

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Dr. Berhés Mariann

**Hemodinamikai és hemoreológiai változások E. coli  
szuszpenzióval indukált fulmináns szepszis modellen**

Debreceni Egyetem

Idegtudományi Doktori Iskola

Debrecen, 2021

# EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

## **Hemodinamikai és hemoreológiai változások E. coli szuszpenzióval indukált fulmináns szepszis modellen**

Dr. Berhés Marianna

Témavezető:

Dr. Fülesdi Béla, az MTA doktora

Dr. Németh Norbert, az MTA doktora



DEBRECENI EGYETEM

Idegtudományi Doktori Iskola

Debrecen, 2021

## Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	8
2. Irodalmi áttekintés.....	9
2.1 A sepszis klinikai definíciója.....	9
2.1.1 Történelmi áttekintés.....	9
2.1.2 Sepsis-1 (1991.) definíciók.....	10
2.1.3 Sepsis-2 definíciók.....	10
2.1.4 Sepsis-3 definíciók.....	12
2.2 A szeptikus sokk patofiziológiája.....	14
2.2.1 Vazodilatáció.....	14
2.2.2 Hipovolémia.....	15
2.2.3 Kapilláris permeabilitás és endotél károsodás.....	16
2.2.4 Szepszis és hemosztázis.....	18
2.2.5 A kapilláris diszfunkció okai sepszisben.....	21
2.3.1 Szeptikus állatmodellek, általános megfontolások.....	22
2.3.2 A leggyakrabban alkalmazott szeptikus kísérleti állatmodellek.....	23
3. Célkitűzések.....	38
4. Módszerek.....	38
4.1 Kísérleti állatok, és kísérleti protokoll.....	38
4.2 Hemodinamikai mérések.....	40
4.3 Adatgyűjtés.....	41
4.4 Statisztikai analízis.....	41
4.5 Hemoreológiai mérések.....	41
4.5.1 In vitro study.....	42
4.5.2 Laboratóriumi vizsgálatok (in vivo).....	42
5. Eredmények.....	45
5.1 Hemodinamikai mérések.....	45

5.2	Hemoreológiai vizsgálatok eredményei .....	50
5.2.1	A hemoreológiai mérésekben résztvevő sertés alcsoport hemodinamikai és mortalitási jellemzői.....	50
5.2.2	Hematológiai paraméterek .....	50
5.2.3	Eritrocita szedimentációs ráta és leukocita anti-szedimentációs ráta.....	51
5.2.4	A vér és plazma viszkozitás .....	52
5.2.5	Vörösvérsejt deformabilitás .....	52
5.2.6	Vörösvérsejt aggregáció .....	55
5.2.7	Az in vitro vizsgálat eredményei.....	56
6.	Megbeszélés .....	58
7.	Irodalmi hivatkozások .....	68
8.	Összefoglalás.....	84
9.	Summary .....	85
10.	Tárgyszavak .....	87
11.	Függelék.....	87
12.	Köszönetnyilvánítások .....	88

## **Rövidítések jegyzéke**

MAP: artériás középnyomás

SOFA: sequential organ failure assesment

qSOFA: quick sequential organ failure assesment

SIRS: szisztémás gyulladós válaszreakció

NO: nitrogén-oxid

NOS: nitrogén-oxid szintetáz

iNOS: indukálható nitrogén-oxid szintetáz

cNOS: konstitutív nitrogén-oxid szintetáz

TNF: tumor-nekrózis faktor

IL: interleukin

ECL: endotél sejt borítás

ROS: reactive oxygen species

RNS: reactive nitrogen species

NET: neutrofil extracelluláris trap

CAS: akut szepszishez társult koagulopátia

DIC: disszeminált intravaszkuláris koagulopátia

vWf: von Willebrandt faktor

TF: tissue faktor (szöveti faktor)

PAI: plazminogén-aktivátor inhibitor

GP: glikoprotein

PAF: trombocita aktiváló faktor

TFPI: szöveti faktor pathway inhibitor

EPCR: endotéliális protein C receptor

MODS: multi organ dysfunction syndrome

HUS: hemolítikus urémiás szindróma

TAMOF: thrombocytopaenia-associated multiple organ failure

ULVWF: ultralarge von Willendbrandt faktor

TAFI: trombin-aktiválható fibrinolízis inhibítort

ATP: adenzin-trifoszfát

CLP: cecalis ligáció és punkciós modell

CASP: colon aszendens stent peritonitis modell

CASPI: sebészi intervenció CASP után

LPS: lipopoliszacharid

MIF: makrofág inhibitor faktor  
ICAM: intracelluláris adhéziós molekula  
CI cardiac index  
PCO<sub>2</sub>: parciális szén-dioxid  
CARS: kompenzatorikus anti-inflamatorikus válasz  
SBV: szisztolés vérviszkozitás  
DBV: diasztolés vérviszkozitás  
DPG: difoszfo-glicerát  
Ca<sup>2+</sup>: kalcium ion  
RBC: red blood cell (vörösvérsejt)  
WBC: white blood cell (fehérvérsejt)  
PiCCO: Pulse index Contour Continuous Cardiac Output  
CO: cardiac output  
CI: cardiac index  
CVP: centrális vénás nyomás  
MTt: mean transit time  
DSt: downslope time  
ITTV: intra-thoracic thermal volume  
PTV: pulmonary thermal volume  
GEDV: global end-diastolic volume  
EVLW: extravascular lung water  
EVLWI: extravaszkuláris tüdővíz index  
SV: stroke volumen  
SVV: stroke volumen variáció  
SVI: stroke volumen index  
SVR: szisztémás vaszkuláris rezisztencia  
SVRI: szisztémás vaszkuláris rezisztencia index  
GEF: globális ejekciós frakció  
CFI: cardiac function index  
PAP: pulmonalis artériás nyomás  
PAOP: pulmonális artéria okklúziós nyomás  
PVPI: pulmonaris vaszkuláris permeabilitási index  
RS: resting state  
LAR: leukocita antiszedimentációs ráta

WBV: teljes vér viszkozitás

PV: plazma viszkozitás

Mo: monocita

Gr: granulocita

MCV: mean cell volume (átlagos vörösvérsejt térfogat)

MCH: átlagos hemoglobin koncentráció

ESR: eritrocita szedimentációs ráta

LAR: leukocita antiszedimentációs ráta

IR: rigiditási index

SAPS: egyszerűsített akut fiziológiai pontrendszer (simplified acute physiology score)

## 1. Bevezetés

Az utóbbi évtizedben a szepszis incidenciája növekvő tendenciát mutat. Németországban 2007. és 2013. között évente 15%-kal növekedett az incidencia, a kórkép mortalitása 30,5%, mely évente átlagosan csak 0,8%-kal csökken, az intenzív terápia fejlődésének dacára. A magas incidencia és halálozási adatok mellett nem elhanyagolható a szeptikus betegek kezelésének magas költségigénye sem, amelynek becsült összege 2013-ban Németországban 9,1 millió Euro volt, amely az az egészségügyi költségvetés 3%-át teszi ki (1).

Tekintettel arra, hogy a fejlődő és alacsony bevételű országokból adatok csak részben érhetőek el, a szepszis globális incidenciája és halálozási mutatói nem ismertek. Egy 2016-ban megjelent tanulmány becslése alapján 31,5 millió szepszis fordul elő világszerte, ebből 19,4 millió súlyos, mely 5,3 millió halálesethez vezet évente (2). Jean-Louis Vincent és munkacsoportja 2019-ben publikált egy metanalízist, mely során 2005. január 1-től 2018. február 20-ig megjelent megfigyelésen alapuló szepszis és szeptikus sokk mortalitási frekvenciával foglalkozó európai és észak-amerikai tanulmányok adatait összesítették a Cochrane adatbázisa alapján. Az átlagos mortalitás 37,3% volt az intenzív osztályokon, míg a kórházi mortalitás 39%. Amennyiben a szeptikus sokkot a Sepsis-3 konszenzus kritériumai alapján diagnosztizálták, az intenzív osztályos és kórházi becsült mortalitás 51,9% illetve 52,1% volt. (3)

A szeptikus folyamat egy, a szervezet által adott generális válaszreakció, de a kórkép közel sem homogén. Mivel a szepszis kialakulásának pontos patomechanizmusa nem ismert, a megismeréshez olyan kutatások vihetnek közelebb, melyeknek célja a szindróma kórétletani hátterének és kezelési lehetőségeinek pontosabb megismerése. Erre szolgálnak a különböző szeptikus állatmodellek.

Értekezésemben a szepszissel, valamint a szeptikus állatmodellekkal kapcsolatos összefoglalót követően saját szeptikus állatmodellünk során nyert eredményeinket foglalom össze.

## 2. Irodalmi áttekintés

### 2.1 A szepszis klinikai definíciója

#### 2.1.1 Történelmi áttekintés

A szepszis több mint 2000 éves görög eredetű szó, melynek a jelentése „putrid”, bűzös. A szepszis Hippocrates értelmezésében állati rothadást jelentett. Azt gondolták, hogy a seb rothadása a levegővel való érintkezés következménye, és a halál akkor következik be, amikor a rothadási folyamat eléri a véráramot. Aristoteles 100 évvel később úgy gondolta, hogy a rothadás- sepsis során új, kis állati teremtmények keletkeznek. Casimire J. Davaine az 1800-as évek végén, anthraksszal kapcsolatos kutatásai során leírt egy másik betegséget, a szarvasmarha szeptikémiát. A kórokozót izolálni ugyan nem tudta, de megállapította, hogy a szeptikémia kórokozói motilisak, míg az anthrax nem, Azt is megállapította, hogy a rothadt szeptikémiás vér már nem virulens, míg az anthraxot tartalmazó vér állandóan virulens marad. Ekkor szemléletváltás történt a szeptikémiával kapcsolatban: a szepszis vérrel átvihető, és a szeptikus vérnek nincs rothadt szaga. (4) A szeptikémia első definíciója William Osler 1892-ben megjelent „Az orvoslás elmélete és gyakorlata” című könyvében olvasható. Eszerint „A szeptikémia egy lázas fertőzés szuppurációs fókusz nélkül, melyet a baktériumok által termelt toxinok felszívódása okoz. A szeptikémiát ugyanazok a kórokozók okozzák, mint a szuppurációt, nevezetesen a strepto- és staphylococcusok.” (4) A legelső, jelenkori definícióhoz hasonló megközelítés 1914-ből, Hugo Schrottmüllertől származik, aki a szepszist a következőképpen jellemezte: „szepszis akkor alakul ki, ha a szervezetben egy olyan fókusz van, melyből folyamatosan, vagy periódikusan patogének kerülnek a véráramba, és így objektív és szubjektív szimptomákat okoznak”.(9)

A „szepszis szindróma fogalmát” 1989-ben Bone és munkatársai vezették be, mely tulajdonképpen megfelel a jelenlegi SIRS definíciónak. Az American College of Chest Physicians (ACCP)/Society of Critical Care Medicine (SCCM) Konszenzus konferenciáját (Distinctions in the Definition of Severe Sepsis) 1991-ben tartották Northbrookban, ahol már nagyrészt a jelenlegi értelmezésében alkották meg a szepszis definícióját. A konferencia célja az volt, hogy elősegítsék a gyorsabb diagnózis alkotást és hogy a kutatási protokollokat és terápiás beavatkozásokat standardizálhassák. (6) Az új terminusok az infekció, bakteriémia, szisztémás gyulladási válaszreakció (SIRS), szepszis, súlyos szepszis, szeptikus sokk és többszervi elégtelenség szindróma (MODS) lettek. A szepszist infekciós inzultus következtében kialakuló szisztémás gyulladási válaszreakcióként definiálták.

### 2.1.2 Sepsis-1 (1991.) definíciók

**Infekció:** gyulladáshoz vezető válasz, melyet a mikroorganizmus jelenléte, vagy inváziója vált ki az egyébként steril területen.

**Bakterémia:** élő baktérium a véráramban.

**Szisztémás gyulladáshoz vezető válaszreakció szindróma (SIRS):** a szervezetet ért súlyos inzultusra adott hiperinflammációs válaszreakció, mely esetén egyidejűleg kettő, vagy több feltétel megvalósul az alábbiak közül:

- Testhőmérséklet  $>38^{\circ}\text{C}$  vagy  $<36^{\circ}\text{C}$
- Szívfrekvencia  $>90/\text{min}$
- Légzésszám  $>20/\text{min}$  vagy  $\text{PaCO}_2 <32 \text{ Hgmm}$  (4.3 kPa)
- Fehérvérsejt szám  $>12\,000/\text{mm}^3$  or  $<4000/\text{mm}^3$  or  $>10\%$  éretlen alakok

**Sepszis:** infekció által kiváltott gyulladáshoz vezető válaszreakció, mely esetén kettő, vagy több feltétel megvalósul a következőkből:

- Testhőmérséklet  $>38^{\circ}\text{C}$  vagy  $<36^{\circ}\text{C}$
- Szívfrekvencia  $>90/\text{min}$
- Légzésszám  $>20/\text{min}$  vagy  $\text{PaCO}_2 <32 \text{ Hgmm}$  (4.3 kPa)
- Fehérvérsejt szám  $>12\,000/\text{mm}^3$  or  $<4000/\text{mm}^3$  or  $>10\%$  éretlen alakok

**Súlyos sepszis:** sepszishez társult súlyos szervdiszfunkció, hipoperfúzió vagy hipotenzió. Hipoperfúzió és perfúziós abnormalitások mellett laktát acidózist, oliguriát és a mentális státusz megváltozását is magába foglalja.

**Szeptikus sokk:** adekvát folyadék terápia ellenére kialakuló sepszis indukálta hipotenzió, melyhez perfúziós abnormalitás társul laktát acidózissal, oliguriával, és a mentális státusz megváltozásával. Azok a betegek, akik vazopresszor vagy inotrop kezelésben részesülnek, lehetnek normotenziósak, de a perfúziós zavar ennek ellenére bizonyítható.

**Sepszis indukálta hipotenzió:** szisztolés vérnyomás  $< 90 \text{ Hgmm}$ , vagy a vérnyomás csökkenés legalább  $40 \text{ Hgmm}$  az alapértékhez képest.

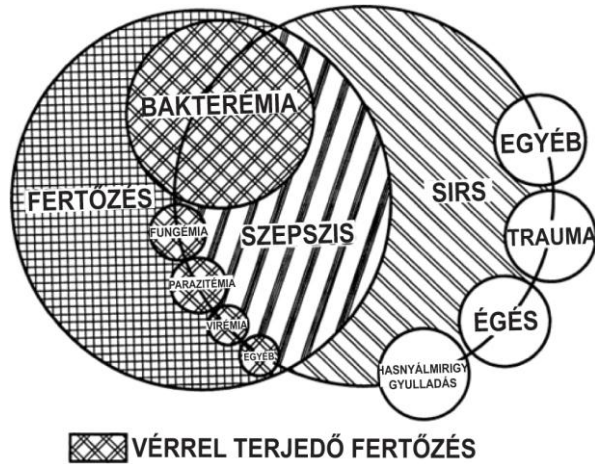
**Többszervi elégtelenség szindróma:** megváltozott szervfunkció akut betegség esetén, beavatkozás nélkül a szervezet homeosztázisát nem lehet fenntartani. (7, 8)

### 2.1.3 Sepsis-2 definíciók

A Sepsis-1 konszenzus diagnosztikus kritériumának legfontosabb korláta az volt, hogy ennek alapján minden beteg, aki infekción esik át, gyakorlatilag teljesíti ezeket a tüneteket, de klinikailag nem feltétlenül sepszis, állapota könnyen kezelhető. Ugyanakkor számos inzultus hatására (pl. akut pancreatitis vagy kardiopulmonalis bypass használatával végzett

szívműtét utáni állapot), infekció nélkül is észlelhetjük a SIRS klinikai jeleit. 1992-ben a szepszist egy olyan klinikai szindrómaként definiálták, melyben egyszerre volt jelen az infekció és a gyulladáshoz való válaszreakció. (1. ábra)

1. ábra: A gyulladáshoz való válaszreakció, a szepszis és az infekció kölcsönhatása (7.)



Mivel ez nem bizonyult eléggé specifikusnak, a definíciók pontosítására volt szükség, melyre 2001-ben került sor. A Sepsis - 2 egy új definíció bevezetését javasolta - klinikai szindróma szervkárosodással - de megtartotta a régi diagnosztikus kritériumokat is. Emellett diagnosztikus kritériumokat kiterjesztették. (1. Táblázat) Szeptikus sokként egy egyéb okkal nem magyarázható perzisztáló keringési elégtelenséget definiált. (9,10)

1. táblázat: A szepszis diagnosztikus kritériumai, 2001.

Infekció	Dokumentált, vagy feltételezett, és az alábbiak közül néhány
Általános változók	Láz (maghőmérséklet $> 38,3^{\circ}\text{C}$ ) Hipotermia (maghőmérséklet $< 36^{\circ}\text{C}$ ) Szívfrekvencia $> 90/\text{min}$ vagy $> 2\text{SD}$ életkorhoz adaptálva Tachipnoé Meváltozott mentális status Szignifikáns ödéma, vagy pozitív folyadékgyengesúly ( $>20 \text{ ml}/\text{ttkg}/24 \text{ óra}$ ) Hiperglikémia (Plazma glükóz $>120 \text{ mg}/\text{dl}$ vagy $7,7 \text{ mmol}/\text{L}$ diabétesz nélkül)
Inflammatórikus változók	Leukocitózis (FVS szám $> 12,000/\text{uL}$ ) Leukopénia (FVS szám $< 4,000/\text{uL}$ ) Normál FVS szám $> 10\%$ éretlen alak Plazma C-reaktív protein (CRP) $> 2\text{SD}$ a normál érték felett Plazma procalcitonin (PCT) $> 2 \text{ SD}$ a normál érték felett

Hemodinamikai változók	Artériás hipotenzió(SBP<90 Hgmm, MAP<70 Hgmm, vagy SBP csökkenés > 40 Hgmm felnőttekben, vagy > 2SD életkorhoz adaptálva ScvO2 > 70% Cardiac index> 3,5 L/perc
Szervdiszfunkció változók	Artériás hipoxémia P/F<300 Akut oliguria UOP<0,5 ml/ttkg/óra) Kreatinin növekedés > 0,5 mg/dl Koagulációs zavar (INR> 1,5 vagy aPTI> 60 sec Ileusz (hiányzó bélhangok) Trombocitopénia (<100000/uL) Hiperbilirubinémia (totál bilirubin> 4 mg/dl vagy 70 mmol/L)
Szöveti perfúziós változók	Hiperlaktatémia (> 1 mmol/L) Magas CRT vagy márványozottság

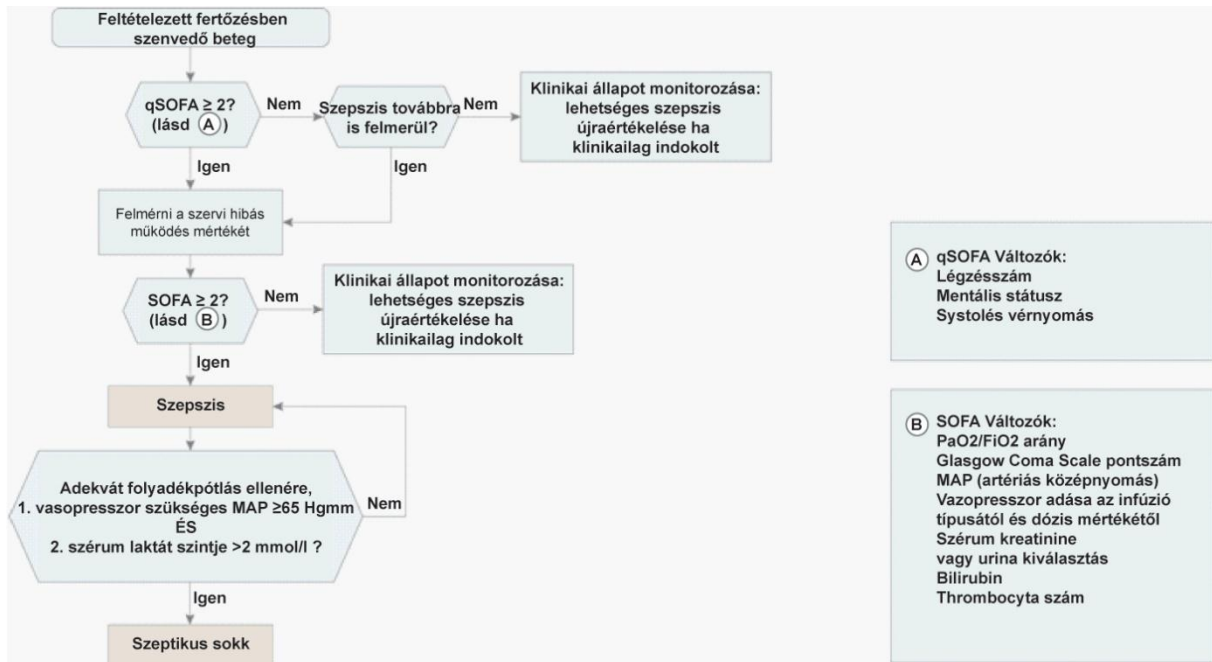
#### 2.1.4 Sepsis-3 definíciók

2016-ban egy újabb konszenzus konferencia zajlott a definíciók pontosítása céljából. A súlyos szepszis definícióját megszüntették. Bevezetésre került a „quick” SOFA score, mely a feltételezhetően fertőző betegség miatt intenzív osztályon kívül kezelt, magas mortalitás kockázatú betegek azonosítását segíti. (2. táblázat) A szepszist életet veszélyeztető szervdiszfunkcióként definiálták, amit a szervezet infekcióra adott diszregulált immunválasza okoz. Szervdiszfunkcióként pedig a teljes SOFA score-ban bekövetkező akut, 2 pontnál nagyobb emelkedést, mely az infekció másodlagos következménye. (1. ábra) Ezáltal a súlyos szepszis definíció feleslegessé vált. A szeptikus sokkot, mint a szepszis részhalmazát definiálta, melyben a mögöttes keringési, celluláris és metabolikus abnormalitások magasabb mortalitási kockázattal járnak, mint szepszis esetén. Diagnosztikus kritériumai a perzisztáló hipotenzió, mely esetén a 65 Hgmm-es MAP eléréséhez vazopresszor terápia szükséges, valamint a szérum laktát szint 2 mmol/L feletti adekvát folyadék terápia ellenére. (2. ábra) Ezen kritériumok mellett a kórházi mortalitás 40%-ra becsülhető. (11)

2. táblázat: qSOFA score 2016

qSOFA kritériumok	Pontszám
Légzés frekvencia > 20/min	1
Mentális státusz megváltozása	1
Szisztolés vérnyomás < 100 Hgmm	1

2. ábra: Szepszis és szeptikus sokk definíció. (The Third International Consensus Definition, 11)



3. táblázat: SOFA score

Változó (pont)	0	1	2	3	4
Légzés: pO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> (Hgmm)	>400	<400	<300	<200 és gépi lélegeztetés	<100 és gépi lélegeztetés
Koaguláció Trombocitax 10 <sup>3</sup>	>150	<150	<100	<50	<20
Máj: Bilirubin umol/L	<20	20-32	33-101	102-204	>204
kardiovaszkuláris: Hipotenzió(Hgmm) Dózis (ug/kg/perc)	>70	<70	<70 dopamin<5, vagy dobutamin	dopamin >5 norepinefrin<0,1 fenilefrin<0,8	dopamin >15 norepinefrin >0,1 fenilefrin >0,8

Központi idegrendszer: Glasgow kóma skála	15	13-14	10-12	6-9	<9
Vese: Kreatinin mg/dl vagy vizeletkiválasztás ml/óra	<1,2	1,2-1,9	2,0-3,4	3,5-4,9	>5

## 2.2 A septicus sokk patofiziológiája

A septicus sokk patofiziológiája mind a mai napig részleteiben nem teljesen ismert. A hemodinamikai sokk a klasszikus értelemben egy klinikai szindróma, mely során az inadekvát perfúzió következtében a vitális szervek súlyos diszfunkciója jön létre. (12) A septicus sokkot súlyos, a folyadék és vazopresszor terápiára nehezen reagáló hipotenzio jellemzi. Mielőtt bevezetésre került az invazív kardiovaszkuláris monitorok használata, azt feltételezték, hogy a septicus sokknak két fázisa van. Az iniciális fázisban hiperdinám (meleg sokk) állapot, a későbbiekben hipodinám (hidegsokk) állapot alakul ki. A gazdaszervezet és a patogének között létrejött komplex kölcsönhatás a folyamatban nagy jelentőséggel bír.

A lokalizált fertőzések esetén a gazdaszervezet aktivációja során az infekció helyére aktivált neutrofilek és monociták áramlanak, gyulladáshoz vezető mediátorok szabadulnak fel, lokálisan vazodilatáció, kapilláris permeabilitás fokozódás, és koagulációs útvonalak aktivációja jön létre. Ugyan ezek a mechanizmusok játszanak szerepet a septicus sokk során is, de szisztémásan. A septicus sokk főbb alapmechanizmusai: a vazodilatáció, hipovolémia, kamrai diszfunkció, megnövekedett kapilláris permeabilitás, diffúz endotél károsodás és végkapillárisok trombózisa. Az endotél károsodása további gyulladáshoz és koagulációs kaskád aktivációhoz vezet.

### 2.2.1 Vazodilatáció

A septicus sokk klasszikus értelemben a disztributív sokkok közé tartozik. A vaszkuláris simaizom reaktivitása megszűnik, ami perifériás vazodilatációhoz vezet. A vér a vitális szervek irányából a nem vitális szervek irányába sőtölődik. (13) A kóros vazodilatáció oka

multifaktoriális. Egyik fő oka a megnövekedett nitrogén-monoxid termelés. A nitrogén-monoxidot az L-arginin aminosavból hozza létre a nitrogén-monoxid szintetáz enzim. A nitrogén-monoxid szintetáz három formában van jelen a szervezetben. A neuronális forma, mely a nitrogén-oxidot neurotranszmitterként szintetizálja; a konstitutív, vagy endotéliális alak, mely a bazális termelésért felelős; és az indukálható típus. A septicus sokk során megnövekedett NO szintet az úgynevezett indukálható NOS (iNOS, 2-es típus) okozza. NOS-2 csak akkor expresszálódik, ha a sejtet proinflammatorikus citokin, mikrobiális termék (endotoxin, peptidoglikán, lipoteichoic sav), vagy hipoxiás hatás éri. (14) A szepszis mediátorai, endotoxinok, gyulladáscitokinek, TNF-alfa, IL-1, IF $\gamma$  állat és humán kísérletek során szintén bizonyítottan indukálták az iNOS expresszióját. (15)

Az úgynevezett konstitutív NOS (cNOS) egészségesek esetén az érendotéliumban, egyes renális és miokardiális sejtekben, trombocitákban, endokardiumban található. A homeosztatisz folyamatokban vesz részt alacsony kibocsátással, különösképpen az érkalibernek a véráramláshoz illesztésében. Aktivitását negatív feedback szabályozza. Az iNOS normál körülmények között szignifikáns mennyiségben nincs jelen a szervezetben. Indukciós körülmények között nagy mennyiségű nitrogén-monoxid termelésére képes rendszer, nem szabályozza negatív feedback. (16)

A NO túltermelés hipotenzióhoz és a vaszkulatura vazokonstriktorokkal szembeni hiporeaktivitásához vezet. A katekolaminok perifériás szintje septicus sokkban jelentősen megemelkedik, melyeknek szintje jól korrelál a szepszis súlyosságával. (17)

Egy másik lehetséges mechanizmusa a vazodilatációnak az ATP-szenzitív kálium-csatornák aktivációja az erek simaizomsejtjeiben. Ennek közvetlen aktivátora a laktát-szint emelkedése lehet. A sejtekből kiáramló kálium megakadályozza a calcium beáramlást, ami a vaszkuláris simaizomzat relaxációjához vezet. Ez szintén refrakter változás a vazoaktív hormonhatásra. (18) A prosztaciklin szintén szerepet játszhat a súlyos vazoplégiában. Ez a prosztaglandin az endotél sejtekből szabadul fel endotoxin és gyulladáscitokinek hatására. (19,20)

### **2.2.2 Hipovolémia**

A septicus betegek rendszerint hipovolémiásak. Ennek lehet az oka nyilvánvaló folyadékvesztés, mint a profúz hányás, hasmenés. Nem látható ok lehet a tachipnoé, ileusz, vagy láz. Ezen kívül, mint maga a sokk típus is jelzi, a megnövekedett vaszkuláris permeabilitás miatt a folyadék kiáramlik az érpályából az extravaszkuláris tér irányába. Ennek jele lehet a hemokoncentráció, de ez nem segít a pontos folyadékvesztés megítélésében. Korai septicus sokkban a cardiac outputot gyakran behatárolja a beteg hipovolémiás állapota, az

alacsony preload, mely a kardiális töltőnyomást csökkenti. Ez az úgynevezett hipodinám fázis. Az intravazális folyadék térfogat javításával, folyadék reszuszcitációval a cardiac output ezért javítható, és kialakul a szeptikus sokk hiperdinám fázisa.

### **2.2.3 Kapilláris permeabilitás és endotél károsodás**

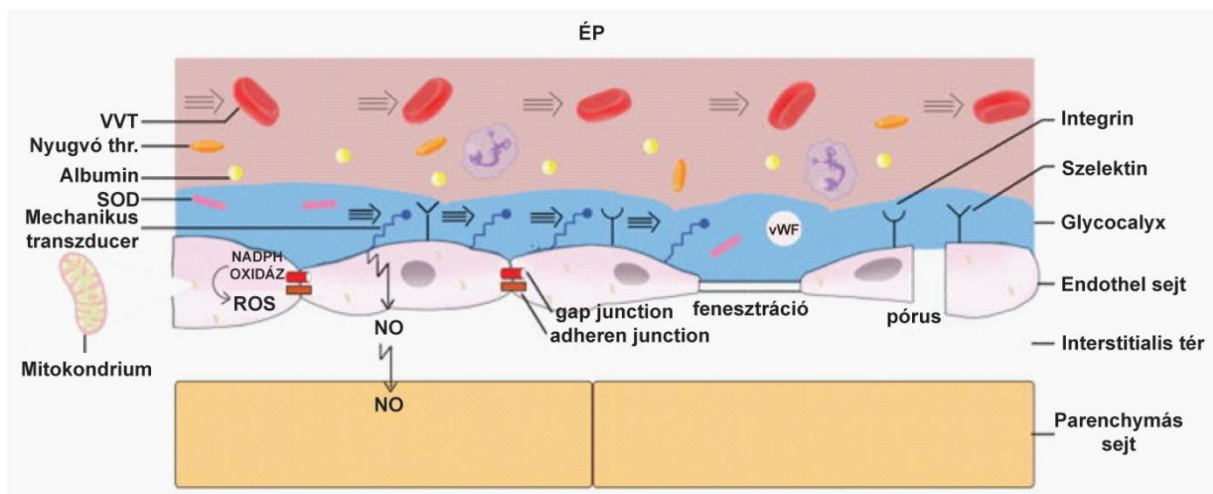
A szepszis súlyos endotelialis sejt diszfunkcióhoz vezet, mely a barrierfunkció, a hemosztázis és az érfal reaktivitás megváltozott működéséhez vezet. Ez központi szerepet játszik a szepszis során kialakuló sokszervi elégtelenségben.

Az endotél képezi a határfelületet a keringő vér és a parenchimális sejtek között. Fiziológias körülmények között az endotél, mint barrier funkcionál, részt vesz a hemosztázis és a vaszkuláris tónus szabályozásában, valamint a transzcelluláris jelátvitelben. Glikokalix borítása számos olyan molekulát tartalmaz, mely részt vesz az érpályában lévő nyíróerő közvetítésében. A vaszkulátúra endotél sejt borítása (ECL) pórusokat és fenesztrációkat tartalmaz. A citoszkeleton és a glikokalix határozza meg az ECL integritását mint barrier és transzporter. A glikokalix az ECL lumenális oldalát fedi. Ez egy több komponensű, negatív felszíni töltésű, javarészt proteoglikán (50-90% heparin-szulfát) és glikoprotein tartalmú, 0.2 - 0.5- $\mu\text{m}$  vastag gél szerű borítás.(21) A bakteriális endotoxinok, hiperglikémia, citokinek és oxidánsok hatására a glikokalix leválhat. (22, 23) A glikokalix számtalan élettani folyamatban játszik közvetítő szerepet, így a hemosztázisban, leukocita és trombocita adhézióban, vaszkuláris barrier funkcióban, a nyíróerő endotéliumra átvitelében, vagy az antiinflamációs és antioxidatív védelemben. Számtalan molekulát tartalmaz, köztük mechanotranszducereket, melyek az intravaszkuláris nyíróerő érzékeléséért és ennek függvényében az indukálható NO termelésért felelősek. A NO molekula egyik fő funkciója a vaszkulatura dilatációja. Itt található számos inaktív molekula, melyek elengedhetetlenek a fiziológias hemosztázis lépéseihöz, és az antioxidotikus folyamatokhoz. Az endotél intra- és transzcelluláris elemei mitokondriumokat tartalmaznak, melyek hozzájárulnak a reaktív oxigén gyök (ROS) termeléshez és az oxidatív foszforilációhoz.

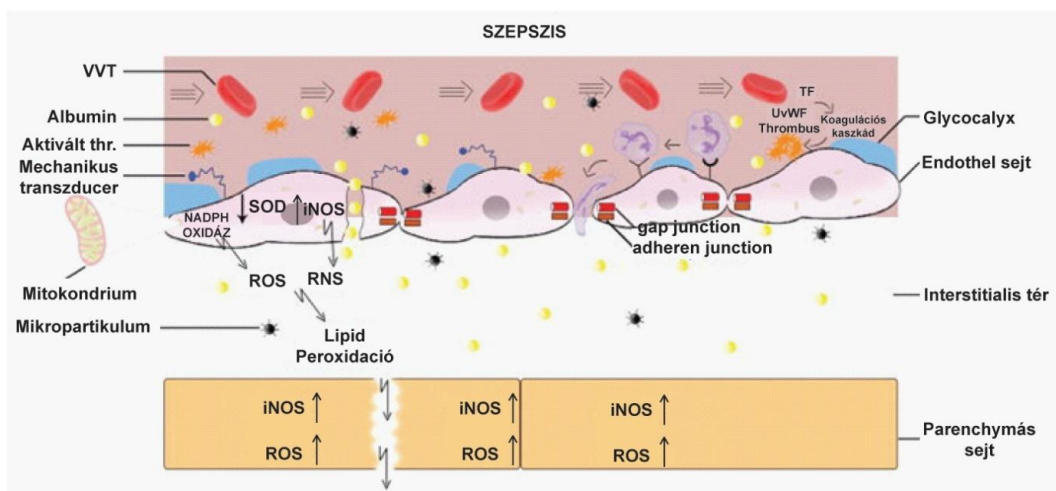
A glikokalix fő károsítói az oxigén szabadgyökök, de egyéb mediátorok, mint a tumor nekrozis faktor alfa, vagy a heparanase is. Hatásukra károsodik a barrierfunkció, mely ödéma kialakulásához vezet, ami szintén kulcsszerepet játszik a szepszis okozta sokszervi elégtelenségben. Adhézios molekulák kerülnek a felszínre a károsodás kapcsán, köztük a szelektinek és integrinek, melyek az aktivált leukociták trapping-jét és transzmigrációját okozzák. A glikokalix károsodása csökkenti a véráram indukálta nyíróerő nagyságának érzékelését és átvitelét az endotéliumra, melynek hatására nitrogén-oxidul és endotelin

szabadul fel. A regionális vaszkuláris kontroll tovább romolhat a nyíróerő érzékelésének elvesztésével, mivel ezek a jelek továbbítódnának a proximális vaszkuláris struktúrákhoz is intraendoteliális gap junction-ök, által, (24) ezzel a vazogén kontroll ellenirányú változását okozva. Tovább károsítja a mikrovaszkuláris perfúziót a neutrofil sejtek extracelluláris trap-je (NET), mely az endotél további károsodásához vezet. (25) Aktiválódnak a hemosztázisban résztvevő molekulák is, mely prokoaguláns állapotot hoz létre. A ROS/RNS rendszer kiváltotta lipidperoxidáció a tight-junction-ök felbomlásához vezet, mely direkt endoteliális membránkárosodáshoz, ezzel a barrierfunkció elvesztéséhez vezet. (3.,4.ábra)

3. ábra: Az endotél egészséges személyek esetében.(26)



4. ábra: Az endotél szepszis során létrejövő elváltozásai (26)



#### 2.2.4 Szepszis és hemosztázis

A szepszis során nem csak szisztémás gyulladás, hanem egy szabályozatlan hemosztázis is létrejön. A gyulladási folyamatok és a koagulációs zavarok nem választhatóak szét egymástól a szepszis során, pozitív visszacsatolással kölcsönösen aktiválják egymást. Az akut, szepsziszhez társult koagulopátia (CAS) magába foglalja a tromboembóliától a fibrin depozítumokig terjedő patológias elváltozások széles skáláját, súlyos esetben akár disszeminált intravaszkuláris koagulopátia (DIC) is kialakulhat mind trombózis, mind diffúz vérzés formájában. (27) A hemosztatikus folyamatban részt vesz az endotélium, oldékony plazma molekulák, trombociták, leukociták. Ezeknek nem csak a pro- és antikoaguláció közötti egyensúly fenntartásában van szerepük, hanem irányítják a közvetlen ér-sérülés területén a fibrin és trombocita alvadék kialakulását is. Állatkísérletekben, ahol endotoxémia által váltottak ki szeptikus állapotot, kimutatták, hogy vaszkuláris fibrin depozítumok alakultak ki, melyek szerveletelenséghez vezettek. (28, 29) Klinikai vizsgálatok bizonyították, hogy ha a szepszis során DIC alakult ki, ez jelentősen növelte a betegek mortalitását. (30) A gazdaszervezet fertőzésekre adott gyulladási válaszreakciója gyorsan aktiválja a prokoagulációs útvonalat. Endotoxin és tumor nekrozis faktor-alfa kombinációjával végzett állatkísérletek kapcsán, már a beadást követő néhány órán belül trombin képződés volt látható. (31) Fiziológias körülmények között az érintetlen glikokalix taszítja a trombocitákat és antikoagulánsként funkcionál, köszönhetően a bőséges heparin-szulfatáz készletének. Az endotélium expresszál és termel olyan molekulákat, melyek kulcsszereplők a hemosztázis szabályozásában. Ilyen a von Willebrand faktor (VWF), a szöveti faktor (TF) és plazminogén-aktivátor inhibitor type-1 (PAI-1). A VWF a sérült érfal területén iniciálja a trombocita aggregációt a felszínre kerülő endoteliális kollagén között egy hidat képezve a trombocita-glikoprotein komplexen (GPIb-IX) keresztül.

Az alvadási kaskád extrinsic útvonala a TF (III. faktor) által aktiválódik. Élettani körülmények között a szubendoteliális szövetben található, fiziológias körülmények között az endotélium megakadályozza a kontaktust a szöveti faktor és a plazma prokoagulánsai között. Ha sérül a vaszkulátúra, felszínre kerül a szöveti faktor, kötődik a VIIa faktoral, valamint kalciummal, és elősegíti a X-es faktor aktivációját. (32) A szepszis során kialakuló prokoaguláns állapot alapja a szöveti faktor interakciója a felszabaduló citokinekkal. A TF expresszió a CAS során alapvető folyamat. A szöveti faktor expressziója fokozza a proinflammatorikus citokinek, mint a TNF, IL-1, IL-6 termelését és jelentős szerepet játszik a fiziológias antikoagulációs folyamatok gátlásában és az endotél további károsodásában.

Számos sejt és szövet képes TF expressziójára, többek között az endoteliális sejtek, mononukleáris fagociták – monociták, makrofágok; valamint a tüdő, vese és a cerebrális asztrociták.

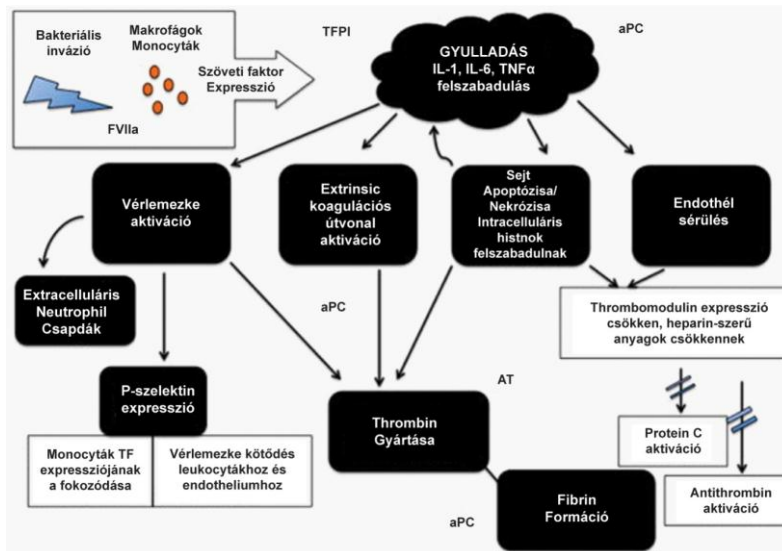
A következő tényező a trombocita-aktiváló faktor (PAF), mely a gyulladás következtében közvetlenül felszabadul. (33) A trombocita aktiváció hatására a trombocita p-szelektint expresszál, mely megnöveli a monociták TF felszabadítását, és a trombocita adhéziót a leukocitákhoz és az endotéliumhoz. (34, 35) Az adhézió után a trombociták felszínként szolgálnak a trombin képződéséhez és más koagulációs faktorok celluláris jelátviteléhez. (36) A CAS során nemcsak a koagulációs oldal aktiválódik, hanem zavart szenved az antikoaguláns oldal működése is. Három fő endogén antikoagulációért felelős faktor működése szenved zavart, az aktivált protein C, a szöveti faktor pathway inhibitor és az antitrombin, mely összességében hiperkoagulopátiához vezet. (37) Fiziológias körülmények között a szöveti faktor pathway inhibitor (TFPI) korai down-regulátora az alvadási folyamatoknak. A szöveti faktor és a VIIa faktor kölcsönhatása aktiválja. Aktiváció után megköti és gátolja a Xa faktort, majd a TFPI-FXa komplex kapcsolódik a TF-FVIIa komplexszel, ezzel akadályozva a korai koagulációs kaszkád amplifikációját. Szepszis során a TFPI egyrészt elhasználódik, másrészt degradálódik, mely prokoaguláns állapot kialakulásához vezet.

A protein C hatékony antikoaguláns, de ezen felül profibrinolitikus és antiinflammatorikus hatással is rendelkezik. A protein C (FXIX) rendszerben a trombin antikoagulánsként működik. Ez az útvonal akkor indul be, ha a trombin és a trombomodulin aktiválódik az érfal endotéliumán. A trombomodulin-trombin komplex aktiválja a protein C-t, mely folyamatot az endoteliális protein C receptor (EPCR) és a protein S, mint kofaktor, megsokszoroz. (38) Az aktív protein C proteolízissel hasítja az V és VII faktort, melyek a trombin kialakulásához elengedhetetlenek. A protein C mennyisége a szepszis során jelentősen csökken; egyrészt degradálódik vagy elhasználódik, valamint a neutrofil sejtek által termelt elasztáz hatására tovább csökken a plazmakoncentrációja. (39) Másrészt a gyulladásos citokinek, TNF- $\alpha$ , IL-1 és IL-6 minimálisra redukálják a trombomodulin expresszióját. (40) További ok lehet az EPCR eltűnése, mely által nem valósul meg a protein C augmentációja. (41)

Az antitrombin a Xa faktor működését gátolja, és a trombin, a IXa faktor akár csak a VIIa faktor TF-hoz kötődését. A trombin endogén antagonistája, aktivitását a vaszkuláris típusú heparin szerű proteoglikánok megsokszorozzák. (42) A szepszis súlyosságával csökken az antitrombin szintézise, a felhasználása viszont fokozódik a folyamatosan termelődő trombin

formációk miatt. (43) Tovább csökkenti a mennyiségét az, hogy az endotél felszínén lévő heparin-szerű glükózaminoglikánok mennyiségét a proinflammatorikus citokinek redukálják.

5. ábra: Sepszis és koaguláció (44)



A sepszis során fennálló folyamatos inflammáció a hemosztázist protrombotikus és antifibrinolítikus állapot irányába tolja, mely disszeminált intravaszkuláris trombozishoz, a szervek perfúziós, isémiás károsodásához és végezetül többszervi diszfunkciós szindrómához (multi organ dysfunction syndrome-MODS) vezet. Ez, fenotípusát tekintve lehet hemolítikus urémiás szindróma (HUS), trombotikus trombocitopéniás purpura, trombocitopéniával asszociát többszervi elégtelenség (thrombocytopenia-associated multiple organ failure-TAMOF), vagy disszeminált intravaszkuláris koagulopátia (DIC).

Egészséges önkénteseken végzett kísérlet során figyelték meg, hogy endotoxin infúziója gyorsan és előreláthatóan változtatta meg a koagulációs rendszert. Az endotoxin bevitelét követő 120 percen belül a gyulladási markerek, főleg az IL-6 és TNF mennyisége megemelkedett, amellyel párhuzamosan nőtt a plazminogén aktivátorok koncentrációja, ami egyértelműen endotél aktivációra utalt. 150 percen belül ezt ellensúlyozta a folyamatos és egyre nagyobb PAI koncentráció emelkedése, mely az alvadék tartósságát biztosítja. (45,46) A csökkent fibrinolízisért tehető felelőssé a későbbiekben a az APC redukciója, amit a trombomodulin csökkent hozzáférése okoz. A kevesebb mennyiségű APC kisebb mértékben gátolja a PAI-t, és ez erősíti az alvadék stabilitását. (47)

A trombin indukálja a trombin-aktiválható fibrinolízis inhibitor (TAFI). Ez az enzim egy proteáz, mely csökkenti az alvadék permeabilitását és növeli a szilárdságát. A sepszis során

ilyen jellegű, fibrinolízisre rezisztens alvadékok keletkeznek. Ennek hátterében állhat a TAFI működése illetve a polifoszfát szekréció, mely rontja a TPA hatékonyságát. (48, 49) Ezzel összefüggésben a neutrofil elasztáz károsítja a fibrinolitikus proteázt, mely még tovább növeli az alvadék életidejét. Meningococcus fertőzés és szepszis esetén a magas TAFI szint jól korrelál a betegség súlyosságával és a mortalitással is. (50) A szepszis során a TFP és a protein C funkciója is károsodik, és a fibrinolízis útvonalai is alul működnek a PAI-1 megnövekedett expressziója miatt. Ez végső soron fibrin-gazdag trombusok kialakulásához vezet, mely a DIC során is megfigyelhető. Ez a septicus betegek akár 25-50%-ban is előfordulhat. (26)

### **2.2.5 A kapilláris diszfunkció okai szepszisben**

A kapilláris hálózat feladata az oxigén és különböző tápanyagok szállítása a szövetekhez. Működését befolyásolja a kapilláris hálózat eloszlása egyes szövetekben, a kapillárisok aktuális állapotának (dilatált, vagy összehúzódott), a kapillárisok közötti távolságnak és hemoreológiai faktoroknak függvényében. A szepszist jelenleg mikrokeringési rendellenességnek tekintjük. Amellett, hogy lecsökken a kapillárisok denzitása, megnövekszik a heterogenitásuk, és lesznek elzáródott, vagy átmenetileg nem keringő kapillárisok is az érpályában. (51) Az arteriolák a vazokonstriktorokra és vazodilatátorokra egyaránt hiporeaktívak, annak ellenére, hogy az endogén katekolamin szint jelentősen emelkedett. (52) A mikrokeringési zavarhoz vezető tényezők komplexek. Számos mechanizmus hat a pre-kapilláris, kapilláris vagy poszt-kapilláris mikrocirkuláció területén. Azok a faktorok, melyek a mikro-reológiai faktorok rosszabodásához vezetnek, nem specifikusak. A vörösvérsejt deformabilitás megváltozásának oka a lokális metabolitok koncentrációjának és sav-bázis háztartásnak (pH, laktát koncentráció, oxigenizáció, mikro-környezet ozmolaritása) a megváltozása; az ATP szint csökkenés és a következményes aktív pumpa mechanizmusok sérülése egy olyan állapot, mely hozzájárul a felszín-térfogat arány megváltozásához, csak úgy, mint a reaktív oxigén gyökök. (53) A vörösvérsejtek mechanikusan is sérülhetnek trombusok, mikrotrombusok (DIC) jelenlétében, vagy az aktív terápiának köszönhetően, mint a toxinok direkt eltávolítása a véráramból magas térfogatú hemofiltrációval.

Fokozott vörösvérsejt aggregáció gyakori megfigyelés manifeszt szepszis esetén. A legtöbb, a szepszis kialakulását vizsgáló klinikai és kísérletes tanulmány beszámol megnövekedett fibrinogén koncentrációról és plazmaviszkozitásról, mely markánsan rontja a vörösvérsejt deformabilitást és fokozza az eritrocita aggregációt. A fibrinogén koncentráció emelkedés az egyik fő oka az eritrocita aggregáció fokozódásának. Továbbá a szabad gyök hatás, a felszíni

glikokalix ultrastrukturális változása, csakúgy, mint a sejt morfológiai változása szintén befolyásolhatja az aggregációt mind mértékében, mind kinetikájában.(54)

A neutrofilek deformabilitása szintén csökken és aggregációjuk fokozódik szepszisben és szeptikus sokkban. Az adherálódott leukocyták megváltoztatják a lokális áramlási viszonyokat és a rigid sejtek elzárják a mikropillárisokat. (55,56) Továbbá a megváltozott reológia a leukociták marginációjához vezet; a megnövekedett eritrocita aggregáció fokozza az axialis áramlást, kiszélesítve a sejtektől megfosztott réteget (Poiseuille-zóna) az endothel felszínének környezetében, és így az áramlási mintázat facilitálja a leukociták kipányvázását és marginációját.

A kapilláris perfúziót általában a „kapilláris hajtó nyomással” , a pre- és poszkapilláris szfinkterek aktuális állapotával jellemzik. A hipovolémiás állapotot szepszis során két fő faktornak tulajdonítják: 1. perifériás vazodilatáció miatt nagy mennyiségű folyadék raktározódik a dilatált erekben; 2. a capillary leak, mely miatt nagy mennyiségű folyadék lép ki az intravaszkuláris térből ezáltal intersticiális folyadék akkumulációt okozva. (57,58,59) A kapilláris leak-ről azt feltételezik, hogy részben a nagy mennyiségű endoteliális NO termelés következménye. Kísérleti megfigyelések során arra a következtetésre jutottak, hogy a NO magas szintje csökkenti a ciklikus nyitás-zárás funkciót az endoteliális tigh-junctionben, és hogy ez a kulcsfontosságú a capillary-leakege kialakulása során. (60) Ehhez hozzájárul az is, hogy a leukociták és komplement rendszer enzimeit szintén károsítják a kapilláris fal integritását. (61)

Kísérleti megfigyelésekre alapozva a prekapilláris szfinkterek döntően a gram pozitív baktériumok okozta szepszisben dilatáltak, míg gram negatív kórokozók esetén ez a fenomén a poszkapilláris szfinkterek szintjén valósul meg. A kapilláris perfúziót önmagában is befolyásolja az aktuális kórokozó szeptikus folyamat során. (62,63)

Számításba véve, hogy a szisztémás vérnyomás szintén befolyásolja a kapilláris hajtó nyomást, a súlyos szepszisben kialakuló alacsony szisztémás vérnyomás alacsony kapilláris hajtónyomást okoz. Egy lokális szabályozó mechanizmus miatt, ha a hajtónyomás csökken, a kapilláris szfinkterek tovább dilatálnak a lokális áramlás javítása érdekében. Sajnos a koagulációs rendszer szintén aktiválódik szepszisben, mely mikrotrombusok kialakulásához vezet, ezzel tovább rontva a lokális oxigén és tápanyag transzportot. (61,64)

### **2.3.1 Szeptikus állapotmodellek, általános megfontolások**

Annak ellenére, hogy szepszis patomechanizmusának pontos megismerésére és terápiás lehetőségek fejlesztésére világszerte jelentős erőforrásokat mozgósítanak, az elmúlt évtizedekben jelentős, a kimenetelt döntően meghatározó előrelépés nem történt. Mint minden más orvosi területen, a szepszis kutatásban is több lehetőség adott. Ismerteink bővítésére végezhetünk *in silico*, *in vitro*, *in vivo*, vagy humán klinikai vizsgálatokat. Ahhoz, hogy az eredmények bizonyító értékűek legyenek, ismernünk kell kísérleti módszer gyengeségeit és erősségeit is. A szepszis kutatás bonyolult, tekintve az összetett patomechanizmust, az érintett populáció heterogenitását, az egyértelmű diagnosztikus markerek hiányát, a módszertani és etikai megszorításokat. Egy lehetőség a szepszis mechanizmusának megismerésére és új terápiás módszerek fejlesztésére a humán szepszis modellezése állatkísérletek során, ami aláhúzza az elérhető és értékes állatmodellek kifejlesztésének fontosságát. A jelenleg alkalmazott állatmodelleken végzett kísérletek eredményei azonban sajnos sokszor félrevezetőek lehetnek. A tökéletes szeptikus állatmodell hiánya egy sarkalatos pontja és gátja lehet a terápiára irányuló kutatásoknak.

Az ideális szeptikus állatmodell a következő feltételeknek kell megfeleljen:

1. Képes előre megjósolni a kísérlet pozitív és negatív végkimenetelét is
2. Olcsó
3. Reprodukálható (saját és más laboratóriumban is)
4. Humánus az állatokkal szemben és teljes mértékben tiszteletben tartja a 3Rs feltételeit
5. Biztosítja a mortalitási végpontot
6. Hemodinamikai, hematológiai, biokémiai jellemzői megfelelnek a humán szepszisben megfigyelteknek (66)

### **2.3.2 A leggyakrabban alkalmazott szeptikus kísérleti állatmodellek**

Ahhoz, hogy egy kísérleti állatmodell alkalmas legyen a szepszis vizsgálatára, meg kell felelnie bizonyos validitási kritériumoknak. A szeptikus állatmodellek központi célja az, hogy tökéletesen reprodukálják a humán szepszis klinikai lefolyását. A klinikai mintázat alapján a szepszis általában két fázisra osztható. A korai fázisban (első szakasz), egy hiperdinám keringési állapot alakul ki. Ekkor a szisztémás vaszkuláris rezisztencia csökkeni kezd, melyet a cardiac output emelkedése kompenzál. A szeptikus folyamat progressziójával a cardiac output csökkeni kezd, de a vaszkuláris rezisztencia változatlan marad, amely hemodinamikai elégtelenséghez és végeredményben sokk kialakulásához vezet. Ez az alacsony cardiac output

és alacsony szisztémás vaszkuláris rezisztencia fémjelzi a szeptikus sokkot, a szepszis késői (második) fázisát. (4. táblázat)

4. táblázat: A szepszis korai és késői fázisának jellegzetességei ((69,70,71)

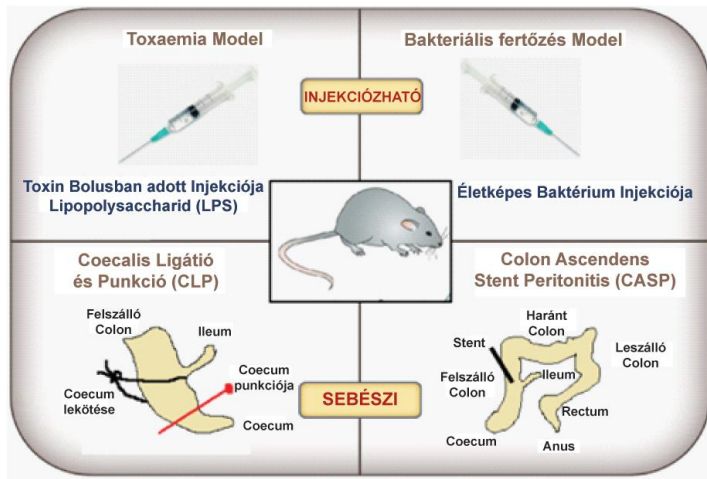
Szepszis korai fázisa	Szepszis késői fázisa
<p>Hiperdinám kardiovaszkuláris állapot:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- emelkedett cardiac output</li> <li>- alacsony vaszkuláris rezisztencia</li> <li>- normotenzió</li> </ul>	<p>Hipodinám kardiovaszkuláris állapot:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- alacsony cardiac output</li> <li>- alacsony szisztémás vaszkuláris rezisztencia</li> <li>- hipotenzió</li> </ul>
<p>Hipermetabolikus állapot:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- megnövekedett glükoneogenesis,</li> <li>- hiperinzulinémia</li> </ul>	<p>Hipometabolikus állapot:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- hipoinzulinémia</li> <li>- hipoglikémia</li> </ul>
<p>A humán szepszis egyéb jellemzői, melyeket jelenleg nem használnak az állatmodellek validálására: 1. specifikus sejtpopulációk apoptózisa (epiteliális, endoteliális, dendrikus sejtek) 2. Immunválasz ( késői-fázis immunszuppresszió )</p>	

A szeptikus állatmodell relevanciájának meghatározásához elengedhetetlen a hemodinamikai monitorozás, mely lehetővé teszi mind a cardiac output, mind a vaszkuláris rezisztencia mérését. A hemodinamikai monitorozás céljaira a klinikai gyakorlatban leggyakrabban használt invazív technikák a PiCCO, vagy a pulmonáris katéter (Schwan-Ganz katéter) alapú hemodinamikai mérés. Azok a modellek, melyeknek a lefolyása nem követi a humán szepszis két fázisát, és nem utánozzák a jellegzetes hemodinamikai változásokat, nem minden esetben tekinthetők klinikailag relevánsnak. (67,68)

Számos olyan kísérleti modell ismeretes, melyek képesek a humán szepszis során megfigyelt klinikai mintázatot és laborparaméter változásokat modellezni. Ezek eltérhetnek a kísérleti állat fajában, korában, nemében, az infekció módjában, a használt patogénben. Rágcsálók esetében a szepszis kiváltására használt kísérleti módszereket két nagy csoportra oszthatjuk: sebészi és nem sebészi infekció típusra. A nem sebészi úton létrehozott infekciók csoportjába tartozik az endotoxin vagy toxémia modell és a bakteriális infekció modell. A sebészi úton kiváltott szeptikus állatmodelleknek két típusa van, a cecalis ligáció és punkciós modell

(CLP), valamint a colon ascendens stent peritonitis modell (CASP). A rágcsálókban leggyakrabban alkalmazott szepszis modelleket a 6. ábrán foglaltuk össze.

6. ábra: A leggyakrabban alkalmazott rágcsáló szepszis modellek(72)

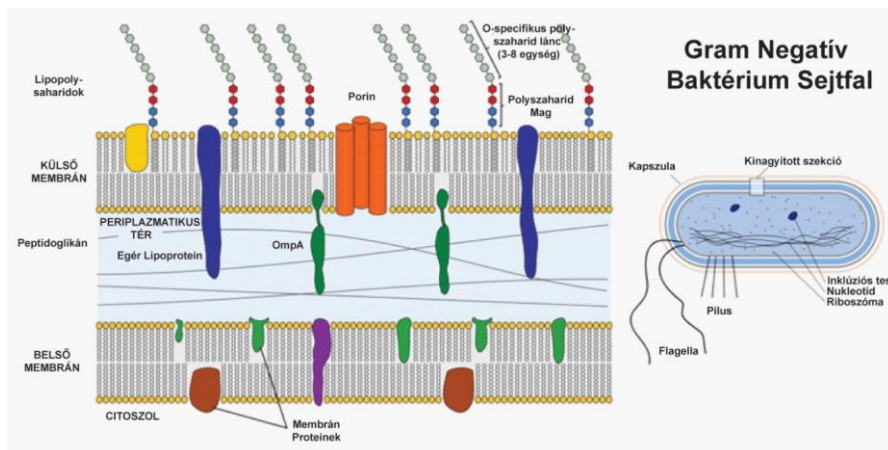


Gyakran használt egér szepszis modellek, injekciózható toxaemia és bakteriális fertőzés modellek, sebészi coecum ligáció és punkció (CLP) és colon ascendens stent peritonitis (CASP) modellek.

### 2.3.2.1 Endotoxin/Toxémia modell

Az endotoxin szisztémás adminisztrációja egyike a szepszis modellezés leggyakrabban alkalmazott lehetőségeinek. Az endotoxin egy olyan lipopolysaccharid komplex, amely minden Gram negatív baktérium sejtfalában megtalálható. A Gram-negatív baktériumok sejtfa komplex felépítésű. (7.ábra)

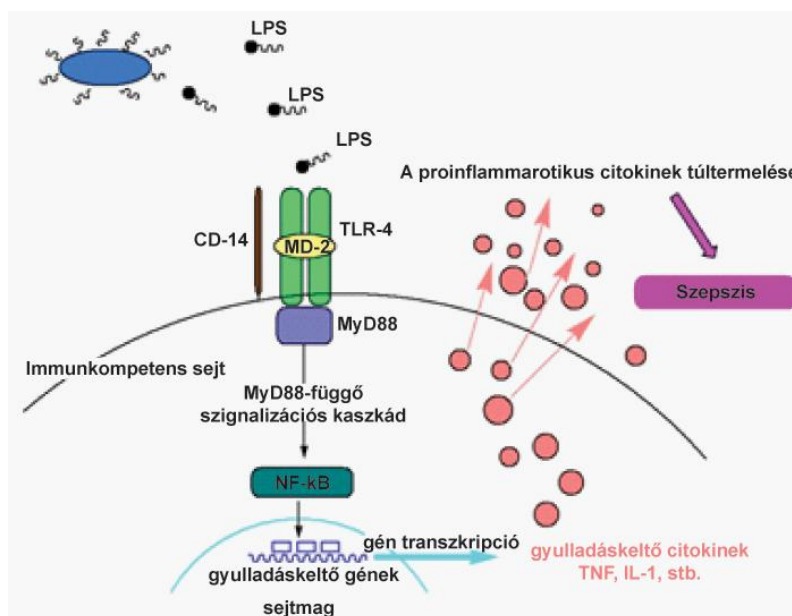
7. ábra: A Gram-negatív baktériumok komplex sejtfa



Az endotoxin, vagy lipopoliszacharid (LPS) kizárólag a külső membrán külső felszínén található. Funkciója az, hogy hidrofób akadályt képezzen, amely meggátolja a baktérium számára ártalmas anyagok, mint epesavak, emésztő enzimek, antibiotikumok behatolását. Ezen kívül lehetővé teszi, hogy a baktérium elkerülje a gazdaszervezet komplementjeit, lizozim és kation fehérjéit. A LPS szabad formában a baktérium autolízise után fordul elő, amit előidézhetnek antibiotikumok, esszenciális tápanyag hiány, sejtmembrán toxin expozíció, vagy gyors növekedés. Ezek az állapotok gyakran megfigyelhetők a szepszis folyamat során.

Az LPS molekulát a gazdaszervezet immunsejtjeinek felszínén lévő toll-like receptor-4 (TLR-4) ismeri fel. Ebben közreműködik a CD14 és MD2 járulékos fehérje is. A TLR-4 LPS általi stimulációja triggereli a MyD88 (myeloid differentiation primary response protein) proteinnel való reakcióját. A MyD88 dependens szignál útvonalak aktiválják a nuklear-faktor kB-t (NF-kB), mely proinflammatorikus mediátorok génexpresszióját szabályozza. Ezen receptorok túlzott stimulációja egy kontrollvesztett inflamációs folyamathoz, szepszishoz vezethet. (8. ábra)

8. ábra: Az LPS, mint szepszis induktor (75)



A Gram-negatív szepszis és endotoxin sokk során az LPS molekula nagy mennyiségben jelenik meg a véráramban. Ez vagy a szisztémás bakteriális infekció során a patogén

baktériumokból, vagy a bél lumenében élő normál baktérium flórából szabadul fel a bélfal intaktságának megszűnése esetén. Kritikus állapotú betegekben a növekvő endotoxin szérumszint koncentráció jelzi a szepszis kialakulását és jól korrelál a betegség súlyosságával és letalitásával. (76,77)

A szepszis vizsgálatára az endotoxin modellt egyszerű kivitelezhetősége miatt széles körben alkalmazzák. Az LPS adminisztrációja a leggyakrabban intravénásan történik, de használható intraperitoneálisan vagy intratracheálisan is. A proinflammatorikus folyamat a beadást követően azonnal megkezdődik és rövid ideig tart. A kísérletek során alkalmazott állatfajok szenzitivitása az LPS-re eltérő, de az élettani és immunológiai változások is különbözőek lehetnek. Az emberi szervezet nagyon érzékenyen reagál az LPS molekula alkalmazására. Egészséges önkéntesek esetében 2-4 ng/tskg LPS már egyértelmű septicus tüneteket produkál. Copeland és munkacsoportja által végzett vizsgálat során az egerek és humán önkéntesek érzékenységet hasonlították össze. A vizsgálat során *Escherichia coli* O113 endotoxint injektáltak egészséges felnőtt önkéntesekbe intravénásan, valamint hím egerekbe intraperitoneálisan akkora dózisban, ami a plazmában megközelítőleg 1,000 pg/ml IL-6 koncentrációt indukált 2 órával a beadás után. A humán alanyok esetében az endotoxin dózisa 2 ng/kg volt, míg az egerek esetében 500 ng/kg. Az endotoxin a humán kísérleti alanyokban gyors élettani választ váltott ki, magas lázzal, tachikardiával és hipotenzióval, de az egerekben ezek a tünetek nem jelentkeztek. Egerek és humán alanyok esetén is megfigyeltek limfopéniát 4 óra múlva, ez azonban 24 óra után megszűnt. Az IL-6 és TNF csúcskoncentrációját a beadást követően 2 óra múlva érte el, és 4-6 óra múlva tért vissza az alapszintre. Az egerekben magasabb koncentrációban termelődött a CXCL kemokin, de mindkét csoportban 2 óra múlva érte el a legmagasabb szérumszintet. (78) A vizsgálat arra is rámutatott, hogy az egerek esetében magasabb endotoxin dózis szükséges a szepszisre jellemző eltérések létrehozására, de számos hasonlóság is megfigyelhető volt az egér és humán endotoxin modell között. Nagy dózisu LPS injekció emlősállatok esetén eltérő hemodinamikai választ produkálhat, mint humán szepszis esetén. Elmarad a hipo-és hipodinám fázis, helyette egy fázisú, rapid kardiovaszkuláris összeomlást figyeltek meg, ami megfelel a septicus sokk késői hemodinamikai válaszának. 40mg/kg (40 millió ng/kg) LPS injekció (79) patkányok esetén, vagy 5 mg/kg (5 millió ng/kg) nyulak esetében (80) hipodinám keringést váltott ki jelentős cardiac output csökkenéssel, keringésösszeomlással és végezetül halállal. Ugyanakkor alacsonyabb dózisu LPS 0,1 mg/kg (100ezer ng/kg) dózisban patkányokban (81), vagy 1-3 ug/kg (1000-3000 ng/kg) dózisban nyulakon (82) korai cardiac output emelkedést és hiperdinám keringést provokált. A rágcsálók és a majmok, leginkább a pávián rezisztensek az

LPS hatásaira, ezzel szemben pl. a juhok érzékenysége igen magas. Alacsony dózisú LPS (0,5-0,75 ug/kg – 500-750 ng/kg) (83,84) alkalmazása juhokban kétfázisú hemodinamikai választ provokál. Kezdetben csökken a cardiac output, súlyos pulmonáris hipertenzió és hipoxémia alakul ki. Pár óra elteltével a cardiac output megemelkedik, és megnő a tüdőkapillárisok permeabilitása. (85)

Ha általánosságban jellemezzük a bólus injekció használatával kiváltott endotoxikózis immunpatológiáját, akkor egy túlméretezett veleszületett immunválaszt figyelhetünk meg, a gyulladásos citokinek központi szerepével. Ezek alapján jól látható, hogy a bólus LPS injekcióval kiváltott endotoxémia típusú állatmodellek hemodinamikai jellegzetességei nagy fokban dózis- és gazdaszervezet függőek, és nem utánozzák megfelelően a hagyományos értelemben vett septicus sokk modellt. Ráadásul állatok esetében a citokin válasz korábban jelentkezik és erőteljesebb, de rövidebb ideig tart. Azért, hogy az állatkísérleteket minél inkább közelíteni tudják a humán sepszisben megfigyelttel, kifejlesztették az LPS infúziós modellt, ahol az endotoxin folyamatos adagolása mellett létrehozható volt a sepszis hiperdinám fázisa is.(76)

Nagy fokban limitálja az endotoxin modell használatát az a tény, hogy az egerek relatíve rezisztensek az LPS-ra, és nagy dózis alkalmazására van szükség a sokk kiváltásához. Ennek a rezisztenciának az oka még nem teljesen tisztázott, de Warren és munkatársai felfedeztek néhány olyan faktort, melyek jelen vannak a rágcsálók szérumban, viszont hiányoznak a humán szérumból. (88) Ilyen faktor lehet a hemopexin, ami egy vaskötő akut fázis protein. Ezek a faktorok képesek lehetnek a proinflammatorikus citokinek szuppressziójára. (89) Egyes egerek szenzitizálhatóak D-galaktózamin co-injekciójával, mely megnöveli a hepatociták szenzitivitását a TNF mediálta apoptózisra. (90) TNF receptor p55 deficiens egerek ugyanakkor rezisztensek maradnak a LPS – D-galaktózamin indukálta septicus sokkra, de rövid idő alatt elpusztulnak nagy dózisú LPS hatására.(91,92) Egerek, amelyekből hiányzik a makrofág migratory inhibition factor (MIF), vagy az intracelluláris cell adhesion molecule-1 (ICAM1) túlélnek a nagy dózisú LPS injekciót, de ugyanolyan szenzitívek a LPS – D-galaktózamin kombinációra, mint a vad típusú egerek.(93,94)

#### 2.3.2.2 Bakteriális infekció/ bakterémia modell

A bakteriális infekció modell kifejezés arra utal, hogy élő baktériumokat injektálnak a kísérleti állatokba, melyek a gazdaszervezetben immunválaszt váltanak ki. A modell számos ponton eltér a sepszis mintázatától, de betekintést adhat a gazdaszervezet patogének elleni reakciójának lezajlásába. A baktériumok több típusát használják ehhez a modellhez, az egyik

leggyakoribb a Gram-negatív *E. coli*. A bakteriális infekció modellt használó kísérletek különbözhetnek a használt baktérium fajában, a törzsben, a dózisban, a használt kísérleti állatban, a bevitel frekvenciájában, és idejében, lokalizációjában, a kísérlet ideje alatt végzett reszuszcitáció módjában. Ez alapján láthatjuk, hogy a kísérleti modellek nagyon variábilisak, és ez befolyásolja az egyes vizsgálatokban a kimenetelt és a kísérletes szepszis lefolyását.

Nagy dózisú baktérium inokulációja nem típusosan kolonizál és replikálódik a gazdaszervezetben, a komplement rendszer gyors lízisét követően, inkább egy endotoxikózis jellegű reakció alakul ki, mint valódi infekciós modell. (95) Patkányokban  $4-5 \times 10^8$  E. coli dózis átmeneti hiperdinám állapotot vált ki emelkedő cardiac index-szel, alacsony szisztémás vaszkuláris rezisztenciával és hipotenzióval. Magasabb dózis, pl.  $12-15 \times 10^8$  csíraszámú E. coli alkalmazása kétfázisú választ provokál: először hiperdinám állapot alakul ki magas cardiac index-szel és csökkenő SVR-val, majd a későbbi fázisban hipodinám keringés dominál alacsony CI-szel, magas SVR-val. (96) Nagyobb emlősállatokon végzett kísérletek során általában magas csíraszámú baktérium szuszpenziót használnak. Rágcsálókba intravénásan injektált  $4-10 \times 10^{10}$  CFU/kg kifejezetten erős citokin termelést provokált a koagulációs és fibrinolitikus rendszer teljes zavarával, kardiovaszkuláris összeomlással és végezetül halállal. (9,98,99)

Az exogén bakteriális infekciós modell esetén nagy a jelentősége a megfelelően megválasztott baktérium törzsnek. Vizsgálatok demonstrálták, hogy a gazdaszervezet védekezőképességét az INF-gamma eltérően módosítja különböző törzsek esetén. *Streptococcus pneumoniae* és *Pseudomonas aeruginosa* infekció esetén elősegítette a gazdaszervezet túlélését, míg *E. coli* és *Staphylococcus aureus* fertőzés esetén fokozta a gazdaszervezet pusztulását. (100,101,102,103,104) Az eltérő baktérium törzsek okozta különböző kórlefutást bakteriális infekciós modellen Dehring és munkatársai demonstrálták malacokkal végzett kísérletükben. 15-30 kg-os hím malacok felületes anesztéziája során az állatokat intubálták, majd spontán légzés mellett végezték a kísérletet. Swan-Ganz katétert használtak a hemodinamikai monitorozásra. Egyenlő csíraszámú Gram-negatív (*E. coli*, *P. aeruginosa*) valamint Gram pozitív (*S. aureus*)  $1 \times 10^9$  organizmus/20 kg/perc folyamatos alkalmazása történt 4 órán keresztül intravénás úton. A *S. aureus* csoportba tartozó állatok magas pulmonáris bakteriális clearance-t tartottak fenn pulmonáris hipertenzióval, normális artériás parciális oxigénnyomással, a boncolás során normál tüdőszövet volt megfigyelhető. Az *E. coli* és *P. aeruginosa* csoportba tartozó állatokban szisztémás hipotenzió, pulmonáris hipertenzió, magas pulmonáris vaszkuláris rezisztencia, hipoxia és csökkent pulmonáris clearance fejlődött ki a

folyamat során, a tüdőszövetet a boncolás során ödéma és kongeszció jellemezte. Ezek az eredmények alátámasztották, hogy a bakteriális infekció modell alkalmas lehet a sepszis indukálta akut légzési elégtelenség demonstrálására malacokban.(105)

Itt kell említést tennünk a Lagoa és munkacsoportja által kutyákon végzett érdekes kísérletéről. Anesztetizált és gépi lélegeztett kutyáknak intravénásan adtak élő *E. coli* baktériumot  $6 \times 10^9$  CFU/ml/kg dózisban, 15 perc alatt. Ezek után két csoportot hoztak létre, a kontroll és folyadék reszuszcitációs (32 ml/kg/óra Ringer-laktát) csoportot. A megfigyelési idő alatt követték a cardiac indexet, a mezenteriális véráramlást, az artériás középnyomást, a szisztémás és mezenteriális oxigenizációs paramétereket, a szérum laktát szintet, a gyomornyálkahártya szén-dioxid parciális nyomását. Az *E. coli* injektálását követően csökkent a MAP, a CI, a mezenteriális véráramlás és mezenteriális oxigénszállítás. Emelkedett az artériás és mezenteriális laktát szint, a gyomornyálkahártya  $PCO_2$ , és az artériás- gyomornyálkahártya közötti  $CO_2$  gap valamint az oxigén extrakciós ráta mindkét csoportban. Szignifikánsan magasabb volt a CI és a szisztémás oxigénszállítás, valamint szignifikánsan alacsonyabb volt az oxigén extrakció 165 perc után a Ringer-laktát csoportban. A folyadék reszuszcitáció ezzel szemben nem volt képes helyreállítani a  $CO_2$  gapet. Ebben a modellben a lokális változások erőteljesebbek voltak a szisztémásaknál, mely a bakteriális infekciós modell okozta súlyos mikrovaszkuláris zavar következménye. (106) Ez a kísérlet azt is demonstrálja, hogy a legegyszerűbb terápiás beavatkozás is befolyásolhatja az élettani változásokat.

Az infekció útvonala szintén módosíthatja a kórlefolyást és a kísérlet végkimenetelét. A baktériumok gyors és elsöprő bevitele az intraperitoneális térbe, vagy a véráramba jellegzetes és gyors választ okoz a gazdaszervezetben. A peritoneális és tüdő infekció első körben lokálisan okoz inflammációt és immunsejt migrációt, míg a véráramba adott kórokozók a legnagyobb azonnali hatást az endotéliumra és vaszkuláris rendszerre fejtik ki. A gazdaszervezet citokin válasza rávilágít ennek a szeptikus állat modellnek a kompartment függőségére. (107) Véráram *E. coli* inokulációja után az IL-1, IL-6, TNF szint gyorsan változik. Ugyanezt a dózist a peritoneális kompartmentbe innokulálva nincs jelentős citokin válasz. (108) Az IL-10 citokin vizsgálata különböző kompartmentek infekciója után hasonló eredményt hozott. *Klebsiella pneumoniae* vagy *Streptococcus pneumoniae* pulmonális adminisztrációja után figyelték meg, hogy az IL-10 rontotta a gazdaszervezet válaszáinak hatékonyságát és növelte a mortalitást. Ugyanakkor peritoneális infekció során az IL-10 magasabb aktivitása javította a kórlefolyás kimenetelét. (109,110,111) A citokinek közül az INF-gamma *K. pneumoniae* infekció során a tüdőkompartmentben védi a gazdaszervezetet,

míg peritonealis kompartment innokulációja után az immunvédelem független tőle. (112) Egyes szerzők megkérdőjelezzik az intravaszkulárisan injektált élő baktérium infekció szepsziszmodell létjogosultságát. Limitálja a modell használatát, hogy a hagyományos értelemben vett szeptikus betegek esetében ritkán igazolható masszív bakterémia, és a legtöbb esetben jelen van egy szeptikus góc, melyből a kórokozók kiáramlása a véráramba folyamatos a góc teljes eliminációjáig. A legtöbb esetben az intravaszkulárisan beadott élő kórokozók az endotoxin modellhez hasonló kórlefolást okoznak. A bakteriális infekció modell esetén is gyors a klinikum kialakulása. A hipodinám keringést erőteljes citokin szérumszint növekedés kíséri. Terápiás beavatkozás nélkül a modell végkimenetele mindig gyorsan bekövetkező halál. Ezt a nagy mennyiségű véráramba kerülő baktérium lízise váltja ki. (113) A modell leggyakoribb infekciós helye a peritonealis és pulmonális kompartment. A pulmonális kompartment a modellt leginkább a tüdőszövet patológiai eltéréseinek vizsgálatára használják. A pneumoszepszisek detektálható bakterémiát okozhatnak a primer tüdőkárosodást követően, többszervi elégtelenséggel. Ez alapján ez a modell is jól hasznosítható a szepszisz modelljeként, abban az esetben, ha teljesíti a szeptikus állatmodell kritériumait, a megfelelő kétfázisú hemodinamikai lefolyást, és immunológiai jellegzetességeket.

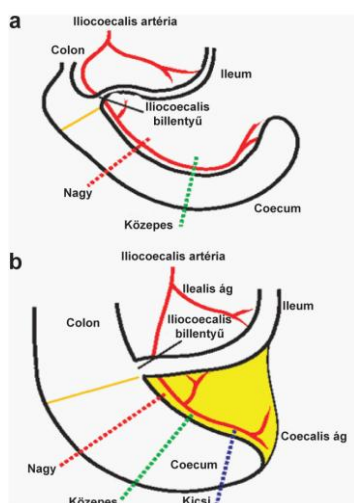
### 2.3.2.3 Sebészi szepszisz modellek

A sebészi modellek alapja a gastrointesztinális traktus protektív és barrier funkciójának az elvesztése, ami fiziológiás körülmények között megóvjá az egyébként steril kompartmentet, a peritoneális teret, a patogénektől. A szepszisz forrása nagyon sok esetben intrabdominális eredetű, ez lehet perforált vastagbél divertikulum, de egy egyszerű appendicitisz is vezethet szepsziszhez, szeptikus sokkhoz. Olyan típusú sebészeti intervenciókat alkalmaznak a modell létrehozásához, melyek peritonitist okoznak. Egyes esetekben patogénnel szennyezett anyagot juttatnak a peritoneumba, más esetben a bélfal integritását szüntetik meg. Minden esetben polimikrobiális szepszisz alakul ki, mely hasonlatossá teszi a modellt a humán szepsziszhez. A két legelterjedtebb modell a coecalis ligáció és punkció modell (CLP) a colon ascendens stent peritonitis (CASP) modell.

A *CLP modell* használata a szepszisz kutatásában gold standardnak számít. A perforált appendicitisz és divertikulitisz klinikai lefolyását utánozza. A szepsziskutatásban az 1980-as években kezdték alkalmazni és terjedt el széles körben. Kezdetben a coecum ligációját végezték kutyákon és malacokon punkció nélkül. (114) A későbbiek során rágszálakon végzett kísérletekben megfigyelték, hogy a ligáció önmagában csak tályogképződéshez vezet,

szisztémás változások nélkül. (115) Emiatt patkány modelleken a coecum punkcióját is javasolták, melyet később egerekre adaptáltak. (116) A coecum ligáció és punkciós kísérleti állatmodell egy komplex modell, amely magába foglalja a szöveti traumát, a szöveti isémiás károsodást, a polimikrobiális kontaminációt, a lokális és szisztémás infekciót is. A sebészi technika viszonylag egyszerű, a kísérleti állat a leggyakrabban rágcsáló. Kivitelezése, a dezinfekció után, középilonali laparotómiával kezdődik, majd a coecumot látótérbe hozzák, a ligáció az ileocecalis billentyűtől distálisan történik. Attól függően, milyen súlyosságú szepszis akarnak létrehozni, a ligáció történhet a coecum bázis és disztális pólus közötti távolság felénél, amivel egy közepesen súlyos szepsztikus állapot érhető el, 40%-os túlélési rátával. 100%-os letalitású szepszis létrehozása esetén a ligáció során a cecum  $\frac{3}{4}$  részét rekesztik ki. A ligált coecumon áthatoló punkciót végeznek a mezenterialis irányból antimezenterialis irányban. A punkció után a hasfal izomzatát tovaftató öltésekkel, a bőrt fémklipekkkel zárják. (117) (9. ábra)

9. ábra: A cecalis ligáció anatómiai lokalizációja, az ileocecalis billentyű és az artériák elhelyezkedése (117)



A coecum perforációja következtében az intralumináris baktériumok a peritoneumba áramlanak, akut, vegyes flórájú bakteriális peritoniszt okozva. Innen a baktériumok a véráramba transzlokálódnak, ahol triggerelik a szisztémás gyulladásos választ. Ez a későbbiekben szepszishoz, többszervi diszfunkcióhoz, szepsztikus sokkhoz vezet. Ha ezt a szepszis modellt rágcsálókön alkalmazzák, az állatok a kórlefolyás során a szepszis típusos tüneteit mutatják hipotermiával, tachikardiával, tachipnoéval, hipotenzióval, letargiával,

diarrhoéval, anorexiával és viselkedési zavarokkal. Megjelennek a korai, hiperdinám állapot jelei, megnövekedett szervperfúzióval, hiperglikémiával és hiperinzulinémiával. Ezt követi a szeptikus sokk késői, hipodinám fázisa alacsony szervperfúzióval, hipoglikémiával és laktát acidózissal. (117,118,119)

A kórlefolyás súlyosságát a mortalitási mutatók értékelése alapján a ligatúra magassága, a tük által okozott punkciós nyílások mérete és száma befolyásolja. (115) Erre jó példa az Ebong és munkacsoportja által végzett kísérlet (118), melyben egereken végzett CLP szepszis modellen a letalitás függvényében vizsgálták az élettani és gyulladáshoz kapcsolódó paraméterek változását. Az egerek az observáció alatt imipenem terápiában részesültek. A szepszis súlyossága a punkciós tű méretével nőtt. Ha 18 G-s tűvel végezték a coecalis punkciót 100%-os, 21 G-s esetén 50%-os, 25 G-s esetén már csak 5%-os volt a letalitás. A 25 G tűs csoportban 12 óra múlva a testhőmérséklet normalizálódott, 4 nap múlva visszaállt a diurnális ritmus és a normál aktivitás. A 21 és 25 G-s csoportban súlyos hipotermiát és csökkent aktivitást figyeltek meg. Direkt összefüggés volt a szepszis súlyossága és a különböző citokinek (IL-1B, TNF, IL-6, IL-10) szintje között, mind a peritőneumban mind pedig a plazmában. Egyik csoportban sem érte el a csúcskoncentrációt a citokinek szintje, amely ellentétes az endotoxin modellekkel. A kemokinekét leszámítva, a citokinek szintje mindegyik csoport esetén a peritoneális térben magasabb volt, mint a plazmában. A kísérlet nem csak a punkciós tűméret és letalitás összefüggésére világított rá, hanem arra is, hogy az emelkedő citokin koncentráció mind a peritoneális kompartmentben, mind a véráramban jól korrelál a szepszis súlyosságával. (118)

Ruiz és munkacsoportja a ligált coecum hosszának függvényében vizsgálta a CLP hatását egerekben. 3 standardizált cecalis ligációs hossz csoportot képeztek hím egerekből, a vizsgálat végpontjai a mortalitás és a szepszis súlyossága volt. A ligáció 5-20-100% coecum hosszánál történt, majd egyszeri punkciót végeztek 20G méretű tűvel. A mortalitás direkt összefüggést mutatott a ligált coecum hosszával, a medián túlélés a 100% ligációs csoportban 24 óra, a 20%-os csoportban 44 óra volt. A szérumban a laktát szint is arányosan nőtt a ligációs hosszal. A proinflammatorikus citokinek szintje szignifikánsan nőtt mindegyik csoportban: a 100% csoportban az IL-6 szintje szignifikánsan magasabb volt a többi csoporttal összevetve. A 20% csoport egyértelműen a szeptikus sokk karakterisztikáját mutatta hipotenzióval, proinflammatorikus aktivitással, szervdiszfunkcióval és hiperlaktatémiával. (120)

A CLP súlyosságát az alapján határozhatjuk meg, hogy a szepszis következtében az állat mennyi idő múlva pusztul el. Kevésbé súlyos CLP esetén napok, de akár nagyon lassan, 28 nap múlva, míg súlyos esetben akár órák alatt is bekövetkezhet az állat halála. Ez alapján

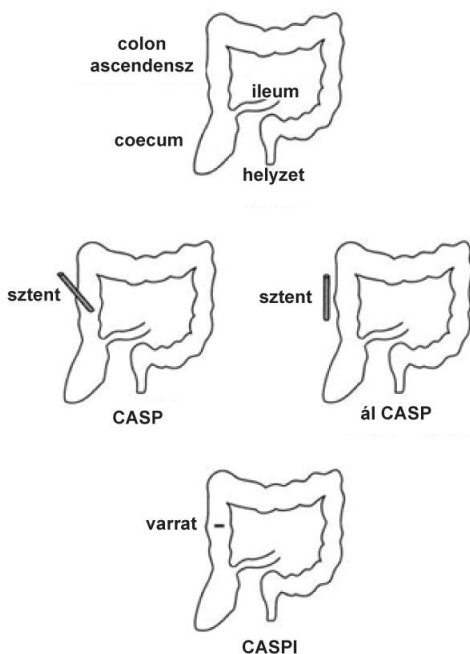
láthatjuk, hogy a CLP nem csak az akut lefolyás tanulmányozására, hanem krónikus szeptikus állapot vizsgálatára is alkalmas lehet. (121,122,123) A modell egyik előnye, hogy irreverzibilis szeptikus állapotot hoz létre, a nekrotikus szövet sebészi eltávolítása, ezáltal az állat góctalanítása sem javítja a kimenetelt. A modell további jelentős előnye, melyeket a fenti példák is jól demonstrálnak, hogy hemodinamikai, metabolikus és immunológiai jellegzetességei megegyeznek a humán szepszisben megfigyelttel. Ez tovább növeli a CLP modell validitását a humán szepszis kutatás területén.

Számtalan előnye mellett nem szabad megfeledkezni a gazdaszervezet infekcióra adott válaszát megzavaró változókról sem. A coecum ligációja és perforációja következtében végső soron egy abszcesszus jön létre. Az állatok egy bizonyos hányadában éppen ezért nem alakul ki szepszis vagy szeptikus sokk, és teljesen felgyógyulnak. (115) A gazdaszervezet túlélési képessége azáltal, hogy visszazorítja a fertőzést, arra utalhat, hogy azok a terápiás beavatkozások, pl. antibiotikumok, melyek elősegítik a tályogképződést, javíthatják a kimenetelt CLP modell esetében. Ezért lehetséges az, hogy azok a szerek, amelyek ebben az irányban hatnak, befolyásolhatják egyéb, a szeptikus sokk kezelésében vizsgált terápia eredményességét. A CLP modell használata kapcsán a nagyfokú variabilitás könnyen alábecsülhető. Ilyen változó a kísérleti állat faja, neme kora. Éppen ezért kimenetel szempontjából sokszor nem összehasonlíthatóak a vizsgálatok. Nehezebben vethetőek össze a különböző vizsgálatok a változó coecalis hossz, a ligáció magassága, a kirekesztett coecumon lévő perforációs nyílások száma, átmérője miatt. A kirekesztés miatt a coecum isémiás, majd nekrotikus lesz, ami szintén módosítja a szepszis kórlefordását. Másrészt a különböző kísérleti állatok intesztinális baktériumflórája is eltérhet. A kísérleti állatok leggyakrabban folyadék és antibiotikum terápiát kapnak, ami további eltérést jelenthet a kísérleti laboratóriumok között.

Ez alapján látható, hogy nem egy standardizált eljárásról van szó, a változók nagy száma miatt az ezzel a szeptikus modellel nyert kísérleti eredményeket óvatosan kell kezelni. (113) CLP modell esetén a kísérlet egyik problémája az abszcesszus képződés, ami bizonyos esetekben a kísérleti összeállítást inkább egy intraabdominális tályoghoz teszi hasonlatossá, mint a szepszishez. Ennek kiküszöbölésére hoztak létre egy alternatív szeptikus modell típust a 1990-es évek végén. A modellt először Zantl és munkatársai alkalmazták 1997-98-ban. Kísérletükben egy olyan állatmodellt szerettek volna létrehozni, mely alkalmas a humán abdominális szepszis patofiziológiai jellemzőinek vizsgálatára. (124) Ez az új módszer a colon ascendens stent peritonitis (CASP), mely jól rekonstruálható és jól standardizálható szeptikus modell. A kivitelezhetősége gyakorlatot igényel. Mint az előző sebészi modellnél, itt is egy

egereken végzett műtéti beavatkozással hozzák létre a szepszist. Az anesztézia és a has bőrének fertőtlenítése után 10 mm-es középilonali metszést ejtenek a hasfalón. A peritoneum megnyitása után azonosítják a caecumot, óvatosan előhúzzák a colon ascendenst. Az ileocecalis billentyűtől 15 mm távolságban egy előre elkészített 14-22 G vénás katétert helyeznek a felszálló vastagbél antimezenterialis falába, melyet két öltéssel rögzítenek. A belső fém vezetőt eltávolítják a kanülből, majd miután meggyőződtek arról, hogy a műanyag kanül vége intraluminálisan helyezkedik el, a cecum irányából székletet fejenek át a kanülon, amíg a kanül végén meg nem jelenik a széklet csepp. A széklet megjelenése után a hasfalat két rétegben zárják. A zárás előtt intraperitonealisan 0,5 ml steril sóoldatot fecskendeznek be folyadékreszuszcitációs céllal. Ál CASP esetén a hasfal nyitása és colon ascendens expozíciója ugyanilyen lépésekkel történik, de a kanült nem helyezik a colon ascendens lumenébe, hanem extraluminárisan fixálják. A CASPI esetén az első műtétet követően 3-5-9 órával a szuturázott hasfalat ismételten kinyitják, egy 3 cm-es laparotómiával, a stent körül lévő fixáló öltéseket eltávolítják a kanüllel együtt, és a vastagbél falon lévő nyílást szuturázzák. 5 ml sóoldattal alapos peritoneális lavage-t végeznek és a hasfalat két rétegben ismét zárják. (10. ábra)

10. ábra: A CASP, ál CASP és CASPI sematikus ábrázolása. (125)



A CASP során a bélumenből a széklet kiáramlása folyamatos a peritoneális kompartmentbe. Ez azt feltételezi, hogy a baktériumok és baktérium toxinok felszabadulása is folyamatos a peritoneumban, ami a gyulladásos mediátorok folyamatos termeléséhez vezet. A beavatkozás

végegyeredménye peritonitisz, szisztémás bakterémia és szisztémás pro- és antiinflammatorikus citokin felszabadulás, ami polimikróbás szeptikus állapothoz vezet multiorgán szervdiszfukcióval, végezetül halállal. A CASP letalitása a stent diaméter függvénye. A CASPI lehetőséget teremt arra, hogy a szepszis fókuszát eliminálják a stent eltávolításával, a perforációs nyílás zárásával és a hasi kompartment átöblítésével. Ezáltal vizsgálható a szepszis lefolyása a sebészi terápiás beavatkozások függvényében is.

A CASP kialakítása után pár órával az állatokon a szepszis iniciális tünetei jelentkeznek. Motilitásuk, táplálék felvételük csökken, védekezési viselkedésük romlik, verejtékeznek, piloerekciónak jelentkezik. Azok a példányok, amelyeknél súlyos peritonitisz és szisztémás gyulladás alakul ki, 48 órán belül elpusztulnak. A stent diaméterétől függően különböző mortalitási ráta figyelhető meg a kísérleti állatoknál. A 14 G stent esetén 100% a mortalitás, míg 16 G esetén 70%, 18 G esetén már csak 50%. Ugyanakkor az ál-CASP csoport egyedei 100%-ban túlélnek. A CASPI csoport egyedeinek túlélése a stent eltávolításának és a sebészi „góctalanításnak” idejétől függ. Ha a stentet 5 órával a CASP műtét után eltávolítják, az állatok 10%-a túléli a beavatkozást. Ha a stent eltávolítása 9 óra múlva történik az állatok mortalitása ismét 100%-ra emelkedik. Több CASP-moddal végzett vizsgálat során az intraabdominális szituációt is ellenőrizték relaparotomia során a stent behelyezése után 24 órával. A folyamatos fécesz kiáramlás mellett fekulens peritonitisz alakult ki. A béltraktus kifejezetten ödémás volt, a mezenterialis erek súlyos vazodilatációjával, a bélfal eritémájával, a Peyer plakkok demarkációjával, szabad hasúri folyadékkal, szeptikus szekréttummal, és bél paralízissel. (126-127) Tizenkét órával a stent behelyezése után a peritoneális mosófolyadékban nagy mennyiségű baktérium detektálható, de ekkor már megjelennek a kórokozók véráramban, májban, tüdőben, lépben és vesékben is. Ugyanakkor LPS akár már 3 óra múlva is kimutatható a szérumból. A baktériumok kvantitatív analízise során típusos bélbaktériumok: *E. coli*, *Bacteroides* és *Enterococcus* specieszek voltak azonosíthatóak. (126) A szérum proinflammatorikus citokinje, TNF, IL-1, IL-12, IL-18 valamint az antiinflammatorikus IL-10 inkább egyidejű emelkedést mutat, mint kétfázisút. Emanuilidis és munkacsoportja CASP egér modellen vizsgálta az IL-10 szerepét szeptikus peritonitiszben. Demonstrálták, hogy makrofág depletált egér modellben szeptikus peritonitisz esetén a Kupfer sejtek a legnagyobb források az IL-10 emelkedő szintjének. Kupfer sejt-mentesített egerek nagyon érzékenyek voltak a szeptikus peritonitisz letális hatására és esetükben megnövekedett bakteriális terhelés jelent meg. A Kupfer sejtek hiányát ellensúlyozni tudták IL-10-Fc fúziós proteinnel. A Kupfer sejtek hiánya miatti alacsonyabb IL-10 szint nem okozott jelentős TNF, IL-1 és IL-18 szint növekedést, ami arra utal, hogy a Kupfer sejtek

elvéstése nem vezet toxikus mennyiségű citokin felszabaduláshoz. Ez az eredmény azt sugallja, hogy az IL-10 protektív hatása nem merül ki szeptikus peritonitisz esetén csak az antiinflammatorikus aktivitásában. (128) A szisztémás citokinek koncentrációja CASP modell esetén a stent átmérőjének függvényében változik. Nagyobb diaméter erőteljesebb citokin választ eredményez a CASP szeptikus modellben. CLP modellel összevetve a CASP modellben a citokin felszabadulás szintén magasabb. (127) Ha CASP által kiváltott citokin választ összehasonlítjuk a humán szeptiszben tapasztaltakkal, akkor a TNF szintjének változása hasonló, míg az IL-6 és IL-10 szint lényegesen magasabb. Ez a megfigyelés azt támaszthatja alá, hogy a SIRS és a CARS (kompenzatorikus anti-inflammatorikus válasz) típusú válaszreakció különböző kompartmentek esetén eltérő lehet. Például tüdőszövet erős TNF, de alacsony IL-10 indukciót mutat, míg a májszövet esetében magas IL-10 de alacsony TNF szint mérhető. (125) Posztoperatív szeptikus betegek vizsgálata során igazolható volt, hogy a monociták csökkent IL-12 termelése magasabb letalitási kockázattal járt. (129) Ezzel egybehangzó Entleutner és munkacsoportjának kutatási eredménye, mely szerint az IL-12p40 deficiens egér CASP modell szintén magasabb mortalitást mutat. Az IL-12 hiánya a proinflammatorikus citokinek és kemokinek késleltetett expressziójához vezetett a májban és a tüdőben, valamint szignifikáns csökkenés volt látható a szérum IL-1 szintben 12 órával a CASP után. Az IL-12 és iNOS védelmi funkciót tölt be a fekulens peritonitiszes egérmodell esetén. A CASP modellen végzett kísérletük alapján az IL-12 deficiencia az immunválasz jelentős késését okozza a polimikrobiális infekció létrehozása után, ami megnöveli az állatok érzékenységét a CASP peritonitisszel és szeptiszszel szemben. (130) Entleutner vizsgálata is alátámasztja a CASP egérmodell alkalmazását a humán szeptisz immunológiai paramétereinek vizsgálatára. A CASP modell egy viszonylagosan új állatkísérleti lehetőség a szeptiszkutatókban. Ezzel a sebészi modellel sikerült a CLP egyik nagy hátrányát, az abszcesszus formációt kiküszöbölni, és egy peritonitisz-szeptisz modellt létrehozni. Mivel új eljárás, a felhasználása nem terjedt el még széles körben, emiatt a modell variabilitási tényezőinek ismerete hiányos lehet. Ez megkérdőjelezheti a validitását a humán szeptisz vizsgálatában. Jelenleg a hemodinamikai mérésekkel egybekötött vizsgálatok száma viszonylag alacsony, ami tovább nehezíti a CASP validitásának megítélését, tekintve azt a tényt, hogy a szeptikus állatmodellek validitását továbbra is a humán szeptiszre jellemző korai és késői fázis megléte határozza meg. További hátránya lehet a modellnek az, hogy a sebészi technika nagymértékben befolyásolhatja a kísérleti modell végkimenetelét. Pontos kivitelezése a beavatkozást végrehajtó személytől nagy precizitást és következetességet igényel a reprodukálhatóság miatt. (107)

### **3. Célkitűzések**

Jelenlegi munkánk egy összetett kutatási terv részét képezi, melynek célja az E. coli indukálta szepszis létrehozása során a sertésmodellben létrejövő hemodinamikai, hemosztazeológiai, hemoreológiai és cerebrovaszkuláris komponensek változásának vizsgálata volt. Tekintettel arra, hogy az eddigi szeptikus állatmodellekben a humán szepszis során alkalmazott emelt szintű hemodinamikai monitorozást alig alkalmazták,

- elsődleges feladatként tűztük ki az intravénásan adott E. coli szuszpenzió indukálta korai szepszis szisztémás hemodinamikai változásainak leírását PiCCO monitor paramétereinek segítségével.
- Vizsgálataink következő célja annak tanulmányozása volt, hogy az általunk választott modellben korai szepszis során milyen, a mikroreológiai viszonyokat érintő változások jönnek létre.

### **4. Módszerek**

#### **4.1 Kísérleti állatok, és kísérleti protokoll**

Az állatkísérleti engedélyt a Debreceni Egyetem Állatjóléti Bizottsága regisztrálta és hagyta jóvá (kísérleti engedély száma: 21/2013. UD CAW) a Magyar Állatvédelmi Törvény XVIII/1998 és a 40/2013 Magyar Kormány Rendelet alapján, mely megfelel az Európai Unió irányelveknek (2010/63/EU).

Kísérletünk során összesen harmincegy egészséges nőstény Hungahib sertést használtunk. Az állatok átlagos kora 10-12 hét volt. A sertéseket véletlenszerűen két csoportra osztottuk: a hemodinamikai mérések esetében kontroll csoport (n=15) és szeptikus csoport (n=16); a hemoreológiai vizsgálatok esetében kontroll csoport (n=4), szeptikus csoport (n=5). Az állatok súlya átlagosan a kontroll csoportban 18,9 (16,7-20,4) kg, a szeptikus csoportban 18,9 (18,9-20,6) kg volt. Az átlagos testhossz a kontroll csoportban 92 (83,5-97,2) cm, a szeptikus csoportban 92 (85-98,2) cm volt.

Általános anesztéziában hajtottuk végre a kísérleteket, mely során 15 mg/ttkg Ketamint és 1 mg/ttkg Xylazint kaptak az állatok intramuszkulárisan. Az anesztézia fenntartása a fájdalmas stimulusokra bekövetkező vegetatív jelek, szívfrekvencia és vérnyomás emelkedés alapján történt, amennyiben szükséges volt, a Ketamin és Xylasin dózist ismételtük. Az anesztézia indukciója után tracheosztomiát végeztünk, melyen keresztül endotracheális tubust helyeztünk

a légcsőbe. A bal oldali véna jugularis interna és a bal oldali artéria femoralis sebészi preparációja után artériás és vénás kanült vezetünk be, melyeken keresztül a későbbiek során a kísérleti vérmintákat vettük, valamint a hemodinamikai méréseket ezek segítségével kivitelezjük. Az endotracheális tubus behelyezése után nyomástámogatott gépi lélegeztetést (Airox Legendair Ventilator, PAU CedexFrance) folytattunk a kísérlet ideje alatt. A gépi lélegeztetés célja 100-130 Hgmm-es artériás parciális oxigén nyomás és 35-45 Hgmm-es artériás parciális szén-dioxid nyomás biztosítása volt. A műtőhelyiség hőmérséklete megközelítőleg 25 °C volt, a sertések alá melegítő párnát helyeztünk, mellyel az állatok 37°C-os maghőmérsékletét garantáltuk. A vizeletürítést szuprapubikusan behelyezett cisztosztomás hólyagkatéteren keresztül biztosítottuk. Az állatok ezen kívül semmilyen terápiás beavatkozásban nem részesültek. A beadott intravénás folyadék mennyisége a szeptikus csoportban megfelelt a beadott E. coli szuszpenzió volumenének, amit a kontroll csoportban fiziológiás sóoldattal helyettesítettünk.

A szeptikus csoport állatainak intravénásan fiziológiás sóban szuszpendált *Escherichia coli* kultúrát ( $2,5 \times 10^5$ /ml; ATCC 25922, Debreceni Egyetem Orvosi Mikrobiológiai Intézet) adtunk folyamatosan emelve a beadott mennyiséget. A protokollnak megfelelően az az első 30 percben 2 ml fiziológiás sóban szuszpendált baktérium kultúrát, majd a következő 30 percben 4 ml baktérium kultúrát adtunk. Ezt követően 32 ml baktérium kultúrát adtunk 120 perc alatt. Így  $9,5 \times 10^6$  összdózisú E. coli-t adtunk be 180 perc alatt. (12. ábra) A helyi laboratóriumban végzett teszt alapján az élő baktériumok száma ennyi idő után még stabil maradt.

A szeptikus csoport állatain, tekintve a fatális infekciót, halálukig végeztük a vizsgálatokat. Mindkét csoport egyedeit 8 órán keresztül obszerváltuk, kivételt képeztek azok az esetek, amikor a kísérleti állat korábban elpusztult. A kísérlet végén az állatokat túlaltattuk.

A vizsgálat során az intravénásán adott fiziológiás sóoldaton és nyomás kontrollált lélegeztetésen kívül folyadék reszuszcitáció, gyógyszeres, vagy egyéb terápiás beavatkozás nem történt.

## 11. ábra: Az élő E. coli oldat intravénás beadásának protokollja

N. Németh et al. / Korai haemorrheológiai változások a szépszis modelben

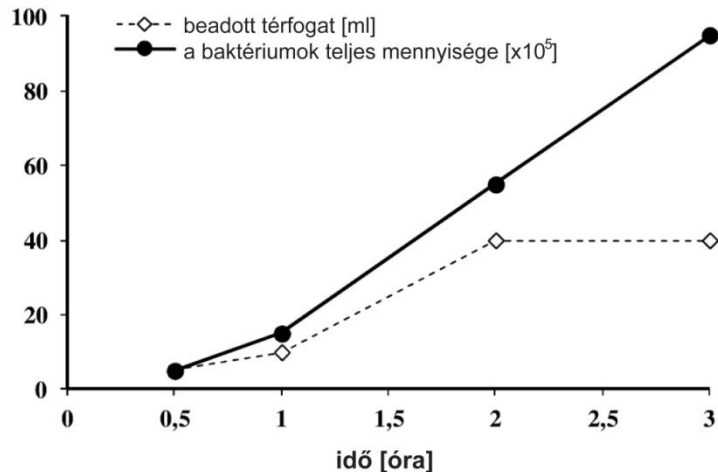


Fig.1. Élő E.coli oldat ( $2,5 \times 10^5/\text{ml}$ ) intravénás beadásának protokollja. Szaggatott vonal a lépésenként emelt oldalt térfogatát [ml], a folytonos fekete vonal a teljes beadott E. coli baktérium ( $\times 10^5$ ) mennyiségét mutatja a kísérlet első három órája alatt.

### 4.2 Hemodinamikai mérések

A hemodinamikai változókat transzpumonális termodilúciós és pulzus contour analízis technikával mértük. Ehhez PiCCO™ (PULSION Medical Systems AG, Munich, Germany) készüléket használtunk. A hemodinamikai méréshez a bal oldali véna jugularis externát és a bal oldali artéria femoralist kanuláltuk. A kanulók a hemodinamikai mérések mellett mintavételi helyként is szolgáltak. A sebészi intervenciók után az állatok egy órás stabilizációs perióduson estek át, mely után megkezdtük a kísérleti protokoll következő fázisát. A szisztémás hemodinamikai változók mérése termodilúcióval történt, melyhez 4 F vastagságú, 8 cm hosszú PiCCO® katéter (Pulsion Medical System AG, München, Németország) használatával történt. A termodilúció során 10 ml hideg só oldatot ( $T < 8^\circ\text{C}$ ) fecskendeztünk be a centrális vénás kanulón keresztül óránként, ezzel a pulzus kontúr analízist is rendszeresen kalibráltuk. A szívfrekvenciát (HR), az artériás középnyomást (MAP) invazívan monitoroztuk az artéria femoralis katéteren keresztül. Az indexek képzéséhez a sertés testfelszín meghatározásához a Meeh formulát használtuk:

$\text{BSA (body surface area)} = 8,58 \times \text{BW (body weight)}$

A PiCCO paraméterek közül a cardiac index, stroke volumen variáció (SVV), globális végdiasztolés térfogat, globális ejekciós frakció, extravaszkuláris tüdővíz index és szisztémás vaszkuláris rezisztencia index került rögzítésre.

### **4.3 Adatgyűjtés**

Az első mérést a szepszis indukciója előtt, az úgynevezett nyugalmi fázisban (resting state – RS) végeztük. Ezt követően a mérések az E. coli szuszpenzió vagy a fiziológiás sóoldat injektálását követően 60 percenként történtek az állat haláláig. A mért adatokat T60-tól T360-ig rögzítettük. A T60 időpontban 2+4 ml E. coli szuszpenzió vagy sóoldat injektálása fejeződött be. A T120 illetve 180 időpontban 2x16 ml E. coli szuszpenzió injektálását, azaz a tervezett 38 ml E. coli oldat szepszis indukciós protokollt befejeztük.

### **4.4 Statisztikai analízis**

A statisztikai analízis során az SPSS 19,0-et (SPSS Chicago, IL) használtuk. A folyamatos változók normál eloszlásának verifikálásához Kolgomorow-Smirnov tesztet alkalmaztunk. A paraméterek nagy része nem mutatott normál eloszlást, az adatokat medián és interquartilis tartományban prezentáltuk, majd a megfelelő non-parametrikus teszttel (Mann-Whitney Rank Sum Test) összehasonlítottuk a csoportokat. A csoporton belüli, a különböző paramétereken a beavatkozás hatására történt változások analízise repetitív ANOVA mérésekkel történt. A változók közötti korreláció számításához Spearman korrelációt használtunk. Szignifikáns eltérésként a  $p < 0,05$  értéket határoztuk meg.

### **4.5 Hemoreológiai mérések**

A hemoreológiai mérésekhez összesen 9 sertést vontunk be a vizsgálatba, kontroll csoport (n=4) és szeptikus csoport (n=5) esetszámmal. A kísérleti állatok antikoaguláns kezelésben nem részesültek. A centrális vénás kanül és az artéria femorális kanül behelyezése után a két kanülből párhuzamosan vérmintát vettünk. Ez a minta (a továbbiakban alapminta) szolgált az alapméréshez. Közvetlenül  $K_3$ -EDTA (1,5 mg/ml) tartalmú kémcsőbe történt a mintavétel, a későbbiek során ebből végeztük az összes laboratóriumi vizsgálatot. Kivételt képezett a szedimentációs mérésekhez használt vénás vérminta, ahol 0,109 M nátrium-citrátot használtunk antikoagulálás céljából. A további artériás és vénás vérmintavétel a szepszis indukciója után 2, 4, 6 és 8 órával történt. A laboratóriumi mintavételek időpontjában a maghőmérsékletet (centrális vénás T [ $^{\circ}$ C] ), az artériás középnyomást (MAP [Hgmm]), szívfrekvenciát (HR [1/perc]), és az oxigén szaturációt (Sat [%] ) is rögzítettük.

#### 4.5.1 In vitro study

Az élő baktérium jelenlétének hatása a vér reológiai tulajdonságaira

Két állatból vettünk alapmintát a vizsgálathoz. A mintákat két szubmintára osztottuk, melyekhez a szepszis indukcióhoz használt E. coli szuszpenzió 50 illetve 100% dózisékat adtuk, az in vivo vizsgálatnak megfelelően 60 m/ttkg keringő vérvolumennel kalkulálva. Az E. coli hozzáadását követően 15-20 perc múlva, valamint 120 perces szobahőmérsékleten történő inkubációt követően mikroeológiai vizsgálatokat - vörösvérsejt deformabilitás és aggregáció, ozmotikus gradiens ektacitometria- vizsgálatot végeztünk.

#### 4.5.2 Laboratóriumi vizsgálatok (in vivo)

##### 4.5.2.1 Hematológiai tulajdonságok

A hematológiai paraméterek meghatározásához Sismax F-800 félautomata mikrosejt számlálót (TOA Medical Electronics Co., Japan) használtunk. A fehérvérsejtszámot (WBC [ $\times 10^3/\mu\text{l}$ ]), vörösvérsejt számot (RBC [ $\times 10^6/\mu\text{l}$ ]), a hematokritet (Htc [%]), az átlagos korpuszkuláris térfogatot (MCV [fl]), az átlagos hemoglobin tartalmat (MHC [pg/l]) és a trombocita számot hasonlítottuk össze.

##### 4.5.2.2 Eritrocita szedimentációs ráta és leukocita anti-szedimentációs ráta

A nátrium-citrát alvadásgátolt vénás vérmintákat tartalmazó kémcsöveket vertikális pozícióba helyezve gravitációs szedimentációt végeztünk. 60 percet követően a szabályos eritrocita szedimentációs rátát regisztráltuk. A leukocita anti-szedimentációs ráta (LAR) meghatározásához a véroszlop felső és alsó részét óvatosan szeparáltuk, és mindkét mintában megmértük a fehérvérsejt számot. A LAR-t a Bogár-formula alapján kalkuláltuk.

$$\text{LAR} = 100 \times (\text{WBC}_{\text{felső}} - \text{WBC}_{\text{alsó}}) / (\text{WBC}_{\text{felső}} + \text{WBC}_{\text{alsó}})$$

##### 4.5.2.3 Vér és plazma viszkozitás

Hevimet-40 kapilláris viszkoziméterrel (Hemorex Ltd. Hungary) történtek a mérések a mintavételt követő 60 percen belül 37 °C-on. A plazmát 800g fordulatszámon centrifugáltuk 10 percig. A teljes vér viszkozitás (WBV [mPas]) értékeket 90 s<sup>-1</sup> nyíróerőn hasonlítottuk össze egymással, melyet a Mátrai formulának megfelelően korrigáltuk 40%-os hematokrit értékre.

Mátrai formula:  $(\text{WBV}_{40\%}/\text{PV})^{40\%/\text{Htc}}$ , ahol

WBV<sub>40%</sub>: 40%-os hematokritra korrigált teljes vér viszkozitás

PV: plazmaviszkozitás

Htc: a minta aktuális hematokrit értéke

#### 4.5.2.4 Vörösvérsejt deformabilitás

LoRRca MaxSis Osmoscan-nel (Mechatronics BV, Hollandia) történt a deformabilitás meghatározása. 5 ul térfogatú vérmintát tettünk 1 ml izotóniás polyvinyl-pyrrolidone (PVP) oldathoz (360 KDa PVP normál phosphate puffereelt sóoldat; viszkozitás=27mPas, ozmolalitás=290-300 mOsm/kg, pH=7,3). 0,3-30 Pa közötti nyíró feszültség (SS) módban a lézer diffrakciós mintázat változásának megfelelően határoztuk meg az elongációs indexet (EI). Az elongációs index egyenlő a  $(L-W)/(L+W)$  hányadossal, ahol a L megfelel a hosszúságnak, a W a szélességnek a diffraktogrammon. Minél nagyobb a vörösvérsejt deformabilitása, annál nagyobb az EI értéke. A mérések 37 °C-on történtek. Lineweaver-Burk analízist végeztünk az EI-SS görbék összehasonlításával a maximális elongációs index ( $EI_{max}$ ) és a fél  $EI_{max}$ -nál lévő nyíró feszültség ( $SS_{1/2}$  [Pa]:  $1/EI=SS_{1/2}/EI_{max} \times 1/SS+1/EI_{max}$ ) kalkulálásához. A későbbiekben kiszámítottuk az  $EI_{max}/SS_{1/2}$  arányt is. (210) Az ozmotikus gradiens ektacitometria, vagy osmoscan vizsgálathoz 250 µl vért kevertünk óvatosan 5 ml PVP oldathoz. Konstans 30 Pa nyírófeszültségen az elongációs index értékeket folyamatosan határoztuk meg az ozmolalitás fokozatos 0-ról 500 mosmol/kg-ig történő emelése mellett. Az eszköz által analizált paraméterek mellett megmértük a minimális elongációs indexeket alacsony ozmotikus környezetben (minimal EI), a maximális elongációs index értékeket (maximal EI), az ezekhez tartozó ozmolalitás értékeket (minO és maxO, mint „optimális” ozmolalitás), és meghatároztuk az egyedi elongációs index- ozmolalitás görbe alatti területet (AUC). A továbbiakban olyan paramétereket is meghatároztuk, amelyek segítségével a minEI és maxEI közötti fázist jellemeztünk ozmolalitás függvényében: deltaEI a maxEI és min EI közötti különbség; deltaO, az ozmolalitás különbség a maxEI és minEI értékhez tartozó ozmolalítások között; valamint a deltaEI/deltaO arányt.(211)

#### 4.5.2.5 Vörösvérsejt aggregáció

A Myrenne MA-1 eritrocyta aggregometert (Myrenne GmbH, Németország) használtuk az aggregációs indexek meghatározásához, melynek működése a fényáteresztő képességen alapul: M ( 0 s<sup>-1</sup> nyíró arányon) és M1 (3 s<sup>-1</sup> nyíróarányon) 5 vagy 10 másodperccel a diszaggregáció után. Az indexek (M 5 s, M1 5 s, M 10 s, M1 10 s) növekednek a fokozott vörösvérsejt aggregációval. A LoRRca műszer syllectometriás mérés technikáját szintén

alkalmaztuk a következő vörösvérsejt aggregációs paraméterek meghatározásához: amplitudó (Amp [au]); aggregációs index (AI [%]); aggregációs félidő ( $t_{1/2}$  [s]). (212).

#### 4.5.2.6 Statisztikai analízis

A kapott adatokat átlag és standard deviációnak megfelelően interpretáltuk. Az eredmények normál eloszlásának megfelelően a csoportok közötti (kontrol versus szeptikus) összehasonlítást Student-t vagy Mann-Whitney RS teszt alapján végeztük. A csoporton belül nyert adatok összehasonlítása az alapértékekkel one-way ANOVA teszttel (Dunn vagy Bonferroni módszer) történt. A p esetében az eredményt 0,5 alatti értéknél tekintettük statisztikai értelemben szignifikánsnak.

## 5. Eredmények

### 5.1 Hemodinamikai mérések

A 16 szeptikus állatból kettő a szepszis indukció kísérleti protokoll megkezdését követően, két állat 2 óra, öt sertés 3 óra, három 4 óra múlva, egy 6 óra múlva pusztult el.

A nyugalmi szisztémás hemodinamikai paraméterek összefoglalása az 5. táblázatban látható. A szeptikus és kontroll csoport hemodinamikai paraméterei az E coli szuszpenzió injektálása előtt statisztikailag hasonlóak voltak.

5. táblázat: Szisztémás hemodinamikai paraméterek a nyugalmi állapotban (RS) a kontroll és a szeptikus csoportban, a medián és az interquartilis tartományok feltüntetésével

Paraméterek	Kontroll csoport	Szeptikus csoport	p-érték
MAP (Hgmm)	102 96,5-110,7	106 97-111,5	0,86
Szív frekvencia (1/perc)	92 81,5-102,5	99,0 81,7-108,5	0,50
CI (l/perc/m <sup>2</sup> )	2,8 1,8-2,9	2,9 2,1-3,2,	0,08
SVRI dyn.sec.cm <sup>-5</sup> .m <sup>2</sup>	2855 2452-3125	2600 2214-2719	0,06
GEDI (ml/m <sup>2</sup> )	411 353-520	538 414-631	0,02
SVV (%)	13 11-17	13 8-16	0,52
GEF (%)	29 23-34	23 20-27	0,12
EVLWI (ml/kg)	13 9-16	17 12-21	0,08

A kontroll sertésekben a hemodinamikai változók relatív stabilak voltak a vizsgálati periódusban. Az artériás középnyomás érték a hatodik órában csökkent, míg a szisztémás vaszkuláris rezisztencia index az ötödik órától emelkedett. (6. táblázat)

A szeptikus csoportban a szeptikus sokk a 176. percben (IQR:60-263) alakult ki az E. coli szuszpenzió injektálásának kezdetétől. (7. táblázat)

6. táblázat: Szisztémás hemodinamikai paraméterek a kontroll csoportban, medián és IQR értékekkel.

TR=resting state T60-T420=Az E.

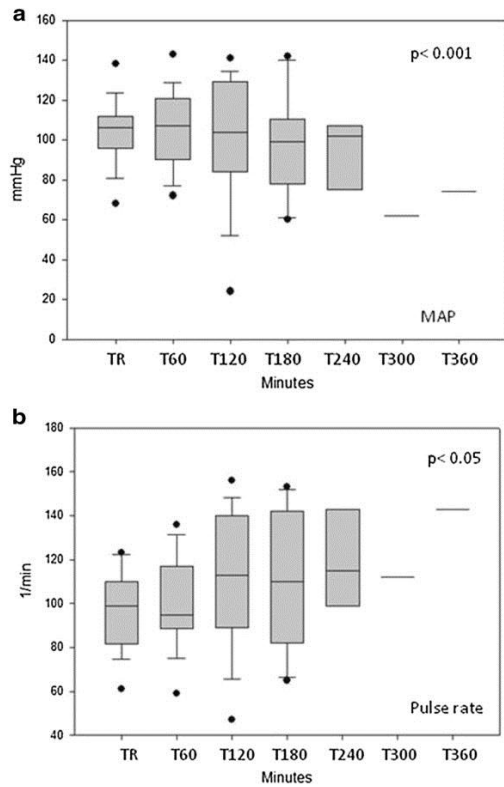
A mérések időpontja								
	TR (n=15)	T60 (n=15)	T120 (n=15)	T180 (n=15)	T240 (n=15)	T300 (n=6)	T360 (n=6)	p-érték
MAP (Hgmm)	102 (96,5-110,7)	103 (92-108,7)	96 (87-109,7)	100 (89-110)	99 (85,2-109)	102 (93-103)	92 (80-99)	<0,001
Szívfrekvencia (1/perc)	92 (81,5-102)	94 (77-103)	88 (83-103)	94 (85-97)	88 (81,5-95,5)	87,5 (82-96)	83,5 (81-87)	0,98
CI (l/min/m <sup>2</sup> )	2,27 (1,8-2,9)	2,4 (1,6-2,8)	2,2 (1,4-2,6)	2,3 (1,6-2,6)	2,0 (1,7-2,7)	1,8 (1,6-2,5)	1,9 (1,5-2,1)	0,18
SVRI (dyn.sec.cm <sup>5</sup> .m <sup>2</sup> )	2855 (2452-3125)	2991 (2771-3291)	3238 (2906-3867)	3138 (2510-4040)	3113 (2799-4450)	4454 (3388-4700)	4054 (3657-4740)	<0,01
GEDVI (ml/m <sup>2</sup> )	411 (353-520)	414 (320-479)	389 (308-465)	395 (305-484)	373 (312-447)	230 (181-350)	207 (188-350)	0,37
SVV (%)	13 (11-17)	15 (11-18)	15 (11-19)	15,5 (11-19)	14 (9,7-20)	16,5 (12-19)	17 (14-18)	0,79
GEF (%)	29 (23-34)	27,5 (23-34)	27 (21,2-28)	26 (23-28)	26 (23-29)	26 (25-28)	26 (24-29)	0,02
EVLWI (ml/kg)	13 (9,6-16,7)	14 (9,2-18)	16 (8,5-19)	15 (7,7-18,2)	13,5 (8-17)	9,5 (6-13)	10 (6-14)	0,07

7. táblázat: Szisztémás hemodinamikai paraméterek a szeptikus csoportban, medián és IQR értékekkel.  
 TR=resting state T60-T420=Az E. coli injekció beadásának kezdetétől eltelt idő (perc)

Paraméterek	A mérések időpontja							p-érték
	TR (n=16)	T60 (n=16)	T120 (n=14)	T180 (n=9)	T240 (n=6)	T300 (n=2)	T360 (n=1)	
<b>MAP (Hgmm)</b>	106 97-111.5	107 90.5- 119.7	104 84.7-127.7	99 81-107	102 75.2-106	62 50-74	74	<0.001
<b>Szívfrekvencia (1/min)</b>	99 81.7-108.5	95 89.7- 115.5	113 89.2-138.7	110 83-142	115 102.5-141	112 109-115	143	0.05
<b>CI (l/min/m<sup>2</sup>)</b>	2.91 2.1-3.2	2.4 1.8-2.9	2.2 2.0-2.6	2.4 1.7-3.1	1.9 1.6-2.8	1.3 1.0-1.7	1.2	0.02
<b>SVRI (dyn.sec.cm<sup>-5</sup>. m<sup>2</sup>)</b>	2600 2214-2719	3350 2497- 4010	2952 2495-4473	4047 2541-5220	2243 2047-5370	3182 677-5682	4585	0.162
<b>GEDI (ml/m<sup>2</sup>)</b>	538 414-631	491 409-601	491 415-604	482 414-548	491 394-582	200 147-254	138	0.535
<b>SVV (%)</b>	13 8-16	15 9-19	18 12-26	21.5 16-26	25 16-27	13.5 13-14	14	<0.001
<b>GEF (%)</b>	23 20-27	21 19-26	19 18-25	20 15-23	21 16-25	20 19-22	19	<0.001
<b>EVLWI (ml/kg)</b>	17 12-21	19 12-23	19.5 15-25	18.5 12-22	18 8-17	9.5 13-21	5	0.03

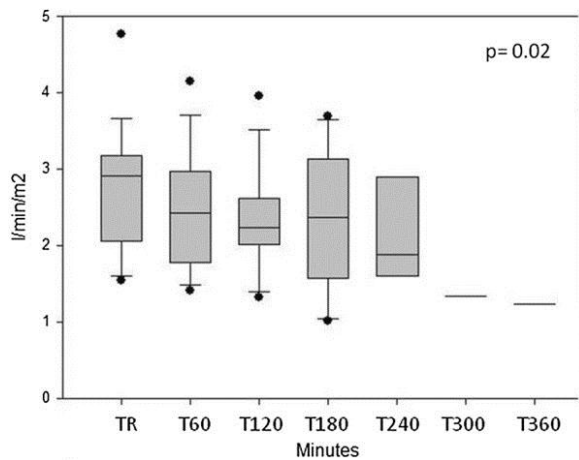
Az artériás középnyomás értékei az idő függvényében fokozatosan csökkentek, míg a szívfrekvencia növekedett az E. coli injektálását követően. (17. ábra )

17. ábra: Az artériás középnyomás (a) és a pulzus frekvencia (b) változása a szeptikus



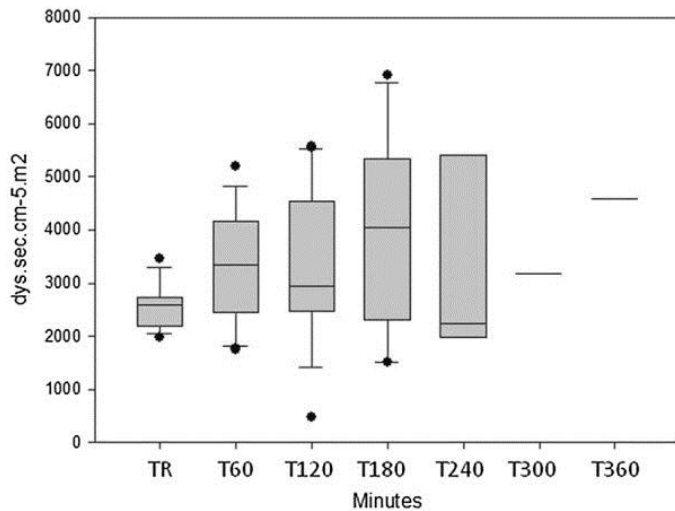
Az áramlási paraméterek változását vizsgálva a cardiac index csökkenése volt tapasztalható. (18. ábra)

18. ábra: A cardiac index változása a szeptikus csoportban idő függvényében (medián és interquartilis tartomány jelölésével). TR: resting state T60–360 = Az E.coli oldat injektálásának megkezdése után percben megadva



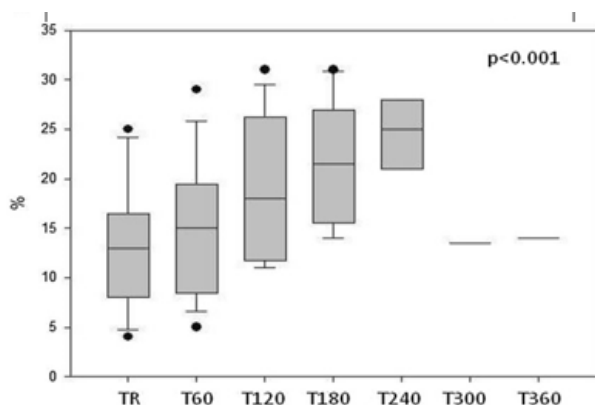
A szisztémás vaszkuláris rezisztencia index átmeneti növekedést mutatott a harmadik órában, de visszatért a kiindulási értékre a későbbi vizsgálati periódusban. (19. ábra)

19. ábra: A szisztémás vaszkuláris rezisztencia index változása a septicus csoportban idő függvényében (medián és interquartilis tartomány jelölésével). TR: resting state T60–360 = Az E.coli oldat

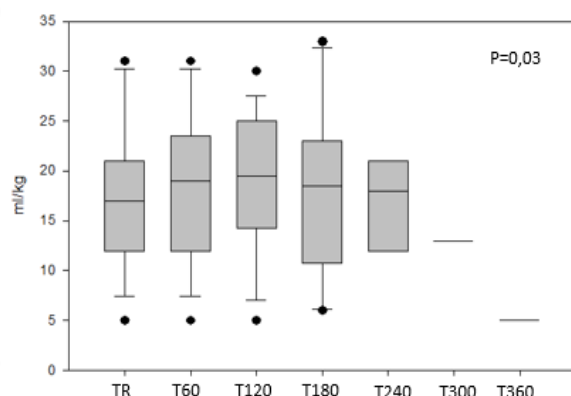


A pulzus kontúr analízise során a stroke volumen variancia szignifikáns emelkedést mutatott a 4. óráig. (20. ábra) a globális végdiasztolés volumen index (térfogat paraméter) nem szignifikáns csökkenése mellett. Az extravaszkuláris tüdővíz index növekvő tendenciát mutatott (21. ábra), míg a globális ejekciós frakció fokozatosan csökkent vizsgálat során.

20. ábra: A stroke volumen variancia változása a septicus csoportban (medián és interquartilis tartomány jelölésével). TR: resting state T60–360 = Az E.coli oldat injektálásának megkezdése után percben megadva



21. ábra: Az extravascularis tüdővíz index változása a septicus csoportban (medián és interquartilis tartomány jelölésével). TR: resting state T60–360 = Az E.coli oldat injektálásának megkezdése után percben megadva



## 5.2 Hemoreológiai vizsgálatok eredményei

### 5.2.1 A hemoreológiai mérésekben résztvevő sertés alcsoport hemodinamikai és mortalitási jellemzői

A hemoreológiai mérésekhez összesen kilenc állat mintáiból nyert adatokat elemeztük. A szeptikus csoportban (n=5) lévő valamennyi kísérleti állat esetében fulmináns szepszis volt megfigyelhető és 3-7 órán belül elpusztultak (2 állat a 3-4. órában, 3 állat a 6-7. órában). A szeptikus csoport esetében a szívfrekvencia emelkedett, az artériás középnyomás csökkent. A szívfrekvencia/MAP arány szignifikáns csökkenést mutatott mind a kontroll csoporttal, mind pedig a szeptikus csoporton belül a kiindulási értékekkel összehasonlítva. Az E. coli oldat injektálásának kezdetétől eltelt 6 óra múlva a p érték < 0,001 a szeptikus csoporton belüli, míg p=0,004 a kontroll csoporttal történt statisztikai analízis során. A kontroll csoport egyedeinél a kísérlet ideje alatt stabil hemodinamikai paramétereket mértünk. (8.táblázat)

8. táblázat: Testhőmérséklet, szívfrekvencia(HR)/ artériás középnyomás(MAP) arány és oxigén szaturáció értékek a kontroll és szeptikus csoportban a kísérlet ideje alatt. (Középérték+S.D.; \*p<0,05 vs.kontroll; 4. és 6. órában a szeptikus csoportban n=3 (one way ANOVA on rank teszt, Bonferroni korrekció, Mann-Whitney rank sum test).

Változó	Csoport	Alap	2 óra	4 óra	6 óra	8 óra
Hőmérséklet [°C]	Kontroll	36,73±0,47	37,43±0,41	37,83±0,7	38,76±1,35	39±1,47
	Szeptikus	37,0±1,21	37,85±0,97	38,2±0,42	38,5±0,28	-
HR/MAP 1/Hgmm.min	Kontroll	0,86±0,21	1,09±0,34	0,98±0,17	0,98±0,17	1±
	Szeptikus	0,82±0,18	1,48±1,24	1,31±0,24*	3,09±0,82*#	-
Szaturáció %	Kontroll	97±1,8	96,7±0,9	94±2,7	95,2±1,5	95±1,4
	Szeptikus	94,2±3,1	91±4,35	93,6±6,1	90±15,5	-

### 5.2.2 Hematológiai paraméterek

A totál leukocita szám a szeptikus csoportban mind az artériás, mind a vénás mintában folyamatosan csökkenő tendenciát mutatott. A 4. és 6. órában szignifikánsan alacsonyabb volt mind a kiindulási értékhez, mind a kontroll csoporthoz viszonyítva (p<0,001). A kontroll csoport esetében egy konstans emelkedés volt megfigyelhető a kísérleti periódus végére. A monocita-granulocita % mindkét csoportban enyhe emelkedést mutatott, de ez nem érte el a szignifikáns különbséget.

A vörösvérsejtszám csaknem konstans maradt, de a kísérlet 6. órájában megemelkedett a hematokrit értékkel párhuzamosan a szeptikus csoportban. A csoportok között szignifikáns

különbség volt kimutatható a vörösvérsejtszám emelkedésben a kísérlet 6. órájában az artériás és a vénás mintában is. Az MCV értékek minimálisan magasabbak voltak a szeptikus csoportban a kontrol csoporttal összehasonlítva.

A trombocita szám dominánsan csökkent a szeptikus állatokban, szignifikáns különbség alakult ki az E. coli szuszpenzió injektálás megkezdésének 6. órájában a csoportok között és a szeptikus csoporton belül is a kiindulási értékhez képest. (8. táblázat)

8. táblázat: A hematológiai paraméterek változása a szeptikus és kontroll csoport artériás és vénás mintáiban.

Változó	Csoport	Minta	Alap	2 órás	4 órás	6 órás	8 órás	
FVS[x10 <sup>3</sup> /μl]	Kontrol	A	15.3 ± 2.39	16.61 ± 0.79	17.63 ± 2.05	17.97 ± 0.61	20.45 ± 2.64	
		V	15.21 ± 1.97	17.36 ± 1.17	16.95 ± 2.69	16.16 ± 2.68	17.45 ± 7.05	
	Szepszis	A	14.88 ± 3.21	13.94 ± 4.98	8.88 ± 3.77*#	7.05 ± 3.58*#	–	
		V	14.53 ± 2.64	14.49 ± 5.08	8.85 ± 4.09*#	7.88 ± 3.64*#	–	
	Mo+Gr% [%]	Kontrol	A	43.25 ± 9.54	41.88 ± 8.84	53.2 ± 10.39	60.21 ± 13.39	68.25 ± 12.3
			V	46.47 ± 10.7	41.42 ± 10.02	52.7 ± 11.26	58.35 ± 10.16	67.31 ± 8.22
Szepszis		A	48.81 ± 6.77	46.14 ± 11.27	45.73 ± 16.42	59.14 ± 20.49	–	
		V	45.85 ± 7.03	45.49 ± 11.7	47.15 ± 20.2	53.15 ± 18.42	–	
VVT [x10 <sup>6</sup> /μl]	Kontrol	A	6.21 ± 0.51	6.48 ± 0.47	5.97 ± 0.85	5.99 ± 0.84	6.21 ± 0.71	
		V	6.27 ± 0.43	6.45 ± 0.31	5.85 ± 0.83	5.53 ± 1.14	5.78 ± 0.53	
	Szepszis	A	6.65 ± 0.44	6.17 ± 0.32	6.7 ± 0.7	6.98 ± 0.89	–	
		V	6.44 ± 0.64	6.49 ± 0.33	6.85 ± 0.8	6.63 ± 0.93	–	
MCV [fl]	Kontrol	A	59.83 ± 4.54	62.76 ± 6.3	60.17 ± 2.82	58.71 ± 1.23	60.5 ± 3.41	
		V	57.65 ± 2.8	60.3 ± 3.88	58.26 ± 1.47	60.42 ± 5.72	60.11 ± 1.62	
	Szepszis	A	61.99 ± 2.62	65.23 ± 7.88	65.93 ± 4.4	64.26 ± 3.05	–	
		V	63.88 ± 4.58	64.81 ± 6.44	63.63 ± 2.07	64.86 ± 3.26	–	
MCH [pg]	Kontrol	A	15.21 ± 0.87	14.76 ± 0.11	15.42 ± 0.89	15.48 ± 1.4	14.58 ± 0.99	
		V	14.91 ± 0.24	15.12 ± 0.39	15.07 ± 0.31	15.03 ± 1.21	15.37 ± 0.33	
	Szepszis	A	15.66 ± 0.64	16.08 ± 0.83	17.08 ± 0.85	16.43 ± 1.76	–	
		V	16.35 ± 1.39	16 ± 0.86	16.73 ± 1.3	16.81 ± 0.92	–	
Thr[x10 <sup>3</sup> /μl]	Kontrol	A	608.5 ± 40.2	612.1 ± 127.4	565 ± 152.1	630.6 ± 105.8	555 ± 131.1	
		V	562.1 ± 119.3	562.3 ± 145.1	517.6 ± 114.8	578 ± 83.7	477.6 ± 88.7	
	Szepszis	A	470.5 ± 55.1	401.75 ± 125.4	382.3 ± 126.2	221.5 ± 32.5*#	–	
		V	421.6 ± 88.9	384.6 ± 111.6	346.1 ± 108	204.5 ± 42.09*#	–	

átlagok ± S.D. \*p<0,05 vs. alap; #p<0,05 vs. Kontrol. A=artériás vérminta, V=vénás vérminta 4 óra, és 6 óra után levéve, n=3 a Szepszis Csoportban. (Az alkalmazott statisztikai teszt: Bonferroni féle One-way ANOVA ÉS Mann-Whitney teszt)

A leukocita anti-szedimentációs sebességét csökkenő tendencia jellemzi a szeptikus állatokban: 2 óránként 15-20%-al csökken. Az értékek szignifikánsan különböznek a Control csoport értékeitől (2 óránál: p=0,031; 4 óránál: p=0,05; 6 óránál: p=0,049)

### 5.2.3 Eritrocita szedimentációs ráta és leukocita anti-szedimentációs ráta

Az eritrocita szedimentációs ráta (ESR) állandó maradt a kontroll csoport állataiban a kísérlet végéig. A szeptikus állatok esetében lépcsőzetes emelkedést mutatott a 4. óráig, majd csökkenni kezdett.

A leukocita anti-szedimentációs ráta minden 2. órában végzett analízis során 15-20%-os csökkenést mutatott. A csökkenés mértéke szignifikáns különbséget mutatott a kontroll

csoporthoz képest is; a 2. órában  $p=0,031$ , a 4. órában  $p=0,05$ , a 6. órában  $p=0,049$  értékkel. (9. táblázat)

9. táblázat: A teljes vér viszkozitás, plazma viszkozitás (PV), a 40% hematokritra korrigált WBV, az erythrocyta szedimentációs ráta és a leukocyta-antiszedimentációs ráta

Változó	Csoport	Alap	2 órás	4 órás	6 órás	8 órás
WBV [mPas] at shear rate of $90 \text{ s}^{-1}$	Kontrol	$2.87 \pm 0.6$	$2.74 \pm 0.62$	$2.31 \pm 0.89$	$2.46 \pm 0.39$	$2.28 \pm 0.34$
	Szepszis	$3.03 \pm 0.51$	$2.66 \pm 0.65$	$3.02 \pm 0.71$	$2.77 \pm 0.91$	–
PV [mPas]	Kontrol	$0.98 \pm 0.09$	$0.98 \pm 0.03$	$1 \pm 0.11$	$1 \pm 0.21$	$0.9 \pm 0.12$
	Szepszis	$1.03 \pm 0.15$	$0.95 \pm 0.02$	$0.94 \pm 0.02$	$0.91 \pm 0.03$	–
WBV <sub>40%</sub> [mPas]	Kontrol	$3.41 \pm 1.29$	$2.98 \pm 0.85$	$2.58 \pm 0.81$	$3.19 \pm 1.09$	$2.57 \pm 0.31$
	Szepszis	$2.95 \pm 0.46$	$2.57 \pm 0.65$	$2.72 \pm 0.38$	$2.54 \pm 0.59$	–
Htc / WBV [%/mPas]	Kontrol	$12.96 \pm 3.4$	$14.8 \pm 4.08$	$15.66 \pm 3.38$	$13.77 \pm 3.25$	$12.81 \pm 5.13$
	Szepszis	$13.8 \pm 2.5$	$16.47 \pm 4.01$	$14.73 \pm 2.43$	$16.25 \pm 4.26$	–
ESR [mm/h]	Kontrol	$3.5 \pm 1$	$3.5 \pm 1$	$3 \pm 1.15$	$3.75 \pm 1.25$	$3.75 \pm 1.25$
	Szepszis	$3.75 \pm 0.5$	$4.25 \pm 0.5$	$4.66 \pm 1.15$	$3.66 \pm 0.57$	–
LAR [%]	Kontrol	$21.98 \pm 14.33$	$27.09 \pm 7.33$	$21.11 \pm 6.01$	$22.02 \pm 6.74$	$19.41 \pm 7.62$
	Szepszis	$17.68 \pm 4.9$	$12.95 \pm 8.12^{\#}$	$10.48 \pm 4.59^{\#}$	$6.91 \pm 6.52^{\#}$	–

átlagok  $\pm$  S.D. \* $p < 0,05$  vs. alap;  $\#p < 0,05$  vs. Kontrol. A=artériás vérminta, V=vénás vérminta 4 óra, és 6 óra után levéve,  $n=3$  a Szepszis Csoportban. (Az alkalmazott statisztikai teszt: Bonferroni féle One-way ANOVA ÉS Mann-Whitney teszt)

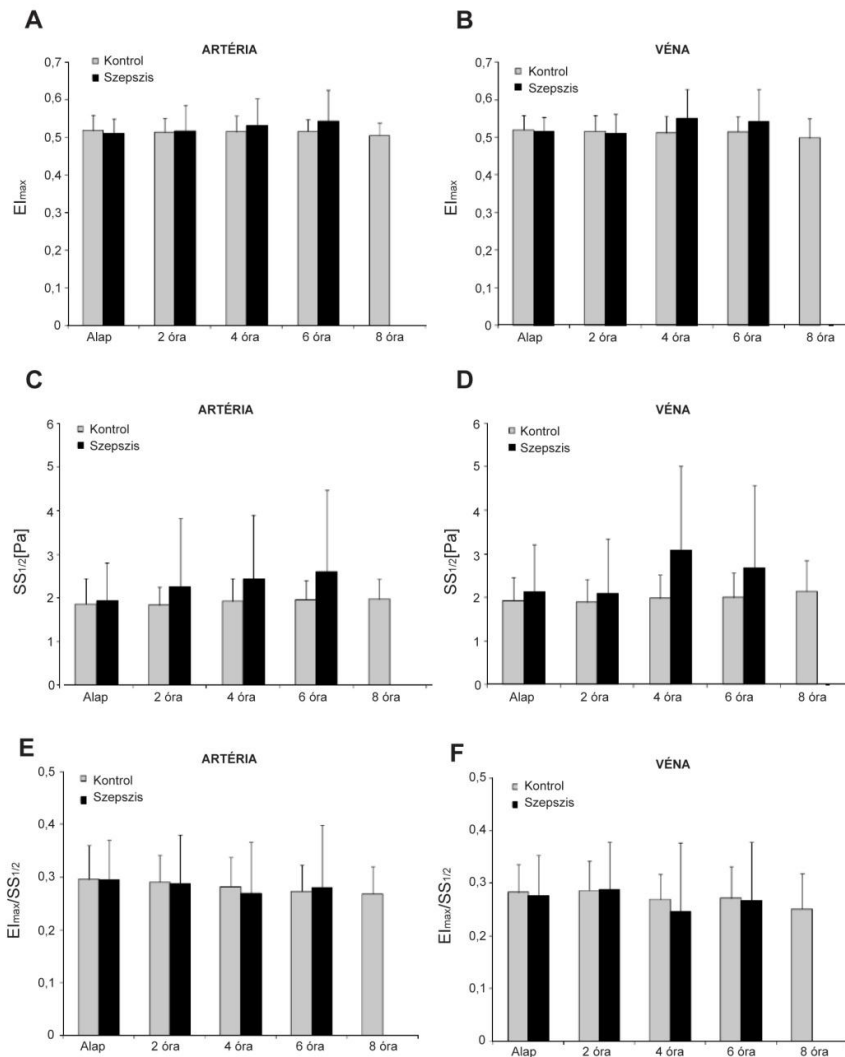
#### 5.2.4 A vér és plazma viszkozitás

A teljes vér viszkozitás (WBV) közepesen csökkent a kontroll csoport állataiban a kísérleti időszak alatt, de eközben a plazma viszkozitása lényegesen nem változott. A 40%-os hematokritra korrigált WBV értékekben lényegi eltérés sem a kontroll, sem a szeptikus állatok esetében nem volt. A szeptikus csoportban a teljes vér viszkozitás a 4. órában kezdett emelkedni, a plazma viszkozitása viszont folyamatos csökkenést mutatott. (9. táblázat)

#### 5.2.5 Vörösvérsejt deformabilitás

A vörösvérsejt deformabilitás romló tendenciát mutatott a szeptikus csoport állataiban. A két óránként levett artériás és vénás vérmintákban az  $SS_{1/2}$  fokozatosan nőtt, míg az  $EI_{\max}SS_{1/2}$  arány fokozatosan csökkent. Ugyanakkor ez a változás nem volt szignifikáns. Az artériás és vénás vérminták összehasonlítása során a deformabilitásban számottevő változást nem észleltünk. (22. ábra: A-F)

22. ábra:  $E_{I_{max}}$  (A,B),  $SS_{1/2}$  [Pa](C,D),  $E_{I_{max}}/SS_{1/2}$ [1/Pa] (E,F) értékek az artériás és vénás mintában a kontroll és a szeptikus csoportban

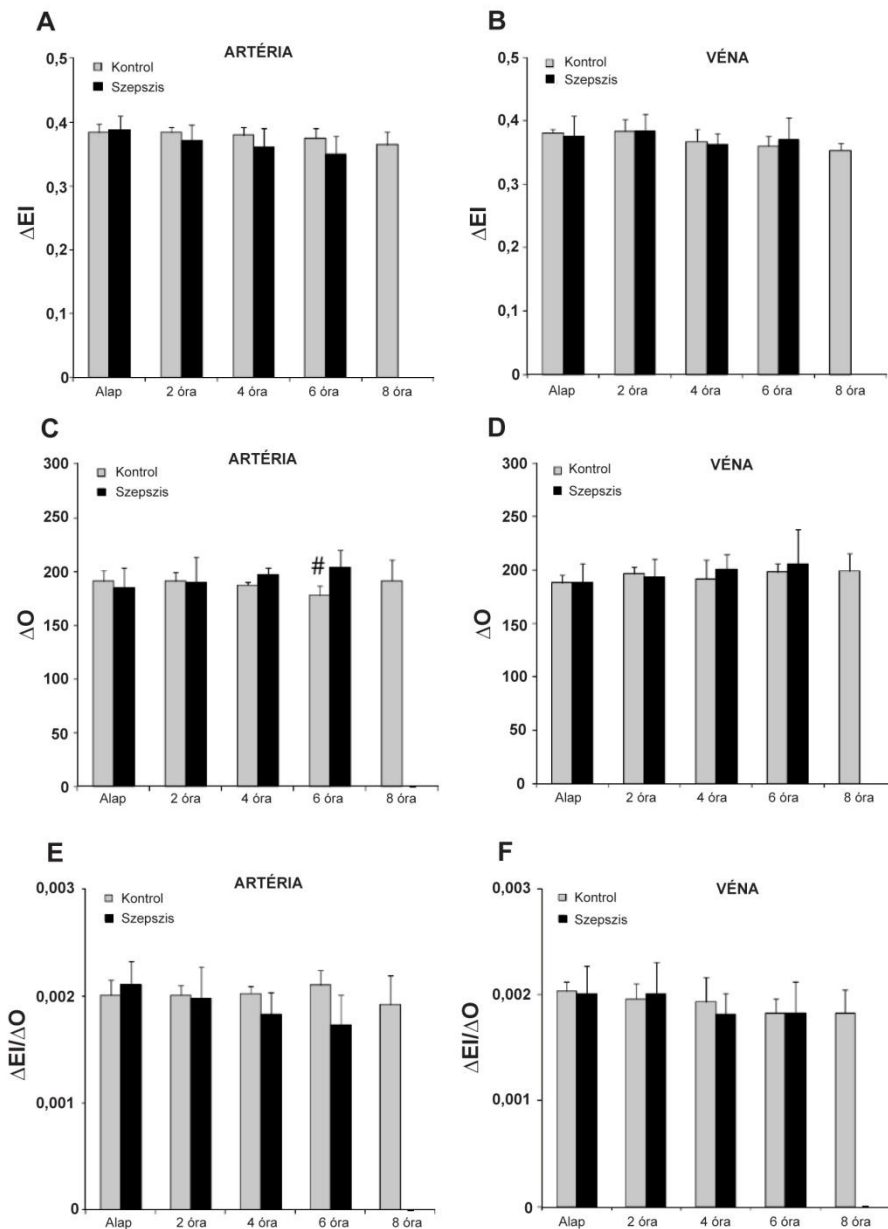


$E_{I_{max}}$  (A,B),  $SS_{1/2}$  [Pa](C,D),  $E_{I_{max}}/SS_{1/2}$ [1/Pa] (E,F) értékek az artériás és vénás mintában a Kontroll és a Szeptikus csoportban. átlagok  $\pm$  S.D. \* $p < 0,05$  vs. alap; # $p < 0,05$  vs. Kontroll. A=artériás vérminta, V=vénás vérminta 4 óra, és 6 óra után levélve,  $n=3$  a Szeptikus Csoportban. (Az alkalmazott statisztikai teszt: Bonferroni féle One-way ANOVA ÉS Mann-Whitney teszt)

Az osmoscan által mért paramétereket vizsgálva a minEI értékek folyamatos növekedést mutattak a szeptikus állatokban, kifejezettebben az artériás vérmintákban. A kísérlet 6. órájában a kontroll csoporttal összevetve a p érték 0,047 volt. Az AUC nagyobb eltéréseket mutatott. Már a szeptikus indukció után két órával csökkenni kezdett, majd a későbbiekben is folytatta ezt a tendenciát. A deltaEI értékek fokozatosan csökkentek, főleg a szeptikus állatok artériás vérmintáiban, míg al deltaO lépcsőzetes emelkedést mutatott a megfigyelési periódus

6. órájáig. A  $\Delta EI/\Delta O$  arány markánsabb eltérést mutatott, fokozatosan csökkent, kifejezettebben az artériás mintákban. (23. ábra: A-F)

23. ábra:  $\Delta EI$  (A,B),  $\Delta O$  (C,D) és  $\Delta EI/\Delta O$  (E,F) értékek az artériás és a vénás mintában a kontrol és szeptikus csoportban



$\Delta EI$  (A,B),  $\Delta O$  (C,D) és  $\Delta EI/\Delta O$  (E,F) értékek az artériás és a vénás mintában a Kontrol és Szeptikus csoportban. átlagok  $\pm$  S.D. \* $p < 0,05$  vs. alap; # $p < 0,05$  vs. Kontrol. A=artériás vérminta, V=vénás vérminta 4 óra, és 6 óra után levéve,  $n=3$  a Szepszis Csoportban. (Az alkalmazott statisztikai teszt: Bonferroni féle One-way ANOVA ÉS Mann-Whitney teszt)

## 5.2.6 Vörösvérsejt aggregáció

A szeptikus csoportban a vörösvérsejt aggregációs index (AI%) csaknem konstans maradt a szepszis indukciót követő 4. óráig, majd csökkenni kezdett. A 6. órában vett minták vizsgálata során a kiindulási értékekkel és a kontroll csoport azonos idejű értékeivel összevetve a csökkenés mértéke szignifikáns volt. A  $p$  érték  $< 0,001$  a csoporton belüli,  $p = 0,003$  a kontrollhoz viszonyított artériás minták és  $p = 0,11$  a csoporton belüli és  $p = 0,02$  a kontroll vénás minták esetében. Ez a változás a vénás minták esetében volt kifejezettebb. Az amplitudó értékek markáns arterio-venozus különbséget mutattak mind a szeptikus, mind a kontroll csoportban. A csökkenés kifejezettebb volt a vénás vérmintákban, a szignifikancia szintet már a szepszis indukciót követő 2. órában elérte (2. óra:  $p = 0,001$  vs. kiindulási vénás minta; 4. óra:  $p < 0,001$  vs. kiindulási vénás minta; 6. óra:  $p = 0,02$  vs. kiindulási artériás minta és  $p = 0,043$  vs. kontroll csoport artériás minta; 6. óra:  $p < 0,001$  vs. kiindulási vénás minta és  $p = 0,029$  vs. kontroll csoport vénás minta). A  $t_{1/2}$  idő megnyúlt, valamint emelkedett a 6. órában a szeptikus sertésekben csoporton belül ( $p < 0,001$  vs. kiindulási minta) és a kontroll csoporthoz ( $P = 0,003$  vs. kontroll csoport) viszonyítva a vénás minták ( $p = 0,02$  vs. kiindulási minta;  $p = 0,002$  vs. kontroll csoport) és az artériás minták esetében is. (10. táblázat)

10. táblázat: A vörösvérsejt aggregációs paraméterek változása (aggregációs index, AI; amplitudó, Amp és aggregációs felezési idő,  $t_{1/2}$ ) a szeptikus és kontroll csoport artériás és vénás mintáiban

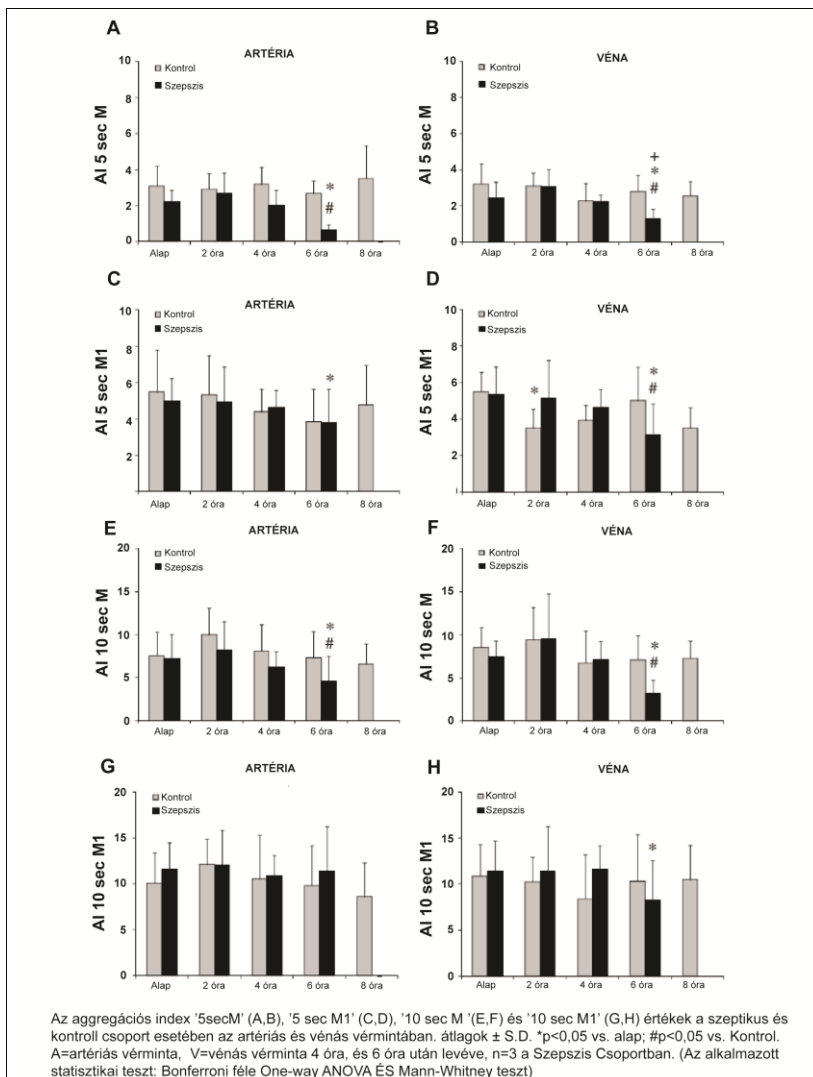
Változó	Csoport	Minta	Alap	2 óras	4 óras	6 óras	8 óras
AI [%]	Kontroll	A	67.39 ± 7.75	66.96 ± 3.48	64.65 ± 3.17	64.18 ± 5.4	61.09 ± 7.33
		V	67.28 ± 6.54	68.35 ± 2.93	61.36 ± 4.79	67.57 ± 2.34	66.77 ± 4.39
	Szepszis	A	63.64 ± 3.39	61.35 ± 6.24	62.21 ± 6.39	55.31 ± 2.85*#	–
		V	63.69 ± 2.78	62.75 ± 5.23	63.48 ± 5.12	51.43 ± 8.8*#	–
Amp	Kontroll	A	19.16 ± 1.67	20.61 ± 2.05	18.83 ± 3.43	20.52 ± 3.22	18.73 ± 2.63
		V	15.37 ± 0.67 <sup>+</sup>	15.4 ± 1.78 <sup>+</sup>	12.81 ± 2.84 <sup>+</sup>	12.96 ± 3.71 <sup>+</sup>	12.16 ± 2.45 <sup>+</sup>
	Szepszis	A	20.85 ± 1.08	19.63 ± 2.84	19.96 ± 3.78	16.39 ± 5.31*#	–
		V	17.76 ± 2.39 <sup>+</sup>	13.08 ± 3.03 <sup>++</sup>	10.93 ± 2.74 <sup>++</sup>	8.82 ± 1.44 <sup>++#</sup>	–
$t_{1/2}$ [s]	Kontroll	A	1.88 ± 0.81	1.8 ± 0.33	2 ± 0.35	2.11 ± 0.59	2.51 ± 0.93
		V	1.85 ± 0.67	1.68 ± 0.27	2.37 ± 0.57	1.75 ± 0.28	1.83 ± 0.43
	Szepszis	A	2.17 ± 0.35	2.49 ± 0.8	2.28 ± 0.64	3.19 ± 0.44*#	–
		V	2.16 ± 0.3	2.29 ± 0.61	2.23 ± 0.51	3.85 ± 1.48*#	–

átlagok ± S.D. \* $p < 0,05$  vs. alap; # $p < 0,05$  vs. Kontroll. A=artériás vérminta, V=vénás vérminta 4 óra, és 6 óra után levéve, n=3 a Szepszis Csoportban. (Az alkalmazott statisztikai teszt: Bonferroni féle One-way ANOVA ÉS Mann-Whitney teszt)

A Myrenne agglomerációval mért paraméterek esetében szintén egy csökkenő tendencia volt megfigyelhető a szeptikus állatok esetében a 4. és 6. órában. A különbség szignifikánsnak bizonyult a 6. órában a '5 sec M' (artériás minta:  $p < 0,001$  vs. kiindulási minta és kontroll csoport; vénás minta:  $p = 0,001$  vs. kiindulási minta és  $p = 0,002$  kontroll csoport; arterio-

venózus különbség:  $p=0,003$ ), '5 sec M1' (artériás minta:  $p=0,027$  vs. kiindulási minta; vénás minta:  $p<0,001$  vs. kiindulási minta és  $p=0,023$  vs. kontroll csoport), '10 sec M' (artériás minta:  $p=0,022$  vs. kiindulási minta, és  $p=0,028$  vs. kontroll csoport; vénás minta:  $p<0,001$  vs. kiindulási minta és kontroll csoport) index értékeinek esetében. A '10 sec M1' esetében csak a vénás mintáknál találtunk szignifikáns különbséget ( $p=0,027$  vs. kiindulási érték; arterio-venózus különbség:  $p=0,00053$ ) (24. ábra)

24. ábra: Az aggregációs index '5secM' (A,B), '5 sec M1' (C,D), '10 sec M' (E,F) és '10 sec M1' (G,H) értékek a szeptikus és kontroll csoport esetében az artériás és vénás vérmintában



### 5.2.7 Az in vitro vizsgálat eredményei

A fél dózis E.coli szuszpenzió 5-6%-os csökkenést okozott a vörösvérsejt számban, míg a teljes dózis esetén ez 13-15%-os volt. A két órás inkubációs időt követően az értékek enyhe

emelkedést mutattak. A vörösvérsejtek eloszlási szélessége (RDW-CV%) csak a keverés után változott, az inkubációs periódust követően fél dózis baktérium után 4-5%, a teljes dózis után 9-10% növekedés volt látható. Az MCV értékének a változása nem haladta meg a 2-4%-ot. Az aggregációs paraméterek fél dózis E. Coli szuszpenzió után enyhén csökkentek, míg a teljes dózis után valamennyi aggregációs paraméter romlani kezdett: az aggregációs index % és a Myrenne index értékek markánsan csökkentek, mely kifejezettebb lett a két órás inkubációs időt követően. Ugyanakkor a vörösvérsejt deformabilitás közepesen romlott. (11. táblázat)

11. táblázat: Az in vitro study rész eredményei: a szelektált hemoreológiai paraméterek változása normál vénás vérmintában (n=2), a fél dózis baktériummal, valamint a teljes dózissal kevert, és a két órás inkubációs idejű alminták esetében

Változó	Alap értékek	Fél dózis baktériummal keverés után	Teljes dózis baktériummal keverés után	Fél dózis baktériummal 2 órás inkubáció után	Teljes dózis baktériummal 2 órás inkubáció után
EI at 3 Pa	0.362 ± 0.003	0.350 ± 0.012	0.352 ± 0.001	0.342 ± 0.011	0.349 ± 0.001
EI <sub>max</sub>	0.509 ± 0.004	0.517 ± 0.004	0.510 ± 0.009	0.490 ± 0.008	0.485 ± 0.015
SS <sub>1/2</sub> [Pa]	1.38 ± 0.06	1.64 ± 0.17	1.55 ± 0.17	1.41 ± 0.16	1.37 ± 0.07
EI <sub>max</sub> / SS <sub>1/2</sub> [Pa <sup>-1</sup> ]	0.36 ± 0.01	0.31 ± 0.03	0.33 ± 0.04	0.35 ± 0.04	0.35 ± 0.02
minEI	0.112 ± 0.005	0.106 ± 0.014	0.096 ± 0.001	0.128 ± 0.001	0.103 ± 0.015
maxEI	0.498 ± 0.001	0.496 ± 0.003	0.486 ± 0.014	0.494 ± 0.005	0.482 ± 0.005
minO	192.5 ± 2.1	185.5 ± 2.1	185.5 ± 2	192.5 ± 0.7	189 ± 2.8
maxO	379.5 ± 14.8	361 ± 2.8	356.5 ± 7.7	371.5 ± 10.6	352.5 ± 4.9
AUC	115.9 ± 5.3	121.6 ± 3.8	113.2 ± 10.9	111.7 ± 9.5	109.7 ± 10.1
ΔEI	0.386 ± 0.015	0.390 ± 0.017	0.389 ± 0.023	0.365 ± 0.005	0.379 ± 0.02
ΔO	187 ± 16.9	175.5 ± 0.7	171 ± 5.65	179 ± 11.3	163.5 ± 7.7
ΔEI / ΔO *100	0.207 ± 0.027	0.222 ± 0.011	0.227 ± 0.006	0.204 ± 0.015	0.232 ± 0.023
AI%	59.31 ± 3.46	55.8 ± 2.9	46.12 ± 7.74	59.46 ± 8.45	47.77 ± 4.56
Amp	21.01 ± 0.29	15.87 ± 3.66	10.04 ± 6.87	15.8 ± 10.99	9.5 ± 7.28
t <sub>1/2</sub> [sec]	2.7 ± 0.44	3.17 ± 0.4	4.76 ± 1.54	2.69 ± 1.07	4.5 ± 0.83
5 sec M	3.06 ± 0.69	2.48 ± 0.65	1.4 ± 1.02	3.7 ± 0.97	1.68 ± 1.28
5 sec M1	6.17 ± 1.38	3.65 ± 1.14	2.7 ± 0.3	2.65 ± 0.78	1.82 ± 1.47
10 sec M	6.78 ± 1.72	7.68 ± 0.75	3.76 ± 1.88	10.5 ± 2.21	5.36 ± 4.68
10 sec M1	14.46 ± 7.63	11.38 ± 2.07	5.78 ± 1.87	10.63 ± 0.79	5.28 ± 4.59

átlag±S.D.

## 6. Megbeszélés

A szepszis továbbra is egy heterogén, nehezen differenciálható klinikai kórkép, melynek mortalitása a javuló terápiás lehetőségek ellenére is igen magas. Egy 2016-ban készült tanulmány globálisan próbálta a szepszis incidenciáját és mortalitását megbecsülni az utolsó 10 év adatai alapján. A feldolgozott adatok szerint évente világszerte 31,5 millió szeptikus, és 19,4 millió súlyos szeptikus beteg kezelése várható, mely 5,3 millió esetben halálos kimenetelű. (1) Egy fontos mérföldkövet lehet a hatékony gyógyszeres terápia fejlesztésében szepszis esetén egy megfelelő állatmodell létrehozása, mely a humán szepszis lefolyását és patomechanizmusát tökéletesen utánozza. Sajnos a legtöbb jelenleg erre a célra alkalmazott állatmodell félrevezető megállapításokat eredményez. Ennek egyik fontos oka, hogy a szepszis során a trauma vagy infekció hatására létrejövő génexpressziók jelentősen eltérnek a leggyakrabban alkalmazott kísérleti faj, az egér esetében, a humán génexpressziótól. Egy másik fontos tényező, hogy számos, a kísérleteknél alkalmazott állatfaj, egér, vagy pávián, rezisztens a bakteriális lipopoliszacharidokra, míg a humán szervezet ezekre kifejezetten szenzitív. (2)

A jelen vizsgálatunk során bakterémia modell által hoztunk létre gram negatív szepszist Hungahib sertésekben. A sertés modell jól használható a humán szepszis kutatásban, összehasonlítva a rágcsálókkal anatómiai és fiziológiai sajátosságai megközelítik a humán jellemzőket. A sertések mérete lehetővé teszi a humán klinikumban használt eszközök és monitorok használatát, és a megfelelő vérvolumenük miatt alkalmasak az ismételt mintavételekre és összehasonlító analízisekre, anélkül, hogy ez jelentősen befolyásolná a hemodinamikai paramétereket és a minták minőségét. Nem elhanyagolható, hogy a sertések szenzitivitása a lipopoliszacharidokra hasonló a humán érzékenységhez, összevetve pl. az egerek rezisztenciájával. (3, 4) A vizsgálat során a szepszis korai hemodinamikai és hemoreológiai konzekvenciáit vizsgáltuk anélkül, hogy bármilyen terápiás beavatkozást végeztünk volna, azaz tulajdonképpen a spontán szepszis kórlefutást kívántuk tanulmányozni. A szepszis indukciójához  $2,5 \times 10^5$  csíraszámú *E. coli* szuszpenziót alkalmaztunk,  $9,5 \times 10^6$  összdózisban. Számptalan szeptikus állatmodell létezik, mely során különböző technikát alkalmaznak a szepszis indukciójára. Az általunk használt bakterémia modell folyamatosan emelkedő koncentrációjú élő *E. coli* szuszpenzió intravénás injektálásával indukál szepszist. Hasonló módszert használtak Thorgesen és Castellheim munkacsoportjai is. Castellheim alacsony ( $4 \times 10^9$  baktérium összdózis) és magas ( $16 \times 10^9$  baktérium összdózis) dózissal élő *E. coli* szuszpenziót injektált vénásan és intrapulmonálisan

emelkedő koncentrációban viszonylag rövid időperiódus alatt sertésekbe, mely modell segítségével gram-negatív szepszist imitáltak. Hemodinamikailag a szeptikus csoportot markáns pulmonáris artériás nyomásemelkedés és szisztémás vérnyomásesés jellemezte. A hiperakutan kialakult pulmonális hipertenzió ideje szoros összefüggésben állt az E. coli infúzió kezdetével és a súlyossága közvetlenül összefüggött az adagolás rátájával. A szepszis kialakulását a hemodinamikai változók mellett az interleukin (IL)- 10, IL- 12, a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF) és a thrombin–antithrombin komplex (TAT) koncentrációjának emelkedése is megerősítette. (5) (6) Az általunk végzett vizsgálat során a korai fulmináns szepszis hemoreológiai és hemodinamikai hatásainak vizsgálatára fektettük a hangsúlyt. Sertésekben intravénás E. coli-val indukált szepszis modellen jelen ismereteink alapján nem vizsgálták eddig a korai hemoreológia eltéréseit, illetve hemodinamikai változásokat PiCCO monitor használatával.

A cardiac output monitorozás bevált módszer a klinikumban a kritikus állapotú betegek hemodinamikai monitorozására és a folyadék, vazopresszor és inotrop kezelés optimalizálására. Sertés szepszis modell hemodinamikai eltéréseinek vizsgálatára Schuerholz és munkacsoportja már sikeresen alkalmazta a folyamatos pulzus kontur cardiac output (PiCCO) monitorozást, de vizsgálatuk célja az eszköz pontos működéséhez szükséges kalibráció gyakoriságának meghatározása volt. A szepszis indukcióhoz coecotomia során nyert autológ székletet jutattak vissza a hasüregbe, a szepszis kialakulásának bizonyítéka a pozitív hemokultúra volt. (7) Baret és munkatársai polivalens immunglobulin hatását vizsgálta szeptikus sertés modellen E. coli intravénás infúzióját követően, melynek során artériás középnyomás és szisztémás vaszkuláris rezisztencia index csökkenést, valamint szívfrekvencia emelkedést figyeltek meg. (8) Pulmonális artériás katétert (PAC) alkalmazott a hemodinamikai monitorozásra Pranskunas és munkacsoportja, szintén intravénás E. coli infúzióval létrehozott szepszis modellen. Méréseik során a cardiac index a felére csökkent, a szisztémás vaszkuláris rezisztencia megduplázódott a szepszis indukcióját követően. (9) Chvojka és munkacsoportja peritonitis indukálta sertés szepszis modellt használtak a kísérletük során. Méréseiket a peritonitis indukciója után 12, 18 és 22 óra múlva végezték. A hemodinamikai monitorozáshoz szintén pulmonális artériás katétert (PAC) használtak. Szignifikáns eltérést a hemodinamikai paraméterek mérése kapcsán az obszerváció 12. órájában figyeltek meg, mely csökkent artériás középnyomás, cardiac output és szisztémás vaszkuláris rezisztencia, valamint emelkedett pulmonális artériás középnyomás és pulmonális éknyomás formájában jelentkezett. A hemodinamikai eltérések mellett pH csökkenést, IL-6 és

TNF-alfa emelkedést is tapasztaltak. Ez a peritonitisz indukálta szepszis modell relatíve gyorsan vezetett szepszis kialakulásához. (10)

Az általunk nyert eredmények jól összehasonlíthatóak az előbbi szeptikus sertés vizsgálatokkal. Vizsgálatunk során a szeptikus sokk kialakulása folyamatában az artériás középnyomás és a cardiac index csökkenését figyeltük meg, emelkedő tendenciájú pulzusszámmal. Emellett szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a stroke volumen variáció értékében a szeptikus állatok esetében. Itt kell azonban megjegyezni, hogy a kísérletünk során nem adtunk intravénás folyadékot az állatoknak, mivel a szepszis során bekövetkező hemodinamikai változások természetes lefolyását tanulmányoztuk terápiás intervenciók nélkül. Ez a magyarázata annak, hogy a kontroll csoport állatainál szintén észleltünk egy lassú artériás középnyomás csökkenést. Ha a kontroll állatok artériás középnyomás esését a kiindulási értékkel összevetettük, ez statisztikailag szignifikánsnak bizonyult, de a MAP értékek egy viszonylag stabil, 96-103 Hgmm-es tartományban maradtak. Az állatok anesztéziáját ketamin-xylazin kombinációval végeztük. Mivel a cardiac index analízise során a kísérlet ideje alatt a kontroll csoportban statisztikailag szignifikáns eltérést nem észleltünk, így a gyógyszerek okozta kardiodepresszív hatás kizárható volt.

Korábban több tanulmány is bizonyította, hogy az élő *E. coli* baktérium intravénás infúziójával korai kardiovaszkuláris összeomlást és a kísérleti állat korai halálát lehet okozni. Tracey és munkatársai páviánok esetében vizsgálta a cachectin (tumornekrózis faktor alfa, TNF-alfa) szerepét a szeptikus sokkban. Ehhez a kísérletükhöz letális dózisú (LD<sub>100</sub>) élő *E. coli* szuszpenziót infundáltak a szeptikus sokk indukciójához. A kontroll csoport állataiban ennek hatására hipotenzio, letális vese- és pulmonáris elégtelenség alakult ki. Ugyanezen modell esetében az állatok előkezelése TNF-alfa monoklonális antitesttel javította az állatok hemodinamikai paramétereit és a túlélést. (11) Kis emlős állatokban az *E. coli* alacsony dózisban több órán keresztül injektálva minimális hemodinamikai eltéréseket okozott, de magasabb dózisban bifázisos választ váltott ki. A korai cardiac output emelkedést a szepszis későbbi fázisában cardiac output csökkenés követte. (12) Szintén páviánok esetében szubletális és letális dózisú *E. coli* injektálása után Taylor és munkacsoportja figyelte meg súlyos disszeminált intravaszkuláris koagulopátia kialakulását, melyhez komplex inflammatorikus és hemosztatikus válasz társult. Ez magába foglalta a mikrovaszkulatura endotéljának és az antikoagulációs rendszernek a károsodását is. A folyamat összességében többszervi diszfunkcióhoz vezetett. (13) Dehring és munkatársai által sertéseken végzett vizsgálat során *E. coli*, *P. aeruginosa* (Gram-negatív) és *S. aureus* (Gram-pozitív) baktériumok injektálása után hasonlították össze a kiváltott szepszis következményeit. Azt tapasztalták,

hogy amíg a gram-pozitív baktérium minimális változást okozott a kiindulási állapothoz képest, az *E. coli* és *P. aeruginosa* sokkot és akut respiratorikus elégtelenséget váltott ki. (14) Egy septicus juh modellben a nem letális dózisú *E. coli* hiperdinám kardiovaszkuláris választ provokált hipotenzióval, megnövekedett cardiac output-tal, tachikardiával.(15) Kutyaiban mind a szubletális és a letális dózisú élő *E. coli* súlyos kardiovaszkuláris károsodást okozott hipotenzióval, nagyon alacsony cardiac output-tal, splanchnicus hipoperfúzióval, és súlyos metabolikus zavarral.(16) Az említett korábbi sepszis modellek alapján látható, hogy az intravénásan injektált *E. coli* által kiváltott hemodinamikai választ jelentősen befolyásolja a kísérlethez használt állatfaj is.(11,12,13,14,15,16)

Az egyértelmű, hogy az intravénás *E. coli* infúzió után kialakult septicus sokk karaktere eltér az egyéb septicus kísérleti modellektől. (19,20) Az általunk létrehozott fulmináns septicus sokk során egy fázisú hipodinám keringési paraméterek voltak megfigyelhetőek. Más sepszis modellek bifázisos válasszal jellemezhetőek, mely során először egy hiperdinám keringés alakul ki megnövekedett cardiac index-szel és cardiac output-tal, alacsony artériás középnyomással és szisztémás vaszkuláris rezisztencia index-szel. A későbbi, úgynevezett hipodinám fázisban pedig alacsony cardiac output és szisztémás vaszkuláris rezisztencia figyelhető meg.

Úgy tűnik, hogy az *E. coli* által kiváltott gyulladásos válasz közvetlenül a miokardium kontraktilitását befolyásolja. A cardiac index és a globális ejekciós frakció csökkenéséhez vezet a folyamat során, mely a hipodinám keringés vezető oka lehet. A hipodinám keringési válasz hatására kísérletünk során megfigyelhető volt egy azonnali mikrocirkulációs károsodás is, már a baktérium infúzió korai szakaszában. (21) Ugyanakkor a cerebrális perfúzió intakt maradt. (22) Az is megfigyelhető volt, hogy a romló hemodinamikai státusz miatt a laktát szint emelkedni kezdett, melyet a magas vörösvérsejtek számának emelkedése követett, mely egyértelmű szöveti hipoxiát jelzett. (23) Ebben a formában az intravénás *E. coli* infúzió egy fulmináns hipodinám sepszist váltott ki sertés modellünkben, mely szöveti hipoperfúzióhoz és hipoxiához vezetett. Wester és munkatársai inaktivált *N. meningitidis* használtak sertésekben sepszis indukciójához. A nyelv és a bőr mikrocirkulációjának vizsgálata esetében a sepszis indukció után 200 perccel alakultak ki a sepszis egyértelmű jelei. (24) Ez az inkubációs idő jól összevethető a saját kísérletünkben tapasztaltnal, mely során a fulmináns sepszis jelei az élő baktérium infúzió kezdetétől számított 2-4. órára datálhatók.

A septicus kardiomiopátia kialakulása jelenleg még nem teljesen tisztázott, annak ellenére, hogy 40 éve ismert probléma. (25) Számos tanulmány alapján a sepszis során kialakult

szeptikus kardiomiopátia akár 2-3-szoros mortalitás növekedést is okozhat. (26,27) A feltételezett mechanizmusok az inflammatorikus citokinek közvetlen miokardiumra kifejtett hatása, miokardium ödéma, megnövekedett oxidatív stressz, és az adrenerg receptorok csökkent expressziója, melyek szisztolés és diasztolés diszfunkcióhoz, valamint üregrendszeri dilatációhoz vezetnek. (26, 28, 29, 30) Az általunk végzett kísérlet során erre utalhat a csökkenő tendenciájú stroke volumen index mellett a cardiac index és a globális ejekciós frakció csökkenése is.

A hemodinamikai paraméterek mellett kísérletünk célja a hemoreológiai paraméterek változásának vizsgálata is volt a korai fulmináns szepszis folyamán. Számos tanulmány közölt megállapításokat az elmúlt évtizedekben a szepszis mikrocirkulációra és reológiai paraméterekre kifejtett hatásairól. Ezek közül a legtöbb a mikroreológiai állapot romlásáról számol be, úgy, mint csökkent vörösvérsejt deformabilitás, fokozott vörösvérsejt aggregáció. (31,32,33,34,35) A szepszis során a vörösvérsejt deformabilitást sok tényező befolyásolja. A 2,3-difoszfo-glicerát a belső viszkozitást és a membrán viszkoelaszticitását növeli. A nitrogén-monoxid megváltoztatja a sejt kalcium homeosztázisát, megnövelve az intracelluláris szabad  $Ca^{2+}$  ionok mennyiségét. A szialinsav mennyisége szepszis során csökken a vörösvérsejt membránjában, mely által megváltozik a sejt alakja, romlik a deformabilitás és növekszik a vörösvérsejt aggregáció. A fehérvérsejtek szabad oxigén gyököket, peroxidázokat, proteázokat szabadítanak fel, melyek megváltoztatják a membrán struktúrát, ezáltal rontva a deformabilitást, és fokozva az aggregációt. (33)

Kísérletes szepszis vizsgálata során Baskurt és munkatársai szeptikus és nem szeptikus patkányok vörösvérsejtek edotoxinnal történt inkubálása után demonstrálták, hogy a mikrohemoreológiai jellegzetességek, mint amilyen a vörösvérsejt deformabilitás vagy vörösvérsejt aggregáció, vizsgálata során a hőmérséklet, melyen a méréseket végzik, befolyásolja a kapott eredményeket.  $37^{\circ}C$ -on ektacitometrival végzett mérés során szignifikáns csökkenést figyeltek meg az elongációs index esetében. (36) Singh és Stolz egészséges önkéntesek vörösvérsejtjeit vizsgálva az elongációs index szignifikáns csökkenését igazolta a hőmérséklet  $37^{\circ}C$ -ról  $5^{\circ}C$ -ra változtatása során. (37) Piagnerelli és munkatársai szeptikus és egészséges vörösvérsejtekkel végzett flowcytometriás vizsgálatot. Megállapították, hogy a szeptikus vörösvérsejtek alakja kevésbé bikonkáv, inkább szferikus karakterű, de a minta hőmérséklete a vörösvérsejtek alakját nem befolyásolta (38).

Több vizsgálat is történt az egészséges és szeptikus vörösvérsejtek mikroreológiai paramétereinek összehasonlítására. Reggiori és munkatársai szeptikus betegek és egészséges önkéntesek vörösvérsejtjeit vizsgálták. A vörösvérsejt deformabilitása szignifikánsan

rosszabb volt a septicus betegek esetében különböző nyírófeszültségen vizsgálva. Az aggregációs index nőtt, a  $t_{1/2}$  rövidült a septicus betegcsoportban. Az elongációs index nagyságát csak a sepszis és a hematológiai társbetegségek befolyásolták. (39) Piagnerelli és munkacsoportja több kutatási eredményt is publikált, mely a sepszis vörösvérsejtre gyakorolt mikroreológiai hatásaival foglalkozik. Kritikus állapotú, intenzív osztályon kezelt betegek esetében a vörösvérsejt membrán proteinek arányának megváltozását írta le egészséges önkéntesek vörösvérsejtjeihez képest, de nem talált különbséget a septicus és nem septicus betegek vörösvérsejt membrán szkeletális fehérje összetételében. (40) Szintén Piagnerelli és munkacsoportja vizsgálta a membrán szialsav és glikoforin A tartalmát septicus betegek és egészséges önkéntesek bevonásával. A szialsav tartalmat nagy teljesítményű folyadék kromatográfiával, a glikoforin A tartalmat antiglikoforinnal határozták meg áramlási citometriával. Emellett értékelték a vörösvérsejt alakokat sferikális index alkalmazásával. A septicus vörösvérsejtek alakja inkább sferikus, mint biconkáv volt, a sferikális index szignifikánsan csökkent sepszisben. Kizárólag a septicus vörösvérsejteknek csökkent a sfericitás kapacitása hipoozmoláris környezetben. A septicus vörösvérsejtek membránjában szignifikánsan csökkent a szialsav tartalom, melynek hátterében az emelkedett neuraminidáz aktivitás állhat. Emellett a membrán glikoforin A tartalma magasabb volt. (41)

Számos humán sepszis vizsgálat történt a vér hemoreológiai paramétereinek változása és a kórállapot súlyossága, kimenetele közötti kapcsolat feltárására. Donadello és munkacsoportja 2015-ben megjelent tanulmányában egy prospektív study keretében septicus és nem septicus betegek lézer-aszisztált optikai rotációs sejtanalizátorral mért vörösvérsejt reológiai paramétereit hasonlította össze az intenzív osztályos felvétel 1. és 3. napján. A vörösvérsejt deformabilitás kifejezésére nyíró feszültség alapú elongációs indexet használtak, mely mellett az aggregációs indexet is meghatározták. A vizsgált betegcsoportban a septicus betegek mortalitása 31% volt. A vörösvérsejt deformabilitás már az intenzív osztályos felvétel idején rosszabb volt a septicus betegek esetében, a vizsgálat ideje alatt a nem túlélő septicus betegek esetén ez tovább romlott. A nem septicus betegcsoportban ez nem volt megfigyelhető. Az aggregációs index értékei a septicus betegek esetében magasabbak voltak, de ennek prognosztikai értéke nem igazolódott. Az ellátási idővel párhuzamosan csökkenő deformabilitás egyértelműen a septicus betegek rossz prognózisát jelezte előre. (42) Moutzouri és munkacsoportja is a vörösvérsejt deformabilitás prognosztikai jelentőségéről számolt be sepszisben egy 2007-ben megjelent tanulmányában. Nem csak a prognózis előrejelzésében, hanem a sepszis súlyosságának monitorozására is hasznos volt a klinikai gyakorlatban. Nozokomiális septicus betegeket válogattak be a study-ba a diagnózist követő

24 órán belül. A vörösvérsejt deformabilitás csökkenése egyértelmű volt a betegcsoportban, melynek mértéke a kórkép súlyosságát is kifejezte. A deformabilitás romlásának mértékét rigiditási index formájában adták meg. Az IR szignifikánsan magasabb volt mindegyik betegcsoportban, szepszis esetén 51%-kal, súlyos szepszis esetén 229%-kal, szepszis sokk esetén 1285%-kal, akut respirációs distressz szindróma esetén 923%-kal volt magasabb az egészséges kontroll csoport IR értékeihez képest. A vörösvérsejt rigiditási index szoros korrelációt mutatott az egyszerűsített akut fiziológiai pontrendszerrel (SAPS II) és a becsült mortalitással is. (43)

A leukociták nem csak a szepszis patofiziológiájában játszanak fontos szerepet, hanem jelentős hatással vannak a mikrocirkulációra is. A fehérvérsejtek marginációját erősen befolyásolja az eritrociták axiális migrációja. Jól ismert tény, hogy a vörösvérsejt aggregáció fokozza a fehérvérsejtek marginációját az endotél mentén. (44) Kirschenbaun és munkacsoportja szepszis során nem csak a vörösvérsejt deformabilitás csökkenését és a vörösvérsejt aggregáció növekedését figyelte meg, hanem fokozott neutrofil-trombocita interakciót és csökkent leukocita deformabilitást is. (45) Szintén hasonló eredményre jutott Yodice és munkacsoportja, megnövekedett fehérvérsejt aggregációt és csökkent neutrofil sejt deformabilitást írtak le súlyos szepszis és szepszis sokkos betegek esetében. (46)

Természetesen mikoreológiai eltérések nem csak szepszishez asszociáltan fordulnak elő. Számos tanulmány közölt hemoreológiai eltéréseket májbetegségekkel összefüggésben. Alkoholos máj cirrózisos betegek esetében csökkent teljes vér viszkozitást és plazma viszkozitást írtak le, csak úgy mint alacsonyabb hematokrit és fibrinogén koncentrációt. (47,48,49) Hepatitis B-s betegek esetében szignifikánsan magasabb teljes vér viszkozitásról és vörösvérsejt aggregációs indexről számoltak be egyes közlemények. (50) Egyes szerzők véleménye szerint a diabetes mellitus során szövődményként észlelt rossz szöveti perfúzió elsődlegesen a betegség során kialakult csökkent vörösvérsejt deformabilitásnak köszönhető. (51,52.)

Saját vizsgálatunkban a szepszis állapot csoportban folyamatosan csökkenő vörösvérsejt deformabilitást találtunk a kísérleti periódus folyamán. Az osmoscan paraméterek esetében ez szintén észlelhető volt. Az osmoscan görbe sejt deformabilitáshoz és membrán stabilitáshoz tartozó része, ami megfelel a min EI és max EI közötti területnek az idetartozó ozmotikus értékekkel együtt, mutatta a legmarkánsabb eltérést. A két pont közötti különbség egy fokozatosan romló tendenciát mutatott. Ez nem csak a csökkent deformabilitást, hanem valószínűleg a megváltozott ozmotikus mikrokönyezet sejtkárosító hatását is tükrözheti.

A korábbi tanulmányoktól eltérően saját vizsgálatunkban csökkenő tendenciájú aggregációs paramétereket figyeltünk meg. A kapott értékek alapján az aggregációs folyamat sebessége és intenzitása is alacsonyabb lett az élő E. coli szuszpenzió infúziót követő hatodik órában, habár a vörösvérsejt deformabilitás romlott. Ennek az ellentmondásos eredménynek az lehet a magyarázata, hogy az általunk végzett vizsgálat párhuzamosan zajlott a fulmináns szepszis korai fázisában a szeptikus sokk kialakulásával. Emellett nem zárható ki a véráramba emelkedő koncentrációban közvetlenül bekerülő élő baktériumoknak hatása az aggregációra kifejtett hatása sem. Ezért teszteltük az élő E. coli szuszpenzió hatását normál vérmintán is. Két normál vérmintához élő E. coli szuszpenziót kevertünk a szeptikus sertések véráramába bejuttatott teljes baktérium koncentrációnak megfelelő dózisban. Ezt a sertések kalkulált teljes vértérfogata alapján határoztuk meg. Az in vitro vizsgálat során azt tapasztaltuk, hogy a vörösvérsejt deformabilitás és aggregáció az in vivo vizsgálatnak megfelelően változott, mely a két órás inkubációs periódus során továbbra is megfigyelhető volt. Fontos azonban megjegyezni, hogy az általunk használt E. coli törzs hemolizint tartalmazott, mely béta hemolízist vált ki. Az in vivo vizsgálat során a vizsgálati periódusban nem észleltünk változást a vörösvérsejt számban és az MCV-ben. Az in vitro vizsgálatban viszont mind a vörösvérsejt szám, mind az MCV csökkeni kezdett az élő baktériumszuszenzió vérmintába keverése után. Nagyon jól ismert tény, hogy az E coli hemolizin károsítja a vörösvérsejt membránt azáltal, hogy gyűrű alakú heptaméter komplexekkel pórusokat képez a membránban. Ennek hatására a vörösvérsejtek az ozmózis miatt visszafordíthatatlanul megduzzadnak, és ez bizonyos idő után sejtlízishez vezet. A komplemetek jelenléte szintén szerepet játszik a vörösvérsejt károsodásban. Keshari és munkatársai által a C5 hasítás inhibitorátnak, egy makrociklikus peptidnek, a hatását vizsgálták pávián állatmodellen E. coli indukátá szepszis során. Megfigyelték, hogy a kontroll csoporttal összehasonlítva a C5 hasadás inhibitorral kezelt csoportban az első 24 óra során a vörösvérsejt konzumpció és hematokrit csökkenése csak minimális volt. A kezelés felfüggesztése után az enyhe csökkenés folytatódott, de a hemolízis látható jelei nélkül. (53) A vörösvérsejt károsodás okaként az endotoxinok közvetlen hatását is meg kell említeni. Pöschl és munkatársai Gram negatív kórokozó kiváltotta szepszis esetében, valamint egészséges önkéntesekből nyert vörösvérsejtek lipid A-val vagy lipopoliszahariddal történő inkubációja után vizsgálták a vörösvérsejt hydroxymyrist-sav tartalmát és a vörösvérsejt deformabilitást. A vörösvérsejt deformabilitás csökkent a Gram negatív szeptikus betegek esetében, valamint a mosott vörösvérsejtek lipid A-val és a teljes vér lipopoliszahariddal történő inkubálása után. A vörösvérsejt deformabilitás csökkenésének mértéke a membrán hydroxymyrist-sav tartalmának

emelkedésével szorosan összefüggött, ami arra utalhat, hogy az endotoxin kötődése a membránhoz közvetlenül a sejt mechanikai tulajdonságait befolyásolja. (54) Todd és munkatársai megfigyelték, hogy septicus betegek intracelluláris kalcium-ion szintje megemelkedik. Reprodukálható volt az eredmény *E. coli* endotoxin és teljes vér inkubációja során. In vitro ugyanebben a vizsgálatban igazolták, hogy a megemelkedett intracelluláris  $Ca^{2+}$  szintet nem lehetett kiküszöbölni verapamil használatával, de gátolható volt ATP előkezeléssel. Ebből arra következtettek, hogy egy energiahiányos állapot tehető feleőssé a megváltozott intracelluláris homeosztázisért. (55) Ruef és munkacsoportja egészséges önkéntesek vörösvérsejtjeit inkubált *E. coli* Lipid A endotoxinnal. Azt tapasztalták, hogy ennek hatására megnövekedett a citoszol  $Ca^{2+}$  koncentrációja, mellyel párhuzamosan romlott a vörösvérsejtek deformabilitása. A Lipid A hatás felfüggeszthető volt verapamil és a protein kináz inhibitor staurosporine-nal. (56)

A nitrogén-monoxid szerepét szintén régóta vizsgálják a septicus hemorreológiai eltérések hátterében. A sepszis során létrejövő hemoreológiai változások hátterében állhat a csökkent vörösvérsejt és leukocita deformabilitás és vörösvérsejt aggregáció, a koagulációs mechanizmusok zavara, valamint az indukálható nitrogén-monoxid szintetáz által termelt nitrogén-monoxid okozta hipotenzio. (57, 58, 59, 60) A NO-nak nagy valószínűséggel multifunkcionális szerepe lehet a mikrovaszkulatura károsodásában, megváltoztatja a vörösvérsejt deformabilitást, de emellett modulálja a szignál transzdukciós útvonalakat is a vörösvérsejtben. (61,62) Bateman és munkacsoportja patkányokon végzett kísérletük során cecalis ligáció és punkció modellel hozott létre patkányokban peritonitist és akut normotenzív sepszist. Ennek során demonstrálták, hogy a vázizomzatban szignifikánsan növekedett a „stopped flow capillary” denzitás 3-6 óra között a fekulens peritonitisz indukcióját követően. Ugyanebben a periódusban megnövekedett a szisztémás NO koncentráció, mely felhalmozódott a vörösvérsejtben. Emellett csökkent a vörösvérsejt deformabilitás, és kialakult egy csökkent deformabilitású vörösvérsejt populáció. Egy in vivo iNOS gátló, az aminoguanidin segítségével gátolták a NO termelést. Megfigyelték, hogy ennek hatására a NO koncentráció az alapértéken maradt, és megakadályozta mind a vörösvérsejt deformabilitás, mind a funkcionális kapilláris denzitás csökkenést. Eredményeik azt sugallják, hogy a sepszis során kialakuló funkcionális kapilláris denzitás csökkenés a NO mediálta eritrocita deformabilitás károsodásának következménye. (63) Az általunk megfigyelt vörösvérsejt aggregáció csökkenés ellentmondásos a világirodalmi adatokhoz képest. A vörösvérsejt aggregáció egy fő meghatározó faktora a vér viszkozitásának, leginkább alacsony nyírófeszültségen. A vörösvérsejt aggregáció által leginkább érintett a posztkapilláris venulák

területe, ahol az érkaliber már elég nagy, a nyíró feszültség pedig elég alacsony az aggregáció kialakulásához. A kapillárisok területén az áramlás meghatározóbb faktora a vörösvérsejt deformabilitása. Különböző állatkísérletek bizonyították, hogy a vörösvérsejt aggregáció szepszis és szeptikus sokk során gátolja a véráramlást a mikrocirkuláció területén. (64) Az általunk vizsgált fulmináns szepszis modell esetében a legtöbb korábbi vizsgálattal ellentétben csökkenő eritrocita aggregációt figyeltünk meg. A gyulladáshoz vezető betegségek, így a szepszis is, akut fázis reakcióval jellemezhető, mely során nagy mennyiségű C reaktív protein, fibrinogén, immunglobulin és alfa-2 makroglobulin termelődik. (65,66,67) A fibrinogén és egyéb nagy molekulású proteinek növekvő koncentrációja a vörösvérsejt aggregáció fokozódásához vezetnek. (68) Az általunk vizsgált fulmináns szepszis modell esetében a legtöbb korábbi vizsgálattal ellentétben csökkenő eritrocita aggregációt figyeltünk meg. Ugyanezen kísérlet alvizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a bőr mikrocirkuláció romlása egy nagyon korai fázisban, már a hemodinamikai paraméterek változása előtt bekövetkezett. Ennek magyarázata lehet a fibrinogén konzumpció, a megnövekedett NO koncentráció hatása, a baktérium endotoxinok direkt hatása a vörösvérsejtekre, a felszíni glikokalix szerekezetének megváltozása. Ez az eredmény azt sugallhatja, hogy a fulmináns szepszis esetében a reológiai változások eltérhetnek a lassan, fokozatosan kialakuló szepszis folyamat során kialakuló reológiai változásoktól. (69)

#### 6/1. Saját eredmények, önálló megállapítások

1. A nemzetközi irodalomban az első között tanulmányoztuk E. coli indukálta fulmináns szepszisben a kórfolyamat spontán, kezelés nélküli lezajlása során jellemző hemodinamikai és hemoreológiai paramétereket.
2. Megállapítottuk, hogy a folyamat során a cardiac index csökken, a szisztémás vaszkuláris rezisztencia és az intravaszkuláris tüdővíz index emelkedik, a stroke volumen variáció csökken. Ennek alapján a kísérletes összeállításunk a hipodinám szeptikus folyamatok modellezésére alkalmas.
3. Megállapítottuk, hogy a baktériumok beadását követően a fulmináns szepszis modellben az erithrocyták deformabilitása és aggregációja a szepszis első óráiban csökkent. A direkt bakteriális hatást in vitro tesztekkel is meg lehetett erősíteni.
4. Tekintettel arra, hogy vizsgálatainkban a szepszis spontán lefolyását vizsgáltuk, mindenféle terápiás beavatkozás nélkül, vizsgálataink alapját képezhetik a hipodinám szepszis tanulmányozását célzó további experimentális vizsgálatoknak, és különösen azoknak, amelyek terápiás beavatkozásokat kívánnak tesztelni.

## 7. Irodalmi hivatkozások

1. Fleischmann C., Hartmann M.: Epidemiology of Sepsis in Germany: Incidence, Mortality And Associated Costs of Care 2007-2013. *Intensive Care Med Exp.* 2015 Dec; 3(Suppl 1): A50
2. Fleischmann C., Scherag A. : Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *Am J Respir Crit Care Med.* 2016 Feb 1;193(3):259-72.
3. Vincent J.L., Jones G.: Frequency and mortality of septic shock in Europe and North America: a systematic review and meta-analysis. *Critical Care* 2019; 23:196  
4.encyclopedia.com
5. Osler W.: The principles and practice of medicine. New York: D. Appleton and Co.; 1892.pp.160-165.
6. Ward N.S., Levy M.M. : Sepsis. Definitions, Pathophysiology, and the Challenge of bedside management. Springer 2017; D. Banerjee D., Levy M.M. Chapter 2. Sepsis definitions P:7-24
7. Bone R.C., Balk R.A.: Definitions for Sepsis and Organ Failure and Guidelines for the Use of Innovative Therapies. *Chest* 1992;101(6) : 1644–1655
8. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference Committee. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis  
*Crit Care Med*, 1992; 20: 864-874
9. Gül F., Arslantas M. K.: Changing Definitions of Sepsis Fethi Gül, *Turk J Anaesthesiol Reanim* 2017; 45(3): 129–138
10. Levy M.M., Fink M.P.: 2001 SCCM/ ESICM/ ACCP/ ATS/ SIS international sepsis definitions conference  
*Intensive Care Med* 2003; 29: 530-538
11. Singer M., Deutschman C. S.: The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016; 315: 801-810
12. Jimenez E: Shock. *Critical Care*, 3rd Ed., edited by Civetta JM, Taylor RW, Kirby RR, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins,1997 , pp359– 387)

13. <https://emedicine.medscape.com/article/168402-overview>
14. Hierholzer C., Billiar T. R. : Nitric oxide in trauma and sepsis. Surgical Treatment: Evidence-Based and Problem-Oriented. Holzheimer RG, Mannick JA, editors. Munich; 2001. Zuckschwerdt (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6909/>)
15. Morris S. M. Jr, Billiar T R.: New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am J Physiol.* (1994);266:E829–E839.
  
16. Young J.D. : The heart and circulation in severe sepsis . *BJanaesthesia* 2004; 93:114-120
17. Russel J.A., Barret R., Boyd J. : Pathophysiology of Septic Shock. *Critical Care Clinics* 2018; 34 (1): 43-61
18. Landry D.W., Oliver J.A.: The pathogenesis of vasodilatory shock. *N Engl J Med.* 2001; 345(8):588-595
19. Thiemeermann C. The role of the L-arginine: nitric oxide pathway in circulatory shock. *Adv Pharmacol.* 1994;28:45–79
  
20. Kim Y M, Hong S J, Billiar T R, Simmons R L. Counterprotective effect of erythrocytes in experimental bacterial peritonitis is due to scavenging of nitric oxide and reactive oxygen intermediates. *Infect Immun.* 1996;64:3074–3080
  
21. Weinbaum S., Tarbell JM., Damiano ER.: The structure and function of the endothelial glycocalyx layer. *Annu Rev Biomed Eng.* 2007;9:121–167
  
22. Zuurbier C, Vink H, Koeman A, Demirci C, Ince C. : Short-term hyperglycemia increases endothelial glycocalyx permeability and decreases lineal density of capillaries with flowing red blood cells . *J Appl Physiol* 2005; 99...1471-6
  
23. Rubio-Gayosso I, Platts SH, Duling BR. Reactive oxygen species mediate modification of glycocalyx during ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;290:2247–2256
  
24. Bolon ML., Peng T., Kidder GM., Tyml K. : Lipopolysaccharide plus hypoxia and reoxygenation synergistically reduce electrical coupling between microvascular endothelial cells by dephosphorylating connexin40. *J Cell Physiol.* 2008;217:350–359

25. Camicia G, Pozner R, de Larrañaga G. :Neutrophil extracellular traps in sepsis. *Shock*. 2014;42:286–294.
26. Ince C., Mayeux PR. :The Endothelium in Sepsis.*Shock* 2016; 45(3):259-270
27. Simmons J.:The Coagulopathy of Acute Sepsis. *Curr Opin Anaesthesiol*. 2015 Apr; 28(2): 227–236.
28. Creasey AA, Chang AC, Feigen L, et al. : Tissue factor pathway inhibitor reduces mortality from *Escherichia coli* septic shock. *The Journal of clinical investigation*. 1993;91(6):2850–60.
29. Taylor FB, Jr, Chang A, Ruf W, et al. Lethal *E. coli* septic shock is prevented by blocking tissue factor with monoclonal antibody. *Circulatory shock*. 1991;33(3):127–34.
30. Dhainaut JF, Yan SB, Joyce DE, et al.: Treatment effects of drotrecogin alfa (activated) in patients with severe sepsis with or without overt disseminated intravascular coagulation. *Journal of thrombosis and haemostasis*. 2004;2(11):1924–33.
31. Van der Poll T, Buller HR, ten Cate H, et al. : Activation of coagulation after administration of tumor necrosis factor to normal subjects. *N Engl J Med* 1990;322(23):1622–7.
32. Sanjeev Palta:Overview of the coagulation system *Indian J Anaesth*. 2014; 58(5): 515–523.)
33. Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM, et al. : The platelet-activating factor signaling system and its regulators in syndromes of inflammation and thrombosis. *Critical care medicine*. 2002;30(5):294–301
34. Mosad E, Elsayh KI, Eltayeb AA.: Tissue factor pathway inhibitor and P-selectin as markers of sepsis-induced non-overt disseminated intravascular coagulopathy. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*. 2011;17(1):80–7.
35. Semeraro F, Ammollo CT, Morrissey JH, et al.: Extracellular histones promote thrombin generation through platelet-dependent mechanisms: involvement of platelet TLR2 and TLR4. *Blood*. 2011; 18;118(7):1952-61.
36. Hoffman M, Monroe DM., 3rd A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost*. 2001;85(6):958–65.
37. Simmons J.:The Coagulopathy of Acute Sepsis *Curr Opin Anaesthesiol*. 2015; 28(2): 227–236.

38. Esmon CT.: The endothelial cell protein C receptor. *Thromb Haemost.* 2000; 83 (5):639-43.
39. Levi M.:The coagulant response in sepsis and inflammation. *Hamostaseologie.* 2010; 30(1):10-2, 14-6.
40. Faust S N. Dysfunction of endothelial protein C activation in severe meningococcal sepsis. *N Engl J Med.* 2001; 345(6):408-16.
41. Guitton C.: Early rise in circulating endothelial protein C receptor correlates with poor outcome in severe sepsis. *Intensive Care Med.* 2011; 37(6):950-6.
42. Wiersinga W.J., Levi M., van der Poll T.: Coagulation in Sepsis. Mechanisms of Sepsis-Induced Organ Dysfunction and Recovery 273-285 Update in Intensive Care and Emergency Medicine book series (volume 44) 2007. Springer.
43. Levi M., van der Poll T., Büller H.R.: Bidirectional relation between inflammation and coagulation. *Circulation.* 2004; 109(22):2698-704.
44. G. Tulli: Blood Coagulation During Sepsis and Septic Shock: Is There Still Room for Anticoagulants? *Practical Trends in Anesthesia and Intensive Care* 2017; 43-76 Springer
45. Nguyen TC: Intensive plasma exchange increases a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs-13 activity and reverses organ dysfunction in children with thrombocytopenia-associated multiple organ failure. *Crit Care Med.* 2008; 36(10):2878-87.
46. van Deventer SJ, Büller HR: Experimental endotoxemia in humans: analysis of cytokine release and coagulation, fibrinolytic, and complement pathways. *Blood.* 1990; 76(12):2520-6.
47. Noel P, Cashen S, Patel B : Trauma-induced coagulopathy: from biology to therapy. *Semin Hematol.* 2013; 50(3):259-69.
48. Mutch NJ, Engel R.: Polyphosphate modifies the fibrin network and down-regulates fibrinolysis by 5attenuating binding of tPA and plasminogen to fibrin. *Blood.* 2010; 115(19):3980-8.)
49. Campbell RA, Overmeyer KA: Contributions of extravascular and intravascular cells to fibrin network formation, structure, and stability. *Blood.* 2009; 114(23):4886-96.
50. Semeraro N, Ammollo CT: Sepsis, thrombosis and organ dysfunction. *Thromb Res.* 2012; 129(3):290-5.
51. Drazenovic R, Samsel RW, Wylam ME, Doerschuk CM, Schumacker PT. Regulation of perfused capillary density in canine intestinal mucosa during endotoxemia. *J Appl Physiol.* 1992;72:259–65
52. Chernow B, Rainey TG, Lake CR. Endogenous and exogenous catecholamines in critical care medicine. *Crit Care Med.* 1982;10:409–16.

53. Bateman R.M, Sharpe M.D., The effect of sepsis on the erythrocyte. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(9): 1932.
54. Moisă E. , Negoită S.,Corneci D.:Understanding red blood cell rheology in sepsis and its role in clinical practice. From biomolecular aspects to possible therapeutic interventions. *Central Eur J Clin Res* 2018;1(1):40-58
55. Morikawa M., Inoue Y, Leukocyte deformability is a novel biomarker to reflect sepsis-induced disseminated intravascular coagulation *Acute Med Surg.* 2015 Jan; 2(1): 13–20
56. Zarbock A, Ley K.: Neutrophil adhesion and activation under flow. *Microcirculation.* 2009;16:31–42.
57. Imm A, Carlson RW. Fluid resuscitation in circulatory shock. *Crit Care Clin* 1993; **9**: 313-333.
58. Marx G.: Fluid therapy in sepsis with capillary leakage. *European Journal of Anaesthesiology*: 2003; 20 (6) : 429-442
59. Groeneveld AB, Bronsveld W, Thijs LG. Hemodynamic determinants of mortality in human septic shock. *Surgery* 1986; **99**: 140-153.
60. Osamu H., Jancy S.: Role of endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide in activation and dysfunction of cerebrovascular endothelial cells during early onsets of sepsis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008; 295(4):1712–1719
61. Opal SM, Garber GE, LaRosa SP, Maki DG, Freebairn RC, Kinasewitz GT, Dhainaut JF, Yan SB, Williams MD, Graham DE, Nelson DR, Levy H, Bernard GR. Systemic host responses in severe sepsis analyzed by causative microorganism and treatment effects of drotrecogin alfa (activated) *Clin Infect Dis.* 2003;37(1):50–58.
62. Opal SM, Cohen J. Clinical Gram-positive sepsis: does it fundamentally differ from gram-negative bacterial sepsis? *Crit Care Med.* 1999;27:1608–1616.
63. Buerke M, Sibelius U, Grandel U, Buerke U, Grimminger F, Seeger W, Meyer J, Darius H. Staphylococcus aureus alpha toxin mediates polymorphonuclear leukocyte-induced vasoconstriction and endothelial dysfunction. *Shock.* 2002;17:30–35.
64. Legrand M., Klijn E.: The response of the host microcirculation to bacterial sepsis: does the pathogen matter? *J Mol Med.* 2010; 88(2): 127–133
65. Russell WMS, Burch RL. 1959. (reprinted 1992). The principles of humane experimental technique. Wheathampstead (UK): Universities Federation for Animal Welfare.

66. Fink M.P. Animal models of sepsis and the multiple organ dysfunction syndrome. In:Souba WW, Wilmore DW, editors. Surgical Research. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2001. pp.875-891
67. Fink, M. P., Heard, S. O.: Laboratory models of sepsis and septic shock. *J. Surg. Res.* 1990;(49): 186–196 .
68. Deitch, E. A.: Animal models of sepsis and shock: a review and lessons learned. *Shock* 1998;(9): 1–11
69. Fink MP and Heard SO. Laboratory models of sepsis and septic shock. *J Surg Res* 1990;49:186-196
70. Deitch EA. Animal models of sepsis and shock: a review and lessons learned. *Shock* 1998;9:1-11.
71. Deitch EA. Rodent models of intra-abdominal infection. *Shock* 2005;24:19-23.
72. Sudhir V.: Laboratory Animal Models to Mimic Human Sepsis. A Review Research and Reviews: *Journal of Zoological Sciences.* 2016.; 4(2):34-39
73. Baystone K.F., Cohen J.: Bacterial endotoxin and current concepts in the diagnosis and treatment of endotoxaemia. *J. Med. Microbiol.* 1990; (31):73-83
74. <https://hu.wikipedia.org/wiki/Endotoxin>
75. Solov'eva T., Davydova V.: Marine compounds with therapeutic potential in Gram-negative sepsis. *Mar Drugs.* 2013;11(6):2216-2229.
76. Fink, M.P., Heard, S.O.: Laboratory models of sepsis and septic shock. *J Surg Res*,1990; 49:186-196
77. Hurley, J.G., Guidet, B.: Endotoxaemia and mortality prediction in ICU and other settings: underlying risk and co-detection of gram negative bacteremia are confounders. *Crit Care*,2012;16(4):148
78. Copeland, S.: Acute Inflammatory Response to Endotoxin in Mice and Humans. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005; 12(1): 60–67
79. Brackett, D.J., Schaefer, C.F., Tompkins, P., Fagraeus, L., Peters, L.J. , Wilson, M.F.: Evaluation of cardiac output, total peripheral resistance, and plasma concentration of vasopressin in the conscious unrestrained rat during endotoxemia. *Circ Shock*, 1985; 17:273-84.
80. Wyler, F., Neutze, J.M. and Rudolph, A.M.: Effects of endotoxin on distribution of cardiac output in unanesthetized rabbits. *Am J Physiol*, 1970;219:246-51.

81. Reidy, J., Wright, I., Boom, S.J., Barclay, R., Di Padova, F. and Ramsay, G., Prevention of cardiovascular effects of endotoxaemia by monoclonal antibodies specific for core endotoxin. *Br J Surg* 1992;79(10):1087-90.
82. Fink, M.P., Morrissey, P.E., Stein, K.L., Clement, R.E., Fiallo, V. and Gardiner, W.M.: Systemic and regional hemodynamic effects of cyclo-oxygenase and thromboxane synthetase inhibition in normal and endotoxemic rabbits. *Circulatory Shock*, 1988; 26:41-57
83. Esbenshade, A. M., Newman, J.H., Lams, P. M., Jolles, H. and Brigham, K.L.: Respiratory failure after endotoxin infusion in sheep: lung mechanics and lung fluid balance. *J Appl Physiol Respir Environ & Physiol*,1982; 53:967-976.
84. Talke, P., Dunn, A., Lawlis, L., Sziebert, L., White, A., Herndon, D., Flynn, J.T. and Traber, D., A model of ovine endotoxemia is characterized by an increased cardiac output. *Circ Shock*,1985; 17:103-8.
85. Sugi, K., Newald, J., Traber, L.D., Maguire, J.P., Herndon, D.N., Schlag, G. and Traber, D.L., Cardiac dysfunction after acute endotoxin administration in conscious sheep. *Am J Physiol*, 1991;260:1474-1481.
86. Fish, R.E. and Spitzer, J.A., Continuous infusion of endotoxin from an osmotic pump in the conscious, unrestrained rat: a unique model of chronic endotoxemia. *Circ Shock*, 1985; 12:135-149,
87. Fish, R.E., Burns, A.H., Lang, C.H. and Spitzer, J.A.: Myocardial dysfunction in a nonlethal, nonshock model of chronic endotoxemia. *Circ Shock*, 1985; 16(3):241-252
88. Warren HS, et al.: Resilience to bacterial infection: difference between species could be due to proteins in serum. *J Infect Dis*. 2010;201:223–232.
89. Liang X, et al.: Hemopexin down-regulates LPS-induced proinflammatory cytokines from macrophages. *J Leukoc Biol*. 2009;86:229–235.
90. Galanos, C., Freudenberg, M. A., Reutter, W.: Galactosamine-induced sensitization of the lethal effects of endotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1979; (76): 5939–5943.
91. Pfeffer, K. et al. Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell*. 1993;73: 457–467.
92. Rothe, J. et al. Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. *Nature*, 1993;364, 798–802.
93. Bozza, M. et al.: Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis. *J. Exp. Med*. 1999;189:341–346.

94. Xu, H. et al.: Leukocytosis and resistance to septic shock in intercellular adhesion molecule 1-deficient mice. *J. Exp. Med.* 1994;180:95–109.
95. Cross, A. S., Opal, S. M., Sadoff, J. C., Gemski, P. : Choice of bacteria in animal models of sepsis. *Infect. Immun.*1993; 61, 2741–2747.
96. Sato, T., Isoyama, T., Tanaka, J., Jones, R.T., Cowley, R.A. and Trump, B.F.:The pathophysiology of septic shock: changes in hemodynamics in rats following live E coli injection. An application of the thermodilution method for measurement of cardiac output. *Adv Shock Res*, 1982;7:25-42, 1982.
97. Taylor, F.B.: Staging of the pathophysiologic responses of the primate microvasculature to *Escherichia coli* and endotoxin: Examination of the elements of the compensated response and their links to the corresponding uncompensated lethal variants. *Crit Care Med*, 2001;29:S78-89.
98. Espat, N.J., Cendan, J.C.,Beierle, E.A., Auffenberg, T.A., Rosenberg, J., Russel, D., Kenney, J.S., Fisher, E., Montegut, W., Lowry, S.F., Copeland, E.M., Moldawer, L.L.: PEG-BP-30 Monotherapy attenuates the cytokine-mediated inflammatory cascade in baboon *Escherichia coli* septic shock. *J Surg Res*, 1995;59:153-8.
99. de Boer, J.P., Creasey, A.A., Chang, A., Abbink, J.J., Roem, D., Eerenberg, A.J., Hack, C.E.,Taylor, F.B. Jr.: Alpha-2- macroglobulin functions as an inhibitor of fibrinolytic, clotting, and neutrophilic proteinases in sepsis: studies using a baboon model. *Infect Immun*,1993; 61(12):5035-5043.
100. Rubins, J. B., Pomeroy, C.: Role of  $\gamma$ -interferon in the pathogenesis of bacteremic pneumococcal pneumonia. *Infect. Immun.* 1997; 65, 2975–2977.
101. Sawa, T. et al.: IL-10 improves lung injury and survival in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *J. Immunol.* 1997; 159, 2858–2866.
102. Kohler, J. et al. : IFN- $\gamma$  involvement in the severity of gram-negative infections in mice. *J. Immunol.*1993; 151, 916–921.
103. Sasaki, S. et al.: Interleukin-4 and interleukin-10 are involved in host resistance to *Staphylococcus aureus* infection through regulation of  $\gamma$ -interferon. *Infect. Immun.* 2000; 68, 2424–2430.
104. Silva, A. T., Cohen: J. Role of interferon- $\gamma$  in experimental gram-negative sepsis. *J. Infect. Dis.*1992; 166, 331–335.
105. Dehring, D.J., Crocker, S.H., Wismar, B.L., Steinberg, S.M., Lowery, B.D., Cloutier, C.T.: Comparison of live bacteria infusions in a porcine model of acute respiratory failure.1983; *J Surg Res*, 34:151-158, 1983.

106. Lagoam, C.E., De Figueiredo, L.F., Cruz, R.J. Jr., Silva, E. and Rocha, E.S.M.: Effects of volume resuscitation on splanchnic perfusion in canine model of severe sepsis induced by live *Escherichia coli* infusion. *Crit Care*,2004; 8:221-228, 2004.
107. Buras J.A.,Holzmann B., Sitkovsky M.: Animal Models of sepsis: setting the stage. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2005;4:854–865.
108. Zanetti, G. et al.: Cytokine production after intravenous or peritoneal gram-negative bacterial challenge in mice. Comparative protective efficacy of antibodies to tumor necrosis factor- $\alpha$  and to lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 1992;148, 1890–1897.
109. Greenberger, M. J. et al.: Neutralization of IL-10 increases survival in a murine model of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Immunol.*1995; 155, 722–729 .
110. van der Poll T., MarchantA ., Keogh C. V., Goldman M., Lowry S. F.: Interleukin-10 impairs host defense in murine pneumococcal pneumonia. *J. Infect. Dis.*1996; 174, 994–1000
111. van der Poll, T. et al.: Endogenous IL-10 protects mice from death during septic peritonitis. *J. Immunol.* 1995;155, 5397–5401.
  
112. Moore T. A., Perry M. L., Getsoian A. G., Newstead, M. W., Standiford T. J.: Divergent role of  $\gamma$ -interferon in a murine model of pulmonary versus systemic *Klebsiella pneumoniae* infection. *Infect. Immun.* 2002; 70, 6310–6318.
  
113. Popov D., Pavlov G.: Sepsis models in experimental animals. *Trakia Journal of Sciences*, 2013;1,13-23.
  
114. Imamura M., Clowes G.H. Jr: Hepatic blood flow and oxygen consumption in starvation, sepsis and septic shock. *Surg Gynecol Obstet*,1975: 141:27-34.
  
115. Wichterman K.A., Baue A.E. and Chaudry I.H.: Sepsis and septic shock - a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res*,1980; 29:189-201, 1980.
  
116. Baker, C.C., Chaudry, I.H., Gaines, H.O., Baue, A.E.: Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine cecal ligation and puncture model. *Surgery*,1983; 94:331-335.
  
  
- 117.Rittirsch D., Huber-Lang M.S., Flierl M.A., Ward P.A.: Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nature Protocols*, 2009;4, 31–36.
  
118. Ebong, S., Call, D., Nemzek, J., Bolgos, G., Newcomb, D. and Remick, D.: Immunopathologic alterations in murine models of sepsis of increasing severity. *Infect Immun*, 1999;67:6603-6610.

119. Wang, P., Wood, T.J., Ba, Z.F. and Chaudry I.H.: Pentoxifylline maintains vascular endothelial cell function during hyperdynamic and hypodynamic sepsis. *Surgery*, 1996;120(2):367-73.
120. Ruiz S., Vardon-Bouines F.: Sepsis modeling in mice: ligation length is a major severity factor in cecal ligation and puncture. *Intensive Care Medicine Experimental* 2016; (4)22:2-13.
121. Remick, D. G., Bolgos, G. R., Siddiqui, J., Shin, J., Nemzek, J. A.: Six at six: interleukin-6 measured 6 h after the initiation of sepsis predicts mortality over 3 days. *Shock* 2002;17, 463-467.
122. Latifi, S. Q., O'Riordan, M. A., Levine, A. D.: Interleukin-10 controls the onset of irreversible septic shock. *Infect. Immun.* 2002;70, 4441–4446.
123. Murphey IE.D.: CLP-induced impairment of innate immune function is caused by exposure to the cecal luminal contents and not the tissue trauma or tissue ischemia/necrosis components. *Microbes and Infection*.2012; 14(1),35-42. 124.
124. Zantl N, Holzmann B, Pfeffer K, Heidecke C-D.: Colon ascendens stent peritonitis (CASP): a novel surgical model for the induction of bacterial peritonitis/sepsis in mice. The immune consequences of trauma, shock and sepsis. Bologna, Italy: Monduzzi Editore; 1997;467–471.
125. Zantl N.: Essential Role of Gamma Interferon in Survival of Colon Ascendens Stent Peritonitis, a Novel Murine Model of Abdominal Sepsis. *Infect Immun.* 1998; 66(5): 2300–2309.
126. Traeger T, Koerner P, Kessler W, et al. Colon ascendens stent peritonitis (CASP)--a standardized model for polymicrobial abdominal sepsis. *J Vis Exp.* 2010;(46):2299.
127. Maier S, Traeger T, Entleutner M, et al. Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis. *Shock.* 2004;21(6):505-511.
128. Emmanuilidis K., Weighardt H., Maier S., Gerauer K., Fleischmann T., Zheng X.X., Hancock W.W., Holzmann B., Heidecke C-D.: Critical Role of Kupffer Cell-Derived IL-10 for Host Defense in Septic Peritonitis. *J Immunol*, 2001; 167 (7) 3919-3927
129. Weighardt, H. et al.: Impaired monocyte IL-12 production before surgery as a predictive factor for the lethal outcome of postoperative sepsis. *Ann. Surg.* 2002; 235, 560–567.
130. Entleutner, M. et al.: Impact of interleukin-12, oxidative burst, and iNOS on the survival of murine fecal peritonitis. *Int. J. Colorectal Dis.*2006; 21(1):64-70.
131. <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Tokyo.png>
132. Lipowsky HH.: Mechanics of blood flow in the microcirculation. In: Skalak R, Chien S, editors. *Handbook of Bioengineering*. New York: McGraw-Hill; 1987; 18–25.

133. Nichols WW, O'Rourke MF. McDonald's Blood Flow in Arteries Theoretical, Experimental and Clinical Principles. 4th ed. London: Arnold; 1988.
134. Dinnar U. Cardiovascular Fluid Dynamics. Boca Raton: CRC Press; 1981.
135. Yang WJ. Biothermal-Fluid Sciences Principles and Applications. New York: Hemisphere Pub. Corp; 1989.
136. Munson BR, Young DF, Okiishi TH, Huebsch WW. Fundamentals of Fluid Mechanics. 6th ed. New York: John Wiley & Sons; 2009
137. Cho YI, Cho DJ. Hemorheology and microvascular disorders. *Korean Circ J*. 2011;41(6):287-295.
138. Nichols WW, O'Rourke MF. McDonald's Blood Flow in Arteries Theoretical, Experimental and Clinical Principles. 4th ed. London: Arnold; 1988.;
139. Dinnar U. Cardiovascular Fluid Dynamics. Boca Raton: CRC Press 1981.
140. Fung YC. Biomechanics. New York: Spriner-Verlag; 1981.
141. de Simone G, Devereux RB, Chien S, Alderman MH, Atlas SA, Laragh JH. Relation of blood viscosity to demographic and physiologic variables and to cardiovascular risk factors in apparently normal adults. *Circulation*. 1990;81:107–117.
142. Ditzel J, Kampmann J. Whole-blood viscosity, hematocrit and plasma protein in normal subjects at different ages. *Acta Physiol Scand*. 1971;81:264–268.
143. Rosenson RS, McCormick A, Uretz EF. Distribution of blood viscosity values and biochemical correlates in healthy adults. *Clin Chem*. 1996;42:1189–1195.
144. Mayer GA. Blood viscosity in healthy subjects and patients with coronary heart disease. *Can Med Assoc J*. 1964;91:951–954.
145. Letcher RL, Chien S, Pickering TG, Sealey JE, Laragh JH. Direct relationship between blood pressure and blood viscosity in normal and hypertensive subjects: role of fibrinogen and concentration. *Am J Med*. 1981;70:1195–1202.
146. Litwin MS, Chapman K, Stoliar JB. Blood viscosity in the normal man. *Surgery*. 1970;67:342–345.
147. Rand PW, Lacombe E, Hunt HE, Austin WH. Viscosity of normal human blood under normothermic and hypothermic conditions. *J Appl Physiol*. 1964;19:117–122.
148. Chien S. Blood rheology in myocardial infarction and hypertension. *Biorheology*. 1986;23:633–653.
149. Lee BK, Durairaj A, Mehra A, Wenby RB, Meiselman HJ, Alexy T. Microcirculatory dysfunction in cardiac syndrome X: role of abnormal blood rheology. *Microcirculation*. 2008;15:451–459.

150. Tsuda Y, Satoh K, Kitadai M, Takahashi T. Hemorheologic profiles of plasma fibrinogen and blood viscosity from silent to acute and chronic cerebral infarctions. *J Neurol Sci.* 1997;147:49–54.
151. Coull BM, Beamer N, de Garmo P, et al. Chronic blood hyperviscosity in subjects with acute stroke, transient ischemic attack, and risk factors for stroke. *Stroke.* 1991;22:162–168.
152. Cokelet GR, Meiselman HJ. Macro- and micro-rheological properties of blood. In: *Handbook of Hemorheology and Hemodynamics.* Baskurt OK, Hardeman MR, Rampling MW, Meiselman HJ, IOS Press, Amsterdam, 2007; 45–71.
153. Stoltz JF, Singh M, Riha P, eds. *Hemorheology in Practice,* IOS Press, Amsterdam, 1999, pp. 9–52.
154. Tóth K, Juricskay I. Rheologiai alapfogalmak. In: *A klinikai haemorheologia alapjai,* Bernát SI, Pongrácz E, szerk, Kornétás Kiadó, Budapest, 1999, pp. 13–24.
155. Jung, F., Mrowietz, C., Hiebl, B., Franke, R.P., Pindur, G., Sternitzky, R. Influence of rheological parameters on the velocity of erythrocytes passing nailfold capillaries in humans. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2011; 48: 129–139
156. Lasch, J., Küllertz, G., and Opalka, J. R.: Separation of erythrocytes into age-related fractions by density or size? Counterflow centrifugation. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2000; 38, 629–632.
157. Danielczok, J. G., Terriac, E., Hertz, L., Petkova-Kirova, P., Lautenschläger, F., Laschke, M. W., et al. (2017). Red blood cell passage of small capillaries is associated with transient  $Ca^{2+}$ -mediated adaptations. *Front. Physiol.* 2017; 8:979.
158. Linderkamp O., Wu P.Y., Meiselman H.J. Geometry of neonatal and adult red blood cells. *Pediatr. Res.* 1983;17:250–253.
159. Burton, N. M., and Bruce, L. J. : Modelling the structure of the red cell membrane. *Biochem. Cell Biol.* 2011; 89, 200–215.
160. Clark, M. R., Mohandas, N., and Shohet, S. B.: Osmotic gradient ektacytometry: comprehensive characterization of red cell volume and surface maintenance. *Blood*, 1983; 61, 899–910.
161. A. Pribush, D. Zilberman-Kravits, N. Meyerstein, The mechanism of the dextran-induced red blood cell aggregation, *Eur. Biophys. J.* 2007;36:85–94.
162. Z. Marton, G. Kesmarky, J. Vekasi, A. Cser, R. Russai, B. Horvath, K. Toth, Red blood cell aggregation measurements in whole blood and in fibrinogen solutions by different methods, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2001;24: 75–83.
164. D. Brooks, Mechanism of red cell aggregation, in *Blood Cells, Rheology and Aging,* D. Platt (ed.) Springer-Verlag, 1988

165. S. Asakura, F. Oosawa, Interactions between particles suspended in solutions of macromolecules, *J. Polym. Sci.* 1958; 33:183–192.
166. Sadaka F., O'Brien J., Prakash S. Red cell distribution width and outcome in patients with septic shock. *J. Intensive Care Med.* 2013;28:307–313.
167. Moutzouri AG, Skoutelis AT, Gogos CG, Missirlis YM, Athanassiou GM. Red blood cell deformability in patients with sepsis: A marker for prognosis and monitoring of severity. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 2007;36:291–299.
168. Suzuki Y, Nakajima T, Shiga T, Maeda N: Influence of 2,3-diphosphoglycerate on the deformability of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*,1990;1029:85–9.
169. Vincent JL, Zhang H, Szabo C, Preiser JC.: Effects of nitric oxide in septic shock. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000; 161:1781–1785
170. Ismail NH, Cohn EJJ, Mollitt DL.: Nitric oxide synthase inhibition negates septic-induced alterations in cytoplasmic calcium homeostasis and membrane dynamics. *Am Surg* 1997; 63:20–23
171. Ortiz-Carranza O, Miller ME, Adragna NC, Lauf PK: Alkaline pH and internal calcium increase Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> effluxes in LK sheep red blood cells in Cl<sup>-</sup>-free solutions. *J Membr Biol*1997; 156:287–295
172. Shiga T, Sekiya M, Maeda N, Kon K, Okazaki M (1985) Cell age-dependent changes in deformability and calcium accumulation of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1985:814:289–299
173. Todd JC, Mollitt DL: Effect of sepsis on erythrocyte intracellular calcium homeostasis. *Crit Care Med* 1995; 23:459–465
174. Marikovsky Y :The cytoskeleton in ATP-depleted erythrocytes: the effect of shape transformation. *Mech Ageing Dev* 1996; 86:137–144
175. Bergfeld GR, Forrester T: Release of ATP from human erythrocytes in response to a brief period of hypoxia and hypercapnia. *Cardiovasc Res* 1992; 26:40–47
176. Busse R, Ogilvie A, Pohl U: Vasomotor activity of diadenosine triphosphate and diadenosine tetraphosphate in isolated arteries. *Am J Physiol* 1988; 254:828–832
177. Todd JC, Mollitt DL: Effect of sepsis on erythrocyte intracellular calcium homeostasis. *Crit Care Med* 1995; 23:459–465
178. Chari SN, Nath N : Sialic acid content and sialidase activity of polymorphonuclear leucocytes in diabetes mellitus. *Am J Med Sci* 1984; 288:18–20 66.

179. Chiarini A, Fiorilli A, Di Francesco L, Venerando B, Tettamanti G: Human erythrocyte sialidase is linked to the plasma membrane by a glycosylphosphatidylinositol anchor and partly located on the outer surface. *Glycoconj J* 1993; 10:64–71)
180. Yodice PC, Astiz ME, Kurian BM, Lin RY, Rackow EC: Neutrophil rheologic changes in septic shock. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997; 155:38–42
181. Berliner AS, Shapira I, Rogowski O, Sadees N, Rotstein R, Fusman R, Avitzour D, Cohen S, Arber N, Zeltser D (2000) Combined leukocyte and erythrocyte aggregation in the peripheral venous blood during sepsis. An indication of commonly shared adhesive protein(s). *Int J Clin Lab Res* 2000;30:27–31
182. Bellingan G: Leukocytes: friend or foe. *Intensive Care Med* 26[Suppl 1]:S111–S118 7, Claster S, Chiu DT, Quintanilha A, Lubin B (1984) Neutrophils mediate lipid peroxidation in human red cells. *Blood* 1984; 64:1079–1084)
183. Piagnerelli M, Boudjeltia KZ, Vanhaeverbeek M, Vincent JL. Red blood cell rheology in sepsis. *Intensive Care Med*. 2003;29(7):1052-1061.
184. Uyesaka, N.; Hasegawa, S.; Ishioka, N.; Ishioka, R.; Shio, H.; Schechter, A.N. Effects of superoxide anions on red cell deformability and membrane proteins. *Biorheology* 1992; 29, 217–229.
185. Bateman, R.M.; Jagger, J.E.; Sharpe, M.D.; Ellsworth, M.L.; Mehta, S.; Ellis, C.G. : Erythrocyte deformability is a nitric oxide-mediated factor in decreased capillary density during sepsis. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2001; 280, 2848–2856.
186. Deplaine, G.; Safeukui, I.; Jeddi, F.; Lacoste, F.; Brousse, V.; Perrot, S.; Biligui, S.; Guillotte, M.; Guitton, C.; Dokmak, S.; et al. The sensing of poorly deformable red blood cells by the human spleen can be mimicked in vitro. *Blood* 2011; 117, 88–95.
187. Sandham JD, Hull RD, Brant RF, et al. : A randomized, controlled trial of the use of pulmonary-artery catheters in high-risk surgical patients. *N Engl J Med*. 2003;348(1):5–14.
188. Huygh J, Peeters Y, Bernards J, Malbrain ML. Hemodynamic monitoring in the critically ill: an overview of current cardiac output monitoring methods. *F1000Res*. 2016;5:F1000 Faculty Rev-2855. Published 2016 Dec 16. doi:10.12688/f1000research.8991.1
189. Sakka SG et al. Assessment of cardiac preload and extravascular lung water by single transpulmonary thermodilution. *Intensive Care Med* 2000; 26(2): 180-187.
190. Felbinger et al. Cardiac index measurements during rapid preload changes: a comparison of pulmonary artery thermodilution with arterial pulse contour analysis. *J Clin Anesth*. 2005;17(4):241-8.)

191. Mendoza DD et al., Cardiac power output predicts mortality across a broad spectrum of patients with acute cardiac disease. *Am Heart J* 2007; 153(3): 366-70. 29.
192. Fincke R et al., Cardiac power is the strongest haemodynamic correlate of mortality in cardiogenic shock: a report from the SHOCK trial registry. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44(2): 340-8.
193. Mihm FG, Feeley TW, Rosenthal MH, Lewis F. Measurement of extravascular lung water in dogs using the thermal-green dye indicator dilution method. *Anesthesiology*. 1982;57:116–22.
194. Mihm FG, Feeley TW, Jamieson SW. Thermal dye double indicator dilution measurement of lung water in man: comparison with gravimetric measurements. *Thorax*. 1987;42:72–6.
195. Barbara H, Mair S, Beitz A, Henschel B, Schmid RM, Huber W. Pulmonary vascular permeability index and global end-diastolic volume: are the data consistent in patients with femoral venous access for transpulmonary thermodilution: a prospective observational study. *BMC Anesthesiol*. 2014;14:81.
196. Groeneveld AB, Verheij J. Extravascular lung water to blood volume ratios as measures of permeability in sepsis-induced ARDS. *Intensive Care Med*. 2006;32:1315–1321.
197. Monnet X, Anguel N, Osman D, Hamzaoui O, Richard C, Teboul JL. Assessing pulmonary permeability by transpulmonary thermodilution allows differentiation of hydrostatic pulmonary edema from ARDS. *Intensive Care Med*. 2007;33:448–453.
198. Liet JM, Jacqueline C, Orsonneau JL, Gras-Leguen C, Potel G, Rozé JC. The effects of milrinone on hemodynamics in an experimental septic shock model. *Pediatr Crit Care Med*. 2005;6(2):195-199.
199. Molnár L, Németh N, Berhés M, et al. Assessment of cerebral circulation in a porcine model of intravenously given *E. coli* induced fulminant sepsis. *BMC Anesthesiol*. 2017;17(1):98.
200. Ye S, Li Q, Yuan S, Shu H, Yuan Y. Restrictive Fluid Resuscitation Leads to Better Oxygenation than Non-Restrictive Fluid Resuscitation in Piglets with Pulmonary or Extrapulmonary Acute Respiratory Distress Syndrome. *Med Sci Monit*. 2015;21:2008-2020.
201. Berhés M, Németh N, Pető K, et al. Hemodynamic consequences of intravenously given *E. coli* suspension: observations in a fulminant sepsis model in pigs, a descriptive case-control study. *Eur J Med Res*. 2019;24(1):11.
202. Gruenewald M, Renner J, Meybohm P, Höcker J, Scholz J, Bein B. Reliability of continuous cardiac output measurement during intra-abdominal hypertension relies on repeated calibrations: an experimental animal study. *Crit Care*. 2008;12(5):R132.

203. Wu F, Lu GP, Lu ZJ, et al. Changes of the hemodynamics and extravascular lung water after different-volume fluid resuscitation in a piglet model of endotoxic shock. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*. 2013;51(9):649-653.
204. Suga H, Nakagawa T, Soga Y, et al. Reinforcement therapy using nitric oxide synthase inhibitors against endotoxin shock in dogs. *Surg Today*. 2006;36(9):811-817.
205. Koami H, Sakamoto Y, Miyasho T, et al. The effects of polymyxin B-immobilized fiber hemoperfusion on respiratory impairment in endotoxemic pigs. *J Nippon Med Sch*. 2014;81(3):130-138.
206. Yu T, Li Q, Liu L, et al. Different effects of propofol and dexmedetomidine on preload dependency in endotoxemic shock with norepinephrine infusion. *J Surg Res*. 2015;198(1):185-191.
207. Liu S, Liu J, Gao K, et al. Effects of mild hypothermia on hemodynamics of systemic and renal of dog with septic shock. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2015;95(43):3545-3548.
208. Endo Y, Miyasho T, Imahase H, Kawamura Y, Sakamoto Y, Yamashita K. Use of perfusion index to detect hemodynamic changes in endotoxemic pigs [published online ahead of print, 2020 Jul 11]. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*. 2020;10.1111/vec.12985.
209. Easley RB, Mulreany DG, Lancaster CT, et al. Redistribution of pulmonary blood flow impacts thermodilution-based extravascular lung water measurements in a model of acute lung injury. *Anesthesiology*. 2009;111(5):1065-1074.
210. Banskurt O.K, and Meiselman H.J.: Data reduction methods for ektacytometry in clinical hemorheology. *Clin Hemorheol Microcirc* 2013; 54:99-107
211. Nemeth N, Kiss F, Miszti-Blasius K. Interpretation of osmotic gradient ektacytometry (osmoscan) data: a comparative study for methodological standards. *Scand J Clin Lab Invest*. 2015;75(3):213-222.
212. Deuel JW , Lutz HU , Misselwitz B , Goede JS . Asymptomatic elevation of the hyperchromic red blood cell subpopulation is associated with decreased red cell deformability . *Ann Hematol* 2012 ; 91 : 1427 – 34

## 8. Összefoglalás

A szepszis és szeptikus sokk napjainkban is magas mortalitással és nagy kórházi költséggel járó szindróma. Patomechanizmusa továbbra sem tisztázott. Bár a klinikumban számos új terápia került bevezetésre, a morbiditási és mortalitási mutatók továbbra sem javultak jelentősen. Az összetett patomechanizmus, a heterogén betegpopuláció, a pontos diagnosztikus markerek hiánya, valamint az etikai megszorítások nehézségeket állítanak a szepszis kutatás útjába. Emiatt egy tökéletes szeptikus állatmodell kifejlesztése mérföldkő lenne a szepszis patomechanizmusának és terápiájának kutatásában. A jelenleg alkalmazott állatmodellek számos hiányossággal bírnak, nem standardizáltak, emiatt a kutatási eredmények sokszor félrevezetőek lehetnek.

Munkánk egy összetett tudományos kísérlet részét képezte, melynek célja *E. coli* indukálta szepszis során a hemodinamikai, hemosztazeológiai, hemoreológiai és cerebrovaszkuláris komponensek változásának vizsgálata volt sertés modellen. Elsődlegesen arra a kérdésre kerestük a választ, hogy az intravénásan adott *E. coli* szuszpenzió indukálta korai fulmináns szepszis során milyen szisztémás hemodinamikai változások figyelhetőek meg. A fulmináns szepszis modellezéséhez élő *E. coli* szuszpenziót alkalmaztunk intravénásan, folyamatosan emelve a beadott mennyiséget. Az első 30 percben 2 ml fiziológiás sóban szuszpendált baktérium kultúrát, majd a következő 30 percben 4 ml baktérium kultúrát adtunk. Ezt követően 32 ml baktérium kultúrát adtunk 120 perc alatt. Így  $9,5 \times 10^6$  összdózisú *E. coli*-t adtunk be 180 perc alatt. A hemodinamikai paraméterek mérése PiCCO monitor segítségével történt. Kísérletünk során a szeptikus sokk kialakulása folyamatában az artériás középnyomás és a cardiac index csökkenését figyeltük meg, emelkedő tendenciájú pulzusszámmal. Emellett szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a stroke volumen variáció értékében a szeptikus állatok esetében. A vizsgálat során az anesztézia gyógyszerein kívül az állatok egyéb gyógyszeres terápiában nem részesültek ( intravénás folyadék terápiában sem) , így a szepszis során bekövetkező hemodinamikai változások természetes lefolyását tudtuk megfigyelni. Az általunk létrehozott fulmináns szeptikus sokk során egy fázisú hipodinám keringési paraméterek voltak megfigyelhetőek. Feltételezéseink alapján az *E. coli* által kiváltott gyulladásoos válasz közvetlenül a miokardium kontraktilitását befolyásolja. Ez a cardiac index és a globális ejekciós frakció csökkenéséhez vezet a folyamat során, mely a hipodinám keringés vezető oka lehet. A hipodinám keringési válasz hatására kísérletünk során

megfigyelhető volt egy azonnali mikrocirkulációs károsodás is, már a baktérium infúzió korai szakaszában. Ez alapján elmondható, hogy az intravénás E. coli infúzió egy fulmináns hipodinám szepszist váltott ki sertés modellünkben, mely szöveti hipoperfúzióhoz és hipoxiához vezetett.

Vizsgálatuk további célja a hemoreológiai változások vizsgálata volt fulmináns szepszis során.

A szeptikus állat csoportban folyamatosan csökkenő vörösvérsejt deformabilitás volt megfigyelhető. Az osmoscan paraméterek vizsgálata során az osmoscan görbe sejt deformabilitáshoz és membrán stabilitáshoz tartozó része, ami megfelel a min EI és max EI közötti területnek az idetartozó ozmotikus értékekkel együtt, mutatta a legmarkánsabb eltérést. A két pont közötti különbség egy fokozatosan romló tendenciát mutatott, mely valószínűleg a megváltozott ozmotikus mikrokörnyezet sejtkárosító hatását is jelzi. A csökkenő tendenciájú aggregációs paraméterek ellentmondanak a korábbi tanulmányok megfigyelésének. Az aggregációs folyamat sebessége és intenzitása is alacsonyabb lett az élő E. coli szuszpenzió infúziót követő hatodik órában, habár a vörösvérsejt deformabilitás romlott. Ennek az ellentmondásos eredménynek az lehet a magyarázata, hogy az általunk végzett vizsgálat párhuzamosan zajlott a fulmináns szepszis korai fázisában a szeptikus sokk kialakulásával. Nem tudtuk kizárni a véráramba kerülő élő baktériumok aggregációra kifejtett hatását, emiatt az élő E. coli szuszpenziót normál vérmintákkal is teszteltük. Az in vitro vizsgálat során a vörösvérsejt deformabilitás és aggregáció az in vivo vizsgálatnak megfelelően változott, mely a két órás inkubációs periódus során továbbra is megfigyelhető volt. Az általunk alkalmazott E. coli szepszis modellt véleményünk szerint jól alkalmazható a hipodinám szepszis hemodinamikai és hemorhológiai hatásainak vizsgálatára.

## **9. Summary**

Sepsis and septic shock remains a leading cause of death in patients treated at the general and surgical ICUs. Its pathomechanism is still not known in all detail. Despite the fact that in the recent decades novel therapeutic interventions came into light, there is only a moderate improvement in the morbidity and mortality ratios. The pathomechanism is complex, the patient population is heterogenous, there are no sensitive diagnostic markers available. The combination of these facts makes the planning of experimental sepsis models more complicated. Hence, an ideal sepsis model would be crucial for getting more insight into the pathophysiological background of the syndrome and searching for effective therapeutic

interventions. Septic animal models used so far are not standardized, do not cover all spectrum of the possible sepsis development and therefore their result may be misleading.

In the present work we aimed to assess the hemodynamic, hemostatic and hemorheologic and cerebrovascular consequences of an E. coli induced sepsis. In the first 30 minutes 2 ml of suspended bacterial cultures were given intravenously, followed by a repeated dose of 4 ml in the next 30 minutes. Thereafter 32 ml bacterial cultures was infused within 120 minutes. As a result of this administration a  $9,5 \times 10^6$  overall dose of E. coli -was administered within a time frame of 180 minutes. As we intended to assess the natural course of the sepsis development, animals in the sepsis group did not receive any therapy (neither volume therapy) during the study, but anesthetic drugs. In the first part we aimed to assess hemodynamic changes induced by intravenous administration of E.coli suspension. Hemodynamic parameters were followed by PiCCo monitoring. We found that mean arterial pressure, cardiac index decreased during the development of septic shock, that was accompanied by a tendency of increased pulse rate. Stroke volume variation stepwise decreased in septic animals during the course of the study. Our fulminant sepsis model appeared to mimic a single-phaes hypodynamic septic shock. We hypothesize that inflammatory response evoked by E. coli influenced directly myocardial contractility. This was supported by decreased cardiac index and global ejection fraction. An immediate microcirculatory damage could be observed as a consequence of the hypodynamic circulation, already in the early phase of the infusion of the bacterial culture, referring to tissue hypoperfusion and hypoxia.

In the second phase of the study we assessed the change of the hemorheological parameters during septic shock development. A decreased erythrocyte deformability was observed among septic animals, that were mainly indicated by changes of min EI és max EI ranges. The speed and intensity of the aggregation was also lower in septic animals at 6 hours after E.coli infusion, despite of worsening of deformability. It is conceivable that there is a direct effect of E.coli bacteria on the aggregation process. Thus, we tested this possible effect by using normal blood samples and the in vitro tests revealed identical results after a 2-hour incubation period. We conclude that our E.coli-induced septic model is suitable for assessing the hemodynamic and hemorheological consequences.

## **10. Tárgyszavak**

Szepszis, szeptikus sokk, szeptikus sokk állatmodellek, PiCCO paraméterek, vörösvérsejt aggregáció, vörösvérsejt deformabilitás,

Sepsis, septic shock, septic shock animal models, PiCCO parameters, red cell aggregation, red cell deformability

## **11. Függelék**

## **12. Köszönetnyilvánítások**

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Prof. Dr. Fülesdi Bélának, támogatásáért és munkámhoz nyújtott segítségéért.

Hálás köszönettel tartozom Prof. Dr. Németh Norbertnek, aki végig segítette munkámat. Tapasztalata, ötletei és tudományos munkája hozzájárult a közlemények megszületéséhez.

Köszönettel tartozom Dr. Hajdu Endrének a vizsgálatokban nyújtott nélkülözhetetlen segítségéért.

Külön köszönetemet fejezem ki a Sebészeti Műtéttani Tanszék valamennyi dolgozójának, hogy lehetővé tették és segítették a tanulmányhoz szükséges vizsgálatok végrehajtását.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni családomnak, barátaimnak és kollégáimnak a türelmüket, a támogatásukat, és a sok biztatást, amit kaptam tőlük.



Nyilvántartási szám: DEENK/319/2021.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Berhés Mariann  
Doktori Iskola: Idegtudományi Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Berhés, M.**, Németh, N., Pető, K., Deák, Á., Hajdu, E., Molnár, Á., Árkosy, P., Szabó, J., Fülesdi, B.: Hemodynamic consequences of intravenously given E. coli suspension: observations in a fulminant sepsis model in pigs, a descriptive case-control study.  
*Eur. J. Med. Res.* 24 (1), 1-6, 2019.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s40001-019-0372-y>  
IF: 1.826
2. Németh, N., **Berhés, M.**, Kiss, F., Hajdu, E., Deák, Á., Molnár, Á., Szabó, J., Fülesdi, B.: Early hemorheological changes in a porcine model of intravenously given E. coli induced fulminant sepsis.  
*Clin. Hemorheol. Microcirc.* 61 (3), 479-496, 2016.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-141914>  
IF: 1.679

### További közlemények

3. László, I., Molnár, C., Koszta, G., Végh, T., Fábán, Á., **Berhés, M.**, Véghné Juhász, M., Fülesdi, B.: A COVID-19-betegek kórházon belüli újraélesztésének speciális szempontjai.  
*Orv. hetil.* 161 (17), 710-712, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/650.2020.31816>  
IF: 0.497 (2019)
4. Végh, T., László, I., Véghné Juhász, M., **Berhés, M.**, Fábán, Á., Koszta, G., Molnár, C., Fülesdi, B.: A COVID-19-fertőzött betegek anesztéziájának és perioperatív ellátásának gyakorlati szempontjai.  
*Orv. hetil.* 161 (17), 692-695, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/650.2020.31809>  
IF: 0.497 (2019)





5. **Berhész, M.**, Fábrián, Á., László, I., Végh, T., Molnár, C., Fülesdi, B., Koszta, G.: Emelt szintű szervtámogató és életfenntartó kezelések kritikus állapotú COVID-19-fertőzött betegeken.  
*Orv. hetil.* 161 (17), 704-709, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/650.2020.31813>  
IF: 0.497 (2019)
6. Fábrián, Á., László, I., Véghné Juhász, M., **Berhész, M.**, Végh, T., Koszta, G., Molnár, C., Fülesdi, B.: Farmakoterápiás lehetőségek SARS-CoV-2-fertőzés/COVID-19-betegség esetén.  
*Orv. hetil.* 161 (17), 685-688, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/650.2020.31812>  
IF: 0.497 (2019)
7. Végh, T., László, I., Véghné Juhász, M., **Berhész, M.**, Fábrián, Á., Koszta, G., Molnár, C., Fülesdi, B.: Kritikus állapotú, légzéstámogatást igénylő COVID-19-fertőzött beteg ellátásának gyakorlati szempontjai.  
*Orv. hetil.* 161 (17), 678-684, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/650.2020.31810>  
IF: 0.497 (2019)
8. László, I., Molnár, C., Koszta, G., Végh, T., Fábrián, Á., **Berhész, M.**, Véghné Juhász, M., Fülesdi, B.: Légútbiztosítás koronavírus-fertőzött betegeken.  
*Orv. hetil.* 161 (17), 696-703, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/650.2020.31811>  
IF: 0.497 (2019)
9. Szilágyi, B., Fejes, Z., Pólska, S., Pócsi, M., Czimmerer, Z., Patsalos, A., Fenyvesi, F., Rusznyák, Á., Nagy, G., Kerekes, G., **Berhész, M.**, Szűcs, I., Kunapuli, S. P., Kappelmayer, J., Nagy, B. J.: Reduced miR-26b Expression in Megakaryocytes and Platelets Contributes to Elevated Level of Platelet Activation Status in Sepsis.  
*Int. J. Mol. Sci.* 21 (3), 1-22, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21030866>  
IF: 4.556 (2019)
10. Balog, K., Csiszko, A., Krasnyánszky, N., Farkas, M., **Berhész, M.**, László, I., Palatka, K., Damjanovich, L., Sápy, P., Szentkereszty, Z.: Kiterjedt, demarkált pancreas necrosis sebészeti kezelése transgastrius necrectomiával = Open transgastric necrosectomy for extended walled-off pancreas necrosis.  
*Magyar Seb.* 72 (1), 8-12, 2019.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/1046.72.2019.1.2>
11. Csiszko, A., Balog, K., Godó, Z., Juhász, G., Pető, K., Deák, Á., **Berhész, M.**, Németh, N., Bodnár, Z., Szentkereszty, Z.: Pressure Distribution during Negative Pressure Wound Therapy of Experimental Abdominal Compartment Syndrome in a Porcine Model.  
*Sensors.* 18 (3), 1-11, 2018.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/s18030897>  
IF: 3.031





12. Molnár, L., Németh, N., **Berhész, M.**, Hajdu, E., Papp, L., Molnár, Á., Szabó, J., Deák, Á., Füleddi, B.: Assessment of cerebral circulation in a porcine model of intravenously given *E. coli* induced fulminant sepsis.  
*BMC Anesthesiol.* 17 (98), 1-9, 2017.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12871-017-0389-3>  
IF: 1.788
13. Tóth, J., Bekéné Debreceni, I., Deák, Á., Pető, K., **Berhész, M.**, Hajdu, E., Szabó, J., Németh, N., Füleddi, B., Kappelmayer, J.: Characteristics of thrombin generation in a fulminant in a fulminant porcine sepsis model.  
*Thromb. Res.* 158, 25-34, 2017.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2017.07.030>  
IF: 2.779
14. Tóth, J., Bekéné Debreceni, I., **Berhész, M.**, Hajdu, E., Deák, Á., Pető, K., Szabó, J., Németh, N., Füleddi, B., Kappelmayer, J.: Red blood cell and platelet parameters are sepsis predictors in an *Escherichia coli* induced lethal porcine model.  
*Clin. Hemorheol. Microcirc.* 66 (3), 249-259, 2017.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-170271>  
IF: 1.914
15. Nemes, R., **Berhész, M.**, Sárkány, P.: Carotis-endarterektómia miatt kialakuló stroke.  
In: Anesztéziail szövődmények megelőzése és kezelése. Szerk.: Bogár L, Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 373-379, 2016.
16. Nemes, B. Á., Kanyári, Z., Zádori, G., Zsom, L., **Berhész, M.**, Hamar, M., Kóbor, K., Péter, A.: Horseshoe kidney transplantation.  
*Inter. Med. Appl. Science.* 7 (2), 85-89, 2015.
17. Kiss, F., Molnár, L., Hajdu, E., Deák, Á., Molnár, Á., **Berhész, M.**, Szabó, J., Németh, N., Füleddi, B.: Skin microcirculatory changes reflect early the circulatory deterioration in a fulminant sepsis model in the pig.  
*Acta Cir. Bras.* 30 (7), 470-477, 2015.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-865020150070000004>  
IF: 0.58





18. Nemes, R., Molnár, L., Fülep, Z., Fekete, K., **Berhész, M.**, Fülepi, B.: Critical illness associated neuromuscular disorders: keep them in mind.  
*Ideggyogy. Szle.* 67 (1-2), 1-12, 2014.  
IF: 0.386

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 21,521**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 3,505**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2021.05.19.

