

**A mikrokeringési - mitokondriális reszuszcitáció lehetőségei új  
gyulladáscsökkentő terápiákkal kísérletes szepszisben**

**Rutai Attila**

**Ph.D. Tézis**

**Szegedi Tudományegyetem – Általános Orvostudományi Kar  
Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola  
Sebészeti Műtéttani Intézet**

**Témavezető:  
Dr. Kaszaki József**

**Szeged**

**2021**

## 1. BEVEZETÉS

Szepszis során a fertőzésre adott diszregulált válaszreakció életet veszélyeztető állapothoz vezethet, a regulációs zavart az oxigénszállítás ( $DO_2$ ) és az oxigénfogyasztás ( $VO_2$ ) közötti aránytalanság, valamint sejtszintű oxigén extrakciós ( $ExO_2$ ) elégtelenség kíséri (Singer et al. 2016). A károsodott mikrokeringés következtében csökken a szövetek felé történő oxigénszállítás, míg a mitokondriális elektrontranszport rendszer (ETS) működési elégtelensége miatt az oxigénfelhasználás hatékonysága sérül. Ezek a folyamatok szorosan kapcsolatosak egymáshoz és végül mikrokeringési-mitokondriális distressz szindrómához (MMDS) vezetnek, amely kulcsszerepet játszik a szeptikus többszervi elégtelenség (MOF) kialakulásában (Spronk et al. 2014).

A szepszis kísérletes modelljei alkalmasak lehetnek a humán terápiák teszteléséhez, de a laboratóriumi körülmények között hatékonynak bizonyuló terápiás eljárások nem mindig ültethetők át közvetlenül a klinikai gyakorlatba. A preklinikai vizsgálatok translációs értékét megfelelően megalapozott irányelvek erősítik, így a „Minimum Quality Threshold in Preclinical Sepsis Studies” (MQTiPSS) kritériumok meghatározzák a rágszálókon végzett szepszis vizsgálatok tervezésének és kivitelezésének jelenleg elfogadott rendszerét is (Osuchowski et al. 2018). Ugyanakkor az ajánlások mellett elengedhetetlen a szeptikus inzultusra adott válaszreakció dinamikájának figyelembevétele, amely alapján meghatározható egy időablak, ahol a humán szepszishez leginkább hasonló változások figyelhetők meg.

A szepszis által kiváltott MOF adekvát kezelése az intenzív osztályok egyik legnagyobb kihívása, a légzés- és a keringés-támogató terápiák nem mindig alkalmasak a kór állapot hatékony befolyásolására (Armstrong et al. 2017). Az utóbbi években a mikrokeringés és a mitokondriumok közötti kétirányú kölcsönhatás került a figyelem középpontjába, és egyre nyilvánvalóbbá vált, hogy az MMDS mechanizmusok alapvetően különböznek a makrohemodinamikai változások kialakulásában szerepet játszó folyamatoktól. A szepszis kórtanában részt vevő számos mediátor közül a hipoxia-érzékeny endotelin (ET) rendszer fontos szerepet játszik a keringés szabályozásában, a vazokonstriktor  $ET_A$  és  $ET_{B2}$ , valamint a vazodilatátor  $ET_{B1}$  receptorokon ( $ET_{A-R}$ ;  $ET_{B1-R}$ ) keresztül (Brooks et al. 1995). Emellett, a triptofán-katabolizmus kynurenin-útvonalának egyik metabolitja, a kinurénsav (KYNA) pleiotróp sejtprotektív hatásának bizonyult gyulladásozó állapotokban (Vécsei et al. 2013). A fentiek alapján feltételeztük, hogy az ET rendszer receptorainak modulációja,

vagy KYNA és analógjainak alkalmazása kísérletes körülmények között potenciális terápiás hatással bírhat a szepszis által kiváltott MMDS-re.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

A tézis fő célja új gyulladáscsökkentő terápiák vizsgálata a szeptikus reakció során kialakuló mikrokeringési elégtelenséggel összefüggő oxigénadósság és energiadeficit csökkentésére. Hipotézisünk szerint az ET vagy a KYNA rendszer kísérletes manipulálása hatékony eljárás lehet a szepszis-indukált MMDS és szervkárosodás kezelésére. Ezek alapján célkitűzéseink a következők voltak:

- Új intraabdominális szepszis rágcsálómodell megtervezése és jellemzése a terápiás stratégiák vizsgálatához. Célunk a szeptikus reakció időbeli lefolyásának jellemzése volt, a humán kórállapotot leginkább tükröző optimális kezelési időpont meghatározásához.
- Az  $ET_A$ -R és  $ET_{B1}$ -R moduláció hatásainak vizsgálata a mikrokeringés és a mitokondriális respiráció helyreállítására. Célunk volt továbbá az  $ET_A$ -R antagonizmus és a szelektív  $ET_{B1}$ -R aktiválás egyedi és kombinált hatásainak tisztázása.
- A KYNA és a szintetikus analógja, az SZR-72 terápiás hatékonyságának vizsgálata a mikrokeringési és mitokondriális zavarok csökkentésére.

A fentiek alapján megvizsgáltuk a mikrokeringés és a mitokondriális funkció közötti kapcsolatot, valamint a célzott mikrokeringési-mitokondriális reszuszcitáció hatékonyságát a szepszis klinikailag releváns rágcsáló modelljében.

## 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A vizsgálatokat három kísérletsorozatban végeztük intraabdominális szepszis modellben (hím Sprague Dawley patkányok;  $350 \pm 30$  g;  $n_{\Sigma}=187$ ). Az 1. tanulmányban a meghatároztuk a szepszis progresszió klinikai szempontból legrelevánsabb időszakát. A 2. és 3. tanulmányban makro- mikrokeringési, valamint mitokondriális és biokémiai változásokat vizsgáltunk. A 2. tanulmányban az  $ET_A$ -R és  $ET_B$ -R célzott kezeléseket, míg a 3. tanulmányban az NMDA-R antagonista KYNA és szintetikus analógjának, az SZR-72 hatásait vizsgáltuk.

### *3.1 Szepszis indukció, monitorozás és sebészi instrumentáció*

Patkányokban fekális peritonitist (0,6 g/kg fécesz; ip.) indukáltunk, míg az álműtött csoportok ip. steril fiziológias sóoldatot kaptak. A kísérleti állatok általános állapotát mindhárom vizsgálatban standardizált pontrendszer segítségével értékeltük. A pontozással

egyidőben minden állat folyadékpótlásban és fájdalomcsillapító kezelésben részesült. A szepszis indukciót követően, előre meghatározott időpontban az állatokat elaltattuk. A spontán légzés biztosítása érdekében tracheostomiát végeztünk, valamint kanüláltuk a jobb oldali *v. jugularis*-t a fenntartó altatáshoz, a kezelésekhez valamint a folyadékpótláshoz. A bal oldali *a. carotis*-t kanüláltuk az artériás középnyomás (MAP) és a szívfrekvencia (HR) monitorozásához. A 2. tanulmányban a perctérfogat (CO) méréséhez a jobb oldali *a. carotis*-ba termisztor katétert vezetünk (SPEL Advanced Cardiosys 1.4, Experimetria Ltd., Budapest).

### **3.2 Kísérleti protokollok**

#### ***A szepszis indukció hosszú távú hatásainak követése az 1. tanulmányban***

Az állatokat véletlenszerűen álműtött ( $n_{\Sigma} = 49$ ) és a szeptikus csoportba ( $n_{\Sigma} = 51$ ) osztottuk, amelyeket további négy (12, 24, 48 és 72 óras) független csoportra osztottunk (álműtött:  $n_{12h} = 13$ ,  $n_{24h} = 12$ ,  $n_{48h} = 12$ ,  $n_{72h} = 12$ ; szeptikus:  $n_{12h} = 13$ ,  $n_{24h} = 13$ ,  $n_{48h} = 13$ ,  $n_{72h} = 12$ ), a terminálás időpontjainak megfelelően. Az invazív monitorozást 12, 24, 48 és 72 óra elteltével végeztük, valamint vérmintákat vettünk a szeptikus reakció időfüggő vizsgálata céljából.

#### ***Kezelési protokoll és invazív monitorozás a 2. tanulmányban***

A kísérleti állatokat véletlenszerűen ( $n_{\Sigma}=55$ ) álműtött ( $n=10$ ) és szeptikus csoportokba ( $n=45$ ) osztottuk. Az altatás indukcióját, a sebészi instrumentálást és a 30 perces stabilizációs időszakot követően 90 percen keresztül 30 percenként MAP, HR és CO monitorozást végeztünk. A szeptikus állatokat véletlenszerűen négy csoportra osztottuk. Az 1. a kezeletlen szepszis csoport, ahol az állatok vivőanyagot (1 ml sóoldat) kaptak ( $n=13$ ). A 2. és 3. az  $ET_A$ -R antagonistá ETR-p1/fl peptiddel (100 nmol/kg/h; Kurabo Ltd., Osaka, Japán;  $n=11$ ) (Baranyi et al. 1995), vagy szelektív  $ET_{B1}$ -R agonista IRL-1620-al (0,55 nmol/kg/h; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA;  $n=11$ ) (Brooks et al. 1995) kezelt szepszis csoportok. A 4. szeptikus csoport ugyanezen dózisokban kombinált  $ET_A$ -R antagonistá és az  $ET_{B1}$ -R agonista kezelésben részesült ( $n=10$ ). Minden kezelést folyamatos, 60 perces iv. infúzióban, 1 ml térfogatban adtuk.

#### ***Kezelési protokoll és invazív monitorozás a 3. tanulmányban***

A kísérleti állatokat ( $n_{\Sigma}=32$ ) véletlenszerűen álműtött ( $n=8$ ) és szeptikus ( $n=24$ ) csoportokra osztottuk. A szeptikus állatokat véletlenszerűen KYNA, (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, Mo., USA; 160  $\mu$ mol/kg ip;  $n=8$ ), vagy SZR-72 (2-(2-N,N-dimetil-aminoetil-aminoil-amin-

1-karbonil)-1H-kinolin-4-on-hidroklorid, SZTE Gyógyszerkémiai Intézet által szintetizálva; 160  $\mu\text{mol/kg}$  ip; n=8), illetve vivőanyaggal kezelt (sóoldat ip; n=8) alcsoportokba osztottuk. A kezeléseket két lépésben végeztük (lépésenként 80  $\mu\text{mol/kg}$ ; 1 ml/kg sóoldatban) 16 és 22 órával a szepszis indukciója után. A műtétet és a 30 perces stabilizációs időszakot követően MAP-ot és HR-t monitoroztunk 15 percenként 60 perces megfigyelési időszakon keresztül.

### ***3.3 Mikrokeringés mérések a 2. és 3. tanulmányban***

A megfigyelési időszakot követően az ileum serosa rétegének mikrokeringését intravitalis videomikroszkóppal vizsgáltuk. A 2. tanulmányban ortogonális polarizációs spektrális (OPS) képalkotó technikát alkalmaztunk (Cytoscan A/R, Cytometrics, Philadelphia, PA). A vörösvértestek sebességének (RBCV) és a kapilláris perfúziós ráta (CPR; perfundált/nem perfundált terület) kvantitatív értékelését számítógépes képelemző rendszerrel (IVM Pictron, Budapest, Magyarország) offline végeztük. A 3. tanulmányban incident dark field (IDF) képalkotó rendszert alkalmaztunk. A serosa mikrokeringés felvételeit CytoCam videomikroszkóppal (Braedius Medical, Huizen, Hollandia) készítettük, míg a perfundált erek arányát (PPV) és a mikrovaszkuláris heterogenitást (MVH) off-line, automatizált értékelőrendszerrel (AVA 3.0, Automated Vascular Analysis, Academic Medical Center, University of Amsterdam) számszerűsítettük.

### ***3.4 Metabolikus, gyulladással és szervfunkciós markerek vizsgálata.***

A mikrokeringési méréseket követően májszövet mintát vettünk mitokondriális oxigénfogyasztás mérések céljára. Biokémiai mérésekhez vénás vérmintát, valamint a terminális ileumból szövetmintát vettünk. A szövetmintavételeket követően az állatokat altatásban termináltuk. A szisztémás metabolizmus állapotának vizsgálatához teljes vénás vérből laktát szinteket mértünk (Accutrend Plus Kit, Roche Diagnostics Ltd., Rotkreuz, Svájc). A plazma ET-1 és IL-6 szintjét standard ELISA módszerrel (Biomedica Ltd., Bécs, Ausztria; Cusabio Biotechnology Ltd., Wuhan, Kína) határoztuk meg a gyártó utasításainak megfelelően. A vesekárosodást a plazma urea szintjéből, míg a májdiszfunkciót a plazma alanin-aminotranszferáz (ALT) szintjének mérésével határoztuk meg, Roche/Hitachi 917 analizátorral (F. Hoffmann-La Roche AG, Svájc).

### ***3.5 Patkány szervkárosodási pontrendszer alkalmazása***

A szervkárosodások (szív- és érrendszeri, légzés-, máj- és veseelégtelenség) súlyosságát patkányokra adaptált pontozási rendszer (rat organ failure assessment - ROFA) segítségével

határoztuk meg. A ROFA-értékeket a pontozási rendszer határértékeinek alapján adott pontok összegzésével határoztuk meg.

### ***3.6 Az ileum xantin oxidoreduktáz (XOR) aktivitás és a nitrotirozin szintjének vizsgálata***

A 3. tanulmányban fagyasztott ileum szövetmintákból fluorometriás módszerrel XOR aktivitást határoztuk meg. A szabad nitrotirozin szinteket ugyanezen szövetmintákból standard ELISA módszerrel (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) detektáltuk.

### ***3.7 A mitokondriális respiráció vizsgálata májhomogenátumokban***

A 2. és 3. tanulmányban a mitokondriális O<sub>2</sub> fogyasztást májhomogenátumokból nagyfelbontású respirometriával (Oxygraph-2k; Oroboros Instruments, Innsbruck, Ausztria) vizsgáltuk. A méréseket 37°C-on, Mir05 respirációs médiumban végeztük. A stabil alaplégzést követően (exogén szubsztrát és ADP nélkül) meghatároztuk a I. (CI) és II. (CII) komplex függő oxidatív foszforiláció kapacitását (OXPHOS), valamint a respiráció és a foszforiláció közötti kapcsolatot jellemző respirációs kontroll hányadost (RCR). Az online megjelenítéshez, a respirometriás adatgyűjtéshez és elemzéshez DatLab szoftvert (Oroboros Instruments, Innsbruck, Ausztria) használtuk.

### ***3.8 Statisztikai analízis***

Az adatok statisztikai elemzését SigmaStat statisztikai szoftvercsomaggal végeztük (SigmaStat for Windows, Jandel Scientific, Erkrath, Németország). Az adatok eloszlásának normalitását Shapiro-Wilk teszttel elemeztük. A csoportokon belül a Friedman próbát alkalmaztunk, Dunn post hoc teszttel. A csoportok közötti különbségeket a Kruskal-Wallis próbával vizsgáltuk, Dunn post hoc teszttel. Szignifikáns változásnak a <0,05 P-értékeket tekintettük.

## **4. EREDMÉNYEK**

### ***4.1 Az oxigén extrakció és a plazma ET-1 szintjének időbeni változásai az 1. tanulmányban***

Az ExO<sub>2</sub> értékekben az álműtött és a szeptikus csoportok között 12 óránál nem volt szignifikáns változás, azonban a szeptikus állatok esetében csökkenést tapasztaltunk 24 órával a szeptikus inzultus követően. A 48. és 72. órában a szeptikus csoport ExO<sub>2</sub> értékei alacsonyabbak voltak, amely változás jelzi, hogy az oxigénszállítás nem fedezte teljes mértékben a szöveti oxigénigényt. Ez a csökkenés a későbbi időpontok esetében nem volt szignifikáns mértékű. A plazma ET-1 koncentrációja a szepszis indukciót követő 24. óránál szignifikánsan emelkedett.

#### **4.2 A 2. tanulmány eredményei - hemodinamikai változások**

A megfigyelési időszak alatt az álműtött csoportban szignifikáns hemodinamikai változást nem tapasztaltunk. A szepszis azonban szignifikáns hipotenzióval, emelkedett CO-val és a perifériás ellenállás (TPR) csökkenéssel járt együtt. A vivőanyaggal kezelt szeptikus csoporthoz képest az ETR-p1/fl kezelés esetében nem figyeltünk meg hemodinamikai hatást, azonban a 90 perces obszervációs időszak alatt az IRL-1620 szignifikánsan növelte a MAP és a TPR illetve csökkentette a CO értékeket. Az ET<sub>A</sub>-R antagonizmus és az ET<sub>B1</sub>-R agonizmus kombinációja a MAP és a TPR értékek szignifikáns emelkedését eredményezte a saját kiindulási, valamint a vivőanyaggal kezelt szeptikus csoport megfelelő értékeihez képest.

#### **4.3 Oxigén dinamikai változások**

A szepszis 24 órás progressziója jelentős oxigéndinamikai változásokat eredményezett, amely az álműtött csoporthoz képest növekvő DO<sub>2</sub>, csökkenő VO<sub>2</sub> és ExO<sub>2</sub> értékekben, valamint a PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> arány romlásában nyilvánult meg. A szeptikus állatokban a tüdőkárosodást jelző szignifikánsan csökkent PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>-arány volt jellemezhető, amelyre az ETR-p1/fl és az IRL-1620 kezelés nem volt hatással. Az ETR-p1/fl kezelést követően a VO<sub>2</sub> és az ExO<sub>2</sub> értékek szignifikánsan magasabbak voltak, a sóoldattal kezelt szeptikus csoporthoz képest. Az IRL-1620 kezelés hatására az ExO<sub>2</sub> szignifikáns növekedése volt megfigyelhető a sóoldattal kezelt szeptikus csoporthoz képest. A kezelések kombinálása az oxigéndinamikai paraméterek nem szignifikáns, tendenciózus javulását eredményezték a vivőanyaggal kezelt szepszis csoporthoz képest.

#### **4.4 Metabolikus és szervkárosodási változások**

A plazma ALT aktivitása és urea szintjei az álműtött állatokhoz képest szignifikánsan magasabbak voltak a vivőanyaggal kezelt szeptikus csoportban, amelyet az ETR-p1/fl és az IRL-1620 kezelés nem befolyásolt. A kombinált ET<sub>A</sub>-R antagonista és ET<sub>B1</sub>-R agonista kezelés esetében azonban a plazma ALT szintjei a vivőanyaggal kezelt szeptikus csoporthoz képest szignifikánsan alacsonyabbak voltak. Hasonlóképpen szignifikánsan emelkedett laktát szinteket mértünk a vivőanyaggal kezelt szeptikus csoportban. Az ETR-p1/fl, valamint a kombinált kezelés hatására a laktát értékek az álműtött csoport szintjére csökkentek.

#### ***4.5 Mikrokeringési változások***

A 24 órás szepszis progresszió jelentős mikrocirkulációs zavarokat okozott az ileum serosa rétegében. Szepszis hatására a CPR 55%-kal, míg a RBCV megközelítőleg 60%-kal volt alacsonyabb az álműtött csoport állataihoz képest. A vivőanyaggal kezelt szeptikus csoporttal összehasonlítva az ETR-p1/fl terápia jelentős javulást okozott a CPR-ben, azonban az RBCV-re nem volt hatással. Az IRL-1620 kezelés enyhe, nem szignifikáns perfúzió javulást okozott, az RBCV befolyásolása nélkül. A kombinált ETR-p1/fl és IRL-1620 kezelés azonban hatékonyan javította mindkét mikrokeringési paramétert.

#### ***4.6 Változások a gyulladási markerekben***

A szeptikus állatok plazma IL-6 és ET-1 értékei az álműtött csoporthoz képest magasabbak voltak. Az IRL-1620 nem befolyásolta a szepszis által kiváltott IL-6 és ET-1 emelkedést, azonban az ETR-p1/fl és a kombinált terápia szignifikánsan csökkentette a szepszis által kiváltott plazma ET-1 emelkedést és az IL-6 értékeket.

#### ***4.7 A mitokondriális respiráció és membrán integritás változásai***

Az intraabdominális szepszis az álműtött csoporthoz képest szignifikánsan csökkentette a szubsztrát oxidációt. A vivőanyaggal kezelt szeptikus csoporttal összehasonlítva az ET<sub>A</sub>-R antagonistá és az ET<sub>B1</sub>-R agonista terápia tendenciózusan növekvő oxigénfogyasztás eredményezett, amely változás a kombinált terápia esetében statisztikailag is szignifikáns volt. A szeptikus inzultus következtében mind az OXPHOS kapacitás, mind az RCR-értékek az álműtött állatokhoz képest szignifikánsan alacsonyabbak voltak. A vivőanyaggal kezelt szeptikus csoporttal összehasonlítva az ETR-p1/fl kezelés megőrizte mind a CII RCR, mind a CII OXPHOS értékeket, valamint növekvő tendencia volt megfigyelhető a CI-hez kapcsolt respirációban is. Az IRL-1620 kezelés enyhe, nem szignifikáns javulást eredményezett a CI- és CII kapcsolt OXPHOS kapacitásban. A kombinált kezelés hatására a CI- és CII kapcsolt OXPHOS, valamint az RCR értékek is szignifikánsan javulást mutattak. A vizsgált exogén citokróm c alapján a szeptikus inzultus a külső membrán szignifikáns dezintegrációját eredményezte, azonban kombinált kezelés esetében a membrán integritás megőrzött volt.

#### ***4.8 A 3. tanulmány eredményei - hemodinamikai és oxigén dinamikai változások***

A szepszis a megfigyelési időszak alatt szignifikáns hipotenziót eredményezett, amelyet egyik kezelés sem volt képes befolyásolni. Az álműtött csoport állataihoz képest csökkent PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> arányt figyeltünk meg a vivőanyaggal kezelt szepszis esetében, míg a többi



csoporthoz képest nem találtunk szignifikáns eltérést. A szepszis az álműtött csoporthoz képest csökkentette az ExO<sub>2</sub> értékeket, míg a KYNA és az SZR-72 kezelés is szignifikáns javulást eredményezett.

#### ***4.9 Metabolikus és szervdiszfunkciós markerek változásai***

A vivőanyaggal kezelt szepszis csoportban a plazma urea szintje szignifikánsan emelkedett volt, azonban mindkét kezelt csoportban esetében az álműtött csoport szintjén maradt. A hepatocelluláris károsodás jól megfigyelhető volt a vivőanyaggal és az SZR-72-vel kezelt csoportokban, míg az álműtött és a KYNA-kezelt csoportok között nem volt különbség. Az álműtött csoporthoz képest a teljes vér laktát értékek valamennyi szeptikus csoportban hasonló mértékben megemelkedtek. A ROFA pontszámok az álműtött csoportokhoz képest szignifikánsan magasabbak voltak a vivőanyaggal és az SZR-72-vel kezelt szeptikus csoportokban. A KYNA-val kezelt csoport ROFA pontértékei nem különböztek szignifikánsan az álműtött csoport értékeitől.

#### ***4.10 Gyulladásos és oxidatív/nitrozatív stressz markerek változásai***

A szepszis indukció az ET-1, IL-6, a nitrotirozin szintjének és a XOR-aktivitásnak jelentős emelkedését eredményezte. Ugyanezek a paraméterek azonban mind a szepszis+KYNA, mind a szepszis+SZR-72 csoportokban az álműtött csoport szintjén maradtak.

#### ***4.11 Mikrokeringési változások***

A szeptikus mikroperfúziós zavarok az álműtött csoporthoz képest alacsonyabb kapilláris perfúziós értékében és a perfúziós heterogenitás növekedésében nyilvánultak meg. Ezekben a paraméterekben a szepszis és a szepszis+SZR-72 csoportok, valamint az álműtött és a szepszis+KYNA csoportok értékei között nem találtunk különbséget.

A KYNA kezelés az SZR-72 kezeléshez képest szignifikánsan hatékonyabbnak bizonyult a szeptikus mikrokeringési károsodás mérséklésében.

#### ***4.12 Mitokondriális respirációs változások***

A külső szubsztrát hozzáadása nélküli alap respiráció illetve a CI- és CII-hez kapcsolt szubsztrát oxidációt követő respiráció is szignifikáns csökkenést mutatott szepszisben. A KYNA kezelés ezeket a paramétereket nem befolyásolta. Az SZR-72-vel történő kezelés azonban megőrizte a NADH- és FADH<sub>2</sub> szubsztrátokhoz kötött, és az azoktól független mitokondriális respirációt. Ezenkívül, a szepszis szignifikánsan csökkentette a CI- és CII-hez kötött OXPPOS-t. A KYNA és az SZR-72 kezelés növelte a CII-hez kötött OXPPOS kapacitást, míg az SZR-72 teljesen visszaállította a CI-hez kötött OXPPOS-t. A szeptikus

inzultus következtében a CI RCR és a CII RCR értékek jelentősen csökkentek, amelyeket a KYNA kezelés szignifikánsan javított, az SZR-72 kezelés pedig teljesen kivédett.

## 5. MEGBESZÉLÉS

### ***5.1 A szepszis kórtanának áttekintése patkánymodellünkben - a szepszis által kiváltott szervi elégtelenség értékelése***

Kísérleteink kivitelezése során, az MQTiPSS irányelveknek megfelelően fájdalomcsillapítást, folyadékpótlást, testhőmérséklet ellenőrzést és humánus végpontokat alkalmaztunk (Osuchowski et al. 2018). Az 1. tanulmányban a gyulladáso- és immunreakció a plazma ET-1 szintjének markáns, időfüggő emelkedésében és csökkenő ExO<sub>2</sub>-ben nyilvánult meg. Ezek a változások a szepszis indukcióját követő 24 órában voltak a legkifejezettebbek, ami arra enged következtetni, hogy a modellben a válaszreakció ennél az időpontnál a legsúlyosabb. Ezeket az eredményeket alapul véve a kezelések hatásának vizsgálatát, az indukciót követő 24. órához időzítettük. A kialakuló szervkárosodásokat az általunk kifejlesztett ROFA pontozási rendszerrel jellemeztük. A szív- és érrendszer, tüdő, vese és májfunkciós paraméterek numerikus értékei megfelelően jelezték a szeptikus állapotot.

#### ***A mikrokeringés szerepe***

A szepszis terápiája során az egyik alapvető cél a szöveti perfúzió és a szubcelluláris oxigénfelhasználás helyreállítása (Balestra et al. 2009). A mikrokeringés vazodilatációval történő manipulációja alkalmas lehet a zárt mikrokeringés újbóli megnyitására, és ezáltal a szöveti oxigénellátás és felhasználás közötti egyensúly helyreállítására. A szakirodalomban a vazodilatációs terápiákkal kapcsolatos tanulmányok azonban meglehetősen ellentmondásos eredményeket közölnek (Boerma et al. 2010; Trzeciak et al 2014). Ideális esetben a szepszis terápia a szisztémás töltőnyomás emelésével párhuzamosan képes az elégtelen mikrokeringés vazodilatációval történő megnyitására.

#### ***A mitokondriumok jelentősége***

Számos szepszis modellben kimutatták, hogy az oxigénfelhasználási zavar hátterében leginkább mitokondriális diszfunkció áll. Ezekben a vizsgálatokban a szeptikus inzultust követően a szubsztrát- és ADP-stimulált mitokondriális respiráció, valamint az RCR szignifikáns csökkenése volt megfigyelhető (Arulkumaran et al. 2016). Szeptikus állatok esetében, az exogén citokrom c adást és OXPHOS stimulációt követő oxigénfogyasztás növekedés a mitokondriális külső membrán sérülésére enged következtetni (Bar-Or et al.

2018). A membránintegritás megszűnése hozzájárulhat az ETS csökkent ADP-ATP konverziójához, és az alacsonyabb RCR értékek kialakulásához. A szignifikánsan emelkedett laktát szintek alapján a mitokondriális oxidatív foszforilációról a glikolízisre történő metabolikus átállás következett be (Bkaily et al. 2008). Az ATP-termelés O<sub>2</sub>-független glikolitikus útvonalát korábban már leírták, azonban szepszis során ez az alternatív útvonal vélhetően nem képes a megfelelő energiatermelés biztosítására. Mindezen a folyamatok egymással szorosan összefüggve, együttesen vesznek részt a szepszis progressziójában, és a MOF kialakulásában.

## ***5.2 Endotelin receptor célzott terápiák a szepszisben. A kezelések keringési hatásai***

### ***Az ET-A receptor antagonistá kezelési hatásai***

Megvizsgáltuk az ET<sub>A</sub>-R antagonizmus hatását a makro- és mikrohemodinamikára, valamint a celluláris energiatermelő mechanizmusok fő komponenseire. Az ETR-p1/fl hatékonyan javította az oxigéndinamikát, a splanchnikus mikrocirkulációt, valamint tendenciózus javulást eredményezett a ROFA értékekben. Az ET<sub>A</sub>-R szelektív antagonizmusa gyulladáscsökkentő hatásának bizonyult, továbbá keringési sokk és szepszis korábbi vizsgálataiban már kimutatták az ET<sub>A</sub>-R antagonizmus potenciálisan kedvező vazodilatatív hatását (Gulati et al. 2016).

### ***Az ET-B receptor agonista kezelési hatásai***

Az IRL-1620 kezelés a hipotenzív szeptikus állatokban szisztémás nyomásválaszt, a teljes perifériás rezisztencia növekedését, az oxigéndinamika és az ileum kapilláris perfúziójának javulását eredményezte. Az ET<sub>B</sub>-R agonizmus vazodilatációhoz köthető kedvező hatásait már perifériás és központi idegrendszeri rendellenességekben is leírták (Gulati et al. 2016; Matsuura et al. 1996). Az IRL-1620 beadása szövet-dependens módon vazodilatációhoz illetve vazokonstriktációhoz vezet; a MAP rövid, átmeneti csökkenését eredményezi, amit egy hosszan tartó nyomásemelkedés követ (McMurdo et al. 1994). Az ET<sub>B</sub>-R-ok két funkcionális altípusa létezik: az ET<sub>B1</sub>-R-okat a vaszkuláris endothél sejtek expresszálják és nitrogén monoxid függő vazodilatációt mediálnak, míg az ET<sub>B2</sub>-R-ok hosszan tartó vazopresszor hatásúak, valószínűleg a domináns ET<sub>A</sub>-R-aktivitásnak köszönhetően. Egyedül az ET<sub>B1</sub>-R IRL-1620 szenzitív, míg az ET<sub>B2</sub>-R inszenzitív (Brooks et al. 1995). Az IRL-1620 CPR növelő hatása valószínűleg a lokális vazodilatációval és a szisztémás töltőnyomás emelésével magyarázható.

### ***Kombinált ET-A receptor antagonistá és ET-B receptor agonista terápia hatásai***

A kombinált terápia az oxigéndinamikai egyensúly, valamint a mikrokeringési paraméterek javítása révén hatékonyan egyesítette az ETR-p1/fl és az IRL-1620 kezelések előnyeit. A kezelés hatására a szervi diszfunkciót jelző paraméterek szignifikánsan mérséklődtek, így a kombinált ET<sub>A</sub>-R antagonistá és ET<sub>B1</sub>-R agonista terápia elérte célját. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy mikrokeringési elégtelenség esetén a vazokonstriktor ET<sub>A</sub>-R-ok specifikus inaktiválása felerősítheti a keringő ET-1 ET<sub>B</sub>-R-okon keresztüli vazomodulációs hatását, ami szubcelluláris szinten potenciálisan kedvező hatású. Az ETR-p1/fl az ET<sub>A</sub>-R intramolekuláris komplementer peptidje, amely képes keringésben lévő ET-1 specifikus megkötésére és blokkolására. Ezenkívül, az ET<sub>B1</sub>-R aktiválása serkenti a keringő ET-1 clearance-t, ami szintén az ET-1 szintjének csökkenését eredményezi (Davenport et al. 2016; Baranyi et al. 1998).

### ***Az endotelin receptor célzott terápia mitokondriális hatásai***

Az ET<sub>A</sub>-R antagonistá kezelés megemelte a csökkent szubsztrát oxidációt és OXPHOS kapacitást, javította a respiráció és a foszforiláció közötti kapcsolatot, valamint mérsékelte a külső membrán funkcionális károsodását. A közelmúltban kimutatták, hogy az ET<sub>B</sub>-R-ok a sejtmag membránban is jelen vannak, ami bonyolultabb intracelluláris mechanizmusokat is feltételezhet, mint a Ca<sup>2+</sup> csatornák és Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> kicserélők nyitása, komplex intracelluláris Ca<sup>2+</sup> homeosztázis megváltoztatása, így végső soron mitokondriális hatások sem nem zárhatók ki (Elustondo et al. 2015). A Ca<sup>2+</sup> felhalmozódás OXPHOS elégtelenségéhez, a mitokondriális belső membrán depolarizációjához, így sejthalálhoz is vezethet. Korábban leírták, hogy az ET-1 fokozza a citoszolikus Ca<sup>2+</sup> tranzienszt, a mitokondriális ROS-termelődést valamint az ATP-felhasználást. Az ET<sub>A</sub>-R-ok gátlása markánsan csökkentette a mitokondriális Ca<sup>2+</sup> raktározást és mérsékelte a rendellenes Ca<sup>2+</sup> felhalmozódást (Brunner et al. 2002; Boveris et al. 2007). Az IRL-1620 önmagában nem befolyásolta jelentősen a mitokondriális légzésfunkciót, viszont az ET<sub>A</sub>-R antagonistával való kombinálása az ADP-stimulált légzés szignifikáns javulását eredményezte. Az ET-1 direkt, mitokondriális hatását az emelkedett mitokondriális ROS-termelésre már korábban leírták (Yuki et al. 2001), ugyanakkor az ET-receptorok intracelluláris jelenlétét mindezidáig egyedül a sejtmagban igazolták.

### ***5.3 A kinurénsav és az SZR-72 hatása a szepikus szervi elégtelenségekre***

A KYNA és az SZR-72 kezelés a gyulladáshoz kapcsolódó markerek szintjeinek csökkentésével és a fokozott antioxidáns/antinitrozatív hatás révén hasonló mértékben csökkentették a tüdő és a vese működési zavarait. Azonban csak a KYNA-kezelés csökkentette a hipoxia-szenzitív ET-1 szintjét, valamint tendenciózusan javította a májkárosodást és a ROFA pontértékeket.

#### ***A kinurénsav és az SZR-72 hatása a vékonybél mikroperfúzióra***

A KYNA, mind az SZR-72 azonos mértékben védte ki a szepszis indukált  $\text{ExO}_2$  csökkenést, azonban a mikroperfúzió elégtelenségét csak a KYNA kezelés volt képes javítani. Korábban leírták, hogy a KYNA fiziológiás körülmények között képes növelni a globális valamint a vesekéreg véráramlását, és csökkenteni az oxidatív stresszt vese iszkémia-reperfúziós károsodás során (Badzyska et al. 2014; Pundir et al. 2013). A simaizomsejtek felszínén expresszálandó NMDA-R antagonizmusa simaizomrelaxációt eredményez, ugyanakkor a KYNA kezelés az IL-6 szintek, a XOR-aktivitás, valamint a megemelkedett vazokonstriktor ET-1 felszabadulás csökkentése révén mérsékelheti a mikroerek citokin és ROS által mediált vazokonstriktóját. Figyelembe véve, hogy a KYNA a GPR35 endogén ligandja (Turski et al. 2013), valamint, hogy csak a KYNA (a szintetikus analóg nem) volt képes helyreállítani a perfúziós zavarokat, a hatások értékelésekkor nem zárható ki a GPR35 által közvetített mechanizmus sem.

#### ***A kinurénsav és az SZR-72 hatása a mitokondriális respirációra***

Az SZR-72 javította a CI OXPHOS-t, valamint a KYNA kezeléshez képest kifejezettebb volt mitokondriális funkcióra gyakorolt hatása. A KYNA analóggal végzett korábbi vizsgálatok a KYNA-nál jelentősebb anti-inflammációs hatást írtak le, azonban mind a KYNA, mind az SZR-72 csökkentették az oxidatív/nitrozatív stressz markererek szintjeit, és stimulálták az Nrf2-antioxidáns útvonalat (Kaszaki et al. 2012; Ferreira et al. 2018). Szepszis indukcióját követően az SZR-72 terápia a CI-II OXPHOS és az RCR javulását eredményezte. A KYNA és az SZR-72 fiziko-kémiai tulajdonságai eltérőek, az SZR-72 valószínűleg képes átjutni a vér-agy gáton, így képes lehet befolyásolni az intracelluláris szingalizációt. Nemrégiben kimutatták, hogy az NMDA-R-ok jelen vannak a belső mitokondriális membránban (mtNMDA-R), ahol szabályozó szerepet tölthetnek be  $\text{Ca}^{2+}$  transzportban, ROS termelésben és a hipoxia alatti metabolikus átkapcsolásban (Nesterov et al. 2018). Ezek alapján feltételezhető, hogy az SZR-72 a KYNA-hoz képest nagyobb affinitással rendelkezik a plazmamembrán, illetve a mitokondriális NMDA-R-hoz.

## 6. A TÉZIS LEGFONTOSABB MEGÁLLAPÍTÁSAI

- 1 Kialakítottunk és jellemeztünk egy sokszervi elégtelenséget, komplex makro/mikrokeringési és mitokondriális diszfunkciót mutató, klinikailag releváns patkány sepszis modellt.
- 2 Az ET-receptorok indirekt módon, a szöveti perfúzió és az intracelluláris oxigénellátás helyreállításán keresztül befolyásolhatják a mitokondriális funkciót. A szelektív ET<sub>B</sub>-R agonizmus ellensúlyozta a peritonitis okozta hipotenziót, míg az ET<sub>A</sub>-R antagonizmus javította a mikrokeringést és az oxigéndinamikát. A kombinált ET-receptor célzott kezelés új lehetőséget kínálhat egy szimultán mikrokeringési és mitokondriális reszuszcitációra, egyúttal a keringő ET-1 szintjének csökkentése révén enyhíti a szeptikus gyulladási reakciót.
- 3 A KYNA-val és szintetikus analógiával végzett kezelések enyhítették az oxidatív/nitrozatív stressz káros következményeit, valamint mérsékelték a gyulladási mediátorok felszabadulását. Az SZR-72 kezelés közvetlenül szabályozhatja a mitokondriális respirációt és az ATP-szintézist, míg a KYNA-val történő kezelés elsősorban a mikrokeringési diszfunkciót javítja, így helyreállítva a szervfunkciókat.
- 4 A kompartmentalizáció ellenére a mikrokeringési és a mitokondriális funkciók fiziológiai körülmények között szorosan kapcsolatosak. A két mechanizmus közös nevezője valószínűsíthetően a kapilláris-mitokondriális oxigéngradiens, amely kulcsfontosságú lehet mitokondriális működés szempontjából sepszis során. Mindezek alapján elmondható, hogy a mikrocirkulációt célzó reszuszcitációs terápiák hatékonysága szubcelluláris szinten is megmutatkozik.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni Boros Mihály professzor úrnak, a Sebészeti Műtéttani Intézet vezetőjének szakértelméért és értékes tudományos útmutatásáért. Különösen hálás vagyok témavezetőmnek Kaszaki Józsefnek tudományos útmutatásáért, támogatásáért és a kísérleti ismeretek elsajátításában nyújtott nélkülözhetetlen segítségéért, amelyek nélkül sosem juthattam volna el doktori tanulmányaim végéig. Hálás vagyok a kutatócsoportunkban dolgozó minden munkatársamnak, Juhász Lászlónak, Tallósy Szabolcs Péternek, Poles Mariettának, Nászai Annának, Fejes Rolandnak, Szabó Andreának, segítségükért, a tézisem alapjául szolgáló közleményekben való munkájukért és barátságukért. Szeretném megköszönni munkatársaimnak, Érces Dánielnek és Varga Gabriellának, a kísérletes ismereteim elsajátításában nyújtott segítségüket és megtisztelő bizalmukat, hogy bevontak a kutatásaikba. Köszönetemet fejezem ki Mester Csilla, Kócsó Annamária, Zádoriné Beretka Nikolett, Bús Andrea, Molnár Virág, Nagyiván Éva, Győrfi Bence, Szabó István nélkülözhetetlen segítségéért. És végül, de nem utolsósorban köszönöm édesanyámnak, nagypapámnak, testvéremnek és egész családomnak, barátaimnak a soha véget nem érő szeretetüket, támogatásukat és türelmüket. Nélkülük soha nem tudtam volna elérni a céljaimat.

**Kutatási támogatások:** NKFIH K116689; GINOP-2.3.2-15-2016-00034; Az Innovációs és Technológiai Minisztérium ÚNKP-20-4 - kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból finanszírozott szakmai támogatásával készült.



### A TÉZIS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLODÓ KÖZLEMÉYEK

- I. **Rutai A**, Fejes R, Juhász L, Tallósy SP, Poles MZ, Földesi I, Mészáros AT, Szabó A, Boros M, Kaszaki J. Endothelin A and B Receptors: Potential Targets for Microcirculatory-Mitochondrial Therapy in Experimental Sepsis. *Shock*. 2020 Jul;54(1):87-95. doi: 10.1097/SHK.0000000000001414. PMID: 31318833.  
**IF: 2,96**
- II. Juhász L, **Rutai A**, Fejes R, Tallósy SP, Poles MZ, Szabó A, Szatmári I, Fülöp F, Vécsei L, Boros M, Kaszaki J. 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. *Front Med (Lausanne)*. 2020 Nov 27;7:566582. doi: 10.3389/fmed.2020.566582. PMID: 33330526;  
**IF: 5,091**
- III. Tallósy SP; Poles MZ; **Rutai A**; Fejes R ; Juhász L; Burián K; Sóki J; Szabó A; Boros M; Kaszaki J. Predicting a peritonitis prognosis in preclinical sepsis: The initial microbiology determines the outcome (Scientific Reports; under review).