

# **EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**Budainé Dr. Tóth Judit**

**Hematológiai elváltozások vizsgálata  
experimentálisan létrehozott letális szepszis modellben**

**DEBRECENI EGYETEM**

**LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2018**

# **EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

## **Hematológiai elváltozások vizsgálata experimentálisan létrehozott letális szepszis modellben**

**Budainé Dr. Tóth Judit**

**Témavezető:**

**Dr. Kappelmayer János**

**egyetemi tanár**



**DEBRECENI EGYETEM**

**LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2018**

## Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke.....	5
2. Bevezetés és irodalmi áttekintés .....	7
2.1. Történeti áttekintés; a szepszis és a szepsztikus shock fogalma.....	7
2.2. A szepszis kórokozói .....	12
2.3. A szepszis patomechanizmusa .....	13
2.3.1. A citokinek és a hypoxia indukálta faktor-1 (HIF-1).....	13
2.3.2. Csontvelői reakció szepszisben .....	16
2.3.3. Mitokondriális dysfunctio és apoptózis .....	17
2.3.4. Az oxidatív stressz markerei: a laktát és a húgysav .....	19
2.3.5. A thrombocyták és a véralvadás szerepe szepszisben .....	20
2.4. A laboratóriumi medicina szerepe a szepszis diagnosztikájában, a szepszis lehetséges biomarkerei .....	25
2.5. Állatmodellek szepszisben .....	28
3. Célkitűzések .....	30
4. Anyagok és módszerek .....	31
4.1. Sertés szepszis modell .....	31
4.2. Maghőmérséklet, hemodinamikai paraméterek és vérgáz-monitorozás .....	32
4.3. Vérvétel és mintakezelés .....	33
4.4. Nagyvérkép meghatározása hematológiai automatával, mikroszkópos kenetelemzés és alvadási szűrőtesztek .....	34
4.5. Klinikai kémiai vizsgálatok .....	35
4.6. Áramlási citometriai vizsgálatok .....	35
4.7. Szepsztikus sertés plazmák egészséges mosott vörösvértestekre gyakorolt hatása .....	37

4.8. TNF- $\alpha$ és LPS egészséges vörösvértestekre gyakorolt hatása .....	37
4.9. Trombin generációs vizsgálatok .....	38
4.10. Statisztikai elemzések .....	40
5. Eredmények .....	42
6. Megbeszélés .....	62
7. Összefoglalás .....	73
8. Summary .....	74
9. A disszertáció új eredményei, megállapításai, klinikai jelentősége .....	75
10. Irodalomjegyzék .....	77
11. Publikációs lista .....	93
12. Tárgyszavak/Keywords .....	96
13. Köszönetnyilvánítás .....	97
14. Függelék .....	98

## 1. Rövidítések jegyzéke

APTI	activated partial thromboplastin time, aktivált parciális tromboplasztin idő
CD	cluster of differentiation, sejtfelszíni jelzőanyag
CK	creatine kinase, kreatin-kináz
CRP	C-reactive protein, C-reaktív protein
DAMP	damage-associated molecular pattern, sérülés-asszociált molekuláris mintázat
DIC	disseminated intravascularis coagulatio, disszeminált intravaszkuláris koaguláció
DiOC <sub>6(3)</sub>	3,3'-dihexyloxocarbocyanine iodide; 3,3'-dihexil-oxocarbocianin-jodid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ethylene-diamine-tetraacetate, etilén-diamin-tetraacetát
ETP	endogen thrombin potential, endogén trombin potenciál
FITC	fluorescein isothiocyanate, fluoreszcein-izotiocianát
GPT	glutamate-piruvate-transaminase, glutamát-piruvát-transzamináz
HIF-1	hypoxia-inducible factor-1, hypoxia indukálta faktor-1
IL	interleukin
LPS	lipopolysaccharide, lipopoliszacharid (más néven endotoxin)
MFI	mean fluorescence intensity, átlagos fluoreszcencia intenzitás
NET	neutrophil extracellular trap, neutrofil extracelluláris csapda
NK-sejtek	natural killers, természetes ölősejtek
NO	nitrogen monoxide, nitrogén-monoxid
PAF	platelet activating factor, thrombocyta aktiváló faktor

$p_aO_2$	partial pressure of oxygen in arterial blood, az oxigén parciális nyomása az artériás vérben
$p_aCO_2$	partial pressure of carbon dioxide in arterial blood, a szén-dioxid parciális nyomása az artériás vérben
PAMP	pathogen-associated molecular pattern, kórokozó-asszociált molekuláris mintázat
PBS	phosphate buffered saline, foszfáttal pufferolt sóoldat
PPP	platelet poor plasma, thrombocytá-szegény plazma
polyP	inorganic polyphosphate, inorganikus polifoszfát
PRP	platelet rich plasma, thrombocytá-dús plazma
PS	phosphatidylserine, foszfatidil-szerin
SIRS	systemic inflammatory response syndrome, szisztémás gyulladási válasz szindróma
SOFA	Sequential (Sepsis-Related) Organ Failure Assessment, szekvenciális (szepszissel összefüggő) szervi elégtelenség értékelése
TFPI	tissue factor pathway inhibitor, szöveti faktor út inhibitor
TLR	toll-like receptor, toll-receptor
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor- $\alpha$ , tumor nekrozis faktor- $\alpha$

## 2. Bevezetés és irodalmi áttekintés

### 2.1. Történeti áttekintés; a szepszis és a szeptikus shock fogalma

A szepszis jelentős népegészségügyi problémát jelent, évente 15-30 millió ember megbetegedéséért felelős világszerte, halálozási aránya megközelíti a 20%-ot [1, 2].

Maga a „szepszis” szó görög eredetű (σηψιζ), jelentése: „állati, növényi vagy szerves anyag bomlása baktériumok jelenlétében” [3]. Orvosi értelemben elsőként Homérosz eposzaiban jelenik meg kb. 2700 évvel ezelőtt a „szepo” (σηπω) ige formájában, amely annyit jelent: „bomlik, rothad”. Hippokratész írásaiban is említésre kerül Krisztus előtt 400 körül, ő úgy tekintett a szepsziszre, mint egy veszélyes biológiai bomlásra, amely a testben bekövetkezhet; és az elsők között volt, aki bizonyos anyagok – mint a borban lévő alkohol és az ecet – antiszeptikus tulajdonságait tanulmányozta. A XVII. századtól kezdődően Anthonie van Leeuwenhoek, majd Semmelweis Ignác, Joseph Lister, Louis Pasteur és Robert Koch munkásságának kiemelkedő szerepe volt a fertőzések és a szepszis patomechanizmusának megismerésében és az antiszepszis szabályainak lefektetésében. Paul Ehrlich, Gerhard Domagk és Alexander Fleming nevéhez fűződik az első antibiotikumok felfedezése.

1991-ben az American College of Chest Physicians és a Society of Critical Care Medicine konszenzus konferenciáján megszületett a szisztémás gyulladási válasz szindróma (systemic inflammatory response syndrome, SIRS), a szepszis, a súlyos szepszis és a szeptikus shock kezdeti definíciója [4].

A SIRS a szervezetet ért bármely hatásra adott szisztémás gyulladási válasz, amely akkor van jelen, ha az alábbi feltételek közül legalább kettő teljesül:

- a testhőmérséklet  $>38^{\circ}\text{C}$  vagy  $<36^{\circ}\text{C}$ ;

- a szívfrekvencia >90/perc;
- a légzésszám >20/perc vagy a  $p_a\text{CO}_2 < 32$  Hgmm;
- a fehérvérsejtszám  $>12000/\text{mm}^3$  vagy  $<4000/\text{mm}^3$  vagy az éretlen alakok (stábok) aránya >10%.

A szepszis a szervezet fertőzésre adott szisztémás válasza, tehát a SIRS feltételei mellett – a SIRS okaként – infekció igazolható. Szepszis akkor jön létre, ha az élő kórokozók véráramba jutását követően olyan generalizált gyulladáshoz vezet, amely érinti az egészséges szöveteket is és ott szervi dysfunctióhoz vezethet.

Súlyos szepsziszről akkor beszélhetünk, ha a szepszishez szervi dysfunctio, hypoperfusio vagy hypotensio társul. Perfúzió zavart jelezhet a laktát acidosis, az oliguria vagy az akutan fellépő tudatzavar, de nem kizárólag az előzőek. Szepszis-indukálta hypotensio esetén a szisztolés vérnyomás  $<90$  Hgmm vagy a kiindulási vérnyomásértékhez képest a csökkenés  $\geq 40$  Hgmm és a hypotensio más okkal nem magyarázható.

Szeptikus shockként definiálták az adekvát volumenpótlás ellenére fennálló szepszis-indukálta hypotensiót és perfúzió zavart. A sokszervi károsodás szindróma (multiple organ dysfunction syndrome, MODS) az akut betegségben szenvedők olyan progresszív szervfunkciózavara, amikor a homeosztázis terápia beavatkozás nélkül nem tartható fenn.

A 2001-es konferencián a korábbi meghatározásokon alapvetően nem változtattak, csak kiegészítették a szepszis diagnosztikai kritérium-rendszerét számos tünettől és jellel [5]. Ennek következtében a bizonyított vagy feltételezett fertőzőes eredet és a SIRS kritériumain kívül diagnosztikus kritériummá vált a megváltozott mentális állapot, a szignifikáns ödéma, a diabetes hiányában észlelt hyperglycaemia, az emelkedett C-reaktív protein (CRP) és procalcitonin szint, az artériás hypotensio, az artériás hypoxia, az akut oliguria, az emelkedett kreatinin koncentráció, a véralvadási eltérések, a thrombocytopenia, az ileus, a hyperbilirubinaemia, az emelkedett laktát koncentráció és a csökkent kapilláris-újratelődés.

Megállapították, hogy a meglévő definíciók nem teszik lehetővé a fertőzésre adott válasz mértékének megfelelő megítélését, így – a daganatok TNM-beosztásának mintájára – megalkották a PIRO rendszert. A szepszis stádiumbeosztását biztosító PIRO rendszer alapját négy fő paraméter képezi: a genetikai hajlam és meglévő betegségek (P=predisposition), a fertőzés helye, típusa és kiterjedése (I=Infection), a szervezet fertőzésre adott válaszában tüneteinek és laboratóriumi jelei (R=Response) és a szervkárosodás mértéke (O=Organ dysfunction).

2015-ben ismételten sor került a szepszis és a szepszikus shock meghatározásának és kritériumainak felülvizsgálatára [6]. A szepszist úgy definiálták, mint egy életet veszélyeztető szervi működészavart, amelynek oka a szervezet fertőzésre adott válaszában nem megfelelően szabályozott volt. A szervi működészavar súlyosságának jelzésére leggyakrabban használt pontrendszer a Sequential (Sepsis-Related) Organ Failure Assessment Score (röviden SOFA score; 1. táblázat) [7, 8]. Magasabb SOFA score fokozott mortalitási kockázatot jelent [8]. Az új definíció szerint szepsziszről akkor beszélhetünk, ha bizonyított vagy feltételezhető fertőzés következtében a SOFA score  $\geq 2$  ponttal hirtelen emelkedik [6]. Azokban a betegekben, akiknél korábban szervfunkció-zavar nem volt ismert, a SOFA score nullának tekintendő. A  $\geq 2$ -es SOFA score-ral rendelkező betegek megközelítőleg 10%-os összesített halálozási kockázattal rendelkeznek, és a 2 alatti pontszámú betegekhez képest 2-25-szörös eséllyel haláloznak el. A szepszis új definíciója kiemeli a szervezet nem megfelelő válaszában fontosságát, amely a kórkép mielőbbi felismerését teszi szükségessé. E terminológia használatával a súlyos szepszis korábbi definíciója fölöslegessé vált.

Annak érdekében, hogy azon (feltételezhetően) fertőzéssel rendelkező betegeket – akik valószínűleg hosszabb ideig szorulnak majd intenzív osztályos ellátásra vagy a kórházi tartózkodásuk során elhaláloznak – mielőbb azonosítsák, bevezették az ún. Quick SOFA (qSOFA) kritériumokat, amelyek az alábbiak:

- a légzésszám  $\geq 22$ /perc,
- megváltozott tudatállapot és
- a szisztolés vérnyomás  $\leq 100$  Hgmm.

A szeptikus shock a szepszis egy csoportja, amelyben a keringési és a celluláris/metabolikus abnormalitások olyan súlyosak, hogy azok jelentősen fokozzák a mortalitást. A szeptikus shock kritériuma a szepszis mellett perzisztáló hypotensio, amely során vazopresszor terápia szükséges az artériás középnyomás  $\geq 65$  Hgmm értéken tartásához, továbbá a laktát koncentráció  $> 2$  mmol/L adekvát folyadékpótlás ellenére is [9]. Ezen kritériumok teljesülésekor a mortalitás meghaladja a 40%-ot.

## 1. táblázat. Sequential (Sepsis-Related) Organ Failure Assessment Score

Szervrendszer	Score				
	0	1	2	3	4
<b>Légzőrendszer</b>					
PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> ,	≥400 (53,3)	<400 (53,3)	<300 (40)	<200 (26,7)	<100 (13,3)
Hgmm (kPa)				légzéstámogatás mellett	légzéstámogatás mellett
<b>Véralvadás</b>					
Thrombocytaszám, ×10 <sup>3</sup> /μL	≥150	<150	<100	<50	<20
<b>Máj</b>					
Bilirubin, mg/dL (μmol/L)	<1,2 (20)	1,2-1,9 (20-32)	2,0-5,9 (33-101)	6,0-11,9 (102-204)	>12,0 (204)
<b>Kardiovaszkuláris rendszer</b>					
	MAP ≥70 Hgmm	MAP <70 Hgmm	Dopamin <5 vagy dobutamin (bármely dózisban) <sup>a</sup>	Dopamin 5,1-15 vagy adrenalin ≤0,1 vagy noradrenalin ≤0,1 <sup>a</sup>	Dopamin >15 vagy adrenalin >0,1 vagy noradrenalin >0,1 <sup>a</sup>
<b>Központi idegrendszer</b>					
GCS score <sup>b</sup>	15	13-14	10-12	6-9	<6
<b>Vese</b>					
Kreatinin, mg/dL (μmol/L)	<1,2 (110)	1,2-1,9 (110-170)	2,0-3,4 (171-299)	3,5-4,9 (300-440)	>5,0 (440)
Vizeletürítés, mL/nap				<500	<200

A táblázatban előforduló rövidítések: PaO<sub>2</sub>: oxigén parciális nyomása az artériás vérben; FiO<sub>2</sub>: fraction of inspired oxygen; MAP: artériás középnyomás; GCS: Glasgow Coma Scale

<sup>a</sup> A katecholaminok dózisa μg/kg/perc-ben vannak megadva legalább 1 óra időtartamra.

<sup>b</sup> GCS score: 3-15, a magasabb érték jobb neurológiai funkcióra utal.

A táblázat Vincent és munkatársainak közleménye alapján, az eredeti táblázat módosításával készült [7].

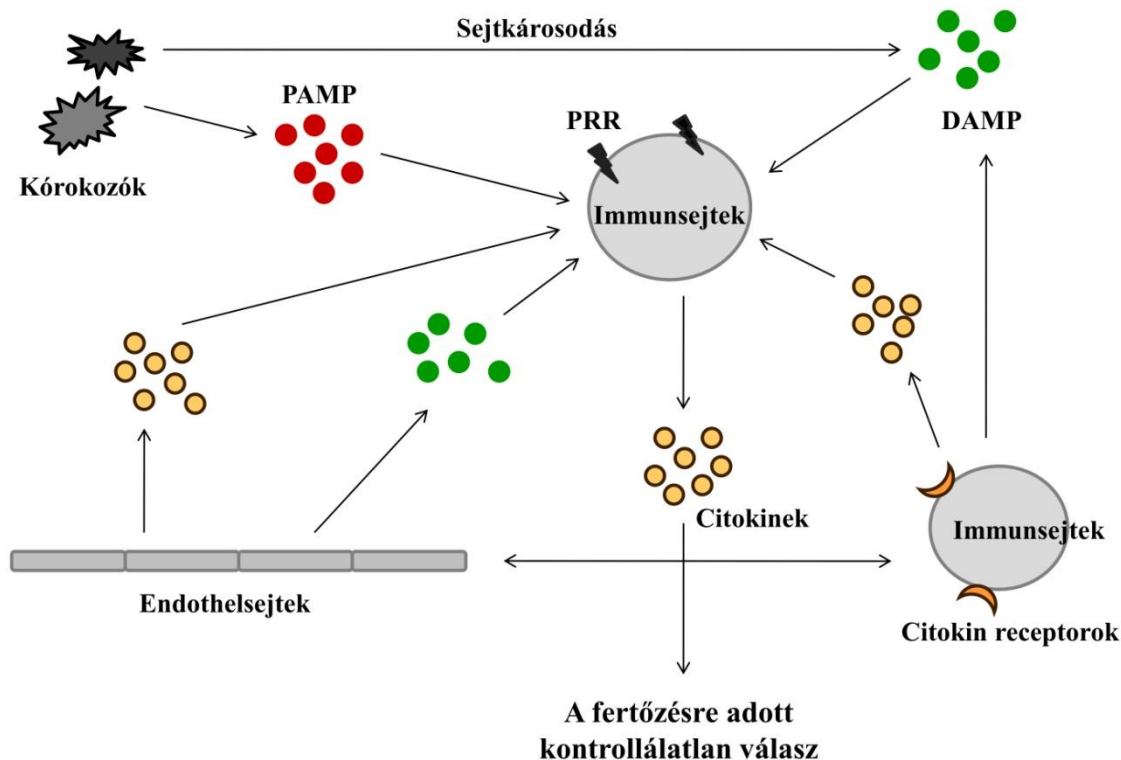
## 2.2. A szepszis kórokozói

A szepszis mindig fertőzés következtében alakul ki, az esetek többségében bacteraemia (élő baktériumok jelenléte a keringésben), ritkábban fungaemia, viraemia, parazitaemia vagy kevert fertőzés áll a tünetek háttérében [4]. A Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok okozta véráramfertőzések aránya földrajzi régióként különbözik, de befolyásolja az is, hogy nosocomialis vagy ún. közösségben szerzett szepsziszről van-e szó, illetve függ a beteg egyéb rizikófaktoraitól [10, 11]. Az 1980-as évekig a szeptikus esetek többségét Gram-negatív baktériumok okozták, míg attól kezdve a Gram-pozitív baktériumoké lett a vezető szerep és a korábbinál gyakoribbá váltak a gombaszepszisek. Egy nagy amerikai felmérés szerint 1979 és 2000 között a szeptikus esetek 52,1%-áért Gram-pozitív és 37,6%-áért Gram-negatív baktériumok voltak felelősek, míg 4,7%-át polimikrobiális, 1%-át anaerob és 4,6%-át gombafertőzés okozta [12]. A leggyakrabban izolált Gram-pozitív patogének a *Staphylococcus aureus* és a *Streptococcus pneumoniae*; míg a Gram-negatívak az *Escherichia coli*, a *Klebsiella* törzsek és a *Pseudomonas aeruginosa* [13]. Jelenleg az összes véráramfertőzés negyedét-felét okozzák a Gram-negatív baktériumok. A nosocomialis Gram-negatív szepszis fő forrásai a centrális vénás katéterek, a légzőrendszer, valamint az urogenitalis és gastrointestinalis tractus; míg a közösségben szerzett szepszis elsősorban húgyúti eredetű, ez utóbbi fő kórokozója az *E. coli* [14-17].

## **2.3. A szepszis patomechanizmusa**

### **2.3.1. A citokinek és a hypoxia indukálta faktor-1 (HIF-1)**

Fertőzés esetén a kórokozó elsőként a veleszületett immunrendszer tagjaival találkozik: a monocytákkal/macrophagokkal, a granulocytákkal és a természetes ölősejtekkel (az NK-sejtekkel). Ezen sejtek a mintázat-felismerő receptoraik (pattern recognition receptor, PRR) segítségével aktiválódnak oly módon, hogy a receptorokhoz kötődnek egyrészt a kórokozó eredetű molekulák (pathogen-associated molecular pattern, PAMP), másrészt az elhalt sejtekből származó anyagok (damage-associated molecular pattern, DAMP) (1. ábra) [18]. Ez utóbbi sejtelhalás részben a kórokozó közvetlen hatásának, részben pedig a felszabadult citokinek hatásának következménye. A mintázat-felismerő receptorok lehetnek például toll-receptorok (toll-like receptor, TLR), Nod- és RIG-szerű, valamint C-típusú lektin receptorok. Az immunsejtek toll-like receptorai közül a TLR2-höz a Gram-pozitív kórokozók peptidoglikánja, míg a TLR4-hez a Gram-negatív kórokozók lipopoliszacharidja (LPS, más néven endotoxin) képes kötődni. Az exogén PAMP-ok és az endogén DAMP-ok felismerése aktivációs/foszforilációs kaszkádokat indít el.



**1. ábra. A citokinek központi szerepe szepszisben**

A fehérvérsejtek mintázat-felismerő receptoraihoz kötődnek a kórokozó eredetű és az elhalt sejtekből kiszabaduló molekulák. Az aktivált fehérvérsejtek citokineket termelnek, amelyek hatással vannak a szervezet többi sejtjére. A szervezet nem megfelelő válasza következtében kezdetben túlzott mértékű gyulladás, később immunszuppresszió alakul ki, amelyek végső soron sokszervi elégtelenséghez és halálhoz vezethetnek. Rövidítések: PRR: pattern recognition receptor, PAMP: pathogen-associated molecular pattern, DAMP: damage-associated molecular pattern. Saját szerkesztésű ábra, amely Chousterman és munkatársainak közleménye alapján, az eredeti ábra módosításával készült [18].

A monocytákban/macrophagokban a nukleáris faktor- $\kappa$ B aktivációja és transzlokációja következtében proinflammatorikus citokinek (tumor necrosis factor- $\alpha$  /TNF- $\alpha$ /, interleukin-1 $\beta$  /IL-1 $\beta$ /), proteázok (elasztáz, kollagenáz, katepszin) és különböző mediátorok (prostaglandinok, leukotriének, thrombocytá aktiváló faktor /platelet activating factor, PAF/) termelődnek, oxigén-szabadgyökök szabadulnak fel, valamint a sejtek szöveti faktort

expresszálnak [19]. A neutrophil granulocyták aktiválódnak és adhéziós molekulákat expresszálnak, így a keringésben mozgásuk lelassul, gördülnek, az endotheliumhoz rögzülnek, az érpályából kilépnek és a fertőzés helyére vándorolva számos mediátort szekretálnak [20]. Az endothelsejtek adhéziós molekulák (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1 és intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) expresszáásával és kemokinek termelésével segítik az aktivált immunsejtek eljutását a fertőzés helyére; prokoaguláns faktorokat szekretálnak vagy expresszálnak; nitrogén-monoxidot (NO) termelnek; és az endothel dysfunctio felelős a fokozott vascularis permeabilitásért [18, 19]. Ezen teljes folyamat szabályozása a pro- és anti-inflammatorikus citokinek termelésének egyensúlyán keresztül valósul meg. Szepszis esetén a fertőzésre adott nem megfelelő válasz generalizált gyulladáshoz és az egészséges szövetek károsodásához vezet. A szepszis kezdeti hiperinflammatorikus fázisában az immunrendszer aktivációja dominál, nagy mennyiségű proinflammatorikus citokin szabadul fel (ez az ún. „citokin vihar”), a keletkező NO vasodilatatiót vált ki és hibernálja a sejteket. A szepszis későbbi szakasza az anti-inflammatorikus fázis, ekkor az immunrendszer deaktivációja jellemző és az anti-inflammatorikus citokinek uralják a képet [21]. A szepszis kezdetén bekövetkező halálozásért a szeptikus shock, míg a későbbi fázisban az immunszuppresszió miatti reinfekció felelős.

A szepszis egyik kulcsfontosságú molekulája a HIF-1, egy folyamatosan termelődő fehérje, amely normoxia esetén gyorsan lebomlik, hypoxiában viszont stabil marad [22]. Enyhébb hypoxia esetén a HIF-1 elősegíti a sejtek alkalmazkodását a megváltozott körülményekhez: a génexpresszió fokozásán keresztül segíti többek között a sejtek glikolízisre történő átállását, fokozza a vascularis endothelialis growth factor (VEGF), az erythropoietin és az NO termelését, ezáltal az angiogenezist, a vörösvértestek képződését és a vasodilatatiót, így biztosítva a sejtek oxigénhez jutását [23]. Az NO ezenkívül gátolja a mitokondriális légzési láncot, így a sejtek hibernált állapotban igyekeznek átvészelni a

hypoxiát. Súlyos hypoxia esetén – amikor a sejtek a hypoxia miatt mutációkat szenvednének – a HIF-1 apoptózist indukál [24]. Az LPS képes HIF-1 termelést kiváltani a macrophagokban, míg az IL-1 $\beta$  normoxia esetén is fokozza a HIF-1 szintjét [25, 26].

### **2.3.2. Csontvelői reakció szepszisben**

A csontvelő a masszív fertőzésre éretlen sejtek felszabadításával reagál. A granulocyták éretlenségét jelzi az emelkedett éretlen/totál granulocytá arány (az ún. balra tolt vérkép), amely mind szepszisben, mind SIRS esetén megfigyelhető [27]. Szepszisben az éretlen alakok megjelenésének oka a neutrophil paralysis: az NO-, citokin- és kemokin-túltermelés következtében sérül a neutrophil granulocyták endotheliumhoz történő adhéziója és a kemotaxis, így a granulocyták nem jutnak el a fertőzés helyére. Az aktív neutrophil granulocyták funkcionális defektusát próbálja a csontvelő az éretlen alakok kibocsátásával kompenzálni [28].

A magas vörösvérsejtek korán jelzik a kritikus állapotú betegek fokozott halálozási kockázatát: átlagosan 1-3 héttel a beteg halála előtt már megjelennek a periférián. A magas vörösvérsejtek megjelenését korábban már leírták hypoxia, chronicus anaemia és súlyos fertőzések esetén [29]; e vörösvérsejteket az ismert csontvelői stimulusok (erythropoietin, IL-3, IL-6) emelkedett szintjével együtt észlelték [30]. Ezen mediátorok koncentrációja általában hypoxia és gyulladás esetén emelkedik, így a magas vörösvérsejtek száma egy olyan paraméter, amelyben összeadódnak a hypoxia és a gyulladás okozta hatások és ez eredményezi e paraméter erős prediktív értékét a fokozott mortalitás tekintetében [31, 32].

Az éretlen thrombocyták megjelenése előrejelzi a szepszis kialakulását, az éretlen thrombocytá aránya – amely a retikulált thrombocytá arányát tükrözi – átlagosan 2-3 nappal a szepszis kialakulása előtt megemelkedik, majd a szepszis kialakulását követően

csökken a kezdeti fokozott thrombopoiesist követő csontvelői depressziónak megfelelően [33].

### **2.3.3. Mitokondriális dysfunctio és apoptózis**

A szervezet oxigénfogyasztásának és ATP termelésének több mint 90%-áért a mitokondriális oxidatív foszforiláció felelős. A légzési lánc enzimeit (elsősorban a NADH-ubikinon oxidoreduktázt és a citokróm C oxidázt) szepszisben gátolhatja maga az LPS, illetve az infekció hatására termelődő TNF- $\alpha$  és a nagy mennyiségben felszabaduló NO [34, 35]. A reaktív oxigén-szabadgyökök és a peroxinitrit károsítják a mitokondriális DNS-t és fehérjéket, valamint a mitokondrium membránrendszerét. A mitokondriumok oxidatív károsodása a citokróm C citoplazmába történő kijutásához vezet, ami apoptózist indukál [36]. Szeptikus betegekben a szolubilis Fas szintjét emelkedettnek találták, ami arra utal, hogy az apoptózis nemcsak intrinszik (mitokondriális) útvonalon, hanem extrinszik úton is aktiválódik [37]. Ráadásul maga a TNF- $\alpha$  is indukálhat apoptózist az extrinszik útvonalon keresztül [38]. A mitokondriális dysfunctio a szepszis korai szakaszában reverzibilis lehet, míg nagyfokú és tartós oxidatív károsodás esetén irreverzibilissé válhat [39]. A szepszis-indukálta szervkárosodás hátterében legalább részben a mitokondriális dysfunctio eredményezte energiakrízis áll [36]. Brealey és munkatársai összefüggést találtak a szeptikus shock súlyossága és kimenetele, valamint a mitokondriális dysfunctio, az ATP-depléció, az intracelluláris antioxidánszint csökkenése és az NO-termelés között [34]. A mitokondriális dysfunctio a szervezet valamennyi – mitokondriummal rendelkező – sejtjét érintheti. A szepszishoz társuló thrombocytopenia hátterében részben a thrombocyták fokozott apoptózisa állhat [40], míg a lymphopenia oka a CD4+ és CD8+ T-sejtek, valamint a B-sejtek apoptózisa lehet [21].

Az apoptózis korai szakaszában a sejtmembrán foszfatidil-szerin (PS) expressziója fokozódik, de membrán integritása nem sérül [41]. A thrombocytákban a mitokondriális reaktív oxigén-szabadgyökök termelésének növekedése fokozza a PS expressziót, de nem váltja ki az integrinek aktivációját és a thrombocyták degranulációját [40]. Ugyanakkor a thrombocytákat aktiváló hatás is eredményezhet fokozott PS expressziót, és végső soron a thrombocyták prokoaguláns aktivitását [42]. A vörösvértestek – bár sem sejtmaggal, sem mitokondriummal nem rendelkeznek – szintén elszennvedői lehetnek a programozott sejthalálnak (eryptosisnak), amelyet esetükben a vörösvértestek zsugorodása, a sejtmembrán kiboltosulások létrejötte és a fokozott PS expresszió jelez [43]. A vörösvértesteket ért károsodás esetén az eryptosis megakadályozza a hemolízis kialakulását, amely során a nagy mennyiségben kiszabaduló hemoglobin veseelégtelenséghez vezethetne. Az excesszív eryptosis azonban anaemiát, sőt mikrocirkulációs zavart okozhat, ugyanis az eryptoticus vörösvértestek az endothelsejtekhez kötődhetnek. Szepszisben fokozott eryptosist írtak le, valamint megfigyelték, hogy a szeptikus betegek plazmája egészséges egyének vörösvértestjein a membrán átrendeződését és a sejtek zsugorodását váltja ki [43, 44]. Szepszis esetén az eryptosist stimulálhatják egyes bakteriális virulenciafaktorok (pl. szfingomielináz, hemolizin), a fertőzéshez társuló vashiány, a fokozott PAF-termelés és az oxidatív stressz, amelyek részben kalcium-függő, részben attól független módon fejtik ki hatásukat [43, 45, 46].

#### **2.3.4. Az oxidatív stressz markerei: a laktát és a húgysav**

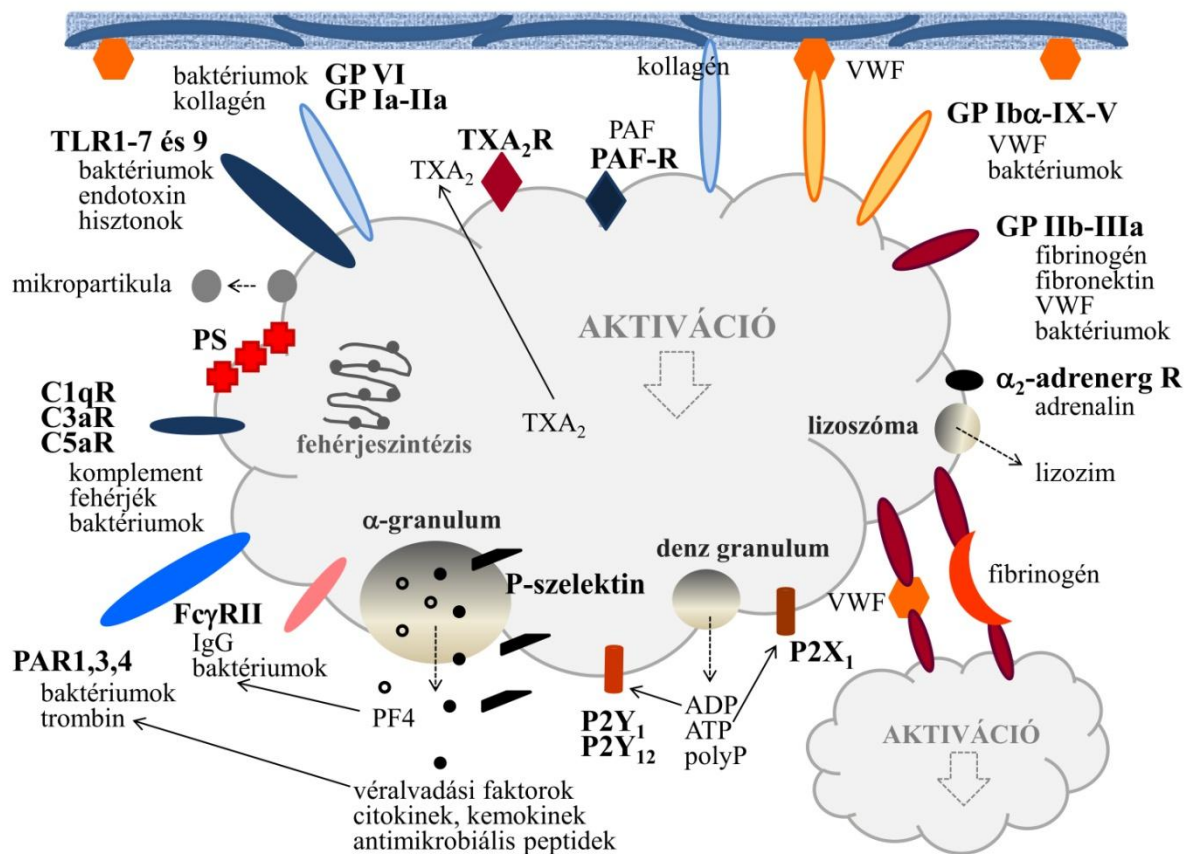
A szepszis-asszociált hyperlactataemia a mortalitás erős, más paramétertől független előrejelzője. A laktát koncentrációt sokáig kizárólag a hypoperfusio és a szöveti hypoxia markereként tartották számon, ez esetben az emelkedett laktátszint az anaerob glikolízis eredménye. Ma már egyértelmű, hogy stresszhelyzetben (így szepszis esetén is) a laktátszint emelkedése fontos adaptív tényező is, amely segíti a túlélést: egyrészt egy alternatív energiaforrást biztosít a sejtek számára, másrészt maga is glükózforrás [47]. Az adrenerg stimulus fokozza az aerob glikolízist, így több piruvát és következésképpen több laktát keletkezik a sejtekben. E megnövekedett laktát mennyiséget használja fel a szív és az agy energianyerés céljából, a májban és a vesében pedig a glükoneogenezis során glükóz keletkezik belőle. Experimentális modellek alapján a tüdő bizonyult a fő laktátforrásnak szepszis esetén [48].

A húgysav egy hatékony antioxidáns, a purin-metabolizmus végterméke, fiziológias pH-n elsősorban urát anion formájában van jelen a szervezetben, kétharmada a vesén át választódik ki. Szepszisben mind az aktivált immunsejtekből, mind az endothelsejtekből reaktív oxigén-szabadgyökök szabadulnak fel. Az oxidatív stressz a szabadgyök-scavenger húgysav koncentrációjának emelkedéséhez vezet [49]. A magas húgysavszint közvetlen vagy közvetett módon vesekárosító hatású, endothel dysfunciót eredményez, számos gyulladásoz transzkripciós faktort aktivál, fokozza egyes citokinek (pl. TNF- $\alpha$ ) és kemokinek termelődését, valamint erőteljesen gátolja az NO-szintézist [50-53].

### 2.3.5. A thrombocyták és a véralvadás szerepe szepszisben

Szepszisben a gyulladás és a véralvadás szorosan összekapcsolódik: a fertőzés nem csupán aktiválja a koagulációs kaszkádot, hanem az alvadási rendszer is fontos szerepet játszik a kórokozó terjedésének limitálásában [54-56]. A képződő nagy mennyiségű trombin, az aktiválódott komplement rendszer fehérjéi, az endothelsejtek proadhezív fenotípusa és a subendothelialis kollagén szabaddá válása, valamint maga a kórokozó is thrombocyta aktivációt eredményez (2. ábra) [57]. Ez idáig számos baktérium esetében – többek között az *E. coli* esetén is – igazolódott, hogy képes a thrombocytákat direkt vagy indirekt módon aktiválni. E folyamatot plazmafehérjék (fibrinogén, von Willebrand faktor, komplement fehérjék, immunglobulinok) és/vagy thrombocyta receptorok (Fc $\gamma$  receptor IIa, glikoprotein Iba, glikoprotein IIb-IIIa, C1q, C3a és C5a receptorok, proteáz-aktivált receptor 1, toll-like receptorok) mediálják, de a baktérium közvetlenül is kötődhet egyes receptorokhoz (TLR2, TLR4, glikoprotein Iba) vagy a baktérium által felszabadított toxin (pl. Shiga toxin, lipoteicholsav) hat a thrombocytára [57, 58]. A thrombocytákból felszabaduló thrombocyta 4-es faktor egyes baktériumokhoz kötődve lerövidíti a thrombocyta aktivációig eltelt időt. Az *E. coli* direkt módon elsősorban a TLR4-en keresztül kötődhet a thrombocytákhoz, de Arbesu és munkatársai a közelmúltban leírtak egy TLR4-független interakciót is [58]. Maga a thrombocyta számos komplement faktort tartalmaz és az aktivált thrombocyta fokozza a komplement rendszer aktiválódását [58]. A thrombocyta adhézió, aggregáció és szekréció túl kiemelt jelentőségű a thrombocyta-leukocyta kapcsolat, melynek során a thrombocyták segítik a neutrophil granulocyták kilépését az intravasculáris térből és aktiválják őket [57]. A thrombocyták maguk is képesek egyes citokineket szekretálni és antimikrobiális peptidjeiknek köszönhetően direkt baktericid hatással is rendelkeznek. Szepszisben a thrombocyták egy részét citotoxikusnak találták, amelyek granzim B-t szekretálnak és a targetsejttel direkt

kapcsolatot létesítve annak apoptózisát indukálják [59]. Az aktiváló ágensek a thrombocyták prokoaguláns fenotípusát is eredményezhetik. E prokoaguláns thrombocyták – amelyek nem pusztán „túl aktivált” formák, hanem a nekrozis jellegzetességeit mutatják – nagymértékben fokozzák a trombin- és ezáltal a fibrinképződést, nagy mennyiségű proinflammatorikus PAF-ot szekretálnak és fokozottan kötődnek a neutrophil granulocytákhoz [42]. Az aktivált thrombocytá eredetű mikropartikulák is jelentős prokoaguláns aktivitással rendelkeznek [57]. Míg kontrollált gyulladás esetén a thrombocyták segítik a fertőzés lokalizálását és a kórokozó eliminálását, addig szepszisben a kontrollálatlan thrombocytá aktiváció túlzott mértékű gyulladáshoz, microthrombusok képződéséhez és thrombocytopeniához, végül disseminált intravasculáris coagulációhoz (DIC-hez) és sokszervi elégtelenséghez vezet [60]. Irodalmi adatok alapján a thrombocytopenia – függetlenül annak okától – a kritikus állapotú, valamint a septicus betegek esetén a mortalitás független előrejelzője [57].



2. ábra. Thrombocyta aktiváció szepszisben

A gyulladás következtében aktiválódik a véralvadási rendszer és a képződő trombin a PAR-okon keresztül aktiválja a thrombocytákat. Az endothelsérülés következtében szabaddá váló subendothelialis kollagénnel a thrombocyták közvetlenül a GP Ia-IIa és GP VI, míg a VWF-on keresztül a GP Ib-IX-V komplexen keresztül kötődnek (adhézió). A baktériumok a megfelelő receptorokon keresztül (TLR, GP Ib-IX-V, GP VI, GP IIb-IIIa, C1qR, Fc $\gamma$ RII, PAR) direkt vagy indirekt módon aktiválhatják a thrombocytákat. A PF4 az egyes baktériumokhoz kötődve lerövidíti a thrombocyta aktivációig eltelt időt. Szepszisben az aktiválódó komplement rendszer és a PAF is thrombocyta aktivációhoz vezet. Számos baktérium, az endotoxin és a hisztinok a TLR-okon keresztül fejtik ki aktiváló hatásukat. Az aktivált thrombocytákból felszabaduló TXA<sub>2</sub> és ADP további thrombocytákat aktivál, amelyek utána a GP IIb-IIIa receptoraikon keresztül összekapcsolódnak fibrinogén- vagy VWF-mediált módon (aggregáció). A thrombocyta aktiváció alakváltozáshoz, aggregátum-képződéshez és degranulációhoz vezet. A granulumokból felszabaduló alvadási faktorok, citokinek, kemokinek és a polyP prokoaguláns és proinflammatorikus hatással rendelkeznek. A PS-t expresszáló thrombocyták és a mikropartikulumok szintén prokoaguláns hatásúak.

Rövidítések: GP: glikoprotein, PAF: platelet activating factor, PAR: protease-activated receptor, PF4: platelet factor 4, polyP: inorganikus polifoszfát, PS: foszfatidil-szerin, TLR: toll-like receptor, TXA<sub>2</sub>: tromboxán A<sub>2</sub>, VWF: von Willebrand faktor. Saját készítésű ábra, amely de Stoppelaar és munkatársainak közleménye alapján, az eredeti ábra módosításával készült [57].

Szepszisben az aktivált thrombocyták a TLR4-en keresztül a neutrophil granulocytákhoz kötődve azok maganyagának felszabadulását váltják ki, neutrophil extracellular trap-ek (NET-ek) képződését eredményezve; ugyanakkor a NET-ek is fokozzák a thrombocyták aktivációját [54, 61]. A NET-ek olyan térhálós struktúrák, amelyek a DNS-en kívül hisztonokból és a sejtek granulumaiból származó enzimekből (neutrophil elasztáz, myeloperoxidáz) állnak; proteolitikus aktivitással rendelkeznek, csapdába ejtik és elpusztítják a kórokozókat. A DNS és a hisztonok a NET-képződésen kívül nekrozis során is kiszabadulhatnak a sejtekből. Az extracelluláris hisztonokat az endotheliumra nézve citotoxikusnak találták, így közreműködhetnek az endothel dysfunctio létrehozásában; képesek aktiválni a thrombocytákat TLR2-n és TLR4-en keresztül; ezenkívül a humán monocyták esetében fokozzák a szöveti faktor aktivitást és a trombin generációt [62-64]. E hatásokért elsősorban a H3 és H4 hisztonok felelősek. A NET-ek és a thrombocyták együttesen vettek részt a DIC kialakításában egy egér szepszis modellben [65]. Összességében a NET-ek a thrombocyták aktiváción kívül fokozzák az alvadási kaskád működését is mind az extrinszik, mind az intrinszik útvonalon keresztül, illetve gátolják az alvadás limitálását a szöveti faktor út inhibitor (TFPI) proteolízisével [61]. A NET-ek kifejezett prokoaguláns és proinflammatorikus hatásuk révén a mikrocirkulációban ún. immuno-thrombosishoz vezetnek, amely kontrollált formában lokalizálja a fertőzést, míg kontrollálatlan esetben DIC-et eredményez [66].

Szepszisben a véralvadási rendszerben bekövetkező változásokért elsősorban a citokinek felelősek [56]. A protrombotikus állapot kialakulását három fő folyamat eredményezi: (1) a prokoaguláns útvonalak aktiválása, (2) a természetes antikoagulánsok gátlása és (3) a fibrinolízis szuppressziója. Az alvadási rendszer aktivációjának központi lépése a szöveti faktor expressziójának fokozódása. Ez elsősorban a monocyták/macrophag rendszerben valósul meg, de néhány tanulmányban szöveti faktort detektáltak még az aktivált

thrombocytákon, endothelsejteken, neutrophil granulocytákon, sőt az eosinophileken is [67] Endotoxaemiás és szeptikus állatmodellekben a nem hemopoietikus sejtek szöveti faktor expressziójának szelektív gátlása az alvadási aktiváció gátlását eredményezte, ami arra utal, hogy a szöveti sejtek (pl. tüdő és vese epithelsejtek, valamint az agy astrocytái) szintén jelentős szöveti faktor termeléssel rendelkeznek szepszisben [68]. Az endothelsejtek felszínén lévő trombomodulin, endothelialis protein C receptor, protein S, TFPI és heparán-szulfát közreműködik a véralvadás limitálásában. Szepszisben a károsodott endothelsejteken ezek mennyisége csökken, így gátlódnak a természetes antikoaguláns folyamatok (protein C útvonala, TFPI és antitrombin) [19, 66, 67]. A plazminogén aktivátor inhibitor-1 (PAI-1) szintézisének fokozódása és a trombinnal aktiválható fibrinolízis inhibitor (TAFI) aktiválódása a fibrinolízis gátlását eredményezi.

A gyulladás és a véralvadás kapcsolatának viszonylag új elemei az inorganikus polifoszfátok (polyP), amelyek 3-1000 ortofoszfát lineáris polimerjei. A nagyobb méretűek bakteriális eredetűek, míg a kisebbek megtalálhatók az emberi szervezetben is, például a thrombocyták denz granulumai nagy mennyiségben tartalmazzák polyP-t [69]. A polyP-k aktiválják a véralvadás kontakt fázisát, amely az alvadási aktiváció mellett a gyulladási mediátor bradikinin képződését eredményezi [70, 71]. Ezenkívül fokozzák az V-ös faktor aktivációját, a XI-es faktor auto-, illetve trombin általi aktivációját, stabilizálják a fibrinhálót és gátolják a TFPI működését. A kontakt aktiváció kiváltására csak a hosszú láncú bakteriális polyP-k képesek, míg az egyéb protrombotikus hatások a thrombocytá aktiváció során felszabaduló polyP-k esetében is létrejönnek. A hemosztázis mellett a gyulladásban is jelentős szerepük van: a polyP-k hozzájárulnak az endothelium proadhezív fenotípusának kialakulásához; fokozzák a hisztonok proinflammatorikus hatását; részben direkt módon, részben a bradikinin keresztül fokozzák a vaszkuláris permeabilitást; illetve a kontakt aktiváció következményeként a komplement rendszer klasszikus útjának aktivációját [69]. Az

extracelluláris hisztonok thrombocytá aktiváló és trombin generáló hatása polyP-mediáltnak bizonyult.

#### **2.4. A laboratóriumi medicina szerepe a szepszis diagnosztikájában, a szepszis lehetséges biomarkerei**

A klinikai kép alapján szepszisnek diagnosztizált esetekben vagy amikor bacteraemia vagy candidaemia feltételezhető, a hemokultúra vizsgálata a betegek 30-50%-ában negatív eredményt ad [72-74]. A hemokultúra negatív szepszis és a nem fertőzőes eredetű SIRS elkülönítése rendkívül fontos, hiszen a Surviving Sepsis Campaign ajánlása alapján az antibiotikus kezelést a szepszis észlelését követő 1 órán belül el kell kezdeni [75, 76], ugyanis minden egy órás késlekedés 7,6%-kal fokozza a szepszis halálozási kockázatát [77]. Ráadásul a mikrobiológiai vizsgálatok többsége viszonylag későn ad eredményt, így a minél korábbi pontos diagnózis érdekében laboratóriumi vizsgálatok elvégzése szükséges. Jelenleg nincs olyan laboratóriumi vizsgálat, amely önmagában alkalmas lenne a szepszis diagnosztikájára [78].

A procalcitonin a Food and Drug Administration által jóváhagyott szepszis biomarker, amely jól elkülöníti a szepszist a SIRS-től, továbbá a rendszeres procalcitoninszint monitorozás fontos a szepszis diagnosztikájában, prognosztikájában és az antibiotikumra adott válasz követése szempontjából [21, 78, 79]. Hátránya, hogy önmagában mérsékelt diagnosztikai hatékonysággal rendelkezik, így csak az egyéb klinikai információkkal együtt értékelhető megfelelően [78, 80]. A CRP jól elkülöníti a bakteriális és virális fertőzéseket, azonban alacsonyabb tartományban nem differenciál egyértelműen a fertőzőes és nem fertőzőes eredet között [21, 78]. Egy 87 mg/L-es CRP koncentráció 88%-os valószínűséggel bakteriális fertőzésre utal [81]. A CRP szint jól korrelál a betegség súlyosságával, a szervfunkció-

zavarral és a mortalitással, ezenkívül a napi monitorozás elengedhetetlen az antibiotikum terápiára adott válasz megítéléséhez [81-83]. A citokinek a gyulladásos válasz monitorozásának hasznos markerei lehetnek, de egyik sem rendelkezik jobb szenzitivitással és specifitással, mint a prokalcitonin és a CRP [84]. A proinflammatorikus IL-6, a TNF- $\alpha$  és az anti-inflammatorikus IL-10 koncentrációjának emelkedése jól korrelált a szepszis súlyosságával [21, 85]. Gyermekeknél az IL-8-at használták a szepszis súlyosságának előrejelzésére, de felnőtt populációban ennek alkalmazhatósága nem igazolódott [86, 87]. Súlyos szepszis és szepszisz shock esetén a mortalitás direkt módon korrelált az IL-18 szint emelkedésével – függetlenül az egyéb pro- és anti-inflammatorikus citokinek szintjétől [88]. Szepszisz gyermeknél az IL-27 és a prokalcitonin együttes monitorozása tűnt ígéretes prognosztikai markernek [89].

Az adekvát folyadékpótlás ellenére is 2 mmol/L fölötti laktát koncentráció 2015 óta a szepszisz shock diagnosztikai kritériuma [9]. A laktát emelkedett szintje erős korrelációt mutat a kedvezőtlen kimenetellel [90, 91], sorozatos mérése jól használható a terápia hatékonyságának monitorozásában [75]. Mindezek ellenére sem a szepszisz diagnosztikájában, sem a mortalitás előrejelzésében nem eléggé specifikus és szenzitív biomarker [78]. Az emelkedett húgysavszintet kedvezőtlen prognosztikai markernek találták [49]. A légzőszervi működés (artériás vérgáz-értékek), a máj- és vesefunkció (bilirubin és kreatinin koncentráció) vizsgálata, valamint a thrombocytaszám mérése nélkülözhetetlen a SOFA score meghatározásához [7].

Szepsziszben leukocytosis, leukopenia vagy az éretlen alakok (stábok) 10% fölötti aránya jellemző [4]. A delta neutrophil index – amely egy hematológiai automata által számított paraméter – az éretlen granulocyták arányára utal (kivéve a blastokat) és jobb indikátora a szepszisznek, mint a fehérvérsejtszám, az abszolút neutrophilszám, a jugendek és stábok összesített aránya, a laktát vagy a CRP. Az index jól korrelál a szepszisz shock és a

DIC kialakulásával, valamint a mortalitással [27]. A delta neutrophil index/ albumin hányados a delta neutrophil indexnél még érzékenyebb marker lehet [92]. A magas vörösvérsejtek megjelenése a szepszis kedvezőtlen kimenetelét jelzi [29]. Azoknál a magas vörösvérsejtekkel rendelkező betegeknél, akiknél a magas vörösvérsejtek megjelenését alacsonyabb  $p_aO_2$  (hypoxia) előzte meg, fokozottabb volt a mortalitás, mint a magasabb  $p_aO_2$ -vel és egyidejűleg magas vörösvérsejtekkel rendelkező betegek esetén [93]. Az éretlen thrombocyták frakció – amely szintén egy hematológiai automata által meghatározott érték – a retikulált thrombocyták arányára utal és a csontvelői megakaryocyták aktivitásáról ad információt [33]. Az éretlen thrombocyták frakciót a szepszis előrejelzőjének találták [33], és azt is leírták, hogy jól elkülöníti a szeptikus és nem szeptikus betegeket, de nem alkalmas a szepszis súlyosságának megítélésére [94].

Szepszisben az abszolút lymphocytaszám tartósan alacsony volta szekunder fertőzésekre hajlamosít és kedvezőtlen kimenetelt jelez [95, 96]. A keringő CD4+CD25+CD39+ regulatorikus T-sejtek számának emelkedése szepsziszre utal, míg a keringő CD4+CD25+ regulatorikus T-sejtek számának emelkedése, a keringő dendritikus sejtek számának tartós csökkenése és a B- és T-lymphocyták attenuátor (BTLA)+/CD4+ lymphocyták arányának növekedése pedig rossz prognózisra [21]. Szintén kedvezőtlen prognosztikai marker a citotoxikus T-lymphocyták antigén-4 (CTLA-4) expressziójának fokozódása csakúgy, mint a triggering receptor expressed on myeloid cells-1 szolubilis formájának (sTREM-1) emelkedett koncentrációja [21]. Szeptikus shock esetén szignifikánsan alacsonyabb szolubilis CD40 ligand szinteket írtak le [97]. A presepsin (szolubilis CD14 fragmenst) csak mérsékelt diagnosztikai hatékonyságúnak találták a szepszis és a SIRS elkülönítésében [98]. A neutrophil granulocyták CD64 expressziója bakteriális fertőzés esetén fokozott, így e vizsgálat alkalmas lehet a bakteriális és virális fertőzés, valamint a szepszis és SIRS elkülönítésére [21, 78]. A monocytákon a programozott sejthalál-

1 (PD-1) receptor, míg a neutrophil granulocytákon a programozott sejthalál-ligand1(PD-L1) expresszió fokozódása rossz prognózisa utalt [21]. A szeptikus betegekben a D-dimer emelkedett koncentrációja bacteraemiára utalt és az emelkedés mértéke korrelált a szepszis súlyosságával [99]. A myocardialis biomarkerek közül a bázikus nátriuretikus peptid propeptidjének N-terminális fragmense (NT-pro-BNP), a magas szenzitivitású kardiális troponin T (hs-cTnT) és a myoglobin koncentráció lehet hasznos prediktív marker [78]. Leírták továbbá a proadrenomedullin, az angiopoietinek és az endocanok diagnosztikai és prognosztikai szerepét is [21, 78]. A keringő szabad (sejtekből kiszabadult) DNS korai prognosztikai marker, az első 96 órában mért maximális plazma DNS koncentráció jól korrelált a szervkárosodással és a szepszis súlyosságával [21]. Szepszisben eddig számos keringő mikroRNS szintjét találták emelkedettnek (pl. miR-122, 133a, 574-5p, 4772) vagy csökkentnek (pl. miR-25, 150, 223, 297) [79].

## **2.5. Állatmodellek szepszisben**

A klinikai tanulmányok lehetőséget biztosítanak a szepszis patomechanizmusának mélyebb megismerésére, azonban e tanulmányok eredményei nagyfokú variabilitást mutatnak a betegek eltérő életkorának, alapbetegségének, a betegség klinikai lefolyásának, az alkalmazott terápiának és a kórokozók heterogenitásának megfelelően. A humán betegekkel ellentétben ezen tényezők jól standardizálhatók az állatmodellekben, így ezekben az esetekben az eltérések kiváltó okai viszonylag könnyebben felderíthetők. Az utóbbi évtizedekben az experimentális állatmodellek iránt egyre nagyobb érdeklődés mutatkozott és körvonalazódott e modellek klinikai relevanciája [100]. A szepszissel kapcsolatos vizsgálatok kezdetén a leggyakrabban használt modell a patkány modell volt. Hátránya, hogy a levehető

vérmennyiség meglehetősen limitált, a hemodinamikai profil az emberekéétől különböző és a patkány viszonylag rezisztens az endotoxinra. A későbbi vizsgálatok során már nagyobb állatokat használtak, hogy jobban utánozhassák a humán szepszis során bekövetkező patológiás változásokat. Három experimentális modell terjedt el szélesebb körben: (1) a coecalis ligatio és punctio által kiváltott peritonitis modell [101], (2) a szepszis indukciója intravénás vagy intraperitoneális endotoxin injekcióval [102], illetve (3) élő baktériumok beadásával. A vizsgálatok egy része során Gram-pozitív baktériumokat is használtak [103], de a szepszist a legtöbb esetben Gram-negatív baktériumok (főleg *E. coli*) adásával váltották ki. Ma már a kutatók egyetértenek abban, hogy az endotoxin injekció inkább az endotoxin shock modelljeként szolgál, és nem egy ideális szepszis modell [104]. Az endotoxaemia kiváltására használt LPS típusa is befolyásolja az endotoxin hatását, így például munkacsoportunk korábbi eredményei alapján [105] a *Salmonella minnesota* eredetű Re-LPS direkt módon fokozza a thrombocyta aktivációt, míg az *E. coli O111:B4* eredetű S-LPS nem rendelkezik ilyen hatással. Összességében a szepszis indukciós lehetőségek közül az élő baktériumok beadása az, amelyik valószínűleg a legjobban mimikálja az emberben in vivo bekövetkező patológiás folyamatokat.

### 3. Célkitűzések

A szervezetnek a fertőzésre és következményes hypoxiára adott válasza intenzíven tanulmányozott, de e változások időbeliségéről viszonylag keveset tudunk. A hemosztázis vizsgálata során a szeptikus betegek esetén a klinikai tanulmányok döntő többsége hypocoagulabilitást jelez, de a kezdeti és valószínűleg rövid ideig tartó hypercoagulabilitást nem képes kimutatni.

A fentiek alapján a munkánk célja a következő volt:

- a fertőzés és a hypoxia indukálta változások kinetikájának meghatározása a klasszikus szepszis paraméterek és a szervkárosodás viszonylatában,
- a fulmináns szepszis során fellépő korai hemosztázis eltérések kimutatása, azaz az alvadási és thrombocyta aktiváció igazolása, továbbá
- a szepszis során felszabaduló szolubilis anyagok sejtaktiváló hatásának kimutatása in vitro kísérletekben.

## 4. Anyagok és módszerek

### 4.1. Sertés szepszis modell

A kísérletek kivitelezése az Európai Unió irányelveinek és a hazai előírásoknak megfelelően történt a Debreceni Egyetem Állatjóléti Bizottságának jóváhagyásával (az engedély száma: 21/2013. DEMAB). Tizenhét fiatal nőstény Hungahib sertést vizsgáltunk (testtömeg:  $19,5 \pm 1,6$  kg) a szeptikus ( $n = 10$ ) vagy a kontroll ( $n = 7$ ) csoport tagjaként. A Sebészeti Műtéttani Tanszék munkatársai és az aneszteziológus kollégák általános anesztéziában (ketamin és xylazin hatása alatt) az asszisztált lélegeztetéshez tracheostomiát végeztek, valamint a többszöri mintavétel és a hemodinamikai mérések biztosítása céljából a bal vena jugularis externába és az arteria femoralisba kanült helyeztek (3. ábra). Az állatok nem részesültek antikoaguláns terápiában, illetve egyéb gyógyszeres kezelésben.

Az *E. coli*-kezelt csoportban a szepszist *E. coli* szuszpenzió intravénás adásával váltották ki ( $2,5 \times 10^5$ /mL; ATCC 25922 törzs, API suspension medium-ban /bioMérieux, Lyon, Franciaország/, Debreceni Egyetem Orvosi Mikrobiológiai Intézet). A fiziológiás sóoldatban szuszpendált *E. coli*-t folyamatosan emelkedő mennyiségben injektálták: az állatok az első 30 percben 2 mL baktérium szuszpenziót kaptak, a következő 30 percben további 4 mL-t, majd 2 órán át óránként 16 mL-t. Három óra alatt összesen  $9,5 \times 10^6$  *E. coli* intravénás beadására került sor [106, 107]. A kontroll csoport tagjai a szeptikus csoport tagjaival azonos mennyiségű és azonos protokoll szerint beadott fiziológiás sóoldatot kaptak, náluk más beavatkozás nem történt. A megfelelő mélységű anesztéziát 15 mg/kg ketamin és 1 mg/kg xylazin intramuscularis adásával 4 órán keresztül tartották fenn oly módon, hogy az első órában 20 percenként, majd a második órától 25 percenként kaptak az állatok anesztetikumot. Az anesztézia mélységéről a vérnyomás és szívfrekvencia változása, illetve

az egyes reflexek megléte vagy hiánya (pl. szemháj-, cornea-reflex, lábujjköz-reflex) adott információt. A 4 órás időtartam alatt az állatokat 37°C-os elektromos melegítőpárnával folyamatosan melegítették. A kísérletek végén végleg elaltatták őket.



**3. ábra. Sertés szepszis modell**

Az általános anesztéziában lévő, lélegeztetett állattól a kanülált arteria femoralisán (a) és vena jugularis externáján (b) keresztül történtek a mintavételek. Az ábra Dr. Németh Norbert anyagából származik.

#### **4.2. Maghőmérséklet, hemodinamikai paraméterek és vérgáz-monitorozás**

A maghőmérséklet meghatározása a centrális vénás kanülön keresztül történt Philips IntelliVue monitorhoz (Koninklijke Philips N.V., Hollandia) kötött PiCCO készülék (Pulsion Medical Systems SE, Németország) segítségével. A szívfrekvencia és az artériás

középnomás követésére szintén invazív módon került sor ugyanezen készülékkel. A módosított shock index – amely a keringés állapotáról ad információt és a kritikus állapotú betegek mortalitásának klinikailag szignifikáns előrejelzője – a szívfrekvencia és az artériás közepnyomás hányadosa [108]. Az artériás vérben az oxigén parciális nyomását ( $p_aO_2$ ) és a laktát koncentrációt GEM 3500 vérgáz-analizátorral (Instrumentation Laboratory, Bedford, USA) határozták meg.

### 4.3. Vérvétel és mintakezelés

Vénás vér vétele minden esetben az előzetesen behelyezett kanülön keresztül történt közvetlenül a vacutainer vérvételi csövekbe (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) oly módon, hogy az első 3 mL vért nem használtuk fel. A vérvételi csöveink antikoagulánsként 0,105 M nátrium-citrátot tartalmaztak, a vér-antikoaguláns arány 9:1 volt. Az első mintavételt közvetlenül az *E. coli* adásának kezdete előtt végezték a kollégák (kiindulási, más néven 0 órás vérvétel); majd az *E. coli*-tartalmú infúzió kezdete után 2 és 4 órával ismételt mintavételre került sor (2 és 4 órás vérvételek). Valamennyi vérmintát 37°C-on szállították a laboratóriumba és a mintavételtől számított 20 percen belül elkezdték a méréseket. A citrátos teljes vérből nagyvérkép-meghatározást végeztünk hematológiai automatán, valamint kenetet készítettünk. A koagulációs szűrőtesztekhez, a trombin generációs vizsgálatok egy részéhez, a klinikai kémiai tesztekhez és az in vitro kísérletekhez thrombocyta-szegény plazmát (PPP) használtunk. Ehhez a nátrium-citráttal alvadásgátolt teljes vért tartalmazó vérvételi csövet a gyártó ajánlásának megfelelően 1500g-n 15 percig szobahőmérsékleten centrifugáltuk, majd az így nyert PPP-t használtuk az alvadási szűrőtesztek meghatározásához, a klinikai kémiai vizsgálatokhoz, az in vitro kísérletekhez, valamint a thrombocyta-dús plazma (PRP) thrombocytaszámának beállításához. A PPP-ből végzett trombin generációs vizsgálatokhoz az

egyszer centrifugált PPP-t még egyszer centrifugáltuk 10000g-n 10 percig szobahőmérsékleten [109]. A centrifugálás után minden esetben a plazma felső 2/3-át használtuk. Az áramlási citometriai vizsgálatokat és a további trombin generációs vizsgálatokat PRP-ből végeztük, amelyet az alvadásgátolt teljes vér 170g-n 10 percig szobahőmérsékleten történő centrifugálásával nyertünk. A PRP thrombocytaszámát Sysmex XP 300 hematológiai automatán (Sysmex, Kobe, Japán) határoztuk meg, majd megfelelő mennyiségű PPP hozzáadásával a thrombocytaszámot 250 G/L-re állítottuk be.

#### **4.4. Nagyvérvék meghatározása hematológiai automatával, mikroszkópos kenetelemzés és alvadási szűrőtesztek**

A nagyvérvék meghatározását a rutin klinikai laboratóriumi gyakorlatunknak megfelelően végeztük ADVIA 120 hematológiai automatán (Siemens, Forchheim, Németország) egy olyan speciális szoftverrel, amely lehetővé teszi a sertésvér sejtsejtek elemének pontos elkülönítését. A lebenyezettségi indexet – amely a fehérvérsejtek éretlenségét jelzi – ugyanezen analizátor számolta. A készülék a basophil/lebenyezettségi üzemmódban először lizálja a vörösvértesteket és a thrombocytákat, majd egy reagens és az egyre emelkedő hőmérséklet segítségével a basophil granulocyták kivételével az összes fehérvérsejtet megfosztja a citoplazmájától. Ezt követően a sejtmagok alakja és összetettsége alapján a fehérvérsejteket mononukleáris és polimorfonukleáris csoportokba sorolja. A Baso X hisztogramon a két fehérvérsejt-populációnak megfelelően három különböző érték látható: a mononukleáris csúcs, a mononukleáris/polimorfonukleáris völgy és a polimorfonukleáris csúcs. A lebenyezettségi indexet a készülék úgy számolja, hogy a polimorfonukleáris csúcs értékét elosztja 14-gyel. Az index csökkent értéke „balra tolt” vérvépet jelez, azaz éretlen fehérvérsejtek megjelenését a keringésben.

A magas vörösvérsejtek számát May-Grünwald-Giemsa festésű perifériás kenetekben határoztuk meg, ugyanitt tanulmányoztuk a thrombocyták morfológiáját. A mikroszkópos vizsgálatokat Zeiss Axiostar Plus fénymikroszkóppal (Zeiss, Jena, Németország) végeztük. A magas vörösvérsejtek számát (G/L) az 1000 fehérvérsejtre eső magas vörösvérsejtek számából és a minták fehérvérsejtszámából kalkuláltuk. Az óriás és féregszerű thrombocyták számát 200 egyedi thrombocytára vonatkoztatva adtuk meg. Thrombocytá aggregátumnak a 3 vagy több thrombocytát tartalmazó konglomerátumot tekintettük és számukat szintén 200 egyedi thrombocytára vonatkoztattuk.

Az alvadási szűrőteszteket (protrombin idő, aktivált parciális tromboplastin idő /APTI/, trombin idő és fibrinogén koncentráció) BCS koagulométeren mértük (Siemens, Forcheim, Németország) a rutin klinikai laboratóriumi gyakorlatnak megfelelően.

#### **4.5. Klinikai kémiai vizsgálatok**

A húgysav és a kreatinin koncentráció, valamint a kreatin-kináz (CK) és a glutamát-piruvát-transzamináz (GPT) aktivitás mérése COBAS 6000 készüléken (Roche, Basel, Svájc) történt a rutin klinikai laboratóriumi gyakorlatnak megfelelően.

#### **4.6. Áramlási citometriai vizsgálatok**

A thrombocytá mitokondrium membrán depolarizációt FC500 áramlási citométer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) segítségével vizsgáltuk Leytin és munkatársainak módszere alapján [110], amelyet sertés thrombocytákra adaptáltunk. E módszer lényege, hogy a thrombocytákat egy 3,3'-dihexil-oxocarbocianin-jodid (DiOC<sub>6(3)</sub>; Sigma-Aldrich, Budapest, Hungary) nevű fluoreszcens festékkel jelöljük és normál mitokondrium működés esetén a

festék a mitokondriumokban felhalmozódik. Amennyiben a mitokondrium membrán depolarizálttá válik, a thrombocyta mitokondriumok DiOC<sub>6(3)</sub> akkumulációja csökken, amely a teljes thrombocyta populáció átlagos fluoreszcencia intenzitásának (MFI) csökkenését eredményezi. A PRP-ket (5 µL) foszfáttal pufferolt sóoldattal (PBS) történő 20-szoros hígítást követően 20 µL 1,5 µmol/L DiOC<sub>6(3)</sub>-oldattal inkubáltuk 20 percig szobahőmérsékleten, sötétben, majd PBS-sel 560 µL végtérfogatúra hígítottuk. Az áramlási citométer segítségével a thrombocytákat a fényszórási tulajdonságaik alapján azonosítottuk – ugyanis korábbi kísérleteink alapján a thrombocyták azonosítására használt anti-humán antitestek nem kötődtek a sertés thrombocytákhoz –, és az FL1 hisztogramokat elemeztük. A mitokondrium membrán depolarizáció mértékét az FL1 hisztogramon észlelt MFI csökkenésként határoztuk meg.

A thrombocyták PS expresszióját szintén a Leytin és munkatársai által közölt áramlási citometriai módszer [110] általunk módosított változatával vizsgáltuk. A PS expressziót a thrombocyták felszínéhez történő annexin V kötődésként határoztuk meg, méréseinkhez fluoreszcein-izotiocianát (FITC)-konjugált annexin V-öt (BD Pharmigen, San Jose, CA, USA) használtunk. Öt µL PRP-t 5 µL annexin V-FITC-cel jelöltünk 40 µL annexin V kötő puffer közegben (BD Pharmigen), a mintáinkat 15 percig szobahőmérsékleten, sötétben inkubáltuk, majd annexin V kötő pufferrel 550 µL végtérfogatúra hígítottuk. A thrombocytákat méretük és fényszórási tulajdonságaik alapján azonosítottuk. Mivel célunk az egyedi thrombocyta populáció vizsgálata volt, ezért a thrombocyta aggregátumokat (a nagy előre haladó és oldalsó fényszórású thrombocyta eseményeket) kapuzással kizártuk. Az aktivált thrombocytákat az FL1 hisztogramokon annexin V bright eseményekként láthattuk és ezen thrombocyták arányát oly módon határoztuk meg, hogy az annexin V bright események számát a teljes egyedi thrombocyta populáció eseményszámához viszonyítottuk.

#### **4.7. Szeptikus sertés plazmák mosott humán vörösvértestekre gyakorolt hatása**

Annak vizsgálatára, hogy vajon az *E. coli*-kezelt és nem kezelt állatok plazma mintái milyen hatással vannak mosott humán vörösvértestekre, in vitro kísérleteket végeztünk egy korábban közölt kísérleti rendszer mintájára [111]. Egészséges „0” vércsoportú donoroktól vért vettünk K<sub>2</sub>-EDTA-t tartalmazó csövekbe (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), majd az alvadásgátolt teljes vért 200g-n 10 percig szobahőmérsékleten centrifugáltuk, így különítettük el a vörösvértesteket a fehérvérsejtektől és a PRP-től. Ezt követően a vörösvértest-szuszpenziót PBS-ben kétszer, majd CaCl<sub>2</sub>-mentes Ringer-oldatban egyszer mostuk. A mosott vörösvértest-szuszpenzió hematokritjét kalcium-mentes Ringer-oldattal 0,1-re (10%-ra) állítottuk be. Az *E. coli* vagy fiziológiás sóoldat infúzió előtt, illetve utána 2 és 4 órával levett sertés minták plazmáját 24 órán át 37°C-on 5% CO<sub>2</sub> közegben inkubáltuk a mosott vörösvértestekkel, a keverékben a hematokrit 0,05 (5%) volt. Mind a keverék elkészítése (10 perc), mind a teljes inkubációs idő letelte (24 óra) után meghatároztuk a vörösvértestek PS expresszióját áramlási citometriai vizsgálattal. A vörösvértesteket glikoforin A (Dako, Santa Clara, CA, USA) jelöléssel azonosítottuk, PS expressziójukról a sejtfelszíni annexin V kötésük adott információt. Az annexin V pozitív vörösvértestek MFI-jének arányát úgy határoztuk meg, hogy a teljes inkubációs idő után (24 óra) mért annexin V pozitív vörösvértestek MFI-jét elosztottuk a sertés plazma és mosott vörösvértestek keverékének elkészítése után (10 perc) mért annexin V pozitív vörösvértestek MFI-jével.

#### **4.8. TNF- $\alpha$ és LPS egészséges vörösvértestekre gyakorolt hatása**

Annak tanulmányozására, hogy a szeptikus sertés plazmák mely komponense lehet hatással az egészséges mosott vörösvértestekre, további in vitro kísérleteket terveztünk. Első

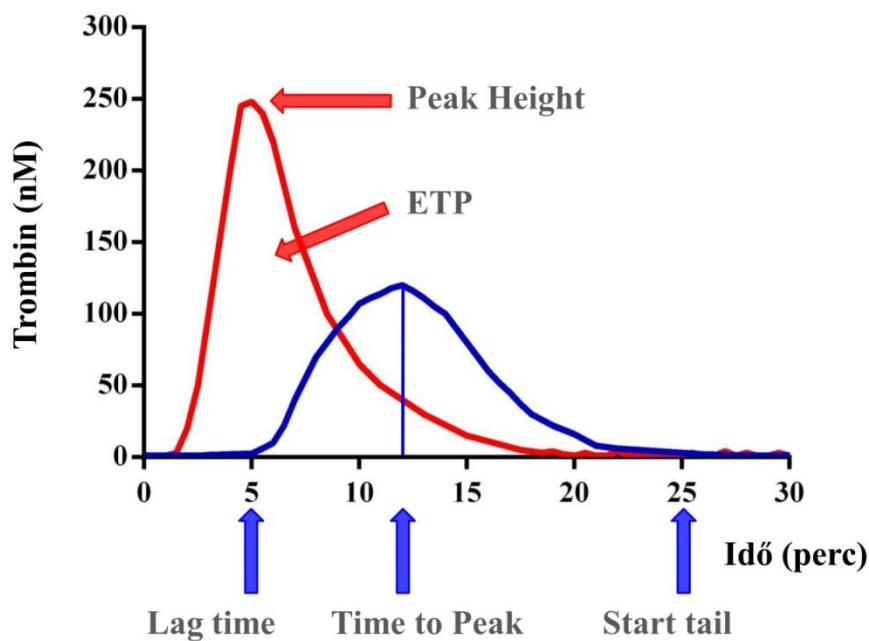
lépésként az előzőekben leírt módon készített mosott humán vörösvértest-szuszpenzióhoz a donorok autológ plazmáján kívül TNF- $\alpha$ -t és/vagy LPS-t adtunk. A rekombináns TNF- $\alpha$ -t (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) mindig 100 ng/mL, az LPS-t (*E. coli* O55:B5, Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország) 100 ng/mL, valamint 1 és 10  $\mu$ g/mL végkoncentrációban alkalmaztuk. A nem aktivált mintában csak mosott vörösvértestek voltak puffer és autológ plazma közegben, a további minták ezeken kívül 100 ng/mL TNF- $\alpha$ -t; 100 ng/mL, 1  $\mu$ g/mL vagy 10  $\mu$ g/mL LPS-t; illetve 100 ng/mL TNF- $\alpha$  mellett 100 ng/mL, 1  $\mu$ g/mL vagy 10  $\mu$ g/mL LPS-t is tartalmaztak. A mintákat 24 órán át 37°C-on 5% CO<sub>2</sub> közegben inkubáltuk, majd egyrészt meghatároztuk a vörösvértestek PS expresszióját FC500 áramlási citométeren, másrészt a minták 1500g-n 15 percig szobahőmérsékleten történő centrifugálása után a felülúszóból LDH aktivitást és hemolízis indexet mértünk COBAS 6000 készüléken. Második lépésben a TNF- $\alpha$ -t és/vagy LPS-t közvetlenül a K<sub>2</sub>-EDTA-val alvadásgátolt teljes vérhez adtuk, és ezután került sor a 24 órás inkubációra (ez esetben a vörösvértesteken kívül a fehérvérsejtek és a thrombocyták is jelen voltak). Az inkubációs idő letelte után a vörösvértesteket mostuk és meghatároztuk a PS expressziójukat, a minták centrifugálása után nyert PPP-ből pedig LDH aktivitást és hemolízis indexet mértünk.

#### **4.9. Trombin generációs vizsgálatok**

Trombin generációs vizsgálatokat PRP-ben és PPP-ben végeztünk Fluoroscán Ascent FL fluoriméteren Thrombinoscope reagensekkel és szoftverrel (Thrombinoscope BV, Maastricht, Hollandia). A méréseket a gyártó ajánlásainak megfelelően kiviteleztük.

A PRP-Reagens 1 pmol/L rekombináns szöveti faktort tartalmazott, ez esetben a minták thrombocytá tartalma szolgált foszfolipid felszínként.

PPP esetén három különböző vizsgálati elrendezést alkalmaztunk. A gyári PPP-Reagens 5 pM (továbbiakban: PPP-Reagens) használatakor a reagensben lévő 5 pmol/L rekombináns szöveti faktorról és 4  $\mu\text{mol/L}$  foszfolipiddel biztosítottuk a trombinképződés feltételeit. Minden PPP minta trombin generációját meghatároztuk reagens hiányában is (ez esetben a PPP-Reagens helyett fiziológiás sóoldatot adtunk a mintákhoz). Az előzőeken kívül néhány minta esetében szöveti faktor hozzáadása nélkül, pusztán foszfolipid hozzáadásával (Mikropartikula (MP)-Reagens; 4  $\mu\text{mol/L}$  foszfolipid) is elvégeztük a méréseket. A fluoriméter lemezének lyukaiba 80  $\mu\text{L}$  PRP/PPP-t és 20  $\mu\text{L}$  PRP-Reagenst/ PPP-Reagenst/ fiziológiás sóoldatot/ MP-Reagenst/ Trombin Kalibrátort pipettáztunk, majd 10 percig tartó 37°C-os inkubáció után 20  $\mu\text{L}$  FluCa (fluorogén szubsztrát és kalcium pufferben) hozzáadásával indítottuk el a trombinképződést. A készülék a trombin generáció dinamikájának megfelelően változó fluoreszcens jelet detektált és ez alapján rajzolta meg a trombin generációs görbét (a trombogramot). A trombinképződés sebességéről a lag time, time to peak és start tail paraméterek, míg a képződött trombin mennyiségéről a peak és endogén trombin potenciál (ETP) paraméterek adtak információt (4. ábra).



#### 4. ábra. Jellegzetes trombogramok PRP (kék) és PPP (piros) esetén

A trombinképződés sebességéről a lag time, time to peak és start tail paraméterek, míg a képződött trombin mennyiségéről a peak és ETP paraméterek adnak információt. A lag time a trombinképződés kezdetéig, a time to peak a legnagyobb trombinmennyiség képződéséig, míg a start tail a trombinképződés végéig eltelt idő percen kifejezve. A peak height (csúcsmagasság) a legnagyobb képződött trombinmennyiség (nM), az ETP a trombogram alatti terület (nM x perc).

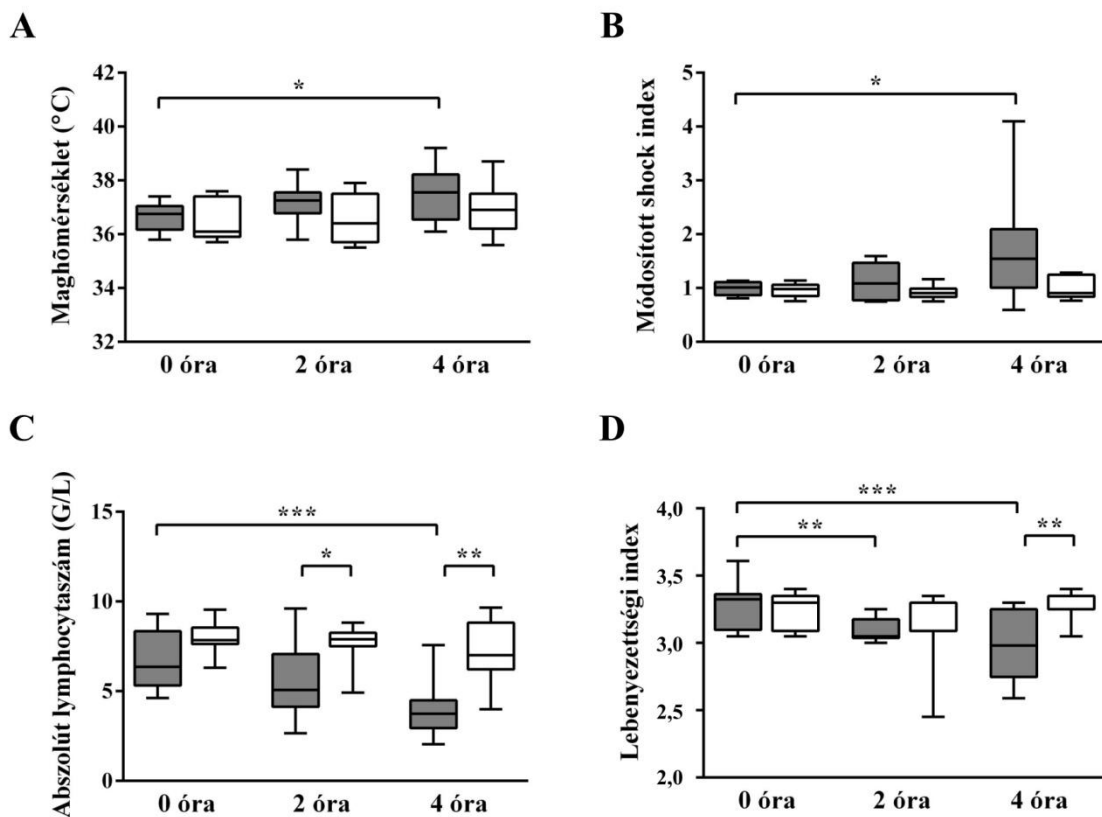
#### 4.10. Statisztikai elemzések

Mérési eredményeink statisztikai analízisét GraphPad Prism 6.0 program (La Jolla, CA, USA) segítségével végeztük. Az adatok eloszlásának elemzéséhez Shapiro-Wilk próbát használtunk. A szeptikus és a kontroll csoport közötti eltérések statisztikailag szignifikáns voltának megítélése Gaussi eloszlás esetén párosítatlan Student-féle t-próbával, míg nem Gaussi eloszlás esetén Mann-Whitney teszttel történt. A szeptikus állatok összetartozó adatainak, továbbá a kontroll állatok megfelelő adatsorainak analíziséhez párosított egyszempontos ANOVA elemzést alkalmaztunk Bonferroni korrekcióval vagy Friedman tesztet Dunn-korrekcióval, az eloszlásnak megfelelően. Az eltéréseket  $p < 0,05$  esetén

tekintettük szignifikánsnak. A 0,05 alatti p értékeket az ábrákon egy csillaggal jelöltük,  $p \leq 0,01$  esetén kettő,  $p \leq 0,001$  esetén három, míg  $p \leq 0,0001$  esetén négy csillag jelzi a szignifikancia mértékét. A 10 szeptikus és 7 kontroll állat eredményeit a medián, az interquartilis tartomány, továbbá a minimum és maximum értékek feltüntetésével mutatjuk be.

## 5. Eredmények

A szeptikus csoportban 4 órával az *E. coli*-tartalmú infúziós kezelés kezdete után mind a maghőmérséklet, mind a módosított shock index paraméterek szignifikáns emelkedést mutattak a kiindulási értékekhez képest (5. ábra). Az abszolút lymphocytaszám szignifikánsan csökkent és már a szepszis indukció után 2 órával jelentős különbség volt észlelhető az *E. coli*-kezelt és a kezeletlen állatok értékei között. A fehérvérsejtek lebonyezettségi indexe mind 2, mind 4 óra elteltével szignifikáns csökkenést mutatott. A kezeletlen kontroll állatok esetén mind a négy paraméter változatlan volt a kísérlet teljes időtartama alatt.



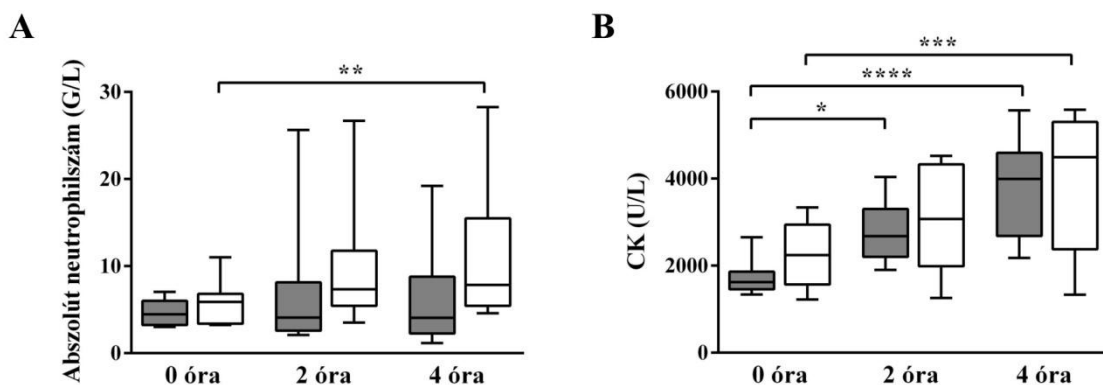
5. ábra. Maghőmérséklet (A), módosított shock index (B), abszolút lymphocytaszám (C) és lebonyezettségi index (D) szeptikus állatok (sötétszürke) és kontrollok (fehér) esetén *E. coli* vagy fiziológiás sóoldat infúzió adása előtt, valamint az infúzió kezdete után 2 és 4 órával

A septicus csoportban 4 órával az *E. coli* adását követően mind a maghőmérséklet, mind a módosított shock index paraméterek szignifikáns emelkedést mutattak a kiindulási értékekhez képest, míg az abszolút lymphocytaszám és a lebenyezettségi index szignifikánsan csökkent; ezen eredmények septicus shock kialakulására utalnak. A kezeletlen kontroll állatok esetén mind a négy paraméter változatlan volt a kísérlet teljes időtartama alatt.

Az ábrán – és a további ábrákon – 10 septicus és 7 kontroll állat eredményeit mutatjuk be a medián, az interkvartilis tartomány, továbbá a minimum és maximum értékek feltüntetésével.

\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$

Az invazív beavatkozás (tracheostomia, asszisztált lélegeztetés, artériás és vénás kanülálás) mind a septicus, mind a kontroll állatokban akut fázis reakcióhoz és izomsérüléshez vezetett, amint az az emelkedett abszolút neutrophilszám és CK aktivitás értékekből látható (6. ábra). Az *E. coli* adását követően az abszolút neutrophilszám a kiindulási értékekhez képest egy enyhe, nem szignifikáns emelkedést mutatott, a magas maximum és alacsony minimum értékek a septicus egyedek közötti jelentős különbségeket jelzik. Az abszolút neutrophilszám tekintetében a kontroll állatoknál egy szignifikáns emelkedés volt észlelhető; míg a CK aktivitás mind a kezelt, mind a kezeletlen csoportban jelentősen emelkedett a kísérletek végére.

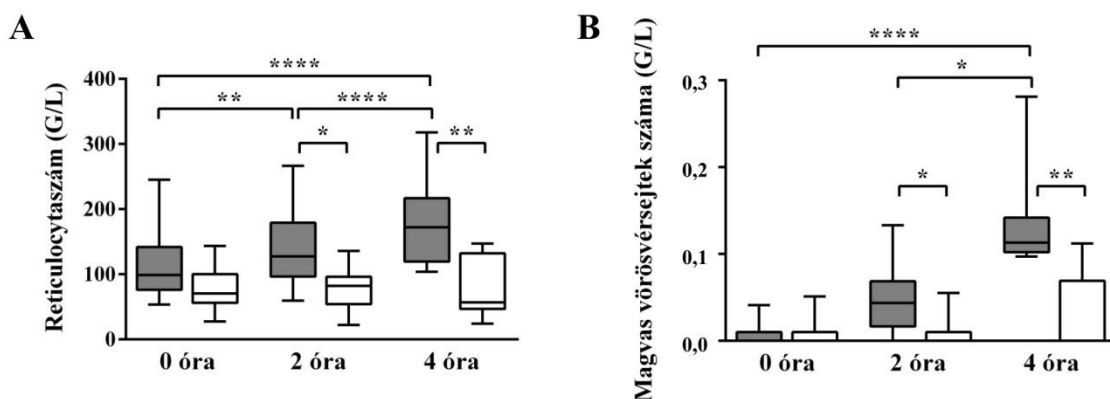


### 6. ábra. A trauma és a stressz által kiváltott változások

Az invazív beavatkozás mind a kezelt (sötétszürke), mind a kezeletlen (fehér) állatokban akut fázis reakciót és izomsérülést eredményezett, amelyet az emelkedett abszolút neutrophilszám (A) és CK aktivitás jelzett (B).

\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$

Annak érdekében, hogy a szepszis folyamán kialakuló csontvelői reakciót tanulmányozhassuk, reticulocytas- és thrombocytaszámot mértünk hematológiai automatával, továbbá a perifériás kenetekben meghatároztuk a magvas vörösvérsejtek számát és vizsgáltuk a thrombocyták morfológiáját. A szeptikus csoport esetén a reticulocytaszám és a magvas vörösvérsejtek száma szignifikánsan emelkedett a kontroll csoport értékeihez, valamint a szeptikus csoport kiindulási értékeihez képest (7. ábra). Ezen változások már 2 órával a szepszis indukció után szignifikánsak voltak.



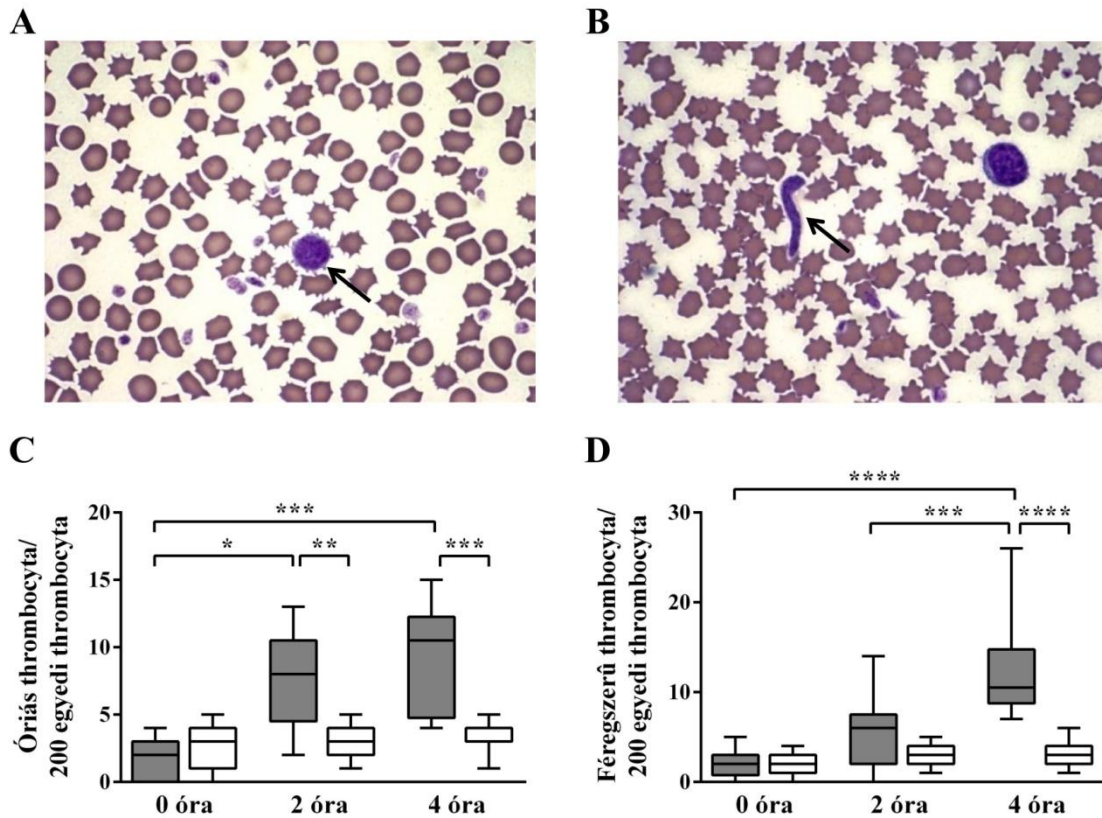
**7. ábra. Abszolút reticulocytaszám (A) és a magvas vörösvérsejtek száma (B)**

A szeptikus csoport (sötétzürke) esetén a reticulocytaszám és a magvas vörösvérsejtek száma szignifikánsan emelkedett a kontroll csoport (fehér) értékeihez, valamint a szeptikus csoport kiindulási értékeihez képest. Ezen változások már 2 órával a szepszis indukció után szignifikánsak voltak.

\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$

Szepszisben a thrombocyták kétféle morfológiai eltérést mutattak: egyrészt különböző méretű és alakú thrombocyták jelentek meg a periférián – valószínűleg a csontvelőben újonnan termelődve és onnan kiszabadulva (thrombocytosis, óriás thrombocyták, féregszerű thrombocyták); másrészt a thrombocyták aktiválódtak, amelynek következtében thrombocytá aggregátumok voltak láthatóak a kenetekben. Az *E. coli*-kezelt csoportban mind az óriás, mind a féregszerű thrombocyták száma már a szepszis korai szakaszában

szignifikáns emelkedést mutatott a kontroll csoport értékeihez, valamint a szeptikus csoport kiindulási értékeihez képest (8. ábra).



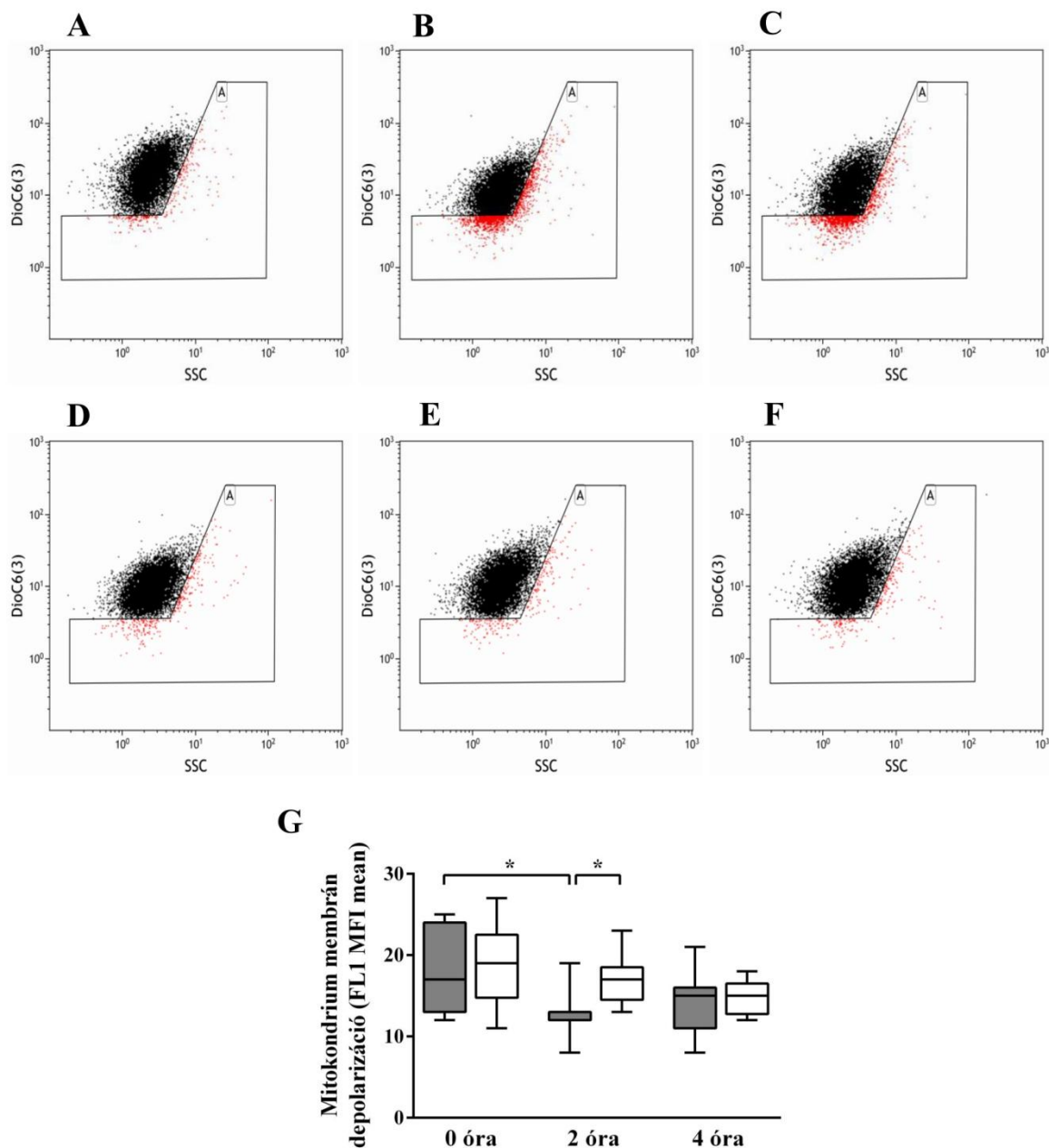
**8. ábra. Thrombocyták morfológiája szeptisben: óriás thrombocyták (A, C) és féregszerű thrombocyták (B, D)**

Szeptisben a thrombocyták kétféle morfológiai eltérést mutattak: egyrészt különböző méretű és alakú thrombocyták jelentek meg a periférián – valószínűleg a csontvelőben újonnan termelődve és onnan kiszabadulva (thrombocyták anisocytosis, óriás thrombocyták, féregszerű thrombocyták), másrészt a thrombocyták aktiválódtak, amelynek következtében thrombocyták aggregátumok voltak láthatóak a kenetekben. Az óriás thrombocytákat (A) és a féregszerű thrombocytákat (B) nyíllal jelöltük. Az óriás thrombocyták (C) és a féregszerű thrombocyták számát (D) 200 egyedi thrombocytára vonatkoztatva adtuk meg. Mindkét thrombocyták alak száma már a szeptis korai szakaszában szignifikáns emelkedést mutatott a kontroll csoport (fehér) értékeihez, valamint a szeptikus csoport (sötétszürke) kiindulási értékeihez képest.

\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$

A keringő thrombocyták sorsának követése céljából vizsgáltuk a szeptikus és kontroll állatok thrombocytáinak mitokondrium membrán depolarizációját oly módon, hogy áramlási citométerrel a thrombocyták mitokondriumaiban felhalmozódó fluoreszcens festék emisszióját detektáltuk (9. ábra). Mitokondrium membrán depolarizáció esetén a festék akkumulációja, ezáltal a teljes thrombocyta populáció átlagos fluoreszcencia intenzitása csökkent. A depolarizáció mértékét az FL1 hisztogramokon látható MFI csökkenéssel jellemeztük. A thrombocyták mitokondriumainak membrán potenciálja szignifikáns változást csak az *E. coli*-kezelt állatok esetében mutatott a szepszis indukció után 2 órával.

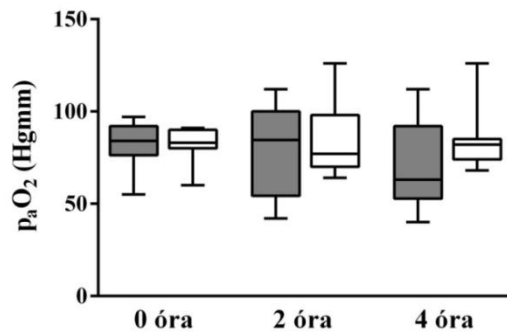
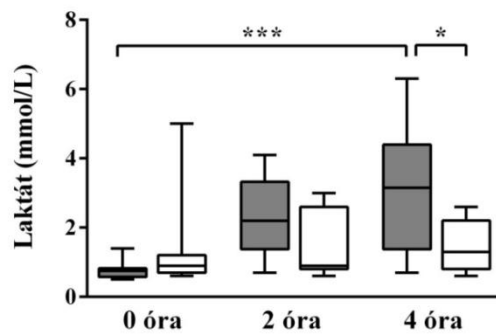
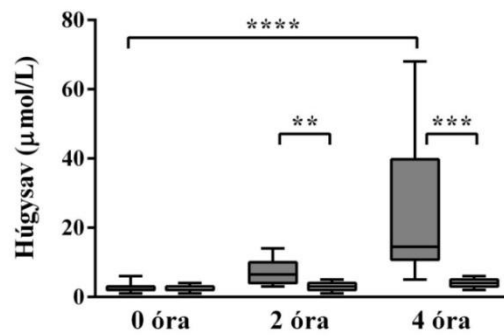
Az *E. coli*-kezelt állatok esetén 4 órával a szepszis indukció után jelzett hypoxiát észleltünk (10. ábra). A szeptikus csoportban laktát acidosis alakult ki, 4 óra elteltével a laktát koncentráció szignifikánsan emelkedetté vált olyan értékeket elérve, amelyek súlyos humán szepszis esetén láthatók. Az oxidatív stresszre adott válasz monitorozása érdekében meghatároztuk az állatok plazmájának húgysav koncentrációját, amely a szeptikus csoport esetén folyamatos emelkedést mutatott. A kezeletlen kontroll állatoknál valamennyi paraméter változatlan maradt a vizsgálat teljes időtartama alatt.



### 9. ábra. Thrombocyták mitokondrium membrán depolarizáció

Az ábrán egy septicus (A-C) és egy kontroll (D-F) állat eredményei láthatók *E. coli* vagy fiziológiás sóoldat infúzió adása előtt (A, D), valamint az infúzió kezdete után 2 (B, E) és 4 órával (C, F). A sepszis indukció hatására a thrombocyták mitokondriumában csökkent a fluoreszcens DiOC<sub>6(3)</sub> akkumulációja, így több thrombocytát került az alacsony fluoreszcencia intenzitással rendelkező események „A” kapujába (pirossal jelölt populáció). A kontrollok esetében a thrombocyták DiOC<sub>6(3)</sub> akkumulációja nem változott. A mitokondrium membrán depolarizációt az FL1 hisztogramon MFI csökkenésként detektáltuk (G). Mindössze az *E. coli*-kezelt állatoknál (sötétszürke) 2 órával a sepszis indukció után láttunk szignifikáns mértékű thrombocyták mitokondrium membrán depolarizációt.

\* p<0,05, \*\* p≤0,01, \*\*\* p≤0,001, \*\*\*\* p≤0,0001

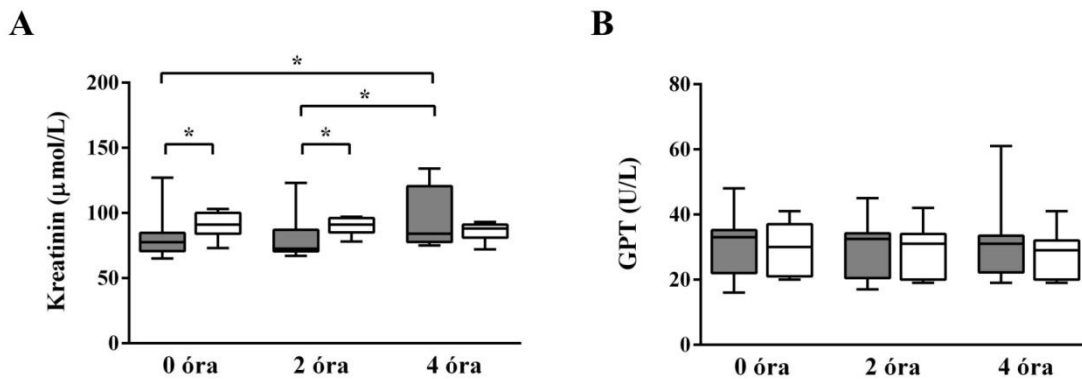
**A****B****C**

### 10. ábra. Az oxidatív stressz markerei

Az *E. coli*-kezelt állatok (sötétszürke) esetén 4 órával a sepszis indukció után jelzett hypoxiát detektáltunk (A). Ennek eredményeként laktát acidosis alakult ki és 4 óra elteltével a laktát koncentráció szignifikánsan emelkedett (B). Az oxidatív stresszre adott válasz monitorozása érdekében meghatároztuk az állatok plazmájának húgysav koncentrációját, amely a septicus csoport esetén folyamatos emelkedést mutatott, élesen különbözve a kontroll csoport (fehér) eredményeitől (C).

\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$

Az esetleges vese- és májkárosodás kimutatása érdekében kreatinin koncentráció és GPT aktivitás meghatározásokat végeztünk (11. ábra). Bár a szeptikus állatok kreatinin koncentrációja szignifikánsan megemelkedett a kísérletek végére, ez az emelkedés lényegesen kisebb mértékű volt, mint a húgysav koncentráció emelkedése.

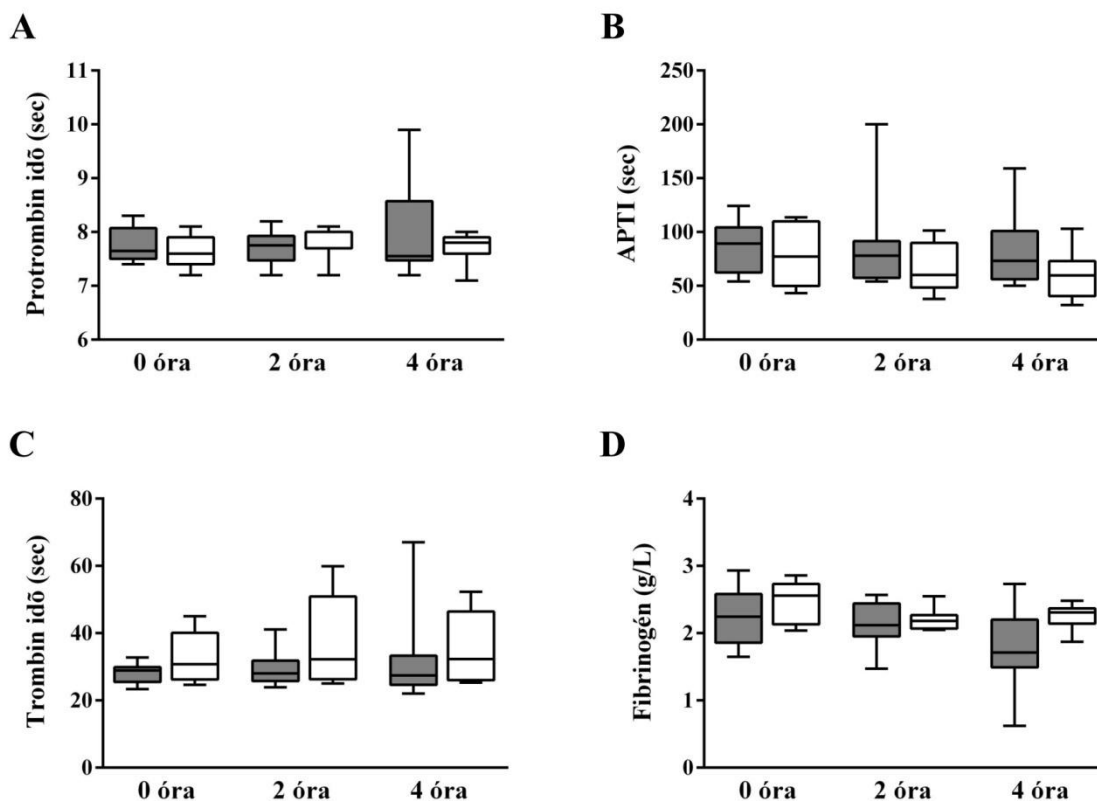


**11. ábra. A szervkárosodás markerei**

Az esetleges vese- és májkárosodás kimutatása érdekében kreatinin koncentráció (A) és GPT aktivitás (B) meghatározásokat végeztünk. Csak a szeptikus állatok (sötétszürke) kreatinin koncentrációja emelkedett szignifikánsan a kísérletek végére.

\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$

Az alvadási szűrőtesztek nagy része (a protrombin idő, az APTI és a trombin idő) nem mutatott szisztematikus változást a 4 órás vizsgálati periódus alatt, viszont az egyes egyedek értékei jelentős variabilitást mutattak (12. ábra). Az *E. coli*-kezelt állatok fibrinogénszintje folyamatosan csökkent, de a csökkenés mértéke nem volt szignifikáns. A kontroll állatok esetén egy kezdeti enyhe csökkenés után állandó fibrinogénszintet mértünk.



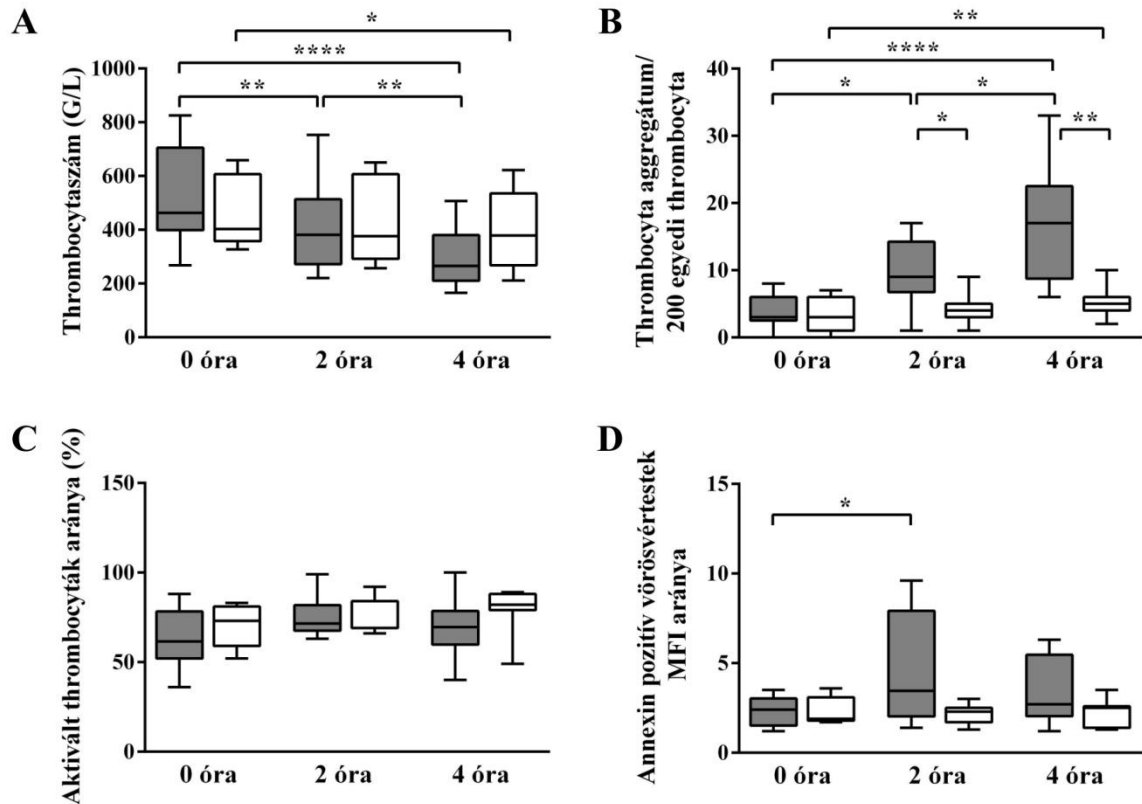
**12. ábra. Véralvadási szűrőtesztek *E. coli* fertőzésnek kitett (sötétszürke) és ki nem tett állatok (fehér) esetén**

A protrombin idő (A), az APTI (B) és a trombin idő (C) nem mutatott szisztematikus változást a 4 órás vizsgálati periódus alatt. Habár ezen időszak alatt a fibrinogén koncentráció (D) folyamatosan csökkent, a változás nem bizonyult szignifikánsnak.

\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$

A thrombocytaszám 4 óra elteltével mind a szeptikus, mind a kontroll csoport esetén szignifikáns csökkenést mutatott (13/A ábra). Ez a változás az *E. coli*-val kezelt csoportban már 2 órával a szepszis indukció után egyértelmű volt, majd 4 óra elteltével a thrombocytaszám tovább csökkent. A kezeletlen csoportban csak egy mérsékelt csökkenést láttunk. Szepszisben intenzív thrombocytá aggregátum képződést figyeltünk meg (13/B ábra). A kezelt állatok esetén 2 óra elteltével thrombocytá aggregátumok jelentek meg, ezek száma 4 óra elteltével tovább emelkedett, míg a kezeletlen egyedeknél az aggregátumok számában csak egy enyhe növekvő tendencia volt megfigyelhető. A szepszis során kialakuló thrombocytá-asszociált változások jellemzése céljából meghatároztuk az aktivált

thrombocyták arányát e thrombocyták annexin V pozitivitása alapján (13/C ábra). Az aktivált thrombocyták az FL1 hisztogramokon annexin V bright eseményekként láthatók és ezen thrombocyták aránya meghatározható, amennyiben az annexin V bright események számát a teljes egyedi thrombocyta populáció eseményszámához viszonyítjuk. A septicus csoportban egy mérsékelt, de nem szignifikáns emelkedést láttunk 2 órával a sepszis indukciót követően. Ezekon kívül tanulmányozni szeretnénk volna, hogy vajon az *E. coli*-kezelt és nem kezelt sertések plazma mintái rendelkeznek-e bármilyen aktiváló hatással mosott humán vörösvértestekre vonatkozóan, ezért a különböző időpontokból származó sertés plazma mintákat mosott humán vörösvértestekkel inkubáltuk 37°C-on 24 órán keresztül (13/D ábra). A vörösvértest-aktiváció markereként a vörösvértestek PS expresszióját vizsgáltuk. Az annexin V pozitív vörösvértestek MFI-jének arányát úgy határoztuk meg, hogy a teljes inkubációs idő után (24 óra) mért annexin V pozitív vörösvértestek MFI-jét elosztottuk a sertés plazma és mosott vörösvértestek keverékének elkészítése után (10 perc) mért annexin V pozitív vörösvértestek MFI-jével. Ez az arány csak abban az esetben volt emelkedett, amennyiben a mosott vörösvértesteket a sepszis indukció után 2 órával levett mintákkal inkubáltuk. A kontrollok esetén semmilyen változást nem észleltünk.

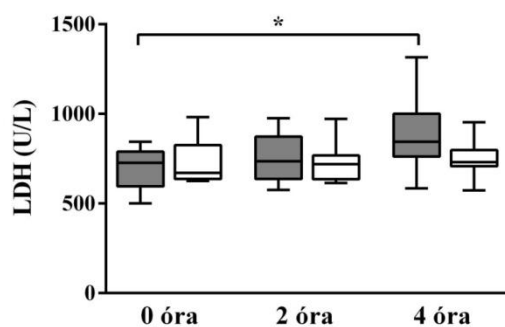
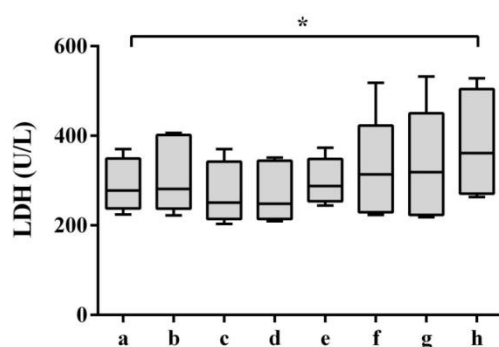
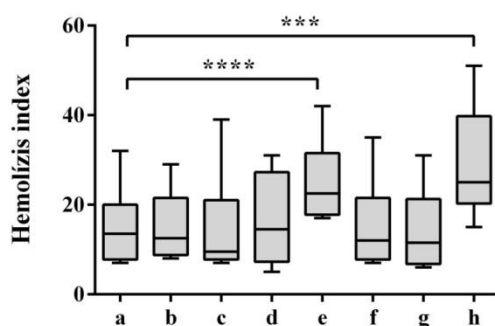


**13. ábra. Thrombocytaszám, thrombocyta aggregátum képződés és a thrombocyták PS expressziója (A-C), valamint a mosott humán vörösvértestek indukálható PS expressziója (D)**

Az *E. coli*-val kezelt csoport (sötétszürke) thrombocytaszáma már 2 óra elteltével szignifikáns csökkenést mutatott, majd 4 óra elteltével tovább csökkent, míg a kezeletlen állatok (fehér) thrombocytaszáma csak mérsékelten csökkent (A). A kezelt állatok esetén 2 óra elteltével thrombocyta aggregátumok jelentek meg, ezek száma 4 óra elteltével tovább emelkedett, míg a kezeletlen egyedeknél csak egy enyhe növekvő tendencia volt megfigyelhető (B). Az aktivált thrombocyták az FL1 hisztogramokon annexin V bright eseményekként láthatók és ezen thrombocyták aránya meghatározható, amennyiben az annexin V bright események számát a teljes egyedi thrombocyta populáció eseményszámához viszonyítjuk. A septicus állatok esetén egy mérsékelt, de nem szignifikáns emelkedést láttunk 2 óra elteltével. (C) A sertés plazma mintákat mosott humán vörösvértestekkel inkubáltuk. Az annexin V pozitív vörösvértestek MFI-jének arányát úgy határoztuk meg, hogy a teljes inkubációs idő után (24 óra) mért annexin V pozitív vörösvértestek MFI-jét elosztottuk a sertés plazma és mosott vörösvértestek keverékének elkészítése után (10 perc) mért annexin V pozitív vörösvértestek MFI-jével. Ez az arány csak abban az esetben volt emelkedett, ha a mosott vörösvértesteket a sepszis indukció után 2 órával levett mintákkal inkubáltuk. (D)

\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$

In vitro kísérletünk eredménye tehát arra utalt, hogy a szeptikus plazma valamely szolubilis komponense vörösvértest-aktiváló hatással rendelkezik és ez a komponens megfelelő koncentrációban a szepszis indukció után 2 órával van jelen. Ezenkívül a kezelt állatoknál a szepszis indukció után 4 órával szignifikáns LDH aktivitás-emelkedést detektáltunk (14/A ábra). Eredményeink alapján felmerült, hogy a szeptikus sertés plazmáknak vajon mely komponense lehet hatással az egészséges mosott vörösvértestekre, így ennek vizsgálatára további in vitro kísérleteket terveztünk. Első lépésként mosott humán vörösvértest-szuszpenzióhoz a donorok autológ plazmáján kívül 100 ng/mL TNF- $\alpha$ -t és/vagy 100 ng/mL, 1  $\mu$ g/mL vagy 10  $\mu$ g/mL LPS-t adtunk. A mintákat 37°C-on 24 órán keresztül inkubáltuk, majd meghatároztuk a mosott vörösvértestek PS expresszióját, továbbá a felülúszó LDH aktivitását és hemolízis indexét. Sem a TNF- $\alpha$ , sem az LPS, sem ezek együttese nem aktiválta a vörösvértesteket és nem eredményezett hemolízist. Második lépésben a TNF- $\alpha$ -t és/vagy LPS-t közvetlenül az alvadásgátolt teljes vérhez adtuk, és ezután került sor a 24 órás inkubációra. A vörösvértestek PS expressziója ez esetben sem fokozódott, ellenben a 100 ng/mL TNF- $\alpha$  és 10  $\mu$ g/mL LPS kombinációját tartalmazó minták plazmájából mért LDH aktivitás szignifikánsan emelkedett volt mind a nem aktivált mintákéhoz, mind a többi aktivált mintáéhoz képest (B); a hemolízis index esetén pedig nem csak a 100 ng/mL TNF- $\alpha$  és 10  $\mu$ g/mL LPS együttes adása, hanem 10  $\mu$ g/mL LPS önmagában is szignifikáns emelkedést eredményezett (C).

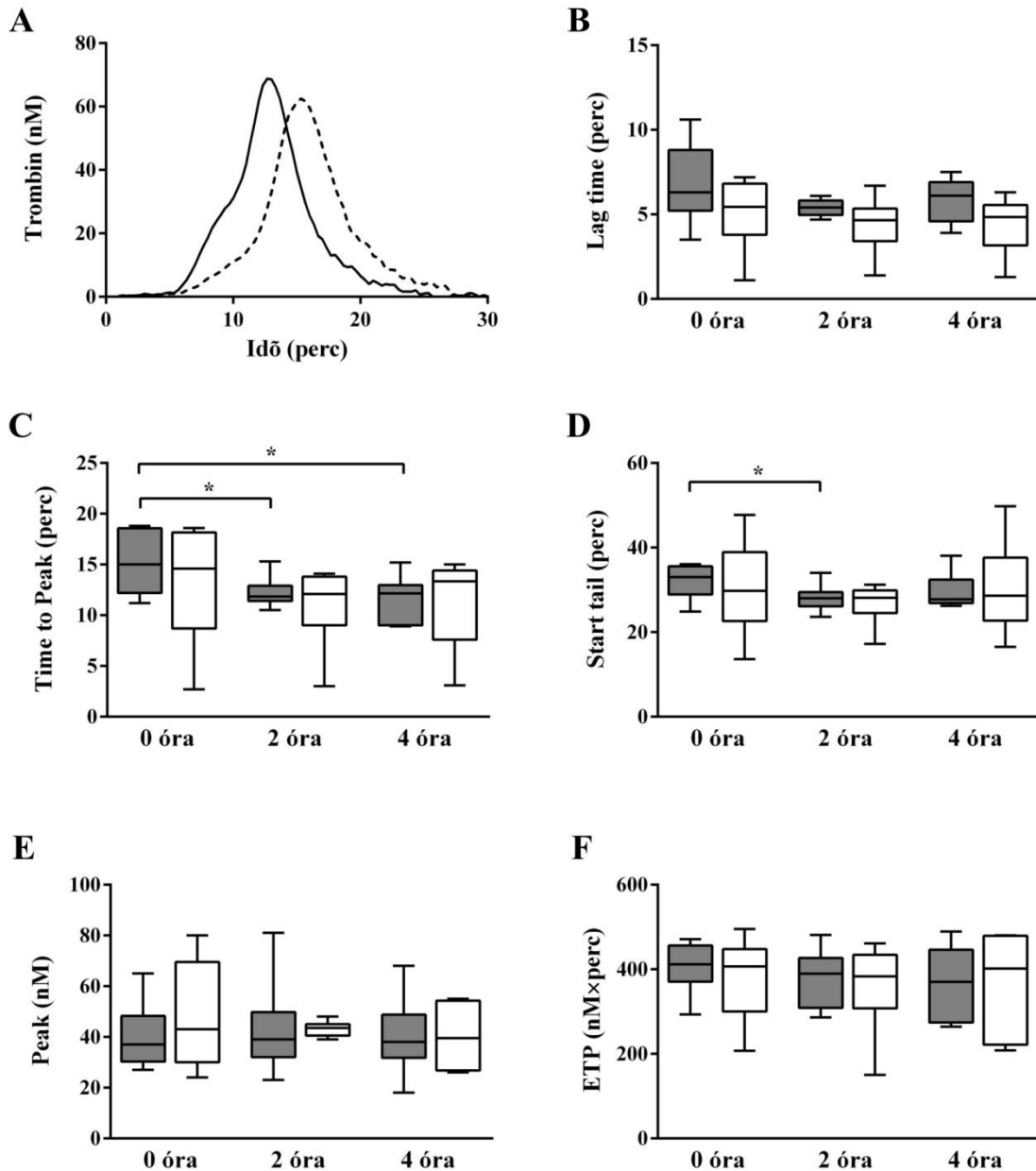
**A****B****C**

#### 14. ábra. Nagy dózisu LPS hatása a vörösvértestekre

Az *E. coli*-kezelt állatok (sötétszürke) esetén 4 órával a sepszis indukció után szignifikáns LDH aktivitás-emelkedést detektáltunk, a kontrolloknál (fehér) nem volt változás (A). Hat egészséges humán donortól származó teljesvér-mintához TNF- $\alpha$ -t, különböző koncentrációjú LPS-t, illetve ezek kombinációját adva azt láttuk, hogy 24 órás inkubációt követően a 100 ng/mL TNF- $\alpha$  és 10  $\mu$ g/mL LPS együttesét tartalmazó minták plazmájából mért LDH aktivitás szignifikánsan emelkedett volt mind a nem aktivált mintákéhoz, mind a többi aktivált mintáéhoz képest (B). A hemolízis index esetén nem csak a 100 ng/mL TNF- $\alpha$  és 10  $\mu$ g/mL LPS együttes adása, hanem 10  $\mu$ g/mL LPS önmagában is szignifikáns emelkedést eredményezett (C). \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$

**a:** nem aktivált minták; **b:** 100 ng/mL TNF- $\alpha$ ; **c:** 100 ng/mL LPS; **d:** 1  $\mu$ g/mL LPS; **e:** 10  $\mu$ g/mL LPS; **f:** 100 ng/mL TNF- $\alpha$  + 100 ng/mL LPS; **g:** 100 ng/mL TNF- $\alpha$  + 1  $\mu$ g/mL LPS; **h:** 100 ng/mL TNF- $\alpha$  + 10  $\mu$ g/mL LPS

Annak érdekében, hogy igazoljuk azt, hogy az *E. coli* adás hatására thrombocyta és alvadási aktiváció, valamint következményes consumptio jön létre, trombin generációs vizsgálatokat végeztünk. Mind PRP-ben, mind PPP-ben vizsgáltuk a trombin generáció kinetikáját (lag time, time to peak és start tail) csakúgy, mint a képződött trombin mennyiségét (thrombin peak and ETP). A PRP minták thrombocytaszámát minden esetben 250 G/L-re állítottuk be. A 15/A ábrán a szeptikus állatok jellegzetes trombin generációs görbéi láthatók PRP-ben. Az *E. coli* adása után 4 órával a trombin generáció korábban és nagyobb sebességgel kezdődött, hamarabb befejeződött, míg a képződött maximális trombin koncentráció és az ETP nem változott a kiindulási értékekhez képest. A szeptikus csoportban a lag time egy jelzett, de nem szignifikáns rövidülést mutatott, míg a time to peak és start tail paraméterek 2 óra elteltével szignifikánsan csökkentek, és a time to peak 4 óra elteltével is szignifikánsan rövidebb maradt (15/B-D ábra). PRP-ben a trombincsúcs és az ETP nem változott a kísérlet 4 órás időtartama alatt (15/E-F ábra).

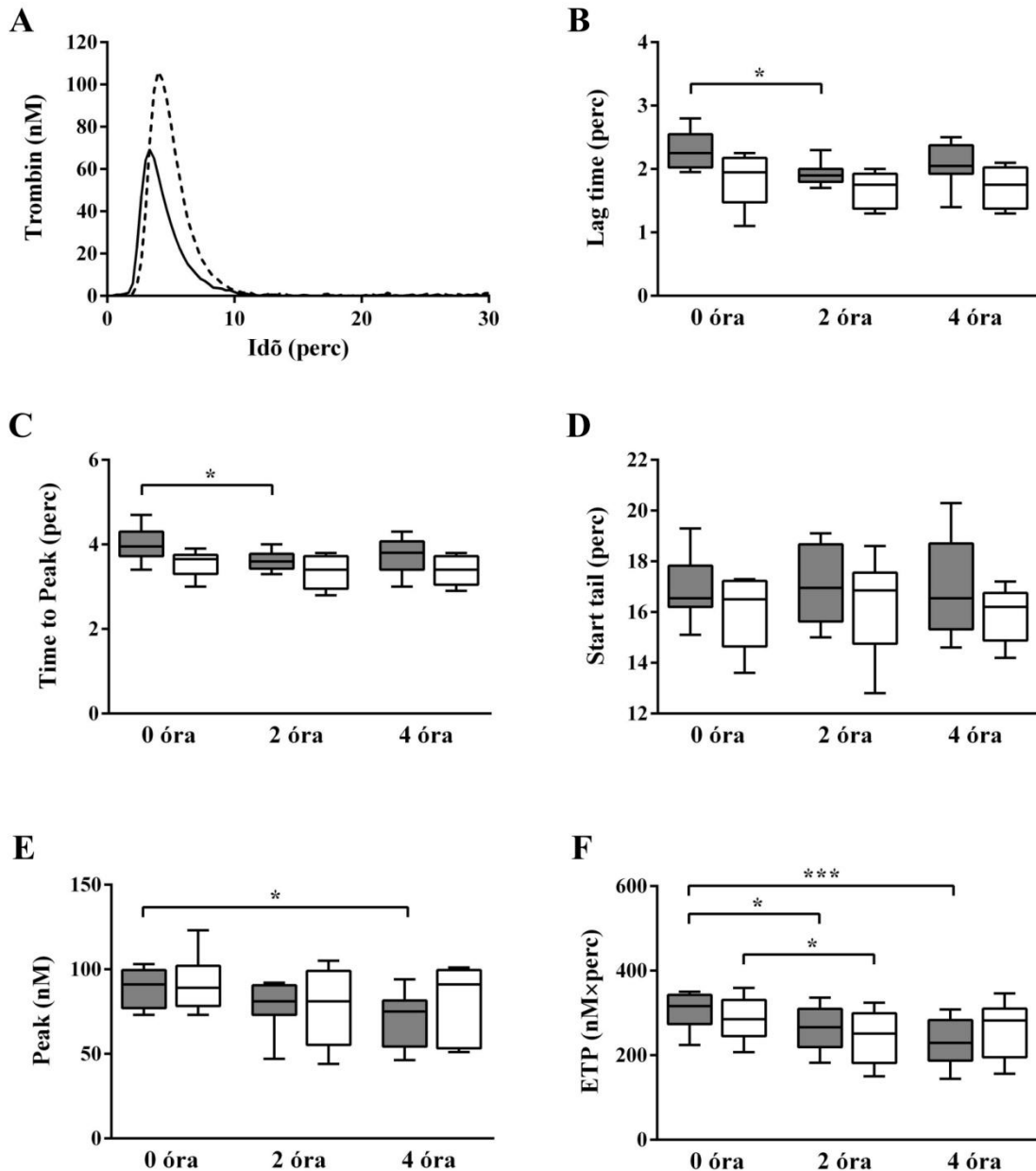


**15. ábra. Trombinképződés PRP-ben**

A trombinképződést PRP-ben vizsgáltuk; és a lag time, time to peak, start tail, peak és ETP paramétereket értékeltük. A septicus állatok PRP mintáiban a trombin generációs görbék 4 óra elteltével (folytonos vonal) balra tolódtak a kiindulási állapothoz képest (szaggatott vonal), míg a peak thrombin és ETP értékek nem csökkentek (A). A lag time nem szignifikáns rövidülést mutatott (B), míg a time to peak és start tail paraméterek 2 óra elteltével szignifikánsan csökkentek, és a time to peak 4 óra elteltével is szignifikánsan rövidebb maradt (C-D). A peak és az ETP nem változott a 4 órás időtartam során (E-F).

\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ ; sötétszürke: septicus állatok, fehér: kontrollok

PPP esetén három különböző vizsgálati elrendezést alkalmaztunk. Először rekombináns szöveti faktor és foszfolipid hozzáadása mellett vizsgáltuk a trombin generációt (a plazmákhoz PPP-Reagenst adtunk). Ebben az esetben az *E. coli* adása után a trombin generáció kissé korábban, de változatlan sebességgel indult és ugyanakkor ért véget, mint a szepszis indukció előtt; a trombinsúcs és az ETP viszont szignifikánsan alacsonyabb volt ezen csoport kiindulási értékeihez képest (16/A ábra). A szeptikus állatokban a lag time és time to peak paraméterek már 2 óra elteltével szignifikáns rövidülést mutattak az alvadási aktivációnak megfelelően, majd 4 óra elteltével kissé megnyúltak, jelezve az alvadási faktor consumptio kialakulását súlyos szepszisben (16/B-C ábra). A start tail a 4 órás periódus alatt végig állandó maradt, ezzel jelezve, hogy a trombinképződés végpontja nem változott (16/D ábra). A kezelt állatokban a trombinsúcs a kísérletek alatt végig folyamatosan csökkent a képződött trombin csökkent mennyiségének megfelelően, és ez a változás 4 óra elteltével lett szignifikáns (16/E ábra). Az ETP mind a szeptikus, mind a kontroll csoportban szignifikáns csökkenést mutatott, de a szeptikus állatok esetén egy sokkal kifejezettebb csökkenés alakult ki a szepszis indukció után 4 órával (16/F ábra).

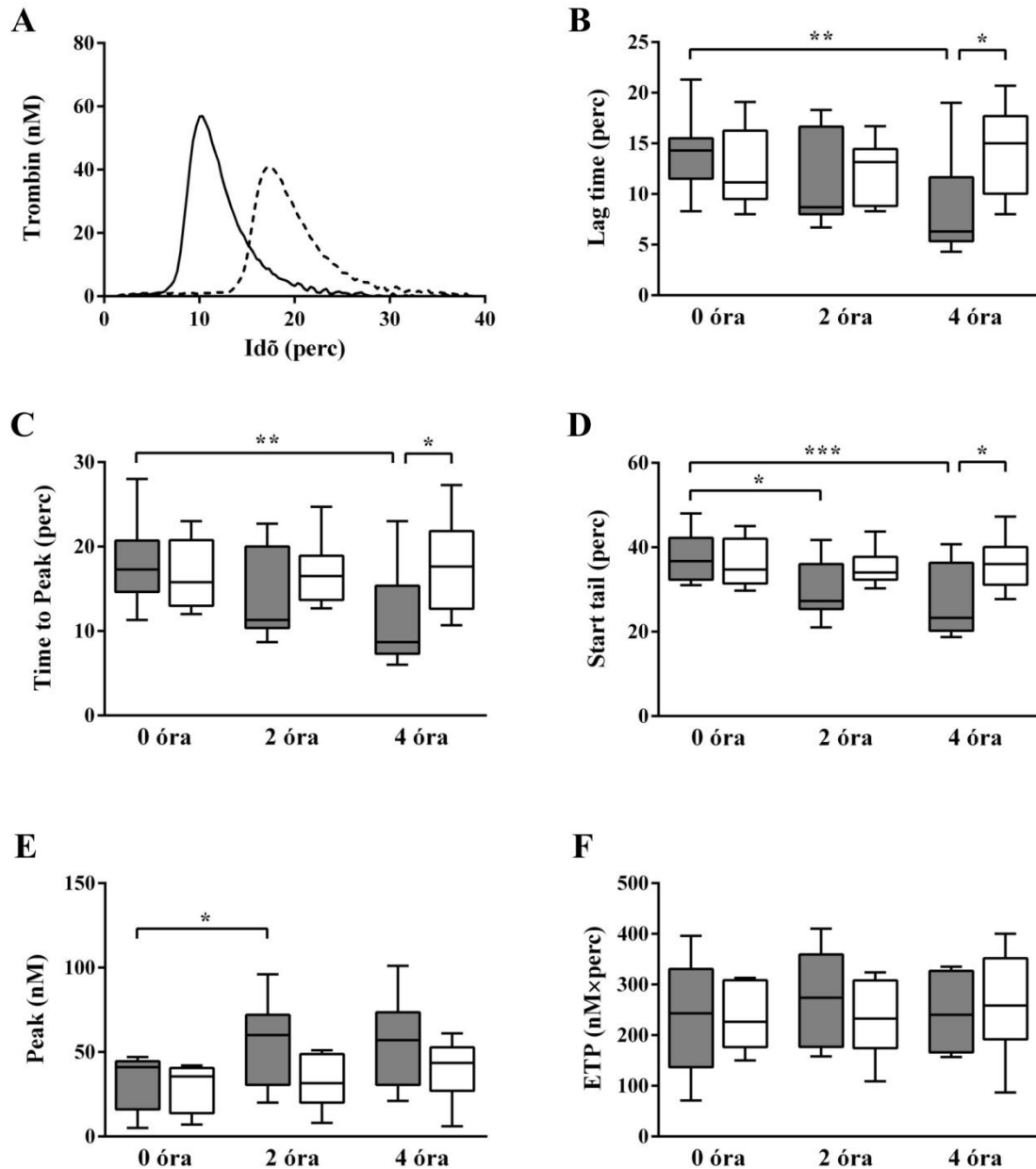


**16. ábra. Trombinképződés PPP-ben rekombináns szöveti faktor és exogén foszfolipid jelenlétében**

Az *E. coli*-kezelt állatok kiindulási trombin generációs görbéje (szaggatott vonal) balra tolódott és kisebb mennyiségű trombin képződött 4 órával a sepszis indukció után (folytonos vonal; A ábrarész). A lag time és time to peak paraméterek már 2 óra elteltével szignifikáns rövidülést mutattak (B-C) állandó start tail mellett (D), míg a peak csökkenése 4 óra elteltével lett szignifikáns (E) egy sokkal kifejezettebb ETP csökkenéssel együtt (F).

\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ ; sötétszürke: septicus állatok, fehér: kontrollok

A következő mérési sorozatban a trombin generációs vizsgálatokat hozzáadott szöveti faktor és foszfolipid nélkül végeztük el (PPP-Reagens helyett fiziológiás sóoldatot adtunk a mintákhoz), így a trombinképződés a PPP saját szöveti faktor aktivitásától, foszfolipid tartalmától és egyéb lehetséges trombin generációs szubsztrátok jelenlététől függött. Ez esetben a kiindulási minták trombin generációjának kinetikus paraméterei 4-5× hosszabbak voltak, mint amilyenek a PPP-Reagens hozzáadása esetén, míg a képződött trombin mennyisége 50-80%-a volt a PPP-Reagens esetén keletkezettnek. A szepszis indukció után 4 órával a trombin generáció szignifikánsan korábban kezdődött és fejeződött be, míg a trombinsúcs a kiindulási értékeknél lényegesen magasabb volt (17/A ábra). A szeptikus csoportban a lag time és time to peak paraméterek már 2 óra elteltével rövidültek az alvadási aktivációnak megfelelően, és ez a változás 4 óra elteltével vált szignifikánssá (17/B-C ábra), míg a start tail már 2 óra elteltével szignifikáns rövidülést mutatott (17/D ábra). A trombinsúcs 2 óra elteltével szignifikánsan emelkedett a nagyobb mennyiségben képződött trombinnak megfelelően és ugyanebben az időpontban az ETP is mutatott egy enyhe növekedést (17/E-F ábra).



**17. ábra. Trombinképződés PPP-ben rekombináns szöveti faktor és exogén foszfolipid hiányában**

A septicus állatokban a kiindulási trombin generációs görbe (szaggatott vonal) kifejezett balra tolódást mutatott és nagyobb mennyiségű trombin képződött 4 órával a sepszis indukció után (folytonos vonal; A ábrarész). A lag time és time to peak paraméterek folyamatosan rövidültek és a változás 4 óra elteltével vált szignifikánssá (B-C), míg a start tail már 2 óra elteltével szignifikáns rövidülést mutatott (D). A peak 2 óra elteltével szignifikánsan növekedett és az ETP is mutatott egy enyhe változást (E-F).

\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; sötétszürke: septicus állatok, fehér: kontrollok

Az utolsó mérési sorozatban néhány minta esetén csak foszfolipid hozzáadása mellett tanulmányoztuk a trombin generációt PPP-ben (ekkor MP-Reagenst adtunk a plazmákhoz), ezáltal a trombinképződést nem csak az alvadási faktor aktivitások, de a PPP szöveti faktor aktivitása is befolyásolta. A trombin generációs görbék jellegzetességei hasonlóak voltak a rekombináns szöveti faktor és exogén foszfolipid hiányában megfigyeltekhez, egyedüli eltérésként a kinetikus paraméterek enyhén rövidülése és a mennyiségi paraméterek enyhén emelkedett volta említhető (2. táblázat).

**2. táblázat. Trombinképződés PPP-ben foszfolipid hozzáadása mellett két reprezentatív állat esetében *E. coli* vagy fiziológiás sóoldat infúzió adása előtt, valamint az infúzió kezdete után 2 és 4 órával**

Állat	Vérvétel időpontja	Lag time (perc)	Time to Peak (perc)	Start tail (perc)	Peak (nM)	ETP (nM×perc)
<b>E.coli-kezelt</b>	0 óra	9,3	11,0	21,0	95	253
	2 óra	7,3	9,0	18,7	114	274
	4 óra	4,0	5,7	17,7	58	172
<b>Kontroll</b>	0 óra	8,7	10,3	19,7	83	245
	2 óra	10,0	12,0	22,3	85	242
	4 óra	9,7	11,3	21,0	93	227

Szepszis indukció után a trombinképződés változásai exogén foszfolipid jelenlétében hasonlóak voltak az exogén foszfolipid hiányában megfigyeltekhez, azonban enyhén rövidült lag time, time to peak és start tail paramétereket észleltünk enyhén emelkedett csúcs trombinkoncentrációval és ETP-vel a foszfolipid hiányában megfigyeltekhez képest.

## 6. Megbeszélés

A klinikai gyakorlatban a szepszis során észlelt változások objektív megfigyelése meglehetősen nehézkes, az állatmodellek biztosíthatják a kívánt standardizált körülményeket. Sertés modellünkben a szepszist élő *E. coli* intravénás beadásával váltottuk ki, majd a fertőzés és a hypoxia indukálta válaszreakciók, valamint a korai hemosztázis eltérések dinamikáját vizsgáltuk.

A csontvelő az intenzív bacteraemiára éretlen fehérvérsejtek felszabadításával reagál. A szeptikus modellünkben az *E. coli*-kezelt állatoknál a baktérium adásának kezdete után 2 órával csökkent lymphocytaszámot igazoltunk a kontroll állatokhoz képest a szepszisnek megfelelően, és ezzel egyidőben a lobularitási index is csökkent, ami éretlen neutrophil granulocyták megjelenését jelenti a periférián. Mindkét érték csökkenése fokozódott 4 óra elteltével és a kezeletlen állatokban nem észleltünk hasonló változást.

Egy korábbi közleményben [107] a mikrocirkulációs eltéréseket tanulmányozva munkacsoportunk azt találta, hogy a szeptikus állatokban 1 óra elteltével a véráramlás 40%-kal csökkent, amely 4 óráig progrediált; míg a kontrollok esetén 1 óra elteltével csak egy nem szignifikáns mértékű csökkenés volt megfigyelhető, amely az idő előrehaladtával normalizálódott. Ezek alapján azt feltételeztük, hogy a mikrocirkuláció károsodása és a következményes hypoxia csontvelői reakciókat indít el. Eredményeink igazolták a feltételezést, ugyanis 2 óra elteltével az abszolút reticulocytaszám megemelkedett és magas vörösvérsejtek jelentek meg a periférián, amelyek többségében polychromatophil normoblastok voltak néhány orthochromatophil sejttel. Humán tanulmányokban már korábban leírták, hogy a magas vörösvérsejtek száma a mortalitás előrejelzője [29, 31, 32]. Ezen szerzők a magas vörösvérsejtek számát egy olyan paraméternek találták, amely összegzi a hypoxia és a gyulladás okozta hatásokat szepszis esetén. Vizsgálataink során a

magvas vörösvérsejtek megjelenése megerősíti a korábban közölteket, és eredményeink alapján a magvas vörösvérsejtek a súlyos szepszis korai markereinek tekinthetők. Bár a reticulocytaszám a vártak megfelelően szintén emelkedett, ez esetben a beteg és kontroll értékek átfedést mutattak, míg a magvas vörösvérsejtek számának emelkedése a szepsziszre nézve sokkal specifikusabb volt.

Az éretlen vörösvérsejtekhez hasonlóan éretlen thrombocyták is felszabadulnak a csontvelőből. Az éretlen thrombocyták frakció előrejelzi a szepszist, de nem alkalmas a szepszis súlyosságának megítélésére [33, 94]. Mi a thrombocyták morfológiai eltéréseit tanulmányoztuk, amely esetünkben összefüggést mutatott a fokozott csontvelői válasszal. A kiindulási mintákból készült kenetekben csak ritkán láttunk óriás thrombocytákat és féregszerű thrombocytákat, és ezen dysplasticus thrombocyták száma kizárólag a szeptikus csoportban emelkedett meg többszörösére, a kontroll csoportban változatlan maradt. A thrombocyták egy nagyon gyors reagálású sejt a hemosztázisban betöltött szerepe során, az utóbbi időben pedig gyulladáshoz sejtként is azonosították [112]. Egy nagy prospektív multicentrikus tanulmányban a thrombocytopeniát a fokozott mortalitás független rizikófaktornak találták szepszisben [113]. A thrombocytopenia súlyossága egyenesen arányos a gyulladás súlyosságával és a következményes mortalitással [114]. A bacteraemiát kísérő thrombocytopenia szintén elősegíti a fiatal thrombocyták felszabadulását. Szepszis modellünkben a keringő thrombocyták mitokondriumainak működését vizsgáltuk, amely megváltozhat a fertőzés és a hypoxia következtében. A patológias állapotokban bekövetkező mitokondriális eltérések károsak vagy hasznosak lehetnek a szervezetre nézve [115]. A „mitokondriális dysfunctio” fogalma még nem egységes. A legtöbb tanulmány, amelyben ezt a jelenséget vizsgálták, szövet-homogenizátumot vagy izolált mitokondriumot használ, és a vizsgálat klasszikus módszere az oxigénfogyasztás mérése. Szepszisben mind fokozott, mind csökkent mitokondriális légzést leírtak; és a mitokondriumok működése fajoként, szepszis

modellenként és szövetenként is különbségeket mutatott. Leggyakrabban a máj, a szív és a vázizom sejteinek mitokondriális működését vizsgálták, legtöbbször patkány-modellben coecalis ligatio és punctio, valamint intraperitoneálisan adott LPS után. A thrombocytá egy könnyen hozzáférhető sejtípus, amely ráadásul jelentős mennyiségű működő mitokondriummal rendelkezik, így alkalmas a mitokondriális funkció sorozatos vizsgálatára [40]. Ezenkívül a keringésben lévő thrombocytákat kevésbé érinti a szepszisben kialakuló hypoperfusio és hypoxia, amely nehezíti annak megítélését, hogy a mitokondriális dysfunctio a szöveti hypoxia vagy az LPS direkt citotoxikus hatásának következménye-e [116]. A szeptikus sertés modellünkben a thombocyták mitokondrium membrán depolarizációját áramlási citometriai módszerrel vizsgáltuk oly módon, hogy a depolarizációt a mitokondriumokban felhalmozódó fluoreszcens festék akkumulációjának csökkenésével detektáltuk. A mitokondrium membrán potenciál jól tükrözi a mitokondrium működését és a mitokondriális energiaállapotot. Az energiatermelés mellett a mitokondriumok fontos szerepet játszanak a sejtek túlélésében és a programozott sejthalálban is, így a mitokondrium membrán depolarizáció nemcsak az aerob metabolizmus zavarára utalhat, hanem összefüggésben lehet az apoptózis mitokondriális útvonalával is [36, 37, 39]. Bár a kísérleteink során a kontroll állatoknál is észleltünk egy enyhe, nem szignifikáns változást, a mitokondriális funkció szignifikáns csökkenése csak a szeptikus csoportnál volt megfigyelhető. Eredményeink fokozott thrombocytá mitokondrium membrán depolarizációra és esetleges thrombocytá apoptózisra utalnak súlyos szepszisben, amelyek korán, már 2 órával a szepszis indukciót követően kialakulnak. Hasonló technikával humán beteganyagon azt találták, hogy a thombocyták mitokondrium membrán potenciálja összefüggést mutatott a SIRS súlyosságával [37]. Puskarich és munkatársai szeptikus shockos betegek esetén korai mitokondriális funkció-eltéréseket írtak le, amelyek korreláltak a szervkárosodással és a túléléssel [117]. Egyéb apoptotikus markereket is hasznosnak találtak humán vizsgálatokban. Egy klinikai

tanulmányban súlyos szepszis esetén a szérum kaszpáz 3 aktivitás jó korrelációt mutatott a korai halálózással [118]. Ismert, hogy a mitokondriális dysfunctio gyakran reverzibilis; ugyanakkor a folyamat már enyhe hypoxiára is nagyon érzékeny lehet, mert a szeptikus csoportunkban a  $p_aO_2$  fokozatos, de nem szignifikáns mértékű csökkenést mutatott a kísérletek alatt és a laktát koncentráció is csak 4 óra elteltével vált szignifikánsan emelkedetté. Eredményeink ugyanakkor alátámaszthatják azt a feltételezést is, hogy a mitokondriumok működését a szepsziszhez társuló hypoxián kívül az LPS közvetlenül is gátolja.

A faji és táplálkozásbeli különbségek miatt a húgysav alkalmasabb markernek tűnik a hypoxia-indukálta változások követésére a szeptikus sertés modellben, mint humán szepszisben. A húgysav koncentrációk egészséges emberekben meglehetősen magasak, megközelítik a metabolit oldhatósági pontját, míg a sertésekben rendkívül alacsonyak. Következésképpen azokban a humán tanulmányokban, amelyekben a húgysavszintet markerként használják, a betegek csak „normál” vagy „magas” húgysav koncentrációval rendelkező csoportokba sorolhatók a nemfüggő referencia tartományhoz viszonyítva [49]. Ezzel ellentétben a mi szeptikus sertés modellünkben jelentős különbség volt a szeptikus és kontroll állatok 4 órás húgysavszintje között, és ezek az értékek nem mutattak átfedést egymással. Ráadásul a szeptikus csoport húgysavszintje már 2 óra elteltével jelentősen különbözött a kontroll csoport eredményeitől – a laktáttal szemben –, amely arra utal, hogy a húgysav koncentráció az oxidatív stressz sokkal érzékenyebb markere, mint a laktát koncentráció. Bár a húgysav koncentrációt jelentősen befolyásolja a vesefunkció, az általunk észlelt emelkedés jórészt nem vesekárosodás eredetű, ugyanis az *E. coli*-kezelt állatok kreatininszintje csak 4 órával a baktériumok adásának kezdete után vált szignifikánsan emelkedetté és az emelkedés mértéke messze elmaradt a húgysavétól. Az is lehetséges, hogy a magas húgysavszint eredményez akut vesekárosodást akár direkt tubuláris toxicitással (a kristályok által), akár indirekt módon, vazoaktív mediátorok felszabadulása és az oxidatív

stressz következtében. A szepszis modellünkben mindössze egy enyhe kreatininszint-emelkedést észleltünk a GPT – mint májspecifikus enzim – aktivitásának változása nélkül. Fontos tehát kiemelni, hogy e fulmináns szepszis során a húgysavszint emelkedése, a mitokondrium membrán depolarizáció, valamint az éretlen vörösvérsejtek és thrombocyták felszabadulása a csontvelőből megelőzi a sokszervi elégtelenség kialakulását. Úgy gondoljuk, hogy további vizsgálatok szükségesek annak megítélésére, hogy ezek az adatok súlyos humán szepszisben is használhatók-e.

Szepszisben a gyulladás és a véralvadás szorosan összefonódik. Az élő *E. coli*-val kezelt sertéseink esetén várható volt, hogy a vizsgálat időtartama alatt DIC alakul ki, amint azt számos korábbi szepszis tanulmányban megfigyelték [119]. Az alvadási szűrőtesztek (a protrombin idő, az APTI és a trombin idő) ezzel szemben nem mutattak szisztematikus megnyúlást a szepszis csoportban, viszont az eredményekben jelentős variabilitás látszott, amely okaként a hemosztázis változások eltérő dinamikája feltételezhető a különböző egyedek esetében. Ezen hagyományos alvadási tesztek érzékenyek a vézésveszéllyel járó alvadásifaktor-deficienciákra, de érzéketlenek a protrombotikus állapotokra [120]. Perrin és munkatársai a trombin generációs tesztek alapján a szepszis shockban lévő betegek <15%-át találták kizárólag hypocoagulabilitással rendelkezőnek [121], és alvadási idő megnyúlás jórészt ezeknél a betegeknél várható. Vizsgálataink során egyedül a fibrinogénszint csökkent nem szignifikáns mértékben a 4 órás időtartam alatt. Ismerve azt, hogy a fibrinogén egy akut fázis fehérje, a mérsékelt csökkenés valószínűleg az alvadási aktiváció miatti fogyás és az akut fázis reakció miatti termelődés eredője.

Az alvadási paraméterekkel ellentétben a thrombocytaszám a szepszis csoportban már 2 óra elteltével szignifikánsan csökkent – az *E. coli* beadását követően aktiválódó thrombocyták kivonódtak a keringésből –, ezzel párhuzamosan thrombocytá aggregátumok jelentek meg, és ezen változások a megfigyelési periódus végéig progrediáltak. Fontos

megjegyezni, hogy – a szeptikus betegekkel ellentétben – ezek az állatok nem részesültek antikoaguláns kezelésben; ennek megfelelően a thrombocytaszám csökkenés és az aggregátum képződés a kontroll állatok esetében is megfigyelhető volt 4 óra elteltével, bár a változások mértéke lényegesen kisebb volt, mint a szeptikus állatoknál. Szisztémás antikoaguláció hiányában az artéria- és vénapreparálás, valamint az általános anesztéziával összefüggő invazív beavatkozások a hemosztázis aktivációjához vezethettek. A thrombocyta aktivációt a PS pozitív thrombocyták annexin V kötésével vizsgáltuk, és az *E. coli*-kezelt állatok esetén a PS pozitív thrombocyták arányában egy nem szignifikáns mértékű emelkedést láttunk. Mivel a baktérium adásának kezdetétől számított 2 óra elteltével a thrombocytaszám már szignifikánsan csökkent, eléggé valószínű, hogy a leginkább aktivált thrombocyták kivonódtak a keringésből és ezáltal detektálhatatlanná váltak számunkra. Irodalmi adatok alapján a thrombocytopenia a szeptikus betegek esetén a mortalitás független előrejelzője, azonban nehéz eldönteni, hogy a thrombocytopenia a thrombocyta aktiváció és consumptio (tehát a primer kórfolyamat) mértékének jelzője vagy csupán a betegség súlyosságára lehet belőle következtetni, ugyanis a gyógyszerek, a csontvelő szuppresszió, a táplálási nehezítettség és a fertőzés mind-mind befolyásolják a thrombocytaszámot [57]. A fulmináns szepszis modellünk eredményei alapján az előbbi változók nincsenek hatással a thrombocyták esetén megfigyelt változásokra. Egy egér modellben korábban leírtak alapján a trombin-dependens thrombocyta fogyás kulcsfontosságú endotoxaemiában [122].

In vitro kísérleteinkben normál humán mosott vörösvértesteket inkubáltunk a szeptikus és kontroll állatok 0, 2 és 4 órás mintáival, és e minták PS-indukáló képességét vizsgáltuk. A kontroll sertésektől származó plazmák nem eredményeztek PS expresszió fokozódást a humán vörösvértesteken, míg a 2 órás szeptikus minták PS-indukáló képessége jelentős volt. Eredményeink arra utalnak, hogy az *E. coli* adása alatt olyan szolubilis anyagok szabadulnak fel, amelyek a sejtek prokoaguláns fenotípusát eredményezik. Egy korábbi

közlemény alapján humán vizsgálatokban a fertőzésre adott válasz részeként felszabaduló H4 hiszton képes volt PS expressziót indukálni a vörösvértesteken [123], továbbá a szabad DNS-ről is leírták, hogy fontos szerepe van a prokoaguláns fenotípus létrehozásában szepszisben [124]. Ezeken kívül Lang munkacsoportjának patogének felülűszójával sikerült eryptosis kiváltani, amelyet részben a vörösvértestek PS expressziójának fokozódása jelzett, és ez korrelált a felülűszó szfingomielináz aktivitásával [125]. A szerzők valószínűsítik, hogy szepszisben a bakteriális szfingomielináz és a PAF a vörösvértestekben fokozza a ceramidképződést, amely azután érzékenyíti a vörösvértesteket az intacelluláris kalcium koncentráció emelkedésére, növelve ezáltal az eryptosis valószínűségét [45]. Mindezek mellett a felszabaduló proinflammatorikus citokinek (pl. IL-6, TNF- $\alpha$ ) is endothel, leukocytá és thrombocytá aktivációt váltanak ki [19], így hatással lehetnek a vörösvértestekre is. Oliver és munkatársai leírták, hogy a TNF- $\alpha$  a plazmában a legmagasabb koncentrációját az endotoxin beadása után 2 órával éri el, majd a rövid féléletidejének köszönhetően szintje gyorsan csökken [126]. Mivel a septicus malacaink 3 órán át kaptak *E. coli*-t és az LPS féléletideje is meglehetősen rövid [127], az LPS szerepe is felmerül a vörösvértestek stimulálásában. Ráadásul a szepszis indukció után 4 órával a septicus állatok plazmájának LDH aktivitása szignifikánsan emelkedett volt a kiindulási állapothoz képest, amely felvetette hemolízis kialakulását a szepszis során. In vitro kísérleteinkben csak vörösvértesteket és plazmát tartalmazó rendszerben sem a TNF- $\alpha$ , sem az LPS, sem ezek együttese nem fokozta vörösvértestek PS expresszióját és nem eredményezett hemolízist, tehát valószínűleg ezek egyike sincs közvetlen hatással a vörösvértestekre. Amennyiben TNF- $\alpha$ -t és/vagy LPS-t közvetlenül az alvadástól teljes vérhez adtuk – amelyben a fehérvérsejtek és a thrombocyták is jelen voltak –, a vörösvértestek PS expressziója ugyan nem fokozódott, de a nagy dózisú LPS hemolízist váltott ki. Tekintettel arra, hogy munkacsoportunk korábbi vizsgálataiban [106] az erőteljes szepszis indukció néhány órán belül valamennyi állatnál

halált okozott, in vitro kísérleteinkben a viszonylag magas – a szepszist nem túlélő betegek endotoxin koncentrációjának megfelelő [128] – LPS koncentrációk hatását vizsgáltuk. Eredményeink azt mutatták, hogy a TNF- $\alpha$  és az LPS sem közvetlenül, sem a fehérvérsejteken és a thrombocyteken keresztül nem indukálja a vörösvértestek PS expresszióját. A TNF- $\alpha$  egyáltalán nincs hatással a vörösvértestekre, míg az LPS is csak közvetetten fejti ki hemolizáló hatását. A 2 órás szeptikus sertés minták PS-indukáló képességének hátterében valamely más szolubilis anyag (pl. bakteriális szfingomielináz, egyéb proinflammatorikus citokinek, PAF, hisztonok, szabad DNS) állhat.

A trombin generációs vizsgálat egy olyan globális koagulációs teszt, amely az utóbbi évtizedekben jelent meg és azóta számos tanulmányban alkalmazták. Egy, a közelmúltban publikált összefoglaló közlemény alapján e vizsgálat több kórképben (krónikus májbetegség, diabetes, gyulladásoos bélbetegségek, myeloproliferatív kórképek, nem-alkoholos zsírmáj) is hasznosnak bizonyult az alvadási mechanizmusok tisztázásában [129]. Ennek ellenére szepszisben a trombin generációs vizsgálatok meglehetősen ritkák, és olyan állatmodellben, amelyben a szepszis indukció élő baktérium beadásával történt, trombin generációs eredményeket még egyáltalán nem közöltek. A klinikai vizsgálatok a szeptikus betegekben legtöbbször hypocoagulabilitást detektáltak csökkent csúcs trombin koncentrációkkal, valamint a trombinképződés kezdetének megnyúlásával és később kialakuló trombincsúccsal, azaz hosszabb lag time és time to peak paraméterekkel [130]. Nemrég Carlier és munkatársai nagyszámú szeptikus betegen végeztek trombin generációs vizsgálatokat és azt találták, hogy a DIC-es és nem DIC-es betegcsoportok eredményeinek átfedése miatt ez a teszt nem használható a klinikai gyakorlatban a szeptikus betegek vizsgálatára [120]. Egy másik tanulmány súlyos állapotú szeptikus betegek trombin generációját értékelte oly módon, hogy a túlélők és a nem túlélők eredményeit hasonlította össze [131]. A szerzők azt találták, hogy a nem túlélők alacsonyabb csúcs trombin koncentrációval, rövidebb lag time és time to peak

paraméterekkel rendelkeztek a túlélőkhöz képest a legtöbb vizsgált időpontban. Mi egy letális sertés modellt tanulmányoztunk, amely leginkább a szepszist nem túlélő betegek patológiás folyamatait mimikálja. Petros és munkatársaihoz hasonlóan a PPP mintákban 2 óra elteltével egy szignifikáns lag time és time to peak rövidülést, továbbá 4 óra elteltével a trombinsúcs és az ETP szignifikáns csökkenését figyelhettük meg, amennyiben a vizsgálatot exogén szöveti faktor és foszfolipid hozzáadásával végeztük. Ezen változások fokozott alvadási aktivációra, de ezzel majdnem egyidejűleg – a consumptiós coagulopathiának megfelelően – csökkent trombin generációs képességre utalnak korai szepszisben. A kontrollokban 2 óra elteltével észlelt enyhe ETP csökkenés az extrinszik és közös út alvadási faktorainak kezdeti enyhe consumptiójával magyarázható.

A továbbiakban a trombin generációs vizsgálatokat magában a PPP-ben, hozzáadott szöveti faktor és foszfolipid nélkül is elvégeztük, ekkor a lag time és time to peak folyamatos rövidülését láttuk, amely 4 óra elteltével vált szignifikánssá, valamint a csúcs trombin koncentráció 2 óra utáni szignifikáns emelkedését. Ezen eredmények szintén alátámasztják egy korai és rövid életű hypercoagulabilis fázis jelenlétét szepszisben. Wang és munkatársai az egér abdominális szepszis modelljükben coecalis ligatio és punctio után 3 órán belül fokozott trombin generációt, majd 6 és 24 óra elteltével a trombin generáció jelzett csökkenését írták le [132].

Feltételezzük, hogy a humán vizsgálatokban általában azért nem sikerül igazolni a kezdeti hypercoagulabilitást, mert egy bizonyos idő eltelik az alvadási rendszer kezdeti változásai és a szepszis tünetek klinikai megjelenése között, illetve ezekben a trombin generációs vizsgálatokban szöveti faktorról és foszfolipiddel történő koaktivációt használnak. Vizsgálataink során az *E. coli* adását követően 4 óra elteltével alakult ki egyértelmű szepszis, míg a PRP-ben és PPP-ben megfigyelhető trombin generációs változások, továbbá a thrombocytaszám csökkenése és a fokozott aggregátum képződés már 2 órával a szepszis

indukciót követően bekövetkezett, ami korai alvadási és thrombocytá aktivációra utal szepszisben. Összesen három különböző vizsgálati elrendezést alkalmaztunk PPP esetén és mindhárommal sikerült igazolnunk az alvadási aktivációt, mint az időfüggő – tehát a trombin képződés sebességét leíró – paraméterek rövidülését. A fokozott maximális trombin képződéssel járó hypercoagulabilitás detektálásához azonban a trombin generációs tesztet mindenféle agonista hozzáadása nélkül kellett elvégeznünk. Amennyiben szöveti faktort és foszfolipidet is adtunk a rendszerhez, úgy a trombinsúcs és ETP paraméterek alapján hypocoagulabilitást észleltünk az alvadási faktorok consumptiójának megfelelően. A humán vizsgálatok egy másik hátránya, hogy gyakran nincs lehetőség a PRP vizsgálatára a thrombocytaszám súlyos esése miatt. A sertés modellünkben a PRP vizsgálatát is elvégeztük oly módon, hogy a minták thrombocytaszámát azonos értékre állítottuk be, és így a PPP-hez alapvetően hasonló, de némiképp eltérő eredményeket kaptunk. A time to peak paraméterek a PPP-hez hasonlóan a szepszis indukció után már 2 órával rövidülést mutattak, amely a kísérlet végéig megmaradt, azonban a csúcs trombin koncentráció és az ETP nem csökkent. A PRP mintákban a trombin generáció vizsgálata csak egy nagyon kis mennyiségű szintetikus szöveti faktor hozzáadásával történik, míg az alvadási komplexek képződéséhez szükséges foszfolipid felszín a thrombocyták biztosítják. Ezáltal a mintában lévő aktivált thrombocyták kompenzatórikus hatása megakadályozza a trombin képződés csökkenését, amit a PPP mintákban láthattunk.

Vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy a trombin generációs vizsgálat egy hasznos eszköze a valódi hyper- és hypocoagulabilitás kimutatásának súlyos szepszis esetén, de az eredmények erőteljesen függenek a kísérleti elrendezéstől. Egyúttal megerősítettük a korábban leírtakat, melyek szerint a globális alvadási tesztek előnyösebbek a rutin alvadási tesztekhez képest [129, 133]. A hagyományos alvadási szűrőtesztek nem mutatják a prokoaguláns és antikoaguláns hatások egyensúlyát [129]. Ennek egyik oka az lehet, hogy az alvadási idő vége

az alvadékképződés időpillanata, ameddig azonban az összes fiziológiásan releváns trombinnak csak kb. 5%-a képződik, tehát a trombin generáció 95%-áról ezek a tesztek nem adnak információt. A másik lehetséges ok az, hogy a természetes antikoagulánsok nem rendelkeznek teljes aktivitásukkal ezekben a rendszerekben (pl. a protein C aktivitásához szükség lenne az endothelsejteken lévő trombomodulinra). Ezzel szemben a trombin generációs vizsgálat mind a véralvadást elősegítő, mind az azt limitáló rendszerről ad információt; a szűrőteszteknel lényegesen alacsonyabb szöveti faktor és foszfolipid koncentrációjú reagenseket használ, fokozva ezzel a teszt szenzitivitását; valamint alkalmas thrombocytákat tartalmazó rendszer vizsgálatára is.

A vizsgálatainknak azonban vannak korlátaik: a vizsgált állatok száma mindkét csoportban meglehetősen alacsony volt, de minden állat hasonló életkorú nőtény volt és az észlelt különbségek meggyőzőnek tűntek. Az állatoknál nem végeztük el a szövetek hisztopatológiai vizsgálatát, ugyanis a biomarkerek kinetikájára fókuszáltunk, amelyek segítenek a korai eltérések felismerésében a fulmináns szepszis folyamán. Mivel az állatok – mint az a korábbi kísérletek során látható volt – a szepszis indukció után 5-6 órával elpusztultak volna, semmilyen következtetést nem tudunk levonni a vizsgált paraméterek eltérései és betegség súlyossága közötti összefüggésre vonatkozóan. Számos thrombocyta aktivációs vizsgálatot nem tudtunk elvégezni a sertéseken, mert a mérésekhez használt anti-humán antitestek nem kötődtek a sertés thrombocytákhoz [134, 135].

## 7. Összefoglalás

A szepszis világszerte a vezető halálokok közé tartozik, korai felismerése és megfelelő kezelése azonban javítja a betegek túlélési esélyeit. Az állatmodellek segítségével a szepszis viszonylag standardizált körülmények között tanulmányozható. Vizsgálataink során egy letális sertés szepszis modellt alkalmaztunk, amelyben a szepszis indukció élő *E. coli* intravénás beadásával történt. Célunk egyrészt a fertőzés és a hypoxia indukálta változások kinetikájának tanulmányozása, másrészt a fulmináns szepszis során fellépő korai hemosztázis eltérések kimutatása volt. Szepszis modellünkben az éretlen vörösvérsejt- és thrombocyta-alakok megjelenése, a thrombocyta mitokondrium membrán depolarizáció, a húgysav koncentráció emelkedése, valamint a thrombocyta- és alvadási aktiváció megelőzte a manifeszt szepszis kialakulását. Áramlási citometriai vizsgálataink eredményei arra utalnak, hogy szepszisben a mitokondriális dysfunctio jelentős hypoxia nélkül is kialakul. A húgysavsztintet az oxidatív stressz érzékenyebb jelzőjének találtuk, mint a laktát koncentrációt. A thrombocytaszám korai és jelentős mértékű csökkenése és a thrombocyta aggregátumok egyidejű megjelenése korai thrombocyta aktivációra utal szepszisben. Kimutattuk, hogy az *E. coli*-indukált szepszis során olyan szolubilis anyagok szabadultak fel, amelyek az egészséges vörösvértesteken PS expressziót indukáltak, azonban a hatás hátterében a TNF- $\alpha$  és az endotoxin szerepe nem volt igazolható. Trombin generációs vizsgálattal a szepszis korai szakaszában ki tudtuk mutatni mind a hyper-, mind a hypocoagulabilitást, attól függően, hogy milyen volt a kísérleti elrendezés. A szepszis korai hemosztázis eltéréseinek kimutatására a trombin generációs vizsgálatot a rutin alvadási szűrőteszteknel előnyösebbnek találtuk.

## 8. Summary

Sepsis is a leading cause of death worldwide, however early diagnosis and adequate therapy can improve prognosis. Use of animal models is a relatively well standardized way to study sepsis. We investigated a lethal porcine sepsis model in which sepsis was induced by the intravenous administration of live *E. coli*. We aimed to study the kinetics of infection and hypoxia induced changes, furthermore we extended to explore early haemostatic alterations during fulminant sepsis. In our sepsis model the appearance of immature red blood cells and platelets, the platelet mitochondrial membrane depolarisation, the elevation of uric acid concentration, as well as platelet and coagulation activation occurred prior to the development of manifest sepsis. Results of our flow cytometric measurements suggest that during sepsis the mitochondrial dysfunction may occur even in the absence of significant hypoxia. Urate level was found to be a more sensitive indicator of the oxidative stress than lactate concentration. The early and significant decrease in platelet count together with the increase of platelet aggregates indicate early platelet activation in sepsis. We demonstrated that soluble substances that are capable of inducing PS expression on normal red blood cells were released during the *E. coli* induced sepsis, however the role of TNF- $\alpha$  and endotoxin could be excluded. We have provided evidence that the thrombin generation assay was useful in evaluating true hyper- and hypocoagulability in early stage of sepsis but the results depended on the assay setting. We found that thrombin generation assay was superior to routine coagulation screening for the detection of early haemostatic alterations in sepsis.

## 9. Az értekezés új eredményei, megállapításai, klinikai jelentősége

1. Letális sertés szepszis modellünkben az éretlen vörösvérsejt- és thrombocytá-alakok megjelenése, a thrombocytá mitokondrium membrán depolarizáció, a húgysavszint emelkedése, valamint a thrombocytá- és alvadási aktiváció megelőzte a manifeszt szepszis kialakulását.
2. A magvas vörösvérsejtek és a dysplasticus thrombocyták száma csak a szeptikus állatokban emelkedett, így e paraméterek vizsgálata alkalmas lehet a szepszis korai kimutatására. A magvas vörösvérsejtek számának emelkedése a szepszis specifikusabb markere, mint a reticulocytaszám-emelkedés.
3. A thrombocyták mitokondriumainak membránja már a szepszis korai szakaszában, jelentős szöveti hypoxia hiányában is depolarizálttá vált, ami arra utal, hogy szepszisben a mitokondriális dysfunctio hypoxia nélkül is kialakul.
4. Sertésekben az oxidatív stressz hatására a húgysav koncentráció korábban és lényegesen nagyobb mértékben emelkedett, mint a laktát koncentráció, tehát a húgysavszint az oxidatív stressz érzékenyebb jelzője.
5. A thrombocytaszám korán és jelentős mértékben csökkent a thrombocytá aggregátumok egyidejű megjelenése mellett, ami korai thrombocytá aktivációra utal szepszisben. Mivel a kísérletek során egészséges állatok szepszis indukciója történt, akik ezt követően nem részesültek gyógyszeres kezelésben, a thrombocytaszám változása arra utal, hogy a thrombocytopenia az infekcióra adott válaszreakció jelzője.
6. Az *E. coli*-indukált szepszis során olyan szolubilis anyagok szabadultak fel, amelyek az egészséges vörösvértesteken PS expressziót indukáltak, azonban a hatás hátterében

a TNF- $\alpha$  és az endotoxin szerepe nem volt igazolható. Nagy dózisú endotoxinnal az egészséges vörösvértestek lízisét tudtuk kiváltani, ehhez azonban szükség volt a fehérvérsejtek és a thrombocyták jelenlétére.

7. Trombin generációs vizsgálattal a sepszis korai szakaszában bizonyítani tudtuk a hyper- és hypocoagulabilitást és igazoltuk, hogy az eredmények erőteljesen függenek a kísérleti elrendezéstől. Thrombocyta-szegény plazmában a hozzáadott agonisták jelenlétében egyidejű hyper- és hypocoagulabilitást, míg agonisták nélkül tisztán hypercoagulabilitást detektáltunk. A sepszis korai hemosztázis eltéréseinek kimutatására a trombin generációs vizsgálatot a rutin alvadási szűrőteszteknel előnyösebbnek találtuk.

## 10. Irodalomjegyzék

- [1] Fleischmann C., Scherag A., Adhikari N.K., Hartog C.S., Tsaganos T., Schlattmann P., et al. Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *Am J Respir Crit Care Med.* 2016; **193**: 259-72.
- [2] Adhikari N.K., Fowler R.A., Bhagwanjee S., Rubenfeld G.D. Critical care and the global burden of critical illness in adults. *Lancet.* 2010; **376**: 1339-46.
- [3] Funk D.J., Parrillo J.E., Kumar A. Sepsis and septic shock: a history. *Crit Care Clin.* 2009; **25**: 83-101, viii.
- [4] Bone R.C., Balk R.A., Cerra F.B., Dellinger R.P., Fein A.M., Knaus W.A., et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest.* 1992; **101**: 1644-55.
- [5] Levy M.M., Fink M.P., Marshall J.C., Abraham E., Angus D., Cook D., et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med.* 2003; **31**: 1250-6.
- [6] Singer M., Deutschman C.S., Seymour C.W., Shankar-Hari M., Annane D., Bauer M., et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA.* 2016; **315**: 801-10.
- [7] Vincent J.L., Moreno R., Takala J., Willatts S., De Mendonca A., Bruining H., et al. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med.* 1996; **22**: 707-10.

- [8] Vincent J.L., de Mendonca A., Cantraine F., Moreno R., Takala J., Suter P.M., et al. Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study. Working group on "sepsis-related problems" of the European Society of Intensive Care Medicine. *Crit Care Med.* 1998; **26**: 1793-800.
- [9] Shankar-Hari M., Phillips G.S., Levy M.L., Seymour C.W., Liu V.X., Deutschman C.S., et al. Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA.* 2016; **315**: 775-87.
- [10] Biedenbach D.J., Moet G.J., Jones R.N. Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infection isolates from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2002). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2004; **50**: 59-69.
- [11] Diekema D.J., Beekmann S.E., Chapin K.C., Morel K.A., Munson E., Doern G.V. Epidemiology and outcome of nosocomial and community-onset bloodstream infection. *J Clin Microbiol.* 2003; **41**: 3655-60.
- [12] Martin G.S., Mannino D.M., Eaton S., Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med.* 2003; **348**: 1546-54.
- [13] Opal S.M., Garber G.E., LaRosa S.P., Maki D.G., Freebairn R.C., Kinasewitz G.T., et al. Systemic host responses in severe sepsis analyzed by causative microorganism and treatment effects of drotrecogin alfa (activated). *Clin Infect Dis.* 2003; **37**: 50-8.
- [14] Sligl W., Taylor G., Brindley P.G. Five years of nosocomial Gram-negative bacteremia in a general intensive care unit: epidemiology, antimicrobial susceptibility patterns, and outcomes. *Int J Infect Dis.* 2006; **10**: 320-5.

- [15] Mylotte J.M., Tayara A., Goodnough S. Epidemiology of bloodstream infection in nursing home residents: evaluation in a large cohort from multiple homes. *Clin Infect Dis.* 2002; **35**: 1484-90.
- [16] McCue J.D. Gram-negative bacillary bacteremia in the elderly: incidence, ecology, etiology, and mortality. *J Am Geriatr Soc.* 1987; **35**: 213-8.
- [17] Friedman N.D., Kaye K.S., Stout J.E., McGarry S.A., Trivette S.L., Briggs J.P., et al. Health care--associated bloodstream infections in adults: a reason to change the accepted definition of community-acquired infections. *Ann Intern Med.* 2002; **137**: 791-7.
- [18] Chousterman B.G., Swirski F.K., Weber G.F. Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. *Semin Immunopathol.* 2017; **39**: 517-28.
- [19] Knoebl P. Blood coagulation disorders in septic patients. *Wien Med Wochenschr.* 2010; **160**: 129-38.
- [20] Movat H.Z., Cybulsky M.I., Colditz I.G., Chan M.K., Dinarello C.A. Acute inflammation in gram-negative infection: endotoxin, interleukin 1, tumor necrosis factor, and neutrophils. *Fed Proc.* 1987; **46**: 97-104.
- [21] Biron B.M., Ayala A., Lomas-Neira J.L. Biomarkers for Sepsis: What Is and What Might Be? *Biomark Insights.* 2015; **10**: 7-17.
- [22] Dery M.A., Michaud M.D., Richard D.E. Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005; **37**: 535-40.
- [23] Zagorska A., Dulak J. HIF-1: the knowns and unknowns of hypoxia sensing. *Acta Biochim Pol.* 2004; **51**: 563-85.
- [24] Greijer A.E., van der Wall E. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *J Clin Pathol.* 2004; **57**: 1009-14.

- [25] Blouin C.C., Page E.L., Soucy G.M., Richard D.E. Hypoxic gene activation by lipopolysaccharide in macrophages: implication of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Blood*. 2004; **103**: 1124-30.
- [26] Hellwig-Burgel T., Rutkowski K., Metzen E., Fandrey J., Jelkmann W. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood*. 1999; **94**: 1561-7.
- [27] Park B.H., Kang Y.A., Park M.S., Jung W.J., Lee S.H., Lee S.K., et al. Delta neutrophil index as an early marker of disease severity in critically ill patients with sepsis. *BMC Infect Dis*. 2011; **11**: 299.
- [28] Alves-Filho J.C., Spiller F., Cunha F.Q. Neutrophil paralysis in sepsis. *Shock*. 2010; **34 Suppl 1**: 15-21.
- [29] Stachon A., Segbers E., Holland-Letz T., Kempf R., Hering S., Krieg M. Nucleated red blood cells in the blood of medical intensive care patients indicate increased mortality risk: a prospective cohort study. *Crit Care*. 2007; **11**: R62.
- [30] Stachon A., Bolulu O., Holland-Letz T., Krieg M. Association between nucleated red blood cells in blood and the levels of erythropoietin, interleukin 3, interleukin 6, and interleukin 12p70. *Shock*. 2005; **24**: 34-9.
- [31] Stachon A., Sondermann N., Imohl M., Krieg M. Nucleated red blood cells indicate high risk of in-hospital mortality. *J Lab Clin Med*. 2002; **140**: 407-12.
- [32] Shah R., Reddy S., Horst H.M., Stassinopoulos J., Jordan J., Rubinfeld I. Getting back to zero with nucleated red blood cells: following trends is not necessarily a bad thing. *Am J Surg*. 2012; **203**: 343-5; discussion 5-6.
- [33] De Blasi R.A., Cardelli P., Costante A., Sandri M., Mercieri M., Arcioni R. Immature platelet fraction in predicting sepsis in critically ill patients. *Intensive Care Med*. 2013; **39**: 636-43.

- [34] Brealey D., Brand M., Hargreaves I., Heales S., Land J., Smolenski R., et al. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet*. 2002; **360**: 219-23.
- [35] Lee I., Huttemann M. Energy crisis: the role of oxidative phosphorylation in acute inflammation and sepsis. *Biochim Biophys Acta*. 2014; **1842**: 1579-86.
- [36] Galley H.F. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. *Br J Anaesth*. 2011; **107**: 57-64.
- [37] Yamakawa K., Ogura H., Koh T., Ogawa Y., Matsumoto N., Kuwagata Y., Shimazu T. Platelet mitochondrial membrane potential correlates with severity in patients with systemic inflammatory response syndrome. *J Trauma Acute Care Surg*. 2013; **74**: 411-7; discussion 8.
- [38] Cohen J.J. Apoptosis. *Immunol Today*. 1993; **14**: 126-30.
- [39] Balestra G.M., Legrand M., Ince C. Microcirculation and mitochondria in sepsis: getting out of breath. *Curr Opin Anaesthesiol*. 2009; **22**: 184-90.
- [40] Garcia-Souza L.F., Oliveira M.F. Mitochondria: biological roles in platelet physiology and pathology. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014; **50**: 156-60.
- [41] Vermes I., Haanen C., Steffens-Nakken H., Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*. 1995; **184**: 39-51.
- [42] Jackson S.P., Schoenwaelder S.M. Procoagulant platelets: are they necrotic? *Blood*. 2010; **116**: 2011-8.
- [43] Lang E., Qadri S.M., Lang F. Killing me softly - suicidal erythrocyte death. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012; **44**: 1236-43.

- [44] Bateman R.M., Sharpe M.D., Singer M., Ellis C.G. The Effect of Sepsis on the Erythrocyte. *Int J Mol Sci.* 2017; **18**:
- [45] Lang F., Gulbins E., Lang P.A., Zappulla D., Foller M. Ceramide in suicidal death of erythrocytes. *Cell Physiol Biochem.* 2010; **26**: 21-8.
- [46] Wesseling M.C., Wagner-Britz L., Nguyen D.B., Asanidze S., Mutua J., Mohamed N., et al. Novel Insights in the Regulation of Phosphatidylserine Exposure in Human Red Blood Cells. *Cell Physiol Biochem.* 2016; **39**: 1941-54.
- [47] Garcia-Alvarez M., Marik P., Bellomo R. Sepsis-associated hyperlactatemia. *Crit Care.* 2014; **18**: 503.
- [48] Bellomo R., Kellum J.A., Pinsky M.R. Transvisceral lactate fluxes during early endotoxemia. *Chest.* 1996; **110**: 198-204.
- [49] Akbar S.R., Long D.M., Hussain K., Alhajhusain A., Ahmed U.S., Iqbal H.I., et al. Hyperuricemia: An Early Marker for Severity of Illness in Sepsis. *Int J Nephrol.* 2015; **2015**: 301021.
- [50] Mazzali M., Kanellis J., Han L., Feng L., Xia Y.Y., Chen Q., et al. Hyperuricemia induces a primary renal arteriolopathy in rats by a blood pressure-independent mechanism. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2002; **282**: F991-7.
- [51] Han H.J., Lim M.J., Lee Y.J., Lee J.H., Yang I.S., Taub M. Uric acid inhibits renal proximal tubule cell proliferation via at least two signaling pathways involving PKC, MAPK, cPLA2, and NF-kappaB. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007; **292**: F373-81.
- [52] Netea M.G., Kullberg B.J., Blok W.L., Netea R.T., van der Meer J.W. The role of hyperuricemia in the increased cytokine production after lipopolysaccharide challenge in neutropenic mice. *Blood.* 1997; **89**: 577-82.

- [53] Zharikov S., Krotova K., Hu H., Baylis C., Johnson R.J., Block E.R., Patel J. Uric acid decreases NO production and increases arginase activity in cultured pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008; **295**: C1183-90.
- [54] Esmon C.T. Molecular circuits in thrombosis and inflammation. *Thromb Haemost.* 2013; **109**: 416-20.
- [55] Hoppensteadt D., Tsuruta K., Hirman J., Kaul I., Osawa Y., Fareed J. Dysregulation of inflammatory and hemostatic markers in sepsis and suspected disseminated intravascular coagulation. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2015; **21**: 120-7.
- [56] Levi M., van der Poll T. Coagulation and sepsis. *Thromb Res.* 2017; **149**: 38-44.
- [57] de Stoppelaar S.F., van 't Veer C., van der Poll T. The role of platelets in sepsis. *Thromb Haemost.* 2014; **112**: 666-77.
- [58] Arbesu I., Bucsaiova M., Fischer M.B., Mannhalter C. Platelet-borne complement proteins and their role in platelet-bacteria interactions. *J Thromb Haemost.* 2016; **14**: 2241-52.
- [59] Sharron M., Hoptay C.E., Wiles A.A., Garvin L.M., Geha M., Benton A.S., et al. Platelets induce apoptosis during sepsis in a contact-dependent manner that is inhibited by GPIIb/IIIa blockade. *PLoS One.* 2012; **7**: e41549.
- [60] Greco E., Lupia E., Bosco O., Vizio B., Montrucchio G. Platelets and Multi-Organ Failure in Sepsis. *Int J Mol Sci.* 2017; **18**:
- [61] Pfeiler S., Stark K., Massberg S., Engelmann B. Propagation of thrombosis by neutrophils and extracellular nucleosome networks. *Haematologica.* 2017; **102**: 206-13.
- [62] Xu J., Zhang X., Pelayo R., Monestier M., Ammollo C.T., Semeraro F., et al. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat Med.* 2009; **15**: 1318-21.

- [63] Gould T.J., Lysov Z., Swystun L.L., Dwivedi D.J., Zarychanski R., Fox-Robichaud A.E., et al. Extracellular Histones Increase Tissue Factor Activity and Enhance Thrombin Generation by Human Blood Monocytes. *Shock*. 2016; **46**: 655-62.
- [64] Xu J., Zhang X., Monestier M., Esmon N.L., Esmon C.T. Extracellular histones are mediators of death through TLR2 and TLR4 in mouse fatal liver injury. *J Immunol*. 2011; **187**: 2626-31.
- [65] McDonald B., Davis R.P., Kim S.J., Tse M., Esmon C.T., Kolaczowska E., Jenne C.N. Platelets and neutrophil extracellular traps collaborate to promote intravascular coagulation during sepsis in mice. *Blood*. 2017; **129**: 1357-67.
- [66] Lipinska-Gediga M. Coagulopathy in sepsis - a new look at an old problem. *Anaesthesiol Intensive Ther*. 2016; **48**: 352-9.
- [67] Semeraro N., Ammollo C.T., Semeraro F., Colucci M. Sepsis, thrombosis and organ dysfunction. *Thromb Res*. 2012; **129**: 290-5.
- [68] Pawlinski R., Mackman N. Cellular sources of tissue factor in endotoxemia and sepsis. *Thromb Res*. 2010; **125 Suppl 1**: S70-3.
- [69] Hassanian S.M., Avan A., Ardeshirylajimi A. Inorganic polyphosphate: a key modulator of inflammation. *J Thromb Haemost*. 2017; **15**: 213-8.
- [70] Morrissey J.H., Smith S.A. Polyphosphate as modulator of hemostasis, thrombosis, and inflammation. *J Thromb Haemost*. 2015; **13 Suppl 1**: S92-7.
- [71] Travers R.J., Smith S.A., Morrissey J.H. Polyphosphate, platelets, and coagulation. *Int J Lab Hematol*. 2015; **37 Suppl 1**: 31-5.
- [72] Vincent J.L., Sakr Y., Sprung C.L., Ranieri V.M., Reinhart K., Gerlach H., et al. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med*. 2006; **34**: 344-53.
- [73] Bloos F., Reinhart K. Rapid diagnosis of sepsis. *Virulence*. 2014; **5**: 154-60.

- [74] Bacconi A., Richmond G.S., Baroldi M.A., Laffler T.G., Blyn L.B., Carolan H.E., et al. Improved sensitivity for molecular detection of bacterial and *Candida* infections in blood. *J Clin Microbiol.* 2014; **52**: 3164-74.
- [75] Dellinger R.P., Levy M.M., Rhodes A., Annane D., Gerlach H., Opal S.M., et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit Care Med.* 2013; **41**: 580-637.
- [76] Levy M.M., Rhodes A., Phillips G.S., Townsend S.R., Schorr C.A., Beale R., et al. Surviving Sepsis Campaign: association between performance metrics and outcomes in a 7.5-year study. *Crit Care Med.* 2015; **43**: 3-12.
- [77] Kumar A., Roberts D., Wood K.E., Light B., Parrillo J.E., Sharma S., et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med.* 2006; **34**: 1589-96.
- [78] Fan S.L., Miller N.S., Lee J., Remick D.G. Diagnosing sepsis - The role of laboratory medicine. *Clin Chim Acta.* 2016; **460**: 203-10.
- [79] Benz F., Roy S., Trautwein C., Roderburg C., Luedde T. Circulating MicroRNAs as Biomarkers for Sepsis. *Int J Mol Sci.* 2016; **17**:
- [80] Wacker C., Prkno A., Brunkhorst F.M., Schlattmann P. Procalcitonin as a diagnostic marker for sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2013; **13**: 426-35.
- [81] Povoas P., Coelho L., Almeida E., Fernandes A., Mealha R., Moreira P., Sabino H. Early identification of intensive care unit-acquired infections with daily monitoring of C-reactive protein: a prospective observational study. *Crit Care.* 2006; **10**: R63.
- [82] Lobo S.M., Lobo F.R., Bota D.P., Lopes-Ferreira F., Soliman H.M., Melot C., Vincent J.L. C-reactive protein levels correlate with mortality and organ failure in critically ill patients. *Chest.* 2003; **123**: 2043-9.

- [83] Zhang Z., Ni H. C-reactive protein as a predictor of mortality in critically ill patients: a meta-analysis and systematic review. *Anaesth Intensive Care*. 2011; **39**: 854-61.
- [84] Carrigan S.D., Scott G., Tabrizian M. Toward resolving the challenges of sepsis diagnosis. *Clin Chem*. 2004; **50**: 1301-14.
- [85] Kellum J.A., Kong L., Fink M.P., Weissfeld L.A., Yealy D.M., Pinsky M.R., et al. Understanding the inflammatory cytokine response in pneumonia and sepsis: results of the Genetic and Inflammatory Markers of Sepsis (GenIMS) Study. *Arch Intern Med*. 2007; **167**: 1655-63.
- [86] Wong H.R., Cvijanovich N., Wheeler D.S., Bigham M.T., Monaco M., Odoms K., et al. Interleukin-8 as a stratification tool for interventional trials involving pediatric septic shock. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008; **178**: 276-82.
- [87] Calfee C.S., Thompson B.T., Parsons P.E., Ware L.B., Matthay M.A., Wong H.R. Plasma interleukin-8 is not an effective risk stratification tool for adults with vasopressor-dependent septic shock. *Crit Care Med*. 2010; **38**: 1436-41.
- [88] Eidt M.V., Nunes F.B., Pedrazza L., Caeran G., Pellegrin G., Melo D.A., et al. Biochemical and inflammatory aspects in patients with severe sepsis and septic shock: The predictive role of IL-18 in mortality. *Clin Chim Acta*. 2016; **453**: 100-6.
- [89] Hanna W.J., Berrens Z., Langner T., Lahni P., Wong H.R. Interleukin-27: a novel biomarker in predicting bacterial infection among the critically ill. *Crit Care*. 2015; **19**: 378.
- [90] Shapiro N.I., Howell M.D., Talmor D., Nathanson L.A., Lisbon A., Wolfe R.E., Weiss J.W. Serum lactate as a predictor of mortality in emergency department patients with infection. *Ann Emerg Med*. 2005; **45**: 524-8.

- [91] Mikkelsen M.E., Miltiades A.N., Gaieski D.F., Goyal M., Fuchs B.D., Shah C.V., et al. Serum lactate is associated with mortality in severe sepsis independent of organ failure and shock. *Crit Care Med.* 2009; **37**: 1670-7.
- [92] Hwang Y.J., Chung S.P., Park Y.S., Chung H.S., Lee H.S., Park J.W., et al. Newly designed delta neutrophil index-to-serum albumin ratio prognosis of early mortality in severe sepsis. *Am J Emerg Med.* 2015; **33**: 1577-82.
- [93] Kuert S., Holland-Letz T., Friese J., Stachon A. Association of nucleated red blood cells in blood and arterial oxygen partial tension. *Clin Chem Lab Med.* 2011; **49**: 257-63.
- [94] Park S.H., Ha S.O., Cho Y.U., Park C.J., Jang S., Hong S.B. Immature platelet fraction in septic patients: clinical relevance of immature platelet fraction is limited to the sensitive and accurate discrimination of septic patients from non-septic patients, not to the discrimination of sepsis severity. *Ann Lab Med.* 2016; **36**: 1-8.
- [95] de Jager C.P., van Wijk P.T., Mathoera R.B., de Jongh-Leuvenink J., van der Poll T., Wever P.C. Lymphocytopenia and neutrophil-lymphocyte count ratio predict bacteremia better than conventional infection markers in an emergency care unit. *Crit Care.* 2010; **14**: R192.
- [96] Drewry A.M., Samra N., Skrupky L.P., Fuller B.M., Compton S.M., Hotchkiss R.S. Persistent lymphopenia after diagnosis of sepsis predicts mortality. *Shock.* 2014; **42**: 383-91.
- [97] Napoleao P., Potapova E., Moleirinho S., Saldanha C., Messias A. Soluble CD40 ligand profiles in patients with septic shock. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2016; **64**: 965-70.

- [98] Zheng Z., Jiang L., Ye L., Gao Y., Tang L., Zhang M. The accuracy of presepsin for the diagnosis of sepsis from SIRS: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intensive Care*. 2015; **5**: 48.
- [99] Prucha M., Bellingan G., Zazula R. Sepsis biomarkers. *Clin Chim Acta*. 2015; **440**: 97-103.
- [100] Poli-de-Figueiredo L.F., Garrido A.G., Nakagawa N., Sannomiya P. Experimental models of sepsis and their clinical relevance. *Shock*. 2008; **30 Suppl 1**: 53-9.
- [101] Natanson C., Fink M.P., Ballantyne H.K., MacVittie T.J., Conklin J.J., Parrillo J.E. Gram-negative bacteremia produces both severe systolic and diastolic cardiac dysfunction in a canine model that simulates human septic shock. *J Clin Invest*. 1986; **78**: 259-70.
- [102] Lindsey D.C., Emerson T.E., Jr., Thompson T.E., John A.E., Duerr M.L., Valdez C.M., et al. Characterization of an endotoxemic baboon model of metabolic and organ dysfunction. *Circ Shock*. 1991; **34**: 298-310.
- [103] Soerensen K.E., Olsen H.G., Skovgaard K., Wiinberg B., Nielsen O.L., Leifsson P.S., et al. Disseminated intravascular coagulation in a novel porcine model of severe *Staphylococcus aureus* sepsis fulfills human clinical criteria. *J Comp Pathol*. 2013; **149**: 463-74.
- [104] Fink M.P., Heard S.O. Laboratory models of sepsis and septic shock. *J Surg Res*. 1990; **49**: 186-96.
- [105] Kappelmayr J., Beke Debreceni I., Vida A., Antal-Szalmas P., Clemetson K.J., Nagy B., Jr. Distinct effects of Re- and S-forms of LPS on modulating platelet activation. *J Thromb Haemost*. 2013; **11**: 775-8.

- [106] Nemeth N., Berhes M., Kiss F., Hajdu E., Deak A., Molnar A., et al. Early hemorheological changes in a porcine model of intravenously given E. coli induced fulminant sepsis. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2015; **61**: 479-96.
- [107] Kiss F., Molnar L., Hajdu E., Deak A., Molnar A., Berhes M., et al. Skin microcirculatory changes reflect early the circulatory deterioration in a fulminant sepsis model in the pig. *Acta Cir Bras.* 2015; **30**: 470-7.
- [108] Liu Y.C., Liu J.H., Fang Z.A., Shan G.L., Xu J., Qi Z.W., et al. Modified shock index and mortality rate of emergency patients. *World J Emerg Med.* 2012; **3**: 114-7.
- [109] Loeffen R., Kleinegris M.C., Loubele S.T., Pluijmen P.H., Fens D., van Oerle R., et al. Preanalytic variables of thrombin generation: towards a standard procedure and validation of the method. *J Thromb Haemost.* 2012; **10**: 2544-54.
- [110] Leytin V., Allen D.J., Mykhaylov S., Lyubimov E., Freedman J. Thrombin-triggered platelet apoptosis. *J Thromb Haemost.* 2006; **4**: 2656-63.
- [111] Totino P.R., Magalhaes A., Alves E.B., Costa M.R., de Lacerda M.V., Daniel-Ribeiro C.T., Ferreira-da-Cruz Mde F. Plasmodium falciparum, but not P. vivax, can induce erythrocytic apoptosis. *Parasit Vectors.* 2014; **7**: 484.
- [112] Chatterjee M., Geisler T. Inflammatory Contribution of Platelets Revisited: New Players in the Arena of Inflammation. *Semin Thromb Hemost.* 2016; **42**: 205-14.
- [113] Martin C.M., Priestap F., Fisher H., Fowler R.A., Heyland D.K., Keenan S.P., et al. A prospective, observational registry of patients with severe sepsis: the Canadian Sepsis Treatment and Response Registry. *Crit Care Med.* 2009; **37**: 81-8.
- [114] Tsirigotis P., Chondropoulos S., Frantzeskaki F., Stamouli M., Gkirkas K., Bartzeliotou A., et al. Thrombocytopenia in critically ill patients with severe sepsis/septic shock: Prognostic value and association with a distinct serum cytokine profile. *J Crit Care.* 2016; **32**: 9-15.

- [115] Jeger V., Djafarzadeh S., Jakob S.M., Takala J. Mitochondrial function in sepsis. *Eur J Clin Invest.* 2013; **43**: 532-42.
- [116] Crouser E.D. Mitochondrial dysfunction in septic shock and multiple organ dysfunction syndrome. *Mitochondrion.* 2004; **4**: 729-41.
- [117] Puskarich M.A., Kline J.A., Watts J.A., Shirey K., Hosler J., Jones A.E. Early alterations in platelet mitochondrial function are associated with survival and organ failure in patients with septic shock. *J Crit Care.* 2016; **31**: 63-7.
- [118] Lorente L., Martin M.M., Ferreres J., Sole-Violan J., Labarta L., Diaz C., et al. Serum caspase 3 levels are associated with early mortality in severe septic patients. *J Crit Care.* 2016; **34**: 103-6.
- [119] Asakura H. Classifying types of disseminated intravascular coagulation: clinical and animal models. *J Intensive Care.* 2014; **2**: 20.
- [120] Carlier L., Hunault G., Lerolle N., Macchi L. Ex vivo thrombin generation patterns in septic patients with and without disseminated intravascular coagulation. *Thromb Res.* 2015; **135**: 192-7.
- [121] Perrin J., Charron C., Francois J.H., Cramer-Borde E., Levy B., Borgel D., Vieillard-Baron A. Coagulation phenotypes in septic shock as evaluated by calibrated automated thrombography. *Shock.* 2015; **43**: 74-9.
- [122] Chen D., McVey J.H., Dorling A. Enhanced effect of inhibition of thrombin on endothelium in murine endotoxaemia: specific inhibition of thrombocytopenia. *Thromb Res.* 2013; **132**: 750-6.
- [123] Semeraro F., Ammollo C.T., Esmon N.L., Esmon C.T. Histones induce phosphatidylserine exposure and a procoagulant phenotype in human red blood cells. *J Thromb Haemost.* 2014; **12**: 1697-702.

- [124] Gould T.J., Vu T.T., Swystun L.L., Dwivedi D.J., Mai S.H., Weitz J.I., Liaw P.C. Neutrophil extracellular traps promote thrombin generation through platelet-dependent and platelet-independent mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014; **34**: 1977-84.
- [125] Kempe D.S., Akel A., Lang P.A., Hermle T., Biswas R., Muresanu J., et al. Suicidal erythrocyte death in sepsis. *J Mol Med (Berl).* 2007; **85**: 273-81.
- [126] Oliver J.C., Bland L.A., Oettinger C.W., Arduino M.J., McAllister S.K., Aguerro S.M., Favero M.S. Cytokine kinetics in an in vitro whole blood model following an endotoxin challenge. *Lymphokine Cytokine Res.* 1993; **12**: 115-20.
- [127] van Deuren M., Santman F.W., van Dalen R., Sauerwein R.W., Span L.F., van der Meer J.W. Plasma and whole blood exchange in meningococcal sepsis. *Clin Infect Dis.* 1992; **15**: 424-30.
- [128] Behre G., Schedel I., Nentwig B., Wormann B., Essink M., Hiddemann W. Endotoxin concentration in neutropenic patients with suspected gram-negative sepsis: correlation with clinical outcome and determination of anti-endotoxin core antibodies during therapy with polyclonal immunoglobulin M-enriched immunoglobulins. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992; **36**: 2139-46.
- [129] Tripodi A. Thrombin Generation Assay and Its Application in the Clinical Laboratory. *Clin Chem.* 2016; **62**: 699-707.
- [130] Collins P.W., Macchiavello L.I., Lewis S.J., Macartney N.J., Saayman A.G., Luddington R., et al. Global tests of haemostasis in critically ill patients with severe sepsis syndrome compared to controls. *Br J Haematol.* 2006; **135**: 220-7.
- [131] Petros S., Kliem P., Siegemund T., Siegemund R. Thrombin generation in severe sepsis. *Thromb Res.* 2012; **129**: 797-800.

- [132] Wang Y., Braun O.O., Zhang S., Luo L., Norstrom E., Thorlacius H. Dynamic changes in thrombin generation in abdominal sepsis in mice. *Shock*. 2014; **42**: 343-9.
- [133] Schochl H., Solomon C., Schulz A., Voelckel W., Hanke A., Van Griensven M., et al. Thromboelastometry (TEM) findings in disseminated intravascular coagulation in a pig model of endotoxemia. *Mol Med*. 2011; **17**: 266-72.
- [134] Krajewski S., Kurz J., Wendel H.P., Straub A. Flow cytometry analysis of porcine platelets: optimized methods for best results. *Platelets*. 2012; **23**: 386-94.
- [135] Azimzadeh A., Romain N., Vermot-Desroches C., Ravanat C., Chenard M.P., Wijdenes J., et al. Antibodies to human adhesion molecules and von Willebrand factor: in vitro cross-species reactivity in the xenotransplantation setting. *Xenotransplantation*. 1998; **5**: 284-91.

## 11. Publikációs lista



**DEBRECENI  
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400

Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/410/2017.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Tóth Judit  
Neptun kód: TJ0226  
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola  
MTMT azonosító: 10038606

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

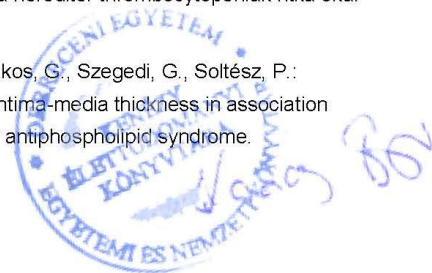
1. **Tóth, J.**, Bekéné Debreceni, I., Deák, Á., Pető, K., Berhes, M., Hajdu, E., Szabó, J., Németh, N., Fülecsi, B., Kappelmayer, J.: Characteristics of thrombin generation in a fulminant in a fulminant porcine sepsis model.  
*Thromb. Res.* 158, 25-34, 2017.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2017.07.030>  
IF: 2.65 (2016)
2. **Tóth, J.**, Bekéné Debreceni, I., Berhes, M., Hajdu, E., Deák, Á., Pető, K., Szabó, J., Németh, N., Fülecsi, 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: 1.679 (2016)





**További közlemények**

3. Kappelmayer, J., **Tóth, J.**: Clinical laboratories: production factories or specialized diagnostic centers.  
*EJIFCC. 27 (2), 156-165, 2016.*
4. **Tóth, J.**, Lenkey, Á., Oláh, A., Kóteles, J., Kissné, S. V., Kerényi, A., Kappelmayer, J.: Pneumatic tube system for transport of laboratory samples: preanalytical aspects.  
*Orvosi Hetilap. 155 (28), 1113-1120, 2014.*  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2014.29895>
5. Bagoly, Z., Fazakas, F., Marosi, A., Török, O., Bereczky, Z., Haramura, G., **Tóth, J.**, Kappelmayer, J., Muszbek, L.: Variant type Glanzmann thrombasthenia caused by homozygous p.724R>X mutation in beta3 integrin.  
*Thromb. Res. 125 (5), 427-431, 2010.*  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2010.01.002>  
IF: 2.372
6. Szántó, T., Vanhoorelbeke, K., Tóth, G., Vandenbulcke, A., **Tóth, J.**, Noppe, W., Deckmyn, H., Hársfalvi, J.: Identification of a VWF peptide antagonist that blocks platelet adhesion under high shear conditions by selectively inhibiting the VWF-collagen interaction.  
*J. Thromb. Haemost. 7 (10), 1680-1687, 2009.*  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1538-7836.2009.03552.x>  
IF: 6.069
7. **Tóth, J.**, Kappelmayer, J., Udvardy, M. L., Szántó, T., Szarvas, M., Rejtő, L., Soltész, P., Udvardy, M., Hársfalvi, J.: Increased platelet glycoprotein Ib number, enhanced platelet adhesion and severe cerebral ischaemia in a patient with polycythaemia vera.  
*Platelets. 20 (4), 282-287, 2009.*  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/09537100902878421>  
IF: 2.272
8. Schlammadinger, Á., **Tóth, J.**, Nagy, B., Fazakas, F., Hársfalvi, J., Kappelmayer, J., Muszbek, L., Radványi, G., Boda, Z.: Bernard-Soulier szindróma: a hereditér trombocytopéniák ritka oka.  
*Hematol. Transzf. 40, 40-46, 2007.*
9. Dér, H., Kerekes, G., Veres, K., Szodoray, P., **Tóth, J.**, Lakos, G., Szegedi, G., Soltész, P.: Impaired endothelial function and increased carotid intima-media thickness in association with elevated von Willebrand antigen level in primary antiphospholipid syndrome.  
*Lupus. 16 (7), 497-503, 2007.*  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1177/0961203307080224>  
IF: 2.248





10. Szarvas, M., Oparaugo, P., Udvardy, M. L., **Tóth, J.**, Szántó, T., Daróczy, L., Vereb, G., Hársfalvi, J.: Differential platelet deposition onto collagen in cone-and-plate and parallel plate flow chambers.  
*Platelets*. 17 (3), 185-190, 2006.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/09537100500437638>  
IF: 1.679

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 18,969**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):  
4,329**

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, 2017.12.13.



## **12. Tárgyszavak/Keywords**

szepszis / sepsis

éretlen vörösvérsejtek és thrombocyták / immature red blood cells and platelets

thrombocyta apoptózis / platelet apoptosis

oxidatív stressz / oxidative stress

thrombocyta aktiváció / platelet activation

trombin generáció / thrombin generation

### 13. Köszönetnyilvánítás

Hálával tartozom témavezetőmnek, Dr. Kappelmayer János professzor úrnak – aki munkámat mindvégig figyelemmel kísérte és értékes szakmai tanácsaival irányította – a folyamatos ösztönzéséért és támogatásáért.

Köszönettel tartozom Dr. Fülesdi Béla és Dr. Németh Norbert professzor uraknak, akik lehetővé tették, hogy bekapcsolódhassak az általuk létrehozott szepszis modell tanulmányozásába és tanácsaikkal nagyban hozzájárultak e munka sikeréhez. Köszönöm Dr. Szabó Judit tanárnőnek a közlemények elkészítése során nyújtott segítséget.

Szeretném megköszönni Bekéné Debreceni Ildikónak azt a sok segítséget, amit a kísérletek tervezése, kivitelezése és az eredmények értékelése során tőle kaptam. Köszönöm, hogy mindig mellettem volt, amikor az én két kezem nem volt elég.

Köszönettel tartozom Dr. Berhés Mariannak, Dr. Pető Katalinnak, Dr. Deák Ádámnak és Dr. Hajdú Endrének a gyümölcsöző közös munkáért, valamint köszönet illeti a Sebészeti Műtéttani Tanszék dolgozóit.

Hálásan köszönöm a Laboratóriumi Medicina Intézet minden munkatársának segítségét. Szeretném külön megköszönni a Hematológia, a Hemosztázis és az Integrált Részlegen dolgozó kolléganők áldozatos munkáját.

Köszönettel tartozom Dr. Hársfalvi Jolán tanárnőnek, aki a korábbi években bevezetett a kutatás világába és Dr. Muszbek László professzor úrnak, hogy az általa vezetett intézetben kutathattam éveken keresztül.

Végezetül nagyon köszönöm a családomnak, férjemnek és gyermekeimnek, hogy szeretetükkel és biztatásukkal mindvégig támogattak. Az ő türelmük nélkül ez a munka nem valósulhatott volna meg.

*Munkámat nagy szeretettel ajánlom Istinek, Kamillának és Istvánkának!*

## **14. Függelék**

A függelék az értekezés alapjául szolgáló *in extenso* közlemények különlenyomatait tartalmazza.