

**A perioperatív gyulladásos válasz csökkentése
exogén metán alkalmazásával**

Dr. Bari Gábor

PhD tézis

Szegedi Tudományegyetem,

Sebészeti Műtéttani Intézet

Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

Témavezetők:

Dr. Varga Gabriella, PhD

Dr. Érces Dániel, PhD

2019

A TÉZIS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

- I. **Bari G**, Érces D, Varga G, Szűcs S, Varga Z, Bogáts G, Boros M. Methane inhalation reduces the systemic inflammatory response in a large animal model of extracorporeal circulation. Eur J Cardiothoracic Surgery 2019. doi: 10.1093/ejcts/ezy453. **IF: 3.5**
- II. **Bari G**, Érces D, Varga G, Szűcs S, Bogáts G. A pericardialis tamponád kórélettana, klinikuma és állatkísérletes vizsgálati lehetőségei. Orvosi Hetilap 2018. 159:163-167 **IF: 0.3**
- III. **Bari G**, Szűcs S, Érces D, Ugocsai M, Bozsó N, Balog D, Boros M, Varga G. A cardiogen sokk modellezése pericardialis tamponáddal. Magyar Sebészet 2017. 70:297-302. **IF: 0**
- IV. Szűcs S, **Bari G***, Ugocsai M, Lashkarivand RA, Lajkó N, Mohácsi A, Szabó A, Kaszaki J, Boros M, Érces D, Varga G. Detection of intestinal tissue perfusion by real-time breath methane analysis in rat and pig models of mesenteric circulatory distress. Crit Care Med 2019. (*megosztott, közlésre elfogadva) **IF: 6.6**
- V. **Bari G**, Szűcs S, Érces D, Boros M, Varga G. Experimental pericardial tamponade - translation of a clinical problem to its large animal model. Turk J Surg. 2018. 34(3):205-211 **IF: 0.1**

A TÉZIS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ ABSZTRAKTOK

- I. **Bari G**, Varga G, Szűcs SZ, Gules M, Kaszaki J, Boros M, Érces D: Methane inhalation decreases mucosal mast cell degranulation in a large animal model of cardiogenic shock. Abstract Book of 17th Congress of the European Shock Society, 2017. September 13-15. Paris
- II. **Bari G**, Érces D, Szűcs Sz, Gules M, Gyarakai P, Szilágyi Á.L., Hartmann P, Boros M, Varga G. Improved platelet function after methane inhalation in a large animal model of obstructive circulatory shock. Abstract Book of 53rd Congress of ESSR, Madrid, 2018. p87 (<https://www.essr2018.com/abstracts>)

1. BEVEZETÉS

1.1. A gáztranszmitterek és a metán

A biológiailag aktív gázok közül a nitrogén monoxid (NO), a kénhidrogén (H₂S) és a szénmonoxid (CO) fontos szabályozó szerepet tölt be a szervezet külső vagy belső hatásokra bekövetkező válaszreakcióinak közvetítésében. Ezeket az egyszerű kémiai szerkezetű, *in vivo* általánosan jelenlevő, élettani körülmények között hatékony molekulákat gáz-transzmittereknek nevezzük. Az előbbi jellegzetességek mellett további hat kritérium megléte alapján definiálhatók. A gáz-transzmitterek (1) kis gázmolekulák, (2) membránokon át szabadon közlekednek, (3) emlős sejtekben endogén úton, enzimatikusan képződnek, (4) specifikus élettani funkciójuk van, (5) hatásuk utánozható exogén forrásból származó megfelelőjükkel és (6) meghatározott sejtes és molekuláris célpontjaik vannak (Wang és mtsai. 2014). A metán (CH₄) a legegyszerűbb, mindenütt kimutatható gázmolekula, mely az emlős emésztőrendszerben szénhidrátok erjedésekor képződik. Az anaerob, biotikus metanogenezis során metanogén mikroorganizmusok (Archea törzsek) széndioxidot és hidrogént redukálnak metánná metil coenzim M reduktáz enzim segítségével (Eckburg és mtsai. 2005). A metán korábbiakban megismert tulajdonságai nem felelnek meg a fenti gáz-transzmitter kritériumok mindegyikének, ugyanakkor az utóbbi években számos tanulmány igazolta a gáz bioaktivitását. Kimutatták, hogy exogén 2,5 v/v%-os normoxiás CH₄-levegő keverék belélegeztetése csökkenti a bél okkluzív ischemia-reperfúziós (I-R) károsodásait (Boros és mtsai. 2012), majd ezt követően az antioxidáns és antiapoptotikus hatásokat több *in vitro* és *in vivo* kísérleti környezetben is bizonyították (Li és mtsai., 2019; Ye és mtsai. 2015; Chen és mtsai. 2016; Liu és mtsai. 2016). A hatásmechanizmus vizsgálata során igazolták a reaktív oxigéngyökök (ROS) képződéséért felelős xantin oxidoreduktáz (XOR) modulációját (Poles és mtsai. 2018), de a gyulladáshoz kapcsolódó kaszkádra gyakorolt összetett hatás minden részletében ma még nem ismert (Mészáros és mtsai. 2017).

1.2. Perioperatív gyulladáshoz való reakció a szívsebészetben

A szívsebészeti betegek perioperatív ellátása során több alkalommal, több helyzetben és több nem várt esemény következtében alakulhat ki lokális vagy szisztémás gyulladáshoz való válasz. Ezek közül különös jelentőségű a perikardiális tamponád során kialakuló keringési zavar és kardiogén shock (Seferović és mtsai. 2006). E kórállapotban keringési redisztribúció, regionális hipoperfúzió és sokszervi mikrokeringési zavar mutatható ki, leginkább a zsigeri szervekben, különösen a vese és

a bélrendszer területén (Kaszaki és mtsai. 1989). A hipoperfúzió és a szöveti hipoxia következtében gyulladásos kaszkádok - többek között a komplement és a bradikinin-kallikrein rendszerek aktiválódnak. A következményes citokin felszabadulás fokozott leukocytákkumulációt eredményez, amelyek transzlokációjával további, fokozott ROS képződés és szöveti károsodás alakul ki.

Klinikai problémát jelent a szívsebészeti műtétek egy részénél szükségszerűen használt extrakorporális keringés (ECC) is, melynek szövődményeként szisztémás gyulladásos válaszreakció (SIRS) alakulhat ki (Day és mtsai. 2005; Millar és mtsai. 2016). E folyamat kialakulásában kitüntetett szerepet játszik a véralvadási kaszkád idegen felületen történő kontakt aktivációja. Ennek során - az ECC beindításához kötelezően alkalmazott heparinos véralvadásgátlás miatt - nem képződik thrombus, azonban a koagulációs kaszkád aktivációjának első fázisa bekövetkezik, s így a komplement rendszer mellett leukocyták, thrombocyták és az érendothel sejtek aktiválódnak (Millar és mtsai. 2016). Ha ezek a komplex proinflammációs folyamatok kiterjednek és kontrollálatlanná válnak, pl. hosszantartó cardiopulmonális bypass (CPB) esetében, akkor a SIRS vitális fontosságú szerveket is érinthet és a septicus shockhoz hasonló szöveti és szervi károsodás léphet fel.

1.3. Perikaridális tamponád és CPB kísérletes modellek

A kardiogén shock következményeit a korábbiakban számos nagyállat modellben vizsgálták (Lluch és mtsai. 1969), és az egyik legalkalmasabb módszernek a perikaridális tamponád létrehozása bizonyult (Starr és mtsai. 1982). E beavatkozások során thoracotomiás feltárásból történik a pericardium kanül bevezetése, amelyen keresztül a tamponád fiziológiás sóoldat feltöltésével kiváltható. Kutatócsoportunk is bizonyította, hogy a perikaridális tamponád modell alkalmas a kardiogén shock okozta keringési zavarok kórélettanának tanulmányozására (Kaszaki és mtsai. 1989). A tamponád standard modelljeiben azonban thoracotomiát kell alkalmazni, aminek számos technikai hátránya van és a beavatkozás szövődményei miatt a kísérletes eredmények is gyakran megkérdőjelezhetők.

Az ECC technológiai fejlesztési igényei mellett az alapvető kórélettani problémák tanulmányozása is jól használható, klinikailag releváns, stabil állatmodelleket igényel. Az irodalomból ismert, hogy ECC rágszálókban is létrehozható (Fujii és mtsai. 2015), azonban e módszer sebészi előkészítése és kivitelezése komoly technikai és manuális kihívást jelent és az eredmények emberi transzlációja is kérdéses. Jelenleg az ECC kísérleti modelljeként többnyire sertést és

kutyát használnak, de teheneket és juhokat is alkalmaztak (Jungwirth és mtsai. 2010). Általános probléma, hogy a CBP komponensek magas működési költségei miatt *in vivo* ECC tanulmányok csak néhány kutatóintézetben végezhetők, a nagyállat modellek létrehozásához a humán műtői környezet és teljes körű operatív-technikai háttér szükséges.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A szívsebészeti perioperatív ellátás során bekövetkező gyulladásos reakciók befolyásolása kihívást és megoldásra váró feladatot jelent. Fontosnak tartottuk olyan adjuváns terápiák kísérletes kidolgozását, amelyekkel e szövődmények befolyásolhatók. Vizsgálataink első célja olyan *in vivo* állatmodelleket kialakítása volt, melyek standardizált körülmények között alkalmasak lehetnek e szívsebészeti klinikai problémák feltérképezésére és az eredmények humán transzlációjára.

1. A jelenleg alkalmazott perikardiális tamponád modelleknek több hátrányuk van. A szívtamponád kialakításához szükséges thoracotomia romló tüdőfunkciót eredményez, a nagy seb felszín vérzéses szövődményekhez vezethet és nagy esélye van más, további szövetkárosodásnak is. Célunk egy olyan perikardiális tamponád állatmodell kidolgozása volt, amelyben a thoracotomia kiküszöbölhető, az állapot jól kontrollálható, és alkalmazásakor klinikailag releváns képet alakíthatunk ki.
2. Második célunk az ECC által kiváltott hemodinamikai és mikrokeringési hatásokat tanulmányozása volt, egy klinikailag releváns nagyállat modellben.
3. Korábbi vizsgálatok igazolták a CH₄ gyulladáscsökkentő hatásait, az oxidoreduktív stressz modulációjával összefüggésben. Feltételeztük, hogy ezek a tulajdonságai potenciálisan alkalmassá teszik terápiás alkalmazását a szívsebészeti gyakorlatban. Következő célunk tehát az volt, hogy megvizsgáljuk a CH₄ belélegeztetés hatását a perikardiális tamponád során kialakuló bélrendszeri szövődményekre, splanchnikus I-R esetén, altatott sertéseken.
4. Célul tűztük ki a CH₄ kezelés hatásának vizsgálatát az ECC következtében kialakuló gyulladásos válaszra. Ezen túlmenően célunk annak a kérdésnek a megválaszolása volt, hogy belélegzett CH₄ alkalmazásával befolyásolható-e a CPB során kialakuló vesefunkciós károsodás. Ezeket a vizsgálatokat altatott törpesertéseken végeztük, amelyeken centrális kanülálással hoztunk létre CPB-t és a CH₄-t az oxigénátor gázáramlásához kevertük.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Kísérleti állatok

A kísérleteket 28 db (az első vizsgálat-sorozatban n=18, míg a másodikban n=10) átlagos testtömegű (45±8 kg) altatott, lélegeztetett hím, vietnámi törpesertéseken végeztük, az EU 2010/63 irányelveknek megfelelően és a Szegedi Tudományegyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága jóváhagyásával (engedély száma: V/148/2013).

3.2. Anaesthesia és hemodinamikai monitorozás

Az anesztéziát ketamin (20 mg/ttkg) és xylazin (2 mg/ttkg) kombinációjával indukáltuk, majd a fenntartás propofol (6 mg/kg/h), midazolam (1,2 mg/kg/h) és fentanyl (0,02 mg/kg/h) infúzióval történt. Az izomrelaxációt pipercuronium egyszeri dózisével (4 mg) értük el. Endotrachealis intubálást követően mesterséges lélegeztetést alkalmaztunk, amelynek során a légzési térfogatot (9±2 ml/kg) és a légzésszámot úgy állítottuk be, hogy a PaCO₂ 35 és 45 Hgmm közé essen. Az állatok testhőmérsékletét 36-37°C-on tartottuk, és volumen fenntartó infúziót adtunk 10 mL/kg/hr sebességgel. Kipreparáltuk a véna jugularist, vénás nyomásmérés, vérminta vétel és infúzió beadás céljából. Az arteria femoralisba perctérfogat mérésére alkalmas PiCCO termodilúciós nyomásmérő katétert helyeztünk (PiCCO Catheters; PULSION Medical Systems, Feldkirchen, Germany). Median laparotomiából a terminalis ileumhoz futó arteria mesenterica ágat preparáltunk és köré ultrahangos áramlásmérő fejet helyeztünk fel (Transonic Systems Inc., Ithaca, NY, USA). A 2. tanulmány egyedei esetében az arteria renalist is preparáltuk, amelyre szintén ultrahangos áramlásmérő fejet helyeztünk. Az állatok a kísérlet során folyamatos invazív hemodinamikai monitorozás alatt álltak, 30 percenként vérgáz analízist végeztünk.

3.3. További sebészi beavatkozás és kísérleti protokoll az 1. tanulmányban

Az állatokat 3 kísérleti csoportba osztottuk. Az 1. csoport (álműtött, n=6) kontrollként szolgált, itt nem hoztunk létre tamponádot. Mindhárom csoportban medián laparotomián keresztül a rekeszen ejtett kb 3 cm-es metszésen át a pericardiumba pledgetes dohányzacskóöltéssel vékony kanült rögzítettünk. A PT során az artériás középnyomás értékeit (MAP) 40 és 45 Hgmm között tartottuk az állatokból nyert, alvadásban gátolt saját vérrel. A tamponád 60 percig tartott, majd a folyadék lebocsátását követően az állatokat további 180 percig obszerváltuk. A 3. csoport állatait a tamponád utolsó 5 percében és a tamponád feloldása utáni további 10 percben 2.5 v/v % normoxiás CH₄-levegő keverékével lélegeztettünk (Linde Gas, Hungary). A centrális

vénás nyomást (CVP), arteria mesenterica ág áramlását, a MAP, a perctérfogatot (CO), a szívfrekvenciát (HR) értékeit regisztráltuk. A vékonybél nyálkahártya mikrokeringését és nyálkahártya károsodás mértékét tamponád kezdete előtti 0. percben, a tamponád oldása utáni 30. percben és a kísérlet 240. percében regisztráltuk. A kísérletek végén biopsziát vettünk az ileumból a leukocyta akkumuláció és a hízósejt degranuláció mértékének meghatározására.

3.4. További sebészi beavatkozás és kísérleti protokoll a 2. tanulmányban

Az állatok 1. csoportja (n=5) kontrollként szolgált, a 2. csoport (n=5), CH₄ kezelést kapott. Mindkét csoportban median sternotomiát végeztünk, a pericardiumot megnyitottuk. Heparin iv. infúzióját követően (2000 NE) és aktivált alvadási idő (ACT) (ACT>500 sec) kontrollt követően dohányzacskó öltéseket helyeztünk az aorta ascendensbe és a jobb pitvari fülcsébe, majd standard kanülálást végeztünk. Aorta lefogás nem történt. Hemodinamikai méréseket követően a CPB-t elindítottuk, majd a légzést megállítottuk. A CPB-t 60 percig tartottuk fel, majd leállítását követően további 120 percig monitoroztunk. A kontroll csoport állatai standard levegő-oxigén keveréket kaptak, a metán kezelt állatok a CPB teljes időtartama alatt 2,5 v/v %-os normoxiás CH₄-levegő oxigén keveréket (1 l/min áramlással) kaptak a CPB oxigenátorba. A vérben lévő metán koncentrációt közeli-infravörös lézer alapú fotoakusztikus spektroszkóppal monitoroztuk. A CPB utáni időszakban a hemodinamikai stabilitást (MAP > 60 Hgmm) folyamatos iv. folyadékpótlással tartottuk fenn, továbbá a szisztémás vaszkuláris rezisztenciát szükség szerint noradrenalin (0,05-0,35 µg/kg/h) perfúzióval biztosítottuk.

3.5. A mikrokeringés in vivo monitorozása

A vékonybél nyálkahártya mikrokeringésének vizsgálata orthogonális polarizációs spektrális (OPS) technikával történt (Cytoscan A/R, Cytometrics, USA), analízáló szoftver segítségével (IVM Pictron, Budapest) meghatároztuk a vörösvértestek átlagos áramlási sebességét (RBCV; µm/s).

3.6. A szövetkárosodás in vivo vizsgálata

A terminális ileum nyálkahártya károsodás mértékét *in vivo* szövettani vizsgálómódszerrel, konfokális lézer pásztázó endomikroszkóp (CLSEM) segítségével határoztuk meg (Five1, Optiscan Pty. Ltd., Australia). A nyálkahártya szerkezeti változásait akridin orange fluoreszcens festék felszíni alkalmazása után vizsgáltuk.

3.7. A teljes vér szuperoxid gyök produkció és a szöveti leukocita akkumuláció meghatározása

A vér szabadgyök termelő kapacitását Zimmermann kemiluminometriás módszerével (1991) detektáltuk. A neutrofil granulocita szöveti akkumulációját a mieloperoxidáz (MPO) enzim aktivitása alapján határoztuk meg (Kubler és mtsai. 1996).

3.8. A xanthin oxidoreduktáz (XOR) aktivitás mérése

A XOR aktivitást a szöveti homogenizátum felülúszójából Beckman (1989) módszerével mértük fluorometriás kinetikus assay segítségével.

3.9. Fehérvérsejt infiltráció és hízósejt aktiváció meghatározása szövettani vizsgálattal

Az ileumból vett szövetmintát hematoxilin-eozinnal (HE) festettük, a nyálkahártyát infiltráló leukociták számlálása metszetenként legalább 20 látótérben történt 400x-os nagyításon. A bélbiopsziás mintákat Carnoy fixálószerbe helyeztük és HE, savas toluidin kék (pH 0,5) vagy alcian kék-safranin O-val (pH 0,4) festettük. A pozitívan festett hízósejteket 20 villus-kripta egységű villusban számoltuk 400X optikai nagyítással.

3.10. A vér CH₄ tartalmának meghatározása

A vér exogén CH₄ jelenlétének bizonyítására közel-infravörös lézer alapú fotoakusztikus spektroszkópot használtunk (Tuboly és mtsai. 2013). A CH₄ értékeit a háttérszintekkel korrigáltuk és ppm-ben fejeztük ki.

3.11. Statisztikai analízis

A csoporton belüli eltéréseket Friedman próbával vizsgáltuk, ezen belül a kontroll értéktől való eltérést Dunn próbával teszteltük. A csoportok közötti különbségek meghatározása Mann-Whitney próbával történt. Ábráinkon a medián értéket és a szórást jellemző 25 és 75 percentilist tüntettük fel, a statisztikai szignifikancia szintet $p < 0,05$ -nél határoztuk meg.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Az 1. tanulmány eredményei

4.1.1. Hemodinamikai változások

A MAP értékét mind a két csoportban a PT ideje alatt 40-45 Hgmm között tartottuk. A tamponádot a MAP csökkenésével párhuzamosan a CO jelentős csökkenése kísérte (Álműtött: $M=2,4$; $p25=2,3$; $p75=2,6$ L/min/m²; Tamponád: $M=1,2$; $p25=1,2$; $p75=1,4$ L/min/m²; Tamponád+ CH₄: $M=1,1$; $p25=1,1$; $p75=1,2$ L/min/m²). A MAP a perikardiális tamponád oldása utáni időszak végére (240. perc) mind a CH₄-nal kezelt csoportban ($M=73$; $p25=70$; $p75=80$ Hgmm), mind a kezeletlen, tamponád csoportban jelentősen lecsökkent az álműtött értékekhez képest. A kísérlet végén a CO értékekben nem tudtunk különbséget kimutatni a kontroll csoporthoz ($M=2,4$; $p25=2,1$; $p75=2,7$ L/min/m²) képest sem a kezeletlen tamponádos ($M=2,1$; $p25=2$; $p75=2,3$ L/min/m²), sem a CH₄-al kezelt csoport ($M=2,1$; $p25=1,9$; $p75=2,2$ L/min/m²) esetében sem. A HR a tamponád alatt mind a kontroll értékekhez, mind az álműtött csoporthoz ($M=75,8$ 1/min; $p25=66,3$ 1/min; $p75=85$ 1/min) képest szignifikánsan megemelkedett kezeletlen ($M=118,8$ 1/min; $p25=108,5$ 1/min; $p75=144,1$ 1/min) és a CH₄ kezelt tamponádos csoportban is ($M=114$ 1/min; $p25=108$; $p75=140,5$ 1/min). Mindkét tamponádos csoportban a kontroll értékeikhez képest magasabb HR volt mérhető, amely kompenzációs folyamatok részeként hozzájárult a CO tamponád utáni rendeződéséhez. A tamponád alatt szignifikánsan emelkedett CVP-t mértünk (*nem közölt adatok*), amely a vénás visszaáramlás romlására utal. A lokális keringési paraméterek közül az SMA ágaiban a perikardiális tamponád alatt jelentős keringésromlás volt megfigyelhető a kezeletlen tamponádos ($M=192,2$ ml/min; $p25=168,9$ ml/min; $p75=245,9$ ml/min) és a CH₄-al kezelt csoportban ($M=175,2$ ml/min; $p25=138,5$ ml/min; $p75=263,5$ ml/min) a kontroll értékekhez és az álműtött csoporthoz ($M=439,2$ ml/min; $p25=400$; $p75=460,8$ ml/min) képest, amely azonban a tamponádot követően mindkét csoport esetében rendeződött. A kísérlet további szakaszában nem találtunk szignifikáns különbséget a CH₄-al kezelt állatokban sem az álműtött csoporthoz, sem a kezeletlen tamponádos csoporthoz képest.

4.1.2. Mikrokeringés változásai

A vékonybél nyálkahártya mikrokeringésének vizsgálata során az RBCV nem változott a kontroll csoportban ($M=471$; $p25=411$; $p75=543$ μ m/sec), míg a perikardiális tamponád csoportban ($M=379$; $p25=353$; $p75=488$ μ m/sec) és a CH₄-al

kezelt csoportban (M=400; p25=328; p75=440 $\mu\text{m}/\text{sec}$) jelentősen csökkent a RBCV a kiindulási értékhez képest. Az obszervációs periódus végén a CH₄ kezelés hatására a vörösvértest áramlási sebesség szignifikánsan emelkedett (M=522; p25=463; p75=557 $\mu\text{m}/\text{sec}$) a nem kezelt perikardiális tamponád csoporthoz képest (M=369; p25=318; p75=402 $\mu\text{m}/\text{sec}$).

4.1.3. Leukocita akkumuláció

A perikardiális tamponád csoportban a leukocita felhalmozódás szignifikánsabban magasabb volt (M=55; p25=42; p75=65 leukocita/látótér), mint a kontroll csoport bélnyálkahártya szöveti mintáiban (M=30; p25=24; p75=35 leukocita/látótér). A CH₄-al kezelt csoportban szignifikánsan kevesebb leukocita akkumulációt detektáltunk (M=34; p25=27; p75=38 leukocita/látótér) a kezeletlen perikardiális tamponád csoporthoz képest.

4.1.4. Hízósejt degranuláció

A tamponád után 90 perccel jelentősen megnövekedett az ilealis szövetmintákban a hízósejtek degranulációja (M=19,4; p25=17,4; p75=21,3 %) a kontroll csoporthoz képest (M=10,7; p25=9,7; p75=11,7 %), amely a megfigyelési időszak végéig magas értéken maradt. A CH₄-al kezelt perikardiális tamponád csoportban nem növekedett a degranuláció mértéke sem a 90. percben (M=10,9; p25=10; p75=13 %) sem a 240. percben.

4.1.5. In vivo szövettan

Valós idejű szövettani vizsgálatokat végeztünk CLSEM technikával. A kísérletek során készült felvételeken igazolható volt, hogy az álműtött állatok bélnyálkahártyája nem károsodott és a kontroll időszakban mindkét tamponád csoport állatainak bélnyálkahártyája is ép volt. A tamponádot követő időszak 30. percben a mucosán már repedések és hámphányok alakultak ki. A perikardiális tamponád csoport állataiban a kísérlet végén készített felvételek számos kiterjedt hámphányt mutattak. A CH₄-al kezelt csoportban károsodás mértéke jelentősen alacsonyabb volt a tamponádot követő 30. percben és a megfigyelési időszak végén is.

4.1.6. Teljes vér szuperoxid tartalom

A perikardiális tamponádot követő 30. percben mért teljes vér szuperoxid tartalom a nem kezelt PT csoportban szignifikánsan emelkedett volt (M=28366; p25=16558; p75=42792 RLU) mind az álműtött (M=6523; p25=2546; p75=14432

RLU), mind a CH₄-al kezelt állatokhoz képest (M=2946; p25=2313; p75=10473 RLU). Ez a különbség a megfigyelési időszak végén már nem volt kimutatható.

4.2. A 2. tanulmány eredményei

4.2.1. Vese véráramlás és óradiurézis

A CPB-csoportban a CPB és a CPB utáni időszakokban szignifikánsan csökkent a vese artéria-áramlása a kiindulási értékhez képest. A CH₄-al kezelt állatok csoportjában a CPB periódus alatt szignifikánsan magasabb vese véráramlást volt megfigyelhető (M=77; p25=66; p75=79 ml/min) a kontroll csoporthoz képest (M=39; p25=36; p75=44 ml/min). A megfigyelési időszakban az óradiurézis szignifikánsan magasabb volt a CH₄-al kezelt csoportban (M=1,1; p25=0,7; p75=1,4 ml/kg/h), mint a kezeletlen állatokban (M=0,4; p25=0,3; p75=0,6 ml/kg/h).

4.2.2. Vér metán tartalma

A fotoakusztikus spektroszkópiai adatok alapján az aortából vett vérminta CH₄ koncentrációja 1,4 ppm-es növekedését mutatott a juguláris vénából vett minta CH₄ szintjéhez képest.

4.2.3. MPO aktivitás

A neutrofilek felhalmozódásának mértékét a bél, a szív és a vesék szövetében az MPO aktivitás mérésével határoztuk meg. Az ileum MPO aktivitás szignifikánsan alacsonyabb volt a CH₄ kezelt csoportban (M=2,2; p25=2,1; p75=2,5 mU/(mg fehérje)) a kezeletlen CPB csoporthoz képest (M=3,3; p25=2,6; p75=3,5 mU/(mg fehérje)). A szív- és vese szövet MPO szintjeiben nem láttunk különbséget a két csoport között.

4.2.4. XOR aktivitás

A XOR aktivitás a kezeletlen csoportban 2 órával a CPB periódus után az összes vizsgált szövetben szignifikánsan magasabb volt (ileum: M=5,4; p25=4,3; p75=10,4 pmol/min/mg; szív: M=4,0; p25=2,9; p75=6,0 pmol/min/mg; vese: M=9,7; p25=8,4; p75=21,6 pmol/min/mg), mint a CH₄-al kezelt állatok esetében (ileum: M=2,6; p25=1,5; p75=2,7 pmol/min/mg; szív: M=1,7; p25=1,1; p75=1,9 pmol/min/mg; vese: M=1,1; p25=0,45; p75=1,9 pmol/min/mg).

4.2.5. Teljes vér szuperoxid tartalom

A CH₄ kezelt CPB csoportban a vér szuperoxid tartalma a megfigyelési időszak végén szignifikánsan alacsonyabb volt (M=543; p25=388; p75=728 RLU), mint a kezeletlen csoportban (M=1301; p25=1089; p75=1458 RLU).

4.2.6. Noradrenalin igény

A poszt-CPB periódus alatt noradrenalint alkalmaztunk, hogy legalább 60 Hgmm MAP-t tartsunk fent. Jelentős különbségeket találtunk a két kísérleti csoport vazopresszor igényei között. A CH₄-nal kezelt csoport szignifikánsan kevesebb noradrenalin-támogatást igényelt (M=0,08; p25=0,06; p75=0,14 µg/kg/min) a nem kezelt csoporthoz képest (M=0,25; p25=0,23; p75=0,33 µg/kg/min).

5. AZ EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

5.1. A metán belélegeztetés hatása perikardiális tamponád során

Sertéseken végzett kísérleteinkben a CH₄ hatását vizsgáltuk a perikardiális tamponád által kiváltott non-okkluzív mezenterialis ischemia miatt kialakuló szöveti károsodásban. Először az eredeti *in vivo* tamponád modellt módosítottuk a humán transzlációs érték növelése céljából. A korábbiakkal ellentétben, a jelenlegi, módosított kísérletes modellben a perikardiális tamponádot laparotómián keresztül transphrenikus kanülálással hoztuk létre. Ezzel a sebészi traumát mérsékeljük, továbbá a thoracotomia miatt kialakuló tüdőszérülés kockázatát csökkentettük. Ahhoz, hogy a klinikai relevanciát fokozzuk, és a iatrogén PT kialakulását modellezzük, az állat saját, alvadásgátolt vérért használtuk a pericardium feltöltésére. A modell finomításával egy jól kontrollálható, ismételhető és klinikailag releváns új PT állatmodellt alkottuk.

A CH₄ hatásainak vizsgálatához az új, módosított PT sertésmodellt használtuk. A tamponád időszaka alatt a MAP és a CO alacsony célértéken maradt. A tamponád időszakban a HR reaktív emelkedést mutatott, amely jól jelzi, hogy a szív verőtérfogatanak csökkenésekor a szervezet a HR emelésével kompenzál. Ezalatt az időszak alatt a bélnyálkahártya véráramlása jelentősen lecsökkent, és gyulladásos folyamatok beindításával járt. A tamponád oldása után a makrohemodinamikai paraméterek közül a MAP emelkedése volt jelentős, azonban nem érte el a kiindulási értéket. A PT oldása utáni időszakban a bél gyulladásos károsodását a szövetminták megnövekedett leukocita akkumulációja és a hízósejtek növekedett degranulációja jelezte. Ezzel együtt a PT időszaka után elvégzett *in vivo* hisztológiai vizsgálat a bél mucosa jelentős strukturális károsodását mutatta ki.

A bél makrokeringésre irányadó SMA áramlás a perikardiális tamponád időszaka alatt jelentősen csökkent. Ez az alacsony CO miatt kialakuló inhomogén véráramlási redisztribúció következménye. A tamponád oldását követően a SMA véráramlási értékeiben reaktív reperfüziós csúcs volt megfigyelhető, amely ezt

követően a kiindulási értékre csökkent. Bár a CH₄ belélegeztetés nem volt hatással a makrohemodinamikai paraméterekre, a mikrokeringést jellemző vörösvértest áramlási sebességet a tamponád oldását követő 2. órában szignifikánsan emelte. A mikrokeringés normalizálásának hátterében a hízósejt degranuláció csökkentése állhat, amely a mérséklődő gyulladás következtében kialakult csökkent vazoaktív válasz következménye lehet. Ezzel párhuzamosan a CH₄ kezelés a szöveti leukocita szám csökkentése mellett mérsékelte a szuperoxid produkciót is. A javuló mikrokeringés és a normalizálódó mediátor szintek következtében jelentősen javult az ileum nyálkahártya állapota.

A CH₄ előnyös hatása jelenleg több elmélettel magyarázható. Nem ismert specifikus receptora, vagy cél-enzime, így a CH₄ bioaktivitása a gáz fizikai tulajdonságaihoz köthető. A CH₄ apoláros molekula, amely képes a sejtmembránban oldódni, így megváltoztatja a mitokondriális membrán stabilitását is, és hatással bírhat a légzési lánc transzmembrán fehérjék ROS termelésére (Strifler és mtsai. 2016). Ismert továbbá, hogy a CH₄ a ROS képződést az antioxidáns enzimek aktivációjával a Nrf2-ARE útvonalon keresztül csökkenti (Wang L és mtsai. 2017).

5.2. A metán hatása CPB során kialakuló szisztémás gyulladásos válaszra

A szívsebészeti ellátás során gyakran alkalmazott CBP következtében kialakuló szisztémás gyulladásos választ és a CH₄ terápiás hatásait vizsgáltuk altatott sertéseken. Tanulmányunkhoz egy új, egyszerűsített CPB modellt alkottunk, amelyben a ECC-t centrális kanülálással hoztuk létre. Ez a konfiguráció a szívsebészeti műtétek során használatos CBP mellett jól modellezi a centrális VA-ECMO támogatást is.

Ismert, hogy a szívsebészeti posztoperatív ellátásban a vesefunkció romlása igen gyakran kíséri az ECC, ezért nagy jelentősége van vese protektív terápiák kidolgozásának. A jelen vizsgálatban a vese artériás áramlás jelentős csökkenését figyeltük meg a CPB alatt és után. A csökkenés ellenére az áramlás szignifikánsan magasabb volt a CH₄-al kezelt csoportban. A növekedésnek funkcionális hatása is volt, mivel az óradiurézis a CH₄-kezelt csoportban az alacsony normál tartományban maradt, szemben a CH₄ kezelés nélküli állatok oligurájával. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a szuperoxid (a ROS generáció első lépése I-R során) képes közvetlenül növelni a Ca²⁺ beáramlását a vese afferens arteriolák simaizomsejtjeiben, ami vazokonstriktiót és így csökkent vesekeringést okozhat (Vogel és mtsai. 2015). A CPB létesítése bizonyos mértékű szöveti hipoperfúziót eredményez, amely a szuperoxid termelésért felelős enzimek (NADPH-oxidáz és XOR) aktivációjához vezet. Kísérleteink során a

CH₄-al kezelt állatok vérmintáiban kevesebb szuperoxidot mértünk CPB-t követően. Ezzel egyidőben mindhárom vizsgált szövetmintában (szív, vese, vékonybél) csökkent XOR aktivitást regisztráltunk, amely a CH₄ nem szerv-specifikus hatására utal. A leukocita infiltrációra irányadó MPO aktivitás szintén csökkent a vékonybélben metán kezelés hatására, azonban ez a változás a szív és vese szövetmintákban nem volt regisztrálható. Ennek valószínű oka, hogy a CPB hatására bekövetkező keringési változásokra a vékonybél mikrokeringés kifejezetten érzékeny, és nyálkahártyája a szervezet egyik fő barriere a külvilággal szemben így immunogén válaszai is kifejezettebbek. Ismert, hogy a noradrenalin befolyásolhatja a vese perfúziót, azonban jelen vizsgálatban alkalmazott dózisok nem okozhatják a vese perfúzió romlását (Bellomo és mtsai. 2001). Schaer és mtsai. arról számoltak be, hogy a noradrenalin alkalmazás kutyában 1.6 mg/kg/min dóziséig növelte a vese perfúziót (Schaer és mtsai. 1985). Jelen tanulmányunkban a maximálisan alkalmazott noradrenalin dózis 0.35 mg/kg/min volt. Továbbá a CH₄ kezelés hatása a veseműködésre már a CPB kezdete után 60 perccel megfigyelhető volt, így kizárhatjuk az inotróp kezelés lehetséges hatását erre a paraméterre.

6. A TÉZIS FONTOSABB MEGÁLLAPÍTÁSAI

1. A korábbiakban alkalmazott állatmodellek finomításával egy új perikardiális tamponád modellt hoztunk létre. A perikardiális térbe thoracotomia nélkül, laparotómián keresztül, transphrenikus úton vezetünk be kanült, a tamponádot a pericardium feltöltésével idéztük elő, amelyhez az állat alvadásgátolt saját vérért használtuk.

2. Egyszerűsített és klinikailag releváns CPB állatmodellt hoztunk létre, amelyben az ECC hemodinamikai hatásai, mikrokeringési és biokémiai következményei is jól megfigyelhetők és jellemezhetők.

3. Elsőként mutattuk ki, hogy a CH₄ belélegeztetés hatékonyan befolyásolja és jelentősen mérsékeli a kísérletes perikardiális tamponád által kiváltott mesenterialis I-R miatt létrejövő gyulladásos aktivációt a bélnyálkahártyában. A CH₄ hatásában fontos szerepet játszhat a mucosa leukocyta infiltráció és a hízósejt aktiváció csökkentése. A párhuzamosan csökkenő ROS képződés a gyulladásos effektorok csökkent működésére utal.

4. Bizonyítottuk, hogy a CH₄ hatásos mennyiségben bevihető a szervezetbe az ECC membrán oxigenátorán keresztül. Az eljárás mérsékeli az ECC gyulladásos hatását a perifériás szövetekben és hatékonyan befolyásolja az ECC által kiváltott ROS termelést is. Elsőként mutattuk ki, hogy a CH₄ kezelés fokozza vese véráramlását és az óradiurézist CPB-t követően. Ezek az adatok felvetik a CH₄ inhaláció terápiás alkalmazásának lehetőségét humán szív-műtétek esetén, a funkcionális veseszövődmények befolyásolása céljából.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni Boros Mihály Professzor Úrnak, a Sebészeti Műtéttani Intézet vezetőjének tudományos munkám irányításáért. Nagyra értékelem támogatását, amellyel lehetővé tette, hogy a vezetése alatt álló intézetben tudományos munkát végezhessenek.

Különleges hálával tartozom témavezetőimnek, Varga Gabriellának és Érces Dánielnek akik személyesen irányítottak és vezettek be a kísérletes kutatás rejtelseibe.

Külön köszönettel tartozok Forster Tamás Professzor Úrnak, a II.sz. Belgyógyászati Klinika és Kardiológiai Központ vezetőjének, hogy támogatta tudományos tevékenységemet.

Köszönöm a Sebészeti Műtéttani Intézet technikai személyzetének is a munkám során nyújtott segítségüket.

Szeretném kifejezni hálámat Bogáts Gábor Tanár Úrnak, a Szívsebészeti Osztály vezetőjének, hogy támogatott és lehetőséget adott a tudományos munka végzésére klinikai munkám mellett.

Végül szeretném megköszönni a családomnak a türelmet és támogatását a dolgozatom elkészítéséhez.

Jelen kutatási eredmények megjelenését az NKFIH-K120232 és NKFIH-K116861, IKOM GINOP-2.3.2-15-2016-00015 és UNKP 20391-3/ 2018 /FEKUSTRAT projekt támogatja.