

**A csökkent nitrogén monoxid képződés perifériás és  
centrális keringési következményei**

**Dr. Molnár Gábor**

**Ph.D. Tézis**

**Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar**

**Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola**

**A keringési rendszer élet- és kórtana, farmakológiája című Doktori program:  
Klinikai jelentőségű kardiorespiratorikus pathomechanizmusok vizsgálata című  
Alprogram**

**Témavezető:**

**Habil. Dr. Kaszaki József**

**Szegedi Tudományegyetem, Sebészeti Műtéttani Intézet, Szeged**

**Dr. Bugyi István Kórház, Sebészeti Osztály, Szentes**

**2011**

### A tézis alapjául szolgáló közlemények

1. Eszlári E, Czóbel M, **Molnár G**, Bogáts G, Kaszaki J, Nagy S, Boros M: Modulation of cardiac contractility through endothelin-1 release and myocardial mast cell degranulation. *Acta Physiol Hun* 95:301-319, 2008. IF 0.491
2. Czóbel M, Kaszaki J, **Molnár G**, Nagy S, Boros M: Nonspecific inhibition of nitric oxide synthesis evokes endothelin-dependent increases in myocardial contractility. *Nitric Oxide Biol Chem* 21: 201-209, 2009. IF 2.506
3. **Molnár G**, Eszlári E, Czóbel M, Kaszaki J, Bogáts G, Nagy S, Boros M: A nitrogén-monoxid-szintézis gátlása endothelinfüggő szívkontraktilitás növekedéshez vezet. *Cardiologica Hungarica* 40(1): 1-6, 2010. IF 0.0
4. **Molnár G**, Csonka E, Vass A, Boros M, Kaszaki J: Circulatory consequences of reduced endogenous nitric oxide production during small-volume resuscitation. *Acta Physiol Hung* 98: 393-408, 2011. IF 1.2

### A tézis alapjául szolgáló előadáskivonatok

1. **Molnár G.**, Kaszaki J., Nagy S., Petri I., Balogh Á., Boros M.: Vazoaktív mediátorok szerepe a kolloid-krisztalloid volumen expanderek keringési hatásaiban. *Magyar Sebészet* 52: 215, 1999.
2. Kaszaki J, Eszlári E, Csonka E, **Molnár G.**, Boros M: A kolloid-krisztalloid volumen expanzió következményei: hízósejtek és az endothelin-1 szerepe. *Magyar Sebészet Suppl*: 20, 2001.
3. Kaszaki J., **Molnár G.**, Nagy S., Balogh Á., Boros M.: The role of endothelin and nitric oxide in the circulatory effects of colloid-crystalloid resuscitation fluids. *J. Physiol.* 526P: 127P, 2000.
4. Kaszaki J., **Molnár G.**, Nagy S., Balogh Á., Boros M.: The role of vasoactive mediators in the circulatory effects of colloid-crystalloid volume expansion. *European Surgical Research* 32 (Suppl 1.): p57, 2000.
5. **Molnár G.**, Kaszaki J., Eszlári E., Géczi T., Nagy S., Petri I., Boros M.: Interaction of endothelin and nitric oxide in cardiac effects of colloid-crystalloid volume expansion. *Perfusion* 8: 366, 2000.
6. Kaszaki J., **Molnár G.**, Eszlári E., Csonka E., Nagy S., Petri I., Boros M.: The role of mast cells and endothelin-1 in the circulatory effects of colloid-crystalloid resuscitation fluids. *European Surgical Research* 33: 155, 2001.

## 71. BEVEZETÉS

A nitrogén monoxid (NO) a kardiovaszkuláris rendszer széles spektrumú regulátora. Az NO folyamatos, de térben és időben változó mértékű termeléséért az NO szintetáz (NOS) izoenzim család a felelős, és a csökkenő, vagy növekvő NO szintek keringési következményei jól vizsgálhatók NO donorokkal, NOS inhibitorokkal és genetikailag módosított modellekkel egyaránt. Bár az NO-t elsősorban perifériás vazoaktív mediátornak tekintik, az emlősszívben a NOS mindhárom izoformája megtalálható és az NO-nak több centrális hatása is ismert: fokozza a szívizom relaxációját és diasztolés funkcióját, fokozza, vagy mérsékli a  $\beta$ -adrenerg választ, módosítja az erő-frekvencia kapcsolatot, és a paraszimpatikus kolinerg hatásokat is közvetítheti. Összességében mindez arra utal, hogy az NO szerepet játszhat a szívkontraktilitás szabályozásában is, ám ez a kérdés még ma is ellentmondásos - főképp az NO képződés mesterséges megváltoztatásával kapott kísérletes eredmények túlzott extrapolációja miatt. Az ellentétes eredményeket az is magyarázhatja, hogy a lokális NO képződés olyan folyamatokat befolyásol, amelyek önmagukban is a szívkontraktilitás változásához vezetnek. E mechanizmusok szerepe és összefüggése az NO-hoz kapcsolt szívizom válaszok szabályozásában jórészt tisztázatlan, de több, indirekt adat utal egy komplex bioaktív mechanizmus, az endothelin (ET) rendszer szerepére és jelentőségére.

Az NO képződés befolyásolható hipertóniás-hiperonkotikus (HSD) oldatokkal is. A heveny keringési elégtelenség kezelésében a HSD oldattal történő kis volumenű folyadékpótlás hatásosan javítja a kardiovaszkuláris funkciókat, sokkal hatékonyabban, mint izotóniás oldatokkal. A folyadékterápia elsődleges célszerve a vaszkuláris endothelium, mely érzékeny érzékelő és jelátvivő felszín a keringő vér és az erek fala között, az egész szervezetben. Az endothelben számos vazoaktív mediátor képződik és szabadul fel, amelyek közül az NO folyamatos termelődésének legfontosabb élettani ingere a nyíróerő, mely az áramló vér és az ér endothel lumen felületén között jön létre. Ugyanakkor kérdéses, hogy NO hiányos állapotban, amely számos klinikai kórkép esetén előfordul (pl. arterioszklerózis, diabétesz, hipertónia), a HSD alkalmazása milyen módon befolyásolja a keringési reakciókat.

A fentiek ismeretében *in vivo* állatkísérletekben élettani körülmények között, illetve hipertóniás-hiperonkotikus folyadék terápia alkalmazása során megvizsgáltuk és jellemeztük az L-arginin analóg, nem szelektív NOS inhibitor  $N^G$ -nitro-L-arginin okozta NO szintézis gátlás perifériás és kardiális keringési következményeit, különös tekintettel a miokardiális kontraktilitást moduláló hatások jellemzésére.

## 1.1. Az NO képződése

Az NO gázhalmazállapotú szabadgyök, mely jelátvivő, jeltovábbító tulajdonságánál fogva számos biológiai folyamatban tölt be fontos szerepet. A szervezetben az NO három különböző NOS izoenzim – a neuronális (nNOS), az indukálható (iNOS) és az endotheliális (eNOS) – révén képződik L-argininből oxigén és NADPH segítségével, miközben L-citrullin keletkezik (Palmer 1988). A NOS enzimek közé a neuronális NO szintáz (nNOS), az indukálható NO szintáz (iNOS) és az endotheliális NO szintáz (eNOS) sorolható. Az nNOS és eNOS izoenzimek aktivációja  $Ca^{2+}$ /calmodulin által befolyásolt, összefoglaló elnevezésük konstitutív NOS (cNOS). Az iNOS működéséhez nem szükséges  $Ca^{2+}$ . A cNOS által termelt NO a szervezet normál, fiziológiai folyamataiban vesz részt, míg az iNOS aktiválódása a pathofiziológiai állapotokra jellemző (Moncada 1991).

A kutatások azt igazolták, hogy a szervezet legtöbb sejtjében megtalálható mindhárom NOS izoenzim. Maga az NO rendkívül reakcióképes szabadgyök, biológiai fél életideje néhány szekundum. Speciális membrán receptora nincs, mivel szabadon diffundál a sejthártyán, s ez a tulajdonsága alkalmassá teszi arra, hogy parakrin és autokrin szabályzásokban vegyen részt.

A cNOS aktivációja két úton lehetséges, melyek az intracelluláris  $Ca^{2+}$  raktárakat mobilizálják. 1. A véráramlás által az endotheliumra kifejtett nyíróerő révén (áramlás-függő NO képződés). 2. Vazoaktív mediátorok endotheliális receptorának aktivációja útján (receptor közvetített NO képződés).

A fagocitákban levő iNOS szerepe elsősorban a gyulladási-és immunfolyamatokban bizonyított. Nyugvó állapotban, fiziológiai körülmények között az enzim aktivitása nagyon alacsony. A gyulladási mediátorok (pl. bakteriális endotoxin, citokinek, tumor nekrosis faktor  $\alpha$ ) hatására aktiválódó enzim ezerszer több NO termelésére képes, mint a cNOS. A korábbiakkal ellentétben ugyanakkor az újabb kutatási eredmények arra utalnak, hogy az iNOS nem elsősorban a gyulladási sejtdestrukcióban, hanem inkább a celluláris stressz állapotok védelmi mechanizmusában játszik szerepet (Buttery 1996, Suschek 1999).

## 1.2. Az NO keringési hatásai

Az NO a kardiovaszkuláris homeosztázis fontos regulátora: szabályozza a szisztémás keringési paramétereket, mint pl. a vérnyomást, a teljes perifériás ellenállást, és a centrális vénás nyomást. Egyik legfontosabb hatása, hogy gátolja az érfal simaizom sejtjeinek kontrakcióját, ezáltal alapvetően meghatározza az erek tónusát. A trombocita aggregáció és adhézió gátlása révén befolyásolja az erek hemosztázisát is. Szerepet játszik a gyulladási

reakciókban is, pl. a leukocita-endothel sejt interakció során. Hosszabb távon hat a vaszkuláris remodellingre és az érképződésre is. Bár számos testi sejt előállíthatja, a regionális véráramlást döntően az érbelhártya eNOS izoenzimje által termelt NO befolyásolja. Ugyanakkor újabb kutatások szerint a mikrovaszkuláris tónus dinamikus, a pulzushullám terjedését meghatározó szabályzásában az endotheliális nNOS is aktívan részt vesz.

### **1.3. Az NO kardiális hatásai**

Az a tény, hogy a szívizomsejtben a NOS mindhárom izoenzimje megtalálható, számos érdekes kérdést vet fel az NO kardiális hatásait illetően. Igazolták, hogy az NO fokozza a miokardium relaxációját és javítja a szív diasztolés működését, gátolhatja és serkentheti is a  $\beta$  adrenerg stimulációra adott választ, modulálja az erő-frekvencia kapcsolatot, valamint közvetíti a paraszimpatikus kolinerg hatásokat (Casadei 2003, Balligand 1993, Cotton 2001, Han 1994).

Az NO cGMP által közvetített módon csökkenti a szívizom diasztolés rigiditását és így a szubendokardiális koronária perfúzió javításával fokozza az oxigén kínálatot. Csökkenti a szív felesleges ATP felhasználását és oxigén igényét és ez által kedvezően befolyásolja a miokardium energiaháztartását. Az energiatermelő oxidatív folyamatok pozitív regulátora. A fenti komplex hatásmechanizmus nem meglepő, ha figyelembe vesszük az NO celluláris forrásainak változatosságát, a NOS izoenzimek sejten belüli diverzitását vagy az intracelluláris támadáspontok sokféleségét.

Az NO kardiális hatásai közül talán a szívkontraktilitás a leginkább vitatott, s ez a legkevésbé ismert paraméter. Számos szerző az NO pozitív inotrop, míg más mások az NO negatív inotrop hatásáról számolnak be (Brunner 2001, Barouch 2002). Az utóbbi évek kutatásai tisztázták, hogy fiziológiás körülmények között és alacsony  $\beta$  adrenerg stimuláció esetén az NO kis dózisban pozitív inotrop, nagyobb dózisban pedig negatív inotrop hatású. Fokozott  $\beta$  adrenerg állapotban az NO negatív inotrop hatása érvényesül.

Az NO biológiai hasznosulását és hatását a szívben számos tényező befolyásolja. A szabadgyök fogó mioglobinnal csökkenti a szabad NO mennyiségét és így gátolja annak hatásait. Az oxidatív stressz során képződő reaktív oxigén vegyületek az NO megkötésével peroxynitrit képződéshez vezetnek, mely a NOS ismert inhibitora (Sheehy 1998, Ovadia 2002). Másrészt ez a vegyület a kontraktilis fehérjék nitrálásával a szív pumpafunkciójának romlását idézheti elő.

#### **1.4. A csökkent NO termelés következményei**

Az endothelium sértetlensége alapvető fontosságú a véráramlás által szabályozott, NO függő vazodilatáció megőrzésében. Emellett az is igazolódott, hogy az endothelium diszfunkció csökkent NO termelést eredményez (Dixon 2005).

Az érfalra ható nyíróerő (*shear stress*) fontos regulátora az endothelium működésének és hosszabb távon a vaszkuláris fenotípust is meghatározza. A tartósan emelkedett nyíróerő atheroprotektív hatású, míg a csökkent *shear stress* atherogenetikus transzformációt okoz (Malek 1999). A flow-mediált vazoreguláció zavarai kóros állapotok kialakulásához is vezetnek. Az olyan, gyakori humán betegségek, mint az arterioszklerózis, a diabétesz vagy a hipertónia esetében az endotheliális NO károsodott metabolizmusa igazolható.

Az elhúzódó endothel sejt diszfunkció további kedvezőtlen következménye az érfal simaizom sejtjeinek proliferációja és az érintett érszakasz szűkülete lehet. Katéteres angioplasztikát követő re-sztenózis hátterében a neointima csökkent NO termelése és diszfunkciója révén miointimális proliferáció alakul ki. A koleszterin a kardiovaszkuláris morbiditás és az arterioszklerózis fontos rizikófaktora. Hiperkoleszterémia esetén az endothelium redox státusza megváltozik, szabadgyökök képződnek, melyek az NO szintézis, továbbá az endothelium funkció károsodását okozzák.

Az NO hiánya további atherogenetikus következményekkel is járhat: fokozódik a tromboziskészség, nő a sejtfelszíni adhéziós molekula 1 expressziója, fokozódik a leukocita-endothel interakció. A fentiek alapján megállapítható, hogy az NO igen fontos atheroprotektív molekula (Topper 1996).

#### **1.5. A hipertóniás volumenpótlás jelentősége**

Az intravénás folyadékterápia fő célja a szervek oxigénellátásához szükséges, megfelelő vérkeringés fenntartása vagy helyreállítása. Akut kórállapotokban a kis volumenű, krisztalloid, kolloid HSD oldattal történő volumenpótlás hatékonyan javítja a károsodott keringési paramétereket. Növeli a plazmavolumen, a vérnyomást és a perctérfogatot, csökkenti a teljes perifériás ellenállást. Helyreállítja a kapillárisok keringését, és a szöveti perfúziót, ezáltal fokozva a sejtek oxigén kínálatát (Vollmar 2004).

A vaszkuláris endothelium a folyadékterápia elsődleges célszerve. A HSD kezelés jelentős ozmotikus stresszt és nyíróerő növekedést okoz az erek belső felszínén. Ez a hatás endotheliális eredetű vasoaktív mediátorok felszabadulásához vezethet, melyek részt vesznek a HSD hatásainak kialakulásában (Miller 1992, Kuchan 1993). Az érbelhártya épsége tehát kulcsfontosságú a volumenpótlás kedvező keringési effektusának létrejöttében.

A klinikai tanulmányok eddig nem jelezték, hogy a HSD alkalmazása hosszú távon kedvezőtlenül hatna a végkimenetelre (pl. a növelné a mortalitást), de ennek ellenkezőjét (pl. a mortalitás csökkenését) sem igazolták (Wade 1997, Younes 1997). Ugyanakkor néhány állatkísérletes tanulmány fokozott vérvesztést és mortalitást mutatott ki HSD terápia után (Krausz 1995).

## **2. CÉLKITŰZÉSEK**

Kísérleteink általános célja a csökkent NO termelés keringési hatásainak vizsgálata volt normovolémiás állapotban és hipertóniás-hiperonkotikus folyadékterápia alkalmazása esetén.

Első célkitűzésünk egy olyan kísérleti rendszer kialakítása volt, ami felderítheti a nem specifikus NOS gátlással járó másodlagos reakciók hátterét, külön hangsúlyt fektetve a szívkontraktilitás modulációjára.

Második célkitűzésünk a HSD okozta gyors volumen expanzió keringési következményeinek vizsgálata volt nem specifikus NOS inhibitor előkezeléssel, vagy anélkül. E célból 7.2% NaCl-10% dextran-40 oldatot és L-arginin analóg N<sup>G</sup>-nitro-L-arginin előkezelést alkalmaztunk.

## **3. MÓDSZEREK**

Kísérleteinket Na-pentobarbitállal (30 mg kg<sup>-1</sup> i.v.) altatott kutyákon (17±2.8 kg) végeztük, a Szegedi Tudományegyetem Állatvédő Etikai Bizottságának jóváhagyásával. Az állatokat hemodinamikai monitorozás céljából instrumentáltuk (artériás, vénás katéterek, Swan-Ganz katéter, katétervég mikromanométer). Thoracotomia után ultrahangos távolságmérő kristálypárt ültettünk a bal kamra falába a kamrai rövid átmérő (LVD) mérésére, majd drain felett zártuk a mellkasfalat. Az állatok spontán lélegeztek, a műtéti periódus alatt 15 ml kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> Ringer-laktát infúziót kaptak.

### **Hemodinamikai mérőmódszerek**

Regisztráltuk az artériás középnyomást (MAP), a centrális vénás nyomást (CVP), a perctérfogatot, mint szívindexet (Swan-Ganz katéterrel; CI), a balkamrai nyomást (LVP) katétervég mikromanométerrel (Millar, USA) monitoroztuk. A jeleket számítógépes adatgyűjtő rendszerrel regisztráltunk (Experimetria, Budapest). A kontraktilitás meghatározása számítógépes programmal az LVP és LVD értékek sorozatmérésével, a vég-

szisztolés nyomás-átmérő összefüggés (ESPDR) analízise alapján történt, az értékeket a balkamrai nyomás-átmérő hurkok vég-szisztolés pontjaira illesztett egyenes meredekségéből számítottuk (Kaszaki 1996).

### **Biokémiai mérések**

A plazma minták ET-1 tartalmát ELISA módszerrel (Biomedica, Ausztria), a plazma nitrit/nitrát ( $\text{NO}_x$ ) szintjét Griess reakcióval határoztunk meg (Moshage 1995). A teljes vér szabadgyök termelő kapacitását kemiluminometriás módszerrel detektáltuk (Zimmermann 1991).

A szívsvövetet proteáz gátlókkal kiegészített Trisz-HCl pufferrel (0.1 M, pH=7.4) homogenizáltuk, majd 4 °C-on 20 percig 24000 g-vel centrifugáltuk. A kapott üledékből mieloperoxidáz (MPO), a felülúszóból xantin oxidoreduktáz (XOR) aktivitást határoztunk meg. Az üledéket detergens hozzáadása és olvasztás-fagyasztás háromszori ismétlésével feltártuk, újra centrifugáltuk, majd az MPO meghatározása 3,3'-5.5'-tetrametilbenzidin hidrogén-peroxid függő, fotométerrel nyomon követhető oxidációja alapján történt (Kuebler 1996). A XOR aktivitást, amely a szuperoxid gyök termelés egyik forrása a szövetekben, a felülúszóból határoztuk meg fluorometriás kinetikus módszer segítségével. A mérés során a XOR természetes szubsztrátja (a hypoxantin-xantin) helyett annak fluoreszkáló analógját (pterin-izoxantopterin) használtunk (Beckman 1989).

A szöveti NOS enzim aktivitásának meghatározásához a  $^3\text{H}$ -arginin- $^3\text{H}$ -citrullin konverzió alapuló metodikát használtuk (Szabó 1993). A homogenizátum felülúszóját először arginin mentesítettük (kation cserélő gyanta alkalmazásával), majd molekulásúly szűrővel a 100 ezernél kisebb molekulásúlyú fehérjéktől tisztítottuk (Amicon Centricon-100; 100000 Mw cut-off ultrafilter). A reakcióelegy a cNOS működéséhez szükséges kofaktorokat (kálcium, tetrahidrobiopterin, NADPH, kalmodulin), valamint a fenti enzimkoncentrátumból 70  $\mu\text{l}$ -t tartalmazott. A reakció 0.4  $\mu\text{Ci}$  triciált arginin hozzáadásával indult. Az enzim működése során NO és tríciummal jelzett citrullin keletkezik, amely mennyisége arányos az enzim aktivitásával. A reakcióelegyből kationcserélő kromatográfiás gyantával a triciált citrullint elválasztottuk és az eluátum trícium tartalmát folyadék szcintillációs módszerrel határoztuk meg. A kapott aktivitásból és a mintából mért protein tartalomból adtuk meg a NOS aktivitást.

### **Kísérleti protokollok**

Az első kísérlet sorozatban az állatok első csoportját (n=7) 0.9%-os fiziológiás sóoldattal kezeltük, míg a második (n=7) és harmadik csoport (n=7) 4 mg  $\text{kg}^{-1}$  NNA (Sigma,



USA) kezelést kapott. A harmadik csoport szelektív ET-A receptor antagonistá ETR-P1/fl peptid előkezelést kapott (Kurabo Ltd. Osaka, Japan, 100 nmol kg<sup>-1</sup> iv) az NNA kezelés előtt 30 perccel. A kezeléseket után 135 percig figyeltük a paraméterek változását, a hemodinamikai méréseket 30 percnként végeztünk. A kísérletek végén szívizom biopsziát vettünk a balkamra falából, ezután az állatokat Na-pentobarbitállal túlaltattuk.

A második kísérlet sorozat állatait további 3 csoportba osztottuk. Az állatok negyedik csoportja, a hipertóniás-hiperonkotikus volumen terápia kontrolljaként szolgált, így 4 ml kg<sup>-1</sup> fizioológias sóoldatot kaptak 15 percig (n=10). Az ötödik (n=7) és a hatodik (n=7) csoport állatainak 4 ml kg<sup>-1</sup> HSD-t (7.2% NaCl-10% dextran 40 oldat) infundáltunk 15 percen keresztül. A 6. csoportban az állatok a HSD infúzió előtt 4 mg kg<sup>-1</sup> NNA kezelést kaptak iv. A volumen terápia hatásait 120 percen át monitoroztuk, a kísérletek végén szívizom biopsziát vettünk.

### **Statisztikai analízis**

A csoporton belüli eltéréseket Friedman és Dunn próbával, a csoportok közötti különbségeket Kruskal-Wallis és Dunn próbával elemeztük. Az ábrákon a medián értéket és a szórás jellemzésére a 25. és 75. percentilist tüntettük fel.

## **4. EREDMÉNYEK**

### **4.1. A csökkent NO termelés következményei normál állapotban**

#### **Hemodinamikai változások**

Az NNA infúzió tartósan emelte az MAP-t, a perifériás érellenállás (TPR) pedig közel kétszeresére emelkedett az alapértékhez képest. A nem specifikus NOS gátlás mintegy 25%-os CI csökkenéssel és szignifikáns szívkontraktilitás fokozódással járt, ugyanakkor a szívfrekvencia és a balkamrai szisztolés-diasztolés átmérő is szignifikánsan csökkent.

Az ET-A receptor antagonistá ETR-P1/fl peptid előkezelés mérsékelte az NNA által okozott vérnyomás emelkedést, és hatékonyan ellensúlyozta a TPR növekedését a vizsgált időszak első 60 percében. Az ETR-P1/fl peptid előkezelés szignifikánsan gátolta az NNA hatására kialakuló CI csökkenést, a balkamrai szisztolés-diasztolés átmérő csökkenését, valamint a szívkontraktilitás növekedését is.

## **Biokémiai változások**

A nem szelektív NOS gátlás szignifikánsan csökkentette a plazma NO<sub>x</sub> szintjét. A plazma ET-1 koncentrációja folyamatosan, közel másfélszeresére emelkedett az NNA infúzió után és szignifikánsan magasabb szinten maradt, egészen a megfigyelési időszak a 120. percéig, ezzel párhuzamosan a teljes vérben ötszörösére emelkedett a szabadgyök produkció.

Az ETR-P1/fl-peptid előkezelés kivédte az NNA által okozott plazma ET-1 szint emelkedését a vizsgálat ideje alatt és szignifikánsan gátolta a szabadgyök túltermelést is. A plazma NO<sub>x</sub> szintje szignifikánsan magasabb volt az ET-A receptor antagonistá előkezelés után az NNA-val kezelt csoporthoz képest. Az NNA kezelést követő 135 perccel a miokardium XOR aktivitása szignifikánsan emelkedett, amelyet az ET-A antagonistá előkezelés csökkentett.

## **4.2. A csökkent NO termelés következményei hipertóniás-hiperonkotikus folyadékterápia során.**

### **Hemodinamikai változások**

A HSD kezelés a MAP és a CVP átmenti emelkedését eredményezte, valamint a TPR bifázisos változását idézte elő: a korai posztinfúziós szakban kezdeti csökkenést követően visszatért a kiindulási értékre, majd a késői posztinfúziós periódusban szignifikánsan emelkedett. Az NNA előkezelés további MAP emelkedést okozott, de a két HSD csoport között nem volt szignifikáns különbség. Az NNA+HSD-vel kezelt állatokban szignifikáns, elhúzó CVP és TPR növekedést észleltünk a többi csoporthoz viszonyítva. A HSD okozta volumen expanzió a korai posztinfúziós fázisban szignifikáns szívindex és koszorúér áramlás emelkedését, jelentős bal kamrai átmérő növekedést és szignifikáns, 60 perces szívkontraktilitás növekedést idézett elő. A szívfrekvencia a HSD kezelés után fokozatosan emelkedett a kísérlet végéig.

Az NNA előkezelés 60 percig szignifikánsan gátolta a HSD okozta CI növekedést, valamint mérsékelte a szívfrekvencia emelkedését. A nem szelektív NOS gátlás megakadályozta a coronaria áramlás növekedését a HSD kezelést követően. A korai fázisban az LVD növekedését egyértelműen nem változtatta meg, de a késői időszakban e paraméter szignifikáns csökkenését okozta a többi csoporthoz képest. NNA hatására a szívkontraktilitás háromfázisú változását figyeltük meg: NNA hatására az ESPDR a volumen-terhelés előtt emelkedett, a HSD adása után 60 percig szignifikánsan csökkent, majd a posztinfúziós időszak végéig fokozatosan ismét emelkedett.

## **Biokémiai változások**

A HSD infúzió végére a plazma ET-1 tartalma szignifikánsan emelkedett a kontroll csoporttal összehasonlítva, a növekedés a megfigyelési időszak végéig fennállt. Ezzel párhuzamosan a plazma NO<sub>x</sub> tartalma 45 percig emelkedett a kontrol csoporthoz viszonyítva. Az NNA előkezelés szignifikánsan fokozta a HSD adás után mérhető ET-1 szintnövekedést, ugyanakkor a NOS gátlás egyértelmű NO<sub>x</sub> szint csökkenést okozott a teljes vizsgálati periódusban.

A HSD infúziót követő 120. percben, a szívszövet cNOS aktivitása statisztikailag alacsonyabb volt a kontrol csoportban dokumentált értéknél, míg a szövetmintákból mért MPO aktivitás számottevően emelkedett. A nem szelektív NOS inhibitor előkezelés tovább fokozta a HSD adása után 120 perccel észlelt cNOS aktivitás csökkenést, de a két csoportban mért NOS értékek között nem volt statisztikailag szignifikáns különbség. Az NNA adása növelte a miokardium MPO aktivitását a kontroll csoporthoz viszonyítva, de a HSD-vel kezelt csoportok között nem volt szignifikáns különbség.

## **5. MEGBESZÉLÉS**

Élettani körülmények között a nem specifikus NOS gátlás egyértelműen fokozta a szívkontraktilitást. Ugyanakkor az is egyértelművé vált, hogy az NO hiány egyik lényeges keringési következménye mögött (vagyis az NO deficiencia miatt kialakuló kontraktilitás fokozódás hátterében) további, függő változó mutatható ki. Az NO hiányát szignifikáns ET-1 felszabadulás kísérte. A nem specifikus NOS gátlás tehát az NO szupresszív, szabályozó szerepét igazolja: az endogén NO korlátozza, vagy ellensúlyozza azokat a mechanizmusokat, melyek NO hiányában fokozzák a szívizom kontraktilitását.

Protokollunkban a szívizom kontraktilitás mértékét az előterheléstől független balkamrai vég-szisztolés nyomás-átmérő összefüggésből számítottuk, és (korábbi eredményeinkkel összehangban) igazoltuk az NNA kezelés szignifikáns szívkontraktilitás fokozó hatását (Kaszaki 1996). Vizsgálatunk igazolta az NNA által kiváltott NOS gátlás hatékonyságát is: ezt bizonyítja a csökkenő plazma NO<sub>x</sub> szint, az elhúzó MAP és TPR emelkedés, valamint a csökkenő perctérfogat és szívfrekvencia. Ezen túlmenően, az adatok azt is igazolták, hogy az NNA által kiváltott szívkontraktilitás növekedés több folyamat közös eredője lehet.

A NOS gátlás egyik fontos következménye a pozitív és negatív inotróp ágensek (és a vazokonstriktív-vazodilatáció) közötti eltolódás lehet. Mivel az NO mérsékelheti az ET-1 képződést (Boulangier 1990, Kourembanas 1993), az NO szintézis gátlása emelkedett plazma ET-1 szintet eredményezhet (Richard 1995, Filep 1997). Az is igazolható, hogy a NOS gátlását követő presszor mechanizmus sokkal inkább az ET-A/ET-B receptor aktiváció növekedésével, mintsem az alfa-1, angiotenzin-1, vazopresszin V1/V2 receptorok aktivációjával függ össze (Banting 1996). A NOS gátlás egy másik, figyelemre méltó következménye, a perctérfogat csökkenése, amely a szív frekvencia és a balkamrai szisztolés-diasztolés átmérő csökkenésével magyarázható (Prendergast 1997).

A NOS gátlás további következménye, a vér szabadgyök termelő képességének fokozódása. Az előbbi folyamat egyenes következménye az NO hiány által kiváltott ET-1 emelkedésnek, amely egyrészt intracelluláris szuperoxid termelést eredményez (NADPH oxidázon keresztül), másrészt a vér sejtjeinek, elsősorban a leukocitáknak a szabadgyök termelését aktiválja (Caldiz 2007). Mivel az ET-A receptor antagonistá kezeléssel felfüggesztette az NNA által kiváltott szuperoxid termelést, ez megerősíti a folyamat ET-1 dependens jellegét.

A nem szelektív NOS gátlás speciális vonatkozása, a miokardiális XOR aktivitás emelkedése. Az nNOS és XOR a szívizom sejtjein belül, térben egymáshoz szoros közelségben helyezkednek el és az nNOS eredetű NO a XOR aktivitás endogén inhibitoraként ismert (Hassoun 1995, Khan 2004). Mivel az ETR-P1/fl peptid hatékonyan emelte a plazma NO<sub>x</sub> szintjét, kevésbé érvényesült a NOS gátlás NO termelést csökkentő hatása. A megmaradt miokardiális NO szint elegendőnek bizonyult a XOR aktivitás féken tartására.

Az endothelin receptorok szerepére a szelektív ET-A antagonistá ETR-p1/fl peptid segítségével következtettünk (Baranyi 1995, Baranyi 1998). Kísérletünk bizonyítja, hogy a NOS gátlást követően, ET-A receptor függő pozitív inotróp válasz jön létre és rávilágít arra, hogy az NNA által okozott keringési reakciók összefüggésben állnak az ET-hez közvetlenül kapcsolódó hemodinamikai és sejtaktivitást befolyásoló válaszokkal.

Így mindezt figyelembe véve, a nem specifikus NOS gátlás hatása legalább három ponton keresztül érvényesül: közvetíti a vazokonstriktív/kontraktilitás válaszokat, stimulálja a vér sejtjeinek szabadgyök termelését és fokozza a miokardiális XOR aktivitást.

A HSD volumen terápia hatására a korai fázisban észlelt jelentős kontraktilitás fokozódás több folyamat eredőjeként értelmezhető. Hemodinamikai szempontból, az LVD növekedés által jelzett előterhelés növekedés, a koronária áramlás szignifikáns fokozódása (Gregg effektus) valamint a szívfrekvencia emelkedése (force-frequency relationship) is

felelős lehet a pozitív inotrop hatásért. Azonban ezen hemodinamikai paraméterek mellett figyelembe kell venni a HSD infúzió hatására felszabaduló/aktiválódó vasoaktív mediátorok hatását is. Számos tanulmányban tesznek említést volumen expanzió során pozitív inotrop hatású mediátorok fokozott felszabadulásáról, többek között a renin–angiotenzin, noradrenalin és az ET-1 felszabadulásáról számoltak be (Wade 1991, Elgjo 1994, Boldt 1994). Kísérleti eredményeink is megerősítették az ET-1 domináns szerepét a folyamatban, mivel az ET-1 plazmaszintje a HSD infúziót követően végig emelkedett maradt. Figyelembe véve a molekula rövid felezési idejét, feltételezhető, hogy volumen expanzió okozta mechanikai stimulusok hatására folyamatosan szabadul fel az ET-1 a celluláris raktárakból.

A HSD kiváltotta nyíróerő fokozódás az ET-1 mellett a korai fázisban az NO szintézis fokozódásához is vezet, melyet a plazma  $\text{NO}_x$  szint 60 perces emelkedése igazol. Ismert, hogy az NO dózis-függő módon képes fokozni a szívkontraktilitást (Massion 2003), így ebben a koncentrációban szintén hozzájárulhatott a HSD korai pozitív inotrop hatásának kialakulásához.

A HSD adását követően a koronária áramlás és a szívkontraktilitás a kontrol szintre esett vissza, az LVD és a CI jelentős csökkenése mellett. A posztinfúziós periódusban, a kísérlet végére a miokardiális cNOS aktivitás szignifikánsan csökkent, az ET-1 által stimulált leukocita aktiváció eredményeként pedig fokozott szívszöveti MPO aktivitás volt mérhető. Irodalmi adatok szerint, az ET-1 szint szignifikáns növekedése csökkenti a plazma NO szintjét, mivel keringési elégtelenséggel járó patológiai állapotokban vagy sebészeti beavatkozások során, az emelkedett ET-1 szint csökkent NO termeléssel párosul (Warner 1999, Ovadia 2002).

A HSD által kiváltott pozitív inotrop hatás 60 perc elteltével drasztikusan esett vissza az alapszintre, amely nem indokolható az inotrop ágensek szintjének csökkenésével. A magyarázat erre a jelenségre, a kontraktilis elemek protein szintű módosulása lehet, amely háttérben az ET-1 és az MPO aktiválódás által stimulált oxigén és nitrogén szabadgyökök által okozott protein nitráció folyamata állhat (Borbely 2005). Ezek az adatok jelzik, hogy a HSD a kezdeti pozitív hatások után egy nem várt, hemodinamikailag előnytelen állapotot eredményezhet.

A nem szelektív NOS gátló előkezelés eredményességét a HSD infúzió ellenére a megfigyelési idő teljes tartama alatt észlelt, a kontrollhoz viszonyítva is szignifikánsan alacsonyabb plazma  $\text{NO}_x$  értékek, valamint a csökkent cNOS aktivitás bizonyítja. Ezzel párhuzamosan az ET szint a kezelt HSD csoporthoz képest is jelentősen emelkedett.

Hemodinamikai szempontból az NNA a HSD kezelés előnyös hatásait már a korai fázisban is hátrányosan befolyásolta. A szívkontraktilitás és a koronária áramlás a kontrollhoz viszonyítva a HSD hatására nem emelkedett, a CI jelentősen csökkent, a TPR szembetűnően emelkedett. A szívkontraktilitás fokozódása rendkívül energiaigényes folyamat, amely csak megfelelő oxigén ellátás-fogyasztás egyensúly fenntartása mellett jöhet létre. Kísérletünkben a NNA + HSD hatására, az ET-1 plazmaszintjének jelentős emelkedése - az NO hiánya mellett - olyan koronária vazokonstriktiót okoz, mely az oxigén kínálat csökkenésén keresztül vezet a pumpafunkció gyengüléséhez (Juhász-Nagy 1999). Ugyanakkor az NNA+HSD kezelést követő késői fázisban a koronária keringés a fennálló vazokonstriktor hatások ellenére sem romlik tovább, mely a szív adenzin mediálta keringés autoregulációjával állhat összefüggésben (Zima 2002). Ennek köszönhetően az oxigén kínálat is javul, és a javuló energetikai állapot lehetővé teszi a pozitív inotróp mediátorok (ET-1, noradrenalin, renin-angiotenzin) hatásának érvényesülését, amely magyarázhatja a kísérlet végén tapasztalt bal-kamrai kontraktilitás növekedését.

## **6. A TÉZIS FONTOSABB MEGÁLLAPÍTÁSAI**

- I. Normál állapotban a csökkent NO termelésnek olyan másodlagos következményei lehetnek, melyek az NO igény és kínálat közötti aránytalanság miatt a miokardium kontraktilitás fokozódásához vezetnek. Az NO szintézis gátlása szabadgyök felszabadulást, miokardiális XOR aktivitás növekedést, a vazokonstriktor hatások felerősödését és pozitív inotrópiát eredményez ET-A receptor dependens folyamatok közvetítésével.
- II. A HSD volumen terápia mechanikai stimulus révén NO és vazokonstriktor mediátor felszabadulást eredményez, melyek a vazomotor és az inotrop egyensúly felborulásához vezetnek és hosszabb távon előnytelen következményekkel járnak.
- III. A miokardium kontraktilitásának fokozódása a HSD alkalmazásának indirekt következménye, amelyben az NO-dependens koszorúér keringés meghatározó tényező.
- IV. A HSD-vel végzett folyadékterápia a rövid távú előnyt követően, végső soron hemodinamikai szempontból kedvezőtlen helyzetet idéz elő - így NO hiányos állapotokban a HSD hatékonysága tovább csökkenhet.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném kifejezni hálámat **Petri István Professor Úrnak**, a szentesi Dr. Bugyi István Kórház Sebészeti Osztály vezetőjének, főnökömnek, aki a gyakorlati sebészetén túl a tudomány művelésére is nevelt és támogatta ez irányú törekvéseimet.

Köszönettel tartozom *Nagy Sándor és Boros Mihály Professor Uraknak* tudományos munkám irányításáért. Nagyra értékelem támogatásukat, mellyel annyi éven át volt lehetőségem a vezetésük alatt álló intézetben dolgozni.

Különleges hálával tartozom témavezetőmnek, *Kaszaki József Tanár Úrnak*, aki személyesen irányított és vezetett be a kísérletes sebészet rejtelseibe. Folyamatos bátorítása, soha nem múló lelkesedése, baráti tanácsai sok nehéz helyzetben segítettek, hogy a klinikai munka mellett a tudományos kutatás is fontos maradjon számomra.

Köszönöm az Intézet dolgozóinak hogy szakértelmükkel, pontos munkájukkal hozzájárultak a kísérletek eredményeihez.

Végül külön köszönöm Feleségemnek, Szüleimnek és egész családomnak a kitartást, a biztatást, a harmonikus háttérrel, melyből erőt meríthettem ehhez a munkához.