

**A MIKROKERINGÉSI ÉS MITOKONDRIÁLIS FUNKCIÓK IDŐBELI
VÁLTOZÁSAINAK VIZSGÁLATA KÍSÉRLETES RÁGCSÁLÓ SZEPSZIS
MODELLBEN**

Ph.D. Tézis

Dr. Fejes Roland

Témavezető: Dr. Tallósy Szabolcs Péter Ph.D.

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



Szeged

2024

Publikált közlemények listája

A Ph.D. disszertáció alapjául szolgáló közlemények (IF: 9.59)

1. Szabolcs Péter Tallósy, Marietta Zita Poles, Attila Rutai, Roland Fejes, László Juhász, Katalin Burián, József Sóki, Andrea Szabó, Mihály Boros, József Kaszaki. **The microbial composition of the initial insult can predict the prognosis of experimental sepsis.** *Scientific Reports*, 2021; 11(1):22772. **IF: 4.9; D1**
2. Roland Fejes, Attila Rutai, László Juhász, Marietta Zita Poles, Andrea Szabó, József Kaszaki Mihály Boros, Szabolcs Péter Tallósy. **Microcirculation-driven Mitochondrion Dysfunction during the Progression of Experimental Sepsis.** *Scientific Reports*, 2024;14: 7153. **IF: 4.6; D1**

További közlemények (IF: 13.93)

1. Attila Rutai,* Roland Fejes,* László Juhász, Szabolcs Péter Tallósy, Marietta Zita Poles, Imre Földesi, András Tamás Mészáros, Andrea Szabó, Mihály Boros, József Kaszaki. **Endothelin A and B Receptors: Potential Targets for Microcirculatory-Mitochondrial Therapy in Experimental Sepsis.** *Shock*, 2020; 54(1): 87–95. (*megosztott) **IF: 2.55; Q1**
2. László Juhász, Attila Rutai, Roland Fejes, Szabolcs Péter Tallósy, Marietta Zita Poles, Andrea Szabó, Imre Szatmári, Ferenc Fülöp, László Vécsei, Mihály Boros, József Kaszaki. **Divergent Effects of the N-Methyl-D-Aspartate Receptor Antagonist Kynurenic Acid and the Synthetic Analog SZR-72 on Microcirculatory and Mitochondrial Dysfunction in Experimental Sepsis.** *Frontiers in Medicine*, 2020; 7:566582. **IF: 5.09; Q1**
3. Attila Rutai, Bettina Zsikai, Szabolcs Péter Tallósy, Dániel Érces, Lajos Bizánc, László Juhász, Marietta Zita Poles, József Sóki, Zain Baaity, Roland Fejes, Gabriella Varga, Imre Földesi, Katalin Burián, Andrea Szabó, Mihály Boros, József Kaszaki. **A Porcine Sepsis Model with Numerical Scoring for Early Prediction of Severity.** *Frontiers in Medicine*, 2022; 9:867796. **IF: 5.09; Q1**
4. Roland Fejes, Tamás Szűcsborus, András Czombos, Csaba Góg, Zoltán Ruzsa. **Managing Patients with Overlapping High Risk for Bleeding and Thromboembolic Events.** *Cureus Journal of Medical Science*, 2024; 16(2):e53557. **IF: 1.2**
5. Fejes Roland,* Kovács-Huber Róbert,* Góg Csaba, Kádár Csilla. **Intenzív Inzulinkezelés Korai Deeszkalálásának Lehetőségei [Options for Early De-escalation of Intensive Insulin Treatment].** *Magyar Belorvosi Archívum*, 2024; 77: 45–48. (*megosztott) **IF: 0**

1. BEVEZETÉS

A legújabb Sepsis-3 definíció a szepszist életveszélyes, többszervi elégtelenségként (*multi-organ failure*, MOF) határozza meg, amelyet a szervezet fertőzésre adott szabályozatlan válasza okoz. A diagnózis az ún. *Sequential Organ Failure Assessment* (SOFA) pontrendszerre épül, ahol a ≥ 2 ponttal történő növekedés szükséges a diagnózis felállításához. Az összetett kórélettani folyamatok miatt a szepszis klinikai kezelése továbbra is kihívást jelent. A szeptikus reakciót patogének vagy szöveti károsodás molekuláris mintázatai indítják el, amelyek az immunrendszer sejtes és humorális folyamatait aktiválják. Hagyományosan a szepszist kétfázisú modellként értelmezték, ahol egy korai, hiperinflammációs gyulladáshoz követhető citokin-vihart követi az immunparalízis.

A kísérleti modellek kulcsfontosságúak az új terápiás lehetőségek kutatásában, ám ezek klinikai transzláthatóságát olyan kihívások limitálják, mint például a szepszis indukció és az indukciós mikrobiális inokulum összetételének standardizálása. A *Minimum Quality Threshold in Preclinical Sepsis Studies* kritériumai egy rendszert vázolnak fel a rágcsáló szepszis modellezésére, és kiemelik a modellfejlesztés legfontosabb szempontjait. A humán *peritonitis* szepszis leképezésére leggyakrabban rágcsálómodelleket használnak, például a széklet intraabdominális injektálását. A bakteriális közösségek változatossága és a domináns bakteriális törzsek szerepe azonban a szepszis súlyosságának meghatározásában még mindig kevésbé ismert.

Habár a szepszis jelentősen befolyásolja a keringési és légző szervrendszereket, a mikrokeringés károsodása jobb mutatója a MOF-nak és a halálozásnak, mint a hagyományos makrohemodinamikai paraméterek. A mikrokeringési diszfunkció kulcsszerepet játszik a szeptikus MOF előrehaladásában az endotélsejt-károsodás és a véráramlási zavarok által. Emellett a mikrokeringési funkciók szoros kapcsolatban állnak a sejtszintű oxigénfogyasztással, amelyeknek jelentős részét a mitokondriális légzés teszi ki. A mitokondriális funkciózavar és szerkezeti károsodás hozzájárul a MOF kialakulásához az energiatermelő mechanizmusok összeomlása által. A mikrokeringési és mitokondriális distressz (MMD) fogalma a fent említett folyamatok összefonódását magyarázza. A legújabb kutatások a mikrokeringési oxigénellátás támogatására összpontosítanak, amely által a mitokondriális működés fenntartható. Az MMD alapján a mitokondriumok és az azokat ellátó mikrokeringési hálózat egyaránt a MOF fő mozgatórugói. Ugyanakkor még mindig nyitott kérdés, hogy ezek a változások ok-okozati összefüggésben állnak-e, és ha igen, hogyan alakul ki ez a kétirányú kapcsolat az idő függvényében. Még standardizált kísérleti körülmények között is kihívást jelent bemutatni az MMD két ága közötti kapcsolatot a szepszis progresszív jellege és keresztreakciók bonyolult hálózata miatt. Fontos megjegyezni, hogy a mikrokeringési és mitokondriális változásokat együtt még nem vizsgálták, sem preklinikai, sem humán szepszis esetében, összpontosítva a MOF előtti és utáni időszakokra.

2. CÉLKITŰZÉSEK

1. Tekintettel a humán szepszis progresszív természetére, célunk volt, hogy megvizsgáljuk a standardizált széketinokulummal kiváltott experimentális szepszis időfüggő jellemzőit (6-72 óra) az állatok általános állapota és a szervi diszfunkciók kialakulása szempontjából.
2. Mivel a szepszis súlyossága egyedenként (beleértve a patkányokat is) eltérő lehet, feltételeztük, hogy a szepszist kiváltó széklet baktériumösszetétele fontos befolyásoló tényező lehet, és döntően hathat a prognózisra. Ezek okán retrospektív módon megvizsgáltuk, hogy a szepszist kiváltó inokulum mikrobiológiai jellemzői hogyan befolyásolják az szepszis súlyosságát.
3. Harmadik célunk, hogy meghatározzuk, hogyan változik a baktériumpopuláció összetétele és a csíraszám a hasüregben az idő függvényében, és hogyan befolyásolják ezek a tényezők a szepszis súlyosságát.
4. A közelmúltban megjelent szakirodalom kapcsolatot feltételez a szepszis okozta mikrokeringési és mitokondriális diszfunkció és a klinikai kimenetel között, így célunk volt, hogy megvizsgáljuk e patofiziológiai komponensek szepszis súlyosságra gyakorolt hatását. Célul tűztük ki továbbá a zsigeri mikrovaszkuláris állapot és az egyidejű *splanchnicus* mitokondriális funkció monitorozását, valamint a kettő időfüggő kapcsolatának jellemzését intraabdominális szepszis modellünkben.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Jelen disszertáció két tanulmányon alapul. A tanulmányokat megelőző előtanulmányban a szűrés és az inkubáció hatását vizsgáltuk az inokulum mikrobiális jellemzőire. Az eredmények alapján egy szűkített mikrobiális koncentrációtartományú inokulumot tudunk alkalmazni a súlyosság időbeli változásának leírására. A *Study 1*-ben a MOF lefolyásának jellemzésére alkalmazható polimikrobiális szepszis modell optimalizálása volt az elsődleges célunk. Mivel a szepszis lefolyása egyes kísérleti állatokban súlyosabb volt, retrospektív módon megvizsgáltuk, hogy az inokulum minőségi jellemzői hogyan befolyásolták a szepszis súlyosságát. A *Study 2*-ben a mikrokeringési és mitokondriális működést leíró paraméterek közötti összefüggésekre összpontosítottunk, valamint arra, hogy ezek hogyan korrelálnak a szepszis súlyosságával, illetve hogyan prognosztizálják a szepszis kimenetelét.

3.1. Etikai engedély és a kísérletekben felhasznált állatok

A vizsgálatokat a Szegedi Tudományegyetem Állatjóléti Bizottsága és az Országos Tudományos és Etikai Bizottság, a magyarországi illetékes nemzeti hatóság (ETT-TUKEB; engedélyszám: V/175/2018) hagyta jóvá. A laboratóriumi állatok gondozására és felhasználására vonatkozó valamennyi intézményi és nemzeti irányelvet betartottuk.

A kísérletekhez hím Sprague Dawley patkányokat használtunk, amelyeket előzőleg műanyag ketrecekben, hőmérséklet-szabályozott helyiségben (21-23°C), napi 12/12 órás világos-sötét ciklusban tartottunk. Korlátlanul hozzáférhettek a standard rágcsálótakarmányhoz és vízhez.

3.2. Az előtanulmány célkitűzései, kísérleti elrendezése és főbb eredményei

Célunk a *peritonitis* szepszis előidézése volt egy meghatározott tartományon belüli, standardizált baktériumszám injektálásával a mikrobiális összetétel variabilitásának korlátozása nélkül. Ezért előzetes vizsgálatot végeztünk, hogy **(1)** megállapítsuk milyen hatással van a szűrés az indukciós inokulumra, **(2)** feltárjuk az indukáló szuszpenziók csíraszámának prognosztikai szerepét, valamint **(3)** optimalizáljuk az inkubáció időtartamát.

Az állatok általános egészségi jólétét és közérzetét egy 0-9 pontos patkányspecifikus betegségi pontozási rendszer (*rat-specific sickness scoring*, RSS) segítségével értékeltük, ahol a 6-os kumulatív értéket tekintettük az eutanázia végpontjának. $1,02 \times 10^6$ kolóniaképző egység (*colony forming unit*, CFU) alatti csíraszám esetén nem volt mortalitás és szignifikánsan emelkedett RSS-érték. Az első 24 órában nem történt szignifikáns változás az RSS-ben egyik állatban sem. Az $5,6 \times 10^6$ CFU feletti csíraszám azonban az első 12-16 órában 90% feletti mortalitást eredményezett. Ezért a *Study 1*-ben és a *Study 2*-ben $1,02 \times 10^6$ és $5,6 \times 10^6$ CFU közötti baktériumtartalmat alkalmaztunk a szeptikus MOF vizsgálatára a modell létrehozása során.

Ezenkívül vizsgáltuk a szűrés hatását a mortalitásra, eredményeink alapján a csíraszám nem befolyásolta a mortalitást, amikor az indukciót szűrés nélkül végeztük. A magasabb csíraszám azonban magasabb mortalitást jelentett szűrés mellett. Ennek hátterében feltételezzük, hogy a székletflokulánsok nagyobb tapadási felületet biztosítanak a mikroorganizmusok számára, ezáltal növelve az indukció változékonyságát. A kvalitatív mikrobiológiai elemzés (3.3. fejezet) a baktériumtörzsek számának jelentős csökkenését mutatta ki mindössze 10 óra 37 °C-on történő inkubáció után, feltételezhetően a populáció növekedéséért folytatott mikrobiális populációdinamika miatt.

3.3. A fekális inokulum mikrobiológiai jellemzése

Az indukciós inokulum kvantitatív és kvalitatív mikrobiológiai elemzéséhez 0,1 ml űrtartalmú mintákat használtunk. A CFU-t a standard telepszámlálási módszerrel határoztuk meg. Az inokulum bakteriális összetételének elemzésére szelektív táptalajokat és mátrix-asszisztált lézer deszorpció/ionizációs szóródási (*matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight*, MALDI-TOF) tömegspektrometriát (MS; Bruker Daltonics, Németország) alkalmaztunk. A bakteriális összetételre vonatkozó eredmények jellemzően 48 órával az inokulumkészítési eljárás befejezése után álltak rendelkezésre.

3.4. A *Study 1* kísérleti protokollja

Az állatokat (380 ± 30 g) véletlenszerűen osztottuk be álműtött ($n_{\Sigma} = 49$) és szeptikus csoportokba ($n_{\Sigma} = 51$), amelyeket random módon tovább osztottunk négy független csoportra (álműtött: $n_{12h} = 13$, $n_{24h} = 12$, $n_{48h} = 12$, $n_{72h} = 12$; szeptikus: $n_{12h} = 13$, $n_{24h} = 13$, $n_{48h} = 13$ és $n_{72h} = 12$) a tervezett progressziós idő alapján. Az előtanulmány során kapott adatoknak megfelelően a szűrt, 5 ml/kg térfogatnyi inokulumot intraperitoneálisan (ip) adtuk be 21G vastagságú tűvel. Az álműtött csoportokban lévő patkányok ugyanilyen térfogatú sóoldatot kaptak ip. Az állatok általános állapotát az indukciót követő 6. órában, majd ezt követően 12 óránként értékeltük az RSS rendszer segítségével. Az RSS értékelésével egy időben minden állat 10 ml/kg krisztalloid oldatot (Ringerfundin, B. Braun, Magyarország) kapott szubkután (sc) a kiszáradás elkerülése érdekében, valamint 15 μ g/kg buprenorfint sc (Bupaq, Merck, USA) fájdalomcsillapítás céljából. A progresszió végén minden csoportban elaltattuk az állatokat, és hemodinamikai monitorozást, vér-, szövet- és hasúri folyadék mintavételt végeztünk. A protokoll végén a kísérleti állatokat mély altatásban, ketamin túladagolással (120 mg/kg) termináltuk.

3.5. A *Study 2* kísérleti protokollja

Az állatokat véletlenszerűen osztottuk be álműtött ($n_{\Sigma} = 40$) és szeptikus csoportokba ($n_{\Sigma} = 40$), amelyeket random módon tovább osztottunk öt független alcsoportra ($n_{12h} = 8$, $n_{16h} = 8$, $n_{20h} = 8$, $n_{24h} = 8$ és $n_{28h} = 8$) a szepszis tervezett progressziójának megfelelően. A szepszis előrehaladásának 6, 12, 16, 20 vagy 24 óráját követően az állatok folyadékterápiában és fájdalomcsillapításban részesültek a *Study 1* protokollja alapján, majd értékeltük az RSS-t. Ezt követően az állatokat elaltattuk, és invazív hemodinamikai monitorozást végeztünk (3.6. fejezet). Ezt követően medián laparotómiát végeztünk, hogy az ileális mikrocirkulációt szerőzai orientációból az *Incident Dark Field* (IDF) képalkotó technikával megfigyeljük (3.8. fejezet). Közvetlenül a mikrocirkulációs méréseket követően májmintát vettünk a mitokondriális légzési funkciók nagyfelbontású fluoro respirometriás méréssel történő értékeléséhez (3.9. fejezet). Végül vérmintákat vettünk a *vena cava inferiorból* a gyulladással és szervi elégtelenséget jelző markerek (3.7. fejezet) mérésére.

3.6. Anesztézia, sebészi előkészítés és invazív kardiopulmonális monitorozás

Mindkét vizsgálatban az állatokat ketamin (45,7 mg/kg) és xilazin (9,1 mg/kg) keverékének ip injekciójával altattuk el. Ezt követően az állatokat hanyatt fekvésben, 37°C-os melegítőpárnára helyeztük és tracheosztómiát végeztünk, valamint kanüláltuk a jobb oldali *vena jugularis anteriort* krisztalloid infúzió adása és folyamatos intravénás analgosedáció céljából. Ezt követően a bal oldali *arteria carotis communist* kanüláltuk az artériás középnyomás (*mean arterial pressure*, MAP) monitorozásához, valamint egy termisztoros katétert helyeztünk a kontralaterális artériába a

perctérfogat (*cardiac output*, CO) méréséhez (Cardiosys 1.4, Experimetria Kft., Budapest, Magyarország). A hemodinamikai paraméterek adatait 60 perces megfigyelési időszak alatt rögzítettük. A megfigyelési időszak 60. percében artériás vérmintát vettünk vérgázelemzéshez (Cobas b123; Roche Ltd., Basel, Svájc). Az oxigénszállítást, -fogyasztást és -extrakciót (DO_2 , VO_2 , illetve ExO_2) standard számítások segítségével állapítottuk meg. A tüdőfunkciót az artériás oxigén parciális nyomása és a belélegzett oxigén frakciójának arányának meghatározásával értékeltük (PaO_2/FiO_2 , ahol $FiO_2 = 0,21$). A 60 perces hemodinamikai monitorozást követően medián laparotómiát végeztünk az ileális szeróza mikrocirkulációjának megfigyelésére (3.8. fejezet). A mikrocirkulációs méréseket követően májmintát vettünk a mitokondriális légzés értékeléséhez (3.9. fejezet).

3.7. Szérummarkerek és a ROFA score értékelése

A teljes vér laktát szintjét vénás vérből mértük (Accutrend Plus Kit; Roche Diagnostics Ltd., Rotkreuz, Svájc). A vérmintákat a *vena cava inferiorból* vettük EDTA-val bevont csövekbe, centrifugáltuk (1200 g 4°C-on 10 percig), és -70°C-on tároltuk. A plazma interleukin-6 (IL-6) és endotelin-1 (ET-1) szintjét standard enzimhez kötött immunszorbens eljárás (Cusabio Biotechnology Ltd., Wuhan, Kína) protokolljai szerint határoztuk meg. A vesefunkciót a plazma karbamidszintjével jellemeztük. A májfunkciót a plazma alanin-aminotranszferáz (ALT) és aszpartát-aminotranszferáz (AST) szintjével értékeltük (Roche/Hitachi 917 analizátor; F. Hoffmann-La Roche AG, Svájc). A MOF jellemzéséhez patkányspecifikus szervi elégtelenségi pontrendszert (*Rat-specific Organ Failure Assessment*, ROFA) használtunk. A szepszist 2 feletti kumulatív ROFA-pontszám alapján definiáltuk.

3.8. Az ileális mikrokeringés vizsgálata *Incident Dark Field* képalkotással

Az ileum mikrocirkulációját szerózai orientációból IDF képalkotó technikával (CytoCam Video Microscope System; Braedius Medical, Huizen, Hollandia) vizualizáltuk. A medián laparotómiát követően egy ileumkacsot ép állapotban emeltünk ki a hasüregből, és egy speciális tartóra helyeztük, miközben folyamatosan nedvesen tartottuk. A CytoCam készülék 530 nm hullámhosszúságú, irányított fényt kibocsátó LED-ekből áll. A fényt a hemoglobint tartalmazó részecskék (vörösvértestek) elnyelik, míg a háttér visszaveri, ezáltal egy megvilágított háttér előtt láthatóvá téve a szöveti mikrovaszkulaturát. Az egy ileumszegmensről készült képeket hat különálló, 50 képkockából álló, nagyfelbontású videofelvételen rögzítettük. A felvételeket offline szoftverrel elemeztük. A perfundált erek arányát (*proportion of perfused vessels*, PPV) a perfundált erek és az összes ér hossz arányaként határoztuk meg. A mikrocirkulációs heterogenitás értékeléséhez félkvantitatív elemzést követően az egyes ereket osztályoztuk (0) hiányzó, (1) szakaszos, (2) lassú és (3) folyamatos áramlás között. Minden egyes eret a fenti értékekkel

jellemeztünk és a felvételek összpontszámai az egyéni értékek átlagai voltak, ami a mikrovaskuláris áramlási indexet (*microvascular flow index*, MFI) jelezte.

A heterogenitási indexet (HI) úgy határoztuk meg, hogy a legmagasabb és legalacsonyabb MFI érték közötti különbséget elosztottuk az átlagos MFI-vel.

3.9. A máj mitokondriális funkcióinak vizsgálata nagyfelbontású respirometriával

Mindkét vizsgálatban a mitokondriális oxigénfogyasztást ($mtVO_2$) máj homogenátumban mértük nagyfelbontású fluororespirometriával (Oxygraph-2k, Oroboros Instruments, Innsbruck, Ausztria). Röviden, a bal oldalsó lebenyből nyert májmintákat homogenizáltuk, majd a méréseket MiR05 médiumban végeztük állandó hőmérsékleten, folyamatos keverés mellett (37°C , 750 rpm). Az alaprespiráció stabilizálódása után rotenont adtunk (1) a komplex I aktivitás gátlására és (2) az oxál acetát (a komplex II endogén inhibitora) felhalmozódásának megakadályozására. A $FADH_2$ által támogatott LEAK-respirációt és az oxidatív foszforiláció maximális kapacitását (OxPhos) exogén szukcinát és adenzin-difoszfát (ADP) jelenlétében mért oxigén fogyasztási értékekkel határoztuk meg. Az OxPhos stimulálását követően a mitokondriális külső membrán (*mitochondrial outer membrane*, mtOM) integritását exogén citokróm c hozzáadásával vizsgáltuk, és az $mtVO_2$ növekedését százalékosan fejeztük ki az OxPhos szintjéhez képest (CytC%). A komplex V-t (vagy ATP-szintáz) oligomycinnel gátoltuk a nem-foszforiláló állapotban történő LEAK-respiráció ($LEAK_{Omy}$) értékeléséhez és a respirációs kontroll hányados (*respiratory control ratio*, RCR) kiszámításához, ami a mitokondriális légzés OxPhos-szal való kapcsoltságának indexe ($Oxphos/LEAK_{Omy}$). Az elemzéshez a DatLab 7.3.0.3. szoftvert (Oroboros Instruments, Innsbruck, Ausztria) használtuk.

3.10. Statisztikai analízis

Az adatokat a SigmaStat 13 szoftvercsomaggal (Systat Software, San Jose, CA) értékeltük. A mortalitást a Kaplan-Meier módszerrel elemeztük és ábrázoltuk. Mann-Whitney vagy Kruskal-Wallis tesztet alkalmaztunk Dunn post-hoc teszttel a diszkrét változók esetében, míg a folyamatos változók esetében kétutas ANOVA-t alkalmaztunk, amelyet Holm-Sidak post-hoc teszt követett. Az adatokat mediánértékek és a 75. és 25. percentilis értékek formájában jelenítettük meg, a $P < 0,05$ értéket tekintettük szignifikánsnak. A különböző paraméterek diagnosztikai pontosságának ábrázolására a görbe alatti terület (*area under the curve*, AUC) adatai alapján meghatározott klasszifikációs analízist (*receiver operating characteristics*-görbét: ROC) használtunk (GraphPad Prism 8.0). A Pearson- vagy Spearman-módszert alkalmaztuk a lineáris korreláció, a korrelációs együttható (r), a regressziós egyenesek és a 95%-os konfidenciaintervallumok elemzésére.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A *Study 1* eredményei

4.1.1. Az állatok általános egészségi állapota és a mortalitás

Az első 24 órán belül néhány szeptikus állat állapota jelentősen romlott, az RSS elérte az eutanáziához szükséges kritikus értéket (6), ezért a 24, 48 és 72 órás csoportokban $n = 3$, $n = 4$ és $n = 3$ állatot termináltunk. Az elaltatott állatok száma szerepel a mortalitási számításokban. A túlélő szeptikus állatok általános állapota nem romlott 48 és 72 óra között.

4.1.2. Globális és szubcelluláris oxigéndinamika, gyulladási értékek

Az ExO_2 értékekben nem volt szignifikáns különbség az álműtött és a szeptikus állatok között a 12. órában, de szignifikánsan csökkent a progresszió 24. órájában. A szeptikus állatokban kevésbé csökkent ExO_2 értékeket mértünk. Az OxPhos szintén csak a 24 órás szeptikus állatoknál mutatott szignifikáns romlást. A szepszis indukciója után az IL-6 szintje 12 óra elteltével, míg az ET-1 koncentrációja 24 óra múlva emelkedett szignifikánsan.

4.1.3. A ROFA score változása

A ROFA adatok a 24-48 órák között szignifikáns növekedést mutattak. A 24 órás ROFA emelkedés minden vizsgált paraméterre visszavezethető volt, a 48 órás értékeknél a teljes vér laktát és a plazma ALT értékek nem mutattak szignifikáns eltérést. A szeptikus csoportban a ROFA pontok 72 óra elteltével közelítették meg az álműtött állatok értékét.

4.1.4. Az indukciós inokulum és a hasúri folyadék mikrobiológiai jellemzése

A CFU meghatározásán túl a baktériumösszetétel elemzését is elvégeztük mind a szepszist kiváltó székletinokulumokból, mind a hasúri folyadékból. Ez a retrospektív mikrobiológiai elemzés jelentős minőségi különbségeket tárt fel a baktériumok összetételében és a monomikrobiális/polimikrobiális mintázatban. Az inokulumok 20%-ában ($n_{\Sigma} = 10$) *E. coli* volt jelen, és az összes korai (24 órás) szepszis mortalitás az *E. coli* monomikrobiális kultúrákkal történő indukcióval volt összeköthető. A szepszist kiváltó inokulumokban három baktériumtörzs, köztük 18, főként Gram-negatív nemzetség volt kimutatható. A legtöbb taxon a Proteobacteria (49%; pl. *E. coli*), a többi pedig a Firmicutes (38%; pl. *Lactobacilli*) és az Actinobacteria (13%; pl. *Propionibacterium acnes*) között oszlott meg. Az inokulumban a leggyakoribb törzs az *E. coli* volt (a minták 100%-ában). A hasúri folyadékban a baktériumkoncentráció az idő múlásával egy nagyságrenddel csökkent az indukciós inokulumhoz képest, ami a baktériumtörzsek diverzitásának csökkenésével járt együtt. Emellett új fajok is elérték a kimutathatósági szintet. A 72 órás szepszis után a hasúri folyadékban már csak *E. coli* (a minták 100%-ában) és *Lactobacillus murinus* (a minták 17%-ában) volt azonosítható.

4.1.5. Összefüggés az indukció csíraszama és a többszervi elégtelenség súlyossága között

Az indukciós CFU és a 12 órás ROFA pontértékek mérsékelt kapcsolatot mutattak. A *peritonitis* 24. órájában azonban szignifikáns korreláció adódott a fenti paraméterek között, ami a 48. és 72. óra alkalmával már nem volt kimutatható.

4.1.6. A ROFA score változása mono- és polimikrobiális indukció esetén 24 óra elteltével

Mivel az inokulumban jelentős különbségek mutatkoztak a baktériumtörzsek diverzitásában, retrospektív alcsoport-elemzést végeztünk, hogy összehasonlítsuk a ROFA-pontértékek paramétereit azon állatok esetében, amelyeket polimikrobiális inokulummal (a 24 órás szepsziscsoportban; $n = 10$) és *E. coli* monomikrobiális inokulummal (a 24, 48 és 72 órás szepsziscsoportban; $n = 3, 4$, illetve 3 állat) oltottunk be. Szignifikánsan magasabb ROFA pontszám értékeket találtunk az *E. coli* monomikrobiális inokulummal beoltott állatokban a másik kohorsszal szemben. Figyelembe véve az inokulumok elhanyagolható mennyiségi különbségei ellenére kimutatott mikrobiológiai összetételbeli változatosságot, egy retrospektív vizsgálatban azt is felmértük, hogy a két jellemző egyidejű értékelése hogyan befolyásolja a szervi diszfunkciót a szepszis 24. órájában. A CFU és a ROFA-pontszámok közötti kapcsolat hasonló korrelációt mutatott mind a monomikrobiális, mind a polimikrobiális alcsoportban, de a monomikrobiális alcsoport regressziós egyenesének meredeksége nagyobb volt, mint a polimikrobiális alcsoporté; ugyanazon koncentráció súlyosabb lefolyást okozott. Továbbá a ROFA korrelációt mutatott a hasúri folyadék CFU-értékeivel is. A szepszis 12-72 órás időszakában a polimikrobiális vagy monomikrobiális alcsoportokban szignifikáns nem lineáris kapcsolatot azonosítottunk a hasúri folyadék CFU és a ROFA-pontszám között az idő múlásával, a baktériumösszetétel az *E. coli* dominancia irányába történő eltolódása mellett.

4.2. A Study 2 eredményei

4.2.1. Az állatok általános egészségi jóléte és a mortalitás

Az álműtött csoportban nem volt szignifikáns változás az RSS értékekben, míg a 20 és 24 órás szeptikus csoportokban szignifikánsan emelkedtek nemcsak a 12 órás szeptikus csoporthoz képest, hanem a 20 és 24 órás álműtött csoportokhoz képest is. Három állatot termináltunk a kritikus emelkedett RSS miatt ($6 \leq$).

4.2.2. A gyulladás és többszervi elégtelenség markereinek változása

Az IL-6 szignifikánsan emelkedett a szeptikus csoportban az álműtött csoporthoz képest. A legmagasabb érték a 16. órában volt megfigyelhető, majd a 24. órára elérte az álműtött csoport szintjét. A ROFA-paraméterek a szeptikus csoportokban a teljes kísérleti időszak alatt szignifikánsan magasabbak voltak az álműtött állatokhoz képest. A ROFA a 20. órában érte el a maximumát a szeptikus csoportban.

4.2.3. A makrohemodinamikai és oxigéndinamikai paraméterek változásai

Az álműtött csoportban nem volt jelentős hemodinamikai változás az idő előrehaladtával. A szepszist a 16. és 24. óra között szignifikáns hipotenzió jellemezte az álműtött állatokhoz képest. A CO a 16. óráig növekvő tendenciát mutatott, majd a 20. órára jelentősen az álműtött állatok szintje alá csökkent szepszisben. A 16-24 órás intervallumban a CO-értékek jelentősen eltértek a 12 órás csoport értékeihez képest, bár a korábbiakhoz képest negatív irányban. A DO_2 fokozatosan csökkent a szeptikus csoportban, a legalacsonyabb értéket a 20. órában érte el, majd a 28. órára meghaladta az álműtött állatok szintjét. A VO_2 a 16. óra kivételével nem mutatott jelentős változást. Az ExO_2 a 20. óráig emelkedett, amikor a tendencia megfordult, és álműtött állatok szintjére csökkent. A 16-24 órás intervallumban az ExO_2 szignifikánsan eltért a 12 órás szeptikus csoport értékeihez képest.

4.2.4. A mikrokeringési paraméterek változásai

A PPV és az MFI szignifikánsan magasabb volt a 16 és 28 órás intervallum között, az álműtött csoporttal szemben. A HI ugyanezen időszakban szignifikánsan magasabb volt a szeptikus csoportban, és habár ezután csökkenő tendenciát mutatott, a 28. Óráig sem érte el az álműtött állatok szintjét.

4.2.5. A máj mitokondriális paramétereinek változásai

A szeptikus állatok OxPhos és $LEAK_{O_{my}}$ értékei a 20. órában jelentősen csökkentek az álműtött csoporthoz képest. A CytC%, amely az mtOM-károsodást jellemzi, erősen növekvő tendenciát mutatott, a 20. órában elérve a szignifikáns maximumát. Az RCR nem különbözött szignifikánsan a szeptikus állatokban az álműtött állatok értékeihez képest a teljes kísérleti időszak alatt.

4.2.6. Receiver operating characteristic (ROC) görbeanalízis

A ROFA score-t alkotó paraméterek közül csak a teljes vér laktat szintje mutatott jelentős prediktív értéket. A mitokondriális funkciók közül a CytC% erős prediktornak bizonyult. A mikrokeringési változók közül a PPV mutatta a legerősebb prediktív értéket, és mind az MFI, mind a HI különösen magas prediktív értékkel rendelkezett.

4.2.7. Összefüggés az MMD paraméterek és a ROFA score között

Az álműtött csoportokban nem volt szignifikáns korreláció a mikrokeringési-mitokondriális változók és a ROFA között. A PPV és a ROFA között negatív, szignifikáns korreláció, a HI és a ROFA között pedig pozitív, szignifikáns korreláció volt a szeptikus csoportban. A mitokondriális paraméterek és a ROFA között sem volt szignifikáns korreláció. A mitokondriális és mikrokeringési változók között az álműtött állatok között nem volt szignifikáns korreláció. A szeptikus csoportban nem volt szignifikáns korreláció a mikrocirkulációs és az OxPhos változók között, míg negatív,

szignifikáns összefüggés állt fenn a PPV és a CytC% között. A HI és a CytC% azonban szintén mérsékelt, pozitív kapcsolatot mutatott.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. Az indukció bakteriális összetételének szepszis progresszióra gyakorolt hatása

A szepszis számos preklinikai állatmodelljét alkalmazták már, amelyek bizonyos előnyökkel és hátrányokkal rendelkeztek. Eredményeink alapján a széklet injektálással történő indukció standardizált CFU tartomány mellett megfelelő módszernek tűnik. Az általunk meghatározott $1,02 \times 10^6$ – $5,6 \times 10^6$ CFU intervallum jól korrelált a MOF 24 órával későbbi megjelenésével. Ez a CFU tartomány az összesített mortalitás nagyjából 20%-át eredményezte, ami jól modellezi a humán intraabdominális szepszis halálozási arányát. A humán szeptikus esetek körülbelül 60%-át bakteriális fertőzés okozza, és az esetek 46%-ában Gram-pozitív fajok igazolódnak a hemokultúrában. A monomikrobiális forrás ritka a humán szepszisben. A szakirodalom egyetért abban, hogy az *E. coli* az egyik leggyakoribb patogén, és bár a légutak a legfrekvenciáltabb fertőző góc, a hasi eredet is jelentős százalékot tesz ki. Ennek ellenére az endogén vagy exogén mikrobiális források azonosítása általában hiányzik az állatmodellek tervezésénél. Az általunk kifejlesztett szepszis modellben az indukciós baktériumok között az *E. coli* mutatta a legmagasabb gyakoriságot (ezt a *Klebsiella*, a *Pseudomonas* és az *Acinetobacter* követte), ami összhangban áll a klinikai tapasztalatokkal. A Gram-pozitív forrásból származó szepszis azonban rágcsálókban viszonylag ritka, ellentétben a *Staphylococcus aureus* gyakori előfordulásával humán szepszisben. Bemutattuk az indukciós törzsek azonosításának kiemelkedő fontosságát, mivel hozzávetőlegesen a feltételezett polimikrobiális indukciós inokulumok 20%-a monomikrobiálisnak bizonyult (vizsgálatunk szerint csak *E. coli* volt jelen). A klinikai adatok alapján a progresszió elsősorban a kórokozótól és a vizsgált betegpopuláció klinikopatológiai jellemzőitől függ. Metaanalízisükben Karakonstantis és mtsai. arra a következtetésre jutottak, hogy a polimikrobiális szepszisben alacsonyabb a halálozási arány; azonban a tanulmány számos limitációt tartalmazott, és még mindig gyenge klinikai evidenciák vannak ebben a kérdésben.

5.2. Mennyiségi és minőségi bakteriális változások a szepszis progresszió folyamán

Ki kell emelni, hogy minden székletminta esetében kimutatható volt a polimikrobiális tartalomról a monomikrobiális felé történő áttérés. Ezt az átalakulást a hasúri folyadékból is kimutattuk. A túlélő állatokban feltártuk a baktériumtörzsek populációdinamikáját. A polimikrobiális csoportban a hasúri folyadékból detektálható baktériumok csíraszama és diverzitása 24 óra elteltével csökkent, és a leggyakoribb törzs ismét az *E. coli* volt. A másodlagos hashártyagyulladás során azonban idővel egyes törzsek koncentrációja (pl. *Neissera subflavia*) is kimutatható szintre emelkedett. A vizsgálatok végére a törzsek többsége

eltűnt a hasúri folyadékból, és csak az *E. coli* és a *Lactobacillus murinus* volt kimutatható csökkent csíraszámmal a 72 órás mintákban. Az újonnan detektált fajok megjelenése felveti a törzsek közötti kölcsönhatás lehetőségét. Ezen fajok közül a *Lactobacillus*ok a probiotikumok közé tartoznak, és különös jelentőséggel bírnak, mivel jótékony hatást fejtenek ki az emberi szervezetre. Jelenlétük a bél mikrobiota homeosztázisának megőrzéséhez és a gyulladáscsökkentő folyamatok beindításához kapcsolódik, amelyekről úgy gondolják, hogy az általuk termelt metabolitok, mint a rövid szénláncú zsírsavak eredménye. A polimikrobiális indukciót követő magasabb túlélési arány háttérében álló pontos folyamatok nem ismertek, de a baktérium-baktérium kölcsönhatás fontos szerepet játszhat. Tudomásunk szerint vizsgálatunk volt az első, amely kimutatta az *E. coli* monomikrobiális törzsek és a kísérleti szepszis korai mortalitásának összefüggését. A kedvező körülmények között felerősödő természetes szelekció a legvalószínűbb magyarázata a mikrobiális összetétel átalakulás folyamatának.

5.3. A mikrokeringségi és mitokondriális változások feltételezett szerepe a többszervi elégtelenség kialakulásában

Ebben az összeállításban a szepszis által kiváltott mikrokeringségi és mitokondriális válaszok eltérő dinamikáját a teljes szeptikus makrohemodinamikai mintázat jelenlétében észleltük, kompenzációs hiperdinám, dekompenzált hipodinám és végül felépülési szakaszokkal. A mikrokeringségi és mitokondriális károsodás, avagy az MMD, együttes jelenlétét a humán MOF patogenezisének jelentős közrejátszójaként azonosították, de a bél mikrocirkulációjában és a máj mitokondriális funkcióiban bekövetkezett változásokat eddig nem vizsgálták együtt az intraabdominális szepszishoz kapcsolódó MOF-ban. Vizsgálatunk részben megerősíti a szakirodalmat, amely a perfundált kapilláris korai csökkenését és a perfúzió heterogenitásának növekedését mutatja a ROFA megfelelő változásaival. Ennek ellenére a kezdeti mikrokeringségi elégtelenség az idő előrehaladtával javult, mígnem a későbbi szakaszban helyreállt. Fontos, hogy a máj mitokondriális funkciói kapcsán sokkal később volt észlelhető az oxidációs működéshez kapcsolódó paraméterek gyors helyreállása és a légzési lánc tartósan kielégítő kapcsoltsága. A CytC% jelentősen megemelkedett, ami a mitokondriális külső membrán (mtOM) károsodására utal. Az mtOM sérülése az intramitokondriális CytC részleges elvesztéséhez és a mitokondriális VO₂ csökkenéséhez vezet. Nagyfelbontású respirometriát alkalmaztunk az mtOM integritásának meghatározására a mitokondriális légzés exogén citokrom c-vel történő stimulálásával. A CytC% magas diagnosztikai erővel bírt a 28 órás kísérleti időszak teljes időtartama alatt, ami arra utal, hogy megfelelő biomarker lehet a súlyos szepszis kialakulásában. E korreláció ellenére azonban az mtOM-károsodás vagy az OxPhos-változások nem befolyásolták a ROFA értékét. Ki kell emelni, hogy az OxPhos gyors helyreállása a máj mitokondriális légzésének hatalmas tartalékkapacitását

sugallja, ami képesnek látszik kompenzálni a membrán integritásának elvesztését. Megjegyzendő továbbá, hogy a ROFA értékek és a mikrokeringési paraméterek közötti korreláció azt jelzi, hogy a MOF kialakulását elsősorban a mikrovaszkuláris tényezők befolyásolják, és a mikrokeringési változók és az mtOM károsodás közötti korreláció az oxidatív kapacitások átmeneti elvesztése nélkül tovább erősíti az erős mitokondriális megküzdési mechanizmusokat.

Az MMD patogenezeise összetett és még csak részben ismert, de úgy tűnik, hogy mikrovaszkuláris heterogenitás okozta tüneti randomitást az egymáshoz közel eső szöveti területeken lévő eltérő mitokondriális funkciók is fokozhatják. A funkcionális diverzitás a máj mitokondriumainak heterogén ultrastrukturális, biofizikai és elektrokémiai jellemzőiből is adódhatnak, ami a potenciálisan végképp károsodott és túlélő szubpopulációkhoz vezethet. A heterogenitás a mitokondriális életciklusból is származhat, beleértve a biogenezist, a fúziót és a hasadást, valamint a sérült mitokondriumok kiürítésének lehetőségeit. Feltételezzük, hogy a megnövekedett CytC efflux – feltételezhetően a megnövekedett membránpermeabilitás miatt – megelőzte az mtOM károsodással járó degradált mitokondriumok teljes kiürülését, és egy szerkezeti és metabolikusan rugalmasabb és kompenzálóbb szubpopuláció képes volt fenntartani az ATP szintézis zavartalanságát. Ezek a mitokondriumok fenntartói és helyreállítói lehetnek a mikrocirkulációnak és a szöveti integritásnak a későbbi időszakban, amikor a szepszis tünetei enyhülnek.

Vizsgálati protokollunkban a ROFA értéket használtuk a MOF progressziójának követésére a humán klinikai rutinhoz hasonlóan (SOFA), és ezen a sémán belül meg lehetett állapítani a mikrokeringési paraméterek diagnosztikus értékét. A humán gyakorlathoz hasonlóan a vér laktát szintje jelentősen megemelkedett, és a súlyosság erős prediktorának bizonyult, alátámasztva a hipoxia markerek diagnosztikus jelentőségét. A vese- és májelégtelenség markereinek alacsony szérumszintje azonban a „*szeptikus stunning*” lehetőségét veti fel, ami azt sugallja, hogy a szervek „*hipoxiás hibernációval*” készültek fel a várható további inzultusra.

Kísérleti protokollunk lehetőséget adott a szeptikus MMD „Mi volt előbb, tyúk vagy a tojás?” ok-okozati dilemmájának vizsgálatára. Fenti megállapításaink alapján a mikrocirkuláció a MOF koraibb prediktora a mitokondriális légzéshez képest. Konkrét paraméterekkel igazoltuk, hogy a mikrokeringési vagy mitokondriális funkcionális károsodás a szepszis lefolyásától és a kompenzációs mechanizmusoktól függően különböző időpontokban fordul elő, és a nem megfelelő monitorozási idők megválasztása téves következtetésekhez vezethetnek. A MOF progressziójának nyomon követésével eredményeink rávilágítanak a mikrovaszkuláris oxigénellátás dinamikájára, így jobb esélyt biztosítanak a diagnosztikai és terápiás erőfeszítések megfelelő időzítésére.

6. ÖSSZEFOGLALÁS ÉS ÚJ EREDMÉNYEK

- 1) Optimalizáltuk a széklet szuszepnzio által kiváltott intraabdominális szepszis patkánymodelljét a csíraszám és az inkubációs idő szempontjából.
- 2) Adataink azt mutatják, hogy a hasüregben lévő indukáló és kolonizáló baktériumok típusa jelentősen befolyásolja a prognózist. Ez azt jelzi, hogy a szepszis modell megalkotásakor mikrobiológiai elemzésre van szükség.
- 3) Az eredmények kompetitív intraperitoneális bakteriális folyamatok jelenlétére utalnak, ami bizonyos domináns törzsek relatív prevalenciájának növekedéséhez vezet, ami magyarázhatja a különböző súlyosságú szepszis kialakulását is.
- 4) Az MMD és a szervi funkciók károsodásának együttes analízise kimutatta, hogy ezek a változások vagy párhuzamosan zajlanak vagy a MOF potenciális patofiziológiai alapjait képezik. Ebben az összefüggésben meg kell jegyeznünk, hogy az ileális mikrovaszkuláris perfúziós elégtelenség korábban jelentkezik, és magasabb prediktív értékkel rendelkezik a szeptikus MOF tekintetében, mint a máj mitokondriális funkcionális változásai. Ezek az eredmények a modell transzlációs erejét fokozzák, mivel olyan mechanizmusokat tárnak fel, amelyek a humán szepszis patofiziológiájában is relevánsak lehetnek.
- 5) A máj mitokondriális funkciói viszonylag gyorsan helyreállnak, ami potenciálisan jelezheti a szöveti hipoxiára eltérő érzékenységet mutató mitokondriális szubpopulációk létezését.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki **Boros Mihály Professzor Úrnak**, a Sebészeti Műtéttani Intézet korábbi vezetőjének. Hálás vagyok a bátorításáért, és köszönöm neki, hogy lehetőséget adott tudományos pályafutásom megkezdésére az Intézetben és kutatásaim elvégzésére. Külön köszönettel tartozom témavezetőimnek és mentoraimnak, **Kaszaki József Tanár Úrnak** és **Tallósy Szabolcs Péternek**, hogy útmutatást és támogatást nyújtottak a kísérleti készségek elsajátításában. Kemény és szigorú tanárok voltak, de mindig igazságosak és támogatók. Munkám során bármilyen kérdésben mindig számíthattam rájuk. Folyamatos ösztönző útmutatásuk nélkül aligha valósulhatott volna meg a doktori értekezésem. Köszönettel tartozom a **Szegedi Tudós Akadémia** programjának, amely 2015-2021 között támogatott, és lehetőséget biztosított számomra, hogy csatlakozzam a Sebészeti Műtéttani Intézet kiváló csapatához. Az éves auditok ösztönöztek, hogy következetesen törekedjek a sikeres és előremutató munkára. Köszönettel tartozom továbbá kutatócsoportunk jelenlegi és volt munkatársainak, **Juhász Lászlónak**, **Rutai Attilának**, **Poles Mariettának** és **Kiss Liliánának**, hogy segítették és értékes munkájukkal hozzájárultak a munkánk tudományos értékének növeléséhez. tézis. Ki kell emelnem **Szabó Andrea** értékes útmutatásait. Nagyon nagyra értékelem nagylelkű segítségét a *Study 1* eredményeinek publikálásában és a disszertációm elkészítésében. Köszönettel tartozom a **Szegedi Tudományegyetem Orvosi Mikrobiológiai Intézet Oktatói Kutatói Centrum** munkatársainak a kvalitatív és kvantitatív mikrobiális mérésekben nyújtott segítségükért és támogatásukért, valamint **Tallósy Szabolcs Péternek**, hogy összekötő szerepet játszott a két intézet között. Munkájuk nélkül a *Study 1* soha nem valósult volna meg. Mindenekelőtt szeretném megköszönni **családomnak**, **édesanyámnak**, **édesapámnak** és **páromnak** a támogatást és a türelmet. Nélkülük soha nem tudtam volna elérni a céljaimat.

Források: A munkát és a publikációkat az NKFIH K116689, GINOP-2.3.2-15-2016-00034, GINOP-2.3.2-15-2016-00015, valamint EFOP-3.6.2-16-2017-00006 támogatások segítették. A kutatás a Szegedi Orvosbiológiai Kutatások Jövőjéért Alapítvány által lebonyolított Szegedi Tudós Akadémia Program támogatásával, az Emberi Erőforrások Minisztériuma szervezésével (EMMI:13725-2/2018/INTFIN) készült.