

**A metánemisszió valós idejű detektálása a bélmikrokeringési változások  
monitorozására**

**Dr. Bársony Anett Gabriella**

**Ph.D. Thesis**

**Szegedi Tudományegyetem, Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar**

**Sebészeti Műtéttani Intézet**

**Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola**

**Témavezetők:**

**Dr. Varga Gabriella, PhD**

**Dr. Érces Dániel, PhD**

**2025**

**Szeged**

## **A TÉZIS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ LEKTORÁLT FOLYÓIRATBAN MEGJELENT TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK**

- I. **Bársony A**, Vida N, Gajda Á, Rutai A, Mohácsi Á, Szabó A, Boros M, Varga G, Érces D. Methane Exhalation Can Monitor the Microcirculatory Changes of the Intestinal Mucosa in a Large Animal Model of Hemorrhage and Fluid Resuscitation. *Front Med* 2020; 7:567260. doi: 10.3389/fmed.2020.567260. eCollection 2020. **IF: 4,59**
- II. Ugocsai M, **Bársony A**, Varga RA, Gajda Á, Vida N, Lajkó N, Rónaszéki B, Tóth G, Boros M, Érces D, Varga G. Conjugation with Tris decreases the risk of ketoprofen-induced mucosal damage and reduces inflammation-associated methane production in a rat model of colitis. *Pharmaceutics* 2023; 15 (9): 2329 **IF: 3,24**

**Kumulatív impakt faktor: 7,83**

## **A TÉZIS TÉMÁJÁHOZ SZOROSAN KAPCSOLÓDÓ TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK, AMELYEK NEM KÉPEZIK A TÉZIS TÁRGYÁT**

- I. Vida N, Varga Z, Szabó-Biczók A, Bari G, Vigyikán G, Hodoniczki Á, Gajda Á, RutaiA, Juhász L, Tallósy SP, Turkevi-Nagy S, **Bársony A**, Öveges N, Szabó A, Boros M, Varga, G, Érces D. Methane administration during oxygenation mitigates acute kidney injury in a pig model of 24-hour veno-venous extracorporeal membrane oxygenation. *Shock* 2025; *in press* **IF: 2,7**

## **A TÉZIS TÉMÁJÁHOZ NEM KAPCSOLÓDÓ LEKTORÁLT FOLYÓIRATBAN MEGJELENT TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK**

- I. Lázár G, Paszt A, Simonka Z, **Bársony A**, Ábrahám S, Horváth G. A successful strategy for surgical treatment of Boerhaave's syndrome. *Surgical endoscopy*. 2011; 25(11), 3613-3619. DOI: 10.1007/s00464-011-1767-1 **IF: 4,013**

**Kumulatív impakt faktor: 15,25**

## **1. BEVEZETÉS**

### **1.1 A gasztrointesztinális rendszer makro- és mikrokeringése**

A gasztrointesztinális (GI) traktus vérellátását egy komplex arteriolás hálózat biztosítja, amely a bélfal különböző rétegeit látja el. A bélfalban az arteriolák a vasa rectából erednek, majd a szubmukóza rétegben artériás plexusokat alkotnak, amelyek tovább ágazva kapilláris hálózatokat hoznak létre. A GI traktus véráramlásának mintegy 80%-a a nyálkahártyába, míg körülbelül 20%-a az izomrétegbe irányul. A bélmotilitás, amely az izomrétegek aktivitásától függ, jelentős mértékben befolyásolja a nyálkahártya kapillárisainak perfúzióját.

A mikrokeringés szerkezete bélszegmensenként eltérő. A vékonybélben az arteriolák a bélbolyhok csúcsánál sűrű kapilláris hálózatot alakítanak ki, míg a vastagbélben az arteriolák a nyálkahártyamirigyekkel párhuzamosan futnak, és a kapillárisok a nyálkahártya felszínéhez közel helyezkednek el. A vastagbél nyálkahártyájának kapillárisai méhsejtszerű mintázatot mutatnak, amely a disztális szakaszok felé haladva fokozatosan ritkul, így perfúziós gradienst eredményez (Kvietys, 2010).

### **1.2 Gyulladásos bélbetegségek**

A gyulladásos bélbetegségek (IBD) krónikus, immunmediált kórképek, amelyek leggyakrabban Crohn-betegségként vagy colitis ulcerosaként jelentkeznek. Az IBD incidenciája világszerte, különösen a fejlett országokban, emelkedő tendenciát mutat, ami új terápiás és diagnosztikai stratégiák kifejlesztését teszi szükségessé (Ng és mtsai, 2017). A jelenlegi kezelések az 5-aminoszalicilsav-származékoktól a biológiai terápiákig (anti-TNF $\alpha$ , anti-integrin, IL-12/23-gátló monoklonális antitestek) terjednek (Rutgeerts és mtsai, 2004; Steigleder és mtsai, 2020). Ennek ellenére a betegek jelentős része rezisztens egyes gyógyszerekkel szemben, ezért új célzott terápiák – például homing-gátlók, Janus-kináz-, Th17- vagy szfingozin-1-foszfát receptor antagonisták – jelenleg a kutatások középpontjában állnak.

Az IBD jellemzően fiatal felnőtteket érint, jelentős társadalmi-gazdasági terhet róva az egészségügyi ellátórendszerre. A betegség pontosabb megértése – különösen a patofiziológiai mechanizmusok feltérképezése – lehetőséget nyújt új terápiás célpontok azonosítására és hatékonyabb kezelések kifejlesztésére. Az IBD-kezelésében nemcsak a gyulladás csökkentése, hanem a szövődmények megelőzése és a betegek életminőségének javítása is prioritást élvez.

A terápiás hatékonyság objektív értékeléséhez korszerű, nem-invazív diagnosztikai eszközök bevezetése is szükséges. A vastagbélnyálkahártya mikrokeringésének valós idejű monitorozása értékes információkat szolgáltat a betegség aktivitásáról, a kezelések hatékonyságáról, valamint a gyulladásos fellángolások korai felismeréséről. Jelen tanulmányban a kilélegzett metán mérését mutatjuk be, mint lehetséges biomarkert.

### **1.3 A bélnyálkahártya mikrokeringésének vizsgálata**

A GI rendszer mikrokeringésének akut eltérései – például vérzés, gyulladás, embólia vagy alacsony perctérfogat következtében – súlyos klinikai következményekkel járhatnak. Az intesztinális perfúzió zavara jelentősen növelheti a morbiditást és mortalitást egyes sebészeti beavatkozások során. Ilyen helyzetekben a makro- és mikrokeringési paraméterek egymástól függetlenül változhatnak, ami azt jelenti, hogy a makrohemodinamikai adatok önmagukban nem elegendőek a mikrokeringés megbízható megítéléséhez. Kritikus állapotú betegek esetében a mikrokeringési diszfunkció fennmaradhat akkor is, ha a szisztémás hemodinamikai értékek már normalizálódtak (Dubin és mtsai, 2009; Jhanji és mtsai, 2009; De Backer és mtsai, 2010).

A GI mikrocirkuláció folyamatos monitorozása kulcsfontosságú, mivel időbeni felismerésével megelőzhető a nyálkahártya károsodása és az epiteliális barrierfunkció romlása. A gyomor-bélrendszeri mikrokeringés vizsgálata azonban jelentős technikai kihívásokat jelent. Jelenleg a szublingvális mikroperfúzió intravitális mikroszkópiás vizsgálata az egyetlen széles körben elfogadott, nem invazív klinikai módszer, azonban a módszer megbízhatóságáról az irodalomban eltérő adatok állnak rendelkezésre (Boerma és mtsai, 2007; Qian és mtsai, 2014).

### **1.4 Endogén metántermelés: diagnosztikai jelentősége**

A jelenlegi korlátozott diagnosztikai lehetőségek miatt javasoljuk a kilélegzett metán valós idejű mérését. A metánt – amelyet korábban csupán a mikrobiális fermentáció melléktermékeként tartottak számon – ma már potenciális gázotranszmitterként is vizsgálják (Keppler és mtsai, 2016). A metán felhalmozódhat a sejtmembránok határfelületein, befolyásolva a membránhoz kötött fehérjék működését, köztük a reaktív oxigénszármazékok (ROS) termelésében részt vevőket is (Boros és Keppler, 2019).

A metán keletkezése elsősorban a metanogén archaeák, különösen a *Methanobrevibacter smithii* aktivitásához köthető. Fizikokémiai tulajdonságainak köszönhetően a metán képes áthatolni a biológiai membránokon, majd a tüdőn keresztül megjelenik a kilélegzett levegőben, így légzési tesztek alkalmazhatók a GI

rendellenességek diagnosztikájában. A lakosság körülbelül 30–40%-a tekinthető metántermelőnek, amit a légköri szintnél magasabb ( $>1$  ppm) kilélegzett metánkoncentráció alapján határoznak meg (Bond és mtsai, 1971; Levitt és mtsai, 2006).

A jelenlegi légzési tesztek klinikailag jól használhatók, azonban a hagyományos gázanalitikai módszerek (például a gázkromatográfia) (Levitt és mtsai, 2006; Ligor és mtsai, 2008) mintavételi gyakorisága és pontossága korlátozott, ezért nem alkalmasak a metánkibocsátás dinamikus változásainak vizsgálatára *in vivo* körülmények között (Yu és Pawliszyn, 2004). Ezzel szemben a fotoakusztikus spektroszkópia (PAS) kiváló alternatívát kínál (Ngai és mtsai, 2006), közeli infravörös lézerek alkalmazásával a gázmolekulák fényelnyelése által generált hanghullámok detektálásával (Bozóki és mtsai, 2011). A PAS lehetővé teszi a nagy érzékenységű, valós idejű metánanalízist, kiküszöbölve a hagyományos módszerek hiányosságait (Tuboly és mtsai, 2013).

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

A kutatás átfogó célja a metánkibocsátás és a GI mikrokeringés kapcsolatának vizsgálata volt.

Az első tanulmány fő célja az volt, hogy kísérletes patkánymodellekben feltárja a teljes test metánkibocsátása, a vastagbél-nyálkahártya gyulladása, valamint a vastag- és vékonybél szerózájának mikrokeringése közötti összefüggéseket:

1. Az összefüggések azonosítása a teljes test metánkibocsátása és a 2,4,6-trinitrobenzenszulfonsav (TNBS) által indukált kísérletes colitis során bekövetkező vastag- és vékonybél mikrokeringési, illetve gyulladásszerű változásai között.
2. Annak vizsgálata, hogy a gyógyszeres kezelések által előidézett GI mikrocirkulációs változások miként hatnak a metánkibocsátásra.
3. Kiegészítő célunk annak vizsgálata volt, hogy a TNBS-colitises patkányokban a vastagbél nyálkahártya mikrokeringési zavaraira adott válaszreakciók hogyan befolyásolják a teljes test metántermelését, illetve hogy ezeket a válaszokat miként módosítják a ketoprofen (Ket) és a ketoprofen-Tris (Ket-Tris) kezelések.

A második tanulmány célja az volt, hogy egy nagyállat-modellben vizsgáljuk és összehasonlítsuk a valós idejű kilélegzett metánkoncentráció-mérés érzékenységét egy már klinikumban alkalmazott módszerrel, a szublingvális mikrokeringés vizsgálatával kontrollált, fokozatos vérzés és a korai folyadékpótlás szakasza során.

4. Célkitűzésünk az volt, hogy nagyállat-modellben értékeljük a valós idejű kilélegzett metánmérés diagnosztikai potenciálját belső vérzés kimutatására, valamint megvizsgáljuk az összefüggéseket a kilélegzett metánszint változása, az artéria mesenterica superior véráramlása (AMSF) és a nyálkahártya mikrokeringési paraméterei között.
5. Emellett azt is vizsgáltuk, hogy a folyamatos kilélegzett metánmonitorozás a folyadékpótlás korai fázisában klinikailag releváns információt nyújthat-e a mezenterialis keringés állapotáról.

### **3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

#### **3.1. Kísérleti állatok**

1. tanulmányban három egymástól elkülönülő, de összefüggő kísérletsorozatot végeztünk hím Sprague Dawley patkányokon ( $n = 72$ ; átlagos testtömeg:  $200 \pm 10$  g), amelyek tartási körülményei megfeleltek a hatályos előírásoknak. A patkányok standard laboratóriumi tápot kaptak, majd a kísérletek előtt három napig szénhidrátban gazdag étrenden (szárított kenyér) tartottuk őket. Az állatok táphoz korlátozottan, vízhez szabadon férhettek hozzá, továbbá a kísérletek előtt 12 órás éhezést alkalmaztunk. Minden kísérleti protokoll megfelelt az EU 2010/63 irányelvének, a beavatkozásokat az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács engedélyével végeztük (engedélyszám: V/148/2013).

A 2. tanulmányban hat hím vietnámi törpesertésen végeztük a kísérleteket (átlagos testsúly:  $40 \pm 3$  kg), szintén az EU 2010/63 irányelv előírásainak megfelelően (engedélyszám: V/148/2013). A sertések 7–10 napos akklimatizációs időszak után kerültek kísérletbe bevonásra. Tartásuk során természetes fényviszonyokat, szabad víz- és takarmányhozzáférést biztosítottunk. A kísérleteket megelőzően 12 órás koplaltatáson estek át, de vízhez ebben az időszakban is korlátlanul hozzáférhettek.

#### **3.2. *In vivo* kísérleti módszerek**

##### **A mikrokeringés direkt vizsgálata**

Az 1/1, 1/3. és a 2. tanulmányban a mikrokeringés vizualizálására és értékelésére a Cytocam-Incident Dark Field (IDF) képalkotási technikát alkalmaztuk (CytoCam Video Microscope System, Braedius Medical, Huizen, Hollandia). Az IDF eljárással megjeleníthetők a hemoglobin-tartalmú struktúrák lineárisan polarizált fény alkalmazásával (Aykut és mtsai, 2015). Az 1/1. és 1/3. tanulmányban a vastagbél szerőza,

míg a 2. tanulmányban az ileum szeróza és mukóza, valamint a szublingvális terület mikrokeringését vizsgáltuk. A felvételeket offline analizáltuk AVA 3.0 (Automated Vascular Analysis, Amszterdami Egyetem, Hollandia) szoftverrel. Meghatároztuk a mikrokeringési áramlási indexet (MFI), a De Backer Score-t (DBS) és a heterogenitás indexet (HI) (De Backer és mtsai, 2007).

Az 1/2. tanulmányban az orthogonális polarizációs spektrális (OPS) képalkotási technikát (Cytoscan A/R, Cytometrics, Philadelphia, PA, USA) alkalmaztuk a gyomor, duodenum, jejunum, ileum és vastagbél szerózájának nem invazív vizualizálására. Ez a módszer az oxi- és deoxihemoglobin izobesztikus pontján (548 nm) visszavert polarizált fényt használ, amelynek révén csak a 200–300  $\mu\text{m}$  mélységből visszaverődött fotonok járulnak hozzá a képalkotáshoz. A 10 $\times$ -es objektívet a vizsgált gasztrointesztinális szerózára helyeztük, majd S-VHS videófelvételt készítettünk (Panasonic AG-TL 700, Matsushita Electric Ind. Co. Ltd, Osaka, Japán). A mikrokeringési paraméterek kvantitatív elemzését offline módon végeztük. A vörösvértest áramlási sebességét (RBCV,  $\mu\text{m/s}$ ) három, posztkapilláris venulában elhelyezkedő vizsgálati területen, számítógép-vezérelt képelemző szoftverrel (IVM Pictron, Budapest, Magyarország.) határoztuk meg.

### **A metánemisszió mérése**

Fotoakusztikus spektroszkópos (PAS) eszközt alkalmaztunk, amely közeli infravörös lézertechnikán alapul (Tuboly és mtsai, 2013). A PAS az optikai abszorpciós spektroszkópia egyik formája, amelyben az abszorbeált fényenergia hőexpanszió révén akusztikus hullámokat generál, így közvetetten méri az optikai abszorpciót. A keletkező hangamplitúdó arányos az abszorbeáló gázkomponens koncentrációjával. A gázminták a fotoakusztikus cellán áthaladva hozzák létre a jelet, amelyet nagy érzékenységu mikrofonok detektálnak. A mintavétel folyamatosan, 150 mL/min sebességgel történik. Az 1. tanulmányban a teljes test metánkoncentrációját, a 2. tanulmányban pedig a kilélegzett levegő metántartalmát mértük.

## **3.3. Labortóriumai módszerek**

### **Az összhemoglobin-koncentráció, a hematokrit és laktátszint mérése**

Az összhemoglobin (tHb), hematokrit (Hct) és laktátkoncentráció változásait artériás vérmintákból kooximetriás vérgázanalizátorral (Cobas b 123, Roche Ltd., Bázél, Svájc) mértük.

## **Gyulladásos markerek vizsgálata**

A kísérletek végén gyomor-, vastagbél- és vérmintákat gyűjtöttünk. A szövetmintákat  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk felhasználásig. A mérésekhez a szöveteket homogenizáltuk, majd  $24\,000 \times g$  centrifugálással 20 percig,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on Tris-HCl pufferben ( $0,1\text{ M}$ ,  $\text{pH} = 7,4$ ), amely  $0,1\text{ mM}$  polimetil-szulfonil-fluoridot (PMSF) tartalmazott a proteázok inaktiválása céljából.

A mieloperoxidáz (MPO) aktivitását – a leukocita akkumuláció indikátoraként – a szövethomogenizátum üledékéből, Kübler és mtsai (1996) módszere szerint határoztuk meg.

Egy fontos szuperoxidgyök-termelő enzim, a xantin-oxidoreduktáz (XOR) aktivitását a homogenizátum felülúszójából fluorometriás, kinetikai módszerrel, Beckman és mtsai (1989) leírása alapján mértük.

A malondialdehid (MDA) koncentrációját a lipidperoxidáció markereként tiobarbitursav-reakcióval határoztuk meg, az eredményeket pedig a szöveti fehérjetartalomra korrigáltuk (Placer és mtsai, 1966).

## **3.4. Kísérleti protokollok**

### **I. tanulmány**

#### **1/1. tanulmány – A teljes-test metánkibocsátás, valamint a TNBS-indukálta gyulladásos válasz és mikrokeringési változások közötti összefüggések vizsgálata**

Az 1/1. tanulmányban az állatokat ( $n=30$ ) véletlenszerűen két csoportba osztottuk ( $n=15/\text{csoport}$ ). Az 1. csoportban colitist idéztünk elő intracolónális TNBS alkalmazásával ( $40\text{ mg/kg}$ ,  $0,25\text{ ml}$  25%-os etanolban), 8 cm-es puha műanyag katéter segítségével, enyhe inhalációs anesztézia mellett (Morris és mtsai, 1989). A kontrollcsoportban az állatok  $0,25\text{ ml}$  25%-os etanolt (a TNBS oldószerét) kaptak beöntésként. A beavatkozás után az állatokat visszahelyeztük ketreceikbe, ahol ad libitum jutottak sztenderd laboratóriumi táphoz. A colitis indukcióját követő 1, 2. és 3. napon mindkét csoportból 5-5 állatot altattunk el invazív, videomikroszkópos mikrokeringési vizsgálatokhoz és biokémiai mintavételhez. Minden állatnál, a vizsgálati időpontokban, a teljes test metánkibocsátását is regisztráltuk.



### **1/2. tanulmány – A teljes-test metánkibocsátás és a gyógyszeres kezelés által indukált gasztrointesztinális mikrokeringési változások közötti kapcsolat vizsgálata**

Az 1/2. tanulmányban az állatokat (n=18) véletlenszerűen három csoportba osztottuk (n=6/csoport). Az 1. csoport kontrollként szolgált, ahol 10 ml/kg 0,11 M kálium-hidroxid (KOH) oldatot kaptak orálisan, gavázs technikával. A 2. csoport állatainak magas dózisú Ket-oldatot (0,56 mmol/kg, 10 ml/kg) adagoltunk. A kezelések után az állatokat visszahelyeztük ketreceikbe, ahol ad libitum szénhidrátban gazdag tápot kaptak. A 3. csoport ugyanilyen ekvimoláris dózisban Ket-Tris konjugátumot (0,56 mmol/kg, 10 ml/kg) kapott. A teljes test metánszintjét a kezelések előtt, közben, után, valamint az 1. és 2. napon mértük. A 2. napon a metánmérések után az állatokat 50 mg/kg i.p. nátrium-pentobarbitállal altattuk el. A sebészi előkészítés során az állatokat háton fekvé, fűtőpárnán rögzítettük, majd a tracheát és a jobb véna jugularist kanüláltuk, spontán légzés és folyadékpótlás biztosítása érdekében. Medián laparotómia után intravitális videomikroszkópiával vizsgáltuk a gyomor és a vastagbél szerőza mikrokeringési paramétereit. Az egyes állatok teljes test metánkibocsátását a kezelést követő 24 órával is regisztráltuk.

### **1/3. tanulmány – A teljes-test metánkibocsátás és a TNBS-colitis gasztrointesztinális mikrokeringési változásai közötti összefüggések vizsgálata, gyulladáscsökkentő kezelés mellett**

Az 1/3. tanulmányban (n=24) a kontrollcsoport állatai (n=6) 0,25 ml, 25%-os etanolt tartalmazó beöntésben részesültek (a TNBS oldószere). A 2, 3. és 4. csoportokban (n=6/csoport) TNBS beöntéssel (40 mg/kg) indukáltunk colitist. A 3. és 4. csoportban a colitis kiváltását követő 12 órán belül Ket-et (Col+Ket; 0,56 mmol/kg, 20 mg/kg, 10 ml/kg) vagy Ket-Tris konjugátumot (Col+Ket-Tris; 0,56 mmol/kg, 20 mg/kg, 10 ml/kg) alkalmaztunk. A kontroll- és a nem kezelt colitises csoport állatai a Ket oldószert (10 ml/kg, 0,11 M KOH) kapták. A 2. napon (24 órával a Ket vagy Ket-Tris kezelések után) az állatokat elaltattuk, háton fekvő helyzetben, fűtőpárnán rögzítettük, tracheotómiát végeztünk, majd a jobb v. jugularist kanüláltuk. Medián laparotómiát követően intravitális videomikroszkópiával vizsgáltuk a vastagbél szerőza mikrokeringését. A teljes-test metánkibocsátást minden állaton 24 órával a kezelést követően is mértük.

### **II. tanulmány – A metánkilégzés diagnosztikai értékének vizsgálata sertésmodellben fokozatos, kontrollált vérzés esetén**

A műtéti előkészítés után 30 perces nyugalmi periódust biztosítottunk, majd kontroll méréseket végeztünk. Ezt követően fokozatos véreztetést alkalmaztunk, melyet

vérvesztést alkalmaztunk, amelyet a protokoll szerint 7 lépésben (T0–T7) hajtottunk végre, majd 5 lépésben (T8–T12) volumenpótlást végeztünk, egészen az artériás középnyomás (MAP) kezdeti értékének 80%-áig. A teljes vértérfogatot 65 ml/kg-ra becsültük, minden vérvétel alkalmával a becsült volumen 5%-át ( $129 \pm 8$  ml) távolítottuk el, míg az egyes reszuszcitációs lépésekben ugyanezt a mennyiséget hidroxietil-keményítő oldattal (HES; Voluven 6%, 130/0.4; Fresenius Kabi, Németország) pótoltuk.

Minden véreztetési vagy reszuszcitációs lépés után az ileum mukóza és szeróza, valamint a szublingvális terület mikrokeringését vizsgáltuk; minden lokalizációról három, egyenként 20 másodperces videofelvételt készítettünk. Az intravitális videomikroszkópos vizsgálatok után rögzítettük a MAP és az AMSF értékeit, valamint vérmintákat vettünk a laktát-, tHb- és Hct-szintek meghatározására. A kilélegzett metánkoncentrációt a teljes megfigyelési időszak alatt folyamatosan monitoroztuk. A kísérletek végén az állatokat nátrium-pentobarbitállal (120 mg/kg i.v.; Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA) túlaltattuk.

### **3.5. Statisztikai analízis**

Az adatelemzéshez statisztikai szoftvercsomagot használtunk (SigmaStat for Windows, Jandel Scientific, Erkrath, Németország). Az adatok normális eloszlását Shapiro–Wilk-tesztel ellenőriztük. A csoporton belüli változások elemzéséhez Friedman-tesztet (nem normál eloszlás esetén) vagy egyutas ismételt mérések varianciaanalízist alkalmaztunk. A kezdeti értékekhez viszonyított időbeli eltéréseket Dunn-tesztel vagy Bonferroni-korrigált t-tesztel értékeltük. A csoportközi különbségeket Kruskal–Wallis egyutas varianciaanalízissel elemeztük, majd Dunn-tesztet alkalmaztunk (a  $p < 0,05$  értéket tekintettük szignifikánsnak). A változók közötti korrelációt Pearson-féle korrelációs együtthatóval ( $r$ ) vizsgáltuk.

## **4. EREDMÉNYEK**

### **1. Tanulmány**

#### **1/1. tanulmány – A teljes-test metánkibocsátás és a TNBS által indukált gyulladásos válasz, valamint a mikrokeringési változások közötti összefüggés**

A colitis indukcióját követő 3. napon az MPO-szint, az XOR-aktivitás és az MDA-koncentráció szignifikánsan emelkedett a kontrollcsoporthoz képest. A colitis csoportban a MFI és a DBS értékei szignifikánsan megnövekedtek a colitis 1., 2. és 3. napján a

kontrollértékekhez viszonyítva. Hasonlóképpen, a teljes-test metánkibocsátás szignifikánsan emelkedett a colitis indukcióját követő 2. és 3. napon, mind a saját kontrollértékekhez, mind a kontrollcsoport adataihoz viszonyítva.

### **1/2. tanulmány – A teljes-test metánkibocsátás és a gyógyszeres kezelés által kiváltott gasztrointesztinális mikrokeringési változások kapcsolata**

A GI nyálkahártya mikrokeringésének kvantitatív markereként az RBCV-t határoztuk meg. A gyomor szerózájában az RBCV szignifikánsan emelkedett a Ket-tel kezelt csoportban a kontrollhoz viszonyítva, és hasonló növekedést tapasztaltunk a duodenumban, jejunumban és ileumban is. A colonban ugyanakkor az RBCV normál tartományban maradt. A Ket-Tris kezelés után a teljes GI traktusban a kiindulási értékeknek megfelelő mikrokeringési paramétereket mértünk. A teljes test metánkoncentrációját a kezelések előtt és 24 órával azután vizsgáltuk; a kontroll- és Ket-Tris csoportokban nem volt kimutatható változás 24 órán belül, míg a Ket csoportban szignifikáns emelkedés volt tapasztalható a kezelés utáni 24. órában.

### **1/3. tanulmány – A teljes-test metánkibocsátás és a TNBS-colitis gasztrointesztinális mikrokeringési változásai közötti összefüggések gyulladáscsökkentő kezelés mellett**

A colitis csoportban a colon szubszerózájában az RBCV szignifikánsan megnövekedett a kontrollcsoportéhoz viszonyítva. A Ket és Ket-Tris kezelés csökkentette az emelkedett RBCV-t a megfigyelési időszak végére. A colitis és a Ket+Col csoportokban a colitis indukcióját követő 24 órával szignifikánsan magasabb metánkibocsátást észleltünk a kontrollcsoporttal összehasonlítva. A Ket-Tris kezelés nem okozott változást a metánemisszióban.

## **II. tanulmány – A metánkilégzés diagnosztikai értéke sertésmodellben fokozatos, kontrollált vérzés esetén**

A vérzés során a MAP szignifikánsan csökkent a T3 szakaszban (20%-os vérveszteség), és a véreztetés végéig alacsonyabb szinten maradt. A reszuszcitációs fázisban a MAP szignifikánsan alacsonyabb volt a kontrollértékeknél egészen T10-ig, amikor a folyadékpótlás elérte a becsült vértérfogat 15%-át. A tervezett reszuszcitáció végére a MAP elérte a kezdeti érték 80%-át. A plazma laktát szintje T6-nál (30%-os vérveszteség) szignifikánsan emelkedett a kiindulási értékhez képest, és magasabb maradt egészen T11-ig. A vérvesztés és a folyadékreszuszcitáció mind a tHb, mind a Hct értékének folyamatos csökkenését eredményezte. A T6-nál mindkét paraméter szignifikáns

csökkenést mutatott a kiindulási értékekhez viszonyítva. A tHb több mint 3 g/dL-rel csökkent a véreztetési szakasz végére (M=11,92; p25=9,7; p75=13,4 g/dL vs. M=8,66; p25=7,43; p75=10,48 g/dL), ami súlyos vérzésre utal. A SMA áramlása folyamatosan csökkent a véreztetés során. Már az 5%-os vérveszteségnél (T1) szignifikáns csökkenést észleltünk.

A folyadékreszuszcitációt követően a MAP meredeken emelkedni kezdett, és a második reanimációs lépésnél (T8) elérte a csúcsertékét. A reszuszcitáció további szakaszaiban a MAP fokozatosan visszatért a kezdeti szintre. A kilélegzett metán átlagos koncentrációja 60,9–90,1 ppm között mozgott, ami a metántermelő emberekben mért magasabb értékeknek felel meg (Levitt és mtsai, 2006). Az összehasonlíthatóság érdekében a mért metánkoncentrációkból levontuk a kontroll időpontban mért kilélegzett metánszintet, ezzel csökkentve az egyéni variabilitást (Szűcs és mtsai, 2019). A kilélegzett metánkoncentráció már 5%-os vérveszteségnél (T1) szignifikánsan csökkent, hasonlóan az AMSF változásaihoz. A reszuszcitáció kezdetekor a kilélegzett metánszint gyorsan emelkedett, és szignifikánsan meghaladta a kiindulási értéket, elérve a csúcsot a becsült vértérfogat 10%-ának megfelelő folyadékbevitel után (T8).

A DBS értékek a vérzés előrehaladtával szignifikánsan csökkentek. Az ileum szeróza DBS értéke 10%-os vérveszteségnél (T2) szignifikánsan alacsonyabb volt a kiindulási szintnél. Ezt követte az ileum mukóza DBS értékének romlása 20%-os vérveszteségnél (T4), míg a szublingvális területen a DBS csökkenése csak 25%-os vérveszteségnél (T5) vált szignifikánssá. A szublingvális DBS szignifikánsan magasabb volt az ileális értékeknél T5 és T7 között, ami a vérzés 35%-os fázisának végére utal. A folyadékreszuszcitáció kezdetekor a mukóza DBS értéke gyorsan emelkedett, és szignifikánsan magasabb lett az ileum szeróza és szublingvális értékeinél a vértérfogat 5%-ának megfelelő folyadékbevitel után (T8), elérve a maximumot T10-nél. A szeróza DBS fokozatosan emelkedett, és a legmagasabb szintet T12-nél érte el.

A vérzés mindhárom területen csökkentette a MFI-et. A szublingvális terület mutatta a legkorábbi szignifikáns csökkenést T3-nál, ezt követte a szeróza MFI T4-től, majd a mukóza MFI T5-től. A folyadékreszuszcitáció minden területen szignifikáns javulást eredményezett az MFI esetében. A szublingvális MFI T10-től kezdődően szignifikánsan magasabb volt az ileális mukóza és szeróza MFI értékénél.

A mikrokeringés heterogenitása a vérzés során nőtt, amit a heterogenitási index (HI) emelkedése is mutatott. A szublingvális HI a reszuszcitáció során helyreállt, míg az ileális

mukóza és szeróza HI-ja szignifikánsan magasabb maradt a kezdeti és szublingvális értékekhez képest a kísérlet végéig.

A vérzés és reszuszcitáció során a kilélegzett metánszint változásait összevetettük az AMSF adatokkal. A vérzési fázisban erős korrelációt találtunk ( $r=0,82$ ), és a reszuszcitáció alatt is szignifikáns kapcsolatot tudtunk kimutatni. Amikor az ileum mikrokeringés két komponensének DBS értékei és a metánkibocsátás közötti összefüggést vizsgáltuk, azt találtuk, hogy a szeróza DBS szignifikánsan korrelált a kilélegzett metánnal mind a vérzés ( $r=0,79$ ), mind a reanimáció ( $r=0,66$ ) során. Hasonló korrelációt észleltünk a másik komponens, a mukóza DBS értékei és a kilélegzett metánszintek között is.

A szublingvális DBS, valamint az ileum mukóza és szeróza DBS értékei között szignifikáns összefüggést ( $r = 0,74$  és  $r = 0,66$ ) kizárólag a vérzéses szakaszban figyeltünk meg.

## 5. MEGBESZÉLÉS

Első tanulmányunk célja a teljes-test metánkibocsátás, a GI mikrokeringés és a gyulladásos folyamatok közötti összefüggések feltárása volt kísérletes patkánymodellben. A TNBS által indukált colitis modellben jelentős gyulladásos válasz, fokozott oxidatív stressz és hiperémiás mikrokeringés alakult ki, amelyet párhuzamos metánkoncentráció-emelkedés kísért. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a kilélegzett metán mérése potenciálisan alkalmas lehet a gyulladásos aktivitás monitorozására.

A metánképződést korábban kizárólag a bél metanogén mikrobiomjához kapcsolták (Ellermann és mtsai, 1988; Conrad, 2009), azonban újabb kutatások kimutatták, hogy eukarióta sejtek – köztük humán sejtvonalak is – oxidatív stressz hatására képesek metánt termelni, függetlenül a mikrobiális fermentációtól (Boros és Keppler, 2019). A ROS által generált metilgyök-intermedierek révén a metán endogén, nem-mikrobiális eredetét is sikerült igazolni, ami új lehetőségeket nyit a metán gáztranszmitter-szerepének értelmezésében (Keppler és mtsai, 2006; Wang és mtsai, 2021). Kémiai rendszerekben metán keletkezhet vas(III)-ion, aszkorbát és hidrogén-peroxid jelenléte mellett enzimikus folyamatok nélkül is (Ghyczy és mtsai, 2003).

Ernst és mtsai (2022) kimutatták, hogy az oxidatív stressz által generált metilgyökök kulcsfontosságú köztitermékek a metánképződésben eukariótákban, beleértve emberi sejtvonalakat is (Liu és Zhang, 2022). Bár ennek biológiai jelentősége még nem teljesen tisztázott, a kilélegzett levegőben mért metán részben az enterális flóra anyagcsere

folyamatai során keletkezik, részben pedig oxidatív stressz hatására a sejtek által termelt metánból származhat (Tuboly és mtsai, 2013; Ernst és mtsai, 2022).

A TNBS által kiváltott gyulladás során tapasztalt metánemisszió-emelkedés – különösen a fokozott XOR aktivitás és magasabb MDA szintek mellett – alátámasztja azt a hipotézist, miszerint a metántermelés összefügg a ROS-mediált szöveti stresszválasszal (Ugocsai és mtsai, 2023). Továbbá, a Ket és a Ket-Tris kezelések közötti különbségek megerősítik, hogy a metánkibocsátás mértéke alkalmas lehet a gyógyszeres kezelések hatékonyságának jelzésére: míg a Ket növelte a metánszintet, addig a Ket-Tris konjugátum csökkentette azt, ami az utóbbi mellékhatások nélküli gyulladáscsökkentő hatására utal. Eredményeink alapján a kilélegzett metán valós idejű monitorozása értékes, nem-invazív eszköz lehet a ROS-mediált nyálkahártya-gyulladás követésére és a terápiás válasz értékelésére.

Összefoglalva, az első tanulmány igazolta a Tris védőhatását az NSAID-ok által okozott bélkárosodással szemben. A metántermelés szoros összefüggést mutatott a gyulladásos állapottal és a bélnyálkahártya mikrokeringésével. A Ket-Tris kezelés alatt a metánszintek a kontroll csoport szintjére csökkentek, ami arra utal, hogy a metán a pro-inflammációs válaszok jelzője lehet, és jelezheti a gyulladáscsökkentő beavatkozások hatékonyságát (Ugocsai és mtsai, 2023).

Második tanulmányunkban sertésmodellben vizsgáltuk a kilélegzett metánkoncentrációt és annak kapcsolatát a makro- és mikrokeringési paraméterekkel kontrollált, fokozatos véreztetési protokoll keretében. Megállapítottuk, hogy a kilélegzett metánszint érzékenyen és korán jelezte az AMSF csökkenését, még a szisztémás hemodinamikai változások előtt. A kilélegzett metánkoncentráció ingadozásai szoros kapcsolatban álltak az ileum mukóza és szeróza mikrokeringési paramétereivel, ami tovább erősíti a metán valós idejű mikrokeringési markerként való alkalmazhatóságát.

A kilélegzett metánszint vizsgálat széles körben alkalmazott diagnosztikai eszköz GI rendellenességek felderítésére. Hagyományosan a laktulóz tesztet követően gázkromatográfiával mérik a kilélegzett levegő metánszintjét, ennek során a mintákat légmentes zsákokba gyűjtik és lángionizációs, hővezetési vagy tömegspektrometriás detektorral elemezik (Costello és mtsai, 2013). Ez a módszer azonban korlátozott mintavételi gyakoriságot tesz lehetővé. Ebben a tanulmányunkban is a PAS módszert alkalmaztuk, ami 1 ppm alatti érzékenységgel képes valós időben követni a metánkoncentráció változásait (a hagyományos gázkromatográfia érzékenysége 3 ppm).

Altatott sertés modellünkben kontrollált vérzést alakítottunk ki a vértérfogat 35%-os fokozatos csökkenésével, amelyet a tHb mérésével igazoltunk. Ez a modell lehetővé tette a nagy időbeli felbontású mérést mind a vérzés, mind a reszuszcitáció fázisában. Reszuszcitáció során HES-infúziót alkalmaztunk, amely jelentősen javítja a makrohemodinamiai paramétereket és a bél mikrokeringését (Wu és mtsai, 2015).

A várakozásoknak megfelelően az AMSF már 5%-os vérvesztésnél szignifikánsan csökkent, párhuzamosan a kilélegzett metánszint változásával. A szeróza és a mukóza mikrokeringése 10%, illetve 20%-os vérvesztést követően változott. A mesenterialis makro- és mikrokeringés közötti jelentős különbség az autoregulációs mechanizmusokkal (Pestel és mtsai, 2010), míg a mukóza és a szeróza mikrokeringésének változásai közötti késleltetés a mukóza oxigenációját előnyben részesítő mikrokeringési redistribúcióval magyarázható (Hiltebrand és mtsai, 2003). A metánszint kezdeti csökkenése valószínűleg a perfundált vértérfogat csökkenését tükrözte kapilláris sűrűség változása nélkül.

Különösen figyelemreméltó, hogy a kilélegzett metánszint a reszuszcitáció során is képes volt követni a gyors perfúziós változásokat, szoros korrelációt mutatva a nyálkahártya mikrokeringésének állapotával. Ezzel szemben a szublingvális mikrokeringés – bár nem invazív és könnyen hozzáférhető (Palágyi és mtsai, 2015) – nem bizonyult megbízható prediktornak a bélrendszeri mikrokeringés gyors, dinamikus változásaira a reszuszcitációs szakaszban.

Összességében kutatásunk rámutat, hogy a kilélegzett metánszint valós idejű monitorozása nemcsak az oxidatív stressz és a gyulladásos folyamatok, hanem a mikrokeringési zavarok korai felismerésére is alkalmas lehet. Ez különösen releváns lehet kritikus állapotú betegek, valamint GI betegségek (például gyulladásos bélbetegségek, IBD) diagnosztikája és terápiás követése során. A PAS alapú, valós idejű kilélegzett metánszint monitorozás érzékenysége, gyorsasága és nem-invazív jellege előnyös a klinikai alkalmazás szempontjából.

További vizsgálatok szükségesek annak tisztázására, hogy a metán biomarkerként milyen érzékenységgel és specificitással jelez különféle kórfolyamatokat humán körülmények között, valamint hogy az endogén metántermelés pontos szabályozása és forrásai miként befolyásolják ennek az új diagnosztikai lehetőségnek a gyakorlati alkalmazhatóságát.

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

1. A teljes-test metánkibocsátás változásai jól tükrözték a TNBS és
2. az NSAID terápia hatására bekövetkező, a vékonybél mikrokeringését érintő változásokat.
3. A teljes-test metánemisszió párhuzamosan nőtt a GI gyulladásos aktivitással a TNBS által kiváltott colitis esetén. Ezért a metánkibocsátás valós idejű mérése nem invazív módszerként használható a GI gyulladásos folyamatainak progressziójának becslésére és a terápiás beavatkozások hatékonyságának monitorozására.
4. Nagyállat modellben, kontrollált, fokozatos vérzés során a kilélegzett metánszint szignifikáns korrelációt mutatott az AMSF értékeivel, valamint az ileum mukóza és szeróza mikrokeringésével. Kimutattuk, hogy a metánkoncentráció gyorsabban reagált az AMSF változásaira, mint a szublingvális mikrokeringés.
5. A reszuszcitációs fázisban a vékonybél mikrokeringésében bekövetkező gyors változások a kilélegzett metánszint ingadozásaiban is tükröződtek, miközben a szublingvális mikrokeringés nem volt képes követni ezeket a dinamikus változásokat.



## 7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Nagyon köszönöm Szabó Andrea Tanárnőnek, a Sebészeti Műtéttani Intézet jelenlegi vezetőjének, hogy vezetése alatt is folytathattam kutatómunkámat az intézetben.

Szeretném kifejezni őszinte hálámat Boros Mihály Professzor Úrnak, a Sebészeti Műtéttani Intézet korábbi vezetőjének a folyamatos támogatásáért és útmutatásáért a tudományos munkám során, valamint a cikkeim lektorálásáért.

Hálás vagyok Varga Gabriellának és Érces Dánielnek a kísérletes munkámban nyújtott felbecsülhetetlen segítségükért, értékes tanácsaikért. Külön köszönöm a disszertációm elkészítése során adott útmutatásaikat.

Külön köszönetet mondok Tóth Gábor Professzornak, a Szegedi Tudományegyetem Orvosi Kémiai Tanszékének vezetőjének az újonnan fejlesztett NSAID származékok konjugálásáért.

Köszönettel tartozom a Sebészeti Kutatóintézet munkatársainak kiemelkedő technikai segítségükért, valamint minden kollégámnak az együttműködésükért és támogatásukért.

E kutatás finanszírozását az EFOP-3.6.2-16-2017-00006 (MB) és a 2024-1.2.3-HU-RIZONT-2024-00033 számú projekt a Kulturális és Innovációs Minisztérium Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Alapból nyújtott támogatásával, a 2024-1.2.3-HU-RIZONT pályázati program finanszírozásában valósult meg.

Végül szeretném megköszönni a Családomnak és a Szüleimnek határtalan szeretetüket, türelmüket és bizalmukat, amelyek megállíthatatlan erőforrásaim voltak ezen az úton.