ekkor helyezük a kamrákba.

A mintákat eleve hűtött OGD médiumba (6-8 °C) tesszük, így néhány perc alatt felveszik a kamrahőmérsékletét. A Peltier-modul eltérő fűtési és hűtési teljesítménye miatt a meleg kamra hőmérséklete más mintázatot követ. A nagyobb teljesítmény és a

hőszenzor késleltetésének hatására a kamra hőmérséklete enyhén oszcillál a beállított érték körül (22. ábra).

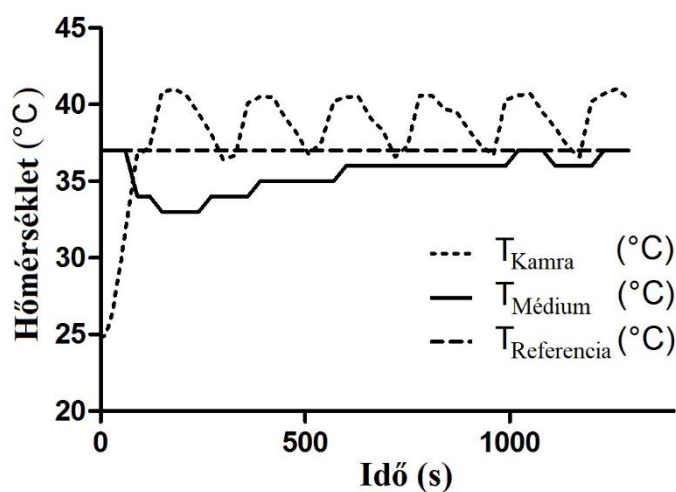


**20. ábra** Az OGD kamra oxigénkoncentráció változása a kísérlet indításakor. A referencia (0,5%) koncentráció körülbelül 3 perc alatt érhető el a kísérlet során alkalmazott  $1 \frac{l}{perc}$  nitrogén átfolyással. Ezt követően az  $O_2$  szint stabilan a határérték alatt marad a kísérlet teljes ideje alatt.



**21. ábra** A kamra és a tenyésztő oldat hőmérsékletváltozása hűtés esetén. A kamra körülbelül 10 perc alatt éri el a 6 °C-os hőmérsékletet. Ekkor a mintákat előhűtött (6 °C) OGD tenyésztő oldatba tesszük. A folyamat során az oldat hőmérséklete kis mértékben emelkedik (~10 °C), de a kamrába helyezve a

tenyésztő lemezt újabb 10 perc alatt beáll a referencia hőmérséklet (4 °C, ahol a biológiai mintákat is tartják az átültetési folyamat közben).



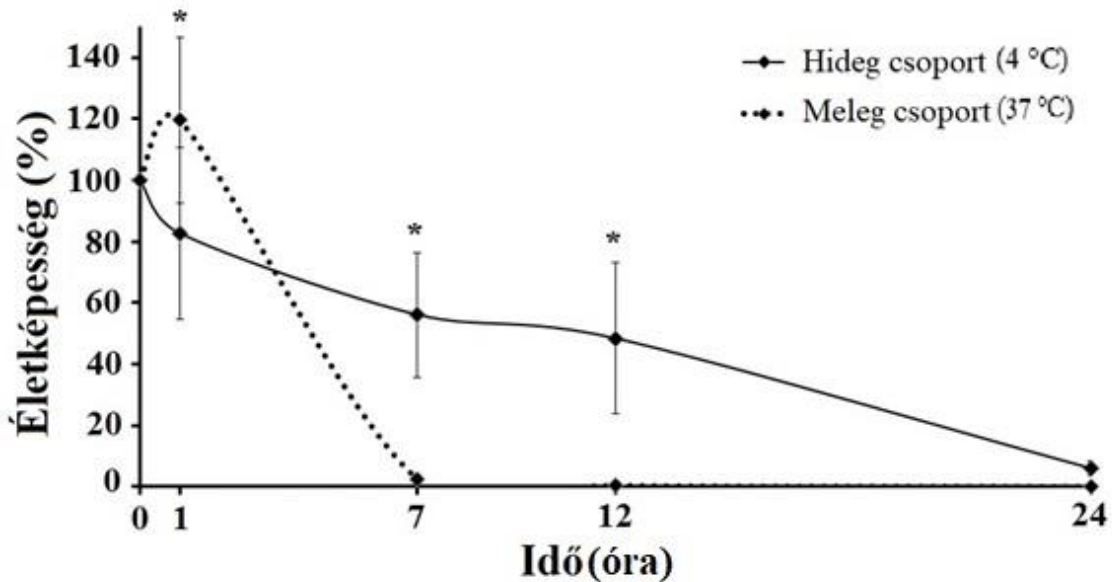
**22. ábra** A kamra és a tenyésztő oldat hőmérsékletváltozása fűtés esetén. Amikor a kamra eléri a 37 °C-ot, a mintákat vízfürdőben előmelegített sejttenyésztő oldatban helyezzük a fűtött kamrába. A minták előkészítése során a tenyésztő oldat hőmérséklete enyhén csökken (34 °C), de a kamrában 10-15 perc alatt eléri újra a 37 °C-ot. A nagyobb fűtési teljesítmény miatt a kamra hőmérséklete oszcillál, a referencia érték körül azonban a minták hőmérsékletét ez nem befolyásolja.

Ebben az esetben a mintákat előmelegített médiumba helyezve tesszük a kamrába, amint a hőmérséklet elérte a megfelelő szintet. A kísérlet előkészítése során minimális mértékben csökken a minták hőmérséklete, de a kamrán belül néhány perc alatt beáll az egyensúly. A kísérlet alatt a vízhűtőrendszerben a hőmérséklet nem haladta meg a 33 °C-ot. A páratartalom 92-98% között mozgott a meleg kamra esetében. A hideg kísérletnél 10-15%-ot mértünk. Egyik esetben sem tapasztaltunk jelentős mértékű folyadékvesztést.

### 7.1.2 *In vitro* OGD eredmények

Eltérő hosszúságú (1, 7, 12, illetve 24 óra) hideg és meleg OGD kísérleteket végeztünk, hogy megfigyeljük a csontszövet iszkémiás állapottal szembeni tűrőképességét. Az 23. ábrán a csoportok közti arányok láthatók az adott méréshez tartozó kontroll csoport függvényében. A meleg csoport váratlanul magas csúcsot mutatott az 1 órás kísérletet követően, majd az életképesség csökkenni kezdett, és a 7 órás időpontban már nem volt mérhető aktivitás. Ezzel szemben a hideg csoportban

lassú csökkenés figyelhető meg, a 7 órás vizsgálat után még mindig 60%-os a sejtek viabilitása. Az aktivitás csak 24 óra elteltével csökkent a minimális szintre (Bago és mtsai 2018).



**23. ábra** A csontszövet iszkémia tűrőképessége 37 és 4 °C hőmérsékleten. A kísérletet 1, 7, 12 és 24 órás iszkémia idővel végeztük. A meleg csoport életképessége váratlan kiugrást mutatott az 1 órás expozíciónál. Ezt követően hirtelen csökkenés figyelhető meg a hideg csoport értékeihez képest. 7 órás kezelést követően a meleg csoport nem mutatott aktivitást. Az eredmények az adott méréshez tartozó kontroll csoporthoz (100%) viszonyított arányt mutatják (n=12) (Bago és mtsai 2018).

## 7.2 Obstruktív alvási apnoe modell

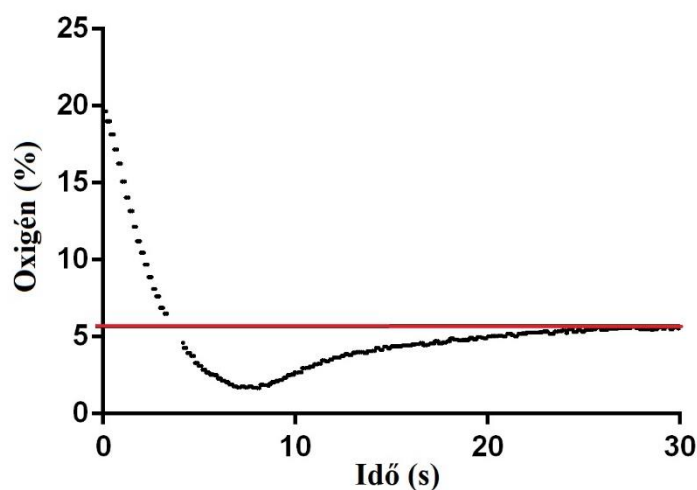
Az OGD modellhez hasonlóan az OSA kamrát is műszakilag validálni kellett az élettani kísérletek indítása előtt. A tesztelés során a következő paramétereket vizsgáltuk: O<sub>2</sub>-szintek közti csere ideje, a szabályozó pontossága, a gázfogyasztás mértéke, a kamra páratartalma. A paraméterek optimalizálását követően állatkísérlettel igazoltuk a modell biológiai hatását.

### 7.2.1 Műszaki paraméterek tesztelése (OSA)

Az elsődleges szempont, hogy az oxigénszint gyorsan és stabilan álljon be a kamrán belül. Ehhez az átáramló gáz sebességét és a PID szabályzó paramétereit kellett optimalizálni. A módszertani részben leírtak és az empirikus paraméterválasztás alapján

a kamra bemeneti ágában mért oxigénkoncentráció karakterisztikáját az 24. ábra mutatja.

Látható, hogy az oxigénkoncentráció közel 5 s alatt eléri a protokoll 5,7%-os értékét. Ezt követően a szabályozó „alul lövi” a beállított értéket, majd körülbelül 22 s elteltével stabilizálódik. A szabályozási folyamat mindkét érzékelő jelét figyeli és azok alapján generált hibajellel dolgozik. Ahogy csökken a kamra O<sub>2</sub>-szintje, úgy emelkedik a bemeneti ágban, amíg a szenzorok között be nem áll az egyensúly. A rendszer késleltetése miatt  $\pm 0,5\%$ -os hibahatárral dolgoztunk. Ebben a sávban a szabályzó jelet fix értéken tartottuk.



**24. ábra** Az OSA modell oxigén koncentráció karakterisztikája. Az alkalmazott  $\sim 55 \frac{l}{perc}$  nitrogén és  $5 \frac{l}{perc}$  szabályozó levegő áramlás esetén 5-6 másodperc alatt elérhető a beállított 5,7%-os szint. A rendszer késleltetése miatt azonban a szabályzó „alul lövi” az értéket és  $\sim 9$  másodpercnél kezd közelíteni a referencia szinthez, amely végül  $\sim 22$  másodperc alatt stabilizálódik a kamrában.

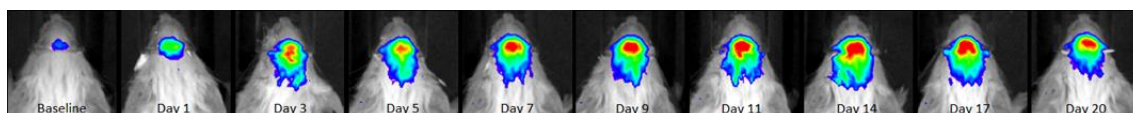
A normoxia periódus beállítása során arra törekedtünk, hogy szintén 20s idő alatt érjük el a minimum 20,3% oxigénkoncentráció értéket. Mivel levegőt használtunk a gázcserehez, külön pneumatikai szabályozást nem igényelt a rendszer. A hosszútávú tesztelés során is stabil működést tapasztaltunk.

A gázfogyasztás a nitrogén esetében volt kritikus, a levegőt kompresszorral állítottuk elő így ezt korlátlan forrásnak tekintettük. A 8 órás kísérlet végén a 200 bar nyomású 40 literes nitrogén palackban 120 bar nyomást mértünk. A páratartalom a kísérlet teljes ideje alatt 60-70%-os tartományban mozgott.



## 7.2.2 Biolumineszcens kiértékelés

A modell fiziológiai hatását biolumineszcens felvételekkel vizsgáltuk. Az 25. ábrán látható, hogy hogyan változik az agyi stressz mértéke a kísérlet előre haladtával. Megfigyelhető, hogy az első héten erősen fokozódik az aktivitás, majd a kísérlet további részében lelassul a változás.



**25. ábra** Az obstruktív alvási apnoe kísérlet biolumineszcens kiértékelése. A kísérlet előtt, majd az 1, 3, 5, 7, 9, 11, 14, 17, 20. napokon készültek a felvételek. A színek jelölik a hipoxia okozta agyi stressz helyét és mértékét (IH, n=8; CTRL, n=7).

Az elkészített eszközre az intézet (CIBR) szabadalmi kérelmet nyújtott be, amelyet 2019 októberében elfogadtak GB2547022B szabadalmi számmal. A beadvány teljes szövege megtalálható a függelék fejezetben.

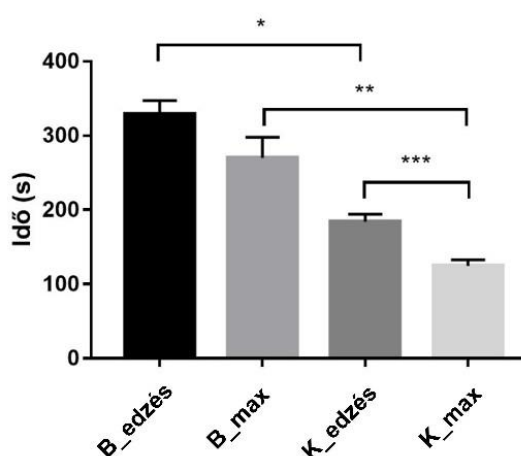
## 7.3 Hipoxia tűrőképesség

Az eredmények alapján az apnea teljesítményben szignifikáns különbség mutatkozik a két vizsgált csoport (búvár, kontroll) között, azonban ez a különbség nem jelenik meg egyértelmű módon a vizsgált élettani paraméterekben.

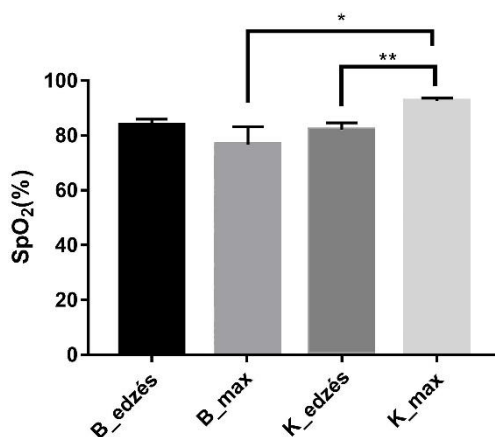
### 7.3.1 Statikus apnea

A 4.3.2 fejezetben ismertetett módszerrel végzett statikus pozícióban történő levegővisszatartási gyakorlat során mért értékeket a 26. ábra szemlélteti. A búvár és kontroll csoportok apnea ideje között mindkét esetben szignifikáns különbség volt. Azonban, további érdekes információ, hogy míg a búvár csoportnál nincs, addig a kontroll csoportban van eltérés a két vizsgálat között. Vagyis a búvárok minimális bemelegítéssel is képesek közel a maximális teljesítményt nyújtani, míg a kontrollokra ez nem volt jellemző. Számszerűsítve ez azt jelenti, hogy a búvárok a maximális teljesítmény 82%-át, míg a kontroll csoportban lévők a 67%-át tudják teljesíteni

minimális felkészüléssel. A vizsgálatok alatt az SpO<sub>2</sub> Assistant program segítségével folyamatosan mértük a véroxigén szint változásokat. Érdekes módon az oxigéntáblás edzés közben mért minimális szaturációs értékek nem mutattak szignifikáns különbséget a két csoport között. A kontroll csoport esetében azonban a minimális, 2 ismétlés után végzett maximális apnea közben mért véroxigén szint értékei szignifikáns eltérést mutatnak a bűvár csoport, illetve a kontroll csoport oxigén táblás edzése során mért értékekhez képest (27. ábra).



**26. ábra** *Statikus apnea teljesítmény.* A bűvár (B) (n=6) és kontroll (K) (n=20) csoport statikus apnea teljesítményének vizsgálata. Az ábra két mérés eredményeit összesíti. Mindkét csoportban a legjobb értéket oxigén táblás edzés (4.3.2 fejezet) közben mértük (B\_edzés, K\_edzés). A minimális (2 ismétlés) bemelegítés után mért eredmények (B\_max és K\_max) mindkét csoportban alacsonyabbak voltak az edzésen elért legjobb eredményhez képest, azonban a bűvároknál nem volt szignifikáns a különbség. Egyutas ANOVA-, illetve Tukey-tesztet alkalmaztunk a kiértékeléshez.

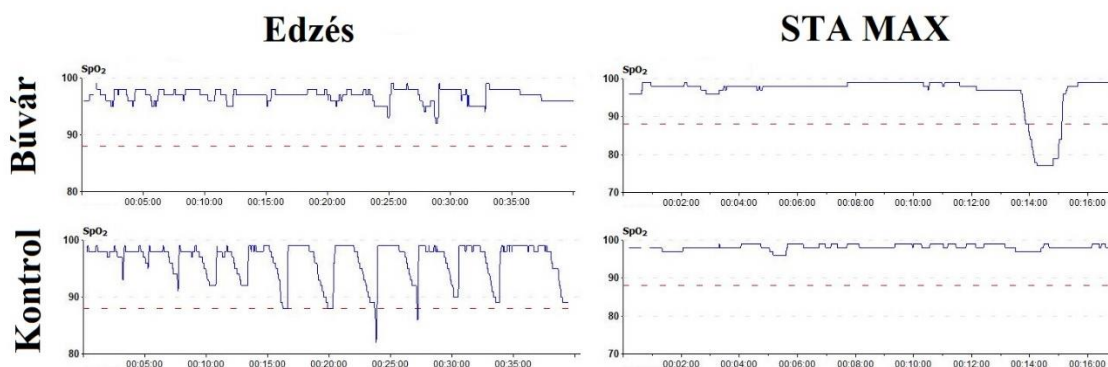


**27. ábra** *Véroxigén szint változás statikus apnea közben.* Az oxigén táblás edzés és a maximális statikus apnea alatt mért minimum véroxigén szintek a két csoportban. A kontroll csoport minimális, 2 ismétlés

után végzett maximális apnea közben mért véroxigén szint értékei (K\_max) szignifikáns eltérést mutatnak a bűvár csoport (B\_max), illetve a kontroll csoport oxigén táblás edzés során mért értékeihez (K\_edzés) képest (bűvár n=6, kontroll n=20). Egyutas ANOVA-, illetve Tukey-tesztet alkalmaztunk a kiértékeléshez.

A szaturációs értékek összhangban vannak a statikus apnea adatokkal (26. ábra). A kontroll csoport edzés nélkül nem tudott olyan mértékű véroxigén csökkenést elérni, mint az oxigéntáblás gyakorlat közben. Ezzel szemben a bűvárok edzés nélkül is képesek voltak elviselni a csökkent szaturációt.

Az 28. ábra jól illusztrálja az eltérést a két csoport, illetve a két mérés között. Annak ellenére, hogy nem találtunk szignifikáns eltérést az edzés közben mért minimális szaturációs értékek között, az alanyoknál látható mintázat béli eltérés.



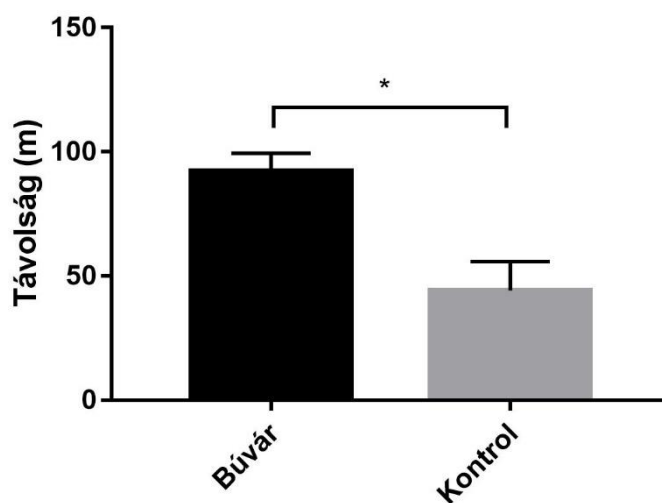
**28. ábra** A véroxigén szint változás mintázata statikus apnea közben. A statisztikai eredmények szemléltetése, mintázat béli eltérés egy bűvár és egy kontroll alany szaturációs értékei között. A statisztika nem mutatott ki szignifikáns eltérést az edzés közben mért minimális véroxigén értékek között, azonban az ábra bal oldala jól szemlélteti a konkrét alanyok közti különbséget. A jobb oldalon a minimális, 2 ismétlést követően végzett maximális statikus levegővisszatartás közben mért szaturációs értékek láthatók. Ebben az esetben szintén megfigyelhető a különbség, amit a statisztikai adatok is megerősítenek.

### 7.3.2 Dinamikus apnea

A dinamikus apnea felmérés során még nagyobb eltérés mutatkozott a két csoport között. A bűvárok kétszer akkora távolságot teljesítettek, mint a kontroll csoport résztvevői. Ennek megfelelően itt szintén szignifikáns eltérés mutatkozott a két csoport eredményei között (29. ábra).

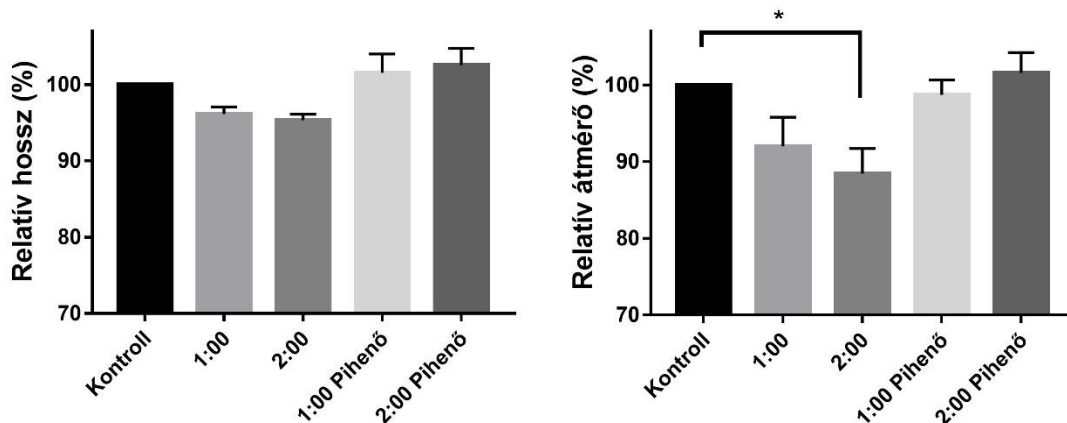
### 7.3.3 Ultrahang vizsgálat

Az első képalkotó vizsgálat során ultrahangméréssel próbáltuk a hílushossz és hílusi keresztmetszeti átmérő értékét búvároknál megmérni statikus apnea közben. A hílusi átmérőt a lépkaputól a lép konvexitására mért átmérőként értelmeztük. A mérés során folyamatosan követtük a lép ultrahangos megjelenését, ami alapján kismértékű csökkenés volt detektálható. Szubjektív tapasztalat, hogy a lép felszíne egyenetlenebbé vált, ami a térfogat csökkenéshez köthető. A csökkenés tényét MR felvétellel is megerősítettük.



**29. ábra** *Dinamikus apnea*. Az uszony nélküli víz alatti úszás eredménye a két csoportban (búvár  $n=6$ , kontroll  $n=12$ ). A kétmintás  $t$ -próba szignifikáns különbséget mutatott a két csoport között 95%-os szignifikancia szint mellett ( $p=0,0079$ ).

A kiértékelést egyutas ANOVA-tesztel ( $p<0,05$ ) végeztük a hossz- és keresztmetszeti értékeket külön véve. A kiértékeléshez relatív, százalékos adatokat használtunk. A hossz tengely mentén átlagosan 5%-os (max. 7,4%), míg a keresztmetszetenél 11,5%-os (max. 22,7%) változást mértünk 2 perc apnea után.



**30. ábra** Az ultrahang vizsgálat során mért relatív hülshossz és -átmérő (lépkaputól a lép konvexitására mért átmérő) értékek. A kontroll mérés teljes belégzés után történt, ezt követően a bűvárok (n=5) bemelegítettek. 10 perc pihenőt biztosítottunk, hogy a bemelegítés ne befolyásolja a mérést. A felvételeket 1 és 2 perc levegővisszatartás közben, illetve a restitution 1 és 2 percénél készítettük. Az egyutas ANOVA-vizsgálat ( $p < 0,05$ ) egyetlen esetben mutatott szignifikáns eltérést (2 perc apnea alatt mért keresztmetszet).

Az 30. ábrán látható, hogy a hossz méretben nem találtunk szignifikáns eltérést a felvételek között. Ezzel szemben a keresztmetszetben 2 perc apnea közben jelentős eltérés mutatkozik a kontroll értékhez képest. Az eredmények minden esetben a normális tartományba estek, nem tapasztaltunk kiugró adatokat. A felvételek készítése alatt a szubjektív tapasztalat alapján a lép megjelenése folyamatosan változott. A mérési eredmények csekély mértékű különbségei miatt nem vizsgáltunk kontroll csoportot.

#### 7.3.4 Mágneses rezonancia vizsgálat

A következő vizsgálatban mágneses rezonancia képalkotással (MRI) készítettünk felvételeket a lépről. Tekintve, hogy az ilyen klinikai berendezések nagyon leterheltek így limitált számban volt lehetőségünk ezt a mérést elvégezni. Összesen 10 bűvár és 13 kontroll vett részt a kísérletben. A két csoportot vizsgálva sikerült a lép térfogatváltozását kimutatni. A statikus levegővisszatartás alatt mért minimális, maximális és átlagos térfogatcsökkenés adatokat az 4. táblázat szemlélteti. Az értékek az alaptérfogathoz viszonyított százalékos csökkenést mutatják.

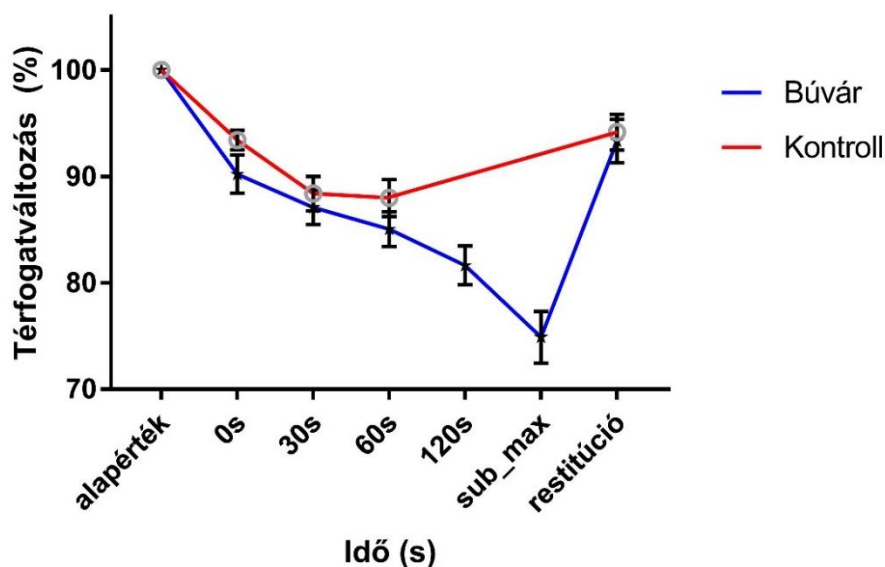
**4. táblázat** Lép térfogatváltozás statikus apnea közben. Az MR vizsgálat során az alaptérfogathoz viszonyított térfogatcsökkenés értékei láthatók a két csoportban.

	Bűvár			Kontroll		
	Min	Max	Átlag	Min	Max	Átlag
<b>0 s</b>	11,5%	15%	10%	0%	11,2%	6,5%

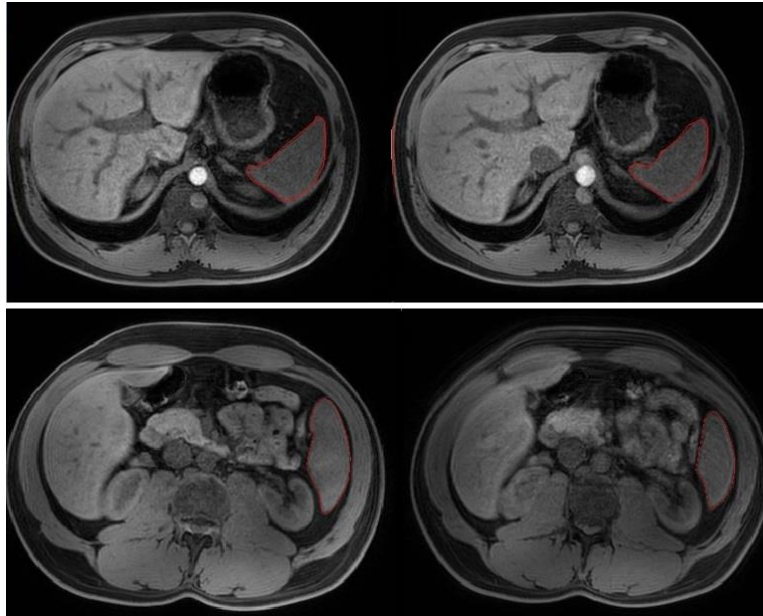
<b>30 s</b>	7,7%	22%	12,9%	1,5%	15,3%	12,6%
<b>60 s</b>	8,6%	22%	15%	2,5%	19,6%	12%
<b>120 s</b>	11,2%	23%	18,4%	-	-	-
<b>Szubmax</b>	17,3%	32%	25%	-	-	-
<b>Pihenő után</b>	0%	16%	6,7%	1,2%	16,3%	5%

A volumenváltozást az 31 és 32. ábrák mutatják. A csoportokat külön-külön vizsgálva nem tudunk szignifikáns eltérést megfigyelni az első 60 s alatt. A bűvár csoportban 120s idő felett is tudtuk azonban a folyamatot vizsgálni.

További érdekes megfigyelés, hogy a pihenő alatt a bűvároknál gyorsabban zajlott a térfogat helyreállítás, mint a kontroll csoportnál. A 2 perces pihenő alatt a bűvároknál átlagosan 18%-os, míg a kontroll csoport esetében 7% volt a változás. Az alap térfogatértékek az ultrahangeredményekhez hasonlóan a normális tartományba estek, nem tapasztaltunk kiugró adatokat az alanyok között.



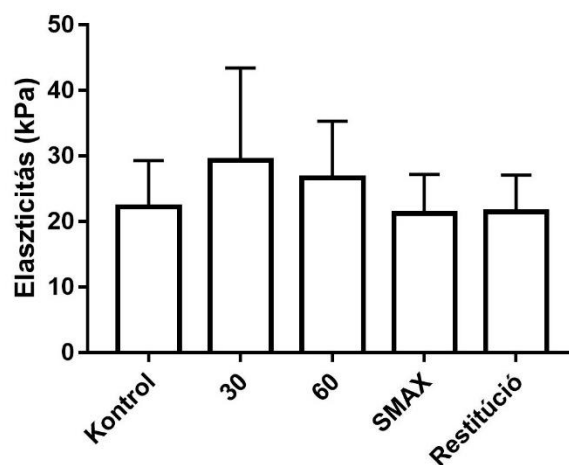
**31. ábra** A bűvár és a kontroll csoportnál mért térfogatváltozási adatok. Az ANOVA-vizsgálat szerint az eltérés nem szignifikáns a 0, 30 és 60 s időpontokban, de a tendencia alapján a bűvárok nagyobb mértékű térfogatváltozást értek el a magasabb apnea teljesítménynek köszönhetően. Továbbá a 2 perces pihenő alatt a bűvároknál nagyobb mértékű változást mutattunk ki. (n=10 bűvár, n=13 kontroll)



**32. ábra** Lép volumetria az MR felvételek alapján. Az első sor egy kontroll alanyt, míg a második sor egy bívárt mutat. A bal oldali képen a nyugalmi, míg a jobb oldalin a 60 s (kontroll), illetve a szubmaximális (bívár) apnea közben készült felvételek láthatók. A kontroll alanynál a körbe rajzolt lép formáján, míg a bívárnál a méretén is szemmel látható a különbség.

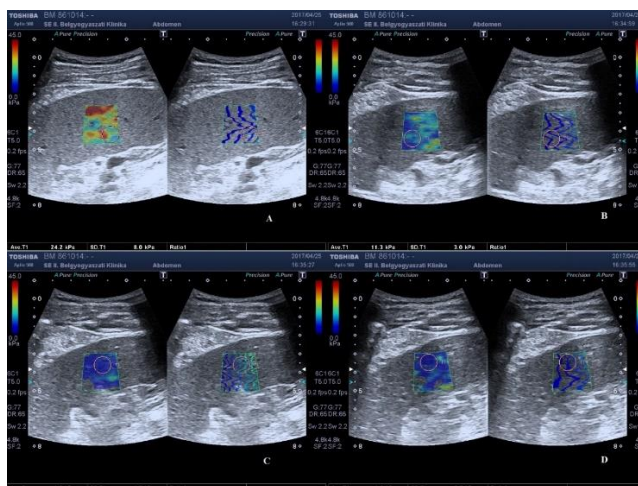
### 7.3.5 Elasztográfia

A lép rugalmasságának mérés során shear-wave elasztográfiát használtunk. A mért értékek szórása jelentős volt, ennek megfelelően először azt vizsgáltuk, hogy az egyes mérési pontok között található-e szignifikáns különbség. A statisztikai vizsgálat ezt nem mutatta ki (33. ábra). Egyetlen mérés esetében (bívár alany, SMAX-nál 32%-os térfogatcsökkenés) sikerült az MR mérésekkel egybevágó adatokat kimutatni (34. ábra). Itt a levegővisszatartás idejével arányosan csökkent a mért érték.





**33. ábra** *A lép rugalmasság vizsgálata során mért adatok.* Egyutas ANOVA-vizsgálattal és Tukey teszttel kiértékelve nem találtunk lényeges eltérést az adott mérések között (n=27).



**34. ábra** *Elastográfiás felvétel statikus apnea közben.* Egy bűvár esetében sikerült a feltevésnek megfelelő adatokat mérni. Az ábrán a kontroll (A), 150 s apnea utáni (B), 180 s apnea utáni, illetve 215 s apnea utáni felvételek látszódnak. A hozzájuk tartozó elaszticitás értékek a következők: 24,2 kPa; 11,3 kPa; 6,9 kPa; 6,3 kPa.

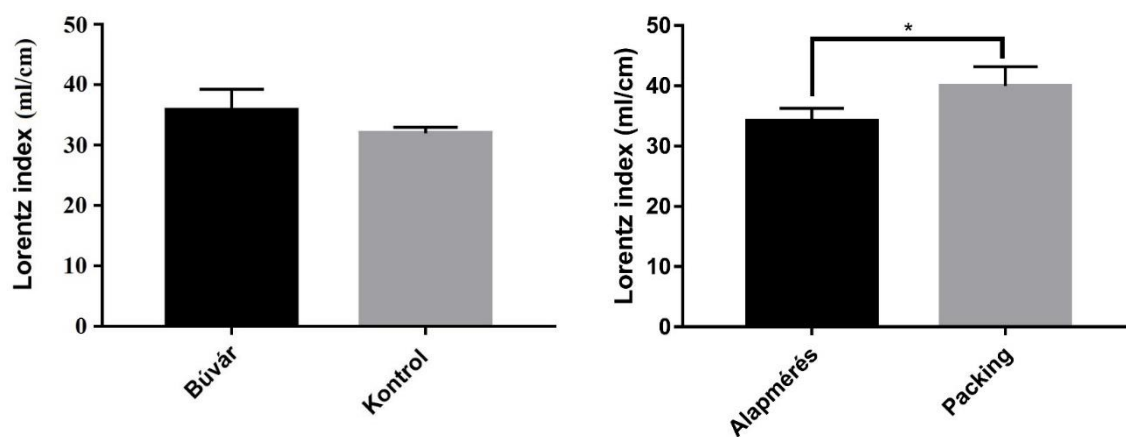
### 7.3.6 Spirometria

A spirometriás mérés során arra voltunk kíváncsiak, hogy az erőltetett kilégzési vitálkapacitásban van-e különbség a bűvár és kontroll csoportok között. Az FVC értékek nem mutattak szignifikáns különbséget. Mindkét csoport eredménye magasabb volt, mint a testparaméterek alapján várható kapacitás. A kontroll alanyok esetében átlagosan 15%-kal, míg a bűvároknál 25%-kal volt nagyobb az FVC. Ennek magyarázata az alanyok aktív sporttevékenysége lehet, azonban a packing technika a későbbiekben mutathat eltérést. A térfogat értékeket a 4.3.4 fejezet szerint magasságra normálva vizsgáltuk (Lorentz index, 35/A. ábra) (Pavlik 2019). A levegőnyeléses technikával viszont négy bűvárnak sikerült mérhetően több levegőt juttatni a tüdőbe (35/B. ábra). Náluk átlagosan 1 literrel magasabb FVC értéket mértünk a normál spirometriás méréshez képest.

**A**

**B**





**35. ábra** Spirometriai eredmények. A; Spirometria vizsgálat során mért FVC adatok testmagasságra normalva. A kétmintás t-próba alkalmazásával nem találtunk szignifikáns eltérést a csoportok között (búvár n=6, kontroll n=4). B; A búvárcsoportban t-teszt vizsgálattal szignifikáns eltérést találtunk az alapmérés és a levegőnyeléses (packing) technikával végzett vizsgálatok között (n=4).

## 8 Megbeszélés

Jelen tanulmány során az iszkémia, illetve hipoxia tűrőképesség sejt és szövet szintű modellezhetőségét vizsgáltuk. A kutatáshoz egyedileg fejlesztett oxigén deprivációs, illetve szakaszos hipoxia kamrákat használtunk. A kidolgozott protokollok alkalmasnak bizonyultak ismételt és biológiailag mérhető hatású kísérletek indítására. A munka utolsó fázisában humán vizsgálatokkal kerestünk olyan élettani paramétereket, amelyek befolyásolhatják az egyéni hipoxiatolerancia mértékét.

### 8.1 Oxigén-glükóz depriváció

Az alacsony hőmérséklet konzerváló hatása jól ismert jelenség, amit a dolgozatban bemutatott saját fejlesztésű modell felhasználásával az eredmények is igazoltak. *In vitro* kimutattuk, hogy a szöveti iszkémia hőmérséklettől függően eltérő hatást fejt ki a mintákra. A vizsgálatokat OGD követelményeknek megfelelő környezetben végeztük. A rendszer alkalmas hideg, illetve meleg iszkémiás környezet kialakítására 4-37 °C hőmérséklettartományon belül. Minimális nitrogén átfolyás mellett ( $1 \frac{l}{perc}$ ) a szigetelésnek és a rögzíthető fedélnek köszönhetően 3 percen belül elérhető a 0,5%-os oxigénkoncentráció. A kamrák, és ez által a csont explantátumok hőmérséklete a kísérlet teljes ideje alatt stabil értéken maradt. Frissen izolált csontokat használtunk a modell biológiai alkalmazhatóságának tesztelésére. Az eredmények alapján jelentős különbséget figyeltünk meg a hideg, illetve meleg hőmérsékleten tartott minták életképessége között, amely jelzi, hogy a rendszer képes az iszkémiás állapot megbízható és reprodukálható modellezésére (Bago és mtsai 2018).

Az *in vitro* hipoxia kamrák fejlesztésének technikai kihívásait gyakran alábecsülik. Jellemző hiba, hogy pusztán nitrogénáramlással feltételezzük az anoxiás állapotot. Megfelelő szigetelés mellett sem egyszerű az oxigénkoncentrációt 1% alá csökkenteni (*In vivo* a mitokondriális oxidatív foszforiláció 1% O<sub>2</sub>-szinten még funkcionál (Wu és Yotnda 2011, Wilson és mtsai 2012, Tiede és mtsai 2011)). Az átáramló gáz sebességének megválasztása több szempontból is kritikus. Elsőként folyamatos áramoltatás mellett számolnunk kell a gázfogyasztással. Hiányos szigetelés mellett a gyorsabb áramlás szívó hatást fejt ki és a környezetből „oxigéndús” levegő

kerülhet a rendszerbe. Végül a gyorsabb szellőztetés a páratartalomra is hatással lehet. A kisméretű holtterek és a folyamatos oxigéntartalom figyelése lehetővé tette, hogy stabilan 0,5% alatti koncentrációt tudjunk fenntartani a kamrákban, amely alkalmas az iszkémia biológiai értelemben vett modellezésére.

A Peltier-elemekkel megvalósított hőmérséklet szabályozás további kihívásokat jelentett. A kamrák homogén hűtéséhez, illetve fűtéséhez kritikus, hogy hány modult és milyen beállítás mellett alkalmazunk. Az elemekre kapcsolt feszültség és áramerősség a két oldal közti maximális hőmérsékletkülönbséget fogja meghatározni. Tehát a hideg oldal hőmérséklete függ a meleg oldal hőmérsékletétől. A hűtési teljesítmény a tápellátás növelésével fokozható, azonban a disszipált hő is jelentősen növekszik. Ha a meleg oldal hűtőrendszere nem képes a többlet hőt elvezetni, akkor a hideg oldal hőmérséklete is emelkedni fog. A rendszer tervezése során a legnagyobb kihívás az volt, hogy megtaláljuk az egyensúlyt a hűtési teljesítmény, az ehhez szükséges tápellátás, és a meleg oldal hőmérsékletének szinten tartása között. Az alkalmazott paraméterek mellett a Peltier-modulok teljesítmény együtthatója (COP) 33,3%, ami alig marad el a kompresszorok hatásfokától (2. táblázat). Természetesen nagyobb hőmérsékletkülönbség esetén ez az érték fokozatosan romlik, maximális beállítás mellett 6-8%-ra csökken. Gyors hűtés a fagyasztás veszélye nélkül nem alkalmazható. A tervezés során a hűtési teljesítményt túlméreteztük azonban az elhanyagolt tényezők miatt (környezeti hatás, hőátadási veszteség az egyes felületek között) ez nem okozott jelentős változást. Párhuzamos kísérletindítás esetén azonban figyelembe kell venni, hogy a kamrák hőmérséklete eltérő idő alatt változik. A gyakorlatban ez nem jelent gondot, mivel a minták előkészítése alatt megtörténik a kamrák hőmérséklet beállítása is.

Meleg OGD vizsgálatok során is érdemes előfűteni a kamrát a következő okok miatt: párhuzamos kísérletekkel lehet közvetlen módon összehasonlítani a hideg és meleg hőmérsékleti hatásokat, az előmelegített kamrával minimalizálhatjuk a hőmérséklet kilengést, amely befolyásolhatja az eredményeket (Watanabe és Okada 1967).

Azonban, az ismertetett rendszer kialakítása képes megfelelő módon kezelni ezeket a kérdéseket és egyszerű, takarékos és megbízható eszközt jelenthet az *in vitro* iszkémia 4, illetve 37 °C-on zajló kutatására.

A kísérletek során alkalmazott iszkémiás időt a sejt vagy szövettípusnak megfelelően empirikus úton határoztuk meg. A célunk, hogy az OGD alatt 50-70% közötti csökkenést érjünk el a sejtek viabilitásában. Amennyiben a sejtpusztulás ennél magasabb akkor a sérülés súlyos és a vizsgálat nem ad reális képet a reperfüziós folyamatokról. Ha kevesebb, akkor a hatás nehezen megfigyelhető. Ennek megfelelően az egyes rendszereknél alkalmazott iszkémiás időket előzetes kísérletekkel be kellett állítani abban az esetben is, ha már meglévő módszert alkalmaztunk. Amennyiben a hőmérsékletet is figyelembe vesszük egy újabb paramétert adunk a munkához. Ezen felül a korlátozott számban elérhető hideg iszkémiás közlemények kevés támpontot kínálnak az ilyen modell fejlesztéséhez (Grizzle és mtsai 2016, Wiedemann és mtsai 2013, Thuillier és Hauet 2018). A publikációkban a vizsgált hőmérséklet egységesen 4 °C azonban a páratartalom, hűtési technika és sebesség, alkalmazott iszkémiás idő paraméterek nem, vagy csak limitáltan kerülnek említésre a módszerek leírásakor.

Ebből kiindulva többféle iszkémiás időt használtuk a hideg és meleg kamráknál annak érdekében, hogy lássuk az eltérő feltételek okozta különbségeket. Az eredmények alapján a meleg csoportban körülbelül 4 óra alatt értük el az 50%-os sejtpusztulást, míg a hideg esetben ehhez 12 óra kellett. A hosszú túlélés magyarázata lehet, hogy a frissen izolált csontszövet 3 dimenziós integritása nem változik és ahogy más sejtek esetében is (Antoni és mtsai 2015), ez kedvező hatású lehet a túlélésre vonatkozóan. Továbbá a mi esetünkben a szövet metabolikus aktivitása elsősorban a csontvelői sejteknek köszönhető, amelyről ismert, hogy kevésbé érzékeny az iszkémiára, mint például az ideg vagy szívizom sejtek (Leach és Treacher 1998, Berggren és mtsai 1982). A várakozásoknak megfelelően a hideg környezet javította a sejtek túlélését, és a hosszabb vizsgálatoknál jelentős különbséget mutattunk ki a csoportok között. Azonban, rövid iszkémia idő mellett érdekes jelenséget figyeltünk meg.

Az 1 órás meleg iszkémia vizsgálat során megnövekedett metabolikus aktivitás (23. ábra), csont esetében magyarázható lenne a rövid iszkémiás kondicionálás kedvező hatásával, amennyiben ismételt kísérletről lenne szó (Liu és mtsai 2019). A jelenséget

inkább a hőmérsékleti hatással lehet magyarázni, melegben felgyorsulnak az enzimrendszerek, és az intenzívebb enzimaktivitás eredményezheti azt a látszatot, hogy javult az életképesség. Ennyi idő, és ilyen körülmények között a sejtek száma feltehetően nem növekszik. Megjegyzendő, hogy a szövet életképesség mérését 3 nappal később végeztük, így az eredmény valójában a post iszkémiás regenerációt mutatja, illetve az iszkémia időtartama rövid így nem okoz végzetes sejtkárosodást a szövetben. Továbbá nem vizsgáltuk az oldott oxigén karakterisztikáját a médiumban, így lehet, hogy 1 óra meleg iszkémia még nem igazi ártalom. Ezen kívül a csont explantátumok 3D szerkezete ebben az esetben is jótékony hatású lehet. Ezen kérdések megválaszolása további kutatást igényel.

A bevezetőben leírtak szerint az OGD modellek fő témája a hipoxia érzékeny sejtek, szövetek vizsgálata. A kutatások túlnyomó többsége ideg, illetve szívizom sejteket használ (Almeida és mtsai 2002, Cselenyák és mtsai 2010, Meloni és mtsai 2011, Lee 2000). Ezt követi a transzplantált szervek csoportja, ahol az egyes szervek eltarthatóságának javítása a cél (Simpkins és mtsai 2007, Totsuka és mtsai 2002). Végül a csontszövetet érintő publikációk főleg a csontvelői őssejtek vizsgálatára terjednek ki (Das és mtsai 2010, Ito és Suda 2014). A csont szövetszintű, grafton végzett iszkémiás vizsgálatára két elterjedt módszert alkalmaznak: okklúzió, amputáció (Winet és mtsai 1998, Sammarco és mtsai 2015). A különböző sejteken alkalmazott OGD protokollok megerősítik az általunk is használt paramétereket. Myoung-gwi közleményében (Ryou és Mallet 2018) szintén 0,1% oxigénkoncentrációt említ az iszkémiás periódus alatt. Továbbá az OGD vizsgálatot az általunk használt kísérleti struktúrához hasonlóan sejtnövesztés előzi meg, majd a viabilitásmérés 24 órás reperfüziót követően történik. Himakarnika (Alluri és mtsai 2015), illetve Zuleta és munkatársai (Zulueta és mtsai 1997) anoxiás, 0% oxigént tartalmazó kamrát használtak a munkájuk során. A legtöbb esetben az oxigénmentes környezetet 95% N<sub>2</sub> és 5% CO<sub>2</sub> keverékkel állítják elő (Ryou és Mallet 2018, Webster és mtsai 1995, Kanazawa és mtsai 2017). Normál tenyésztési körülmények között a sejtek számára fontos a megfelelő CO<sub>2</sub>-szint, azonban Jian és munkatársai kimutatták, hogy a csontsejtek proliferációja CO<sub>2</sub> mentes környezetben is lehetséges (Chen és mtsai 2013). Cselenyák és munkatársai (Cselenyák és mtsai 2010) szintén CO<sub>2</sub> mentes (99,5% N<sub>2</sub>) modellről számolnak be közleményükben. Továbbá

szövet, illetve szerv transzplantáció során az iszkémiás periódusban speciális tartósító folyadékban tárolják a donor graftokat CO<sub>2</sub> forrás nélkül (Motoyama és mtsai 2011).

Suzuki eredményei alátámasztják megfigyeléseinket, miszerint a hideg hőmérséklet hatására javul a csontszövet túlélési aránya (Kiyoshi 1991). Kísérletükben hasonló megfigyelésre jutottak miszerint 24 óra iszkémiát követően a csontszövet már nem alkalmas transzplantációra. Az eredményeket természetesen nem lehet egy az egyben összehasonlítani, mivel nem OGD modellről van szó, illetve teljes szervet (amputált végtagot) alkalmaztak, amelyet az iszkémia során konzerválófolyadékban tároltak. A hűtés iszkémiával szembeni előnyös hatását más, különböző szöveteket vizsgáló közlemények is említik (Totsuka és mtsai 2002, Levine 2018, Campsen és mtsai 2009). A hűtés hatása összhangban van a metabolikus aktivitás csökkenéssel (Watanabe és Okada 1967).

A kidolgozott protokoll tehát jól követi az irodalomban megtalálható módszereket. A bevezetőben ismertetett kamratípusok alapján látható, hogy sok féle berendezés létezik az iszkémiás célú vizsgálatokra. A dolgozatban bemutatott fejlesztés önálló készülékként funkcionál, a táp- és gázellátáson kívül nem igényel más eszközt, így egymagában alkalmazható az iszkémia modellezésére.

A műszaki paraméterek tesztelése során kapott eredmények összhangban állnak a tervezéssel és a várakozásokkal. A fűtés közben tapasztalt oszcillációt bonyolultabb szabályozással kompenzálni lehet azonban a mérések alapján erre nincs szükség. Az irodalomban talált más OGD kutatásokban használnak CO<sub>2</sub> forrást is az átszellőztetéshez azonban összevetve a saját eredményeinkkel nem tapasztaltunk különbséget a CO<sub>2</sub> mentes iszkémia után.

A pontos vizsgálatokhoz a modell limitációit figyelembe kell venni. A jelen fejlesztés célja egyszerű, kisméretű és költséghatékony rendszer fejlesztése volt, amely képes az alapvető elvárásokat teljesíteni. Az általunk végzett mérésekhez nincs szükség a valós idejű (mikroszkópos) megfigyelésre. A kisméretű kamrák miatt a gázfogyasztás minimális, nem igényel bonyolult vezérlést. Továbbá az OGD kísérletek során az O<sub>2</sub>-koncentráció egységes, így nem kell szabályozni. Az egyszerű felépítés hátránya, hogy manuális beállítást igényel (a hőmérséklet vezérlést nem számolva) és nem monitorozza

a kísérletet, így utólag, ilyen formán nem követhetők vissza az adatok. Továbbá a rendszer kizárólag *in vitro* kísérletekhez készült nem alkalmas állatkísérletek folytatására. A jelen vizsgálat elsősorban technikai jellegű volt, és csak állati szöveteket használtunk a kamra teszteléséhez.

Az eredményeket az ismertett korlátok között kell értelmezni, megfigyelt jelenségekből még nem vonhatók le messzemenő következtetések. További vizsgálatot igényel, hogy más típusú szövetek hogyan reagálnak az iszkémiás sérülésre. A különböző hőmérsékleti hatások is érdekes kérdést vetnek fel, a rendszer műszakilag alkalmas 4-37 °C közötti értékek beállítására. Ezen felül lehetőség van olyan anyagok tesztelésére, amelyek alkalmasak lehetnek a sejtek túlélését javítani (transzplantációs folyadék), illetve a reperfüziós periódusban a regenerációt elősegíteni.

## 8.2 Obstruktív alvási apnoe

A kutatómunka ezen fázisában megterveztünk, létrehoztunk és végül validáltunk egy alvási apnoe modellezésére alkalmas állatkísérleti rendszert. A műszaki fejlesztés során egy standard állatketrecet alakítottunk át szakaszos hipoxiás kamrának. A paraméterek optimalizálásával sikerült ~22 s idő alatt beállítani a kívánt oxigénszintet. Ehhez a gyorsasághoz jelentős mértékű gázáramot használtunk, amit  $60 \frac{l}{perc}$  értéken maximalizáltunk. Az áramlási sebességet és a zajt hangtompítókval olyan szinten mérsékeltek, hogy az állatok viselkedésében nem tapasztaltunk rendellenességet, amiből arra következtettünk, hogy nem volt zavaró hatással a terhelés. A takarékos üzemeltetés miatt a levegőt kompresszorral biztosítottuk. Az elkészült modell biológiai hatását transzgénikus egerekkel végzett kísérletsorozattal igazoltuk. A szakaszos hipoxia agyi hatását 21 napos kondicionálással figyeltük, amely során a hipoxiás csoportba tartozó állatok napi 8 órában voltak a kamrában 90 s / 5,7%, majd 90 s / 20,8% O<sub>2</sub> periódussal. Az 1, 3, 5, 7, 9, 11, 14, 17, 20. napokon biolumineszcens kamrával mértük a hipoxiás expozíció által kiváltott agyi stressz mértékét. A felvételeken jól látszik a stresszhatás növekvő, majd később stagnáló mértéke. Ez alapján az eredmények igazolták, hogy a kifejlesztett modell alkalmas *in vivo* biológiai vizsgálatok elvégzésére (Polšek és mtsai 2017).

A 4.2.7-es fejezetben leírt protokoll szerint napi 8 órában zajlott a kísérlet, ami a folyamatos oxigénszint standard cseréje miatt komoly kihívást jelentett. A manuális vezérlés szóba sem jöhetett ilyen paraméterek mellett. Továbbá a fejlesztés során három különböző rendszer működését kellett összehangolni, amihez nélkülözhetetlen a megfelelő szabályozó, így a feladat automatikus kialakítást követelt.

Az érzékelők elhelyezése kulcsfontosságú volt a vezérlés szempontjából, mivel a szelepek működése a szenzorok által mért jelek alapján történik. Figyelembe kellett venni, hogy a gázkeveredés sebessége eltér a modell különböző részein. Ennek megfelelően a kamra bemeneti ágában (ahol nagyon gyors a keveredés) és a kamrában (ahol lassú a keveredés) helyeztük el a két oxigénszenzort. A vezérlő ezáltal nem csak a kamra és a beállított szint közti különbségét látta, hanem a beáramló gázkeverék és a kamrában lévő koncentráció közti eltérést is. A folyamat eredménye, hogy a beáramló gáz és a kamra oxigénkoncentrációja a hibahatáron belül azonos értékű lesz, ami éppen a beállított oxigénszint. Ezzel a megoldással csökkenteni tudtuk a hirtelen szelepnyitás okozta nagy mennyiségű gázbeáramlást, ami finomította a rendszer működését.

Ezt követően a pneumatikai elemek méretezésével meg kellett határozni a gázcsere sebességét. Figyelembe kellett venni, hogy a sebesség optimalizáláshoz használt gázáram, milyen hatással bír az állatokra, illetve a rendszer stabilitására. A kamra mérete és a beállított áramlási mennyiség nehezítette a precíz szabályozást. A térfogat különbségek miatt a kamrában lassabban változik az  $O_2$ -koncentráció, mint a bemeneti ágban, ahol a gázok (sűrített  $N_2$  és levegő) keverednek. A rendszer indításakor a szabályozó maximális eltérést érzékel így teljesen nyitott állapotba állítja a  $N_2$  szelepet ezzel biztosítva a maximális áramlást. A kamrában a gázok keveredése lassabb így az érzékelő is késleltetve jelzi a valós értéket. Emiatt a szabályzó is késleltetve kezdi elzárni a szelepet, amelynek végül a beállítottnál alacsonyabb  $O_2$  érték lesz az eredménye. A rendszernek ezt kompenzálni kell egyrészt, hogy a kísérlet a beállított értéken történjen, másrészt, hogy a kísérleti állatok ne szenvedjenek végzetes sérülést. Ennek megoldására folyamatos, alacsony sebességű levegőáramlást alkalmaztunk.

Végül olyan elektronikus szabályozó egységet kellett kialakítani, amely képes az érzékelők jelét feldolgozva irányítani a szelepek működését. A vezérlő egység feladata, hogy a levegőáramláshoz igazítsa a nitrogén mennyiségét a beállított  $O_2$ -



koncentrációnak megfelelően. A szabályozás karakterisztikáját a PID paraméterek megválasztása határozza meg, amelyeket empirikus úton addig hangoltunk, amíg az 24. ábrán látható eredményt nem kaptuk.

A szerkezeti kidolgozáson kívül komoly feladat volt a felhasználó barát kialakítás, ugyanis fontos, hogy laikus felhasználó számára is használható legyen a készülék. Ehhez értelmezhető kijelzésre és egyszerű kezelőszervekre volt szükség. Biztosítani kellett a rendszer védelmét a helytelen beállítások ellen. Ez két dolog miatt volt fontos: ne lehessen olyan paramétereket beállítani, ami a program összeomlásához vezet, illetve a beállítás hatására ne okozzunk kárt a készülék többi elemében, illetve a kísérleti állatokban.

Az FPGA fejlesztőkártya limitált mennyiségű kezelőszervet (kapcsolók, nyomógombok, kijelző) biztosít. Emiatt a paraméterek beállításához egy menürendszert dolgoztunk ki, ahol az egyes értékek külön-külön megadhatók. Jelen esetben minden mérés ugyanazzal a beállítással zajlott így a gyorsabb kísérlet indítás érdekében a vizsgálat paramétereit alapértékként állítottuk be.

A folyamatos gázcsere jelentős mennyiségű nitrogént használ a kísérlet közben. Természetesen a szabályozó megfelelő beállítás mellett ezt csökkentheti. Azonban, optimalizált értékekkel is mindössze két kísérletre (2 nap) volt elegendő egy nitrogén palack.

A fentiekén kívül állatkísérletek esetén nincs szükség 100% páratartalomra. Optimális esetben ~50% elegendő. Ennek megvalósítása újabb fejtörést okozott. A megoldást a periodikusan változó gázáramlás adta. Az OGD kamránál használt buborékoltató rendszert építettük be a levegő ágba. Ennek megfelelően egy periódusig száraz nitrogént, majd egy periódusig párás levegőt fűjtünk a kamrába. Ezzel a megoldással sikerült 60-70% közötti eredő páratartalmat elérni, ami a tervezettnél kicsivel magasabb, de még elfogadható.

A vizsgálati protokollt korábbi közlemények alapján határoztuk meg. A modell validálása szempontjából kézenfekvő megoldásnak bizonyult a génmódosított egerek és a biolumineszcens kamera használata. A célunk, hogy szignifikáns eltérést lássunk a hipoxiának kitett állatoknál. A folyamatos monitorozással már a kísérlet 3. napjától

láttunk mérhető hatást. A 7. naptól kezdve a változás lassult, és a vizsgálat végéig egységes szinten maradt. A jelenség magyarázata az állatok sorozatos hipoxiára bekövetkező adaptációja lehet. A kontroll csoport esetében nem figyeltünk meg jelentős mértékű változást az eredmények az 25. ábra „baseline” tartományába estek.

A piacon elérhető kamrák közül (2.2 fejezet) számos olyan létezik, amelyek képesek hasonló beállításra (BioSpherix 2019, CoyLab 2019). Ezek a rendszerek azonban nagyon drágák, nagyméretűek, illetve nem standard állat ketrecet használnak a vizsgálathoz, amely a további stresszhatáson túl, lassítja a gázcsere folyamatát. Jelen kutatáshoz jól definiált keretben működő modellre volt szükség, ami indokolta az egyedi fejlesztést. Az újdonság a többi kamrához képest, hogy mi két darab oxigénszenzort alkalmazunk és FPGA alapú vezérléssel működtetjük a rendszert. A kamrák többsége mikrokontroller vezérléssel van ellátva. A különbség a két eszköz között, hogy a mikrokontroller szerkezete rögzített, a programkódban leírt utasításokat képes sorban végrehajtani. Ezzel szemben az FPGA logikai kapumátrixa szabadon programozható, így a hardver leíró nyelvvel (VHDL) tetszőleges logikai elemeket tudunk létrehozni, amelyek akár párhuzamosan is tudnak számításokat végezni.

Goldbart és munkatársai közleményükben (Goldbart és mtsai 2003) 10% O<sub>2</sub>-koncentrációt alkalmaztak a hipoxiás fázisban. A protokollt tekintve szintén 90 s periódusokban váltogatták az oxigén értékét. A méréseik alapján 30 s alatt érték el a hipoxiás értéket és 5 s ideig tartott a normoxia helyreállítása. A számok azt mutatják, hogy lassabb és kiegyensúlyozatlanabb rendszert használtak. Ettől függetlenül képesek voltak biológiailag mérhető elváltozást kimutatni. Gozal szintén ezt a protokollt használta, azonban az ő mérései alapján 10 s alatt érték el a 10% O<sub>2</sub>-koncentrációt. A gyártói utasítás szerint (Biospherix 2019) az általuk használt termékhez (Oxycycler model A44XO) csatlakozó oxigénérzékelő a gázforrás és a kamra közé került. Így valójában a kamrába beáramló szintet mérték és nem közvetlenül a benne lévő értéket. A kamra térfogatától függően jelentős késleltetés alakulhat ki a mért és a valós oxigénkoncentráció között. Tekintve, hogy az obstruktív apnea modellek rövid szakaszokat használnak, a nagymértékű késleltetés hatással lehet az eredményekre is. Azonban, ennek ellenére ki tudtak mutatni jelentős változás a vizsgált hipokampális régióban. Phillips által használt protokoll tovább erősíti, hogy az egyedi fejlesztésű rendszerünk dinamikát tekintve gyorsabb (Phillips és mtsai 2006), mint a kísérletekben

alkalmazottak többsége. Greenberg a fentiekől eltérően mindössze 5-7 s ideig tartotta fenn a hipoxiás, 6,5-7% O<sub>2</sub>-koncentrációt (Greenberg és mtsai 1999). A beálláshoz ebben az esetben is 30 s-re volt szükség.

Minimális kamra méretet (2,2 L) használtak Lefebvre és munkatársai. Több állatot is elhelyeztek ilyen szűk helyen, ami felveti a stresszhatás kérdését is. A kisméretű kamrával is 40 s idő alatt tudták csak az 5%-os O<sub>2</sub>-szintet megvalósítani. Számos más összehasonlítható modell létezik még az időszakos hipoxia vonatkozásában, például Li és munkatársai által leírt rendszer (Li és mtsai 2012), szintén egy egyedi fejlesztésű szerkezetet mutat be. Érdekes koncepció, hogy az állatok ketrecét mozgatják egy hipoxiás, illetve egy normoxiás térfogat között. Az áthelyezés 4 s alatt megtörténik, azonban a tényleges gázkeveredést nem mérik, így félrevezető lehet, hogy 86 s-et töltenek az állatok az egyes fázisokban. Mindenképp meg kell jegyezni, hogy ebben a kialakításban a nitrogén szükséglet minimális, mivel nincs szó folyamatos átszellőztetésről. Tagaito és munkatársai szintén egy eredeti megoldással, vízen úszó harang alakú kamrát terveztek, hogy lehetővé váljon a vizsgált állat EEG és EMG monitorozása a hipoxiás expozíció során (Tagaito és mtsai 2001).

A modell krónikus hatásának monitorozására noninvazív módszert kell alkalmazni. A különböző képalkotó berendezések (CT, MR) közül számunkra a biolumineszcens képalkotó eljárás volt elérhető, amely gyors és elegendő információt biztosít a vizsgált folyamatról. A mérések során igazoltuk, hogy a kamera kellően érzékeny az agyi hatások megfigyelésére. Az általunk használt biolumineszcens vizsgálatot más publikációkban is említik, amelyek alátámasztják, hogy a módszer alkalmas különböző stresszhatások kimutatására is (Zinn és mtsai 2008, Lim és mtsai 2009, Hara-Miyauchi és mtsai 2012).

Az egyedi fejlesztések esetében az első működőképes szerkezet prototípus. Ennek megfelelően a felhasználás során számolni kell a rendszer korlátaival. Jelen esetben a műszaki adottságok miatt nem tudtunk 22 s-nél gyorsabb gázcserét elérni. Azonban, az eredmények alapján már ez is elegendőnek bizonyult a hatás kiváltásához. Figyelembe kell venni, hogy az állatokra gyakorolt egyéb stresszhatások (áramlási sebesség, zajszint, páratartalom) mértékét, amelyek jelen munka során, empirikus úton kerültek meghatározásra, így az eredményt ennek megfelelően kell elemezni. A

szerkezet alkalmas 0-30% közötti oxigénszint beállítására (megfelelő gázforrások mellett) azonban, a szabályzó paramétereit nem teszteltük a kísérletben használt értékeken kívül. A fentebb említettek alapján az FPGA vezérlő közel 100%-os kihasználtságú, így a rendszer bővítésére csak akkor van lehetőség, ha nagyobb kapacitású chipet alkalmazunk. Ennek megfelelően két különböző periódus beállítására van lehetőség, ennél komplikáltabb profilt csak a kód jelentős módosításával érhetünk el.

A kiértékeléshez használt biolumineszcens módszer hatékony, gyors és noninvazív megoldás a kísérlet monitorozására, azonban limitált információt kapunk arról, hogy az agy mely területeit, milyen mértékben érinti a károsodás. A kamera érzékenysége rendkívül magas így körültekintően kell előkészíteni az állatokat a méréshez. Akár egy szőrszál is okozhat mérési hibát. Jelen munka célja módszertani fejlesztés volt, így az eredmények ilyen jellegű limitációja nem okozott akadályt. Részletesebb információkhoz hisztológiai és/vagy kisállat CT, MR vizsgálatok javasoltak.

Látható, hogy a rendszerben még bőven van olyan beállítási lehetőség ( $O_2$ , periódus idő), amelyeket a jelen tanulmány keretei közt nem volt lehetőségünk tesztelni. A teljes rendszer leíráshoz érdemes lenne más oxigén beállításokat, illetve eltérő expozíciós időket is vizsgálni. Érdekes információt adhat, hogy mely hipoxiás szint mennyi idő után okoz jelentős stresszhatást az agyban. Az egészségügyi vonatkozások mellett sport jellegű vizsgálatokat is indíthatunk. Lehetőség van az állatok hipoxiás edzésére, valamint a hipoxiás adaptáció megfigyelésére.

Ezen felül a kamra kiválóan alkalmas lehet a dolgozat befejező részében ismertetett apnea edzések modellezésére is (Eichhorn és mtsai 2018). Levegővisszatartás közben az elit bűvárok a fiziológiás határokat feszegetik, amely során bekövetkező folyamatok szintén megfigyelhetők súlyos alvási apnoéval küzdő betegeknél (Heusser és mtsai 2009). A felkészülési időszakban az apnea gyakorisága, közelíti az alvási apnoe betegeknél tapasztalható gyakoriságot (Chapleau 2010). Ebből kiindulva az apnea bűvárok tevékenysége korrelációt mutat az alvási apnoe közben fennálló kondíciókkal. Az OSA betegeknél az ismételt hypoxémia növeli a szimpatikus

aktivitást, ami artériás hipertenziót vált ki. Búvároknál is megfigyelhető akut változás a kardióvaszkuláris autonóm regulációban (Dujic és mtsai 2008).

Végül, a terápiás szakaszos hipoxia indukálhatja a szívizom jobb ellenállását miokardiális iszkémia során (Kolár és mtsai 2007). Ezeket az előnyös hatásokat azonban hosszabb, kevésbé súlyos hipoxia-expozícióval érik el, mint alvási apnoe esetén. Általában okklúziós módszert alkalmaznak a végtagokon (Kharbanda és mtsai 2002). Ennek kedvező hatását a sportterület is felismerte és egyre több helyen kínálnak úgynevezett Kaatsu edzéseket, amely során adott nyomáson csökkentik a végtagok vénás keringését ezzel limitálva a mikrocirkulációt, amely hipoxiát hoz létre.

### **8.3 Hipoxia tűrőképesség**

A munka utolsó részében szabadtüdő bűvárcsoportot vizsgáltunk, akik ismertén jobban bírják a hipoxiát az átlagemberhez képest. Fizikai, illetve élettani méréseket végeztünk, amelyek segítségével eltérést kerestünk a bűvár és a kontroll csoportok között. Kimutattuk, hogy jelentős különbség mérhető a statikus, valamint dinamikus apnea teljesítményben. Ezt követően az élettani vizsgálatok során a következő paramétereknél vártunk egyértelmű különbséget: FVC, SpO<sub>2</sub> karakterisztika, lép jellemzők (hossz, keresztmetszet, térfogat, rugalmasság). A mért értékek azonban nem minden esetben mutattak jelentős eltéréseket.

A statikus levegővisszatartás méréséhez alkalmazott protokoll sikeresnek bizonyult, az eredmények alapján átlagosan közel 3 perces maximális levegővisszatartást sikerült elérni a csoportban. Minimális felkészüléssel, összesen kétszer ismételt levegővisszatartás mellett ez az érték 2 percre csökkent. A bűvár csoport tagjai átlagosan 5 percet teljesítettek ugyanezzel a protokollal. Náluk ez az érték minimális felkészülés esetén sem csökkent jelentős mértékben. Ennek magyarázata az adaptációban keresendő, jobban hozzá vannak szokva a légzési ingerekhez, valamint a folyamatos edzés miatt erősebb bűvárreflex jön létre. A gyakorlat alatt folyamatosan mértük az SpO<sub>2</sub>-szintet és a legkisebb értékek (maximális apnea alatt) között szignifikáns eltérést találtunk. Ezzel szemben az 28. ábra érzékelteti, hogy ugyanaz a gyakorlatsor a kontroll személynél látványos csökkenéseket okoz a véroxigén szintben, míg a bűvár esetében minimális a változás.

A dinamikus apnea, vagyis a víz alatti úszás közben a várakozásoknak megfelelően még nagyobb különbséget mértünk a csoportok között. Ebben az esetben a fizikai kondíció nagyobb szerepet játszott a jobb teljesítmény elérésében, mint a statikus apnea alatt. Az aktívan sportoló kontroll alanyok nem tudták a bűvárokat megközelíteni.

Hipoxiás állapotban, a szervezetben „védekező” mechanizmusok indulnak el (búvárreflex, perifériás vazokonstrikció), amelynek része a lép térfogatcsökkenése is (Espersen és mtsai 2002). Különböző képalkotó eljárásokkal vizsgáltuk a lép apnea hatására megjelenő változásait. Sikerült szignifikáns keresztmetszet- és térfogat változást kimutatni, azonban a csoportok között nem találtunk eltérést. Az apnea gyakorlatot nehezítette, hogy az UH mérés során az alanyok háton vagy oldalfekvésben helyezkedtek el a lép pozíciója szerint. Várakozásainkkal szemben pusztán néhány mm-es eltéréseket tudtunk mérni, főleg a bűvár csoportban, de ez nem járt látványos térfogatcsökkenéssel. Emiatt arra a következtetésre jutottunk, hogy az UH nem alkalmas arra, hogy ezekben a vizsgálati csoportokban a lép térfogatváltozását összehasonlítsuk.

A pontosabb adatok miatt MR vizsgálattal is megismételtük a mérést. A szeletek DICOM formátumban kerültek rögzítésre, amit MIPAV szoftverrel dolgoztunk fel. Minden szeleten körbe rajzoltuk a lépkontúrt, ami sok esetben nehézséget jelentett a többi szerv közelsége miatt. Ezt követően 3 dimenziós modellt alkottunk és térfogatot számítottunk. A tengelyek mentén mért, UH adatokhoz képest nagyobb mértékű térfogatváltozást tudtunk kimutatni a 3 dimenziós rekonstrukcióval. Mindkét csoportban szignifikáns eredmény mutatkozott 30, illetve 60 s értékeknél. Érdekes módon a két csoportot összehasonlítva ezekben az időpontokban nem figyeltünk meg jelentős különbséget. Az eredmény azt bizonyítja, hogy lép térfogatváltozása hipoxiás edzettség nélkül is létrejön. Az 32. ábrán látható, hogy a két csoport a 60 s mérésig hasonlóan viselkedik, azonban a kontroll alanyoknál ezt követően megjelenik az első légzési inger. Ily módon a kontroll alanyok esetében a hasonló mértékű térfogat változás nem segíti az apnea teljesítmény fokozást. A bűvárok több mint kétszer hosszabb (közel 3 perc) időt voltak képesek teljesíteni légzési inger nélkül. Eközben átlagosan 25%-os csökkenést mértünk a lép térfogatában. A volumenváltozás rendeződése (restitúció) ugyan mindkét csoportban 2 perc alatt megtörtént, azonban a bűvárok esetében ez gyorsabb folyamatot jelent a nagyobb mértékű térfogatváltozás miatt.

Az eredményeket más megközelítéssel is szeretnénk volna igazolni. A feltevésünk szerint az apnea hatására kiáramlik a lébben tárolt vér, csökken a térfogat (ahogy azt az MR felvételeken is látjuk) és emiatt változik a rugalmassága. Az elasztográfiás mérésekkel azonban csak egy esetben sikerült alátámasztani a jelenséget (35. ábra).

A spirometriai vizsgálat sem mutatott eltérést a csoportok között. A bűvár csoportban néhányan elsajátították az úgynevezett packing levegővételi technikát. A mért adatok alapján náluk 1-1,5 literrel nőtt a térfogat. A mennyiség függ a technikától, a tüdő állapotától, illetve a rekeszizom és a mellkas rugalmasságától is. Az elit versenyzők külön speciális nyújtó gyakorlatot végeznek annak érdekében, hogy minél több levegőt tudjanak „packingelni” a maximális teljesítmény előtt.

Ferretti és munkatársai azonban tőlünk eltérően jelentős különbséget mértek a bűvár és a kontroll alanyok tüdő paramétereit között (Ferretti és mtsai 2012). A vizsgálatuk során kimutatták, hogy a bűvár csoport tagjai átlagosan 22%-kal nagyobb FVC értékkel rendelkeztek (packing technika nélkül), mint a testparaméterek alapján várható. A megfigyelést a szerző egy másik publikációjában is megerősítette (Ferretti és mtsai 2003). A mérésen részt vett bűvároknál a fenti adatokhoz hasonlóan mi is ki tudtuk mutatni a megnövekedett erőltetett kilégzési vitálkapacitást, sőt egészen kiugró 65%-os többletet is mértünk, de ennek ellenére nem találtunk eltérést a kontroll értékekhez képest, akik átlagosan 15%-kal voltak a várható szint felett. Megjegyzendő, hogy a kontroll csoport többnyire fiatal, sportos alanyokból állt, így a spirometriás értékeket az egyének fizikai kondíciója magyarázhatja, ennek ellenére az apnea teljesítményben nem láttunk a bűvárokat megközelítő eredményeket.

A vizsgálat során azonban igazoltuk, hogy a bűvárok által használt speciális „packing” technikával mérhetően több levegő préselhető a tüdőbe (35. ábra). Az eredmények egybevágóak az irodalmi adatokkal is (Seccombe és mtsai 2006). A technika alkalmazásáról viszont megoszlanak a vélemények (Eichinger és mtsai 2008). A legegyszerűbb magyarázat szerint a jobb teljesítményhez több levegőre van szükség, amit ezzel a módszerrel, illetve edzéssel el lehet érni (Orio és Schagatay 2012, Overgaard és mtsai 2006). Azonban, a túlzott mértékű hiperinfláció negatív hatással lehet a szívműködésre és csökkentheti a perctérfogatot (Schipke és mtsai 2015, Novalija

és mtsai 2007). Ezen kívül károsíthatja a tüdőszövetet és akár vérzéses sérülést is okozhat, főleg mélymerülés esetén (Chung és mtsai 2010).

Az apnea teljesítmény egyik befolyásoló tényezője a véroxigén szint (Tutorov 2012). Az eredmények több szempontból is érdekesek. Az oxigéntáblás edzés alkalmával a kontroll alanyokat fokozatosan emelkedő apnea terheléssel szoktattuk a levegővisszatartáshoz. Az ismételt gyakorlatok közben folyamatosan 5-10%-os csökkenést figyeltünk meg. Ezzel szemben a búvárok értékei minimális 3-4%-os változást mutattak az edzés nagyrésztében és csak az utolsó néhány hosszabb ismétlés alatt volt ennél nagyobb (~5%) a csökkenés. A mintázatot jól szemlélteti az 28. ábrán látható alanyok adatai. Ennek megfelelően a búvárokat kevésbé terhelte meg az edzés, mint a kontroll csoport tagjait. Felvezetés vagy hozzászoktatás nélkül a kontroll csoport eredménye csökkent (26. ábra). Az SpO<sub>2</sub>-szintben minimális, néhány százalékos változás történt csak. Ezzel szemben a búvárok a kezdeti szakaszban, az edzéshez hasonló, stabil értéket tartottak, és csak a levegővisszatartás végén történt jelentős csökkenés, ami szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a kontroll csoportban. Az eredmények alapján arra következtetésre jutottunk, hogy a kontroll alanyok fokozatosan emelkedő terhelés esetén rövid távon adaptálódnak a magas CO<sub>2</sub> okozta légzési ingerekhez és képesek néhány százalékos SpO<sub>2</sub>-csökkenést elérni. Bemelegítés nélkül azonban ez nem figyelhető meg. A búvárok jobb adaptációja miatt a légzési ingerek nem korlátozzák a teljesítményt és a tényleges eredményt a várakozásoknak megfelelően az oxigénszint fogja meghatározni (Overgaard és mtsai 2006).

A jelenséget Heusser és munkatársai is kimutatták (Heusser és mtsai 2010). A csökkenő véroxigén szinttel együtt emelkedik vér CO<sub>2</sub>-tartalma is. A légzési inger elsősorban a növekvő CO<sub>2</sub>-szint váltja ki, amellyel szemben az edzett búvárok toleranciája megnő. A kontroll alanyok esetében ez magyarázhatja a kisebb apnea teljesítményt és a csekély mértékű SpO<sub>2</sub> változást.

Az egyéni apnea teljesítményre sok tényező hatással van, az irodalom a búvárreflex során bekövetkező változások mellett a lépreakciót említi a legtöbbször. Levegővisszatartás hatására a lép összehúzódással emeli a vér hemoglobinkoncentrációját az apnea kezdeti szakaszában (Lindholm és Lundgren 2009). A jelenségre vannak megfigyelések, de még nem pontosan feltárt a téma (Schagatay és



mtsai 2001). A búvároknál a merülés után tapasztalható emelkedett hemoglobín érték hasonló természetű, mint az alvási apnoés betegekénél, amely az alvás közbeni hipoxia mértékét jelzi (Choi és mtsai 2006, Ostrowski és mtsai 2012).

A lép apnea teljesítmény-beli szerepét jól mutatják a Bakovic és munkatársai által publikált adatok (Baković és mtsai 2003). Három csoportot (búvár, kontroll, splenektomizált) vizsgáltak és az eredményekből egyértelműen látszik, hogy a lép nélküli alanyok apnea teljesítménye elmarad a többi csoporthoz képest. Ismételt levegővisszatartás esetén is csak minimális változást értek el. A sorozatos apnea gyakorlatok közben a fentebb tárgyalt adatoknak megfelelően a búvár csoportnál jelentős eltérést találtak a véroxigén szintben. A lépméret és térfogatváltozások között hozzánk hasonlóan nem találtak eltérést a két csoportban. Érdekes megfigyelés azonban, hogy a mi eredményeinkhez képest az általuk mért ismételt apneát követően lassabban, 60 perc után történt meg a restitúció. Elia és munkatársainak munkája szintén megerősíti (Elia és mtsai 2019), hogy a kontroll és a búvár alanyok lépmérete között nincs eltérés. Továbbá nem találtak korrelációt a léptérfogat, testmagasság és testsúly összefüggésben.

Schagatay kutatása párhuzamot von a lépméret és az apnea teljesítmény között (Schagatay és mtsai 2012). Megfigyelése alapján a legjobb eredményt elért sportolók lépmérete volt a legnagyobb a vizsgált alanyok között. A kapcsolat olyan értelemben logikus, hogy nagyobb relatív térfogatváltozás jobban növeli a vérkeringés oxigénszállító kapacitását. Másfelől érdekes kérdést vet fel, hogy nem találtak korrelációt a lép térfogata és a testparaméterek között. Megremis és munkatársai más eredményre jutottak (Megremis és mtsai 2004). Munkájuk során több mint 500 mérést végeztek egészséges gyerekeken és megállapították, hogy a lépméret függ a kortól, testmagasságtól, testsúlytól, valamint a testfelülettől. Chow és munkatársai felnőtteken végeztek hasonló méréseket és a statisztikai kiértékelés alapján megerősítették, hogy a lép mérete magasság és súlyfüggő, valamint a nemek között is találtak eltérést (Chow és mtsai 2015). Az általunk megfigyelt adatok szintén nem mutatnak ilyen jellegű korrelációt az említett testparaméterekkel, de a mért értékek minden alany esetében belesznek a Chow és munkatársai által közölt normális tartományba. A reflex pontos mechanizmusa továbbra is kérdés, azonban Richardson és munkatársai szerint az emelkedő CO<sub>2</sub>-szint kapcsolatban áll a lép térfogatcsökkenésével (Richardson és mtsai

2012). A megfigyelést Lodin-Sundström és Schagatay mérési eredményei is alátámasztják (Lodin-Sundström és Schagatay 2010). Munkájuk során a hipoxiás környezet, illetve az apnea által kiváltott hatást tanulmányozták. A szaturációnál minimális volt az eltérést, azonban az apnea fázis alatt a lép térfogatértékek nagyobb csökkenést mutattak. A jelenség ismét magyarázható az akkumulálódó CO<sub>2</sub>-vel. A változás mértékét tekintve a mért adatok (32. ábra) egybe esnek Schagatay és munkatársai által számítottakkal (Schagatay és mtsai 2005). Hozzánk hasonlóan UH mérésekkel hossz- és keresztmetszeti értékeket vettek fel. Az adatokból matematikai számítás útján kaptak térfogat értékeket.

Az ultrahangos módszert más tanulmányok is alkalmazzák lépméret meghatározásra (Hosey és mtsai 2006). A folyamat során néhány milliméteres eltérést kaptunk a tengelyhossz adatokban, amely egyezést mutat más tanulmányokban mért nagyságrenddel (Hurford és mtsai 1990), de nem tartottuk elegendően precíznek a megfigyelést. Érdekes, hogy csak a keresztmetszeti tengelyen tapasztaltunk szignifikáns változást (30. ábra).

Összevetve az eddigieket, a lépméret csökkenése kedvező hatással bír az apnea teljesítményre abban az esetben, ha az alany képes a növekvő CO<sub>2</sub> indukált légzési ingereket kezelni.

A léptérfogat számítását MR felvételek alapján, többféle módon is el lehet végezni (Mazonakis és mtsai 2000, Betal és mtsai 2000). Jelen munkában 3 dimenziós rekonstrukcióval közelítettük a valós léptérfogatot Inoue és munkatársai által publikált módszerhez hasonlóan (Inoue és mtsai 2013). A közölt eredmények jelentős átfedést mutatnak az általunk megfigyelt térfogatváltozási adatokkal (0-30%). Az apnea hatására bekövetkező lépreakció nem teljesen tisztázott kérdés. Több közlemény is megerősíti, hogy bűvárokban mérhető a változás azonban a kontroll csoportok esetében eltérőek a megfigyelések (Hurford és mtsai 1990, Prommer és mtsai 2007, Baković és mtsai 2003, Schagatay és mtsai 2005).

Az eredmények alapján feltételeztük, hogy a statikus levegővisszatartás közben mért 20% körüli térfogatváltozás esetén a lép rugalmassága is mérhető változást mutat. A vizsgálatot nehezítette, hogy nem találtunk olyan közleményt, amely apnea közben használta volna ezt a módszert. A lépet érintő elasztográfiás vizsgálatok főleg

májzsugorodásról szóló tanulmányokban kerülnek említésre. Az alapértékeket a statikus gyakorlatot megelőzően rögzítettük, az eredmények minden esetben a normál tartományba estek (Stefanescu és mtsai 2011). Ezt követően kétszer ismételt bemelegítő apnea után végzett maximális levegővisszatartás közben 15 másodpercenként felvett készítettünk. Sajnos az értékek nagy szórást mutattak és a kiértékelés során nem tudtunk szignifikáns eltérést kimutatni, valamint az adatok mintázata sem tükrözte a kezdeti feltételezést. A kísérleti alanyok közül egy esetben azonban a várakozásoknak megfelelő eredményeket kaptunk, ami alátámasztja, hogy további vizsgálatok szükségesek a helyes módszer beállításához.

A kutatás ezen részét jelentősen korlátozta, hogy az elérhető bűvárpopuláció mindösszesen 10 fő. A pontosabb következtetésekhez mindenképp szükséges az elemszám növelése. A teljesítmény tesztek alkalmával a kontroll csoport a felkészítések ellenére, a kevés tapasztalat és a technikai tudás hiánya miatt nem tudta az optimális teljesítményt nyújtani. A spirometriai vizsgálatok esetében szintén kevés elemszámmal dolgoztunk. Továbbá, bemelegítés nélkül egyrészt valamivel kevesebb mennyiségű levegőt tudunk venni, másrészt a hirtelen nagy mennyiségű levegő szédüléshez, súlyosabb esetben ájuláshoz is vezethet. Az ismételt próbálkozások azonban idővel fáradást okoznak, így néhány próbálkozást követően csökken a mért FVC érték.

A véroxigén szint mérésekor figyelembe kell venni, hogy az extrém alacsony hipoxiás értékeknél az eszközök pontossága nem garantált. Általában 70-80%-ig biztosítják az 1%-os hibahatárt. Ezen felül fontos, hogy az újra csíptethető készülékek ne mozduljanak el a folyamat közben. Továbbá a pulzoximéterek a szaturált hemoglobinnal százalékos arányát mérik, illetve a bűvárreflex során bekövetkező perifériás vazokonstriktió befolyásolhatja az eredményt. Érdekes lenne hemoglobinkoncentrációt mérni lép kontrakció előtt és után, ami igazolhatja, hogy a kezdeti fázisban változatlan szaturáció az emelkedett hemoglobinnak köszönhető-e. A véroxigén szint pontosabb meghatározását vérgáz analízissel lehet elvégezni, amely szöveti oxigenizációs vizsgálattal kiegészítve fontos adatokat szolgáltat a szervezet oxigénfelvételét illetően. Az egyes folyamatok összeköthetőek lennének a vérben mérhető oxigén és szén-dioxid értékekkel.

Az alkalmazott képkalkoló vizsgálatoknak is megvannak a saját limitációi. Ismert, hogy az UH kifejezetten operátor függő. Éppen ezért a vizsgálatokat egy szakképzett radiológus végezte. A lép esetében rutinszerű a hosszanti (cranio-caudalis) és az egyik keresztmetszeti (hílushi) méret regisztrálása, azonban a lép nem mindig helyezkedik el ideális pozícióban. A térfogatot UH alapján becsülni/számítani lehet, azonban ehhez szükség van a harmadik méretre is, amelynek standard mérése kifejezetten nehézkes. Ezért vizsgáltuk pusztán az előbb említett két átmérőt, ugyanabban a síkban tartva a vizsgáló fejet, és az előre választott pillanatokban készítettünk felvételt. A mérés kifejezett hátránya, hogy a vizsgáló egyben a mérést végző radiológus, így nem vak módon végzi a kísérletet. Méréseink ezzel együtt a léptérfogat csökkenését mutatták, de meglepő módon nem találtunk különbséget a vizsgálati csoportok között. Fontos tapasztalat, hogy UH-val a mérések erősen szubjektív és tájékozódó jellegűek, mivel a sík is tapasztalati úton kerül kiválasztásra, valamint a mérésekhez sem lehet egyértelmű, pontosan megismételhető anatómiai pontokat megadni. A technika természetesen jól működik a klinikai gyakorlatban, ahol elegendő a lépmegnagyobbodás tényét és annak hozzávetőleges mértékét megállapítani.

Az MR felvételek kiküszöbölik ezeket a gondokat, azonban nagyon érzékeny a bemozdulásokra, amelyek csak a kiértékelés során derülnek ki. Így a rekeszizom mozgása (légzési inger) miatt nincs lehetőség maximális apnea kísérletek monitorozására. További megfontolandó tény, hogy az első légzési inger egyén- és állapotfüggő. Léteznek olyan versenyzők, akiknél nagyon korán megjelenik az első rekeszizom kontrakció, amit hosszú ideig képesek elviselni. Másoknál sokkal később történik meg a reakció. Ennek megfelelően értékes adatokról maradhatunk le. A folyamat végén rekonstruált 3 dimenziós modell jól közelíti a valós méretet, de a szeletek vastagságának megfelelően lesz eltérés.

Az elasztográfiás módszernél az UH korlátain felül komoly kihívás, hogy nagyon nagy kooperációt igényel a vizsgálat alany és a vizsgáló részéről, illetve, hogy nem található a témában iránymutató publikáció. Továbbá, elképzelhető, hogy az elasztográfiás módszer csak kellő mértékű volumencsökkenés esetén alkalmazható. A feltételezést alátámasztja, hogy a várakozásoknak megfelelő eredményt annál a bűvárnál mértük, akinél a korábbi mérések során maximális volt a térfogatcsökkenés. Az egyéni adaptáció is befolyásolhatja, hogy a hipoxia hatására milyen aktivitással jelenik meg a

lép reakciója. A jelenlegi eredmények alapján indokolt a bűvár populáció nagyobb számban történő ismételt vizsgálata a jelenség pontos értelmezéséhez.

Az irodalomban talált publikációkban sem teljes az összhang az apnea által kiváltott hatásokat illetően, ezért a mért fiziológiai paramétereiből nem lehet azonnal következtetéseket levonni a teljesítményre vonatkozóan. Jelen adatoknál azonban a jelenség kimutatása volt az elsődleges cél.

További vizsgálatok szükségesek, ahol nagyobb elemszámmal dolgozva várhatóan az eredmények is egyértelműbb információt adnak. Érdekes lenne a statikus kísérleteket vizes környezetben is vizsgálni, ahol a bűvárreflex még erősebben megjelenik. Továbbá, az akut teljesítmény felmérésén túl a kontroll csoport edzése is értékes információval szolgálhat. Az irodalmi megfigyelések alapján vizsgálható lenne, hogy az átlagosnál nagyobb léppel és tüdővel rendelkező egyének fejlődésdinamikája, milyen összefüggést mutat az átlagos vagy az az alatti mérettel rendelkezőkével. A kísérlet akár tisztázhatja is a jelenleg megosztó véleményeket az egyes szervek szerepét illetően.

A statikus vizsgálatok elnyújthatók tiszta oxigén beléggzéssel. Ennek megfelelően hosszabb képalkotóvizsgálatra lenne lehetőség, amely során több információt szerezhethetünk a lépreakciót indukáló folyamatokról. Valamint a „packing”, levegőnyeléses technika alkalmazása is felvet vizsgálandó kérdéseket. Okoz-e a nagyobb térfogat miatt kialakuló többletnyomás, illetve szöveti feszülés eltérést a bűvár reflex folyamatában? Magyarázható-e a teljesítmény béli különbség a technikával, és ha igen, akkor milyen mértékben?

Az apnea hatására bekövetkező folyamatok jobb megértése és a gyűjtött információk segíthetik a specifikus edzésmódszerek kidolgozását, amelyek célirányosan a hipoxia és hiperkapnia toleranciát erősítik. Jelen kutatásban nem alkalmaztunk invazív módszereket, azonban az irodalmi értékek alapján a vérben is mérhető változásokat lehet kimutatni. Természetesen, az ilyen jellegű vizsgálatok bonyolítják a kísérletet. Alternatív megoldása lehet a problémának a bemutatott alvási apnoe modell. Megfelelő beállítás mellett állatokon modellezhető akár a statikus, akár a dinamikus apnea. Az edzés adaptációs hatásokon kívül lehetőség nyílna szövettani vizsgálatokra is.

A fent említett irányokon túl a hipoxiás kondicionálás egészségügyi és sport vonatkozásai is érdekes témát jelentenek (Törpel és mtsai 2018). Az okklúziós vagy más néven Kaatsu módszert már évek óta használják egészségfejlesztésre (Nakajima és mtsai 2006, Vanwye és mtsai 2017). A jelenlegi trendek szerint a sportteljesítményre is kedvező hatással van azáltal, hogy kisebb ellenállással akár nagyobb savasodást is elő tudunk idézni (Conceição és mtsai 2018). A búvárkodás szempontjából a szervezet oxigénfelvétele kritikus, amely függ a testösszetételtől. Az anaerob tartomány és a tejsav felhalmozódás kifejezetten a dinamikus apnea számok alatt történik. Szárazedzés során ennek megfelelő edzéseket kell alkalmazni, anélkül, hogy jelentősen növelnénk az izomzat tömegét. Ennek megfelelően a Kaatsu módszer remek kiegészítője lehet a szabadtüdős szárazedzéseknek (Chamas 2019). A felvetés további vizsgálatot igényel annak érdekében, hogy kialakítható legyen az optimális edzésszám és az alkalmazott okklúzió mértéke (Patterson és mtsai 2019).

## 9 Következtetések

A korábbi fejezetekben ismertetett eredmények alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a dolgozatban bemutatott egyedi fejlesztések alkalmasak az iszkémia *in vitro*, illetve hipoxia *in vivo* modellezésére. A kidolgozott protokollok ismételhető és megbízható eredményt szolgáltatnak.

Az OGD modell fejlesztése során a validációs tesztek igazolták, hogy a készülék megfelel a kívánt követelményeknek. Stabil módon képes az általunk végzett kísérletekhez szükséges 4, illetve 37 °C-os hőmérséklet fenntartására, megfelelő szigeteléssel rendelkezik, amely biztosítja, hogy az oxigénkoncentráció folyamatosan 0,5% alatt maradjon. Pneumatikai elemek segítségével a rendszer nitrogén fogyasztását is sikerült optimalizálni. A tesztek alatt a páratartalom végig a szövetkultúráknak kedvező szinten maradt. A validációs eredmények megerősítették, hogy a kamra alkalmas az irodalomban és a piacon található más hipoxiás kamrákhoz hasonló funkciókra, így megalapozottá vált a kamra szövet kísérleti alkalmazása. Az OGD kísérletek során a szövetek túlélőképességét két paraméter befolyásolja: a hőmérséklet és az iszkémiás állapot időtartama. A két kamrás felépítés lehetővé tette az eltérő hőmérsékleten zajló, párhuzamos vizsgálatokat. Az ismételt kísérletek eredményei alapján a modell képes biológiai hatást kiváltani, ismételhető módon. Az eredmények pedig igazolják a felvetésünket, miszerint a hőmérséklet és az iszkémiás idő jelentősen befolyásolják a túlélési arányt. A rendszer továbbá alkalmazható iszkémia-tűrőképesség fokozó vizsgálatokra, amely során optimalizált eljárás dolgozható ki az egyes szövet típusok konzervációjára. A transzplantációs területen kívül számos betegség és akut sérülés közben lezajló folyamatok jobb megértését is lehetővé teszi.

Az alvási apnoe modell technikai validációját empirikus úton valósítottuk meg. A tesztek során olyan beállításokat alkalmaztunk, amelyek biztosították a kívánt sebesség és oxigénkoncentrációk elérését. A menürendszer lehetővé tette a szabad paraméterválasztást, így a rendszer alkalmassá vált más protokollok vizsgálatára is. A technikai mérések során kapott adatok egybevágóan más tanulmányokban használt értékekkel, ezzel igazolva, hogy a kamra műszakilag alkalmas a modellezésre. A vizsgálatok alatt nem tapasztaltunk rendellenes viselkedést a kísérleti állatokon, amely megerősítette, hogy a kamra és az alkalmazott áramlássebesség, páratartalom megfelelő

számukra. A biológiai validáció során a sorozatos hipoxiás expozíció gyulladós folyamatot indított el az állatok agyában. A folyamat jól nyomon követhető volt biolumineszcens képalkotó technológiával, illetve az elváltozások hisztológiai vizsgálattal igazolhatók a kísérletet követően. Az eredmények alapján az alvási apnoe állatkísérlettel modellezhető szakaszos hipoxia kamrában. A készülék ezen felül alkalmas lehet a hipoxia során kiváltott adaptációs mechanizmusok megfigyelésére is. Ezzel lehetőséget biztosít, hogy részletesebb információt kapjunk az egyes szervek hipoxia, illetve anoxia közben betöltött szerepéről.

Az eszközfelkészítés mindkét esetben sikeresnek bizonyult, amelyek során olyan alpmódszereket hoztunk létre, amelyre más kutatásokat is fel lehet építeni. Ezt támasztja alá az azóta elindult kísérletek eredményei, amelyek alapján a jelen munkától függetlenül egy diplomamunka, egy doktori értekezés, illetve két tudományos publikáció megvalósulását is biztosították. Továbbá, a fejlesztőmunka sikerét tovább erősíti az obstruktív alvási apnoe kamra idén elfogadásra került szabadalmi bejelentése.

A humán vizsgálatoknál a teljesítmény adatok alapján egyértelműen látszott a különbség a kontroll és a búvár csoportok között. A búvároknál mért értékek alapján levonható a következtetés, hogy az apnea tűrőképesség edzéssel javítható, azonban az élettani mérések során nem találtunk olyan különbséget, amely egyértelműen azonosíthatná az adaptációt. Ennek ellenére a FVC érték és lépméret indikátora lehet az apnea teljesítménynek.

A lépreakciók képalkotó eljárással nyomon követhetők, amely során megállapítottuk, hogy az ultrahang alkalmas arra, hogy a lépkontrakció tényét búvár esetében regisztráljuk, azonban arra nem alkalmas, hogy a méretváltozás pontos mértékét meghatározzuk. A megfigyeléseink szerint az MR bizonyult a legpontosabbnak, emiatt ennek alkalmazása lenne szükséges a későbbi vizsgálatokban.

A hipoxia tanulmányozására bemutatott három különböző megközelítés, együttesen egy olyan eszközparkot és lehetőséget kínál, amely a sejtszintű kísérletektől egészen a humán vizsgálatokig lehetővé teszi a kutatást. A megfigyelések és az irodalmi adatok alapján a kísérletek jó kiegészítői egymásnak. Az obstruktív alvási apnoe kamra kiváló kapcsolódási pont az OGD és apnea kutatások között. A két kamrát együtt használva az *in vivo* módon kiváltott elváltozásokat *in vitro* OGD kísérlettel igazolni tudjuk. Ezen



felül hasonlóság mutatkozik az apnea és az alvási apnoe közben zajló folyamatoknál. Az OSA kamra ez alapján alkalmas apnea kísérletekre is, amelyek eredménye felhasználható a humán vizsgálatok során is.

## 10 Összefoglalás

A dolgozatban bemutatott munka során több különböző módszer segítségével vizsgáltuk a hipoxia szövetekre, illetve szervezetre gyakorolt hatását. Az első fázisban kialakítottunk egy *in vitro* iszkémia modellezésre alkalmas készüléket, amely alkalmas folyamatos 0,5% alatti O<sub>2</sub>-koncentrációt, illetve beállítástól függően 4-37 °C között hőmérsékletet biztosítani. Csontszöveti OGD vizsgálatokkal igazoltuk, hogy a rendszer alkalmas különböző hőmérsékleten az iszkémiás hatások tanulmányozására. A csont explantátumokat patkány koponyacsontból izoláltuk, majd 3 napos inkubációt követően kerültek az OGD kamrába. A kísérletek párhuzamosan 4, illetve 37 °C-os hőmérsékleten, eltérő expozíciós időkkel történtek. Az időszerelemzés kimutatta, hogy a hűtés segítségével jelentős mértékben javítható a csontsejtek iszkémiás-reperfúziós sérülést követő túlélése.

A kutatás második fázisában a célunk egy olyan automata rendszer fejlesztése volt, amely folyamatos gázcserével szakaszos módon képes az alvási apnoéhoz hasonló hipoxiát előidézni. A létrehozott készülék alkalmas 0-30% közötti O<sub>2</sub>-koncentrációk szabályozására két különböző periódusban. A kísérlet során 90 s periódus időt használtunk 5,7%, illetve 20,8% O<sub>2</sub>-szintekkel. A vizsgálat napi 8 órán keresztül 21 napig zajlott. A folyamathoz transzgénikus egereket használtunk, ami lehetővé tette a noninvazív biolumineszcens felvételekkel történő monitorozást. A kiértékelés során mérhető stresszhatást mutattunk ki az agyban, amely igazolta, a kialakított kísérleti módszer alkalmasságát.

A munka befejező részében humán vizsgálatokkal kerestük azon élettani paramétereket, amelyek hatással lehetnek az apnea közben bekövetkező hipoxia elleni tűrőképességre. A mérések során edzett szabadtüdőbűvár populációval igazoltuk, hogy a hipoxiatolerancia edzéssel fokozható. A kísérletben vizsgáltuk az erőltetett kilégzési vitálkapacitást, az apnea alatti véroxigén változást, illetve a lépreakciót. A tüdőterefogatban nem találtunk jelentős eltérést a két csoport között. Ezzel szemben az eltérő apnea teljesítmények szignifikáns különbséget okoztak a maximális teljesítmény során elért minimális szaturációs értékeknél. Az apnea hatására a lépben bekövetkező terfogatváltozást képalkotó vizsgálatokkal (UH, MR) megerősítettük. A bűvárok jelentősen több ideig bírták a vizsgálatot, mint a kontroll csoport tagjai. Ennek

megfelelően nagyobb mértékű térfogatváltozást értek el a szubmaximális méréskor. Ezzel szemben a restitúció mindkét csoportban megtörtént a 2 perces pihenő alatt. Az eredmények alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a reakció gyorsabban zajlik a bűvárok esetében.

## 11 Summary

The present work introduces several methods to study the effect of hypoxia at tissue and organ level. In the first phase, an *in vitro* ischemia modelling device was developed which is suitable to provide continuous O<sub>2</sub> concentration below 0.5% and temperature between 4-37 °C depending on the settings. The system can be used for observing ischemic effects at different temperatures as confirmed by OGD experiments with bone tissues. Bone explants were harvested from rat skull and used for OGD experiments after 3 days of incubation. The measurements were performed in parallel at 4 and 37 °C with different exposure times, respectively. The time series analysis showed that the cooling can significantly increase bone cells survival after ischemic-reperfusion injury.

In the second phase of the research, our goal was to develop an automated system that can intermittently induce hypoxia, similarly to what happens during sleep apnea, by continuous gas exchange. The created device is suitable for controlling O<sub>2</sub> concentrations between 0-30% in two different time periods. 90s periods were used during the experiments with 5.7% and 20.8% O<sub>2</sub> levels, respectively. The study lasted 8 hours a day for 21 days. The experiments were conducted on transgenic mice allowing non-invasive bioluminescent imaging observation. The suitability of the developed experimental method was confirmed by showing measurable effects of stress in the brain during the evaluation.

In the concluding part of the work human measurements were performed to look for physiological parameters that may affect hypoxia tolerance during apnea. The fact that hypoxia tolerance can be enhanced by training was demonstrated by testing a group of trained freedivers. Lung capacity, blood oxygen changes and splenic volume response were measured during the experiments. No significant difference was found in lung capacities between the diver and the control groups. In contrast, different apnea performances caused significant differences in the minimum saturation values achieved during maximal apnea attempt. The volume change of the spleen due to apnea was confirmed by imaging measurements (UH, MR). Freedivers performed significantly better in the apnea tests than the subjects of control group. Accordingly, a larger volume change was reached during the submaximal attempt. In contrast, restitution was done in

both groups during the 2 minutes rest period. The recovery proceeds faster in freedivers was concluded based on the results.

## 12 Irodalomjegyzék

AIDA World Records. (2020) AIDA International. Letöltés dátuma: 2020. február 04.

Forrás: <https://worldrecords.aidainternational.org/>

Alluri H, Anasooya Shaji C, Davis ML, Tharakan B. (2015) Oxygen-Glucose Deprivation and Reoxygenation as an In Vitro Ischemia-Reperfusion Injury Model for Studying Blood-Brain Barrier Dysfunction. *J Vis Exp*, 99(e52699):1-5.

Almeida A, Delgado-Esteban M, Bolaños PJ, Medina MJ. (2002) Oxygen and glucose deprivation induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurones but not in astrocytes in primary culture. *J Neurochem*, 81(2):207-217.

Antoni D, Burckel H, Josset E, Noel G. (2015) Three-Dimensional Cell Culture: A Breakthrough in Vivo. *Int J Mol Sci*, 16(12):5517-5527.

Engelbrecht C. (2009) History of freediving. Seanomad Freediving School. Letöltés dátuma: 2020. február 04. Forrás: <https://seanomad-freediving.com/en/content/history-freediving>

Bago M, Horvathy D, Simon M, Marschall B, Pinto A, Kuten O, Polšek D, Hornyak I, Nehrer S, Lacza Zs. (2018) Temperature controlled dual hypoxic chamber design for in vitro ischemia experiments. *Biocybern Biomed Eng*, 38(3):498-503.

Baković D, Valic Z, Eterović D, Vukovic I, Obad A, Marinović-Terzić I, Dujčić Z. (2003) Spleen volume and blood flow response to repeated breath-hold apneas. *J Appl Physiol*, 95:1460–1466.

Bansal HO, Rajamayoor S, Shreeraman PR. (2012) PID Controller Tuning Techniques: A Review. *JCET*, 2(4):168-176.

Beidleman BA, Muza SR, Fulco CS, Jones JE, Lammi ES, Cymerman A. (2009) Intermittent altitude exposures does not improve endurance performance at altitude. *Med Sci Sports Exerc*, 41(6):1317-1325.

Berggren A, Weiland A, Dorfman H. (1982) The effect of prolonged ischemia time on osteocyte and osteoblast survival in composite bone grafts revascularized by microvascular anastomoses. *Plast Reconstr Surg*, 69(2):290-298.

Betal D, Hughes ML, Whitehouse GH, Roberts N. (2000) Postprandial Decrease in Splenic Volume Demonstrated by Magnetic Resonance Imaging and Stereology. *Clin Anat*, 13(6):404–409.

Billups-Rothenberg Inc. (2018) MIC-101 Billups-Rothenberg Inc. Letöltés dátuma: 2019. november. 22. Forrás: <https://brincubator.com/modular-incubator-chamber/>

BioSpherix. (2019) BioSpherix Products. Letöltés dátuma: 2019. november. 22. Forrás: <https://www.biospherix.com/>

Bradley T, Floras J. (2009) Obstructive sleep apnoea and its cardiovascular consequences. *Lancet*, 373(9657):82-93.

Campsen J, Zimmerman M, Bak TE. Kidney and Pancreas Transplantation (Chapter 90). In: Harken A, Moore E (szerk.), *Abernathy's Surgical Secrets*, 6th ed., Mosby: Elsevier Inc., Philadelphia, 2009: 436-438.

Chamas H. (2019) KAATSU for Freediving | The Future of Freedive Training. *Freedive Passion*. Letöltés dátuma: 2019. december. 01. Forrás: <https://www.freedivepassion.com/post/kaatsu-for-freediving-the-future-of-freedive-training>

Chapleau MW. (2010) CIH: from sleep apnea to breath-hold diving. *Clin Auton Res*, 20(2):53-55.

Chen J, Zhang C, Feng Y, Zong C, Chen J, Wang J, et al. (2013) Studies on Culture and Osteogenic Induction of Human Mesenchymal Stem Cells under CO<sub>2</sub>-Independent Conditions. *Astrobiology*, 13(4):370-379.

Choi JB, Loredó JS, Norman D, Mills PJ, Ancoli-Israel S, Ziegler MG, Dimsdale JE. (2006) Does obstructive sleep apnea increase hematocrit? *Sleep Breath*, 10(3):155-160.

Chow KU, Luxembourg B, Seifried E, Bonig H. (2015) Spleen Size Is Significantly Influenced by Body Height and Sex: Establishment of Normal Values for Spleen Size at US with a Cohort of 1200 Healthy Individuals. *Radiology*, 279(1):306-313.

- Chung SC, Seccombe LM, Jenkins CR, Frater CJ, Ridley LJ, Peters MJ. (2010) Glossopharyngeal insufflation causes lung injury in trained breath-hold divers. *Respirology*, 15(5):813-817.
- Conceição MS, Gáspari AF, Ramkrapes A, Junior E, Bertuzzi R, Cavaglieri CR, Chacon-Mikahil M. (2018) Anaerobic metabolism induces greater total energy expenditure during exercise with blood flow restriction. *PLoS One*, 13(3): e0194776.
- Cool Chips. (2019) Cool Chips Technology. Letöltés dátuma: 2019. november. 24. Forrás: <http://www.coolchips.gi/technology/ccalc.shtml>
- CoyLab. (2019) Coy Laboratory Products. Letöltés dátuma: 2019. november. 22. Forrás: <https://coylab.com/>
- Cselenyák A, Pankotai E, Horváth EM, Kiss L, Lacza Zs. (2010) Mesenchymal stem cells rescue cardiomyoblasts from cell death in an in vitro ischemia model via direct cell-to-cell connections. *BMC Cell Biol*, 11(29):1-11.
- Das R, Jahr H, van Osch G JVM, Farrell E. (2010) The role of hypoxia in bone marrow-derived mesenchymal stem cells: considerations for regenerative medicine approaches. *Tissue Eng Part B Rev*, 16(2):159-168.
- Davis PJ, Cladis FP, Motoyama EK. Anesthesia for Congenital Heart Surgery (Chapter 20). In: Andjelkovic N, Mirra J (szerk.), *Smith's Anesthesia for Infants and Children*, 8th ed., Mosby: Elsevier Inc., Philadelphia, 2011: 616-684.
- De Bruycker S, Vangestel C, Staelens S, Van den Wyngaert T, Stroobants S. (2018) How to Modulate Tumor Hypoxia for Preclinical In Vivo. *Contrast Media Mol Imaging*, 2018:1-17.
- Desouza C, Salazar H, Cheong B, Murgo J, Fonseca V. (2003) Association of hypoglycemia and cardiac ischemia: a study based on continuous monitoring. *Diabetes Care*, 26(5):1485-1489.
- Dobrivojević M, Boháček I, Erjavec I, Gorup D, Gajović S. (2013) Computed microtomography visualization and quantification of mouse ischemic brain lesion by nonionic radio contrast agents. *Croat Med J*, 54(1):3-11.



- Dujic Z, Ivancev V, Heusser K, Dzamonja G, Palada I, Valic Z, et al. (2008) Central chemoreflex sensitivity and sympathetic neural outflow in elite breath-hold divers. *J Appl Physiol*, 104:205-211.
- Eichhorn L, Doerner J, Luetkens JA, Lunkenheimer JM, Dolscheid-Pommerich RC, Erdfelder F, et al. (2018) Cardiovascular magnetic resonance assessment of acute cardiovascular effects of voluntary apnoea in elite divers. *J Cardiovasc Magn Reson*, 20(40):1-11.
- Eichinger M, Waltersbacher S, Scholz T, Tetzlaff K, Röcker K, Muth CM, et al. (2008) Lung hyperinflation: foe or friend? *Eur Respir J*, 32(4):1113-1116.
- Elia A, Wilson, OJ, Lees M, Parker PJ, Barlow MJ, Cocks M, O'Hara JP. (2019) Skeletal muscle, haematological and splenic volume characteristics of elite breath-hold divers. *Eur J Appl Physiol*, 119(11-12):2499–2511.
- Engineering ToolBox. (2008) Compressed Air and Water Content. Letöltés dátuma: 2019. november. 23. Forrás: [https://www.engineeringtoolbox.com/water-content-compressed-air-d\\_1275.html](https://www.engineeringtoolbox.com/water-content-compressed-air-d_1275.html)
- ESBE Scientific. (2016) CytoGrow ReachIn Large Capacity CO2 Incubator. Letöltés dátuma: 2020. február 02. Forrás: <http://en.esbe.com/products/C1-LIFESCIENCE/C2-INCUBATION/C3-CO2INCUBATORS/1CP-CO2INCLRG.aspx>
- Espersen K, Frandsen H, Lorentzen T, Kanstrup IL, Christensen NJ. (2002) The human spleen as an erythrocyte reservoir in diving-related interventions. *J Appl Physiol* (1985), 92(5):2071-2079.
- Eurostat. (2019) Causes and occurrence of deaths in the EU. Letöltés dátuma: 2019. november. 21. Forrás: <https://ec.europa.eu/eurostat/web/products-eurostat-news/-/DDN-20190716-1>
- Fan J, Liu Y, Yin J, Li Q, Li Y, Yin G, et al. (2016) Oxygen-Glucose-Deprivation /Reoxygenation-Induced Autophagic Cell Death Depends on JNK-Mediated Phosphorylation of Bcl-2. *Cell Physiol Biochem*, 38:1063-1074.
- Ferretti G, Costa M. (2003) Diversity in and adaptation to breath-hold diving in humans. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 136(1):205-213.

- Ferretti G, Costa M, Moroni R, Ranieri P, Butti F, Sponsiello N. (2012) Lung volumes of extreme breath-hold divers. *Sport Sci Health*, 7(2-3):55-59.
- Cowled P, Fitridge R. Pathophysiology of Reperfusion Injury (Chapter 18). In: Fitridge R, Thompson M (szerk.), *Mechanisms of Vascular Disease: A Reference Book for Vascular Specialists*. Barr Smith: University of Adelaide Press. Adelaide, 2011: 331-350.
- Francel TJ, Vander Kolk CA, Yaremchuk MJ. (1992) Locally applied hypothermia and microvascular muscle flap. *Ann Plast Surg*, 28(3):246-215.
- Franklin KA, Lindberg E. (2015) Obstructive sleep apnea is a common disorder in the population-a review on the epidemiology of sleep apnea. *J Thorac Dis*, 7(8):1311-1322.
- Fulco CS, Beidleman BA, Muza SR. (2013) Effectiveness of Preacclimatization Strategies for High-Altitude Exposure. *Exerc Sport Sci Rev*, 41(1):55-63.
- Goldbart A, Row BW, Kheirandish L, Schurr A, Gozal E, Gozal D, et al. (2003) Intermittent hypoxic exposure during light phase induces changes in cAMP response element binding protein activity in the rat CA1 hippocampal region: water maze performance correlates. *Neuroscience*, 122(3):585-590.
- Govus AD, Garvican-Lewis LA, Abbiss CR, Peeling P, Gore CJ. (2015) Pre-Altitude Serum Ferritin Levels and Daily Oral Iron Supplement Dose Mediate Iron Parameter and Hemoglobin Mass Responses to Altitude Exposure. *PLoS One*, 10(8): e0135120.
- Greenberg HE, Sica A, Batson D, Scharf SM. (1999) Chronic intermittent hypoxia increases sympathetic responsiveness to hypoxia and hypercapnia. *J Appl Physiol* (1985), 86(1):298-305.
- Grizzle WE, Otali D, Sexton KC, Atherton DS. (2016) Effects of Cold Ischemia on Gene Expression: A Review and Commentary. *Biopreserv Biobank*, 14(6):548-558.
- Guibert EE, Petrenko AY, Balaban CL, Somov AY, Rodriguez JV, Fuller BJ. (2011) Organ Preservation: Current Concepts and New Strategies for the Next Decade. *Transfus Med Hemother*, 38(2):125-142.

- Gulczynska EM, Gadzinowski J, Kesiak M, Sobolewska B, Caputa J, Talar T, et al. (2019) Therapeutic hypothermia in asphyxiated newborns: selective head cooling vs. whole body cooling - comparison of short term outcomes. *Ginekol Pol*, 90(7):403-410.
- Gurevich YG, Logvinov GN. (2005) Physics of thermoelectric cooling. *Semicond Sci Tech*, 20(12): R57.
- Hara-Miyauchi C, Tsuji O, Hanyu A, Okada S, Yasuda A, Okano H, et al. (2012) Bioluminescent system for dynamic imaging of cell and animal behavior. *Biochem Biophys Res Commun*, 419(2):188-193.
- Hartmann IK, Wagener J. (2019) CO2 Incubators - Making the Best Choice for Your Lab. WHITE PAPER, 50:1-5. Letöltés dátuma: 2019. november. 24. Forrás: [https://www.ependorf.com/product-media/doc/en/604515/CO2-Incubators\\_White-Paper\\_050\\_CellXpert-CO2-Incubators\\_CO2-Incubators-Making-Best-Choice-Your-Lab.pdf](https://www.ependorf.com/product-media/doc/en/604515/CO2-Incubators_White-Paper_050_CellXpert-CO2-Incubators_CO2-Incubators-Making-Best-Choice-Your-Lab.pdf)
- Hayashi N, Ishihara M, Tanaka A, Osumi T, Yoshida T. (1997) Face immersion increases vagal activity as assessed by heart rate variability. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 76(5):394-399.
- Hendrikse S, Merks A. (2009) Diving the Skafandro suit. *Diving Heritage*. Letöltés dátuma: 2019. november. 24. Forrás: <https://www.divingheritage.com/greecekern2.htm>
- Heusser KD, Breskovic T, Diedrich A, Joyner MJ, Luft FC, Jordan J, Dujic Z. (2009) Cardiovascular Regulation During Apnea in Elite Divers. *Hypertension*, 53(4):719-724.
- Heusser K, Dzamonja G, Breskovic T, Steinback CD, Diedrich A, Tank J, et al. (2010) Sympathetic and cardiovascular responses to glossopharyngeal insufflation in trained apnea divers. *J Appl Physiol*, 109(6):1728-1735.
- Higher Peak. (2020) MAG-20 Altitude Generator. Letöltés dátuma: 2020. február 03. Forrás: <https://www.higherpeak.com/store/p1/mag20.html>
- Holloway PM, Gavins FN. (2015) Modeling Ischemic Stroke In Vitro: Status Quo. *Stroke*, 47(2):561-569.

- Hosey R, Mattacola C, Kriss V, Armsey T, Quarles J, Jagger J. (2006) Ultrasound assessment of spleen size in collegiate athletes. *Br J Sports Med*, 40(3):251–254.
- Hurford WE, Hong SK, Park YS, Ahn DW, Shiraki K, Mohri M, Zapol WM. (1990) Splenic contraction during breath-hold diving in the Korean ama. *J Appl Physiol*, 69(3):932-936.
- Hypoxico. (2019) Hypoxico Altitude Pool Lane. Letöltés dátuma: 2019. november. 24. Forrás: <https://hypoxico.com/commercial-systems/hypoxico-pool/>
- Inoue Y, Nakajima A, Mizukami S, Hata H. (2013) Effect of Breath Holding on Spleen Volume Measured by Magnetic Resonance Imaging. *PLoS One*, 8(6): e68670.
- Ito K, Suda T. (2014) Metabolic requirements for the maintenance of self-renewing stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(4):243-256.
- Joulia F, Steinberg JG, Faucher M, Jamin T, Ulmer C, Kipson N, Jammes Y. (2003) Breath-hold training of humans reduces oxidative stress and blood acidosis after static and dynamic apnea. *Respir Physiol Neurobiol*, 137(1):19-27.
- Joulia F, Steinberg JG, Wolff F, Gavarry O, Jammes Y. (2002) Reduced oxidative stress and blood lactic acidosis in trained breath-hold human divers. *Respir Physiol Neurobiol*, 133(1-2):121-30.
- Kanazawa M, Miura M, Toriyabe M, Koyama M, Hatakeyama M, Ishikawa M, et al. (2017) Microglia preconditioned by oxygen-glucose deprivation promote functional recovery in ischemic rats. *Sci Rep*, 42582(7):1-16.
- Kapałczyńska M, Kolenda T, Przybyła W, Zajączkowska M, Teresiak A, Filas V, et al. (2018) 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch Med Sci*, 14(4):910-919.
- Kent BD, Ryan S, McNicholas WT. (2011) Obstructive sleep apnea and inflammation: relationship to cardiovascular co-morbidity. *Respir Physiol Neurobiol*, 178(3):475-481.
- Kerrigan CL, Stotland MA. (1993) Ischemia reperfusion injury: a review. *Microsurgery*, 14(3):165-175.

Kharbanda RK, Mortensen UM, White PA, Kristiansen SB, Schmidt MR, MacAllister R, et al. (2002) Transient limb ischemia induces remote ischemic preconditioning in vivo. *Circulation*, 106(23):2881-2883.

Khodae M, Grothe HL, Seyfert JH, VanBaak K. (2016) Athletes at High Altitude. *Sports Health*, 8(2):126-132.

Kiviniemi AM, Breskovic T, Uglesic L, Kuch B, Maslov PZ, Dujic Z, et al. (2012) Heart rate variability during static and dynamic breath-hold dives in elite divers. *Auton Neurosci*, 169(2):95-101.

Kiyoshi S. (1991) Cold Ischemic Damage to Bone. *J reconstr Microsurg*, 7(3):179-185.

Kolár F, Jezková J, Balková P, Breh J, Neckár J, Herget J, et al. (2007) Role of oxidative stress in PKC-delta upregulation and cardioprotection induced by chronic intermittent hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 292(1):H224-H230.

Kong H, Omran A, Ashhab MU, Gan N, Peng J, He F, et al. (2014) Changes in microglial inflammation-related and brain-enriched MicroRNAs expressions in response to in vitro oxygen-glucose deprivation. *Neurochem Res*, 39(2):233-243.

Evolved New Media. (2011) Beating the edge effect. *Laboratory News*. Letöltés dátuma: 2019. november. 24. Forrás:

[http://www.labnews.co.uk/article/2028052/beating\\_the\\_edge\\_effect](http://www.labnews.co.uk/article/2028052/beating_the_edge_effect)

Lalancette-Hébert M, Faustino J, Thammisetty SS, Chip S, Vexler ZS, Kriz J. (2017) Live imaging of the innate immune response in neonates reveals differential TLR2 dependent activation patterns in sterile inflammation and infection. *Brain Behav Immun*, 65:312-327.

Lányi A, Lovas R, Náráy-Szabó G, Pákozdi I. (2007) Tézisek a felsőoktatásról. VISSZHANG. LI. évfolyam 31. szám, 2007. augusztus 3. Letöltés dátuma: 2019. november. 24. Forrás: <https://www.es.hu/cikk/2007-08-05/lanyi-andras-lovas-rezso-naray-szabo-gabor-pako/tezisek-a-felsooktatasirol.html>

Leach RM, Treacher DF. (1998) Oxygen transport-2. Tissue hypoxia. *BMJ*, 317(7169):1370-1373.

- Lee JM, Grabb MC, Zipfel GJ, Choi DW. (2000) Brain tissue responses to ischemia. *J Clin Invest*, 106(6):723-731.
- Lemaître F, Joulia F, Chollet D. (2010) Apnea: A new training method in sport? *Med Hypotheses*, 74(3):413–415.
- Lemyre B, Chau V. (2018) Hypothermia for newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Paediatr Child Health*, 23(4):285-291.
- Levine GN. Heart transplantation (Chapter 28). In: Levine GN (szerk.), *Cardiology Secrets*, 5th ed. Elsevier Inc., Philadelphia, 2018: 253-265.
- Li C, Lu J, Zhang B. (2012) Development of a novel chronic intermittent. *Sleep Breath*, 16(1):177-179.
- Lim E, Modi KD, Kim J. (2009) In vivo Bioluminescent Imaging of Mammary Tumors Using IVIS Spectrum. *J Vis Exp*, 26: e1210.
- Lindholm P, Lundgren CE. (2009) The physiology and pathophysiology of human breath-hold diving. *Appl Physiol*, 106(1):284-292.
- Liu Y, Wang D, Wu X, Zhou J. (2019) Ischemia Injury: A New Method Accelerates Bone Healing in a Rat Tibia Fracture Model. *Biomed Res Int*, 2019:1-10.
- Lo CM, Keese CR, Giaever I. (1994) pH changes in pulsed CO<sub>2</sub> incubators cause periodic changes in cell morphology. *Exp Cell Res*, 213(2):391-397.
- Lodin-Sundström A, Schagatay E. (2010) Spleen contraction during 20 min normobaric hypoxia and 2 min apnea in humans. *Aviat Space Environ Med*, 81(6):545-549.
- Lyaker MR, Tulman DB, Dimitrova GT, Pin RH, Papadimos TJ. (2013) Arterial embolism. *Int J Crit Illn Inj Sci*, 3(1):77-87.
- Mazonakis M, Damilakis J, Maris T, Prassopoulos P, Gourtsoyiannis N. (2000) Estimation of spleen volume using MR imaging and a random marking technique. *Eur Radiol*, 10:1899-1903.
- Megremis SD, Vlachonikolis IG, Tsilimigaki AM. (2004) Spleen Length in Childhood with US: Normal Values Based on Age, Sex, and Somatometric Parameters. *Radiology*, 231(1):129-134.

- Meloni BP, Meade AJ, Kitikomolsuk D, Knuckey NW. (2011) Characterisation of neuronal cell death in acute and delayed in vitro ischemia (oxygen–glucose deprivation) models. *J Neurosci Methods*, 1(195):67-74.
- Murdoch D. (2010) Altitude sickness. *BMJ Clin Evid*, 2010(1209):1-11.
- Nakajima T, Kurano M, Iida H, Takano H, Oonuma H, Morita T, et al. (2006) Use and safety of KAATSU training: Results of a national survey. *Int J KAATSU Training Res*, 2(1):5-13.
- Novalija J, Lindholm P, Loring SH, Diaz E, Fox JA, Ferrigno M. (2007) Cardiovascular aspects of glossopharyngeal insufflation and exsufflation. *Undersea Hyperb Med*, 34(6):415-423.
- OICF. (2017) Xenogen IVIS 200. Optical Imaging Core Facility. Letöltés dátuma: 2019. november. 23. Forrás: <https://oicf.uchicago.edu/equipment.php#xenogen>
- Organdonor. (2020) Organ Donation Statistics. Letöltés dátuma: 2020. március. 29. Forrás: <https://www.organdonor.gov/statistics-stories/statistics.html>
- Orio J, Schagatay E. (2012) Lung-packing and stretching increases vital capacity in recreational freedivers. *Eur Respir J*, 40(56): P867.
- Ostrowski A, Strzała M, Stanula A, Juskiewicz M, Pilch W, Maszczyk A. (2012) The Role of Training in the Development of Adaptive Mechanisms in Freedivers. *J Hum Kinet*, 32:197-210.
- Overgaard K, Friis S, Pedersen RB, Lykkeboe G. (2006) Influence of lung volume, glossopharyngeal inhalation and PET O<sub>2</sub> and PET CO<sub>2</sub> on apnea performance in trained breath-hold divers. *Eur J Appl Physiol*, 97(2):158-164.
- Oxford Optronix. (2019) HypoxyLab™. Letöltés dátuma: 2019. november. 22. Forrás: <https://www.oxford-optronix.com/en/Hypoxia-Workstation>
- Patterson SD, Hughes L, Warmington S, Burr J, Scott BR, Owens J, et al. (2019) Blood Flow Restriction Exercise: Considerations of Methodology, Application, and Safety. *Front Physiol*, 10(533):1-15.

Pavlik G. A légzés élettana. In: Gubics Á (szerk.), Élettan – Sportélettan. Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 2019: 258-262.

Pecon. (2019) Pecon Products. Letöltés dátuma: 2019. november. 22. Forrás: <https://www.pecon.biz/>

Pflugfelder PW, Singh NR, McKenzie FN, Menkis AH, Novick RJ, Kostuk WJ. (1991) Extending cardiac allograft ischemic time and donor age: effect on survival and long-term cardiac function. *J Heart Lung Transplant*, 10(3):394-400.

Phillips SA, Olson EB, Lombard JH, Morgan BJ. (2006) Chronic intermittent hypoxia alters NE reactivity and mechanics of skeletal. *J Appl Physiol*, 100(4):1117–1123.

Place TL, Domann FE, Casee AJ. (2017) Limitations of oxygen delivery to cells in culture: An underappreciated. *Free Radic Biol Med*, 113:311-322.

Polšek D, Bago M, Živaljić M, Rosenzweig I, Lacza Zs, Gajović S. (2017) A novel adjustable automated system for inducing chronic intermittent hypoxia in mice. *PLoS ONE* 12(3): e0174896.

Porcari JP, Probst L, Forrester K, Doberstein S, Foster C, Cress ML, Schmidt K. (2016) Effect of Wearing the Elevation Training Mask on Aerobic Capacity, Lung Function, and Hematological Variables. *J Sports Sci Med*, 15(2):379-386.

Porcari JP, Probst L, Forrester K, Doberstein S, Foster C, Cress ML, Schmidt K. (2018) Effect of wearing the Elevation Training Mask 2.0 on pulmonary and respiratory muscles function. *J Sports Sci Med*, 52(62).

Prakash R, Izraely S, Thareja NS, Lee RH, Rappaport M, Kawaguchi R, et al. (2019) Regeneration Enhances Metastasis: A Novel Role for Neurovascular Signaling in Promoting Melanoma Brain Metastasis. *Front Neurosci*, 13(297):1-31.

Prommer N, Ehrmann U, Schmidt W, Steinacker JM, Radermacher P, Muth CM. (2007) Total haemoglobin mass and spleen contraction: a study on competitive apnea divers, non-diving athletes and untrained control subjects. *Eur J Appl Physiol*, 101(6):753-759.



- Reingewirtz Y, Szmukler-Moncler S, Senger B. (1997) Influence of different parameters on bone heating and drilling time in implantology. *Clin Oral Implants Res*, 8(3):189-197.
- Richardson MX, Engan HK, Lodin-Sundström A, Schagatay E. (2012) Effect of hypercapnia on spleen-related haemoglobin increase during apnea. *Diving Hyperb Med*, 42(1):4-9.
- Roehm NW, Rodgers GH, Hatfield SM, Glasebrook AL. (1991) An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *J Immunol Methods*, 142(2):257-265.
- Rosenzweig I, Williams SC, Morrell MJ. (2014) The impact of sleep and hypoxia on the brain: potential mechanisms for the effects of obstructive sleep apnea. *Curr Opin Pulm Med*, 20(6):565-571.
- Ryou MG, Mallet RT. (2018) An In Vitro Oxygen–Glucose Deprivation Model for Studying. *Methods Mol Biol*, 1717:229-235.
- Sammarco MC, Simkin J, Cammack AJ, Fassler D, Gossmann A, Marrero L, et al. (2015) Hyperbaric Oxygen Promotes Proximal Bone Regeneration and Organized Collagen Composition during Digit Regeneration. *PLoS ONE*, 10(10):1-16.
- Sanada SK. (2011) Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 301(5):H1723-H1741.
- Saroj PM, Sam K, Nicholas JS. (2016) Lab Assembled Microcontroller-Based Sensor Module for Continuous Oxygen Measurement in Portable Hypoxia Chambers. *PLoS ONE*, 11(2):1-14.
- Schagatay E, Andersson JP, Hallen M, Palsson B. (2001) Selected contribution: role of spleen emptying in prolonging apneas in humans. *J Appl Physiol*, 90(1606):1623–1629.
- Schagatay E, Haughey H, Reimers J. (2005) Speed of spleen volume changes evoked by serial apneas. *Eur J Appl Physiol*, 93(4):447-452.

- Schagatay E, Haughey H, Reimers J. (2005) Speed of spleen volume changes evoked by serial apneas. *Eur J Appl Physiol*, 93(4):447-452.
- Schagatay E, Richardson MX, Lodin-Sundström A. (2012) Size Matters: Spleen and Lung Volumes Predict Performance in Human Apneic Divers. *Front Physiol*, 3(173):1-8.
- Schandl K, Horváthy DB, Doros A, Majzik E, Schwarz C, Lacza Zs, et al. (2016) Bone-Albumin filling decreases donor site morbidity and enhances bone formation after anterior cruciate ligament reconstruction with bone-patellar tendon-bone autografts. *Int Orthop*, 40(10):2097-2104.
- Schipke JD, Kelm MS, Muth T, Sievers B, Steiner S. (2015) “Lung packing” in breath hold-diving: An impressive case of pulmo–cardiac interaction. *Respir Med Case Rep*, 16:120–121.
- Schulte PM. (2015) The effects of temperature on aerobic metabolism: towards a mechanistic understanding of the responses of ectotherms to a changing environment. *J Exp Biol*, 218(12):1856-1866.
- Secombe LM, Rogers PG, Mai N, Wong CK, Kritharides L, Jenkins CR. (2006) Features of glossopharyngeal breathing in breath-hold divers. *J Appl Physiol* (1985), 101(3):799-801.
- Seetha S. (2009) Neonatal Encephalopathy: Treatment with Hypothermia. *J Neurotrauma*, 26(3):437–443.
- Shimizu K, Lacza Zs, Rajapakse N, Horiguchi T, Snipes J, Busija DW. (2002) MitoK(ATP) opener, diazoxide, reduces neuronal damage after middle cerebral artery occlusion in the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 283(3):H1005-H1011.
- Siemionow M, Arslan E. (2004) Ischemia/reperfusion injury: a review in relation to free tissue transfers. *Microsurgery*, 24(6):468-475.
- Silva AQ, & Schreihöfer AM. (2011) Altered sympathetic reflexes and vascular reactivity in rats after exposure to chronic intermittent hypoxia. *J Physiol*, 589(6):1463-1476.

- Simpkins C, Montgomery R, Hawxby A, Locke J, Gentry S, Warren D, Segev D. (2007) Cold ischemia time and allograft outcomes in live donor renal transplantation: is live donor organ transport feasible? *Am J Transplant*, 7(1):99-107.
- Sinex JA, Chapman RF. (2015) Hypoxic training methods for improving endurance exercise performance. *JSHS*, 4(4):325–332.
- Sontheimer H. Cerebrovascular Infarct: Stroke (Chapter 1). In: Tucker M, Anderson K (szerk.), *Diseases of the Nervous System* (1st ed.). Academic Press: Elsevier Inc., 2015: 14-15.
- Stefanescu H, Grigorescu M, Lupsor M, Procopet B, Maniu A, Badea R. (2011) Spleen stiffness measurement using fibroscan for the noninvasive assessment of esophageal varices in liver cirrhosis patients. *J Gastroenterol Hepatol*, 26(1):164–170.
- Tagaito Y, Polotsky VY, Campen MJ, Wilson JA, Balbir A, Smith PL, et al. (2001) A model of sleep-disordered breathing in the C57BL/6J mouse. *J Appl Physiol*, 91(6):2758–2766.
- Teiger E, Castaigne A. (1999) Description and mechanisms of ischemia in atherosclerosis. *Rev Prat*, 49(19):2110-2116.
- ThermoFisher. (2019) Tri-gas CO<sub>2</sub> incubators. ThermoFisher Scientific. Letöltés dátuma: 2019. november. 22. Forrás: <https://www.thermofisher.com/hu/en/home/life-science/lab-equipment/co2-incubators/direct-heat-co2-incubators/tri-gas-co2-incubators.html>
- Thuillier R, Hauet T. (2018) Impact of Hypothermia and Oxygen Deprivation on the Cytoskeleton in Organ Preservation Models. *Biomed Res Int*, 2018(8926724):1-10.
- Tiede LM, Cook EA, Morse B, Fox HS. (2011) Oxygen matters: tissue culture oxygen levels affect mitochondrial function and structure as well as responses to HIV viroproteins. *Cell Death Dis*, 2: e246.
- Totsuka E, Fung JJ, Lee MC, Ishii T, Umehara M, Makino Y. (2002) Influence of cold ischemia time and graft transport distance on postoperative outcome in human liver transplantation. *Surg Today*, 32(9):792-799.

Törpel A, Fabian H, Dennis H, Notger GM, Lutz S. (2018) Strengthening the Brain-Is Resistance Training with Blood Flow Restriction an Effective Strategy for Cognitive Improvement? *J Clin Med*, 7(10):337.

Training mask. (2020) How training mask works. Letöltés dátuma: 2020. február. 03. Forrás: <https://www.trainingmask.com/how-training-mask-works/#videos>

Tutorov OP. (2012) Heart rate changes (HR) and oxygen saturation in blood (SAO<sub>2</sub>) dependency in relation to the static apnea duration (STA). *Exercise and Quality of Life*, 4(1):612-622.

UCSD Department of Bioengineering. (2012) Oxygen & Carbon Dioxide Controlled Incubator for Cell Culture Studies. Letöltés dátuma: 2019. november. 24. Forrás: [http://beweb.ucsd.edu/courses/seniordesign/projects/2011/project\\_9/designsolution.html](http://beweb.ucsd.edu/courses/seniordesign/projects/2011/project_9/designsolution.html)

Vanwey WR, Weatherholt AM, Mikesky AE. (2017) Blood Flow Restriction Training: Implementation into Clinical Practice. *Int J Exerc Sci*, 10(5):649–654.

Volkmer E, Drosse I, Otto S, Stangelmayer A, Stengele M, Kallukalam BC, et al. (2008) Hypoxia in Static and Dynamic 3D Culture Systems for Tissue Engineering of Bone. *Tissue Eng Part A*, 14(8):1331-1340.

Wagener J, Plennevaux C. (2014) Eppendorf 96-Well Cell Culture Plate – A simple method of minimizing the edge effect in cell-based assays. *APPLICATION NOTE*, 326. Letöltés dátuma: 2019. november. 24. Forrás: [https://www.eppendorf.com/uploads/media/Application-Note\\_326\\_Cell-Culture-Plate-96-Well\\_A-simple-method-of-m\\_eng\\_01.pdf](https://www.eppendorf.com/uploads/media/Application-Note_326_Cell-Culture-Plate-96-Well_A-simple-method-of-m_eng_01.pdf)

Walczyńska A, Sobczyk L. (2017) The underestimated role of temperature–oxygen relationship in large- scale studies on size- to- temperature response. *Ecol Evol*, 7(18):7434–7441.

Wang G, Hou R, Li D. (2011) Effects of different oxygen-glucose deprivation durations and media on the cell viability of N9 microglia. *Journal of Xinxiang Medical College*. Letöltés dátuma: 2019. november. 29. Forrás: [https://en.cnki.com.cn/Article\\_en/CJFDTotal-XXYX201106002.htm](https://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTotal-XXYX201106002.htm)

Wang Z, Tao J, Zhang Q, Wei M. (2015) Effect of oxygen and glucose deprivation on VEGF and its receptors in microvascular endothelial cells co-cultured with mast cells. *Cell Biol Int*, 39(9):1016-1025.

Watanabe I, Okada S. (1967) Effects of temperature on growth rate of cultured mammalian cells (L5178Y). *J Cell Biol*, 32(2):309–323.

Watson CJ, Dark JH. (2012) Organ transplantation: historical perspective and current practice. *BJA*, 108(1): i29–i42.

Webster KA, Discher DJ, Bishopric NH. (1995) Cardioprotection in an In Vitro Model of Hypoxic Preconditioning. *J Mol Cell Cardiol*, 27(1):453-458.

Wenger RH, Kurtcuoglu V, Scholz CC, Marti HH, Hoogewijs D. (2015) Frequently asked questions in hypoxia research. *Hypoxia (Auckl)*, 3:35–43.

Whelan S. (2014) New Guinness World Record For Serbian Freediver Branko Petrovic. Deeper Blue. Letöltés dátuma: 2020. február 04. Forrás:  
<https://www.deeperblue.com/new-guinness-world-record-serbian-freediver-branko-petrovic/>

Wiedemann D, Schachner T, Bonaros N, Dorn M, Andreas M, Kocher A, Kuznetsov AV. (2013) Impact of Cold Ischemia on Mitochondrial Function in Porcine Hearts and Blood Vessels. *Int J Mol Sci*, 14(11):22042-22051.

Wikipédia (a). (2020) Hőelektromosság. Letöltés dátuma: 2020. november. 22. Forrás:  
<https://hu.wikipedia.org/wiki/H%C5%91elektromoss%C3%A1g>

Wikipédia (b). (2020) Antimicrobial properties of copper. Letöltés dátuma: 2020. november. 24. Forrás:  
[https://en.wikipedia.org/wiki/Antimicrobial\\_properties\\_of\\_copper](https://en.wikipedia.org/wiki/Antimicrobial_properties_of_copper)

Wikipédia (c). (2021) TLR2. Letöltés dátuma: 2021. január. 20. Forrás:  
<https://en.wikipedia.org/wiki/TLR2>

Wikipédia (d). (2021) Jacques Mayol. Letöltés dátuma: 2021. január. 29. Forrás:  
[https://en.wikipedia.org/wiki/Jacques\\_Mayol](https://en.wikipedia.org/wiki/Jacques_Mayol)

Wikipedia (e). (2021) Freediving. Letöltés dátuma: 2021. január. 04. Forrás:  
<https://en.wikipedia.org/wiki/Freediving>

Wilson DF, Harrison DK, Vinogradov SA. (2012) Oxygen, pH, and mitochondrial oxidative phosphorylation. *J Appl Physiol*, 113(12):1838-1845.

Winet H, Hsieh A, Bao J. (1998) Approaches to study of ischemia in bone. *J Biomed Mater Res*, 43(4):410-421.

Wu D, Yotnda P. (2011) Induction and Testing of Hypoxia in Cell Culture. *J Vis Exp*, 54(2899):1-4.

Xu W, Chi L, Row BW, Xu R, Ke Y, Xu B, et al. (2004) Increased oxidative stress is associated with chronic intermittent hypoxia-mediated brain cortical neuronal cell apoptosis in a mouse model of sleep apnea. *Neuroscience*, 126(2):313-323.

Yang GZ, Xue FS, Liu YY, Li HX, Liu Q, Liao X. (2018) Feasibility Analysis of Oxygen Glucose Deprivation Nutrition Resumption on H9c2 Cells In vitro Models of Myocardial Ischemia Reperfusion Injury. *Chin Med J (Engl)*, 131(19):2277-2286.

YouTube. (2016) New Cell Culture Plate eliminates Edge Effect During Extended Incubation. Letöltés dátuma: 2019. november. 24. Forrás:  
[https://www.youtube.com/watch?v=\\_j7S-W8SopU](https://www.youtube.com/watch?v=_j7S-W8SopU)

Zheng J, Feng C, Run S, Xingjiu H, Wei L, Jinhuai L. (2002) Study on the Characteristics of Ag Doped CuO-BaTiO<sub>3</sub> CO<sub>2</sub> Sensors. *Sensors*, 2(9):366-373.

Zhou H, Purdie J, Wang T, Ouyang A. (2009) pH Measurement and a Rational and Practical pH Control Strategy for High. *Biotechnol Prog*, 26(3):872-880.

Zinn KR, Chaudhuri TR, Szafran AA, O'Quinn D, Weaver C, Frank SJ, et al. (2008) Noninvasive Bioluminescence Imaging in Small Animals. *ILAR J*, 49(1):103-115.

Zoran I. (2009) Hypoxia or In Situ Normoxia: The stem cell paradigm. *J Cell Physiol*, 219(2):271-275.

Zulueta JJ, Sawhney R, Yu FS, Cote CC, Hassoun PM. (1997) Intracellular generation of reactive oxygen species in endothelial cells exposed to anoxia-reoxygenation. *Am J Physiol*, 272(5 Pt 1): L897-L902.

## **13 Saját publikációk jegyzéke**

### **13.1 A dolgozathoz kapcsolódó saját publikációk:**

Bago M, Horvathy D, Simon M, Marschall B, Pinto A, Kuten O, Polšek D, Hornyak I, Nehrer S, Lacza Zs. (2018) Temperature controlled dual hypoxic chamber design for in vitro ischemia experiments. *Biocybern Biomed Eng*, 38(3):498-503.

Polšek D, Bago M, Živaljić M, Rosenzweig I, Lacza Zs, Gajović S. (2017) A novel adjustable automated system for inducing chronic intermittent hypoxia in mice. *PLoS ONE* 12(3): e0174896.

### **13.2 A dolgozattól független saját publikációk:**

Horvathy D, Szanto P, Marschall B, Bago M, Csery M, Hornyak I, Doros A, Lacza Zs. (2020) Ketamine decreases cell viability of bone explants and impairs bone healing in rats. *J Orthop Surg Res*, 15(46):1-5.

Simon M, Major B, Vacz G, Kuten O, Hornyak I, Hinsenkamp A, Kardos D, Bago M, Cseh D, Sarkozi A, Horvathy D, Nehrer S, Lacza Zs. (2018) The Effects of Hyperacute Serum on the Elements of the Human Subchondral Bone Marrow Niche. *Stem Cells Int*, 2018(4854619):1-12.

Lacza Zs, Marschall B, Bagó M, Gyevnár Zs, Béres Gy, Szabó B, Kovács P. (2018) A dinamikus Q-szög futókban és balett táncosokban: térsérülésre hajlamosító tényező, amely edzéssel elkerülhető? *Sportorvosi Szemle*, 59(2):65.



## 14 Köszönetnyilvánítás

A kutatás előrehaladtával, ahogyan egyre jobban elmélyültünk az egyes témákban arányosan nőtt a résztvevők és segítők száma is. Már a doktori képzés elejétől fogva nemzetközi együttműködés is segítette a projektek megvalósulását. Többször is volt lehetőségem nemzetközi csapatban dolgozni, ahol rengeteg tudást és tapasztalatot sikerült gyűjteni az évek alatt. Ennek megfelelően a kutatási időszak sokszínűen és izgalmasan zajlott, amely során nagyon sok támogatást és segítséget kaptam. Ezúton szeretném megköszönni mindazok segítségét, akik valamilyen formában hozzájárultak ahhoz, hogy ez a dolgozat megszülethessen:

Dr. Lacza Zsombornak, hogy vállalta a témavezetést, biztosította a kutatáshoz szükséges feltételeket, valamint a folyamatos segítséget és biztatást a tovább haladáshoz.

Dr. Horváthy Dénesnek, aki a teljes munka során tanácsaival nagyon sokat segített a kutatások megtervezésében, értelmezésében és a következő lépések kidolgozásában. Továbbá külön köszönetet érdemel a képalkotó vizsgálatok megvalósításában és az adatok kiértékelésében nyújtott támogatásáért.

Németh Gyulának, Grits Pálnak és Szakáts Lászlónak a technikai és fejlesztési feladatokban nyújtott segítségüket. Nélkülük egyik készülék sem valósulhatott volna meg.

Dr. Szócs Annának, aki az MR mérések megszervezésében és lebonyolításában vett részt.

Dr. Srecko Gajovicnak, aki lehetővé tette, hogy nemzetközi projektben vehessek részt, amelynek során megvalósult eszköz sikeres szabadalmi elbírálásban részesült.

Dr. Dora Polseknek, hogy felajánlotta a kooperáció lehetőségét, amely során folyamatos támogatást és segítséget biztosított az akadályok leküzdéséhez.

Dr. Marschall Bencének, aki az egyetemi kötelezettségein felül vállalta, hogy kísérleti alanyként és segítőként is jelen lesz a méréseken. Segítségével gyorsan és szervezeten sikerült az összes vizsgálatot lebonyolítani.

Dr. Kovács Péternek a General Personal Training Kft. vezetőjének és munkatársainak a kutatáshoz nyújtott támogatást. Segítségükkel elérhetővé váltak az egyes mérésekhez szükséges eszközök.

Dr. Jakab Zsuzsannának és Dr. Korda Dávidnak, hogy lehetővé tették az elasztográfiás vizsgálatokat.

Németh Mártonnak a tervezési feladatok fizikai számításához adott tanácsaiért.

Göbl Kornéliának az MR felvételek kiértékelésében nyújtott segítségért.

Fridvalszki Marcellnek és Langmár Gergelynek a humán vizsgálatok szervezésében és résztvevők keresésében nyújtott segítségükért.

Freediving Hungary és a nOxygen Apnea Club tagjainak név szerint: Engyel Ákos, Söjtöri Nóra, Takács Judit, Dr. Bacskó László, Bendzsák András, Borsos Miklós, Reményi Attila, Sopronyi András, Nemes Fruzsina, Sass Kálmán, Hliva Patrick, akik hősiesen teljesítették a kutatás összes megpróbáltatását.

Marzia Baldachininek a kitartó segítségét a dolgozat javításában.

A Szövetépítő Laboratórium és a Klinikai Kísérleti Kutató Intézet minden tagjának a beszélgetéseket, észrevételeket és tanácsokat.

A Neuroradiológiai tanszék munkatársainak, hogy biztosították az MR felvételek lehetőségét.

A Horvát Agykutató Intézet (CIBR) munkatársainak a támogatását.

A Sporttudományok Doktori Iskolának és munkatársainak a képzés alatt nyújtott segítségét.

Családtagjaimnak és barátaimnak a folyamatos támogatást és biztatást.

Valamint, köszönöm az összes résztvevőnek a jelentkezést, illetve, hogy értékes adatokkal gazdagították a munkát!

# 15 Függlék

---

(12) **UK Patent**                      (19) **GB**                      (11) **2547022**                      (13) **B**  
(45) Date of B Publication                      **02.10.2019**

---

(54) Title of the Invention: **An automated system for inducing hypoxia**

(51) INT CL: **A01K 1/03** (2006.01)                      **A61D 7/00** (2006.01)

---

(21) Application No:                      **1602071.1**  
(22) Date of Filing:                      **05.02.2016**  
(43) Date of A Publication                      **09.08.2017**

(72) Inventor(s):  
**Dora Polsek**  
**Marcell Bago**  
(73) Proprietor(s):  
**University of Zagreb**  
**(Incorporated in Croatia)**  
**School of Medicine, Salata 3, Zagreb 10000, Croatia**

(56) Documents Cited:  
**WO 2009/076335 A1**                      **CN 204016480 U**  
**CN 104173119 A**                      **CN 101491477 A**  
**US 20090223460 A1**  
**International Journal of Clinical and Experimental**  
**Physiology [online], Vol 1, Issue 4, Oct-Dec 2014, Dr.**  
**Hisashi Nagai et al. "A novel system including an N2**  
**gas generator and an air compressor for inducing**  
**intermittent or chronic hypoxia", pages 307 - 310**

(74) Agent and/or Address for Service:  
**Callidea Ltd**  
**Ogrizoviceva 9, Zagreb 10000, Croatia**

(58) Field of Search:  
As for published application 2547022 A viz:  
INT CL **A01K, A61D, A61G**  
Other: **WPI, EPODOC**  
updated as appropriate

Additional Fields  
Other: **None**

**GB 2547022 B**