

**Gyulladásos aktiváció kísérletes perikardiális tamponád
során. A komplement C5a gátlás hatásai.**

Dr. Vass Andrea

Ph.D. Tézis

Szegedi Tudományegyetem

Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

A keringési rendszer élet- és kórtana, farmakológiája képzési program

**Klinikai jelentőségű kardiorespiratorikus patomechanizmusok vizsgálata
alprogram**

Témavezető:

Habil. Dr. Kaszaki József

Szegedi Tudományegyetem

Sebészeti Műtéttani Intézet,

II. sz. Belgyógyászati Klinika és Kardiológiai Központ, Szeged

2013

A tézis alapjául szolgáló közlemények listája

1. **Vass A**, Süveges G, Érces D, Nógrády M, Varga G, Földesi I, Futakuchi M, Imai M, Okada N, Okada H, Boros M, Kaszaki J: Inflammatory activation after experimental cardiac tamponade. *Eur Surg Res* 51:1-13, 2013. DOI: 10.1159/000352089 IF 0.75
2. Érces D, Nógrády M, Nagy E, Varga G, **Vass A**, Süveges G, Imai M, Okada N, Okada H, Boros M, Kaszaki J: Complement c5a antagonist treatment improves the acute circulatory and inflammatory consequences of experimental cardiac tamponade. *Crit Care Med* 41: 2013. (accepted for publication) DOI: 10.1097/CCM.0b013e31828a6768 IF 6.123

A tézishez kapcsolódó közlemény

1. 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 0.84

Egyéb közlemények listája

1. Nemes A, Forster T, Ungi I, Nagy V, **Vass A**, Pálincás A, Varga A, Csanády M. The coronary flow velocity reserve measured by stress transoesophageal echocardiography evaluates the success of coronary interventions--results of a 5-year follow-up. *Scand Cardiovasc J.* 39: 286-292, 2005. IF:0.757
2. Rosztóczy A, **Vass A**, Izbéki F, Kurucsai G, Róka R, Horváth T, Lonovics J, Forster T, Wittmann T: Savas gastrooesophagealis reflux által provokált coronariaspasmus kórképe. *Magy Belorv Arch.* 61: 203–206, 2006. IF: 0
3. Rosztóczy A, **Vass A**, Izbéki F, Nemes A, Rudas L, Csanády M, Lonovics J, Forster T, Wittmann T: The evaluation of gastro-oesophageal reflux and oesophagocardiac reflex in patients with angina-like chest pain following cardiologic investigations. *Int J Cardiol* 118: 62-68, 2007. IF: 1.765
4. Csanády M, Tóth F, Hogye M, **Vass A**, Sepp R, Csanády M Jr, Czigner J, Kiss JG, Jóri J, Forster T. Hearing disturbances in hypertrophic cardiomyopathy. Is the sensorineural disorder neurogenic or myogenic? *Int J Cardiol.* 116: 53-56, 2007. IF:1.765

1. BEVEZETÉS

1.1. A keringési shock

Keringési shocknak nevezzük azt az állapotot, amelyben a perctérfogat csökkenése kapcsán a véráramlás nem elegendő a szöveti igények kielégítésére. A perfúzió csökkenés először reverzibilis, majd irreverzibilis célszervi károsodást okoz, végül sejtelhaláshoz, nekrozishoz vezet. A megfelelő szöveti perfúzió fenntartása éppen ezért létfontosságú a túlélés szempontjából. A szöveti perfúziót meghatározó perfúziós nyomás a szisztémás érellenállás és a perctérfogat függvénye. Ez utóbbit a verőtérfogat és a szívfrekvencia szorzataként definiáljuk.

A shockot etiológia szerint feloszthatjuk: kardiogén, extrakardiális obstruktív, oligémiás és a keringés átrendeződésével járó (disztributív) shockra (Parillo 1991). A shock patogenezise a különböző eredet ellenére, számos vonásban egyezést mutat, és a folyamat végül sejthalálhoz vezet. A klinikai gyakorlatban a betegek túlélését a megfelelő és gyors diagnózis, valamint a terápiás beavatkozások mielőbbi megkezdése határozza meg.

Az alacsony perctérfogat kialakulásában leggyakrabban két tényező játszik fontos szerepet, ezek egyike a preload csökkenése a vénás visszaáramlás csökkenése révén, melyet a vérvolumen csökkenése okozhat (pl. vérzéses shockban, ill. hipovolémia esetén). A másik tényező a szív pumpafunkciójának csökkenése, melyet kardiogén shocknak nevezünk, és amelyben a miokardium elégtelensége az elsődleges tényező. Ez létrejöhet akut miokardiális infarktus során, vagy egyéb szívizombetegségekben, és ez alakul ki perikardiális tamponád alatt is.

1.2. A perikardiális tamponád jellemzői

Perikardiális tamponád során a perikardiumban felszaporodó folyadék gátolja a kamrák diasztolés telődését, ennek következtében a kardiogén shock obstruktív formájában akut keringési elégtelenség lép fel. A perikardiális tamponád életet veszélyeztető állapot, amit jellegzetes tünetcsoport (paradox pulzus, hipotenzió, megnövekedett véna juguláris nyomás) és a perikardiális folyadék jelenléte jellemez. A diagnózis a súlyos esetekben többnyire egyszerű, ám ha a keringési elégtelenség jellegzetes tünetei hiányoznak, akkor eszközös vizsgálatok szükségesek a fenyegető, súlyos következmények elkerülése érdekében. Perikardiális tamponád gyanúja esetén a diagnosztika alapja az echokardiográfiás vizsgálat, mellyel igazolható a szívburokban felgyülemlett folyadék jelenléte, és emellett a szív funkcióját jellemző további fontos paraméterek megítélése is biztosított. A perikardiális tamponád előfordulási gyakorisága nem kellően ismert. Számos epidemiológiai vizsgálat szól a

perikardiális folyadékról, azonban nagyon kevés a tamponád jelenlétéről. A perikardiális folyadék eredetét tekintve leggyakrabban daganatos eredetű (36%), ezen kívül lehet még idiopátiás (30%), fertőzőes (21%) és autoimmun eredetű (5%) (Bodson *et al.* 2011). Az utóbbi időben a szívsebészeti és egyéb invazív kardiológiai beavatkozások (pacemakerek, katéteres és elektrofiziológiai vizsgálatok) elterjedésével, egyre jelentősebb arányt képviselnek az iatrogén esetek (Valley and Fly, 2007). Az elsődleges terápiás beavatkozás a perikardiális folyadék csökkentése perikardiális punkcióval, vagy műtéti perikardiotómiával (Seferovic *et al.* 2006). Fontos ugyanakkor, hogy a tamponád megszüntetése után helyreálló perifériás keringés több szervben is jellegzetes iszkémia-reperfúziós károsodásokat indukálhat. Ennek magyarázata, hogy a hipoxia és a reperfúzió során a célszervekben reaktív oxigén szabadgyökök generálódnak, valamint aktiválódnak a polimorfonukleáris leukociták. E folyamatok eredményeként a sejtmembránok dezintegrálódnak, sejtszétesés jön létre (Boros *et al.* 1989, Prasad *et al.* 1990). A nekrotikus sejtekből a gyulladásozó folyamatok láncreakcióját elindító HMGB1 citokin szabadul fel, amely további leukocita akkumulációt generál (Scaffidi *et al.* 2002). A leukocita felszaporodással egyidejűleg az endothelin-1 vazokonstriktor peptid szintjének emelkedését, valamint a vazodilatátor nitrogén monoxid alacsony szintjét is leírták iszkémia-reperfúziós szindrómában (Boros 2003). Az endothelin-1 az egyik leghatékonyabb endogén vazoaktív mediátor, amely hozzájárul a mikrocirkuláció károsodásához, vazokonstriktor és proadhezív hatásánál fogva (Boros *et al.* 1998). Ezen kívül a hízósejtekből hisztamin felszabadulást generál (Kaszaki *et al.* 2008) és részt vesz a komplement rendszer aktiválásában is (Soop *et al.* 2004).

1.3. A komplement rendszer főbb jellemzői

A komplement rendszert 1890 fedezték fel. Ekkor találták meg az első hő-stabil antitestet a szérumban és felismerték, hogy ennek kiegészítő, un. komplementer hatása van a baktériumok eliminálása során. Azóta már a komplement rendszer több mint 30 fehérjéből álló rendszere ismert, melyek a plazmában oldható formában, vagy sejtmembránhoz kötött formában vannak jelen. A komplement rendszer fehérjéi a májban szintetizálódnak, hálózatot képeznek, mely fontos szerepet játszik mind a veleszületett, mind a szerzett immunitásban, részt vesz az opsonizációban és kemoattraktív hatással is rendelkezik. A komplement rendszer aktiválódása enzim-kaszád során történik, mely végül az anafilatoxin C3a és C5a komplement képződéséhez vezet. Ezen fehérjék a sejtek nekrozisát, lízisét okozzák.

A komplement rendszer aktiválódása három ismert úton történhet: a klasszikus, a lektin és az alternatív úton. A klasszikus aktiválódás során C1, C4, és C2 komplement jön létre, az

alternatív aktivációval D, C3, és B faktorok képződnek. Mindkét út a C3 faktor aktiválódásához vezet, létrehozva a C3b komplementet, mely végül további komponensek, a C5-9 aktiválódását okozza. A komplement C5-9-et „membrán attack complex”-nek (MAC) nevezik, mivel beépülve a sejtmembránba a sejt ozmotikus lízisét okozza. A C3a és C5a molekulák képesek kötődni a hízósejtekhez és a bazofil leukocitákhoz, melynek következtében hisztamin és egyéb vazóaktív mediátorok szabadulnak fel. A komplement C5a 74 aminosavból álló fehérje, mely a C5 aktiválódása során keletkezik, anafilatoxinak is nevezik. Fehérvérsejteket és más endoteliális sejteket stimulál, valamint hatékonyan aktiválja a PMN leukocitákat és más gyulladásozó sejteket. A C5a az egyik leghatékonyabb gyulladásozó mediátor, amely elősegíti a kemotaxist, részt vesz az aggregációban, a sejtek degranulálódásában és szuperoxid anionok képződésében (Fujita *et al.* 2004).

2. CÉLKITŰZÉSEK

Ma általánosan elfogadott, hogy a gyulladásozó aktivációnak jelentős szerepe van az alacsony perfúzióval járó keringési állapotokban. Mindezek alapján feltételeztük, hogy a perikardiális tamponád során bekövetkező akut pumpa funkció károsodás együtt jár a gyulladásozó rendszer aktiválódásával, mely a klinikai tünetek további progressziójáért lehet felelős.

Első vizsgálatunkban kísérletes perikardiális tamponád modellt hoztunk létre, melynek segítségével felmértük a tamponád azonnali hemodinamikai hatásait, különös tekintettel a vékonybél keringésére és a mikrocirkulációs változásokra. Meghatároztuk a tamponádot követő időszakban a pro-inflammatorikus mediátorok és metabolitok szintjét (szuperoxid gyökök képződése, big-ET, HMGB-1) és megfigyeltük ezek hatását a hemodinamikával összefüggésben.

További kísérleteinkben megvizsgáltuk a komplement rendszer aktiválódása során döntő szerepet játszó C5a gátlás hatásait kísérletes perikardiális tamponád alatt. A hipoperfúzió által indukált folyamatokat gátló, vagy azokat kedvezően befolyásoló, potenciális anti-inflammatorikus szerek jelenleg nem állnak rendelkezésre a klinikumban. Célkitűzéseink szerint meghatároztuk egy 17 aminosavból álló acetyl peptid-A (AcPepA) szintetikus C5a antagonistá kezelés hatásait klinikailag releváns, állatkísérletes modellünkben. Feltételeztük, hogy a C5a antagonistá korai alkalmazása a perikardiális tamponád megszüntetését követően csökkentheti a tamponád által okozott káros hemodinamikai és gyulladásozó hatásokat.

3. MÓDSZEREK

Kísérleteinket az NIH kísérleti állatokra vonatkozó előírásai alapján, a Szegedi Tudományegyetem Állatvédő Etikai Bizottságának jóváhagyásával végeztük (engedély száma: V/148/2013).

3.1. Műtéti beavatkozások

A kísérleteket mindkét nemű, átlagosan 24 ± 3 kg súlyú vietnámi törpesertéseken végeztük, melyeket 12 órás éhezést követően instrumentáltunk. A műtét előtt az állatok vizet fogyaszthattak *ad libitum*. Az altatást ketamin (20 mg/tskg) és xylazin (2 mg/tskg) im. kombinációjával indukáltuk, majd az anesztézia fenntartását folyamatos propofol infúzióval (50 μ l/min/kg) és ketamin (5 mg/kg) és xylazin (0,5 mg/kg) im. kiegészítéssel végeztük a thoracotomia előtt és a 180 perces obszervációs periódus alatt. Endotracheális intubációt követően mechanikus lélegeztetést alkalmaztunk, a légzési volumen 9 ± 2 mL/kg volt, pozitív végkilégzési nyomást nem használtunk a tamponád alatt.

Az állatokat hemodinamikai monitorozás céljából instrumentáltuk (artériás, vénás katéterek, Swan-Ganz katéter). Thoracotomia után kanüláltuk a perikardium üregét, majd drain felett zártuk a mellkasfalat. A műtétet követően 30 perc nyugalmi szakasz következett, majd az állatokat a továbbiakban folyamatosan monitoroztuk. A kísérlet végén vékonybél biopsziákat vettünk immunohisztokémiai vizsgálatokra.

3.2. Hemodinamikai mérőmódszerek

Folyamatosan regisztráltuk a vérkeringési adatokat, és a centrális vénás nyomást (SPELL Haemosys; Experimetria Ltd., Budapest, Hungary) számítógépes mérőrendszerrel. További hemodinamikai monitorizálásra a PiCCO Plus V 5.2.2 és a VoLEF V 1.0 (PULSION Medical Systems SE, Munich, Germany) rendszereket használtuk együttesen (Végh *et al.* 2009). Az artériás középnyomást, a perctérfogatot és a szívfrekvenciát, valamint globális végdiasztolés volument és az extravaszkuláris tüdővíz mennyiségét a PiCCO Plus monitorizáló rendszerrel mértük. A PiCCO–VoLEF kombinált monitorral pedig a pulmonális arteriás nyomást mértük, és a jobb és bal szívfél végdiasztolés volumeneket határoztuk meg. Standard formula alapján számítottuk a szisztémás vaszkuláris rezisztencia indexet és a pulmonális vaszkuláris rezisztencia indexet. Minden paramétert a testfelszínre, ill. a testsúlyra vonatkoztattunk (Phillips *et al.* 2009).

3.3. A vékonybél mikrocirkuláció vizsgálata pCO₂ gap méréssel

A szöveti és az artériás pCO₂ szintek különbsége a gasztrointesztinális traktusban létrejövő mikrocirkulációs változások érzékeny paramétere. A terápia hatékonyságát jelzi, melyek a mikrokeringésben létrejövő kórfolyamatok ellen irányulnak (Kolkman *et al.* 2000). A vékonybél lumenébe silastic tonometriás katétert (Tonosoft Medical Technical and R&D Ltd., Hungary) helyeztünk enterotómiával (Boda *et al.* 2006) és az intramukozális pCO₂ szintet kapnométerrel monitoroztuk. Artériás és vénás vérgáz mintákat vettünk a vizsgálat kezdetén és minden órában és meghatároztuk a vérgáz értékeket (Cobas b121, Roche, Austria). A pCO₂ gap meghatározására a szimultán mért artériás vérgáz paCO₂ értékéből kivontuk a tonometriával mért szöveti pCO₂ szintet.

3.4. Biokémiai meghatározások

A mérésekhez 5 ml vért vettünk a véna jugularisba bevezetett kanülön keresztül EDTA-t (1 mg/mL) tartalmazó polipropilén csövekbe, a protokollban meghatározott időközönként. A vérmintákat centrifugáltuk (1200g, 10 perc) 4 °C-on, a mintákat -70 °C tároltuk a mérésekig.

Big-endothelin, TNF- α , HMGB-1 és hisztamin meghatározás

A big-ET (az ET-1 peptid stabil propeptidje), TNF- α , a HMGB-1 és a hisztamin plazma koncentrációit kereskedelmi forgalomban kapható ELISA kitek segítségével határoztuk meg (Biochemica Hungaria Kft., Budapest, Hungary; Shino-Test Corporation, Kanagawa, Japan; Quantikine ultrasensitive EIA kit for histamine).

A teljes vér szuperoxid gyök produkciójának meghatározása

A teljes vér szabadgyök termelő kapacitását kemiluminometriás módszerrel detektáltuk (Zimmermann *et al.* 1991).

A plazma troponin T színjének mérése

A kardiális troponin T kimutatása a plazmából szenzitív elektrokemilumineszcens immunoassay (ECLIA) alkalmazásával történt (Elecsys 2010, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

Mieloperoxidáz aktivitás mérése

A PMN leukociták infiltrációját jelző mieloperoxidáz aktivitást vékonybél biopsziás mintából határoztuk meg (Kuebler *et al.* 1996). A mintát 0.1 mM fenilmetilszulfonil fluorid tartalmú Tris HCl pufferben (0.1 M, pH 7.4) homogenizáltuk, majd centrifugáltuk (4 °C-on, 20 percig, 2000 g). A mieloperoxidáz aktivitást 450 nm-en (UV-1601 Shimadzu, Japan) spektrofotométerrel mértük, az aktivitást fehérje tartalomra számítottuk.

Immunohisztokémia

A C3 komplement reakciót a vékonybél szövetmintákban immunohisztokémiai módszerrel vizsgáltuk (Girardi *et al.* 2003) formalinban fixált mintából, nyúl poliklonális anti-komplement C3c antitestet használva (Bioss Inc, Woburn, MA, USA). A szövettani mintákat a vizsgálattól független kórszövettanász szakember értékelte.

3.5. Kísérleti protokollok

Az első kísérlet-sorozatban az állatokat random módon két csoportra osztottuk. Az álműtött csoport (n=7) mellett a második (n=8) csoportban peri kardiális tamponádot hoztunk létre intraperikardiálisan beadott kolloid oldattal (60-90 ml 6% HES), amíg az artériás középnyomás 45-50 Hgmm-re nem csökkent. A tamponád 60 percig tartott, majd a folyadék lebocsátását követően az állatokat további 180 percig obszerváltuk. Vérmintákat vettünk a kontroll periódusban, valamint a 75. 150. és 240. percekben, amelyekből meghatároztuk a vazóaktív és gyulladáshoz vezető mediátorok szintjét (big-ET, hisztamin, nitrit/nitrát, troponin T, HMGB-1 és a teljes vér szuperoxid tartalma). A kísérletek végén vékonybél biopsziát vettünk az ileumból mieloperoxidáz aktivitásmérésre, ill. immunohisztokémiai vizsgálatokra a C3 komplement depozitumok kimutatására. Ezután az állatokat Na-pentobarbitállal túlaltattuk.

A második kísérletsorozatban az állatokat random módon három csoportra osztottuk. Az első, álműtött, kontroll csoport (n=6) mellett a második (n=7) és a harmadik (n=6) csoport állataiban peri kardiális tamponádot hoztunk létre. A harmadik csoport a tamponád 45. percében C5a antagonistá AcPepA kezelést kapott (4 mg/kg 5 ml bolus fiziológiás sóoldatban, majd infúzióban). Az AcPepA-t a japán kooperációs partner állította elő (Biologica Co. Ltd. Nagoya, Japan) (Okada *et al.* 2011). A kontroll és a kezeletlen tamponádos csoportok fiziológiás sóoldatot kaptak. Vérmintákat az első vizsgálati protokoll szerint vettünk, az obszerváció 240 percig tartott.

3.6. Statisztikai analízis

Az adatok kiértékelését statisztikai szoftver csomag segítségével végeztük (SigmaStat for Windows, Jandel Scientific, Németország), nem-parametrikus módszereket alkalmazva. A csoporton belüli eltéréseket Friedman és Dunn próbával, a csoportok közötti különbségeket Kruskal-Wallis és Dunn próbával elemeztük.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Hemodinamikai változások és gyulladásos válaszreakciók perikardiális tamponád során

4.1.1. Hemodinamikai változások

Az álműtött csoportban a kísérlet időtartama alatt hemodinamikai változást nem mutattunk ki a kiindulási értékekhez képest.

A tamponád 60 perce alatt az artériás középnyomást 40-45 mmHg között tartottuk, kolloid infúziót adva a perikardium üregébe, ezzel a perctérfogat mintegy 60%-os csökkenését értük el. Az szisztémás vaszkuláris rezisztencia index és a szívfrekvencia szignifikánsan nőtt (32% ill. 66%-al). A tamponád megszüntetése után az artériás középnyomás szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a kontroll csoportban, miközben a perctérfogat és a szívfrekvencia visszatért a kiindulási értékekre.

A centrális vénás nyomás növekedés a szívtamponádos csoportban jelzi a vénás visszaáramlás gátlását. A folyamat együtt járt a jobb és bal szívfél végdiasztolés térfogatának csökkenésével. A tamponád megszüntetését követően a centrális vénás nyomás és a jobb szívfél végdiasztolés volumene normalizálódott, míg a bal szívfél esetében az érték alacsonyabb maradt, nem érte el a kiindulási értéket. Ez a változás a tamponádot követően hosszabb ideig fennálló bal kamrafunkció károsodásával magyarázható.

A tamponád alatt átmenetileg szignifikánsan csökken a pulmonális artériás nyomás, majd növekszik, a pulmonális vaszkuláris rezisztencia kétszeresére nőtt. A tamponád megszűnését követően a pulmonális vaszkuláris rezisztencia és a pulmonális artériás nyomás szignifikánsan magasabb marad a kontroll csoporttal összehasonlítva, ezzel egyidejűleg az extravaszkuláris tüdővíz mennyisége is megnövekszik a vizsgálat végére.

Az artéria mesenterica superiorban jelentős véráramlás csökkenést mutattunk ki a tamponád alatt, mely a mesenterialis keringés károsodását jelzi. A tamponád megszüntetését követően a mesenterialis véráramlás a kontroll értékre tért vissza.

A mikrocirkuláció változásáról a $p\text{CO}_2$ gap, a lokális szöveti és az artériás $p\text{CO}_2$ közötti különbség tájékoztat. A $p\text{CO}_2$ gap szignifikánsan nőtt a tamponádos csoportban, a tamponád megszűnését követően értéke csökkent, de még így is szignifikánsan magasabb volt, mint a kontroll csoportban.

4.1.2. A biokémiai paraméterek változása

A tamponádot követően azonnal, jelentősen emelkedett a szuperoxid gyök termelődése, ezzel párhuzamosan szignifikánsan megnőtt a hisztamin szintje is a vizsgálat 75. és 240. percében.

A plazma NO_x koncentráció a nitrogén monoxid termelődést jelzi. A perikardiális tamponád hatására kisebb mértékű, de statisztikailag szignifikáns emelkedést észleltünk a NO_x szintjében, összehasonlítva a kezdeti és a kontroll csoport megfelelő értékeivel.

A big-ET az ET stabil, hosszú felezési idejű prekürzora. A plazma big-ET szintje szignifikánsan, mintegy 4-5-szeresére nőtt.

A HMGB-1 a gyulladást előidéző folyamat kifejlődését jelző mediátor; a molekula plazmaszintje jelentősen emelkedett a perikardiális tamponád következtében.

A bélbiopsziás szövetmintában a PMN leukociták felszaporodását lehetett kimutatni, ezzel egyidejűleg a mieloperoxidáz aktivitás is szignifikánsan megemelkedett a kísérleti csoportban az álműtöttekhez képest.

A troponin T plazmaszint emelkedése jelzi a szívizomsejtek károsodását. A perikardiális tamponád során a troponin T koncentrációja megemelkedett és szignifikánsan magasabb volt a kísérlet végéig, mint az álműtött csoportban.

A komplement rendszer aktiválódását a C3 komplement depozitumok megjelenése jelezte a bélbiopsziás mintákban. Immunohisztokémiai módszerrel vizsgálva a C3 lerakódások száma a kapillárisokban szignifikánsan magasabb volt a tamponádos csoportban a kontrollhoz képest.

4.2. A komplement C5a antagonistákkal történő kezelés kardiális hatásai

4.2.1. Kardio-pulmonális hemodinamikai változások

Az artériás középnyomás 40-45 Hgmm között tartottuk a perikardiális tamponád alatt 60 percig, s ezzel mintegy 65%-os perctérfogat csökkenést értünk el, miközben a szívfrekvencia szignifikánsan emelkedett. A tamponád megszüntetését követően az artériás középnyomás szignifikánsan alacsonyabb volt a kezelt tamponádos csoportban a kontrollhoz képest, míg a szívfrekvencia és a perctérfogat visszatért a kiindulási értékre az alacsonyabb artériás középnyomás ellenére. Az AcPepA alkalmazása a tamponád 45. percében az artériás középnyomás emelkedését okozta, nem befolyásolta a perctérfogatot, szignifikánsan csökkentette a szívfrekvenciát.

A centrális vénás nyomás emelkedése jelezte a vénás visszaáramlás gátlását a tamponád alatt. Ez együtt járt a teljes végdiasztolés térfogat csökkenésével. E paraméter a tamponád

megszűnését követően sem érte el a kiindulási értéket, jelezve a hosszú ideig fennálló vénás beáramlás csökkenését. Az AcPepA kezelés szignifikánsan növelte a preload paramétereket a tamponádot követően, a teljes végdiasztolés térfogat növekedett, jelezve a vénás beáramlás és az előterhelés növekedését.

A perikardiális tamponád a balkamra funkció elhúzódo károsodását okozta, melyet a bal szívfél végdiasztolés térfogatának tartós csökkenése igazolt. Az AcPepA komplement antagonistá alkalmazása a tamponád 45. percében normalizálta a bal szívfél végdiasztolés volumenét a tamponád megszűnését követően, a kezeletlen csoporthoz képest. Szemben a bal szívfél érintő változásokkal, a jobb szívfél végdiasztolés térfogata a tamponád megszüntetésével elérte a kiindulási értéket, és ezen már a komplement C5a antagonistá kezelés sem változtatott.

A perikardiális tamponád szignifikáns változásokat okoz a pulmonális keringésben, mind a tamponád alatt, mind a tamponád megszűnését követően. Az AcPepA kezelés csökkentette a tamponád által kiváltott pulmonális artériás nyomás és pulmonális vaszkuláris rezisztencia emelkedést, míg a perikardiális tamponád által okozott extravaszkuláris tüdővíz index növekedést nem befolyásolta (a megfigyelési periódusunk során).

4.2.2. A biokémiai paraméterek változása

A TNF- α felszabadulás a gyulladáso folyamatok szenzitív markere. Kísérleti modellünkben mintegy tízszeres plazma TNF- α emelkedést mutattunk ki a tamponád alatt, mely a kompressziót megszüntetve a megfigyelési periódus végére jelentősen lecsökkent.

Egy további fontos mediátor, a hisztamin szintjének emelkedése jelzi a hipoxiára érzékeny gyulladáso sejtek (hízósejtek és bazofil leukociták) aktiválódását. A plazma hisztamin szint szignifikánsan megnőtt a tamponádot követő 15. percben.

Az AcPepA beadását követően a biokémiai markerekben szignifikáns különbségeket észleltünk. Az AcPepA kezelés csökkentette a TNF- α és a hisztamin plazma koncentrációját, mely megközelítette álműtött csoport szintjét. A troponin T szint szignifikáns emelkedését igazoltuk a tamponád alatt és azt követően, ugyanakkor az AcPepA kezelés alkalmazása alacsonyabb troponin T szinteket eredményezett.

A komplement rendszer aktiválódásának jeleként, immunohisztokémiai módszerrel vizsgálva, a vékonybél mintákban komplement C3 lerakódást mutattunk ki a tamponádoso csoportban. Ezzel szemben az AcpepA-val kezelt csoportban jelentősen csökkent a C3 depozitumokat mutató kapillárisok száma.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. I. tanulmány. Hemodinamikai változások és gyulladásoos válaszreakciók perikardiális tamponád során

A perikardiális tamponád magas mortalitással és posztoperatív szövödményekkel járhat, a megfelelő kezelés ellenére is. A tompa mellkasi sérülések kapcsán a mortalitás meghaladhatja a 80%-ot (Brathwaite *et al.* 1990). Elektív szívsebészeti műtétek esetén a mortalitást 22%-nak találták klinikailag igazolt, lokalizált perikardiális tamponád során (Grumann *et al.* 2012).

Vizsgálatainkban célul tűztük ki, hogy feltérképezzük a perikardiális tamponád során fellépő gyulladásoos folyamatokat, ezért megvizsgáltuk a gyulladásoos mediátorok aktiválódását, amelyeknek szerepük lehet a tamponád után kialakuló károsodásokban. Kísérletben kimutattuk, hogy a tamponád a szisztémás keringésben alacsony perfúzióval jár együtt, melynek során károsodik a bal kamra funkció és a pulmonális keringés is. A diasztolés telődés gátlása során vazokonstriktoros kompenzáló mechanizmusok aktiválódnak, melyek különböző mértékben jelentkeznek a pulmonális és a szisztémás keringésben: a pulmonális vaszkuláris rezisztencia emelkedése jelentősen nagyobb (112%), míg a szisztémás vaszkuláris rezisztencia növekedése kisebb (32%). Korábbi kísérletes és klinikai adatok igazolták, hogy a perikardiális nyomás emelkedése a koronária keringés fokozatos csökkenését okozza, a koszorúér vaszkuláris rezisztenciája növekszik (Klopfenstein *et al.* 1987, Skolidis *et al.* 2000). Azt is igazolták, hogy a koronária áramlási rezerv csökken a perikardiális nyomás növekedésével, mely jelzi a miokardium fokozott fogékonyságát az iszkémiás károsodásokkal szemben. A szívfrekvencia jelentős emelkedése a tamponád kezdetei szakaszában szintén hozzájárul a kardiális hipoxia kialakulásához. Vizsgálatunkban a troponin T emelkedése is igazolta a tamponád akut fázisában a miociták hipoxiás károsodását.

A tamponád megszüntetését követően az artériás középnyomás alacsony maradt, a perctérfogat azonban normalizálódott, a kontroll csoporttal összehasonlítva. A jobb szívfél végdiasztolés volumene normalizálódott, ellenben a bal szívfél végdiasztolés volumene alacsonyabb maradt, jelezve a továbbra is fennálló bal kamrai diszfunkciót. A pulmonális vaszkuláris rezisztencia, a pulmonális artériás nyomás és az extravaszkuláris tüdővíz index emelkedése is jelezte a pulmonális keringés károsodását. Ez összhangban áll azokkal a klinikai megfigyelésekkel, melyek a perikardiális tamponádot követően fellépő keringési elégtelenségről és tüdőödémáról számoltak be (Ligero *et al.* 2006, Bernal *et al.* 2007).

Állatkísérletes modellünkben a CO₂ gap változása igazolta a vékonybél mikrokeringés károsodását. Ezzel párhuzamosan kimutattuk a szuperoxid gyökök szintjének emelkedését, a big-ET, a HMGB-1, a hisztamin és a bél mieloperoxidáz aktivitás emelkedését, valamint a komplement rendszer aktiválódását a tamponádot követő periódusban.

5.2. II. tanulmány. A komplement C5a antagonistá kezelé kardialis hatásai

Ismert, hogy a gyulladási rendszer aktiválódása szerepet játszik az alacsony perctérfogattal járó keringési elégtelenség progressziójában. Az “anti-inflammatorikus” komponensek szerepéről, vagy e potenciálisan káros hatások csökkentésének lehetőségeiről viszonylag kevés ismeret áll rendelkezésünkre. Néhány korábbi kísérlet adatai (Ward 2008; Sarma and Ward 2011) azonban arra utaltak, hogy a komplement rendszer gátlása lehetséges célpont lehet e káros következmények mérséklésére. Második vizsgálatunkban ezért azt a célt tűztük ki, hogy megvizsgáljuk a komplement C5a, a gyulladási folyamatokban központi szerepet játszó, potens mediátor gátlásának hatását, egy szintetikus, 17 aminosavból álló antagonistá peptid (AcPepA) segítségével, amely már korábbi kísérletekben, endotoxin shock modellben hatékonyan bizonyult (Okada *et al.* 2011). Tanulmányunkban kimutattuk, hogy a C5a antagonistá peptid a reperfüziót megelőző fázisban történő alkalmazása normalizálja a tamponád megszüntetését követően kialakuló balkamrai diszfunkciót, és helyreállítja a pulmonális keringést. Ezzel egyidejűleg a TNF- α , a hisztamin plazma szintek és a komplement aktiválódás jelei (kapilláris C3 depozitumok) is szignifikánsan csökkentek.

Ismert, hogy a hisztamin nagy mennyiségben szabadul fel hipoxiás körülmények között (Boros 2003) és a komplement C5a molekula közvetlen hízósejt aktiváló hatása révén hisztamin felszabadulást eredményezhet (El-Lati *et al.* 1994). A megemelkedett hisztamin szint szerepet játszik az ér permeabilitás fokozódásában, amely a pulmonális rendszerben hozzájárulhat az extravaszkuláris tüdővíz emelkedéséhez (Walkenstein *et al.* 1985), és a tüdő ödéma kialakulásához.

Egyre több adat szól amellett, hogy a citokinek és különösen a TNF- α szerepet játszanak a kardiovaszkuláris betegségek kialakulásában. A TNF- α plazmaszintjének emelkedését és receptorainak fokozott expresszáldását mutatták ki iszkémia–reperfüziós károsodás, miokarditis és krónikus szívelégtelenség kapcsán is. A TNF- α két fontos hemodinamikai paramétert is befolyásolhat, a perifériás érellenállást és a szívkontraktilitást (Ferrari *et al.* 1999). Vizsgálatunkban kimutattuk, hogy a perikardiális tamponád a TNF- α plazmaszintjének emelkedésével jár, melyet az AcPepA kezelé kivédett.

A plazma troponin T szintjének emelkedését mutatták ki klinikai körülmények között, tüdődaganatos betegen perikardiális tamponád kapcsán létrejövő kardiális iszkémiában (Kelley *et al.* 2009). Ehhez hasonlóan tamponád modellünkben igazoltuk a troponin T szintjének emelkedését, melyet az időben alkalmazott AcPepA kezelés mérsékelte.

Összefoglalva eredményeinket, vizsgálatainkkal megerősítettük, hogy a komplement rendszer aktivációjának jelentős szerepe van a perikardiális tamponád által kiváltott keringési elégtelenségben. A C5a antagonistá kezelésk hatékony terápiás eszköznek bizonyult a hipotenzió következményeinek, a gyulladásk rendszer aktiválódásának, a balkamrai diszfunkció és a pulmonális keringésk zavarainak mérséklésében, kísérletes körülmények között.

6. A TÉZIS FONTOSABB MEGÁLLAPÍTÁSAI

I. A perikardiális tamponád klinikailag releváns, állatkísérletes modelljét kidolgozva igazoltuk, hogy a tamponád szignifikáns zavarokat okozott a vékonybél keringésében, károsította a balkamrai funkciót és a pulmonális keringést, valamint ezzel egyidejűleg jelentős gyulladásoos aktivációt eredményezett a tamponádot követő periódusban.

II. A kísérletes vizsgálatainkban kimutatott pro-inflammatorikus és vazoaktív mediátorok közül a hisztamin, a big-ET, a HMGB-1 és a komplement C3 szintek változásai diagnosztikai lehetőségeket és új, adjuváns terápiás célpontokat jelenthetnek a tamponád káros perifériás következményeinek befolyásolására.

III. Kimutattuk, hogy a tamponád megszüntetése előtt alkalmazott komplement C5a antagonistá terápia hatékonyan befolyásolja azokat a keringési és gyulladásoos mechanizmusokat, melyek a tamponádot követő káros következményekért is felelősek lehetnek.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

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

Szeretném kifejezni hálámat Forster Tamás Professzor Úrnak, a II számú Belgyógyászati Klinika vezetőjének, hogy bízott bennem és támogatott tudományos és klinikai munkámban.

Különleges hálával tartozom témavezetőmnek, *Kaszaki József Tanár Úrnak*, aki személyesen irányított és vezetett be a kísérletes kutatás rejtelseibe. Folyamatos bátorítása, soha nem múló lelkesedése és baráti tanácsai segítettek, hogy ez a PhD elkészülhessen.

Szeretném kifejezni legmélyebb hálámat Csanády Miklós Professzor Úrnak, a II Belgyógyászati Klinika korábbi igazgatójának, hogy fiatal orvosként a klinikájára kerülhettem, és tagja lehettem az echokardiográfiás munkacsoportnak, valamint Sereg Mátyás Főorvos Úrnak, a székesfehérvári Szent György Kórház kardiológiai osztálya korábbi vezetőjének, aki bevezetett a kardiológiába.

Külön köszönettel tartozom a Sebészeti Műtéttani Intézet technikai személyzetének, valamint a II. Belgyógyászati Klinika echokardiográfiás asszisztens nőinek. Az ő kiváló munkájuk és lelkes hozzáállásuk sokat segített, hogy a nehézségeket megoldjuk, ezáltal elősegítették az experimentális és klinikai tevékenységemet. Köszönöm az Intézet dolgozóinak hogy szakértelmükkel, pontos munkájukkal hozzájárultak a kísérletek eredményeihez.

Végül szeretném kifejezni hálámat az egész családomnak, akik mindvégig támogattak, és mellettem álltak.

Jelen kutatási eredmények megjelenését a „Környezeti tényezők és genetikai faktorok interakciójának vizsgálata immunmediált és daganatos betegségek kialakulásában” című, TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0035 számú projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg. További kutatási támogatás: OTKA K104656;