

Szegedi Tudományegyetem
Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar
Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

**Klinikailag releváns sertésmodell kifejlesztése a kísérletes és humán szepszis közötti
eltérések áthidalására**

Ph.D. Tézis

Dr. Zsikai Bettina Ágnes

Témavezető: Dr. Kaszaki József

Szeged

2024

1. BEVEZETÉS

A szepszis jelenleg is az egyik vezető halálok világszerte az intenzív osztályokon. Az Egészségügyi Világközgyűlés (WHA) és az Egészségügyi Világszervezet (WHO) a szepszist globális egészségügyi prioritássá nyilvánította, és állást foglalt a megelőzési-, a diagnosztikai- és a kezelési lehetőségek fejlesztésének szükségessége mellett (Reinhart és mtsai., 2017). Az elmúlt három évtizedben a szepszissel kapcsolatos ismereteink folyamatosan bővültek, a szepszis definíciója pedig folyamatosan fejlődött, a klinikai eseteket tárgyaló és a komplex patológiát felölelő kísérletes tanulmányok alapján.

1.1. A szepszis definíciójának változása

A szepszis modernkori definícióját először az „American College of Chest Physicians” és a „Society of Critical Care Medicine” fogalmazta meg 1991-ben egy konszenzus konferencián (Sepsis-1), ahol a súlyos szepszis, a septicus sokk és a többszervi elégtelenség klasszifikációjára is sor került. A szepszist ekkor infekció és az azt kísérő szisztémás gyulladással válaszreakció (SIRS) együtteseként definiálták (Bone és mtsai., 1992). Meghatározását 2001-ben aktualizálták, a szepszist a fertőzésre adott szisztémás gyulladással válaszként határozták meg (Levy és mtsai., 2003). A „Surviving Sepsis Campaign” (SSC) a szepszis és a septicus sokk okozta halálozás és megbetegedés csökkentése érdekében jött létre 2002-ben, és számos ajánlást fogalmazott meg a korai hatékony ellátással kapcsolatban (Rello és mtsai., 2017). A III. International Consensus Definition for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3) konferencia 2016-ban újra definiálta a gyulladást, a szepszist és a septicus sokk fogalmát. Az új meghatározás szerint a szepszis súlyos, potenciálisan életveszélyes állapot, amelyet az infekcióra adott diszregulált válaszreakció következtében kialakuló szervi diszfunkció jellemez. A septicus sokk, mint a szepszis egyik alkategóriája, a szepszissnél súlyosabb keringési és metabolikus zavart, sejtszintű diszfunkciót foglal magában, és adekvát folyadékpótlás ellenére kialakuló kontrollálhatatlan hipotenzió jellemzi (Singer és mtsai., 2016). A humán szepszis klinikai tüneteinek, a szervi diszfunkcióknak az értékelésére az elmúlt évtizedekben a „Sequential (sepsis-related) Organ Failure Assessment” (SOFA) pontrendszert fejlesztették ki. A SOFA hat szervrendszer értékelésére alkalmas, a légzés, a keringés, a máj, a vese, a vérárvadás és központi idegrendszer funkciókárosodását méri, ahol a növekvő pontszám súlyosabb szervi diszfunkciót tükrözi (Vincent és mtsai., 1996). A Quick SOFA Score (qSOFA) fogalmát a Sepsis-3 konferencia vezette be (Angus és mtsai., 2016), amely egyszerű, ágy mellett megállapítható kritériumokat állít fel a fertőzés gyanús felnőtt betegek azonosítására (Singer és mtsai., 2016).

1.2. A szepszis és a szeptikus sokk patomechanizmusa

A szepszis patogenezise összetett, a fertőző ágensek és a gazdaszervezet közötti kölcsönhatás számos aspektusát érinti. A jelenlegi definíció szerint, a szepszis a szervezet fertőzésre adott kontrollálatlan válaszreakciója, melynek kezdeti szakaszát a gyulladással mediátorok fokozott produkciója, a „citokinvihar” kialakulása jellemzi. Ebben kiemelt szerepe lehet a tumor nekrozis faktor alfa (TNF- α), az interleukin-6 (IL-6) és az interleukin-1 (IL-1) citokineknek, amelyek emelkedő szintje lázas állapothoz, további gyulladással válaszreakciókhoz, valamint a szövetek és sejtek fokozódó oxigénfogyasztásához, és így az oxigén extrakció (ExO₂) növekedéséhez vezet (Chousterman és mtsai., 2017; Piechota és mtsai., 2007). A „citokinvihar” beindítja a nitrogén-monoxid (NO) termelődését is, ami szisztémás vazodilatációt és a teljes perifériás rezisztencia (TPR) konzekvens csökkenését eredményezi, amelyre kompenzációs mechanizmusokkal reagál a szervezet. Az emelkedő szívfrekvencia, a perctérfogó (CO) növekedése és a fokozott oxigénszállítás (DO₂) segítenek ellensúlyozni a csökkent TPR-t és a megnövekedett oxigénfogyasztást (VO₂) (Armstrong és mtsai., 2017). A vazodilatátorvasokonstriktor egyensúly elvesztése, a megfelelő szisztémás töltőnyomás csökkenése és a hiperkoaguláció elégtelen mikroperfúziót eredményez, ami szöveti hipoxiához vezet (Ince és mtsai., 2016). Az elégtelen mikrokeringés a szöveti és szubcelluláris oxigén- és szubsztrát ellátás csökkenését eredményezi, ami a mitokondriális oxigénfogyasztást is érinti. A kialakuló mitokondriális diszfunkció súlyos következménye a reaktív oxigén gyökök fokozott produkciója és az ebből eredő oxidatív stressz által okozott közvetlen sejtkárosodás, amely a szeptikus szervkárosodás kialakulásáért felelős lehet (Zhang és mtsai., 2018). A folyamat progressziója a szepszis hipodinámiai fázisához vezet, amelyet a DO₂ és a VO₂ közötti egyensúly felborulása, az ExO₂ csökkenése, a kompenzációs mechanizmusok kimerülése, immunoparalízis, a vérnyomás progresszív csökkenése jelez és súlyos többszervi elégtelenséghez (MOF) vezethet (Armstrong és mtsai., 2017; Singer és mtsai., 2016).

1.3. A szepszis biomarkerei

A folyamat kezdetén a Toll-like receptorok patogén-asszociált molekuláris mintákhoz való kötődése intracelluláris jelátviteli kaskádokat indít el, amelyek a korai válaszreakciókat szabályozó proinflammatorikus biomarkerek, például a TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 és a „high mobility group box 1” (HMGB1) szintézisét és felszabadulását eredményezik (Rivers és mtsai., 2013). Ezzel egyidejűleg az antiinflammatorikus biomarkerek - mint az interleukin 10 (IL-10) - termelődése is megkezdődik, aminek fontos szerepe van a szövetkárosodás megelőzésében, a gyulladás csökkentésében és a gyógyulás elősegítésében. A pro- és antiinflammatorikus biomarkerek egyensúlyának felborulása a folyamat súlyosbodását jelzi (Rittirsch és mtsai.,

2008; Taeb és mtsai., 2017). A „big endothelint” (bET) és a HMGB1-et a szöveti hipoxia és nekrozis biomarkereiként tartják számon (Chaudhry és mtsai., 2013). A plazma nitrit/nitrát (NO_x), a nitrogén-monoxid (NO) stabil végterméke, plazma szintjének emelkedése a fokozott nitrogén-monoxid szintézisnek és a reaktív nitrogén-oxid-gyökök termelődésének markere (Radi, 2018). Habár a laktát nem szepszis-specifikus biomarker, a szérumban emelkedése súlyos szepszist jelezhet, a szervi diszfunkció progresszióját jelenti, és magasabb mortalitási kockázattal jár (Rello és mtsai., 2017).

1.4. Bizonyítékokon alapuló ajánlások a preklinikai szepszismodellekben

A patomechanizmus részletes megértésének és a mortalitás csökkentésének előfeltétele a megfelelő kísérleti modellezés. A komplex patológiát megfelelően reprodukáló és klinikai transzlációra alkalmas állatmodellek elengedhetetlenek a szepszis és szeptikus sokk új terápiás célpontjainak azonosításához. A közelmúltban kidolgozott „Minimum Quality Threshold in Preclinical Sepsis Studies” (MQTiPSS) ajánlás lehetővé teszi a kísérletes szepszismodellek standardizálását, beleértve a humán szepszisre jellemző szervi elégtelenség/működési zavar jeleinek értékelését (Osuchowski és mtsai., 2018), a humán SOFA score-hoz hasonló pontrendszer alkalmazásával (Singer és mtsai., 2016; Vincent és mtsai., 1996). Bár az MQTiPSS elemei általános célokra, ezen belül inkább rágcsálókra (patkányok és egerek), mint nagyobb laboratóriumi állatokra (sertés vagy juh) vonatkoznak. Azonban a szepszis modellezésében a sertések számos előnnyel rendelkeznek a rágcsálókkal szemben, mivel anatómiai, genetikai és élettani szempontból közelebb állnak az emberhez (Swindle, 2012; Meurens, 2012). Emellett a sertések esetében a klinikailag releváns anesztézia, invazív hemodinamikai monitorizálás és intenzív ellátás is alkalmazható (Guillon, 2019). Továbbá lehetővé teszik a standardizált indukció kivitelezését, valamint a kórkép progressziójának és súlyosságának egyéni értékelését, de az altatás-érzéstelenítés szükségessége és a limitált megfigyelési idő továbbra is korlátozó tényezők (Soerensen, 2012; Park, 2019; Waterhouse, 2018).

2. CÉLKITŰZÉSEK

A fenti megfontolások figyelembevételével célul tűztük ki a szepszis kutatására alkalmazható sertésmodellek korszerűsítését a változó szepszis definícióknak megfelelően, végső célként pedig a heterogenitás, valamint a kísérletes- és humán vizsgálatok eredményei közötti szakadék csökkentését. Az 1. vizsgálatban a Sepsis-1 definíciókat követtük, és ennek megfelelően terveztük meg kísérleti elrendezésünket (Érces és mtsai., 2011; Zsikai és mtsai., 2012). A későbbi 2. vizsgálatban (Rutai és mtsai., 2022) a Sepsis-3 kritériumoknak megfelelően módosítottuk modellünket. Az **1. vizsgálatban céljaink** a következők voltak:

- I. Egy olyan standardizált **kísérleti protokoll** létrehozása, amely progressziós szakasza rendelkezik a már publikált tanulmányok előnyeivel, és kompatibilis a humán szepszis klinikai lefolyásával. Ennek megfelelően, a szepszis indukciója polimikrobiális élő kórokozókkal történik, míg a klinikai lefolyásnak megfeleltethető progressziós fázist éber állapotban, beavatkozás nélkül hagyjuk kibontakozni.
- II. Altatásban végzett instrumentálást követő **monitorizálási fázis** kialakítása, amelynek célja, a Sepsis-1 kritériumok szerinti diagnózis felállítása, és a kórfolyamat jellemzése a makro- és mikrokeringési válaszok, valamint a szöveti hipoxia biomarkereinek mérésével.

A **2. vizsgálatban** a következő **célok** elérését tűztük ki:

- III. A humán pontrendszeren alapuló fajspecifikus **sertés SOFA pontozási rendszer** (pSOFA) kidolgozása és alkalmazása, a sertés fiziológiáját figyelembe vevő módosításokkal, amely valós információt nyújt a szervkárosodás mértékéről.
- IV. Bemutatni az intraperitoneálisan injektált székletinokulum és a hemokultúra **mikrobiológiai elemzésének** fontosságát, a mikrobiológiai inzultus mértéke és a szepszis/szervkárosodás súlyossága közötti összefüggés vizsgálatával.
- V. Annak kimutatása, hogy a dedikált **gyulladásos markerek** korai emelkedése és dinamikája hogyan függ össze a szepszis súlyosságával és kimenetelével.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. A kísérleti protokoll

Vizsgálatainkat hím és nőtény vietnami törpesertéseken végeztük. Az állatokat véletlenszerűen álműtött (1. tanulmány: n=6; 2. tanulmány: n=9) és szeptikus csoportokba osztottuk (1. tanulmány: n=9; 2. tanulmány: n=27). Mindkét vizsgálat kísérleti elrendezésében négy szakaszt különítettünk el.

3.1.1. Kontroll mérések és vérmintavétel rövid anesztézia mellett: 1. szakasz

Az anesztézia bevezetése után háromlumenű centrális vénás katétert alkalmazva kanüláltuk a juguláris vénát az aszepszis szabályai szerint, folyadékpótlás és a kezdeti vérmintavétel céljából (t=0). Endotracheális intubációt követően állatainkat mechanikusan lélegeztettük. Az alapvető lélegeztetési beállításokat (légzésszám; légzési térfogat; pozitív végkilégzésvégi nyomás; belégzési oxigén frakció (FiO₂)) pulzoximetriával ellenőriztük, az állatok nyelvére illesztett szenzor segítségével. A légzésszámot úgy állítottuk be, hogy a kilégzés végi CO₂ nyomást (kapnometriával ellenőrizve) és az artériás parciális szén-dioxid nyomást (PaCO₂) a 35-45 Hgmm közötti tartományban tartsuk.

3.1.2. A szepszis indukciója: 2. szakasz

Egy tompa végű 12G vastagságú Veress tű segítségével $t=0$ időpontban az intraperitoneális térbe polimikrobiális autológ székletinokulumot injektáltunk. A kontroll állatokat steril sóoldattal kezeltük hasonló módon. Az indukciót követően állatainkat extubáltuk és ébresztettük az anesztézia és a gépi lélegeztetés fokozatos redukciónak.

3.1.3. A szepszis progressziója: 3. szakasz

A spontán lélegző állatokat vizsgálóketrecbe helyeztük, majd 6 órával a szepszis indukcióját követően vérmintavétel történt. A folyadékgyensúly fenntartása érdekében a 6. és 12. órában állataink 15 ml/kg/h intravénás krisztalloid (Ringerfundin[®]) infúzióban részesültek, míg fájdalomcsillapítás céljából iv. nalbufint (0,2 mg/kg) alkalmaztunk.

3.1.4. Invazív hemodinamikai monitorizálás, mintavételek és súlyossági besorolás: 4. szakasz

Az invazív hemodinamikai monitorizálást a szepszis indukciója után 15 órával kezdtük meg. Állatainkat ismételten elaltattuk, majd a re-intubációt követően gépi lélegeztetést indítottunk. A húgyhólyagba sebészi úton katétert vezetünk az óradiurézis mérésére. A jobb oldali femorális artériába termisztoros transzpulmonális termodilúciós katétert helyeztünk invazív hemodinamikai monitorizálás (perctérfogat, perctérfogat index, extravaszkuláris tüdővíz index (ELWI), szívfrekvencia, artériás középnyomás (MAP)) céljából és a maghőmérséklet mérésére. Az 1. vizsgálati protokollban a bal oldali femorális vénán keresztül pulmonális artériás katéter is bevezetésre került. Az intramukozális pCO_2 -szintek kapnometriával történő monitorozására ballonmentes tonometriás szondát helyeztünk a vékonybél lumenébe (Boda és mtsai, 2006). A $PaCO_2$ és a tonometriás pCO_2 ($tpCO_2$) egyidejű mérésével lehetőségünk nyílt a pCO_2 és $tpCO_2$ értékek kiszámítására ($tpCO_2 - PaCO_2$). A hemodinamikai méréseket, a vérgáz analízist és a 2. vizsgálatban a szervi diszfunkciók értékeléséhez szükséges vérminták levételét a kísérletek 16. és 24. órája között óránként végeztük. A vérmintákat cooximetriás vérgáz analizátorral elemeztük, a DO_2 , VO_2 és ExO_2 adatokat a vérgáz és a perctérfogat értékekből kalkuláltuk. A légzési elégtelenség (tüdőkárosodás) mértékét a PaO_2/FiO_2 arány alapján határoztuk meg. A szisztémás vaszkuláris rezisztencia indexet (SVRI) és a verőtérfogat indexet (SVI) a standard képletek alapján számítottuk ki. A 2. vizsgálatban a pSOFA pontértékeit a vizsgálat 16. és 24. órája között határoztuk meg. Szeptikus állatainkat 18 órával az indukciót követően két alcsoportba, szepszis ($n=10$) és szeptikus sokk csoportba ($n=9$) osztottuk, a Sepsis-3 definíció konszenzus kritériumai alapján (szepszis: bizonyított szervkárosodás, SOFA pontszám ≥ 2 ; laktát szint ≥ 2 ; szeptikus sokk: tartós hipotenzió, a 65 Hgmm feletti MAP fenntartása a megfelelő folyadékpótlás ellenére vazopresszort igényel) (Singer és mtsai., 2016).

3.2 Intravitális videomikroszkópia a mikrokeringés vizsgálatára

A mikrokeringés vizsgálatára intravitális videomikroszkópiát alkalmaztunk vizsgálataink 0., 16., 20. és 24. órájában. Az 1. vizsgálatban az intravitális ortogonális polarizációs spektrális (OPS) képalkotó eljárást, míg a 2. vizsgálatban az „incident dark field” (IDF) képalkotó technikát alkalmaztuk a nyelv alatti régió mikrokeringésének nem-invazív vizsgálatára. A perfundált erek arányát (PPV) az összes észlelt ér hosszának és a mérhető áramlási értékkel rendelkező erek hosszának százalékos arányaként adtuk meg (Dobbe és mtsai, 2008; Massey és mtsai, 2016).

3.3. Szervfunkciók vizsgálata: gyulladáso és metabolikus markerek, véresejt analízis

Mindkét vizsgálatban Griess-reakcióval mértük a plazma NO_x szintjét, amely a nitrát nitritté történő enzimatis redukcióján alapul. A TNF- α és IL-10, valamint a bET és a HMGB1 plazmaszintjét ugyanezen mintákból ELISA kitekkel határoztuk meg a gyártó utasításai szerint. Lépést tartva a Sepsis-3 kritériumokkal és a SOFA pontozási rendszerrel, a májfunkciót a plazma bilirubin-, aszpartát-aminotranszferáz- (AST) és alanin-aminotranszferáz- (ALT) szintjeinek mérésével, míg a vesekárosodás mértékét a plazma kreatinin- és albuminszintjének meghatározásával értékeltük. A szérum laktát szintet, mint a metabolikus egyensúly felborulásának indikátorát vénás vérmintákból határoztuk meg. Az 1. vizsgálatban gyulladáso markerként csak a fehérvéresejtszámot vizsgáltuk hagyományos Bürker-kamrát alkalmazva. A 2. vizsgálatban a vérlemezke-, fehérvéresejt- és vörösvéresejtszám meghatározása EDTA-val bevont csövekbe vett vérmintából automatizált sejtszámlálóval történt.

3.4. Hemokultúra

A 2. vizsgálatban, a kísérlet 18. órájában a szeptikus csoportba tartozó, véletlenszerűen kiválasztott 14 állattól vérmintát vettünk aerob és anaerob mintavevő palackokba. Az inokulum mikrobiális összetételét a leggyakoribb fajok tekintetében MALDI-TOF tömeg spektrometriával elemeztük.

3.5. A pSOFA pontszámok kiszámítása

A 2. vizsgálatban a humán SOFA és qSOFA pontszámokhoz hasonlóan két pontozási rendszert vezettünk be sertésekre adaptálva, amelyek a vizsgált szervrendszerek száma szerint három vagy öt doménből (komponensből) álltak. A 3D- vagy 5D-pSOFA pontozás során a légzőrendszer megítélésére a PaO₂/FiO₂ arányt használtuk, a humán küszöbértékhez hasonló értékkel. A veseelégtelenség indikátoraként az óradiurézist alkalmaztuk. Mivel a sertések vérlemezkeszáma magasabb, mint az emberé, ezért a 200×10⁹/l-ig terjedő értékeket normálisnak tekintettük (Waterhouse és mtsai, 2018). A bilirubinra ugyanazokat a küszöbértékeket használtuk, mint a humán SOFA pontozásnál.

3.6. Statisztikai analízis

Az adatok kiértékelését statisztikai szoftvercsomag segítségével végeztük (SigmaStat for Windows). Az adatok normál eloszlását Shapiro-Wilk teszttel ellenőriztük. A csoporton belüli változásokat Friedman-próbával vizsgáltuk. A csoportok baseline értékeihez viszonyított időfüggő eltéréseit Dunn-próbával teszteltük. A csoportok közötti eltérések meghatározása Kruskal–Wallis varianciaanalízissel, majd Dunn-próbával történt. A statisztikai szignifikancia szintjét $p < 0,05$ -nél határoztuk meg. A két változó közötti összefüggéseket Spearman rangkorrelációs együttható segítségével vizsgáltuk.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A Sepsis-1 kritériumok alapján tervezett szepszis modell eredményei (1. tanulmány)

A **SIRS kritériumok** (szívfrekvencia, PaCO_2 , testhőmérséklet, fehérvérsejtszám) tekintetében a kontrollcsoport eredményei nem mutattak változást. A szeptikus csoportban a **szívfrekvencia** folyamatos emelkedést mutatott, jelentősen meghaladva a kontroll értékeket. A **PaCO_2** már a 16. órától szignifikánsan csökkent a kontroll csoporthoz képest. A gyulladásos folyamat előre haladtával a **testhőmérséklet** növekedését figyeltünk meg, amely már a 20. órától szignifikánsan emelkedett volt a kontroll csoporthoz képest. A **fehérvérsejtszám** szignifikáns csökkenése már a 18. órában bekövetkezett a kontroll csoport adataihoz képest. Szeptikus állatainkban a 20. órától szignifikáns leukopéniát észleltünk.

4.2. Makrohemodinamikai változások az 1. vizsgálatban

A **MAP** a szeptikus állatainkban fokozatosan 70 Hgmm alá csökkent, míg a **perctérfogat index** jelentősen megemelkedett, és a 20. órától szignifikánsan meghaladta a kontrollcsoport értékeit. A **SVR** a szeptikus csoportban a 18. órában kezdett csökkenni, mélypontját a 20. órában érte el, majd ezen az alacsony szinten maradt a vizsgálat végéig. A szeptikus csoportban az **ELWI** már a 16. órában szignifikánsan magasabb volt a kontrollcsoportéhoz képest, és a vizsgálat során további romlást mutatott.

4.3. Direkt és indirekt mikrokeringési változások az 1. vizsgálatban

A szeptikus csoportban a vékonybélben mért és számított **pCO_2 rés** szignifikánsan magasabb értéket mutatott már az invazív monitorizálás kezdetén a kontrollcsoportéhoz képest, majd a 20. óra körül a pCO_2 rés hirtelen emelkedése volt megfigyelhető. A szublingvális mikrocirkuláció direkt vizsgálata során fokozatosan csökkenő, és a kísérlet 16. órájától szignifikánsan alacsonyabb vörösvértest áramlási sebességet és kapilláris perfúziós rátát észleltünk a szeptikus csoportban, mind a kiindulási értékekhez, mind a kontroll csoport értékeihez képest.

4.4. Plazma biomarkerek változásai az 1. vizsgálatban

A szepszis indukcióját követően már az első órákban megfigyelhető volt a **NO_x** szint szignifikáns emelkedése mind a kiindulási értékekhez, mind a kontrollcsoport értékeihez képest. A szeptikus csoportban a plazma **HMGB1** koncentrációja fokozatosan emelkedett, és a 16. órára szignifikáns, a kontroll csoporthoz képest ötszörös értéket ért el. Ezt követően diszkrét csökkenés volt megfigyelhető, ami a 24. órára már csak a kiindulási értékhez képest jelentett szignifikáns eltérést. A plazma **bET** szintje gyors, szignifikáns emelkedést mutatott a szeptikus csoportban, amely a 6. órára érte el csúcsát, és a kontroll csoporthoz képest mindvégig magas maradt.

4.5. A Sepsis-3 kritériumok alapján tervezett szepszis modell eredményei (2. tanulmány):

A 2. vizsgálatban a pSOFA pontrendszert alkalmaztunk a szepszis indukció 16. órájától állataink szeptikus és szeptikus sokk alcsoportokra való felosztására. A szeptikus sokk csoportban a 8 órás megfigyelési időszak alatt mindvégig szignifikánsan alacsonyabb **MAP** értékeket tapasztaltunk, álműtött állataink értékeihez képest. A szeptikus csoportban szignifikáns hipotenzió csak az utolsó 2 órában volt megfigyelhető. A szeptikus sokk csoportban az **óradiurézis** mértéke már a 16. órában szignifikánsan alacsonyabb volt a kontroll csoporthoz képest, de a szeptikus állatokhoz képest is szignifikáns különbség volt megfigyelhető több időpontban. A **PaO₂/FiO₂** arány hasonlóan változott a két szeptikus csoportban, de szeptikus sokk esetén már az invazív monitorizálás kezdetére szignifikáns csökkenés volt megfigyelhető a kontroll csoporthoz képest. A **trombocitaszám** progresszív csökkenése minden csoportban megfigyelhető volt a vizsgálati időszak utolsó három órájában. A legalacsonyabb értékeket a szeptikus sokk csoportban mértük. Az álműtött állatokhoz képest csak a szeptikus sokk csoportban volt szignifikáns emelkedés a **plazma bilirubin** szintjében és az **AST/ALT arányban** a vizsgálat utolsó 3-4 órájában. A **plazma kreatinin** szintje is a szeptikus sokk csoportban volt szignifikánsan magasabb a többi csoport értékeihez képest. A **plazma albumin** szint progresszív csökkenése minden csoportban megfigyelhető volt.

4.5.1. Változások a pSOFA pontszámokban

A 8 órás megfigyelési időszak alatt a szeptikus sokk csoportban szignifikánsan magasabb **3D-** és **5D-pSOFA** pontszámokat detektáltunk, mint az álműtött és szeptikus csoportban. A szeptikus és az álműtött csoport között szignifikáns különbség mindkét pontszám esetében csak a vizsgálat 24. órájára jelent meg.

4.5.2. Makrohemodinamikai változások

Mindkét szeptikus csoportban a teljes vizsgálati időszak alatt szignifikáns **szívfrekvencia** növekedést figyeltünk meg a kontroll csoporthoz viszonyítva. A szeptikus sokk csoportban a

perctérfogat index a kísérletek utolsó két órájában mutatott jelentős csökkenést, míg az **SVI** szignifikáns csökkenése mindkét szeptikus csoportot jellemezte. A **SVRI** értékei alapján a két szeptikus csoport markáns elkülönülést mutatott, mivel a szeptikus sokk csoportban már a 18. órától szignifikáns csökkenés volt látható a kontroll csoporthoz képest.

4.5.3. Mikrokeringési változások

A szublingvális régióban mindkét szeptikus csoportban szignifikánsan alacsonyabb mikrovaszkuláris perfúzió (csökkent **PPV** értékek) volt mérhető, mely legalacsonyabb értékét a kísérletek 20. órájában érte el, míg a 24. órára a **PPV** javulása volt megfigyelhető.

4.5.4. Oxigén dinamikai változások

Bár a **DO₂** értékeket illetően nem volt különbség a három csoport között, a 18. és 24. órában szignifikánsan megnövekedett **VO₂** értékeket találtunk a szeptikus sokk csoportban az álműtött állatokhoz képest. Mindkét szepszis indukált csoport szignifikánsan magasabb **ExO₂** értéket mutatott több időpontban a kontroll állatokhoz képest, függetlenül a szepszis súlyosságától.

4.5.5. Vérsejtszám változások

A fehérvérsejtszám az álműtött csoportban nem változott, míg 16 órával a szepszis indukcióját követően szignifikáns leukopénia alakult ki mindkét szeptikus csoportban. A **vörösvértestek** száma nem változott egyik vizsgált csoportban sem.

4.5.6. Az inokulum mikrobiológiai vizsgálata

A retrospektív mikrobiológiai elemzés során az inokulum mikrobiális koncentrációja $3,8 \times 10^7$ és $4,95 \times 10^9$ CFU között változott. Az $1,4 \times 10^9$ CFU felett növekedett a szeptikus sokk kockázata, míg a 8×10^9 CFU feletti értékek az állatok állapotának rapid romlását eredményezték. A székletsuszpenzióban található leggyakoribb mikroorganizmusok az *E. coli* és a *Klebsiella pneumoniae* voltak, amelyek emberben is Gram-negatív szepszist okozhatnak. Az *E. coli* előfordulása 100%-os volt a székletmintákban. Ezeken kívül számos *Lactobacillus* fajt is azonosítottunk.

4.5.7. A mikrobiológiai koncentrációk és a pSOFA pontszámok összefüggései

Mérsékelt, szignifikáns, pozitív korrelációt észleltünk az inokulum CFU értékek és a késői, 24. órás 3D- és 5D-pSOFA pontszámok között. A hemokultúrából kitenyésztett mikrobák koncentrációja erős, szignifikáns korrelációt mutatott a 18. órás 3D- és 5D-pSOFA score értékekkel.

4.5.8. A gyulladási biomarkerek plazmaszintjének változásai

Mindkét szeptikus csoportban hasonló **TNF- α** szinteket detektáltunk, amely a 6. órában érte el csúcát, és ez a jelentős emelkedés az invazív hemodinamikai monitorizálás teljes időtartama alatt megmaradt a szeptikus sokk csoportban. A plazma **HMGB1** szintje a szeptikus csoport

minden vizsgálati időpontjában emelkedett volt a kiindulási értékhez képest. A szeptikus sokk csoportban jelentős, háromszoros növekedés volt megfigyelhető már a kísérlet 16. órájában, amely a megfigyelési időszak végére csökkenő tendenciát mutatott. Az **IL-10** plazmaszintje szintén korai szignifikáns növekedést mutatott és a 16. órában érte el csúcspontját mindkét szeptikus csoportban, mind a kontrollcsoportban, mind a kiindulási értékekhez képest. A csoportok közötti különbség a 20. órára megszűnt. A plazma **bET**-szintjének változása csak a szeptikus sokk csoportban volt megfigyelhető. Szignifikánsan magasabb szintjét a 16. és 24. óra között figyeltük meg. A plazma **NO_x** szintje mindkét szepszis indukált csoportban emelkedést mutatott, de a 16. órától a szeptikus sokk csoportban szignifikánsan magasabb **NO_x** szintet mérünk az álműtött csoportban és a kiindulási értékekhez képest. A teljes vér **laktát** szintje az indukció után már 6 órával mindkét szeptikus csoportban emelkedett, de csak a szeptikus sokk csoportban ért el szignifikánsan magasabb értéket, amely a teljes vizsgálati periódus alatt megmaradt.

4.5.9. A plazma biomarkerek és a pSOFA pontszámok összefüggései

Szignifikáns összefüggést találtunk a késői, 24. órás 3D- és 5D-pSOFA pontszámok és a korai, 6. órás TNF- α , a 16. órás bET és a 16. órás HMGB1 szintek között. Nem találtunk azonban összefüggést a 24. órás 3D- vagy 5D-pSOFA pontszámok és a 16. órás IL-10 értékek között.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. Klinikai translációra alkalmas kísérleti szepszis modell kidolgozása

A kísérleti eredmények állatokról emberre történő translációs sikertelensége főként a nem megfelelő állatmodelleknek és a kísérletes szepszis humán kompatibilitási eltéréseinek köszönhető. Ez a tanulmány a polimikrobiális, intraabdominális szepszis továbbfejlesztett sertésmodelljét mutatja be klinikailag releváns hemodinamikai reakciókkal, laboratóriumi profillal, gyulladásos biomarkerekkel és bakteriémiával, amelyben kísérleti protokollunkat az MQTiPSS irányelvek ajánlásainak megfelelően alakítottuk ki.

Kísérleteink **indukciós szakaszában** standardizáltuk az intraabdominális szepszist előidéző inzultus mértékét, amely a gyulladásos- és hemodinamikai válaszreakciók reprodukálhatóságát eredményezte. Barth és munkatársai (2008) által kidolgozott modellt továbbfejlesztve, az 1. vizsgálatunk protokollját úgy alakítottuk ki, hogy az invazív instrumentálás és monitorizálás a szepszis indukciója után 15 órával kezdődjön. Kísérleti elrendezésünk **progressziós szakasza** egyesíti az éber és altatott *in vivo* modellek előnyeit, és követi a humán szepszis, valamint a többszervi elégtelenség klinikai lefolyását. Mindeközben pedig megfelel az állatok tudományos célú felhasználására vonatkozó etikai normáknak. Modellünkben szervtámogató kezeléseket

(légzéstámogatás, folyadékpótlás, diuretikum adása, vazopresszor- és inotróp terápia) az intenzív osztályokon bevett gyakorlathoz hasonlóan alkalmaztunk. Ezek az egyénre szabott kezelések az inzultus után leghamarabb 16 órával kezdődtek állataink aktuális állapotának megfelelően, a humán vonatkozású ajánlások alapján célzottan (Corrêa és mtsai, 2012; Head LW és mtsai, 2016). Modellünk klinikai kompatibilitását növeli, hogy az **invazív monitorizálás** a szeptikus folyamat későbbi szakaszában indul, amikor a fertőzés jelei már egyértelműen megmutatkoznak. A klinikai gyakorlatnak megfelelően a szükséges diagnosztikai és terápiás lépések csak ezt követően történtek. Vizsgálatunk a szeptikus és a kontroll csoport között a mikrokeringési paraméterek eltérő mintázatát mutatta mind a bélben, mind a szublingvális régióban. Adataink egyértelműen igazolták a hiperdinamias makrokeringés ellenére is fennálló intesztinális- és perifériás hipoxia jelenlétét. A mikrokeringési változások hátterében a NO és a proinflammatorikus citokinek megváltozott szintézise állhat. Az 1. tanulmányból származó eredményeinket összegezve megállapíthatjuk, hogy a törpesertes modellünkben észlelt mikro- és makrohemodinamikai változások és patofiziológiai jellemzők rendkívül hasonlóak a humán szepszisben észlelt klinikai tünetekhez. Peritonitis modellünk kielégítően reprodukálja a humán szepszis klinikai lefolyását, patofiziológiájának kutatására és új terápiás megközelítések kidolgozására egyaránt alkalmazható.

5.2. A szepszis diagnózisa a Sepsis-1 kritériumok szerint

Az 1. vizsgálatban még nem használtuk a SOFA értékelést, habár a szervkárosodások jeleit észleltük, nem monitorizáltuk őket. Célunk a gyulladáshoz vezető folyamat megfigyelése és leírása volt. Szeptikus állatainkat csak a kontroll csoport állataival hasonlítottuk össze. A szepszist a maghőmérséklet, a szívfrekvencia, az PaCO₂ és a fehérvérsejtszám alapján klasszifikáltuk, ezáltal a SIRS fázisban lévő állatok is a szeptikus csoportba kerültek. A szepszis tüneteit nem mutató állatokat kizártuk a vizsgálatból. Eredményeink jelentős szórása ellenére is szignifikáns különbségeket találtunk a kontroll és a szeptikus csoport eredményei között.

5.3. A fajspecifikus, sertés SOFA pontozási rendszer (pSOFA) kidolgozása

Második vizsgálatunk kísérleti elrendezése az elsővel szinte megegyezett, azonban kísérleteink során a szervkárosodás mértékének megítélésére a humán SOFA pontozási rendszerhez hasonló, sertésre adaptált pontrendszert alkalmaztunk. Eredményeink alapján a pSOFA 3- és 5-doménos formáinak használatát javasoljuk a szervkárosodás átfogó számszerűsítésére. Igazoltuk, hogy a szervi diszfunkciók kialakulásának dinamikája összefüggésbe hozható a pSOFA pontszámok változásával szepszis modellünkben, ami hozzájárulhat a preklinikai modellek klinikai translációjához. A nagyállat modellek standardizálása a pSOFA pontrendszerrel lehetővé teheti továbbá a különböző modellek összehasonlítását.

Eredményeink elemzése megerősítette a pSOFA pontértékelés jelentőségét a szepszis súlyosságának meghatározásában. Korábbi vizsgálataink során is megfigyelhetők voltak a szeptikus állapot jellemzői, azonban a szepszis és a szeptikus sokk elkülönítése jelentősen árnyalta az eredményeket, lehetővé téve a preklinikai és a klinikai scenariók közötti szakadék csökkentését.

5.4 Korreláció a mikrobiológiai inzultus és a szepszis okozta szervkárosodás mértékei között

A 2. vizsgálatban retrospektív mikrobiológiai analízist végeztünk. Igazoltuk, hogy a standardizált, autológ inokulum, sok klinikai és preklinikai megfigyeléshez hasonlóan, túlnyomórészt *E. coli* domináns bakteriémiát eredményezett (Park és mtsai, 2019; Vincent JL és mtsai, 2006). A mikrobiológiai inzultus mértéke és a 3D- vagy 5D-pSOFA pontszámok összefüggéseit vizsgálva megállapítottuk, hogy az inokulum kezdeti mikroba koncentrációja mérsékelt összefüggést mutatott a szervi diszfunkció súlyosságával, míg a vérben lévő mikrobák koncentrációjával erősebb korrelációt mutattunk ki. Fontos megjegyezni, hogy az egyéni mikrobiológiai változatosság befolyásolhatta állataink állapotának súlyosságát, ami megnehezítheti a standardizálást. Ezért a rutinszerű előzetes mikroflóra vizsgálat elősegítheti az autológ széklet inokulummal indukált szepszismodellek standardizálását.

5.5. A gyulladáshoz vezető mediátorok dinamikájának értékelése

A vizsgált gyulladáshoz vezető mediátorok dinamikája szignifikáns különbséget mutatott a szepszis és a szeptikus sokk csoportok között. A plazma TNF- α szint korai emelkedésének kimutatása, valamint a bET és HMGB1 szintek későbbi emelkedése előre jelezte a szervi diszfunkciók lehetőségét, amelyet a késői (24. órában mért) 3D- és 5D-pSOFA pontszámok igazoltak. Ezért azt javasoljuk, hogy ezek a biomarkerek potenciálisan prediktív jelentőséggel bírhatnak kísérletes szepszisben.

A makrofágok és neutrofil granulociták a fertőzésre adott válasz reakciókban reaktív oxigéngyököket (ROS) termelnek. Az NO és a ROS együtt, egy pozitív visszacsatolási mechanizmussal súlyosbítja a gyulladáshoz vezető választ, ezáltal növeli a plazma NO_x-szintjét (Waltz és mtsai., 2015). Kísérleteinkben a szeptikus sokk csoport magasabb NO_x-szintje alátámasztotta ezt a pozitív visszacsatolást.

A vér laktát szintje a szepszis fontos prognosztikai markere. A fokozott oxigénfogyasztás és a mikrokeringés egyidejű zavara a szöveti oxigénellátás romlásához, és a hipoxia következtében megnövekedett laktát termeléshez vezet (Lee és mtsai, 2021). A 2. tanulmányban a vér laktát szintjének növekedése mindkét szeptikus csoportban korai emelkedést mutatott, azonban a szeptikus sokk csoportban mindvégig magas maradt. Ez a tartós szöveti hipoxia közvetve az oxigénszállító kapacitás csökkenését jelzi. Kísérleteink során a szepszis asszociált biomarkerek

változása megegyezett a humán szepszisben tapasztaltakkal, amely alkalmassá teszi modellünket a szepszis biomarkereinek tanulmányozására, valamint új terápiás célpontok kifejlesztésére.

5.6. Az oxigéndinamika és a mikrokeringés értékelése

Második vizsgálatunkban az oxigéndinamikai paraméterek alapján kevésbé volt elkülöníthető a szepszis és a septicus sokk csoport. Az alacsonyabb SVRI, a magasabb DO_2 és VO_2 , valamint a jelentősen magasabb ExO_2 kompenzált hiperdinamiás fázisra utalt. Mindkét septicus csoport szignifikánsan csökkent mikrovaszkuláris perfúziót (csökkent PPV értékek) mutatott a szublingvális régióban. A monitorizálási időszak végére (24. óra) javuló kapilláris perfúziós rátát figyeltünk meg, ami az alkalmazott szervtámogató kezelésekkel (folyadék- és inotróp terápia, diuretikum) magyarázható.

6. A TÉZIS LEGFONTOSABB MEGÁLLAPÍTÁSAI

1. Klinikailag releváns septicus nagyállatmodellt fejlesztettünk ki, amelyet a klinikumban megfigyelhető komplex makro- és mikrokeringési változások, gyulladós biomarker profil valamint szervi diszfunkció jellemez. Módszertana ötvözi az éber és altatott vizsgálatok előnyeit, és megfelelően követi a humán szepszist és a többszervi elégtelenség kialakulását.
2. A gazdaszervezet válaszait, a szervkárosodás mértékét sertésre adaptált 3D- és 5D SOFA pontrendszerekkel számszerűsítettük. A 3D-pSOFA score alkalmas a keringési-, légzési- és vesefunkciós zavarok laboratóriumi vizsgálatok nélküli értékelésére, míg az 5D-pSOFA pontszám használata fokozza a vizsgálatok reprodukálhatóságát és a várható kimenetel szempontjából alternatív lehetőségként jelenik meg a mortalitás helyett.
3. A nagyállatokon végzett kísérletek pSOFA pontrendszerekkel történő standardizálása összehasonlíthatóvá teszi a különböző modelleket, így csökkentve a preklinikai és a klinikai kimenetel közötti szakadékot.
4. Mikrobiológiai elemzéssel kimutattuk, hogy az inokulum mikrobiális koncentrációja szorosan összefügg a szepszis és a szervkárosodás súlyosságával.
5. Preklinikai modellünk lehetővé tette, hogy igazoljuk a gyulladással összefüggő szöveti hipoxia, vagy nekrozis által kiváltott plazma biomarker szintek emelkedésének prediktív értékét a késői szervkárosodás kimutatásában.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Boros Mihály professzor úrnak, a Sebészeti Műtéttani Intézet vezetőjének értékes tudományos útmutatásaiért és naprakész tudásáért. Köszönöm, hogy diákkorom óta kutatási- és fejlődési lehetőséget biztosít számomra. Külön köszönettel tartozom témavezetőmnek és mentoromnak, Dr. Kaszaki Józsefnek, amiért bevezetett a tudományos kutatás világába. Sok izgalmas kísérletet és előadói skillt köszönhetek neki. Szakmai hozzáértése, kritikai érzéke és folyamatos támogatása nélkül ez a dolgozat nem jöhetett volna létre. Köszönöm neki a 16 évnyi közös munkát és a belém fektetett energiát. Köszönöm kutatócsoportunk munkatársainak, Rutai Attilának, Érces Dánielnek, Tallósy Péter Szabolcsnak, Bizánc Lajosnak, Sztányi Péternek, Varga Gabriellának, Szabó Andreának, Juhász Lászlónak, Poles Zita Mariettának, Sóki Józsefnek, Fejes Rolandnak és Földesi Imrének a doktori értekezésben szereplő tanulmányok tudományos értékének növelésében nyújtott segítségüket. Köszönetemet fejezem ki a Sebészeti Műtéttani Intézet munkatársainak, Mester Csillának, Győrfi Bencének és Pristyák Dávidnak, akiktől kiváló technikai segítséget kaptam. Végül, de nem utolsósorban szeretném megköszönni családom türelmét és támogatását, amit dolgozatom megírása során tanúsítottak.

Kutatási támogatások: NKFIH K116689, GINOP-2.3.2-15-2016-00034.

A TÉZIS ALAPJÁT KÉPEZŐ KÖZLEMÉNYEK

- I. Érces, D., **Zsikai, B.**, Bizánc, L., Sztányi, P., Vida, G., Boros, M., Jiga, L., Ionac, M., Mándi, Y., Kaszaki, J. (2011). An improved model of severe sepsis in pigs. *Timisoara Medical Journal*, 61 (3–4), 135–140.
- II. **Zsikai, B.**, Bizánc, L., Sztányi, P., Vida, G., Nagy, E., Jiga, L., Ionac, M., Érces, D., Boros, M., & Kaszaki, J. (2012). Klinikailag releváns sepsismodell törpesertésen. *Magyar Sebészet*, 65(4), 198–204. doi: 10.1556/maseb.65.2012.4.5
- III. Rutai, A.*, **Zsikai, B.***, Tallósy, S. P., Érces, D., Bizánc, L., Juhász, L., Poles, M. Z., Sóki, J., Baaity, Z., Fejes, R., Varga, G., Földesi, I., Burián, K., Szabó, A., Boros, M., Kaszaki, J. (2022). A Porcine Sepsis Model with Numerical Scoring for Early Prediction of Severity. *Frontiers in Medicine*, 9, 867796. doi: 10.3389/fmed.2022.867796; SJR Q1; IF 3.9; *Megosztott első szerzőség.