

**Nem okkluzív mezenteriális iszkémia makro- és mikrokeringési következményeinek
befolyásolása komplement C5a antagonistá kezeléssel**

Dr. Nógrády Miklós

Ph.D. Tézis

Szegedi Tudományegyetem,

Sebészeti Műtéttani Intézet

Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

Témavezetők:

Dr. Varga Gabriella, PhD

Dr. Érces Dániel, PhD

2016

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

- I. Vass A, Süveges G, Érces D, **Nógrády M**, Varga G, Földesi I, Futakuchi M, Imai M, Okada N, Okada H, Boros M, Kaszaki J (2013) Inflammatory activation after experimental cardiac tamponade. *Eur Surg Res.* **51(1-2):1-13. IF: 0,75**
- II. Érces D*, **Nógrády M***, Varga G, Szűcs S, Mészáros AT, Fischer-Szatmári T, Cao C, Okada N, Okada H, Boros M, Kaszaki J (2016) Complement C5a inhibition improves late hemodynamic and inflammatory changes in a rat model of nonocclusive mesenteric ischemia. *Surgery* **159(3):960-71. IF: 3,38**
- III. Érces D, **Nógrády M**, Nagy E, Varga G, Vass A, Süveges G, Imai M, Okada N, Okada H, Boros M, Kaszaki J (2013) Complement C5A antagonist treatment improves the acute circulatory and inflammatory consequences of experimental cardiac tamponade. *Crit Care Med.* **41(11):e344-51. IF: 6,12**
- IV. **Nógrády M**, Varga G, Szűcs Sz, Kaszaki J, Boros M, Érces D (2016) Komplement C5a antagonista terápia hatása nem okkluzív mezenterialis iszkémia állatmodelljeiben *Magyar Sebészet* (közlésre elfogadva)

*megosztott első szerzők

1. BEVEZETÉS

1.1. Az akut mezenterialis iszkémia

Az akut mezenterialis iszkémia (AMI) súlyos, életveszélyes állapot, 50-70%-os halálozási aránnyal (Acosta és mtsai, 2010). A bélnyálkahártya a mezenterialis véráramlás átmeneti csökkenése után is sérülhet kisebb mértékben, azonban az iszkémiás állapot elhúzódása bélfal nekrozishoz és perforációhoz vezethet (van den Heijkant és mtsai, 2013). Kórtana alapján az AMI okkluzív és nem okkluzív csoportokba osztható. Az okkluzív AMI leggyakoribb oka az artéria mesenterica superior (AMS) embólusa/trombózisa, vagy a véna mesenterica trombózisa. A nem okkluzív mezenterialis iszkémia (NOMI) az AMS vagy más splanchnikus verőér ágak fizikai elzáródása nélkül alakul ki. Az érintett keringési területen a bélfal károsodása változó mértékű lehet, de akár a gangrénáig fokozódhat. A kórkép magas mortalitású, a halálozás a jelenlegi terápiás lehetőségek mellett meghaladja az 50%-ot. Jelentős problémát jelent, hogy a tünetek leggyakrabban nem specifikusak, ezért általában csak a késői szakaszban gondolnak a folyamatra, a súlyos szövődmények, peritonitis, szepszis fellépése után (Klar és mtsai, 2012). Elsődlegesen ritkán alakul ki, ezekben az esetekben a betegek általában idősek, krónikus szívelégtelenségben szenvednek. Gyakrabban jelentkezik szövődményként alacsony perctérfogattal járó állapotok során, de szívsebészeti beavatkozások alatt az extrakorporális keringés miatt kialakuló gyulladásos reakció és az alkalmazott vazopresszor terápia is hozzájárulhat kialakulásához (Klotz és mtsai, 2001).

1.2. A NOMI patomechanizmusa

Szinte minden keringési sokk állapotban létrejöhet NOMI. Keringési sokkban a létfontosságú szervek vérellátása károsodik, amelyet a szervezet eleinte képes kompenzálni a keringés centralizációjával. A folyamat során főként a szív, az agy, a mellékvesék oxigénellátása biztosított, viszont ennek következtében az oxigénhiányos szervek (zsigeri szervek, vesék) visszafordíthatatlan hipoxiás károsodást szenvednek. A sokkot kardiogén, disztributív, hipovolémiás és obstruktív csoportokra oszthatjuk. Kardiogén sokkban a megfelelő vérvolumen ellenére romlik a perctérfogat, amit a károsodott szív pumpafunkció okoz. A disztributív sokkot a perifériális érellenállás jelentős csökkenése okozza, hipovolémiás sokkban a keringő vértérfogat csökken, az obstruktív sokk a szív vagy a nagyerek elzáródása következtében alakul ki.

A NOMI-t legtöbbször feszülő légmell, perikarditisz vagy perikardiális tamponád (PT) okozza (Seferović és mtsai, 2006). A PT során megnövekedett utóterhelés tovább ronthatja a perifériális szervek perfúzióját, valamint növeli a szívizom oxigénigényét. A generalizált hemodinamikai károsodás következtében létrejött keringési redisztribúció NOMI kialakulásához vezet a szplanchnikus területen. A zsigeri területen kialakult hipoxia mezenteriális vazokonstrikcióhoz vezet (Williams és mtsai, 1980), amelyben jelentős szerepet játszanak az oxigénhiány okozta endogén vazokonstriktorok (endothelin-1 (ET-1)) és proinflammációs molekulák (pl. high-mobility group box protein-1 (HMGB-1)) felszabadulása (Weitzberg és mtsai, 1991; Scaffidi és mtsai, 2002). Feltételezések szerint a folyamatban fontos szerepet játszhat a komplement rendszer aktivációja is (Soop és mtsai, 2004), különösen az aktiváció során képződő C5a komplement fragmentum. A komplement C5a simaizom kontrakciót okoz, amellyel közvetlenül is hozzájárul a keringés romlásához. Kemotaktikus hatása révén neutrofil granulocita akkumulációt vált ki, citokinek és reaktív oxigén származékok termelését fokozza, amellyel a gyulladási folyamatot tovább súlyosbítja (Ehrensgruber és mtsai, 1994).

Fontos továbbá, hogy a NOMI-t követő reoxigenizáció súlyosabb szöveti sérüléseket okozhat, mint maga az iszkémiás károsodás (Yasue és mtsai, 1988). A reperfüziós fázisban csökken a mezenteriális véráramlás, növekszik az érellenállás és fokozódik a fehérvérsejtek szabadgyöktermelő kapacitása (Wolfárd és mtsai, 1999). A reaktív oxigéngyökök (ROS) emelkedett szintje központi szerepet játszik az említett iszkémia-reperfüziós károsodásban (Boros és mtsai, 1991). Más endogén vegyületek, mint például a vérlemezke-aktiváló faktor (Carter és mtsai, 1996), ET-1 (Wolfárd és mtsai), hisztamin (Kaszaki és mtsai, 1994), tumor nekrozis faktor- α (TNF- α) (Yao és mtsai, 1995) és különböző interleukinok (Tamion és mtsai, 1997) szintén fontos szerepet töltenek be a szöveti károsodás kialakulásában. Ennél is fontosabb, hogy az iszkémia-reperfüzió aktiválhatja a komplement rendszert antigén független gyulladási útvonalakon keresztül (Riedemann és mtsai, 2003).

Annak bizonyítására, hogy a NOMI kórtanában a komplement rendszer aktiválódása, ezen belül is a C5a anafilatoxin központi szerepet játszik, kísérleteinkben komplement C5a gátló kezelést alkalmaztunk: egy újonnan kifejlesztett mesterséges peptid, a 17 aminosavból álló (ASGAPAPGPAGPLRPMF) acetil-peptid-A (AcPepA) hatásait vizsgáltuk a NOMI szövődményeire. Korábbi *in vitro* vizsgálatok igazolták, hogy az AcPepA koncentrációfüggő módon kötődik a komplement C5a központi régiójához (Fujita és mtsai, 2004), és a molekula

hatékonyak bizonyult C5a dependens sokk modellekben - kísérletes endotoxin sokkban jelentősen javította a kezelés nélkül letális inzultus túlélési arányát (Okada és mtsai, 2011).

1.3. Állatmodellek a NOMI kórtanának kutatására

Nagy klinikai jelentősége ellenére a NOMI-ra vonatkozó ismereteink jórészt esetmegfigyelésekből gyűjtött adatokból származnak. A NOMI következményeit számos nagy állatmodellben, legtöbbször kísérletes PT létrehozásával is vizsgálták, amely a NOMI akut következményeinek tanulmányozására alkalmas. Kísérletes PT során a perikardium különböző folyadékokkal lehet feltölteni (vér, dextrán vagy fiziológiás sóoldat), de ekkor a NOMI során kialakuló változások, keringési zavarok kórélettana csak korlátozottan vizsgálható. Az intézetünkben kidolgozott sertés PT modellben jól reprodukálható módon igazoltuk, hogy PT alatt a szignifikánsan csökkenő perctérfogat mellett jelentősen megemelkedik a szívfrekvencia. Kimutattuk, hogy a tamponád megszüntetését követően vérnyomáscsökkenés, valamint a vénás visszaáramlás tartós károsodása alakul ki (Érces és mtsai, 2013), a PT megszüntetése után a perctérfogat és a szívfrekvencia normál szintre tér vissza. A romló makrohemodinamikai változások ebben a modellben jól nyomon követhetőek, azonban a szplanchnikus terület mikrokeringési változásai továbbra sem voltak feltárva és ezek az állatmodellek a NOMI hosszú távú következményeinek tanulmányozására sem voltak alkalmasak.

2. CÉLKITŰZÉSEK

1. Feltételezésünk szerint a kísérletes PT lehetőséget kínálhat a NOMI kórélettanának vizsgálatára. Elsődleges célunk az volt, hogy jellemezzük a PT vékonybél mikrokeringésre kifejtett hatásait és a létrejött gyulladásos reakciót kísérletes nagy állat modellben.
2. Feltételeztük, hogy a komplement C5a faktor gátlása kedvezően befolyásolja a NOMI káros következményeit. Célkitűzéseink szerint megvizsgáltuk a C5a antagonistá kezelésk akut hatásait a NOMI által okozott mikrokeringési és gyulladásos szövődményekre.
3. Következő célunk egy megbízható rágcsáló modell kidolgozása volt, amely alkalmas a NOMI okozta lokális és szisztémás következményeinek megfigyelésére. Feltételeztük, hogy az aorta részleges okklúziója rágcsálókban véráramlás csökkenést okoz a zsigeri

területen és ez egy megfelelő állapot lehet a NOMI késői makro- és mikrokeringési, valamint gyulladáshoz vezető következményeinek vizsgálatára.

4. Céljaink közé tartozott az AcPepA kezelés késői hatásainak vizsgálata a NOMI-t követő keringési és gyulladáshoz vezető folyamatra klinikailag releváns időkorlátokon belül.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Kísérleti állatok

Kísérleteinkhez hím, Sprague-Dawley patkányokat és vietnámi törpesertéseket használtunk, a vizsgálatokat a NIH irányelvei (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) és a tudományos célokra felhasznált állatok védelméről szóló 2010/63 számú EU direktíva szerint végeztük a Szegedi Tudományegyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága jóváhagyásával (engedélyszám: V/148/2013).

3.2. Kísérleti protokoll

Az 1. tanulmányban a kísérleteket mindkét nemű (n=19, átlagosan 24±3 kg súlyú) vietnámi törpesertéseken végeztük, amelyeket 12 órás éhezést követően instrumentáltunk. A műtétek előtt az állatok vizet *ad libitum* fogyaszthattak. Az anesztéziát ketamin (20 mg/ttkg) és xylazin (2 mg/ttkg) intramusculáris kombinációjával indukáltuk, majd fenntartását folyamatos propofol infúzióval (50 µl/min/kg) végeztük. Az endotracheális intubációt követően az állatokon mechanikus lélegeztetést alkalmaztunk, a légzési volumen 9±2 ml/kg volt. A légzési frekvenciát úgy állítottuk be, hogy a kilégzés végi szén-dioxid (ETCO₂) és a parciális artériás szén-dioxidnyomás (PaCO₂) 35-45 Hgmm tartományban legyen. Altatást követően hanyattfekvő helyzetben az állatokat fűtőpadra helyeztük és a testhőmérsékletüket 36 és 37 °C között tartottuk. Az állatok Ringer-laktát infúziót kaptak (10 ml/kg/h) a kísérlet alatt. A jobb oldali artéria femoralist és véna jugularist kanuláltuk az artériás középnyomás (MAP) és a perctérfogat (CO) termodilúciós (PiCCO, Pulsion Medical Systems, Németország) méréséhez, valamint folyadékpótlás és gyógyszeres kezelés céljából. Medián laparotomiát követően az AMS gyökét preparáltuk, amely köré a mezenterialis véráramlás mérése céljából ultrahangos áramlásmérő fejet (Transonic Systems Inc., Ithaca, NY, Amerikai Egyesült Államok) rögzítettünk. A kísérletek során az állatokat folyamatosan monitoroztuk,

artériás vérgáz ellenőrzések rendszeresen történtek (Cobas b121; Roche Diagnostics GmbH, Bécs, Ausztria). A műtét után 30 perc nyugalmi szakasz következett.

Az állatokat véletlenszerűen 3 kísérleti csoportba osztottuk. Az 1. csoport (álműtött, n=6) kontrollként szolgált. A protokoll megfelelt a 2. (n=7) és 3. (n=6) csoportnál alkalmazottal, azzal a különbséggel, hogy itt nem hoztunk létre PT-ot. Mindhárom csoportban bal oldali lateralis thoracotomia után a perikardiumba dohányzacskó-öltésen keresztül vékony kanült helyeztünk el, majd rögzítettük. Intraperikardialisan beadott kolloid oldattal (100-150 ml 6% hidroxietil keményítő) PT-ot hoztunk létre, mialatt az MAP-t 40 és 50 Hgmm között tartottuk. A tamponád 60 percig tartott, majd a folyadék lebocsátását követően az állatokat további 180 percig obszerváltuk. A harmadik csoport a tamponád 45. percében C5a antagonistát kapott (4 mg/kg 5 ml bolus fiziológiás sóoldatban, intravénásan a jugularis vénán keresztül). Az AcPepA-t együttműködő partnerünk állította elő és bocsátotta rendelkezésünkre (Biologica Co. Ltd. Nagoya, Japán). A kontroll és a kezeletlen tamponád csoportok 0,9%-os NaCl oldatot kaptak azonos protokoll szerint. A tamponád kezdete jelöli a 0. percet, vérmintákat vettünk a kontroll periódusban, valamint a 75, 150, és 240. percekben, amelyekből meghatároztuk a HMGB-1 és a big-ET (az endothelin prekürzora) szintet. A kísérletek végén vékonybél biopsziát vettünk az ileumból a mieloperoxidáz (MPO) aktivitás mérésére.

A 2. és 3. tanulmányban patkányokat alkalmaztunk kísérleteinkhez. A 2. tanulmányban nátrium-pentobarbitál anesztéziát (50 mg/kg intraperitoneálisan) követően a patkányokat hanyattfekvő helyzetben fűtőpadra helyeztük, tracheostomiát végeztünk a spontán légzés elősegítésére. A jobb oldali véna jugularist kanüláltuk folyadékpótlás (Ringer laktát infúzió, 10 ml/kg/hr) és gyógyszeres kezelés céljából. Kanüláltuk a bal oldali artéria femoralist a MAP és a szívfrekvencia (HR) mérése céljából. A jobb artéria carotis felől termisztor katétert (PTH-01; Experimetria Ltd., Budapest, Magyarország) vezetünk az aorta ascendensbe termodilúciós CO mérés céljából (SPEL Advanced Cardiosys 1.4, Experimetria Ltd, Budapest, Magyarország). Medián laparotomiát követően az aorta abdominalis proximális részét kipreparáltuk a rekeszizom és az AMS eredése között, majd egy szilikon érleszorító katétert helyeztünk az ér köré. A műtétet követően 30 perc nyugalmi szakasz következett. A kontroll időpontban, 30 perccel a PAO indukciója után, közvetlen a PAO megszüntetése előtt, valamint a 90. és 120. percben mértük MAP, a CO, HR és az AMS áramlás értékeit.

Az állatokat véletlenszerűen osztottuk 2 kísérleti csoportba. Az első csoportnál (n=7) PAO-t váltottunk ki egy órán keresztül. A cél az volt, hogy a MAP-ot folyamatosan 30 és 40 Hgmm között tartsuk. A 2. csoport (n=6) álműtötként szolgált.

A 3. tanulmányban nátrium-pentobarbitál anesztéziát követően a patkányokat hanyattfekvő helyzetben fűtőpadra helyeztük. Kanüláltuk a bal oldali artéria femoralist MAP és a HR mérése céljából. Medián laparotomiát követően az aorta abdominalis proximalis részét kiproparáltuk a rekeszizom és az AMS eredése között, majd egy szilikon érleszorító katétert helyeztünk az ér köré. A műtétet követően 30 perc nyugalmi szakasz következett. A kontroll időpontban, 30 perccel a PAO indukciója után, közvetlen a PAO megszüntetése előtt, valamint a 90. és 120. percben mértük MAP, a CO, HR és az AMS áramlás értékeit.

Az állatokat véletlenszerűen osztottuk 3 kísérleti csoportba. Az első csoport (n=8) álműtötként szolgált, míg a 2. (n=8) és a 3. (n=9) csoportnál PAO-t váltottunk ki egy órán keresztül. Az első és a második csoportnál az AcPepA vivőanyagát (1 ml fiziológias sóoldat) a farokvénába adtuk intravénásan, míg a 3. csoportnál AcPepA kezelést (4 mg/kg 1 ml fiziológias sóoldatban) alkalmaztunk 15 perccel a PAO vége előtt. A kontroll időpontban, 30 perccel a PAO indukciója után, közvetlen a PAO megszüntetése előtt, valamint a 90. percben mértük az MAP és HR értékeit. A megfigyelési idő leteltével a femoralis katétert eltávolítottuk, a sebet pedig szuturával zártuk. Az állatokat azonnal kizártuk a kísérletből, ha a hátsó végtag tartós iszkémia tüneteit észleltük.

Az állatokat újra altattuk 24 óra elteltével a már leírt módon, majd a spontán légzés megkönnyítésére tracheostomiát hajtottunk végre. A jobb oldali véna jugularist kanüláltuk folyadékpótlás (Ringer laktát infúzió, 10 ml/kg/hr) és gyógyszeres kezelés céljából. A MAP és HR mérése céljából kanüláltuk az bal arteria carotis communist. A jobb arteria carotis felől termisztor katétert (PTH-01; Experimetria Ltd., Budapest, Magyarország) vezetünk az aorta ascendensbe termodilúciós CO mérés céljából (SPEL Advanced Cardiosys 1.4, Experimetria Ltd, Budapest, Magyarország). A medián laparotomia sebet újra kinyitottuk, majd a mezenteriális véráramlás mérésére ultrahangos áramlásmérő fejet (Transonic Systems Inc., Ithaca, NY, USA) helyeztünk az AMS köré. A kísérletek 2. napján a műtétet követő 30 perc nyugalmi szakasz után minden csoportnál kontroll makrohemodinamikai (MAP, CO, AMS áramlás) méréseket végeztünk, valamint 5 cm-re proximálisan a coecumtól a vékonybél nyálkahártya mikrokeringését OPS technikával vizsgáltuk. A kísérletek végén a véna cava inferiorból vérmintákat vettünk HMGB-1 és ET-1 plazmaszint meghatározásához. Szövetteni

mintákat vettünk az ileumból a leukocita akkumuláció szövettani vizsgálatának céljából, majd az állatokat pentobarbitállal túlaltattuk.

3.3. A mikrokeringés in vivo monitorozása intravitális videómikroszkópiával

Mind a sertés, mind a patkány modellben a vékonybél nyálkahártya mikrokeringésének vizsgálata orthogonális polarizációs spektrális (OPS) technikával történt (Cytoscan A/R, Cytometrics, Philadelphia, Pennsylvania, USA), amellyel a nyálkahártya felszíni 200 µm-es mélységében levő kapillárisokban keringő vörösvértestek tehető láthatóvá kontrasztanyag alkalmazása nélkül. Az ileum megnyitását követően a nyálkahártya mikrokeringéséről S-VHS videofelvételek készültek (Panasonic AG-TL 700, Matsushita Electric Ind. Co. Ltd, Osaka, Japán), melyeket off-line analizáltunk (IVM Pictron, Budapest, Magyarország) és meghatároztuk a vörösvértestek átlagos áramlási sebességét (RBCV; µm/s).

3.4. Vazoaktív és gyulladásoz mediátorok plazmaszintjének meghatározása

Sertések esetében a véna jugularisból, míg patkányok esetében a véna cava inferiorból 5 ml-es vérmintákat vettünk EDTA-t tartalmazó polipropilén csövekbe, majd 1200 g-vel 4 C°-on 15 percig centrifugáltuk. A plazmamintákból, amelyeket felhasználásig -70 C°-on tároltunk, és HMGB-1 (mindkét modellben), big endothelin (big-ET; sertések esetén) és ET-1 (patkányok) plazma koncentrációit határoztuk meg ELISA módszerrel (Biomedica Kft, Ausztria). A HMGB-1 potens proinflammációs citokin, amely származhat a nekrotikus sejtek magjából vagy aktív szekréció útján fehérvérsejtekből. A HMGB1 plazma koncentráció meghatározására nagy szenzitivitású és specificitású lépcsős szendvics ELISA módszert használtunk (Shino-Test Corporation, Kanagawa, Japán).

3.5. A teljes vér szuperoxid gyök produkciójának és a mieloperoxidáz enzimaktivitás meghatározása

Sertés modellben a teljes vér szabadgyök termelő kapacitást Zimmermann és munkatársai által 1991-ben leírt kemiluminometriás módszerrel detektáltuk.

A neutrofil granulocita szöveti akkumulációját a szöveti MPO enzim aktivitása alapján határoztuk meg. A sertések terminális ileumából származó szövetminta homogenizálása után,

az üledék MPO aktivitását fotometriás módszerrel (UV-1601 spektrofotométer, Shimadzu, Japan) határoztuk meg (Kubler, 1996).

3.6. Fehérvérsejt infiltráció meghatározása

A fehérvérsejt infiltrációt szövettani vizsgálattal határoztuk meg. A kísérletek végén az ileumból szövetmintát vettünk, amit 6 %-os formalinban fixáltunk, paraffinba ágyasztunk, 4 µm vastag szeletekre vágunk és hematoxilín- eozinnal festettük. Az ileum nyálkahártyáját infiltráló leukociták számlálása metszetenként legalább 20 látótérben történt 400x-os nagyításon.

3.7. Az ér- és szövetkárosodás *in vivo* vizsgálata

Rágcsáló modellünkben az ileum nyálkahártya károsodás mértékét *in vivo* szövettani vizsgálómódszerrel, fluoreszcens konfokális pásztázó lézer endomikroszkópia (CLSEM; Five1, Optiscan Pty. Ltd., Australia) segítségével határoztuk meg. Az ileum lumenét a coecumtól proximálisan 5 cm-re megnyitottuk, a nyálkahártyát feltártuk. A mucosa mikrovaskuláris szerkezetét fluoreszcein isothiocianát-dextran (FITC-dextran; 150 KDa, 20 mg/mL oldat fiziológiás sóban, Sigma Chem., 0,3 ml *iv*) adása után vizsgáltuk. Az eszköz objektívét a vékonybél nyálkahártyára helyeztük és 5 perccel a festék beadása után (1 scan/kép, 1024 x 512 pixel és 475 x 475 µm képenként) konfokális képeket készítettünk. A nyálkahártya szerkezeti változásait akridin orange (Sigma-Aldrich Inc, St. Louis, MO, USA) felszíni alkalmazása után vizsgáltuk. A PAO csoportban nem átfedő, különálló területeket vizsgáltunk és ezeket hasonlítottuk össze a kezelt és kontroll csoportok adataival szemikvantitatív kiértékelő módszert alkalmazva.

3.8. Statisztikai analízis

Az adatok kiértékelését statisztikai szoftver csomag segítségével végeztük (SigmaStat for Windows, Jandel Scientific, Németország), nem parametriás módszereket alkalmazva. A csoporton belüli eltéréseket Friedman próbával vizsgáltuk, ezen belül a kontroll értéktől való eltérést Dunn próbával teszteltük. A csoportok közötti különbségek meghatározása Kruskal–

Wallis és Dunn próbával történt. A grafikonokon a medián értéket és az interquartilis félterjedelmet ábrázoltuk. A szignifikancia szintet $p < 0,05$ -nél határoztuk meg.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A kísérletes PT jellegzetes tünetei

Kísérletes PT modellünkben az alacsony perctérfogattal járó állapot közvetlen hemodinamikai hatásai nagy részletességgel és időbeli felbontással vizsgálhatók. A tamponád alatt 1 órán át 40-50 Hgmm között tartottuk a MAP-ot, ezen időszak alatt a CO 65%-kal csökkent, amely jelentős HR emelkedéssel járt együtt. A csökkenő CO eredményeként kialakuló redisztribúciót a szignifikánsan lecsökkent AMS áramlás is jelezte. A tamponád megszüntetését követően a perctérfogat és a szívfrekvencia is normalizálódott a MAP jelentős csökkenése ellenére. A perikardiális folyadék eltávolítását követően az AMS áramlás visszatért a kiindulási tartományba.

A vékonybél nyálkahártyájában heterogénen oszcilláló mikrokeringés volt detektálható, ezért a vörösvértest áramlási sebesség súlyozott átlagát számítottuk ki. Az álműtött sertések esetében a vörösvértest áramlási sebesség a gyors áramlási fázisokban nem változott a kísérlet során, azonban a kezeletlen tamponádos csoport egyedeiben a tamponád végére szignifikánsan csökkent mikrokeringés volt kimutatható mind a kontroll értékekhez, mind az álműtött csoport adataihoz képest. A PT csoportnál a lassú áramlási fázisok időtartama szignifikánsan emelkedett a kísérlet 240. percére.

A PT során a big-ET (az ET-1 stabil prekurzora) jelentősen, 4-5-szörösére emelkedett a tamponádot követően. Jelentős emelkedés volt megfigyelhető a HMGB-1 szintben is. A tamponádot kísérő NOMI következtében az ileum nyálkahártyáját érintő gyulladás alakult ki, amelyet a szövetek között akkumulálódó fehérvérsejtek mennyiségét jellemző szöveti MPO enzim aktivitásának emelkedése is igazolt. A tamponádot követően emelkedett szuperoxid termelődést mértünk.

4.2. AcPepA kezelés hatása kísérletes PT-ben

A C5a antagonistá kezelési hatására az AMS áramlás szignifikáns emelkedését idéztük elő. Ezzel párhuzamosan a tamponádot követő obszervációs időszak végére az AcPepA-val

kezelt csoportnál szignifikánsan emelkedett mikrokeringés volt mérhető mind a kontroll értékekhez, mind a kezeletlen PT csoport értékeihez képest a gyors áramlású szakaszokban. Kimutattuk, hogy a tamponád hatására megnőtt lassú áramlási szakaszok hosszát a kezelés a kísérlet végére csökkentette.

Az AcPepA kezelés jelentősen csökkentette az emelkedett Big-ET és a HMGB-1 szintet. Hatására jelentősen mérséklődött a szöveti MPO aktivitása. C5a antagonistával a tamponádot követő emelkedett szuperoxid termelődést szignifikánsan csökkentettük.

4.3. A kísérletes PAO jellegzetes tünetei

Kísérleteinkben a PAO alatt a MAP egy órán keresztül 30 és 40 Hgmm közti értékeken volt. 30 perccel a PAO vége után a CO szignifikánsan magasabb értéket ért el az álműtött csoporthoz és a kontroll értékekhez képest is. A PAO-t követően 30 perccel a MAP szignifikánsan megemelkedett majd fokozatosan visszatért a kontroll értékekre a megfigyelési időszak alatt. Az SMA áramlás szignifikánsan csökkent a PAO alatt, majd szignifikánsan alacsonyabb értékeken is maradt a kísérletek végéig a kontroll értékekhez és az álműtött csoporthoz képest is.

Huszonegy órával a PAO-t követően a MAP értékekben nem tudunk sem csoporton belül, sem csoportok között kimutatni szignifikáns különbséget. A műtéti beavatkozás fokozott HR-t eredményezett a második napra, azonban a pulzusszám a PAO-n átesett patkányok esetében még az álműtött állatok megemelkedett értékeihez képest is szignifikánsan magasabb volt.

A CLSEM technika alkalmazásával végzett *in vivo* vizsgálatainkkal kimutattuk, hogy a PAO szignifikáns szöveti károsodást okozott a kontroll csoporthoz képest. A mikroerek struktúrája szintén jelentős károsodást szenvedett.

PAO után 24 órával szignifikánsan megemelkedett a gyulladáshoz köthető mediátorok (HMGB-1 és TNF- α) koncentrációja, valamint az ET-1 szintje. A kísérletek második napján szignifikánsan emelkedett fehérvérsejt-akkumulációt mértünk.

4.4. AcPepA kezelés hatása kísérletes PAO-ban

Az első napon nem volt szignifikáns különbség a MAP értékek között az áloperált patkányoknál. A MAP szignifikánsan magasabb volt a PAO-t követően 30 perccel a kontroll csoporthoz képest. Az AcPepA kezelés nem befolyásolta ezeket az értékeket és az álműtött csoporton belül sem alakult ki jelentős változás az 1. napon.

Az AcPepA kezeléssel átesett patkányokban a HR emelkedése nem ért el szignifikáns mértéket az álműtöttekhez viszonyítva. A kezelt csoportoknál az AMS áramlás nem változott a kontroll értékekhez képest. A kezeletlen csoport esetében ugyanakkor jelentős AMS áramlás-emelkedés volt megfigyelhető az álműtött csoporthoz képest. A C5a gátló kezelés szignifikánsan csökkentette az emelkedett CO-t. A második napra mind a szerozális, mind a nyálkahártyában mért RBVC szignifikánsan csökkent az álműtött csoporthoz képest. Az AcPepA kezelés szignifikánsan magasabb RBVC értékeket eredményezett.

A C5a gátló kezelés csökkentette a nyálkahártya károsodását, valamint szignifikánsan befolyásolta a mikroerek struktúrájában létrejött változásokat. Az AcPepA szignifikánsan csökkentette az említett gyulladási mediátorok és az ET-1 szintjét, valamint redukálta az emelkedett fehérvérsejt-akkumulációt is.

5. MEGBESZÉLÉS

Sertéseken végzett vizsgálatainkban a NOMI során létrejövő akut hemodinamikai változásokat figyeltük meg. A tamponád követően a makrohemodinamikai paraméterek közül a csökkent MAP, valamint a szignifikánsan emelkedő HR volt a meghatározó. E változásokat kifejezett gyulladási folyamat kísérte, amely során vazóaktív és proinflammációs mediátorok szabadultak fel. A szisztémás keringéssel párhuzamosan a splanchnicus terület mikrokeringése is romlott, amelyet a szöveti MPO aktivitás növekedése kísért, jelezve ezzel a neutrofil leukocita-akkumulációt.

A tamponád megszüntetését követően a MAP csökkent, de a CO kompenzált volt és nem volt különbség a kontroll csoporthoz képest. Ez a megnövekedett HR-nak volt köszönhető, amely a szívizom fokozott terhelésére utal. Az AcPepA kezelést követően a MAP a kontroll értékek szintjére emelkedett a CO-hoz hasonlóan, azonban a HR emelkedése nem volt megfigyelhető. Utóbbi változás jelentősége igen fontos, ha figyelembe vesszük azt a tényt, hogy a szívizom keringése a diasztolés fázis alatt biztosított, a szisztolés alatt pedig

majdnem teljesen megáll. A HR növekedésével a szisztolés fázis hossza nem változik, viszont a diasztolés szakaszé rövidül. Az alacsonyabb HR mellett megtartott CO-nál jobb a szívizom oxigén ellátása. Feltételezhető, hogy ezeket a változásokat a csökkent ET felszabadulás eredményezte AcPepA kezelés után. Kimutatták, hogy nem szelektív ET receptor antagonisták fokozza a CO-t és csökkenti a perifériás ellenállást szívelégtelenségben szenvedő betegeknél (Lüscher és mtsai, 2000). Az AMS áramlás a tamponád alatt lecsökkent, jelezve ezzel az ellátási terület vérellátásának csökkenését, azonban a tamponádot követően a véráramlás visszatért a kontroll értékekre és nem volt szignifikáns különbség az álműtött csoporthoz képest. A kezelt csoportnál az AMS áramlás szignifikánsan emelkedett a tamponádot követően, majd fokozatosan visszaállt a kontroll értékekre a kísérlet végéig. Ez a korai áramlásemelkedés feltehetően a vazokonstriktor ET-1 relatív hiányának is köszönhető (kimutatták, hogy az ET-A receptor gátlása képes javítani a zsigeri keringést hasonló körülmények közt (Wolfárd és mtsai 1999)).

A késői hemodinamikai változásokat patkányokon végzett kísérleteink során figyeltük meg, ezek hasonlóak voltak a szisztémás gyulladással járó válaszban leírt változásokhoz. A NOMI indukcióját követő napon, annak ellenére, hogy a MAP a normál tartományban volt, a HR és a CO szignifikánsan megemelkedett. Ez kompenzációs mechanizmus részeként értelmezhető, a szisztémás gyulladás kezdeti szakaszában az oxigén kereslet megemelkedik a fokozott anyagcsere ráta következtében. A fokozott oxigén igény kielégítéséhez az oxigénszállítás is növekszik a CO emelkedésével, azonban a sejtek oxigenizációja nem javítható a megfelelően működő mikrokeringés nélkül. A rossz kapilláris perfúzió nem teszi lehetővé az oxigén felhasználást a látszólag emelkedett oxigénszállítás ellenére sem. Mindkét modell esetében a mikrokeringés jelentős károsodást szenvedett, melyet a bélnyálkahártya csökkent RBCV-e jelzett. Ez azt jelenti, hogy a normál, vagy emelkedett AMS áramlás ellenére kimutatható mikrocirkulációs károsodás volt jelen a bélfalban (Tao és mtsai, 1995). Az AcPepA-val kezelt csoportoknál a vékonybélben mért RBCV szignifikánsan nagyobb volt. A jobb mikrokeringési paramétereket azonban nem emelkedett CO és AMS áramlás mellett mértük, amely az oxigén felhasználás javulását jelezheti. A C5a gátló kezelés után mért alacsonyabb ET-1 értékek szintén hozzájárulhattak a mikrokeringés javulásához. A fokozott ET-1 felszabadulás fontos szerepet játszhat az intenzív gyulladással járó válaszreakció kialakulásában, a komplement rendszer aktiválódása mellett. Az ET-1 felszabadulás, a kifejezett vazokonstriktor hatás miatt hozzájárul a mikrokeringés zavarához, valamint befolyásolja a citokinek felszabadulását is. Az AcPepA-val kezelt csoportnál, a mikrokeringés javulása

valószínűleg több tényezőn alapul, amelyhez a csökkent ET-1 felszabadulás és leukocita aktiváció is hozzájárul.

Mind a sertésekben, a tamponádot követő korai szakaszban, mind a patkányok esetében - az inzultust követő napon - magasabb HMGB-1 szinteket mértünk, melyet az AcPepA kezelés szignifikánsan csökkentett. Ezek az eredmények korrelálnak egy endotoxin sokk modellben mért adatokkal, ahol az AcPepA kezelés hatását vizsgálták (Okada és mtsai, 2011). Ezeket az eredményeket magyarázhatja a C5L2 nagy affinitású C5a receptor működése. Korábban jelátvitelhez nem kapcsolt úgynevezett „scavenging” C5a receptornak gondolták, amelynek feladata a C5a megkötése. A közelmúltban megjelent kutatások eredményei bizonyították, hogy a C5L2-nek fontos szerepe van a gyulladásos folyamatok kialakulásában és a komplement C5a rajta keresztül közvetlenül képes szabályozni a HMGB-1 kibocsátást (Wang és mtsai, 1999). A HMGB-1 fontos proinflammációs citokin, „alarmin”, amely hatékonyan aktiválja a neutrofil granulocitákat és citokin termelésüket fokozza. A C5L2 receptor jelentőségét mutatja, hogy a C5L2 gén kiütése egereknél nagyobb túlélési arányt eredményezett coecum ligáció-punkcióval kiváltott szepszis modellben a vad típushoz képest (Rittirsch és mtsai, 2008).

A fentieket összefoglalva, eredményeink azt igazolják, hogy a komplement rendszer korai aktivációja, ezen belül is a C5a fontos szerepet játszik a NOMI alatt bekövetkező szisztémás hemodinamikai és mikrokeringési zavar kialakulásában. A NOMI kezelési lehetőségei limitáltak, korai diagnózis esetén az egyetlen hatékony lehetőség az AMS-ba juttatott vasodilatátor kezelés, de a beavatkozás eredményességét a technikai és személyi feltételek korlátozzák. A C5a gátló kezelés a gyulladásos folyamat mérséklése mellett hatékonyan befolyásolhatja a NOMI hemodinamikai következményeit is.

6. A TÉZIS FONTOSABB MEGÁLLAPÍTÁSAI

1. Törpesertéseken a kísérleti PT szisztémás gyulladással aktivációt és mikrokeringés károsodást okoz a szplachnikus területen, amely lehetőséget biztosít a NOMI patofiziológiájának vizsgálatára nagy állat modellben.
2. A komplement C5a faktor antagonistá AcPepA kezelés javítja a zsigeri mikrokeringést és csökkenti a PT akut gyulladással következményeit. A komplement aktiváció szerepet játszhat a NOMI következtében kialakuló rövidtávú mikrokeringési zavarban.
3. Az újonnan kialakított PAO rágcsáló modell alkalmas a NOMI hosszú távú, klinikailag releváns hemodinamikai és gyulladással szövődésének vizsgálatára.
4. A kísérletileg létrehozott NOMI következtében romlik a bél mikrokeringése, gyulladással aktiváció és ezáltal másodlagos nyálkahártya károsodás jön létre. A komplement C5a faktor antagonistá AcPepA kezelés javítja a mikrokeringést és csökkenti a NOMI gyulladással szövődésüket. Mindezek alapján megállapítható, hogy a komplement rendszer aktivációja központi szerepet játszik a NOMI szubakut, káros következményeiben is.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

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

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

Külön köszönettel tartozom Kaszaki József Tanár Úrnak, aki tudományos diákkörösként elindított a kutató pályán. Köszönöm a Sebészeti Műtéttani Intézet technikai személyzetének is a munkám során nyújtott segítségüket.

Szeretném kifejezni hálámat Németh Gábor Tanár Úrnak, a SZTE-ÁOK Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika vezetőjének, hogy támogatott és lehetőséget adott a tudományos munka végzésére klinikai munkám mellett.

Végül szeretném megköszönni a sok segítséget Dr. Surányi Andreának, klinikai tudományos munkáim témavezetőjének.

Jelen kutatási eredmények megjelenését az NKFI-116861 és az OTKA-K104656 számú projektek, valamint a GINOP-2.3.2-15-2016-00015 I-KOM TEAMING: "Az intercelluláris kommunikáció szerepe a határfelületek (bőr, béltraktus) gyulladósos és immunológiai betegségeiben" projekt támogatja.