

Mesenterialis hypoperfusio állatkísérletes modellezése és terápiás lehetőségei

Szerző: Szűcs Szilárd

Témavezetők:

Dr. Kaszaki József egyetemi docens,

Dr. Varga Gabriella egyetemi tanársegéd,

Dr. Mészáros András PhD hallgató

SZTE ÁOK

Sebészeti Műtéttani Intézet

2014

Tartalom

1. Rövidítések jegyzéke	3
2. Bevezetés	4
3. A kutatás háttere – Irodalmi áttekintés	6
3.1 Non-occlusiv mesenterialis ischaemia	6
3.1.1 Történeti előzmények	6
3.1.2 Klinikuma	6
3.1.3 Diagnosztikája	7
3.1.4 Terápiája	8
3.2 Gyulladásos folyamatok	9
3.2.1 Az ischaemia – reperfüziós (IR) károsodás	9
3.3 Gyulladásos mediátorok	10
3.3.1 Nitrogén-monoxid (NO)	10
3.3.2 Hisztamin	10
3.3.3 High mobility group box protein-1 (HMGB-1)	10
3.3.4 Tumor necrosis faktor- α (TNF- α)	11
3.4 A mikrokeringés és vasoactiv mediátorai	11
3.4.1 Vasoconstrictorok	12
3.4.2 Vasodilatátorok	12
3.5 A komplement rendszer	12
3.5.1 A C5a központi szerepe	13
3.5.2 A C5a gátlása, AcPepA	14
4. Célkitűzés	15
5. Módszerek	16
5.1 Sebészi beavatkozás	16
5.2 Keringési paraméterek	17

5.2.1 Makrokeringés	17
5.2.2 Mikrokeringés	17
5.3 Biokémiai vizsgálatok.....	18
5.3.1 Endothelin-1 (ET-1) és HMGB-1	18
5.3.2 TNF- α	19
5.4 Kísérleti protokoll	19
5.5 Statisztikai analízis	21
6. Eredmények	22
7. Megbeszélés.....	31
8. Felhasznált Irodalom.....	36
9. Köszönetnyilvánítás.....	42

1. Rövidítések jegyzéke

AcPepA:	Acetil-peptid A
AHB:	Antisense homology box
AMS:	Arteria mesenterica superior
AMSF:	AMS flow (áramlás)
BP:	Blood pressure (vérnyomás)
C5aR:	C5a receptor
C5L2:	a C5a alternatív receptora
CO:	Cardiac output (perctérfogat)
ET-1:	Endothelin-1
ET-A és B:	Endothelin receptor A és B
HMGB-1:	High mobility group box-1 citokin
HR:	Heart rate (szívfrekvencia)
IR:	Ischaemia-reperfusio
MAP:	Mean arterial pressure (artériás középnyomás)
MVR:	Mesenterialis vascularis rezisztencia
NOMI:	Non-occlusiv mesenterialis ischaemia
OPS:	Ortogonális polarizációs spektrális képalkotás
PAO:	Partialis aorta occlusio
RBCV:	Red blood cell velocity (vörösvértest áramlási sebesség)
ROS:	Reaktív oxigén származékok
TNF-α:	Tumor necrosis faktor- α
TPR:	Teljes perifériás rezisztencia

2. Bevezetés

A non-occlusiv mesenterialis ischaemia (NOMI) egy igen komoly klinikai problémát jelentő állapot. Habár az akut mesenterialis ischaemiának csak körülbelül 20-30%-át teszi ki [Trompeter 2002] – így a ritkább kórképek közé tartozik –, viszont súlyosak a következményei és gyakori a fatális kimenetel. Bár megoldására számos állatkísérletes és klinikai próbálkozás is történt, ezek közül egy sem hozott valódi áttörést, ami rámutat a probléma bonyolult hátterére és nagy jelentőségére.

Az ischaemia a vérkeringés megszűnéséből adódó, a reperfúzió pedig az ischaemia után a keringés helyreállításából következő komplex biokémiai és patofiziológiai folyamatok összessége, melyek a károsodás helyén indulnak és hatással vannak a szervezet egészére. Mesenterialis hypoperfúzióról akkor beszélünk, ha az intestinalis keringés több mint 50%-kal csökken, mert ennél kisebb csökkenés esetén a kompenzációs mechanizmusok megakadályozzák a károsodást [Bulkley 1985].

A bélnyálkahártya alapvető feladata a felszívás mellett az is, hogy a potenciális kórokozók átjutásának gátat szabjon. Ha a bél vérellátása megszűnik, vagy jelentősen lecsökken, ez a barrier funkció már néhány percen belül károsodik és így baktériumok és mikrobiális termékek juthatnak a lumenből az érpályába [Haglund 1994]. Mire az ischaemia tüneteit a beteg észleli ez a folyamat már elindult és súlyos esetben kezelés nélkül 24 óra alatt gangrénás bélelhalást okozhat [Robbins 2009].

Azonban régóta ismert tény, hogy a keringés újbóli megindulása után is drámai szövetkárosodás következik be. Ilyenkor a fokozott és hirtelen leukocyta aktiváció, illetve citokin- és reaktív oxigén származék (ROS) felszabadulás nem csak magát a belet, hanem távoli szerveket is károsít, így ez az állapot gyakran társul acut respirations distress syndromával (ARDS) és többszervi elégtelenséggel (MODS).

A reperfúzió után a gyulladásos kaszkád része a komplement rendszer aktiválódása. Ennek egyik központi eleme a C5 fehérje, amelynek a hasításával keletkezik a terminális komplex (C5b-9) kialakulásához szükséges C5b fragmens (ami a sejtmaggal rendelkező sejtekben aktivációt, sejtmag nélküliekben lízist okoz), és a C5a peptid, más néven anafilatoxin. A C5a erős kemoattraktáns, a HMGB-1 (high mobility group box-1) szint emelésén keresztül hozzájárul a leukocyta aktivációhoz [Rittirsch 2008], serkenti a citokinek termelődését és felszabadulását, a hízósejt degranulációt és a

ROS termelődést [Lee 2008], így fontos szerepet tölt be mind a lokális mind a szisztémás gyulladásos folyamatokban. Így a C5a hatásának gátlásán keresztül jelentősen csökkenthetők a károsodások.

Erre a C5a hatásmechanizmusából következő elvi lehetőségek közül az első, a C5a receptorok gátlása. Ez a módszer nem váltotta be a hozzá fűzött reményeket. Másik módszer a C5a ellenes antitestek alkalmazása, amelyek hatásosnak bizonyultak, de hátrányuk a magas előállítási költség mellett a gyakrabban előforduló adverz immunreakció.

Új megközelítés a C5a közvetlen gátlása, amelyre Nagoyai Egyetemen kifejlesztettek egy peptidet, az Acetil-Peptid A-t (AcPepA). Az AcPepA egy, az N-terminális végén acetilált antisense komplementer peptid, amely az eddigiektől eltérő módon a C5a központi részéhez közvetlenül képes kapcsolódni, így inaktiválni azt. [Okada H. 2011].

Intézetünkben korábbi kísérletek kapcsán kidolgoztak egy nagyállat modellt, amelyben pericardiális tamponáddal hoztak létre szisztémás hypotensiót és mesenterialis ischaemiát. Ennek segítségével bebizonyították az AcPepA kezelés hatékonyságát rövid távon [Érces 2013]. A tamponád kivitelezése thoracotomiával történt, ami a rövid távú vizsgálat céljának megfelel, azonban a beavatkozás igen megterhelő, ezért hosszabb távú kísérletre nem alkalmas. A lehetséges kezelés 24 órán túli vizsgálatához ki kellett dolgoznunk egy új modellt, amely fókuszában a mesenterialis rendszer hypotensiója állt.

Jelen munkánk célja az volt, hogy létrehozzuk a non-occlusiv mesenterialis ischaemia reprodukálható és standardizálható kisállat modelljét, és ennek segítségével hosszú távon megvizsgáljuk az AcPepA kezelés makro- és mikroheminamikai hatását és releváns gyulladásos paraméterek változását.

Eredményeink igazolták, hogy az egyszeri AcPepA kezelés még hosszú távon is kedvezően befolyásolja a mesenterialis ischaemia általános és lokális káros következményeit.

3. A kutatás háttere – Irodalmi áttekintés

3.1 Non-occlusiv mesenterialis ischaemia

Az akut mesenterialis ischaemia kialakulására két mód van. Occlusiv (elzáródásos) formája többek között az arteria mesenterica superior thrombosisa, vagy embolisatioja révén jöhet létre. Ismert elzáródás nélkül fellépő, ún. non-occlusiv formája is, mely low-flow állapotokban: például nagy érsebészeti beavatkozások (aorta cross-clamping), szervátültetések, súlyos szisztémás hypotensióval járó állapotok (pl.: pericardialis tamponad) szövődménye lehet.

3.1.1 Történeti előzmények

Az 1930-40-es években már említést tettek olyan ritka esetekről, amikor nem tényleges elzáródás kapcsán jött létre mesenterialis infarctus képe. Ezt követően igazolták, hogy a korábban elzáródásosnak tartott esetek jó része nem embolia vagy thrombosis következménye volt. A NOMI-t először Ende említette 1958-ban, súlyos szívelégtelenséggel kapcsolatos állapotokban [Ende 1958], később leírták shockos epizód után, szívritmus zavarban [Corday 1962], digitalis toxicitásban [Gazes 1961], aorta insufficienciában, melyek közös jellemzője az alacsony perctérfogat és a splanchnikus erek vasoconstrictiója. Az 1960-as években halálos betegség volt, melynek okai a diagnosztikus nehézségek, a szöveti károsodás progressziója a kiváltó faktorok megszüntetése után és a nem megoldott terápia (műtét) voltak [Boley 1997]. Ezek részben a mai napig meglévő problémák, és bár a túlélés az elmúlt évtizedek során jelentősen javult, a mortalitása még mindig igen magas.

3.1.2 Klinikuma

Acosta és munkatársai 2006-ban a Malmöi Egyetemen végeztek a mesenterialis ischaemiára vonatkozó átfogó vizsgálatot, melyben az 1970 és 1982 között Malmöben elhunyt betegek adatait dolgozták fel. A betegség operációval vagy boncolással igazolt incidenciája évente 12,9/100.000 beteg volt. Ezeknek az eseteknek 15,4%-a volt NOMI [Acosta 2006]. Megjegyzendő, hogy napjainkra ez az arány 20-30%-ra emelkedett [Liu 1999].

Kialakulásának oka máig nem teljesen tisztázott, de rizikófaktorai közé tartozik:

- az előrehaladott atherosclerosis és rizikótényezői,
- az alacsony perctérfogattal járó állapotok (pl.: akut myocardialis infarctus, congestiv szívelégtelenség, arrythmiák),
- a végstádiumú vesebetegség, és az ezzel járó haemodialysis,
- és a mesenterialis keringést csökkentő gyógyszerek túladagolása.

Ezek mellett szerepet játszik:

- a shock,
- sepsis,
- dehydratio,
- nagy szív-, ér-, és hasi sebészeti beavatkozások (pl.: cardiopulmonalis bypass) [Ori 2005].

Kiemelendő, hogy a NOMI kialakulásának kockázata veseelégtelenség fennállása esetén az átlag populációhoz képest 2-10-szeresére nő [Zeier 1993], melynek két fő oka van. Az első a kalcium-foszfor anyagcsere felborulásából adódó fokozott arteriola kalcifikáció. A második ok e betegek terápiájának következménye: NOMI általában hemodialízishez (ritkábban peritoneális dialízishez) szokott társulni, a dializátummal távozó túl sok folyadék elvesztése következtében létrejövő hypotenzív epizód miatt. Emellett a terápia részeként alkalmazott humán rekombináns eritropoetin nem kontrollált adása a hematokrit emelkedéséhez, hiperviszkozitáshoz, és így az áramlás csökkenéséhez vezethet [Zeier 1995].

A NOMI tünetei általában igen változatosak és nem specifikusak: az enyhe, diffúz hasi érzékenységtől és hasi disztenziótól a kifejezett fájdalomig terjedhetnek, melyet típusos esetben a jobb oldali hypogastriumban jelez a beteg, ugyanis itt található az ileocecalis junctio, mely a steal jelenség miatt különösen érzékeny a hypoperfúzióra. Fájdalom hiányában még a láz, az ileus, vagy a hasmenés hívhatja fel a figyelmünket a betegsége, főleg ha e jelek leukocytosissal társulnak [Bassilios 2003].

3.1.3 Diagnosztikája

Komoly odafigyelést és nagy tapasztalatot igényel, hogy a rizikófaktorok és a tünetek alapján megtegyük a szükséges lépéseket, melyek segítségével felállítható a helyes diagnózis.

Gyakoriak a laboreltérések, de a tünetekhez hasonlóan ezek sem specifikusak. NOMI-ra utalhat az ismeretlen eredetű leukocytosis és laktát acidosis [Ori 2005], a serum foszfát szint emelkedése és a peritonealis folyadék magas amiláz szintje [Jamieson 1975]. A serum laktát-dehidrogenáz és kreatin-foszfokináz értékek csak később emelkednek és rossz prognózisra, visszafordíthatatlan károsodásra utalnak.

A nativ hasi röntgenfelvétel nem része a diagnózisnak, de egyéb ok miatt kérve mellékletként elzáródásra, vagy perforációra utaló jelek feltűnhetnek a betegség késői fázisában. NOMI-ban gyakran található gáz a portalis vénás rendszerben, illetve a bélfalban, ami ultrahangon apró echogén pontozottságot eredményez, CT felvételen hipodenzitás formájában jelentkezik [Howard 1996].

A betegség klasszikus radiológiai jeleit Siegelman írta le, angiográfiás felvételeken [Siegelman 1974]:

- szűkület a mesenterialis erek eredésénél,
- felváltott tágulatok-szűkületek az ereken „kolbász füzér jel”,
- a mesenterialis árkádok spasmusa,
- és az intramuralis erek telődési hiánya.

A modern képalkotásban a digitális szubsztrakciós angiográfiás felvételeken és nagy térbeli felbontású CT képek háromdimenziós rekonstrukcióján is ugyanezen elváltozások lehetnek kórjelzőek [Woodhams 2010].

A diagnózist alátámaszthatja a peritonealis folyadék bakteriológiai tenyésztése, melyben elsősorban Gram-negatív pálcák mutathatóak ki.

3.1.4 Terápiája

A kezelés már az angiográfia során megkezdődhet az intraarteriális katéteren keresztül, vagy CT során intravénásan, a kontrasztanyaggal együtt adott vasodilatátor (papaverin, glucagon) formájában. Emellett a bél nyálkahártya barrier funkciójának sérülése miatt szisztémás antibiotikum adása javasolt [Björck 2010].

Amennyiben a hasi panaszok nem szűnnek papaverin adása után sem, a hasat azonnal fel kell tární és az irreverzibilisen károsodott bélszakaszt el kell távolítani. Az érintett bélszakasz életképességének megítélése történhet szem ellenőrzése mellett, amelynek része a szín, a pulzáció és a perisztaltika vizsgálata, azonban a módszer pontossága kevesebb mint 60% [Sheridan 1991]. Ugyanerre a célra a Doppler ultrahang nem bizonyult megfelelőnek, ezzel szemben a fluoreszcens eljárások ígéretesek [Mann

1982]. Ilyen például a HyperEye Medical System, melynek előnye, hogy műtét közben felállítható a diagnózis és megítélhető a bél épsége makroszkópos elváltozás hiányában is, valamint nincs szükség hozzá intervenciós radiológusra és nem terheli a vesét a kontrasztanyag [Nitori 2013].

Tehát a NOMI túlélésének sarokpontja a korai diagnózis és az azonnal megkezdett terápia. Habár a műtéti technikák is fejlődnek, kiterjedt károsodás esetén még mindig nehéz elkerülni a fatális kimenetelt [Archodovassilis 2007].

3.2 Gyulladásos folyamatok

3.2.1 Az ischaemia – reperfúziós (IR) károsodás

Ischaemia, vagyis a vérkeringés megszűnésekor az oxigén ellátásának zavara miatt csökken a mitokondriumokban az oxidatív foszforiláció, ennek következtében az ATP szint. Az ATP szükséges a sejt homeosztázisának fenntartásához, többek között a sejtmembránban található ionpumpák működéséhez. ATP hiányában elektrolitok (Na^+ , Ca^{2+} ionok és víz) áramlanak a sejtbe, így az megduzzad [Kolkman 2003]. A Ca^{2+} beáramlása továbbá azt eredményezi, hogy a xantin-dehidrogenáz (XDH) enzim xantin oxidázzá (XO) hidrolizál [Banda 1996], melynek szubsztrátja az ATP lebomlásából származó, és oxigén hiányában felhalmozódó hipoxantin. Reperfúzió során, oxigén jelenlétében a hipoxantin mennyiség jelentős része xantinná alakul, amelynek melléktermékeként rengeteg ROS szabadul fel [Abela 2003], ami fehérje, lipid és DNS károsító hatással rendelkezik. Ennek hatására aktiválódnak a DNS-t javító enzimek, melyek nagy energiaigényük miatt tovább csökkentik a sejt készleteit, végül necroticus sejthalálhoz vezetnek. A helyzetet tovább súlyosbítja a szabadgyököket megkötni, inaktiválni képes rendszerek limitált kapacitása is [Szabo 1998].

Hypoxia hatására az endotheliumban proinflammatorikus jelutak aktiválódnak és így adhéziós molekulák, citokinek, endothelin és lipid mediátorok szabadulnak fel, amit a meginduló keringés eljuttat a környező szövetekhez [Syk 1998] és távoli szervekhez [Simpson 1993], ahol hasonló károsodások jönnek létre, mint a kiindulási helyen.

3.3 Gyulladásos mediátorok

3.3.1 Nitrogén-monoxid (NO)

A NO egy rövid féléletidejű, szabad gyöknek tekinthető molekula, mely a szervezetben fiziológias körülmények között is termelődik kis mennyiségben az állandóan aktív nitrogénmonoxid-szintáz (NOS) enzim endotheliális- (eNOS), és neuronális (nNOS) izoenzimeit által. Számos funkciója van: többek között vasodilatator hatása révén modulálja a mikrokeringést, gátolja a thrombocyták aktivációját és a leukocyták adhézióját [Katsube 2007], illetve stabilizálja a hízósejtek membránját, így a permeabilitást szabályozza [Kanwar 1994].

Az enzim harmadik típusa gyulladásos folyamatokban indukálódik (inducible, iNOS) és egy nagyságrenddel nagyobb NO koncentrációt hoz létre. A NO és a szuperoxid gyökök ($O_2^{\bullet-}$) reakciójának eredményeként önmagában nem szabadgyök tulajdonsággal rendelkező, ám sokkal reakcióképesebb peroxinitrit ($ONOO^-$) képződik. Ez a termék nagy részben felelős a DNS- és a sejtfehérjék károsodásáért, a lipidperoxidációért és a mitokondriális funkciók gátlásáért. Hatásai révén jelentősen hozzájárul az enterocyták pusztulásához, így a mucosa permeabilitás növekedéséhez [Potoka 2002].

3.3.2 Hisztamin

A bélnyálkahártya postcapillaris venulái körül található hízósejtek preformált granulumaiból IR hatására felszabaduló, illetve *de novo* szintetizálódó hisztamin több mediátorral együtt képes lokális szöveti reakciót létrehozni [Boros 1995]. A folyamat során a kis erek permeabilitása megnő, szöveti oedemát okoz, ezzel részt vesz a barrier funkció károsításában. Felszabadulásában jelentős szerepet játszanak a gyulladásos sejtek termékei, közülük is kiemelendő az endothelin-1 (ET-1) [Szalay 2000] és a C5a [Kimura 1998].

3.3.3 High mobility group box protein-1 (HMGB-1)

A C5a-like receptor 2 (C5L2) egy nagy affinitású C5a receptor, melyről korábban azt gondolták, hogy scavenger funkciót tölt be. Kiderült azonban, hogy ezen receptoron keresztül hatva a C5a serkenti a HMGB-1 felszabadulását [Rittirsch 2008]. Ez a mediátor fontos szerepet tölt be a természetes immunitás szabályozásában (leukocyták toborzás, citokin felszabadulás), és a sepsis egyik markere [Ulloa 2006].

3.3.4 Tumor necrosis faktor- α (TNF- α)

Az akut gyulladásos reakció egyik legtöbbet kutatott és legjobban ismert molekulája a TNF- α . Elsősorban az aktivált macrophagok termelik számos stimulusra, például IR károsodásra, bakteriális termékek és egyéb citokinek hatására. Szerteágazó hatásai az interleukin-1-hez (IL-1) igen hasonlóak (ezért gyakran együtt emlegetik őket), amelyek közül szempontunkból azok a leglényegesebbek, amelyeket az endothelre és a leukocytákra fejtenek ki [Robbins 2009].

Az endothelen fokozza a leukocyta adhézións molekulák termelését, további cytokinek és az arachidonsav származékok szintézisét és felszabadulását a nuclearis faktor- κ B (NF- κ B) jelátviteli úton keresztül. A folyamat a postcapillaris venulákban a neutrophil granulocyták marginálódását, gördülését, majd adhézióját eredményezi. Ez részben hozzájárul az érfal permeabilitásának növekedéséhez [Lush 2000].

3.4 A mikrokeringés és vasoactiv mediátorai

Számos szervünk mikrokeringése fiziológias körülmények között is mutat heterogenitást. Ez a jelenség a vékonybélben három jellemzővel írható le. Az első az anatómiai rétegek közötti (keresztmetszeti) különbség. Emésztési fázisban a mucosa véráramlása a muscularis rétegének a többszöröse, de mikor nem zajlik felszívás ez az arány nem mutat ilyen kifejezett eltérést.

A második aspektus az anatómiai rétegen belüli (horizontális) heterogenitás, amit a funkcionális capillaris denzitással (FCD), illetve a vörösvértest áramlási sebességgel (RBCV) jellemezhetünk, és következtethetünk belőlük a szöveti perfúzióra. Végül van egy időbeli változás, amely egy „on-off” szerű áramlásként figyelhető meg a villusok ereiben.

Azonban hypoperfusio kapcsán (pl.: IR károsodás, haemorrhagiás shock) a heterogenitás mértéke megnő, amely a mucosa és a tunica muscularis közötti áramlás redistribúciójához vezet, így csökkenni fog a mucosa véráramlása és oxigenizációja [Vajda 2004]. Ez a lecsökkent véráramlás a rétegen belüli keringés elégtelenségét, így szövetkárosodást okoz.

3.4.1 Vasoconstrictorok

Az ET-1 a legpotensebb vasoconstrictor, így nagymértékben képes a vascularis rezisztenciát befolyásolására. Az endothel sejtekből szabadul fel és miután egy konvertáz enzim aktiválja, az érfal simaizomsejtjein hat [Webb 1997]. Két receptora van: az ET-B-n hatva enyhe vasodilatációt okoz, de sokkal jelentősebb az ET-A szerepe, melynek aktiválása a mucosa, submucosa, és muscularis rétegben erős vasoconstrictioval jár [Burgener 2001].

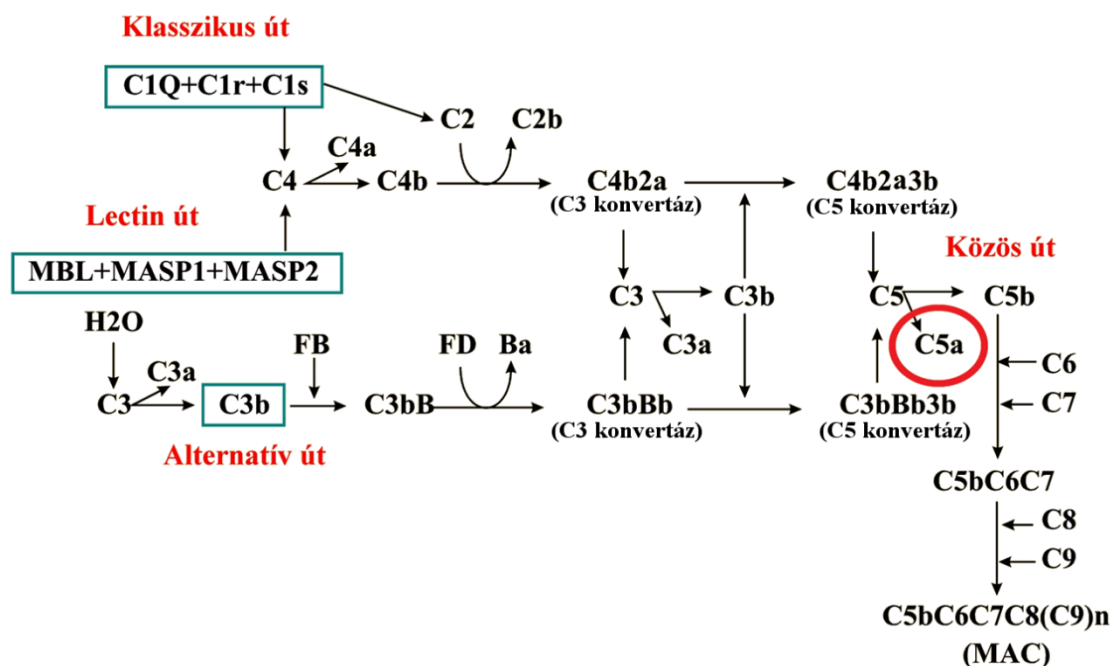
A mesenterialis keringés károsító hatásokra különösen érzékennyé válik a renin-angiotenzin rendszer termékére az angiotenzin (AT)-II-re [Ceppa 2003]. Ez az erős vasoconstrictor a tüdőben található angiotenzin konvertáló enzim (ACE) által az AT-I-ből hasítódik [Robbins 2009]. Leírták, hogy coronaria bypass műtét után (ami az intestinum hypoperfúziójával jár) megemelkedő AT-II szint képes akár mesenterialis ischaemiát is kiváltani [Reilly 1993].

3.4.2 Vasodilatátorok

A már említett NO mellett, csökkent véráramlással járó állapotokban jelentős szerepet játszanak a mucosa keringésének fenntartásában a cyclooxygenáz enzim lipid termékei, a prosztaglandinok, főleg a prosztaglandin E₂ (PGE₂) és a prosztaciklin (PGI₂) [Kolkman 2003].

3.5 A komplement rendszer

A komplement rendszer három úton aktiválódhat. Az első, klasszikus útban a C1q faktor IgG és IgM immunglobulin családból keletkezett immunkomplexek Fc régiójához kapcsolódik és köti a C1r faktort, ami aktiválja C1s-t. A lektin úthoz mannóz kötő lektin (MBL) kell, mely MBL asszociált serin proteázokat (MASP) aktivál. A két folyamat egy közös pontban találkozik, a C4-es faktor hasadását eredményezve, amit a C2-es követ, így létrejön a C3 konvertáz (C4b2a). Az alternatív útvonal itt a C3-as hasadásánál kapcsolódik be a kaszkádba, a faktor B és D segítségével. A C3 konvertázhoz C3b fragmensek kapcsolódnak és C5 konvertázzá alakul (1. ábra) [Gorsuch 2012].



1. ábra: A komplement rendszer

A C5 faktorból két termék keletkezik. A C5b lokálisan a membránhoz kötött hatásokért felel és további faktorokkal együtt (C5b-9) a sejtmaggal rendelkező sejteken aktivációt, sejtmag nélküli sejteken (baktériumok) lízist okoz [Walport 2001 a, b]. A C5a egy szolubilis glikopeptid, mely a keringéssel távoli szervekhez is el tud jutni és ott is károsodást tud okozni. Ezek közül a mesenterialis ischaemiára legjellemzőbb az ARDS [Wada 2001], mely csökkenti az egész szervezet oxigénellátását és végül MODS-hoz vezet [Harward 1993]. Ezért fontos a C5a által aktivált kóros folyamatok gátlása.

3.5.1 A C5a központi szerepe

A C5a két receptoron keresztül hozza létre hatásait, azonban ezek legnagyobb részt a C5a receptorhoz (C5aR) kapcsolhatóak. Ez a receptor számos immun és nem-immun sejten is megtalálható [Lee 2008]. Vascularis hatásaiért a hízósejtekből felszabaduló hisztamin és szerotonin felelős, a neutofil granulocytákban pedig aktiválja a lipoxigenáz útvonalat és az így szabaddá váló leukotriének erős kemoattraktánsként is hatnak (bár a C5a önmaga is rendelkezik ilyen tulajdonsággal). Az endothel sejteken és a leukocytákon fokozza az adhézións molekulák kifejeződését és további gyulladásos

mediátorok felszabadulását [Robbins 2009]. Ezen kívül fokozza a granulocyták ROS termelődését és az oxidatív robbanást [Lee 2008].

Másik receptora, a C5L2, a korábban említett módon HMGB-1 termelésén keresztül leukocytá aktivációt hoz létre.

3.5.2 A C5a gátlása, AcPepA

A C5a hatásának gátlása több módon is lehetséges. Egyik típusa a C5a-ellenes antitestek és szolubilis receptorok alkalmazása, viszont ezek nagyobb molekulák, így instabilabbak, előállításuk drágább, több a mellékhatásuk és rosszabb a biológiai hozzáférhetőségük [Haynes 2000]. További lehetőséget jelentenek a C5aR antagonisták, amelyek kisebb méretűek. Gátlásuk azonban a receptor polimorfizmus miatt nem csak a kívánt hatást éri el, hanem számos negatív következménnyel jár. Adagolásuk sem egyszerű, mert a gyulladásos válaszban a C5aR-ok immunreaktivitása megemelkedik [Lee 2008], így a megfelelő dózis meghatározása nehézséget jelent.

A megoldást egy újszerű, innovatív elgondolás adta, mely a molekuláris felismerési teórián alapul, miszerint az adott olvasási kereten belül, a DNS szemben lévő szálai alapján szintetizálódó peptidek képesek egymáshoz kötődni. Ezeket a helyeket antisense homology boxoknak (AHB) nevezik [Baranyi 1995]. A 74 aminosavból álló C5a peptiden az ANTIS nevű program segítségével találták meg a PL37-nek nevezett AHB-t (37. – 53. aminosav), ami a C5a receptor aktivációért felelős helyen van [Baranyi 1996]. Ezután a MIMETIC nevű program 19 komplementer peptidet generált erre a régióra, amiből 7 rendelkezett gátló hatással. Ezek közül egyről (peptid A) igazolódott, hogy ténylegesen képes kötődni és gátolni C5a hatását [Fujita 2004]. A stabilitás érdekében az N' terminális alanin aminosavat acetilálták (AcPepA).

A létrehozott AcPepA peptid tehát a C5a fehérje közvetlen gátlószere és a célmolekulához történő kötődése nem antigén-antitest kölcsönhatáson alapszik.

4. Célkitűzés

Munkánk során két alapvető célt tűztünk ki. Első lépésként kidolgoztunk egy olyan kisállat modellt, amelyen reprodukálhatóan és standardizálhatóan vizsgálhatók a mesenterialis hypoperfúzió hosszú távú hatásai és kezelésének lehetőségei.

A továbbiakban a létrejövő károsodások kialakulásában egy központi szerepet játszó elem, a C5a anaphilatoxin direkt gátlásának hatását vizsgáltuk. Ezért az így létrehozott modellen makrokeringési és mikrokeringési paramétereket mértünk, hogy mind a szisztémás, mind a lokális vérellátás állapotáról képet kapjunk. Ezen túlmenően az IR károsodás következtében zajló gyulladásos folyamat vizsgálatára biokémiai próbákat végeztünk.

5. Módszerek

Kísérleteinket 300-320 grammos hím Sprague-Dawley patkányokon végeztük. Vizsgálatainkat a NIH irányelvei alapján (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) végeztük a Szegedi Tudományegyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága jóváhagyásával.

5.1 Sebészi beavatkozás

Az első napon állatainkat 16 óra éheztetés után Na-pentobarbitál (50 mg/ttkg, i.p) altatás mellett hanyatt fekvő helyzetben fűthető műtőasztalra helyeztük. A beavatkozásokat steril körülmények között végeztük. Kipreparáltuk a bal oldali arteria femoralist, és az artériás vérnyomás- és pulzusszám mérés céljából kanuláltuk (PE40-es kanül). A hemodinamikai adatok folyamatos monitorozása SPEL Advanced HAEMOSYS 1.17 adatgyűjtő szoftver (Experimetria Ltd., Budapest) alkalmazásával történt.

Medián laparotomiát követően orthogonális polarizációs spektrális képalkotás (OPS Cytoscan A/R Intravitalis Videómikroszkópia) módszerével az ileocecalis junctiotól proximálisan 5 cm-re az ileum serosájának mikrokeringéséről kontroll felvételeket készítettünk. Felkerestük és proximálisan, a rekeszizom és az arteria mesenterica superior (AMS) eredése között kipreparáltuk az aorta abdominalist, majd szilikon szalagot vezettünk az aorta köré. Parciális aorta occlusiot (PAO) hoztunk létre a szalag mérsékelt megszorításával, amelynek során az alsó testfél artériás középnyomását 60 percen keresztül 40-50 Hgmm között tartottuk. Ezt az arteria femoralisban mérhető középnyomás monitorozásával ellenőriztük. A beavatkozást követően a hasfalat 6/0-ás, atraumatikus, monofil fonállal egyesítettük két rétegben: az izmokat tova futó, a bőrt pedig egyszerű megszakított öltésekkel zártuk. Az arteria femoralist lekötöttük, a sebet elláttuk. Ébredés után táplálékot és folyadékot *ad libitum* kaptak.

A második napon az állatokat újra altattuk. Az átjárható légút biztosítása érdekében tracheostomiát követően tracheakanül került behelyezésre, a jobb oldali vena jugularisba PE50-es kanült vezettünk, melyen keresztül a kísérlet végéig fenntartó infúziót kaptak (10 ml/kg/h), illetve szükség szerint további adag altatót a narkózis

fenntartásának érdekében. Az állatok vérnyomásának és pulzusszámának mérése céljából kanuláltuk a jobb arteria carotis communist, a bal oldali carotis communison keresztül termisztor katétert (PTH-01; Experimetria Ltd., Budapest, Hungary) vezetünk az aorta ascendensbe a perctérfogat (cardiac output, CO) meghatározására.

A hasfalat ismételten megnyitottuk, felkerestük az AMS-t, amelyre ultrahangos áramlásmérő fejet helyeztünk a véráramlás mérése céljából (T206 Animal Research Flowmeter; Transonic Systems Inc.), illetve újabb OPS vizsgálatokat végeztünk a serosán és az ileum lumenének megnyitása után a mucosán. A makro- és mikrokeringési paramétereket 2 órán keresztül 30 percenként mértük. A kísérlet végén vér és vékonybél mintákat vettünk a biokémiai paraméterek meghatározására.

5.2 Keringési paraméterek

5.2.1 Makrokeringés

Az artériás nyomás és pulzusszám mérése BPR-02 transducer (Experimetria Kft. Budapest) segítségével történt és az értékek HAEMOSYS 1.17 (Experimetria Kft. Budapest) adatgyűjtő szoftver alkalmazásával kerültek rögzítésre a beavatkozás előtt, közben és után.

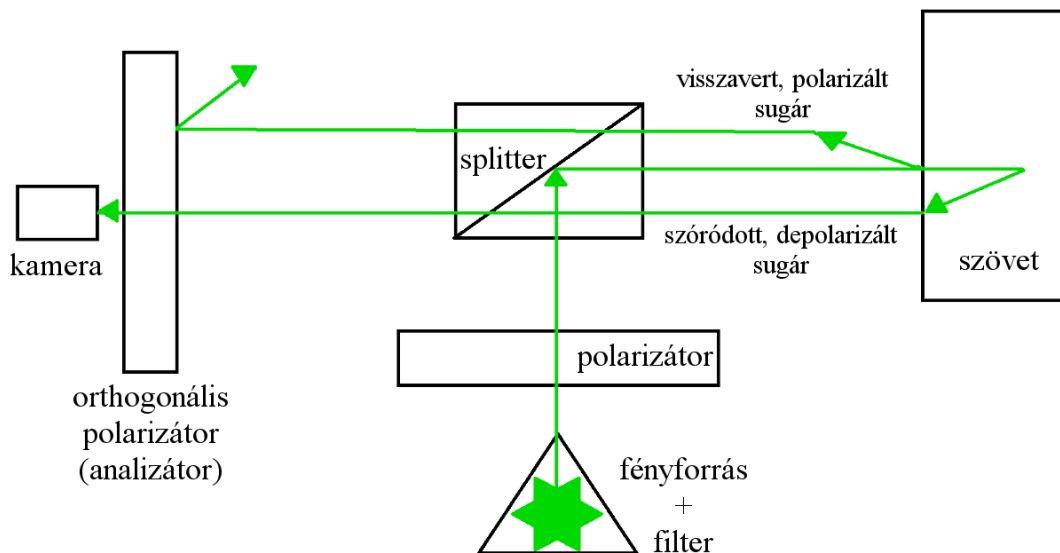
A CO termodilúciós módszerrel történő méréséhez PTH-01 termisztor katétert (Experimetria Kft. Budapest) használtunk, melyet SPEL Advanced Cardiosys 1.4 (Experimetria Kft. Budapest) számítógépes program segítségével rögzítettük. Az így mért adatokat két további számított paraméterhez használtuk: az adatokból a teljes perifériás ellenállást (TPR), az artériás középnyomás (mean arterial pressure, MAP) és a CO hányadosaként, a mesenterialis vascularis rezisztenciát (MVR) pedig az AMS véráramlás és a MAP hányadosából számítottuk.

Az arteria mesenterica superior áramlását ultrahangos áramlásmérő alkalmazásával (Transonic System Inc., Ithaca, New York, USA) vizsgáltuk.

5.2.2 Mikrokeringés

Az orthogonális polarizációs spektrális (OPS Cytoscan A/R Intravitalis Videómikroszkópia) technika alkalmazása során az objektív közvetlenül érintkezik a vizsgálandó szövetrel, amelyet a zöld fény spektrumába eső 548 nm hullámhosszú (az

oxigenizált és deoxigenizált hemoglobin izobesztikus pontja, azaz egyenlő mértékű abszorbanciát mutat), polarizált fénnel a serosa felszínéhez kevesebb, mint 200 μm -re levő kapillárisokban keringő vörösvértestek tehetők láthatóvá kontrasztanyag alkalmazása nélkül. A beeső polarizált fény útja kb. tízszer törik meg a szövetben, míg nem depolarizálódik. A depolarizált fény egy újabb polarizátoron, az analizátoron keresztül kerül egy képerősítőbe, majd a kamerába, azonban a visszaverődő polarizált fény kiszűrődik (2. ábra). Így a mikrokeringésről videofelvétel készíthető. Felvételeinket IVM Pictron szoftver segítségével off-line analizáltuk. Ezzel a technikával meghatároztuk a funkcionális kapilláris denzitást (FCD: az adott körülmények között átjárható kapillárisok hosszának aránya összeshez viszonyítva) és a vörösvértest áramlási sebességet (RBCV, mm/sec).



2. ábra: Az OPS működése

5.3 Biokémiai vizsgálatok

5.3.1 Endothelin-1 (ET-1) és HMGB-1

A vasoconstrictor hatású endothelin-1A és a HMGB-1 késői proinflammációs citokin, plazma koncentrációját nagy szenzitivitású és specificitású lépcsős szendvics ELISA módszerrel határoztuk meg (Biomedica Kft, Ausztria; Shino-Test Corporation, Kanagawa, Japán).

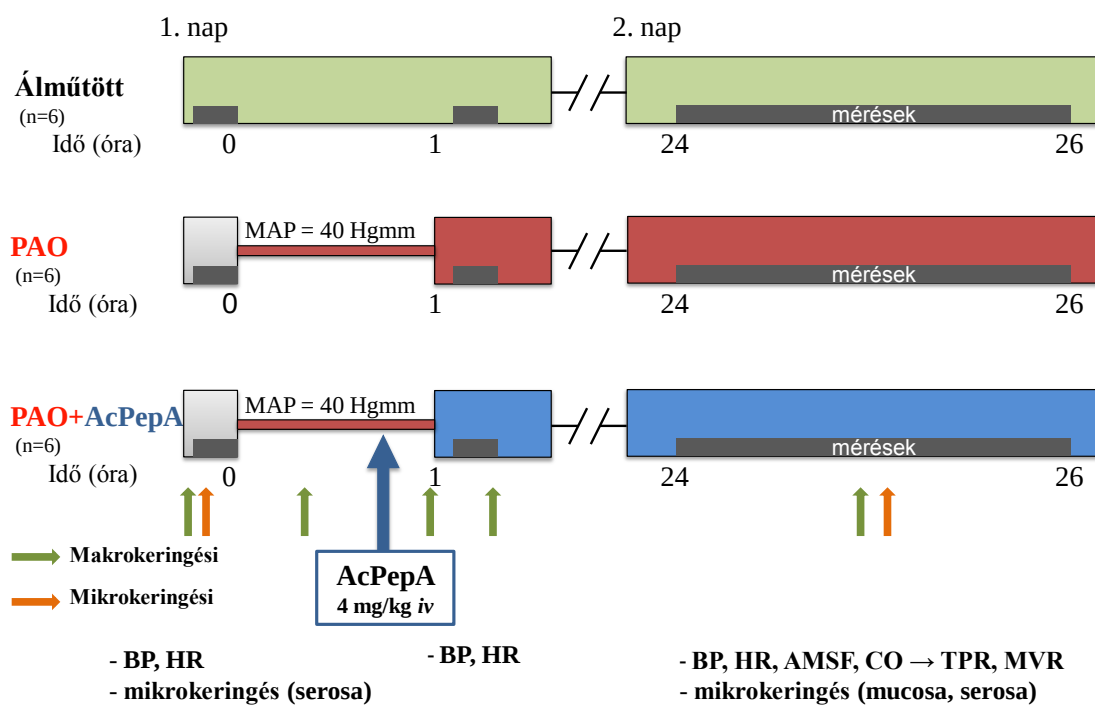
5.3.2 TNF- α

A vizsgálatok végén a vena cava inferiorból 0,5 ml-es vérmintákat vettünk EDTA-s polipropilén csövekbe, melyeket 20 percen keresztül 1000 G-vel centrifugáltuk (4°C). Ezt követően a mintát lefagyasztottuk és a mérések időpontjáig -70°C-on tároltuk. A plazma TNF- α koncentrációját kereskedelmi forgalomban kapható enzimkapcsolt immunosorbent-assay segítségével határoztuk meg (Quantikine ultrasensitive ELISA kit; Biomedica Hungaria Kft, Magyarország). A detektálható minimum TNF- α koncentráció 0,5 pg/ml, a módszer inter- és intra-assay koefficiens értéke 10%-nál alacsonyabb volt.

5.4 Kísérleti protokoll

Kísérletünk két napos protokoll alapján zajlott (3. ábra). Az állatokat random módon 3 csoportra osztottuk. Az álműtött csoport (n=6) kontrollként szolgált a vizsgált paraméterek változásának követésére. A hasfal megnyitása után a vékonybelet előemeltük, majd az aorta preparálását követően visszahelyeztük a hasüregbe és a sebet zártuk. A PAO csoport egyedeinél (n=6) az aorta abdominalis 60 perces részleges leszorításával az alsó testfél artériás középnyomását 40-50 Hgmm-en tartottuk. A harmadik csoport egyedei a PAO mellett AcPepA kezelést kaptak (PAO + AcPepA; n=6). Az aorta leszorítással az alsó testfélben létrehozott hypotensio 45. percében az állatok 4 mg/ttkg AcPepA-t kaptak 5ml-es infúzióban 5 perc alatt, a farokvénán keresztül. A másik két csoport tagjai az AcPepA oldószerét, fiziológiás sóoldatot kaptak.

Az előkészítést követő nyugalmi periódus után kezdtük meg a méréseket. Az első napon vizsgáltuk a vékonybél serosa mikrokeringését (red blood cell velocity, RBCV), és monitoroztuk a MAP-ot és a szívfrekvenciát (heart rate, HR). A második napon két órán keresztül 30 percenként a vékonybél serosa és a mucosa mikrocirkulációjáról készítettünk felvételeket és a makrohemodinamikai paraméterek közül a MAP és HR mellett a CO-t és az AMSF-t is monitoroztuk. A kísérlet végén vér és vékonybél mintákat vettünk a biokémiai paraméterek meghatározására (ET-1, HMGB-1, TNF- α).

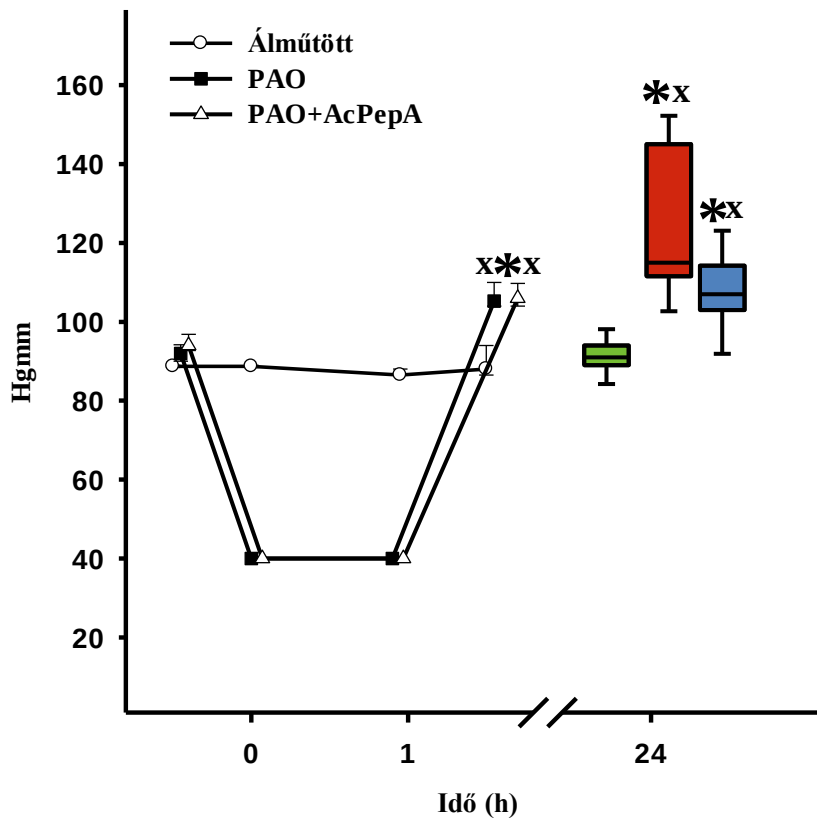


3. ábra: Kísérleti protokoll

5.5 Statisztikai analízis

Az adatok kiértékelését statisztikai szoftver csomag segítségével végeztük (SigmaStat for Windows, Jandel Scientific, Németország), nem paraméteres módszereket alkalmazva. A csoporton belüli eltéréseket Friedman-próbával vizsgáltuk, ezen belül a kontroll értéktől való eltérést Dunn-próbával teszteltük. Az ábrákon a csoporton belüli szignifikáns eltérést * jelöli. A csoportok közötti különbségek meghatározása Kruskal–Wallis és Dunn-próbával történt, melyek eredményét az ábrákon x-el (változás az álműtött csoporthoz képest) és #-el (változás a PAO csoporthoz képest) jelöltük. A grafikonokon feltüntettük a mért értékek mediánját, a szórást a 25 és 75 percentilis között és a szélső értékeket. A szignifikancia szintet $p < 0.05$ -nél határoztuk meg.

6. Eredmények



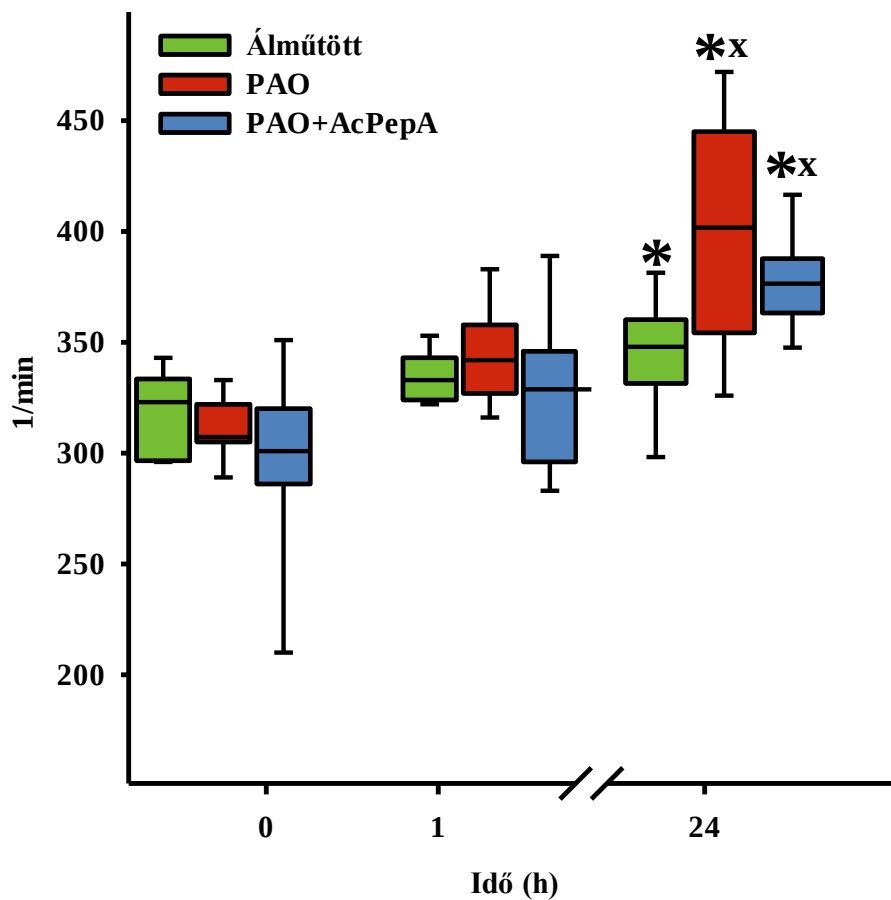
4. ábra: Az artériás középnyomás változása

Az artériás középnyomás a makrokeringést jellemző egyik legfontosabb paraméter. A 4. ábrán a fent említett három csoport vérnyomásértékei láthatóak. Az álmútótt állatok eredményeit zölddel, a PAO csoportét pirossal, és az AcPepA kezeltekét kékkel ábrázoltuk.

A 60 percen keresztül az alsó testfélben előidézett 40 Hgmm-es középnyomás megszüntetését követően a két hypotensiós csoport értékei mind az álmútóthoz, mind a kiindulási értékekhez képest szignifikánsan megemelkedtek.

A második napon az álmútótt csoport eredményei nem változtak, míg a két PAO-s csoport vérnyomás értékei szignifikánsan magasabbak maradtak.

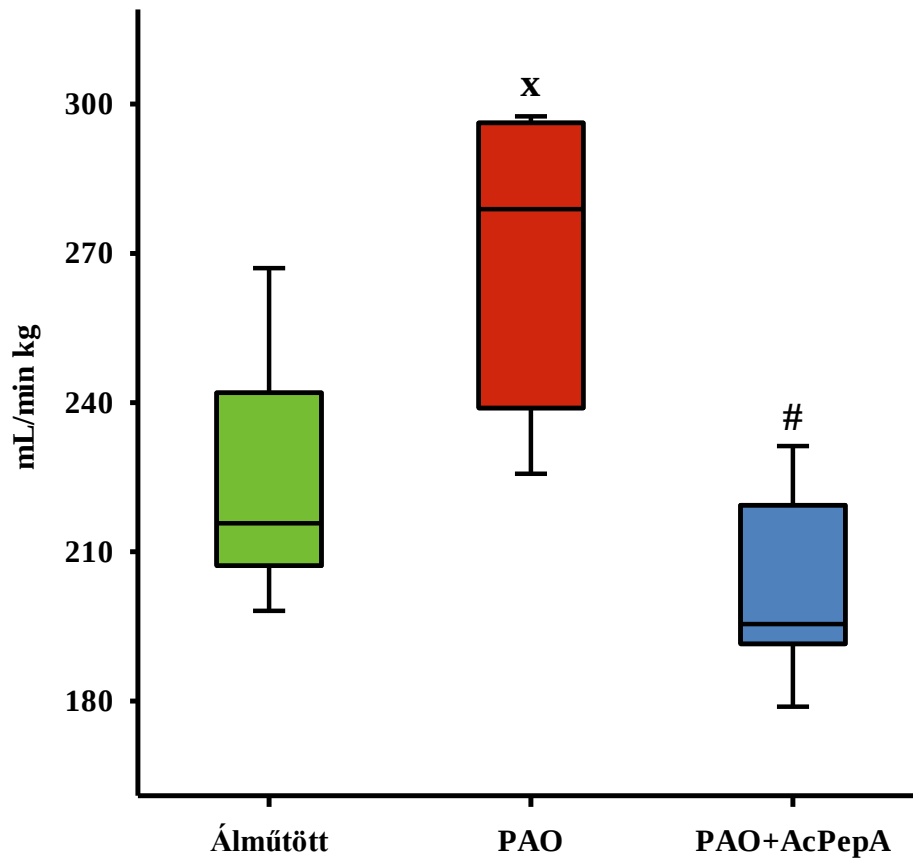
A vonal és az oszlop grafikonon a medián értéket és a szórás jellemzésére a 25 és 75 percentilis értékeket tüntettük fel. * $p < 0,05$ a csoporton belüli szignifikáns változást mutatja a kontroll értékhez képest; ^x $p < 0,05$ szignifikáns változás az álmútótt csoporthoz képest.



5. ábra: A szívfrekvencia változása

A szívfrekvencia értékeiben (5. ábra) az első napon nem mértünk szignifikáns változást, viszont a második napon mind a PAO, mind az AcPepA kezelt csoportban szignifikáns emelkedés figyelhető meg a kiindulási értékhez képest, amely a kezeletlen PAO csoportban sokkal kifejezettebb volt.

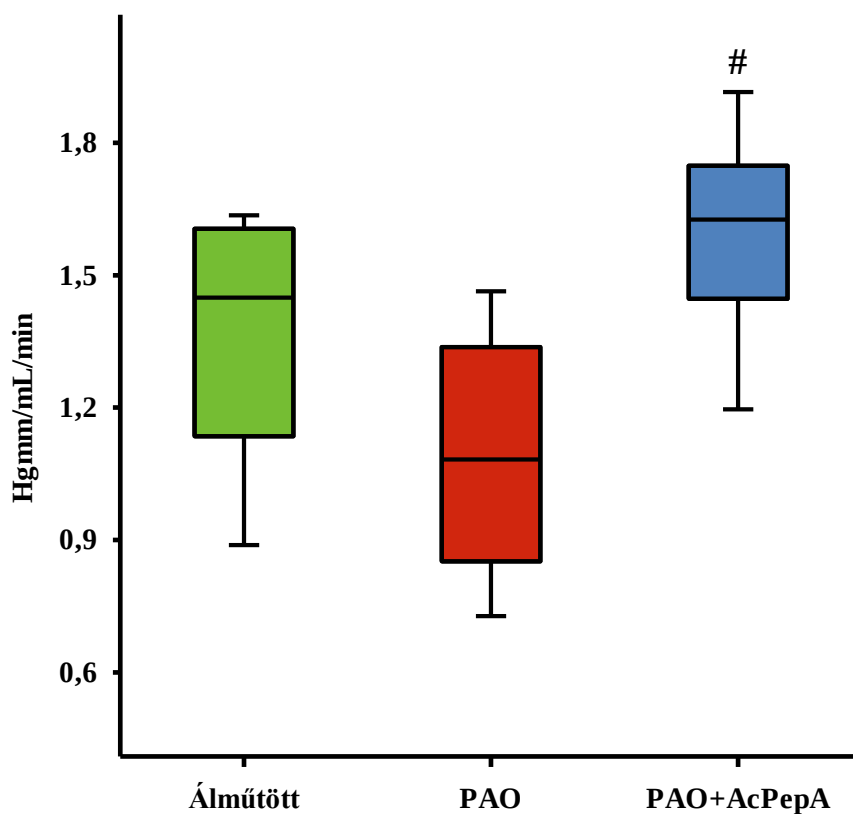
Az oszlop grafikonon a medián értéket és a szórás jellemzésére a 25 és 75 percentilis értékeket tüntettük fel. * $p < 0,05$ a csoporton belüli szignifikáns változás a kontroll értékhez képest; ^x $p < 0,05$ szignifikáns változás az álműtött csoporthoz képest.



6. ábra: Perctérfogat

A perctérfogat mérésére a második napon került sor, melyet testtömegre vonatkoztatva adtuk meg (6. ábra). A PAO csoport értékeiben szignifikáns emelkedés figyelhető meg, míg az AcPepA kezelés hatására a perctérfogat szignifikánsan alacsonyabb volt.

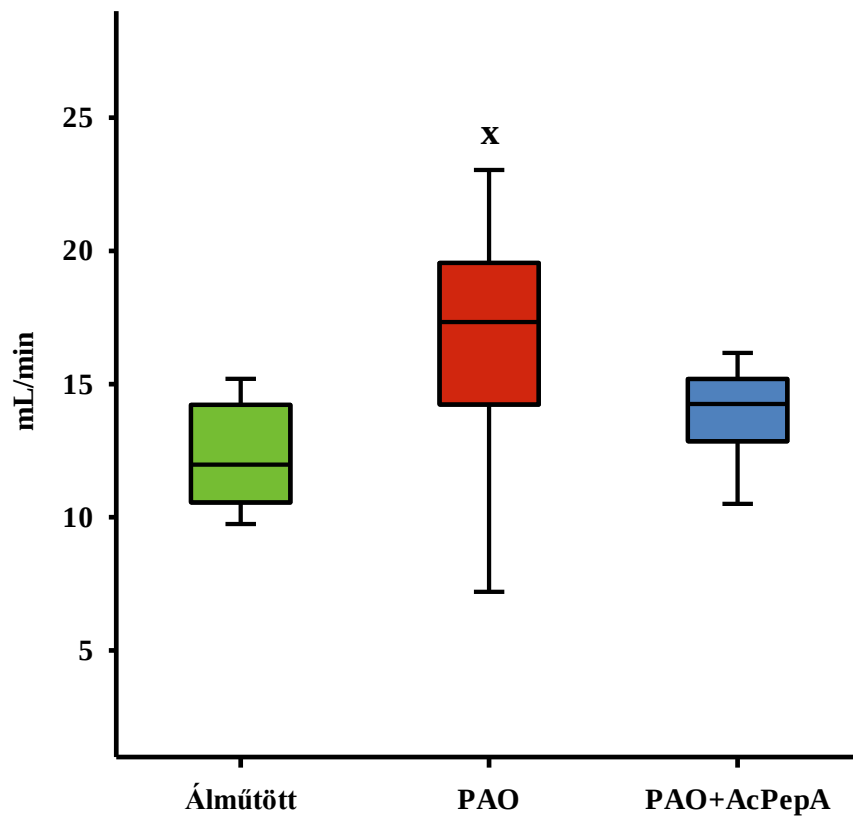
Az oszlop grafikonon a medián értéket és a szórás jellemzésére a 25 és 75 percentilis értékeket tüntettük fel. ^x $p < 0,05$ szignifikáns változás az álmútótt csoporthoz képest; [#] $p < 0,05$ szignifikáns változás a PAO csoporthoz képest.



7. ábra: Teljes perifériás ellenállás

A MAP és a CO hányadosaként meghatározott TPR értékeket a PAO nem befolyásolta, azonban az AcPepA kezelt csoport eredményei a kezeletlen PAO csoporthoz képest szignifikánsan magasabbak voltak (7. ábra).

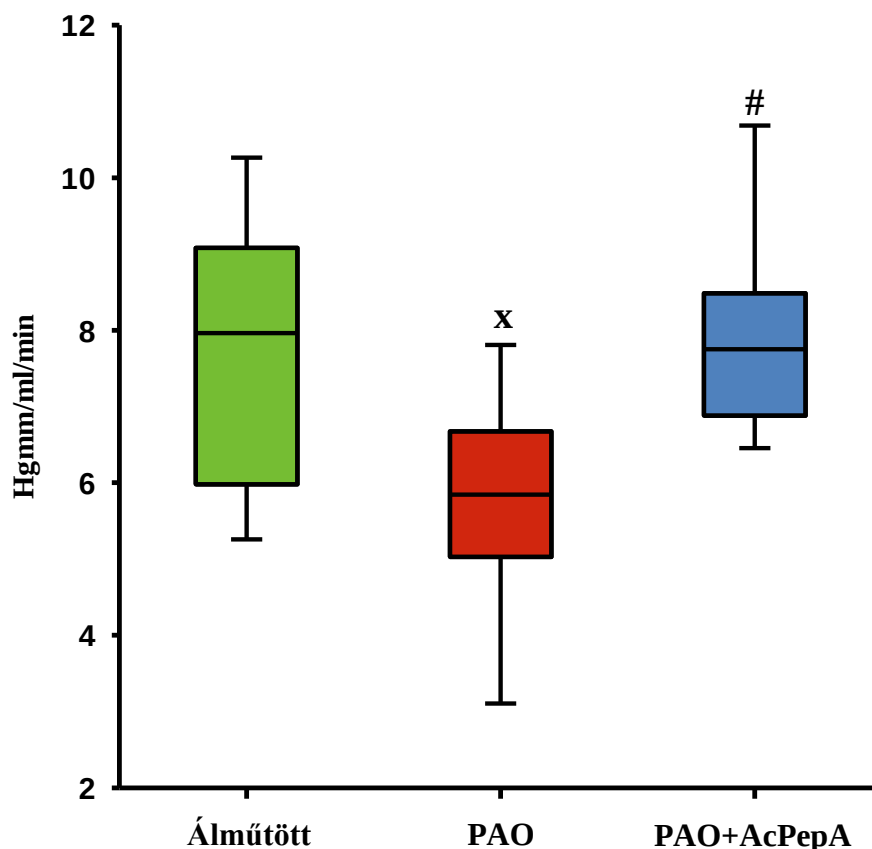
Az oszlop grafikonon a medián értéket és a szórás jellemzésére a 25 és 75 percentilis értékeket tüntettük fel. [#] $p < 0,05$ szignifikáns változás a PAO csoporthoz képest.



8. ábra: Az arteria mesenterica superior áramlása

Az AMS véráramlása (8. ábra) a PAO csoportban szignifikánsan megemelkedett, míg a C5a antagonistá kezeléscsökkentette, értéke az álműtött csoportétól nem különbözött.

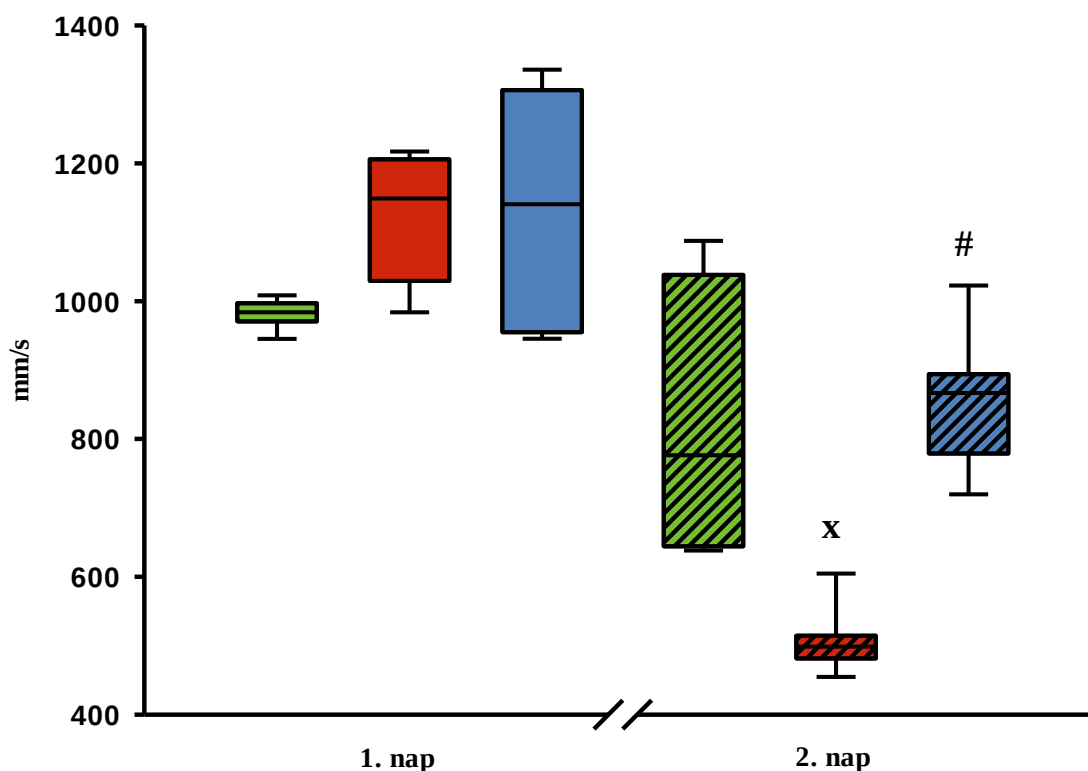
Az oszlop grafikonon a medián értéket és a szórás jellemzésére a 25 és 75 percentilis értékeket tüntettük fel. ^x $p < 0,05$ szignifikáns változás az álműtött csoporthoz képest.



9. ábra: Mesenterialis vascularis rezisztencia

Az AMS érelenállása (9. ábra) a PAO csoportban lecsökkent, míg az AcPepA kezelés emelte azt, értéke az álműtött csoportétól nem különbözött.

Az oszlop grafikonon a medián értéket és a szórás jellemzésére a 25 és 75 percentilis értékeket tüntettük fel. ^x $p < 0,05$ szignifikáns változás az álműtött csoporthoz képest; [#] $p < 0,05$ szignifikáns változás a PAO csoporthoz képest..

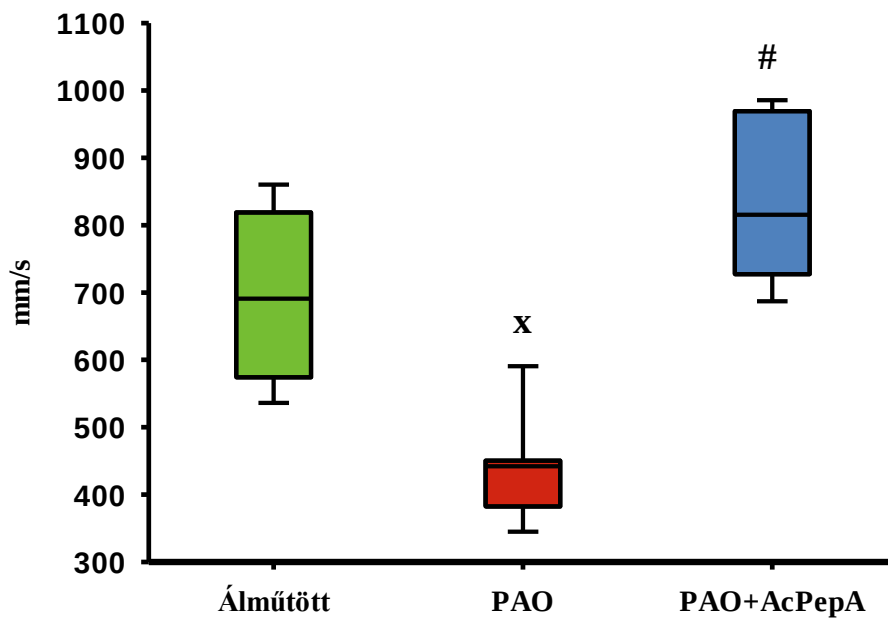


10. ábra: A serosa átlagos vörösvértest áramlási sebessége

A mikrokeringés a szöveti oxigenizáció érzékeny mutatója. A 10. ábrán a vékonybél serosában mért átlagos RBCV-e látható. Az első napon, a beavatkozás előtt a három csoport között eltérést nem tudtunk kimutatni.

A második napon a PAO csoport serosa RBCV értéke szignifikánsan lecsökkent az álműtött csoportban mért érték felére, míg az AcPepA kezelt csoportban az álműtött szintjén maradt.

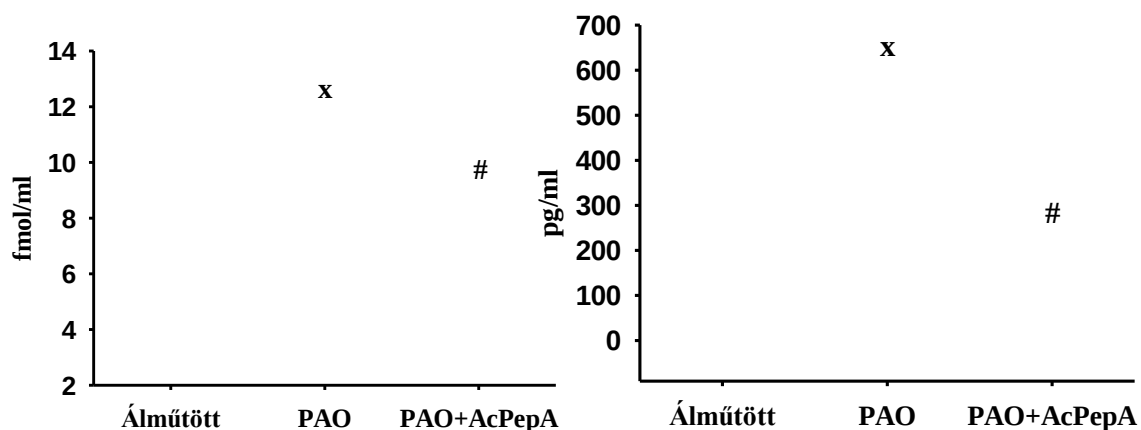
Az oszlop grafikonon a medián értéket és a szórás jellemzésére a 25 és 75 percentilis értékeket tüntettük fel. ^x $p < 0,05$ szignifikáns változás az álműtött csoporthoz képest; [#] $p < 0,05$ szignifikáns változás a PAO csoporthoz képest.



11. ábra: A mucosa átlagos vörösvértest áramlási sebessége

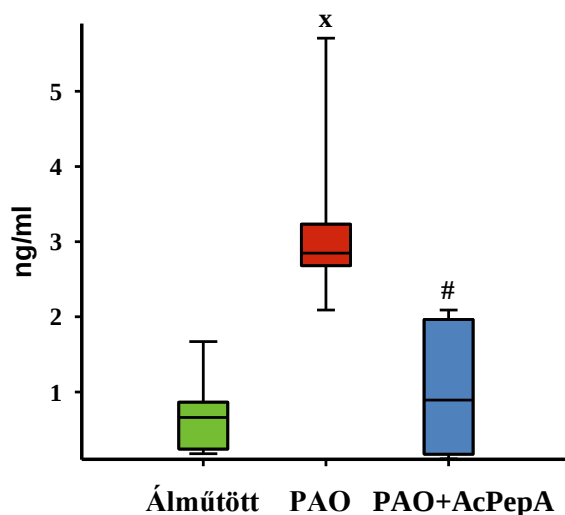
A mucosa mikrokeringési eredményei (11. ábra) a serosa mikrokeringési adataihoz hasonlóan alakultak; a kezeletlen PAO csoportban szignifikáns csökkenés volt mérhető. Az AcPepA kezelés normalizálta a RBCV-t a vékonybél mucosában.

Az oszlop grafikonon a medián értéket és a szórás jellemzésére a 25 és 75 percentilis értékeket tüntettük fel. ^x $p < 0,05$ szignifikáns változás az álműtött csoporthoz képest; [#] $p < 0,05$ szignifikáns változás a PAO csoporthoz képest.



12./a ábra: Endothelin-1

12./b ábra: TNF- α



12./c ábra: HMGB-1

Az endothelin-1, a TNF- α és a HMGB-1 (12. ábra a, b, c) biokémiai paraméterek esetében hasonló változásokat figyeltünk meg. A PAO csoportban az adott mediátorok plazma koncentrációja szignifikánsan emelkedett, míg az AcPepA kezelést követően nem mutattunk ki emelkedést az álmútött csoporthoz képest.

Az oszlop grafikonon a medián értéket és a szórás jellemzésére a 25 és 75 percentilis értékeket tüntettük fel. ^x $p < 0,05$ szignifikáns változás az álmútött csoporthoz képest; [#] $p < 0,05$ szignifikáns változás a PAO csoporthoz képest.

7. Megbeszélés

A NOMI akut, életet veszélyeztető állapot, amely azonnali diagnosztikus és terápiás lépéseket kíván. Kóreredete részben közös a teljes elzáródással járó mesenterialis ischaemiával, hiszen leggyakrabban rossz cardiovascularis állapot társbetegsége, azonban thrombus vagy embolia helyett a keringés olyan mértékű lecsökkenéséről van szó, amely már nem elég a szöveti perfusio fenntartásához.

Azért jelent nagy problémát, mert előfordulása a 1970-es évektől napjainkig – a cardiovascularis megbetegedésekhez hasonlóan – folyamatosan nőtt, és a mai modern sebészeti és intervenciós technika ellenére a mortalitása még mindig igen magas [Archodovassilis 2007]. További nehézséget jelent az a paradox jelenség, hogy a keringés visszaállítása egy hosszabb hypoperfusio után további károsodást okozhat, amit valamilyen módon csökkenteni kell a szövődmények minimalizálása érdekében.

Számos vizsgálat eredménye utal arra, hogy a kialakuló reakciókban az egyik kulcselem a C5a komplement peptid. Aktiválja az endothelt és a leukocytákat, a hízósejteken keresztül vascularis hatásokat fejt ki, mediálja a citokin felszabadulást és a neutrofil granulocyták erős kemotaktikus faktora. A C5a célzott, közvetlen gátlása a Nagoyai Egyetemen kifejlesztett AcPepA fehérjével korábban patkányok [Fujita 2004], illetve rhesus majmok [Okada H. 2011] esetében, lipopoliszacharid (LPS) indukálta septicus shockos állapotban jelentősen javította a túlélést.

Intézetünkben egy megelőző vizsgálat keretében megállapították, hogy 60 perc systemás hypotensio után (amelynek egyik részjelensége a NOMI) az AcPepA előnyösen befolyásolta a keringési és biokémiai mutatókat az első 180 percben [Érces 2013]. Azonban a jól felépített modell ellenére ez a három órás intervallum klinikailag csak az akut fázisnak felel meg. Mivel az AcPepA alkalmazása kísérletesen az ellátás első lépcsőjében előnyösnek bizonyult, ezért kutatásunk a kezelés hatásának hosszabb távú vizsgálatára fókuszált.

Kiindulásként létrehoztunk a mesenterialis hypotensio egy kis állatokon, rágcsálókon alkalmazható, könnyen kivitelezhető és real-time makro- és mikrokeringési vizsgálatokra alkalmas modelljét. A hasfal megnyitása után felkerestük az aortát, és a köré vezetett gumiszalag feszítésével idéztük elő a NOMI-t. Emellett igyekeztünk a beavatkozással minél kisebb traumát okozni az állatnak (pl.: az első napon azért előnyös

az arteria femoralisban mérni vérnyomást, mert a szervezetnek sokkal kisebb megterhelést jelent a lekötése, mint az arteria carotisé, és a jó collateralis keringése miatt nem károsodik az alsó végtag funkciója sem), ezzel minimalizáltuk az esetleges sebészeti szövödményeket. A fent említett módszer további előnye, hogy a hypotensios állapotot vérnyomáskontroll mellett állíthattuk be, és már az első napon lehetőségünk nyílt egyes paraméterek alapértékeinek felvételére. Egyebekben a modellel szemben támasztott általános követelmények (legyen standardizálható és reprodukálható) teljesültek.

Ezek után az így létrehozott, alkalmas modellen széleskörű vizsgálatot végeztünk a mesenterialis hypoperfusio 24 órán túli következményeinek és a C5a antagonistá kezelési hosszú távú hatásainak felderítésére.

Az első napon, a beavatkozást megelőzően és azt követően is vizsgáltuk a makrokeringés paramétereit. A szívfrekvenciában nem történt változás, a MAP viszont mindkét, átmeneti hypotensióknak alávetett csoportban megemelkedett a kezdeti értékekhez képest, valószínűleg a systemás keringés kompenzációs mechanizmusainak eredményeként. A második napra a PAO csoport keringési paraméterei hyperdinamiás állapotot mutattak: megemelkedett a MAP, a HR, ennek eredményeként a CO is magasabb volt, a TPR pedig csökkenő tendenciát mutatott.

Ez a jelenség meglehetősen lehet, mivel a fenti értékeket figyelembe véve a keringés állapota jó, azonban már kimutathatóak mikrokeringési eltérések. A klinikumban nehéz felismerni a sepsisnek ezt a korai, ún. hyperdinamiás systemás keringéssel járó szakaszát, többek között a mikrokeringés szűkös vizsgálati lehetőségei miatt. A folyamat később fokozatosan hypotensioval és összességében hypodinam keringéssel járó, klasszikus septicus shockhoz vezet. Mint azt eredményeink is mutatják, az állapot súlyosságával együtt nő bizonyos biokémiai markerek szintje, amelyek gyulladás vagy sepsis kapcsán termelődnek.

Örvendetes ugyanakkor, hogy az AcPepA kezelt csoportban a CO és a TPR is az álműtött szintjében maradt, amihez a gyulladásos paraméterek alacsony szintje társult, a gyulladásos állapot generalizálódása tehát nem kezdődött meg.

A szisztémás értékekhez hasonlóképpen alakultak a bél lokális makrokeringését meghatározó értékek a PAO csoportban, ugyanis az AMSF emelkedett, míg a MVR

csökkent. Ez az emelkedett áramlás azonban diszkrepanciát mutat a mikrokeringésben mért változásokkal, mert az RBCV értékei mind a serosában, mind a mucosában az álműtött szintjének a felére csökkentek.

Az RBCV változására több mechanizmus együttes jelenléte adhat magyarázatot. Az IR károsodás miatt felszabaduló számtalan citokin és egyéb mediátor egyik fő hatása a különösen érzékeny endothel aktiválása, ami a sejtek duzzadásában és pseudopodiumok képzésében nyilvánul meg. Ez jelentősen szűkíti a kapillárisok belső átmérőjét. Súlyosabb esetben az endothelsejtek elemelkedhetnek a basalis membránról [Carden 2000], és leöklődve eltömeszelik az eret, illetve a szűkült keresztmetszetű kapillárison a károsodott membránú vörösvértestek és az aktivált leukocyták is könnyebben fennakadnak [Lush 2000]. Továbbá a megnövekedett permeabilitás miatt makromolekulák lépnek ki az interstitiumba és vizet visznek magukkal, ami oedemát, fokozott szöveti nyomást eredményez, és kívülről komprimálja az ereket, ezzel megszünteti a véráramlást (no-reflow) [Vollmar 2011]. Ezek a mechanizmusok az arteriolákon történő simaizom kontrakcióval együtt a vér shuntölődését eredményezik, ami magyarázza, hogy emelkedett AMSF mellett miért csökkent a mikrokeringés.

A szöveti oedemát illető változások részben a hisztaminnak köszönhetők. Habár külön mérést nem végeztünk erre vonatkozóan, szintjének növekedése mellett szól, hogy az intézetünkben végzett hypotensios nagy állat vizsgálatokban értéke 15 perccel a tamponád megszüntetése után szignifikánsan megemelkedett [Érces 2013]. Erre lehetséges magyarázatot ad, hogy a hízósejtek membránján ET-A receptorok találhatóak, amelyek gátlásával csökkenthető a hisztamin felszabadulás. Tehát van egy direkt összefüggés a hisztamin és az ET-1 között, azonban közvetett mechanizmusok is szerepet játszanak. Az ET-1 által okozott vasoconstrictio ischaemiát okoz, ami részben a keletkező oxigén szabadgyököknek köszönhetően fokozza a degranulációt. A hízósejtek membránja továbbá nagyon érzékeny az ozmotikus stresszre, így az endothel károsodás hatására létrejövő perivascularis oedema is hisztamin felszabadulást eredményez [Szalay 2000]. Mindezek alátámasztják eredményünket, és ezért lényeges, hogy a PAO csoport ET-1 szintjének emelkedése az AcPepA kezelteknél nem volt megfigyelhető.

A fentiek alapján a kórosan fokozott ET-1 felszabadulás jelentősen befolyásolja a mikrokeringést, és a citokin felszabaduláson keresztül a makrokeringésre is hatással

van. Az AcPepA alkalmazása az ET-1 szint és a leukocita aktiváció mérséklése révén a ROS termelés csökkenésével is nagyban hozzájárul az RBCV megtartottságához a kezelt csoportban.

Az egyebek mellett sepsisben is megemelkedő HMGB-1 szintet magasnak találtuk a PAO csoportban, míg az AcPepA kezelt állatoknál ez az emelkedés nem volt tapasztalható. Ez az eredmény összhangban van intézetünk korábbi vizsgálataival, ahol ugyancsak alacsony perctérfogat következtében károsodott a bél [Érces 2013]. Az AcPepA továbbá főemlősökön alkalmazott endotoxin shock modellen is hatékonyan csökkentette a HMGB-1 szintet [Okada H. 2011]. Az eredmények lehetséges magyarázata, hogy egy kevésbé ismert C5a receptor, a C5L2 játszik szerepet a folyamatban. Korábban úgy gondolták, hogy ez egy nem szignalizáló scavenger receptor, amely nem képes G-fehérjével kötödni. Újabb vizsgálatok azonban kimutatták, hogy jelentős szerepe van a természetes immunrendszer és a gyulladásos folyamatok szabályozásában. A C5L2 knockout egerek túlélése javult coecalis ligatio és punctio indukálta sepsis modellben, a vad típusú egerekhez képest. Más vizsgálatok igazolták, hogy a HMGB-1 felszabadulás, endotoxin + C5a, vagy csak endotoxin kezelés hatására csökkent a C5L2 knockout makrofágokból. [Rittirsch 2008]

Bár a TNF- α citokint a gyulladás korai mediátorának tartják, azonban méréseink szerint szintje a PAO csoportban még 24 órán túl is emelkedett volt. Egy friss vizsgálat eredményeiben hasonlóan magas értékeket kaptak, és igazolták, hogy a TNF- α , vagy receptorának a gátlása csökkenti az enterocytákban a zonula occludens-1 (ZO-1) fehérjék downregulációját, a tight junction-ök károsodását, ezzel csökken a mucosa permeabilitása, a barrier funkció megtartott marad [Shen 2013]. Tehát azzal, hogy az AcPepA kezelés megelőzte a gyulladásos válasz kialakulását, a TNF- α szint csökkentésével közvetetten is hozzájárult a nyálkahártya épségének megőrzéséhez.

Jelen kísérleteinkben sikerrel bebizonyítottuk az AcPepA kezelés hosszú távú hatékonyságát mesenterialis hypoperfusio után. Eredményeink megerősítik korábban nyert adatainkat a C5a gátlás rövid távú hatásairól. Bár kidolgozott módszerünkben a PAO csak az alsó testfélben hoz létre hypotensiót, azonban ez a mesenterialis rendszert is magában foglalja, így nem csökkenti a modell használhatóságát a splanchnikus keringés károsodását célzó vizsgálatokban. A kidolgozott állatmodell limitációja az irodalmi áttekintésben ismertetett, a systemás hypoperfuziót pericardialis tamponáddal

létrehozó módszerrel szemben az, hogy esetünkben a leszorítás feletti szervek keringése fokozott. Ennek esetleges, a keringés szabályozását érintő, illetőleg a szívizomzatot átmenetileg megterhelő hatását figyelembe kell venni.

Kísérletes munkánk során létrehoztunk egy új, a mesenterialis rendszer elzáródással nem járó keringési elégtelenségének vizsgálatára alkalmas állatmodellt. Bebizonyítottuk, hogy a C5a antagonistá AcPepA kezelés hatékonyan mérsékli a NOMI által kiváltott gyulladásos reakciókat, ezzel csökkentve a korai és hosszú távú makro- és mikrokeringési szövődményeket. Eredményeink továbbá arra engednek következtetni, hogy az AcPepA kezelés a klinikumban is hatékony eszköz lehet a NOMI kezelésének kiegészítésében, ám ehhez további átfogó vizsgálatok szükségesek.

8. Felhasznált Irodalom

Abela CB, Homer-Vanniasinkham S: Clinical implications of ischaemia-reperfusion injury. *Pathophysiology*, 9:229-240, 2003

Acosta S, Ogren M, Sternby NH, Bergqvist D, Björck M: Fatal nonocclusive mesenteric ischaemia: population-based incidence and risk factors. *J Intern Med*, 259(3):305-313, 2006

Archodovassilis F, Lagoudiannakis EE, Tsekouras DK, Vlachos K, Albanopoulos K, Fillis K, Manouras A, Bramis J: Nonocclusive mesenteric ischemia: a lethal complication in peritoneal dialysis patients. *Perit Dial Int*, 27(2):136-41, 2007

Banda MA, Granger DN: Mechanism and protection from ischemic intestinal injury. *Transplantation Proc*, 28:2595–2597, 1996

Baranyi, L., W. Campbell, H. Okada: Antisense homology boxes in C5a receptor and C5a anaphylatoxin. *J. Immunol*, 157:4591, 1996

Baranyi, L., W. Campbell, K. Ohshima, S. Fujimoto, M. Boros, and H. Okada: The antisense homology box: a new motif within proteins that encodes biologically active peptides. *Nat. Med*, 1:894, 1995

Bassilios N, Menoyo V, Berger A, Mamzer MF, Daniel F, Cluzel P, et al: Mesenteric ischaemia in haemodialysis patients: a case/control study. *Nephrol Dial Transplant*, 18:911–917, 2003

Björck M, Wanhainen A: Nonocclusive mesenteric hypoperfusion syndromes: recognition and treatment. *Semin Vasc Surg*, 23(1):54-64, 2010

Boley SJ, Brandt LJ, Sammartano RJ: History of mesenteric ischemia. The evolution of a diagnosis and management. *Surg Clin North Am*, 77(2):275-88, 1997

Boros M, Takaichi S, Masuda J, Newlands GF, Hatanaka K: Response of mucosal mast cells to intestinal ischemia-reperfusion injury in the rat. *Shock*, 3:125-131, 1995

Bulkley GB, Kvietys PR, Parks DA, Perry MA, Granger DN: Relationship of blood flow and oxygen consumption to ischemic injury in the canine small intestine. *Gastroenterology*, 89:852-857, 1985

- Burgener D, Laesser M, Treggiari-Venzi M et al: Endothelin-1 blockade corrects mesenteric hypoperfusion in a porcine low cardiac output model. *Critical Care Medicine*, 29:1615–1620, 2001
- Carden DL, Granger DN: Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol*, 190:255–66, 2000
- Ceppa EP, Fuh KC, Bulkley GB: Mesenteric hemodynamic response to circulatory shock. *Curr Opin Crit Care*, 9(2):127-32, 2003
- Corday E, Irving DW, Gold H, et al: Mesenteric vascular insufficiency. Intestinal ischemia induced by remote circulatory disturbances. *Am J Med*, 33:365-376, 1962
- Ende N: Infarction of the bowel in cardiac failure. *N Engl J Med*, 258:879–881, 1958
- 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(11):344-351, 2013
- Fujita E, Farkas I, Campbell W, Baranyi L, Okada H and Okada N: Inactivation of C5a anaphylatoxin by a peptide that is complementary to a region of C5a. *J. Immunol*, 172:6382-6387, 2004
- Gazes PC, Holmes CR, Vince M, et al: Acute hemorrhage and necrosis of the intestines associated with digitalization. *Circulation*, 23:358, 1961
- Gorsuch WB, Chrysanthou E, Schwaeble WJ, Stahl GL: The complement system in ischemia-reperfusion injuries. *Immunobiology*, 217(11):1026-1033, 2012
- Haglund U: Gut ischaemia. *Gut*, 35(1 Suppl):S73-6, 1994
- Haynes DR, Harkin DG, Bignold LP, Hutchens MJ, Taylor SM, Fairlie DP: Inhibition of C5a-induced neutrophil chemotaxis and macrophage cytokine production in vitro by a new C5a receptor antagonist. *Biochem Pharmacol*, 60(5):729-733, 2000
- Harward TR, Brooks DL, Flynn TC, Seeger JM: Multiple organ dysfunction after mesenteric artery revascularization. *J Vasc Surg*, 18:459–467, 1993

- Howard TJ, Plaskon LA, Wiebke EA, Wilcox MG, Madura JA: Nonocclusive mesenteric ischemia remains a diagnostic dilemma. *Am J Surg*, 171:405–408, 1996
- Jamieson WG, Lozon A, Durand D, Wall W: Changes in serum phosphate levels associated with intestinal infarction and necrosis. *Surg Gynecol Obstet*, 140:19–21, 1975
- Kanwar S, Wallace JL, Befus D, Kubes P: Nitric oxide synthesis inhibition increases epithelial permeability via mast cells. *Am J Physiol*, 266:222-229, 1994
- Katsube T, Tsuji H, Onoda M: Nitric oxide attenuates hydrogen peroxide-induced barrier disruption and protein tyrosine phosphorylation in monolayers of intestinal epithelial cell. *Biochim Biophys Acta*, 1773:794–803, 2007
- Kimura T, Andoh A, Fujiyama Y, Saotome T, Bamba T: A blockade of complement activation prevents rapid intestinal ischaemia-reperfusion injury by modulating mucosal mast cell degranulation in rats. *Clin Exp Immunol*, 111(3):484-90, 1998
- Kolkman JJ, Mensink PB: Non-occlusive mesenteric ischaemia: a common disorder in gastroenterology and intensive care. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 17(3):457-473, 2003
- Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN: *Robbins A Patológia Alapjai*, 8. kiadás: p54-668, 2009
- Lee H, Whitfeld PL, Mackay CR: Receptors for complement C5a. The importance of C5aR and the enigmatic role of C5L2. *Immunol Cell Biol*, 86(2):153-160, 2008
- Liu HL, Huang JJ, Lan RR, Wang MC, Sung JM, Hsieh RY: Ischaemic bowel disease in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Nephrol Dial Transplant*, 14:2032–2034, 1999
- Lush CW, Kvietys PR: Microvascular dysfunction in sepsis. *Microcirculation*, 7(2):83-101, 2000
- Mann A, Fazio VW, Lucas FV: A comparative study of the use of fluorescein and the Doppler device in the determination of intestinal viability. *Surg Gynecol Obstet*, 154:53–55, 1982

- Nitori N, Deguchi T, Kubota K, Yoshida M, Kato A, Kojima M, Kadomura T, Okada A, Okamura J, Kobayashi M, Sato T, Beck Y, Kitagawa Y, Kitajima M: Successful treatment of non-occlusive mesenteric ischemia (NOMI) using the HyperEye Medical System™ for intraoperative visualization of the mesenteric and bowel circulation: report of a case. *Surg Today*, 44(2):359-62, 2014
- Okada H, Imai M, Ono F, Okada A, Tada T, Mizue Y, Terao K, Okada N: Novel complementary peptides to target molecules. *Anticancer Res*, 31(7):2511-2516, 2011
- Ori Y, Chagnac A, Schwartz A, Herman M, Weinstein T, Zevin D, et al: Non-occlusive mesenteric ischemia in chronically dialyzed patients: a disease with multiple risk factors. *Nephron Clin Pract*, 101:87–93, 2005
- Potoka DA, Nadler EP, Upperman JS, Ford HR: Role of nitric oxide and peroxynitrite in gut barrier failure. *World J Surg*, 26(7):806-811, 2002
- Reilly PM & Bulkley GB: Vasoactive mediators and splanchnic perfusion. *Critical Care Medicine*, 21:55–68, 1993
- Rittirsch D, Flierl MA, Nadeau BA, et al: Functional roles for C5a receptors in sepsis. *Nat Med*, 14:551–557, 2008
- Shen ZY, Zhang J, Song HL, Zheng WP: Bone-marrow mesenchymal stem cells reduce rat intestinal ischemia-reperfusion injury, ZO-1 downregulation and tight junction disruption via a TNF- α -regulated mechanism. *World J Gastroenterol*, 19(23):3583-95, 2013
- Sheridan WG, Lowndes RH, Williams GT, Young HL: Determination of a critical level of tissue oxygenation in acute intestinal ischemia. *Gut*, 33:762–766, 1991
- Siegelman SS, Sprayregen S, Boyle SJ: Angiographic diagnosis of mesenteric arterial vasoconstriction. *Radiology*, 112:533–542, 1974
- Simpson R, Alon R, Kobzik L, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB: Neutrophil and nonneutrophil-mediated injury in intestinal ischemia-reperfusion. *Ann Surg*, 218:444-454, 1993

- Syk I, Brunkwall J, Ivancev K, Lindblad B, Montgomery A, Wellander E, Wisniewski J, Risberg B: Postoperative fever, bowel ischaemia and cytokine response to abdominal aortic aneurysm repair—a comparison between endovascular and open surgery. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 15:398–405, 1998
- Szabo C & Dawson VL: Role of poly (ADP-ribose) synthetase in inflammation and ischaemia-reperfusion. *Trends Pharmacol Sci*, 19:287–298, 1998
- Szalay L, Kaszaki J, Nagy S, Boros M: Endothelin-1 induces mucosal mast cell degranulation in the rat small intestine. *Life Sci*, 67(16):1947-1958, 2000
- Trompeter M, Brazda T, Remy CT, Vestring T, Reimer P: Non-occlusive mesenteric ischemia: etiology, diagnosis, and interventional therapy. *Eur Radiol*, 12(5):1179-1187, 2002
- Ulloa L, Messmer D: High-mobility group box 1 (HMGB1) protein: Friend and foe. *Cytokine Growth Factor Rev*, 17:189–201, 2006
- Vajda K, Szabó A, Kucsá K, Suki B, Boros M: Microcirculatory heterogeneity in the rat small intestine during compromised flow conditions. *Microcirculation*, 11(4):307-315, 2004
- Vollmar B, Menger MD: Intestinal ischemia/reperfusion: microcirculatory pathology and functional consequences. *Langenbecks Arch Surg*, 396(1):13-29, 2011
- Wada K, Montalto MC, Stahl GL: Inhibition of complement C5 reduces local and remote organ injury after intestinal ischemia/reperfusion in the rat. *Gastroenterology*, 120(1):126-133, 2001
- Walport, M.J: Complement. First oftwo parts. *N. Engl. J. Med*, 344:1058–1066, 2001a
- Walport, M.J: Complement. Second of two parts. *N. Engl. J. Med*, 344:1140–1144, 2001b
- Webb DJ: Endothelin: from molecule to man. *Br J Clin Pharmacol*, 44:9–20, 1997

Woodhams R, Nishimaki H, Fujii K, Kakita S, Hayakawa K: Usefulness of multidetector-row CT (MDCT) for the diagnosis of non-occlusive mesenteric ischemia (NOMI): assessment of morphology and diameter of the superior mesenteric artery (SMA) on multi-planar reconstructed (MPR) images. *Eur J Radiol*, 76(1):96-102, 2010

Zeier M, Hupp T, Wiesel M, Rambašek M, Ritz E: Nonocclusive intestinal ischemia as a complication of hemodialysis treatment. *Dtsch Med Wochenschr*, 118:1020–1024, 1993

Zeier M, Wiesel M, Rambašek M, Ritz E: Non-occlusive mesenteric infarction in dialysis patients: the importance of prevention and early intervention. *Nephrol Dial Transplant*, 10:771–773, 1995

9. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki Dr. Boros Mihály professzor úrnak, amiért lehetővé tette, hogy 3 éven át a Sebészeti Műtéttani Intézetben tudományos diákköri munkát folytathassak.

Külön köszönet illeti témavezetőimet, Dr. Varga Gabriellát és Dr. Mészáros Andrást odaadó segítségükért, útmutatásaikért, és Dr. Kaszaki József egyetemi docens urat az eredmények kiértékelése során nyújtott segítségéért. Továbbá köszönöm Dr. Érces Dánielnek a hasznos tanácsokat, Cao Chunnak és Fischer Sz. Tamásnak a munkám alapjául szolgáló vizsgálatban való segítséget, és az intézeti laboratórium dolgozóinak és az állatház gondozóinak a magas szintű kísérletes háttér biztosítását.

NYILATKOZAT

Alulírott **Szűcs Szilárd**, a Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karának hallgatója ezennel büntetőjogi felelősségem tudatában kijelentem és aláírással igazolom, hogy

„Mesenterialis hypoperfúzió állatkísérletes modellezése és terápiás lehetőségei”

című szakdolgozatom **saját, önálló munkám**; az abban hivatkozott nyomtatott és elektronikus szakirodalom felhasználása a szerzői jogok nemzetközi szabályainak megfelelően készült.

Tudomásul veszem, hogy szakdolgozat esetén plágiumnak számít:

- szó szerinti idézet közlése idézőjel és hivatkozás megjelölése nélkül;
- tartalmi idézet hivatkozás megjelölése nélkül;
- más publikált gondolatainak saját gondolatként való feltüntetése.

Alulírott kijelentem, hogy a plágium fogalmát megismertem, és tudomásul veszem, hogy plágium esetén szakdolgozatom visszautasításra kerül.

Szeged, 2014. február 7.

.....
Szűcs Szilárd