

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

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

Budainé Dr. Tóth Judit

Témavezető: Dr. Kappelmayer János



DEBRECENI EGYETEM
Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2018

**HEMATOLÓGIAI ELVÁLTOZÁSOK VIZSGÁLATA
EXPERIMENTÁLISAN LÉTREHOZOTT LETÁLIS SZEPSZIS MODELLBEN**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: Budainé Dr. Tóth Judit okleveles általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán Doktori Iskolája
(Trombózis, hemosztázis és vaszkuláris biológia programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Kappelmayer János, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Balla György, akadémikus
tagok: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora
Prof. Dr. Bogár Lajos, az MTA doktora

A doktori szigorlat helyszíne és időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Laboratóriumi Medicina Intézet könyvtára
2018. április 23. (hétfő) 12:00 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Molnár Zsolt, PhD
Dr. Bácsi Attila, az MTA doktora

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Balla György, akadémikus
tagok: Prof. Dr. Bogár Lajos, az MTA doktora
Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora
Prof. Dr. Molnár Zsolt, PhD
Dr. Bácsi Attila, az MTA doktora

Az értekezés védésének helyszíne és időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme
2018. április 23. (hétfő) 13:30 óra

1. Bevezetés és irodalmi áttekintés

1.1. A szepszis és a szeptikus shock fogalma, etiológiája

A szepszis egy életet veszélyeztető szervi működészavar, amelynek oka a szervezet fertőzésre adott válaszában nem megfelelően szabályozott volta. Jelentős népegészségügyi problémát jelent, évente 15-30 millió ember megbetegedéséért felelős világszerte, halálozási aránya megközelíti a 20%-ot. A szepszis során kialakuló szervi működészavar súlyosságának jelzésére leggyakrabban használt pontrendszer a Sequential (Sepsis-Related) Organ Failure Assessment Score (röviden SOFA score), amely a légző- és kardiovaszkuláris rendszer, a vese, a máj, valamint a központi idegrendszer működését és a thrombocytopenia mértékét veszi alapul. Magasabb SOFA score fokozott mortalitási kockázatot jelent. Szepsziszről akkor beszélhetünk, ha bizonyított vagy feltételezhető fertőzés következtében a SOFA score ≥ 2 ponttal hirtelen emelkedik. 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 ≥ 65 Hgmm értéken tartásához, továbbá a laktát koncentráció >2 mmol/L adekvát folyadékpótlás ellenére is.

A szepszis mindig fertőzés következtében alakul ki, az esetek többségében bacteraemia áll a tünetek hátterében. Az 1980-as évekig a szeptikus esetek többségét Gram-negatív baktériumok okozták, míg attól kezdve a Gram-pozitív baktériumoké lett a vezető szerep. 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 közösségekben szerzett szepszis elsősorban húgyúti eredetű, ez utóbbi fő kórokozója az *Escherichia coli*.

1.2. A szepszis patomechanizmusa

1.2.1. A citokinek és a hypoxia indukálta faktor-1 (HIF-1)

Fertőzés esetén a kórokozó elsőként a veleszületett immunrendszer tagjaival találkozik: a monocytákkal/macrophagokkal, a granulocyttákkal 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). Ez utóbbi

sejtelhalás részben a kórokozó közvetlen hatásának, részben pedig a felszabadult citokinek hatásának következménye. Az immunsejtek mintázat-felismerő toll-like receptorai (TLR) 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. A monocytákban/macrophagokban proinflammatorikus citokinek (tumor necrosis factor- α /TNF- α /, interleukin-1 β /IL-1 β /), 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. A neutrophil granulocyták aktiválódnak és adhézións molekulákat expresszálnak, így a keringésben mozgásuk lelassul, gördülnek, az endotheliumhoz rögzülnek, az érnyálából kilépnek és a fertőzés helyére vándorolva számos mediátort szekretálnak. Az endothelsejtek adhézións molekulák expresszáálásával 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. Ezen teljes folyamat szabályozása a pro- és anti-inflammatorikus citokinek termelésének egyensúlyán keresztül valósul meg. Sepszis esetén a fertőzésre adott nem megfelelő válasz generalizált gyulladásához és az egészséges szövetek károsodásához vezet. A sepszis 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 sepszis későbbi szakasza az anti-inflammatorikus fázis, ekkor az immunrendszer deaktivációja jellemző és az anti-inflammatorikus citokinek uralják a képet. A sepszis kezdetén bekövetkező halálozásért a szeptikus shock, míg a későbbi fázisban az immunszuppresszió miatti reinfekció felelős.

A sepszis egyik kulcsfontosságú molekulája a HIF-1, egy folyamatosan termelődő fehérje, amely normoxia esetén gyorsan lebomlik, hypoxiában viszont stabil marad. 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 angiogenesis, a vörösvértestek képződését és a vasodilatatiót, így biztosítva a sejtek oxigénhez jutását. 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. Az LPS képes HIF-1 termelést kiváltani a macrophagokban, míg az IL-1 β normoxia esetén is fokozza a HIF-1 szintjét.

1.2.2. 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. Szepszisben az éretlen alakok megjelenésének oka a neutrophil paralysis: az NO-, citokin- és kemokin-túltermelés következtében sérül a neutrophil granulocyták endotheliumhoz történő adhézioja 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.

A magvas vörösvérsejtek korán jelzik a kritikus állapotú betegek fokozott halálozási kockázatát: átlagosan 1-3 héttel a beteg halála előtt már megjelennek a periférián. A magvas vörösvérsejtek megjelenését korábban már leírták hypoxia, chronicus anaemia és súlyos fertőzések esetén; e vörösvérsejteket az ismert csontvelői stimulusok (erythropoietin, IL-3, IL-6) emelkedett szintjével együtt észlelték. Ezen mediátorok koncentrációja általában hypoxia és gyulladás esetén emelkedik, így a magvas 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.

Az éretlen thrombocyták megjelenése előrejelzi a szepszis kialakulását, az éretlen thrombocytá frakció 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.

1.2.3. Mitokondriális dysfunctio és apoptózis

A szervezet oxigénfogyasztásának és ATP termelésének több mint 90%-áért a mitokondriális oxidatív foszforiláció felelős. A légzési lánc enzimkomplexeit (elsősorban a NADH-ubikinon oxidoreduktázt és a citokróm C oxidázt) szepszisben gátolhatja maga az LPS, illetve az infekció hatására termelődő TNF- α és a nagy mennyiségben felszabaduló NO. 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. Szeptikus betegekben a szolubilis Fas szintjét emelkedettnek találták, ami arra utal, hogy az apoptózis nemcsak intrinszik (mitokondriális) útvonalon, hanem extrinszik úton is aktiválódik. Ráadásul maga a TNF- α is indukálhat apoptózist az extrinszik útvonalon keresztül. A mitokondriális dysfunctio a szepszis korai szakaszában reverzibilis lehet, míg

nagyfokú és tartós oxidatív károsodás esetén irreverzibilissé válhat. A szepszis-indukálta szervkárosodás hátterében legalább részben a mitokondriális dysfunctio eredményezte energiakríziss áll. A mitokondriális dysfunctio a szervezet valamennyi – mitokondriummal rendelkező – sejtjét érintheti. A szepszishez társuló thrombocytopenia hátterében részben a thrombocyták fokozott apoptózisa állhat, míg a lymphopenia oka a CD4+ és CD8+ T-sejtek, valamint a B-sejtek apoptózisa lehet.

Az apoptózis korai szakaszában a sejtmembrán foszfatidil-szerin (PS) expressziója fokozódik, de membrán integritása nem sérül. A thrombocytákban a mitokondriális reaktív oxigén-szabadgyökök termelésének növekedése fokozza a PS expressziót, de nem váltja ki az integrinek aktivációját és a thrombocyták degranulációját. Ugyanakkor a thrombocytákat aktiváló hatás is eredményezhet fokozott PS expressziót, és végső soron a thrombocyták prokoaguláns aktivitását. A vörösvértestek – bár sem sejtmaggal, sem mitokondriummal nem rendelkeznek – szintén elszenvedői lehetnek a programozott sejthalálnak (eryptosisnak), amelyet esetükben a vörösvértestek zsugorodása, a sejtmembrán kiboltosulások létrejötte és a fokozott PS expresszió jelez. 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. Szepszis esetén az eryptosist stimulálhatják egyes bakteriális virulenciafaktorok (pl. szfingomielináz, hemolizin), a fertőzéshez társuló vashiány, a fokozott PAF-termelés és az oxidatív stressz.

1.2.4. 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. 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.

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. A magas húgysavszint közvetlen vagy közvetett módon vesekárosító hatású, endothel dysfunctiót eredményez, számos gyulladásos transzkripciós faktort aktivál, fokozza egyes citokinek (pl. TNF- α) és kemokinek termelődését, valamint erőteljesen gátolja az NO-szintézist.

1.2.5. 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. 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. 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 γ receptor IIa, glikoprotein Ib α , 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 Ib α) vagy a baktérium által felszabadított toxin (pl. Shiga toxin, lipoteicholsav) hat a thrombocytára. 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 a közelmúltban leírtak egy TLR4-független interakciót is. Maga a thrombocyta számos komplement faktort tartalmaz és az aktivált thrombocyta fokozza a komplement rendszer aktiválódását. 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. 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 apoptózist indukálják. Az aktiváló ágensek a thrombocyták prokoaguláns fenotípusát is eredményezhetik. E prokoaguláns thrombocyták – amelyek nem pusztán „túl aktivált”

formák, hanem a nekrózis jellegzetességeit mutatják – nagymértékben fokozzák a trombin- és ezáltal a fibrinképződést, nagy mennyiségű proinflammatorikus PAF-ot szekretálnak és fokozottan kötődnek a neutrophil granulocytákhoz. Az aktivált thrombocyta eredetű mikropartikulák is jelentős prokoaguláns aktivitással rendelkeznek. Míg kontrollált gyulladás esetén a thrombocyták segítik a fertőzés lokalizálását és a kórokozó eliminálását, addig szepszisben a kontrollálatlan thrombocyta aktiváció túlzott mértékű gyulladáshoz, microthrombusok képződéséhez és thrombocytopeniához, végül disseminált intravascularis coagulációhoz (DIC-hez) és sokszervi elégtelenséghez vezet. Irodalmi adatok alapján a thrombocytopenia – függetlenül annak okától – a kritikus állapotú, valamint a szepsztikus betegek esetén a mortalitás független előrejelzője.

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. 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 nekrózis során is kiszabadulhatnak a sejtekből. Az extracelluláris hisztonokat az endotheliumra nézve citotoxikusnak találták, így közreműködhetnek az endothel dysfunctio létrehozásában; képesek aktiválni a thrombocyta TLR2-n és TLR4-en keresztül; ezenkívül a humán monocyták esetében fokozzák a szöveti faktor aktivitást és a trombin generációt. E hatásokért elsősorban a H3 és H4 hisztonok felelősek. Összességében a NET-ek a thrombocyta 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. A NET-ek kifejezett prokoaguláns és proinflammatorikus hatásuk révén a mikrocirkulációban ún. immunothrombosishoz vezetnek, amely kontrollált formában lokalizálja a fertőzést, míg kontrollálatlan esetben DIC-et eredményez.

Szepszisben a véralvadási rendszerben bekövetkező változásokért elsősorban a citokinek felelősek. 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, amely elsősorban a monocyta/macrophag rendszerben valósul meg. 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 útvonal, TFPI és antitrombin). 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 thrombocyta denz granulumai nagy mennyiségben tartalmaznak polyP-t. A polyP-k aktiválják a véralvadás kontakt fázisát, amely az alvadási aktiváció mellett a gyulladásos mediátor bradikinin képződését eredményezi. 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 thrombocyta 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 hisztionok proinflammatorikus hatását; részben direkt módon, részben a bradikinin keresztül fokozzák a vaszkuláris permeabilitást; illetve a kontakt aktiváció következményeként a komplement rendszer klasszikus útjának aktivációját. Az extracelluláris hisztionok thrombocyta aktiváló és trombin generáló hatása polyP-mediáltnak bizonyult.

1.3. 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. Három experimentális modell terjedt el szélesebb körben: (1) a coecalis ligatio és punctio által kiváltott peritonitis modell, (2) a szepszis indukciója intravénás vagy intraperitoneális endotoxin injekcióval, illetve (3) élő baktériumok beadásával, ez utóbbi esetben a szepszist leggyakrabban Gram-negatív baktériumok (főleg *E. coli*) adásával váltották ki. A szepszis indukciós lehetőségek közül az élő baktériumok beadása az, amelyik valószínűleg a legjobban mimikálja az emberben in vivo bekövetkező patológias folyamatokat.

2. Célkitűzések

A szervezetnek a fertőzésre és következményes hypoxiára adott válasza intenzíven tanulmányozott, de e változások időbeliségéről viszonylag keveset tudunk. A hemosztázis vizsgálata során a septicus 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 aladási és thrombocytá aktiváció igazolása, továbbá
- a szepszis során felszabaduló szolubilis anyagok sejtaktiváló hatásának kimutatása in vitro kísérletekben.

3. Anyagok és módszerek

3.1. 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 septicus ($n = 10$) 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. 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. 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. szemhéj-, 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.

3.2. 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 középnyomás 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 középnyomás hányadosa. Az artériás vérben az oxigén parciális nyomását (p_aO_2) és a laktát koncentrációt GEM 3500 vérgáz-analizátorral (Instrumentation Laboratory, Bedford, USA) határozták meg.

3.3. 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 elkezdtek 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. 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.

3.4. Nagyvérvkép meghatározása hematológiai automatával, mikroszkópos kenetelemzés és alvadási szűrőtesztek

A nagyvérvkép meghatározását a rutin klinikai laboratóriumi gyakorlatunknak megfelelően végeztük ADVIA 120 hematológiai automatán (Siemens, Forchheim, Németország) egy olyan speciális szoftverrel, amely lehetővé teszi a sertésvér sejtsejtszámainak pontos elkülönítését. A lebenyezettségi indexet – amely a fehérvérsejtek éretlenségét jelzi – ugyanezen analízátor 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 magvas 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 magvas vörösvérsejtek számát (G/L) az 1000 fehérvérsejtre eső magvas vörösvérsejtek számából és a minták fehérvérsejtszámából kalkuláltuk. Az óriás és féregszerű thrombocyták számát 200 egyedi thrombocytára vonatkoztatva adtuk meg. Thrombocyta 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.

3.5. 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.

3.6. Áramlási citometriai vizsgálatok

A thrombocyta mitokondrium membrán depolarizációt FC500 áramlási citométer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) segítségével vizsgáltuk Leytin és munkatársainak módszere alapján, amelyet sertés thrombocytákra adaptáltunk. E módszer lényege, hogy a thrombocytákat egy 3,3'-dihexil-oxocarbocianin-jodid ($\text{DiOC}_{6(3)}$; 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 $\text{DiOC}_{6(3)}$ 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 $\mu\text{mol/L}$ $\text{DiOC}_{6(3)}$ -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 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 végtérfigatúra hígítottuk. A thrombocyta 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 thrombocytaikat az FL1 hisztogramokon annexin V bright eseményekként láthattuk és ezen thrombocyta arányát oly módon határoztuk meg, hogy az annexin V bright események számát a teljes egyedi thrombocyta populáció eseményszámához viszonyítottuk.

3.7. 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. Egészséges „0” vércsoportú donoroktól vért vettünk K₂-EDTA-t tartalmazó csövekbe (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), majd az alvadástól 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 CaCl₂-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% CO₂ 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 kötése 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.

3.8. TNF-α 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-α-t és/vagy LPS-t adtunk. A rekombináns TNF-α-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 µg/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-α-t; 100 ng/mL, 1 µg/mL vagy 10 µg/mL LPS-t; illetve 100 ng/mL TNF-α mellett 100 ng/mL, 1 µg/mL vagy 10 µg/mL LPS-t is tartalmaztak. A mintákat 24 órán át 37°C-on 5% CO₂ 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-α-t és/vagy LPS-t közvetlenül a K₂-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.

3.9. Trombin generációs vizsgálatok

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

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 µmol/L foszfolipiddel biztosítottuk a trombinképződés feltételeit. Minden PPP minta trombin generációját meghatároztuk reagens hiányában is (ez esetben a PPP-Reagens helyett fiziológiás sóoldatot adtuk a mintákhoz). Az előzőeken kívül néhány minta esetében szöveti faktor hozzáadása nélkül, pusztán foszfolipid hozzáadásával (Mikropartikula (MP)-Reagens; 4 µmol/L foszfolipid) is elvégeztük a méréseket. A fluoriméter lemezének lyukaiba 80 µL PRP/PPP-t és 20 µL PRP-Reagenst/ PPP-Reagenst/ fiziológiás sóoldatot/ MP-Reagenst/ Trombin Kalibrátort pipettáztunk, majd 10 percig tartó 37°C-os inkubáció után 20 µL FluCa (fluorogén szubsztát 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.

3.10. 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.

4. 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. 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 lebenyezettségi 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.

Az invazív beavatkozás (tracheostomia, asszisztált lélegeztetés, artériás és vénás kanülálás) mind a szeptikus, mind a kontroll állatokban akut fázis reakcióhoz és izomsérüléshez vezetett, ami az emelkedett abszolút neutrophilszám és CK aktivitás értékekből volt látható. Az *E. coli* adását követően az abszolút neutrophilszám a kiindulási értékekhez képest egy enyhe, nem szignifikáns emelkedést mutatott, a szeptikus egyedek közötti jelentős különbségeket a magas maximum és alacsony minimum értékek jelezték. 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.

Annak érdekében, hogy a szepszis folyamán kialakuló csontvelői reakciót tanulmányozhassuk, reticulocyt- 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. Ezen változások már 2 órával a sepszis indukció után szignifikánsak voltak.

Sepszisben a thrombocyták kétféle morfológiai eltérést mutattak: egyrészt különböző méretű és alakú thrombocyták jelentek meg a periférián – valószínűleg a csontvelőben újonnan termelődve és onnan kiszabadulva (thrombocyta anisocytosis, óriás thrombocyták, féregszerű thrombocyták); másrészt a thrombocyták aktiválódtak, amelynek következtében thrombocyta aggregátumok voltak láthatóak a kenetekben. Az *E. coli*-kezelt csoportban mind az óriás, mind a féregszerű thrombocyták száma már a sepszis korai szakaszában szignifikáns emelkedést mutatott a kontroll csoport értékeihez, valamint a szeptikus csoport kiindulási értékeihez képest.

A keringő thrombocyták sorsának követése céljából vizsgáltuk a szeptikus és kontroll állatok thrombocytainak mitokondrium membrán depolarizációját oly módon, hogy áramlási citométerrel a thrombocyták mitokondriumaiban felhalmozódó fluoreszcens festék emisszióját detektáltuk. 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. Csak az *E. coli*-kezelt állatok esetében 2 órával a sepszis indukció után láttunk szignifikáns mértékű thrombocyta mitokondrium membrán depolarizációt.

Az *E. coli*-kezelt állatok esetén 4 órával a sepszis indukció után jelzett hypoxiát észleltünk. A szeptikus csoportban laktát acidosis alakult ki, 4 óra elteltével a laktát koncentráció szignifikánsan emelkedetté vált olyan értékeket elérve, amelyek súlyos humán sepszis 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.

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

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. 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.

A thrombocytaszám 4 óra elteltével mind a szeptikus, mind a kontroll csoport esetén szignifikáns csökkenést mutatott. 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 thrombocyta aggregátum képződést figyeltünk meg. A kezelt állatok esetén 2 óra elteltével thrombocyta 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 thrombocyta-asszociált változások jellemzése céljából meghatároztuk az aktivált thrombocyták arányát a thrombocyták annexin V pozitivitása alapján. 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 szepszis indukciót követően. Ezeken 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. 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 szepszis indukció után 2 órával levett mintákkal inkubáltuk. A kontrollok esetén semmilyen változást nem észleltünk.

In vitro kísérletünk eredménye tehát arra utalt, hogy a septicus 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. Eredményeink alapján felmerült, hogy a septicus sertés plazmának vajon mely komponense lehet hatással az egészséges mosott vörösvértestekre, így ennek vizsgálatára további in vitro kísérleteket terveztünk. Első lépésként mosott humán vörösvértest-szuspenzióhoz a donorok autológ plazmáján kívül 100 ng/mL TNF- α -t és/vagy 100 ng/mL, 1 μ g/mL vagy 10 μ 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- α , sem az LPS, sem ezek együttese nem aktiválta a vörösvértesteket és nem eredményezett hemolízist. Második lépésben a TNF- α -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- α és 10 μ g/mL LPS kombinációját tartalmazó minták plazmájából mért LDH aktivitás szignifikánsan emelkedett volt mind a nem aktivált mintákéhoz, mind a többi aktivált mintáéhoz képest; a hemolízis index esetén pedig nem csak a 100 ng/mL TNF- α és 10 μ g/mL LPS együttes adása, hanem 10 μ g/mL LPS önmagában is szignifikáns emelkedést eredményezett.

Annak érdekében, hogy igazoljuk azt, hogy az *E. coli* adás hatására thrombocytá 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. 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 septicus 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. A trombincsúcs és az ETP nem változott a kísérlet 4 órás időtartama alatt.

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 sepszis indukció előtt; a trombincsúcs és az ETP viszont szignifikánsan alacsonyabb volt ezen csoport kiindulási értékeihez képest. A septicus 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 sepszisben. A start tail a 4 órás periódus alatt végig állandó maradt, ezzel jelezve, hogy a trombinképződés végpontja nem változott. A kezelt állatokban a trombincsúcs a kísérletek alatt végig folyamatosan csökkent a képződött trombin csökkent mennyiségének megfelelően, és ez a változás 4 óra elteltével lett szignifikáns. Az ETP mind a septicus, mind a kontroll csoportban szignifikáns csökkenést mutatott, de a septicus állatok esetén egy sokkal kifejezettebb csökkenés alakult ki a sepszis indukció után 4 órával.

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 trombincsúcs a kiindulási értékeknél lényegesen magasabb volt. 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, míg a start tail már 2 óra elteltével szignifikáns rövidülést mutatott. A trombincsúcs 2 óra elteltével szignifikánsan emelkedett a nagyobb mennyiségben képződött trombinnak megfelelően és ugyanebben az időpontban az ETP is mutatott egy enyhe növekedést.

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 megfigyeltékhez, egyedüli eltérésként a kinetikus paraméterek enyhe rövidülése és a mennyiségi paraméterek enyhén emelkedett volta említhető.

5. 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 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 magvas vörösvérsejtek jelentek meg a periférián, amelyek többségében polychromatophil normoblastok voltak néhány orthochromatophil sejtrel. Humán tanulmányokban már korábban leírták, hogy a magvas vörösvérsejtek száma a mortalitás előrejelzője. Ezen szerzők a magvas 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 vártan 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 thrombocyta frakció előrejelzi a szepszist, de nem alkalmas a szepszis súlyosságának megítélésére. Mi a thrombocyták morfológiai eltéréseit tanulmányoztuk, amely esetünkben összefüggést mutatott a fokozott csontvelői válasszal. A kiindulási mintákból készült kenetekben csak ritkán láttunk óriás thrombocyták és féregszerű morfológiájú thrombocyták, és ezen dysplasticus thrombocyták száma kizárólag a szeptikus csoportban emelkedett meg többszörösére, a kontroll csoportban változatlan maradt. A thrombocyta egy nagyon gyors reagálású sejt a hemosztázisban betöltött szerepe során, az utóbbi időben pedig gyulladásos sejtként is azonosították. Egy nagy prospektív multicentrikus tanulmányban a thrombocytopeniát a fokozott mortalitás független rizikófaktorának találták szepszisben. A thrombocytopenia súlyossága egyenesen arányos a gyulladás súlyosságával és a következményes mortalitással. 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 patológiás állapotokban bekövetkező mitokondriális eltérések károsak vagy hasznosak lehetnek a szervezetre nézve. 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 sejtjeinek mitokondriális működését vizsgálták, legtöbbször patkány-modellben coecalis ligatio és punctio, valamint intraperitoneálisan adott LPS után. A thrombocyta egy

könnyen hozzáférhető sejttípus, amely ráadásul jelentős mennyiségű működő mitokondriummal rendelkezik, így alkalmas a mitokondriális funkció sorozatos vizsgálatára. Ezenkívül a keringésben lévő thrombocytaikat 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. A szeptikus sertés modellünkben a thrombocyta mitokondrium membrán depolarizációját áramlási citometriaival 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. 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 thrombocyta mitokondrium membrán depolarizációra és esetleges thrombocyta apoptózisra utalnak súlyos szepszisben, amelyek korán, már 2 órával a szepszis indukciót követően kialakulnak. Hasonló technikával humán beteganyagon azt találták, hogy a thrombocyta mitokondrium membrán potenciálja összefüggést mutatott a SIRS súlyosságával. 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 szepszishoz 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. 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, vazóaktív 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 a 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. Az alvadási szűrőtesztek (a protrombin idő, az APTI és a trombin idő) ezzel szemben nem mutattak szisztematikus megnyúlást a szeptikus 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 vérzésveszéllyel járó alvadásifaktor-deficienciákra, de érzéketlenek a protrombotikus állapotokra. Perrin és munkatársai a trombin generációs tesztek alapján a szeptikus shockban lévő betegek <15%-át találták kizárólag hypocoagulabilitással rendelkezőnek, 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 szeptikus 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 betegekkal 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 szepsztikus betegek esetén a mortalitás független előrejelzője, azonban nehéz eldönteni, hogy a thrombocytopenia a thrombocyta aktiváció és consumption (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. 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.

In vitro kísérleteinkben normál humán mosott vörösvértesteket inkubáltunk a szepsztikus 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 szepsztikus 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, továbbá a szabad DNS-ről is leírták, hogy fontos szerepe van a prokoaguláns fenotípus létrehozásában szepszisben. Ezeken kívül Lang munkacsoportjának patogének felülúszójával sikerült eryptosist kiváltani, amelyet részben a vörösvértestek PS expressziójának fokozódása jelzett, és ez korrelált a felülúszó szfingomielináz aktivitásával. 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. Mindezek mellett a felszabaduló proinflammatorikus citokinek (pl. IL-6, TNF- α) is endothel, leukocyta és thrombocyta aktivációt váltanak ki, így hatással lehetnek a vörösvértestekre is. Oliver és munkatársai leírták, hogy a TNF- α a plazmában a legmagasabb koncentrációját az endotoxin beadása után 2 órával éri el, majd a rövid féléletidejének köszönhetően szintje gyorsan csökken. Mivel a szepsztikus malacaink 3 órán át kaptak *E. coli*-t és az LPS féléletideje is meglehetősen rövid, az LPS szerepe is felmerül a vörösvértestek stimulálásában. Ráadásul a szepszis indukció után 4 órával a

szeptikus 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- α , 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- α -t és/vagy LPS-t közvetlenül az alvadást gátló teljes vérhez adtuk – amelyben a fehérvérsejtek és a trombocyták is jelen voltak –, a vörösvértestek PS expressziója ugyan nem fokozódott, de a nagy dózisú LPS hemolízist váltott ki. Tekintettel arra, hogy munkacsoportunk korábbi vizsgálataiban 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 – LPS koncentrációk hatását vizsgáltuk. Eredményeink azt mutatták, hogy a TNF- α és az LPS sem közvetlenül, sem a fehérvérsejteken és a trombocytákon keresztül nem indukálja a vörösvértestek PS expresszióját. A TNF- α 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. 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. 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. Egy másik tanulmány súlyos állapotú szeptikus betegek trombin generációját értékelte oly módon, hogy a túlélők és a nem túlélők eredményeit hasonlította össze. 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 trombincsúcs 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 extrinzik 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.

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 thrombocyta aktivációra utal szepszisben. Összesen három különböző vizsgálati elrendezést alkalmaztunk PPP esetén és mindhárommal sikerült igazolnunk az alvadási aktivációt, mint az időfüggő – tehát a trombinképződés sebességét leíró – paraméterek rövidülését. A fokozott maximális trombinképződéssel 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 trombincsúcs 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 trombinképződés 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. A hagyományos alvadási szűrőtesztek nem mutatják a prokoaguláns és antikoaguláns hatások egyensúlyát. 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.

6. 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 húgysavszintet 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- α 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.

7. Az értekezés új eredményei, megállapításai, klinikai jelentősége

1. Letális sertés szepszis modellünkben az éretlen vörösvérsejt- és thrombocyta-alakok megjelenése, a thrombocyta mitokondrium membrán depolarizáció, a húgysavszint emelkedése, valamint a thrombocyta- 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 thrombocyta aggregátumok egyidejű megjelenése mellett, ami korai thrombocyta 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- α és az endotoxin szerepe nem volt igazolható. Nagy dózisu endotoxinnal az egészséges vörösvértestek lízisét tudtuk kiváltani, ehhez azonban szükség volt a fehérvérsejtek és a thrombocyták jelenlétére.
7. Trombin generációs vizsgálattal a szepszis 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 szepszis korai hemosztázis eltéréseinek kimutatására a trombin generációs vizsgálatot a rutin alvadási szűrőteszteknel előnyösebbnek találtuk.

8. 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

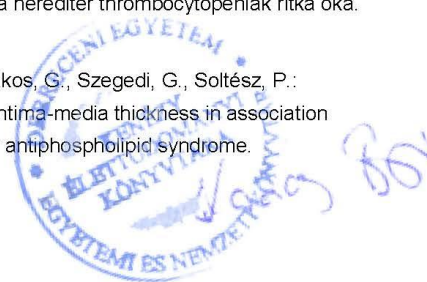
1. **Tóth, J.**, Bekéné Debreceni, I., Deák, Á., Pető, K., Berhes, M., Hajdu, E., Szabó, J., Németh, N., Fülesdi, B., Kappelmayer, J.: Characteristics of thrombin generation in a fulminant porcine sepsis model. *Thromb. Res.* 158, 25-34, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2017.07.030>
IF: 2.65 (2016)
2. **Tóth, J.**, Bekéné Debreceni, I., Berhes, M., Hajdu, E., Deák, Á., Pető, K., Szabó, J., Németh, N., Fülesdi, 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 hereditár trombocytopeniák 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 tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2017.12.13.

