

OTKA zárójelentés

A thoracalis epidurális analgészia és a szisztémás fájdalomcsillapítás összehasonlítása akut nekrotizáló pancreatitisben

Bevezetés

Az akut pancreatitis (AP) a hasnyálmirigy hirtelen kialakuló, nemritkán igen súlyos gyulladása. Az évente észlelt új esetek száma 15-60 fő, százezer lakosra számítva, ezzel a sürgősségi ellátást igénylő gasztroenterológiai betegségek egyik leggyakoribb képviselője. A betegek 20 %-ában súlyos, nekrotizáló AP jön létre, amely mortalitása akár a 25-40 %-ot is elérheti. A kórkép kialakulásának mechanizmusa még sok tekintetben nem tisztázott.^{1,2}

Az AP pathogenesisre több tényezőre vezethető vissza. A leggyakoribb okok közé az alkoholfogyasztás és az epekövesség tartozik. Ritkábban genetikai mutációk, magas vérszírészlet, magas szérumszint kalcium szint, gyógyszerek, toxinok, fertőzések, hasnyálmirigy rák, autoimmun betegségek, hasi trauma okozhatnak AP-t.³

Az heveny hasnyálmirigy gyulladás igen erős fájdalommal jár, amelynek csillapítása a mai napig nagy kihívást jelent a klinikusok számára. A klinikai gyakorlatban, az AP esetén alkalmazott fájdalomcsillapításról a mai napig nincsenek evidenciák. A betegellátás során első lépésként nem-szteroid gyulladáscsökkentőket (NSAID) alkalmaznak fájdalomcsillapítóként, amelyek az esetek nagy részében nem elégségesek a szükséges fájdalomcsillapítás eléréséhez. A következő lépésben különböző ópiát jellegű vegyületek (morfin, pethidin, nalbuphin, stb.) alkalmazása szisztémásan, azonban a mai napig vitatott kérdés a morfin felhasználása, az Oddi-sphincter összehúzó hatása miatt. Ha az ópiátok szisztémás (véna, intramuszkuláris, subcután, transzdermális) alkalmazása sem elegendő, epidurális anesztézia a következő választandó fájdalomcsillapító módszer. Epidurális anesztézia során a hasnyálmirigynek megfelelő gerincvelői szegmentumig helyeznek le a klinikusok epidurális katétert. A fájdalomcsillapítás gyógyszerei ez esetben ópiát vegyületek, valamint gyors feszültségfüggő nátrium csatorna blokkolók (pl. lidokain). Experimentális vizsgálatok leírták patkányban az epidurális anesztézia jótékony hatását a gyulladás, valamint a szisztémás szövődmények kimenetelére.^{4,5,6}

Az ópiátok hatása rendkívül szerteágazó, hatásukat ópiát receptorokon fejtik ki (1. ábra). Feltételezéseink szerint több ponton hathatnak az AP lefolyására, amelyek közül néhány jótékony, némely káros hatású lehet:

Pozitív hatások:

1. Vasodilatációt okoznak gyulladás alatt, így javítják a nekrotizáló pancreas szövet vérkeringését
2. Analgetikus hatásuk miatt negatív visszacsatolással a gyulladás mértékét is csökkentik

Negatív hatások:

1. Paralitikus ileust okoznak, ami a bélbaktériumok túlszaporodását és transzlokációját idézheti elő a véráramba, így fokozzák a septicus szövődeményeket

2. Oddi-sphincter kontrakciót okoznak, azonban patkányokban nincs Oddi-sphincter így ezen hatást kizárhattuk

Az ópiátoknál ismert a mirigyek szekréció gátló hatása, a hasnyálmirigy esetén az acinusokra kifejtett gátló hatás jótékony hatású állatmodellekben (pl. octreotid alkalmazása)⁷, azonban a ductuszokra kifejtett gátló hatás káros lehet a csökkent bikarbonát és folyadékszékreció miatt.⁸ Az acináris/duktális szekrécióra kifejtett hatásokra nem térünk ki vizsgálataink során.

Ópiátok	Lokalizáció	Hatás
μ	agy gerincvelő perifériás neuron gasztrointesztinális traktus	fájdalomcsillapítás függőség légzésdepresszió eufória csökkent GI motilitás vazodilatació
κ	agy gerincvelő perifériás neuron	fájdalomcsillapítás szedáció
δ	agy perifériás neuron	fájdalomcsillapítás függőség

• **morfin**: perifériás, spinális, supraspinális μ agonista

• **buprenorfin**: parciális μ agonista, κ antagonist

Az ópiátok feltételezett hatásai

AP-ben:

Pro: fájdalomcsillapítása

Kontra: paralitikus ileus

Pro/Kontra: csökkent hasnyálmirigy szekréció

Kontra: Oddi sphincter spazmus (buprenorfin esetén elhanyagolható)

Pro: vazodilatació

1. ábra. Ópiát receptorok lokalizációja és hatása.

Célkitűzés

Jelen kísérleteink során célul tűztük ki, hogy összehasonlítsuk a szisztémás, valamint az epidurális anesztéziát experimentális AP során patkányban.

Anyagok és módszerek

Alkalmazott hasnyálmirigy-gyulladás modell

Kísérleteink során SPRD patkányokon dolgoztunk, amely során experimentális AP-t váltottunk ki. Modellünkben 3 g/kg L-ornitint adagoltunk az állatoknak intraperitoneálisan (ip.), a feláldozás 24 óra elteltével történt pentobarbitál anesztéziában.⁹ Vért gyűjtöttünk kardiális punkcióval, amelyből centrifugálás után szérumot nyertünk, amiből laboratóriumi paramétereket mértünk. A feláldozás után eltávolítottuk az állatok hasnyálmirigyeit, amelyeket -80 °C-ra fagyasztottunk le, és különböző metodikák alapján homogenizáltunk biokémiai és molekuláris biológiai vizsgálatokhoz.

Fájdalomcsillapítás

Morfint, valamint buprenorfint használtunk az AP fájdalomcsillapítására. Az ópiát vegyületeket különböző dózisban adagoltuk az állatoknak ip., valamint intratekálisan (it.). Az it. adagolási módot az epidurális fájdalomcsillapítás helyett használtuk, amely technikailag könnyebben kivitelezhető volt, azonban a hatás helye megegyező az epidurális adagolásával.

Acut pancreatitis súlyosságának szövettani, valamint biokémiai jellemzése

6 %-os formalinba ágyazott hasnyálmirigy mintákból hematoxilin-eozin festett metszeteket készítettünk, majd ezeket patológus segítségével kiértékeljük. A szövettani mintákat ödéma (0-5), leukocitás infiltráció (0-5), valamint sejtkárosodás (%) szerint értékeltük. A vérből centrifugálással szérumot nyertünk, majd ebből amiláz aktivitást mértünk. A hasnyálmirigy mintákat homogenizáltuk, majd mieloperoxidáz enzim aktivitást mértünk belőle. A fagyasztott hasnyálmirigy mintákból szárítással víztartalmat határoztunk meg.

Fájdalom vizsgálata

Az állatoknak 2 %-os ecetsavat injektáltunk ip., majd különböző időintervallumokban mértük a kialakuló izomösszehúzódnások számát.

Bélmotilitás vizsgálata

Gyomorszondán keresztül a patkányoknak metilvörös festéket adagoltunk, majd különböző időpontokban feláldoztuk az állatokat, így mértük a vékonybél tranzitidejét. Metilvörös festék adagolásával mértük a teljes gasztrointesztinális tranzit időt is.

Vérkeringés vizsgálata

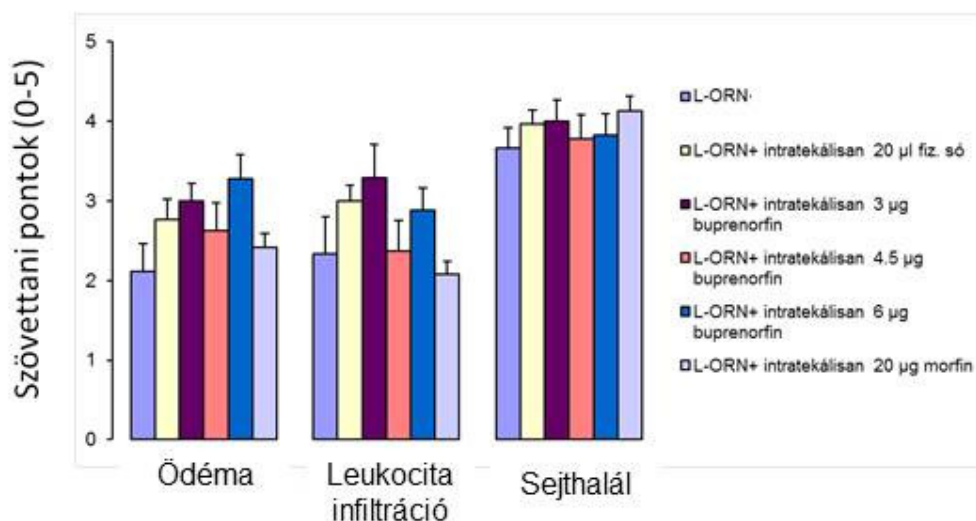
Altatásban kiperaráltuk az állatok felső mesenterialis artériáját, majd Doppler-ultrahangos áramlásmérő fejjel mértük a véráramlási sebességet.

Eredmények

Laboratóriumi vizsgálatok:

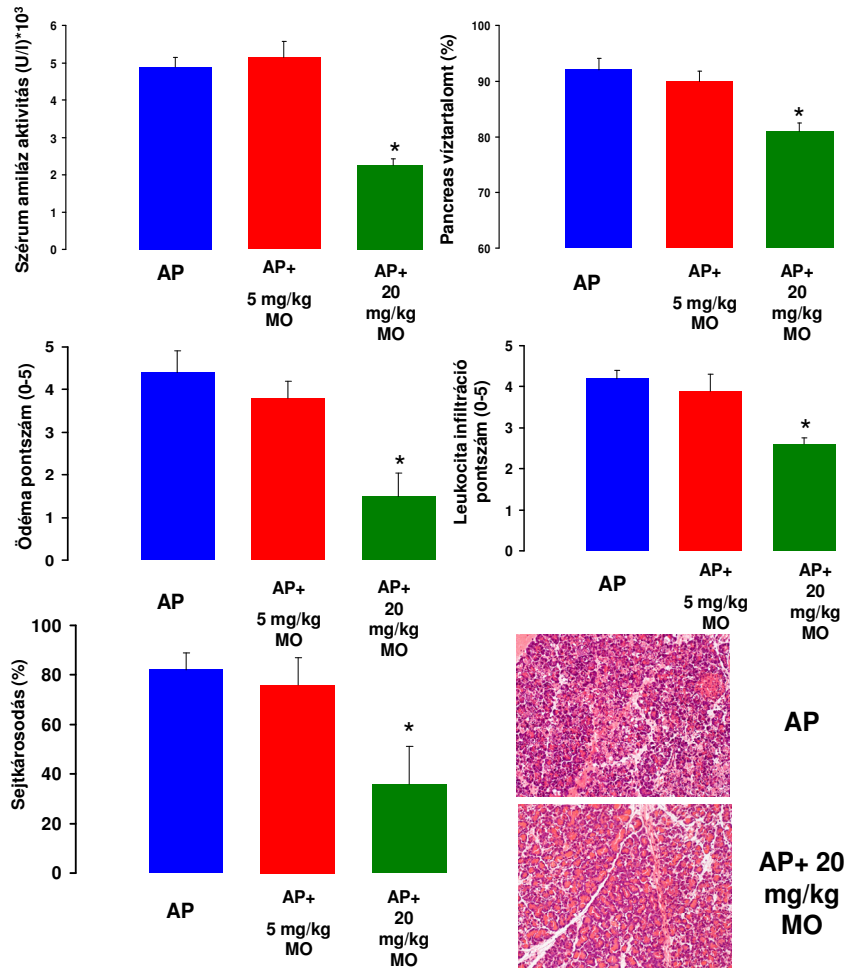
Első lépésben az ópiátok hatásának idejét, valamint effektív dózisát, vizsgáltuk patkányokban (dózis-idő) vizsgálat, writhing-teszt segítségével. A patkányoknak 2 %-os ecetsavat adtunk ip., majd a hashártya izgalom miatt kialakuló kontrakciókat számoltuk meg fél órás időintervallum alatt. A kontroll (fájdalomcsillapítás nélküli) csoportban jelentős számú (>30) kontrakciót sikerült detektálnunk, míg a fájdalomcsillapított csoportban nem voltak kontrakciók, illetve szignifikánsan kevesebb volt (elvéve 1-1), mint a kontroll csoportban. Ezen vizsgálataink alapján azt kaptuk, hogy a perifériásan (ip.) adott morfin 10-20 mg/kg-os dózisa kb. 4-6 órán keresztül védi ki a fájdalmat, míg a buprenorfin 0.5 mg/kg-os dózisa 8-12 órán keresztül hatásos. További kísérleteink során ezen időtartamokat vettük alapul a szükséges fájdalomcsillapítás eléréséhez. (nem ábrázoltuk)

Következő kísérletsorozatunkban megvizsgáltuk, hogy milyen hatással vannak a különböző adagolási módok, valamint dózisos alkalmazása experimentális AP-ben. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy az it. adagolt morfin/buprenorfin nincs hatással a kialakuló AP súlyosságára a szövettani elemzés alapján (2. ábra). Ezért a továbbiakban ezen alkalmazási módot nem vizsgáltuk.

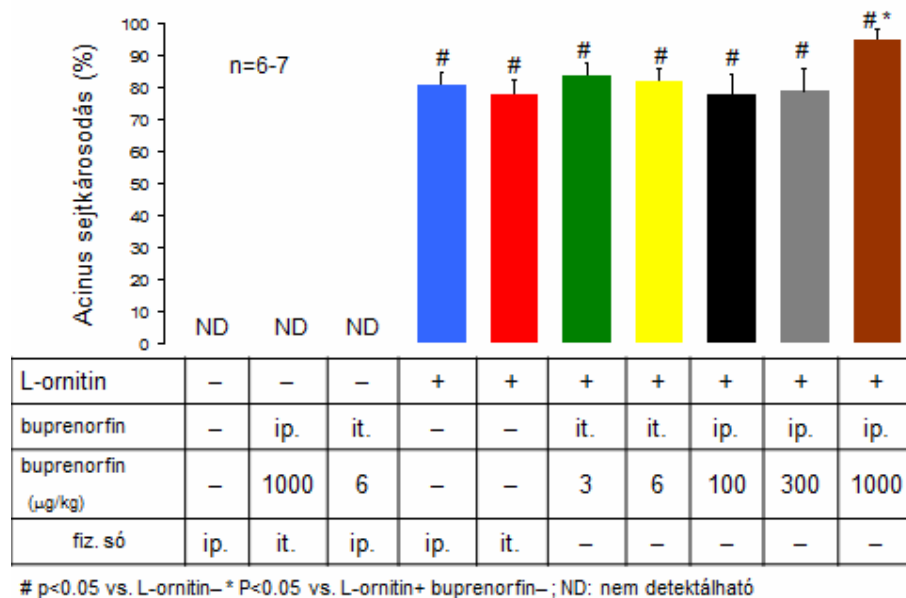


2. ábra Különböző szövettani paramétereket (ödéma, leukocita infiltráció, sejthalál) vizsgáltunk 3 g/kg L-ornitinnel kiváltott akut nekrotizáló hasnyálmirigy-gyulladásban patkányban. A fájdalomcsillapító ópiátok intratekálisan különböző dózisban történt; morfin 4 óránként adagolva, buprenorfin óránként adagolva. Nem találtunk szignifikáns különbséget az intratekálisan ópiátokkal kezelt AP-es állatok és a fájdalomcsillapítás nélküli AP-es állatok pontértékei között. n=7-8

Következő lépésben megvizsgáltuk a szisztémásan (ip.) adagolt morfin/buprenorfin hatásait. Ezen kísérleteink során azt találtuk, hogy a szisztémásan adagolt morfin dózis-függően javított az AP kimenetelén (3. ábra), míg a szisztémásan adagolt buprenorfin dózis-függően rontott rajta (4. ábra).



3. ábra A szisztémásan 4 óránként adagolt morfin dózis-függően javította az L-ornitin-indukálta heveny hasnyálmirigy-gyulladás súlyosságát a szövettani és biokémiai paraméterek alapján. * $p < 0.05$, $n = 7-8$.



4. ábra Az intratekálisan, 12 óránként adagolt buprenorfin nem befolyásolja a sejtelhalás mértékét heveny nekrotizáló pancreatitisben, míg a szisztémásan, 12 óránként adagolt buprenorfin dózis-függően rontotta a heveny hasnyálmirigy-gyulladás súlyosságát szövettani, valamint biokémiai paraméterek alapján patkányban, L-ornitin-indukálta acut pancreatitisben.

Következő lépésben a szisztémásan adagolt ópiátok keringésre kifejtett hatását vizsgáltuk meg Doppler ultrahanggal. Több kísérlet alapján kijelentettük, hogy a perifériásan adagolt 5 mg/kg morfin nem befolyásolta szignifikánsan a szisztémás, valamint a lokális, gasztrointesztinális keringési viszonyokat. Következő lépésben szeretnénk volna megvizsgálni az epidurális adagolt morfin hatását, azonban az epidurális tér kipreparálása, lokalizációja (a humán viszonyokkal ellentétben) technikailag rendkívül komplikált volt, ezért áttértünk az it. adagolási módra. Ezen esetben az állatok a spinális térbe kapták az adott gyógyszereket. Az it. ópiátokkal kezelt állatokban nem végeztük el a kísérleteket, mivel az adagolási mód nem befolyásolta az AP szövettani, valamint biokémiai paramétereit. (nincs ábrázolva)

Ezután megvizsgáltuk az ópiátok paralitikus ileust okozó hatását. Szisztémás adagolás mellett az irodalomban jól ismert eredményeket kaptuk, miszerint mind a morfin, mind a buprenorfin jelentős paralitikus ileust okozott. (nincs ábrázolva) Ezek alapján valószínűleg nem az ópiátok vérkeringést, vagy bélmotilitást befolyásoló hatása áll az AP-t enyhítő/súlyosbító tulajdonsága mögött.

A hasnyálmirigy gyulladás fájdalomcsillapításáról nagyon kevés adattal rendelkezünk, mind humán, mind kísérletes vonatkozásban. Munkánk során elsősorban patkányokkal dolgoztunk, azonban szeretnénk volna a fájdalomcsillapítás hatását egereken is vizsgálni. Az egerek vizsgálata főként azért jó választás, mert lehetőség nyílik különböző knock-out törzseken vizsgálni a fájdalomcsillapítás hatását (pl. TRPV1 KO egereken). Ehhez azonban szükséges volt beállítani egy könnyen kivitelezhető, valamint reprodukálható, súlyos AP modellt. Dawra és munkatársai 2007-ban közölték, hogy 2x4 g/kg L-arginin ip. adagolva AP-t vált ki egérben, azonban a cikkben közölt paraméterekkel nagyon enyhe gyulladást kaptunk, vagy csak nagyon nagy mortalitással sikerült pancreatitist kiváltani. Vizsgálataink szerint az L-arginin-indukálta AP modell az egerekben dózis-, koncentráció-, valamint törzs-függést mutat. Ezen munkákból egy originális valamint egy review közlemény is született.^{10,11}

Klinikai vizsgálatok:

Klinikai vizsgálataink során súlyos AP-es betegeket gyűjtöttünk, valamint randomizáltunk. A vizsgálat végrehajtását azonban gátolta, hogy az OTKA pályázat időtartama alatt csak 10 alatti súlyos nekrotizáló pancreatitiszes beteget sikerült bevonni a vizsgálatba, amely szám nem volt elegendő különböző csoportok kialakításához, valamint az áramlás mérése sok esetben nem volt kivitelezhető. Különböző tanulmányok keretében azonban a jövőben szeretnénk ezen vizsgálatokat is végrehajtani, hogyha elegendő számú beteg gyűlik össze.

Összefoglalás

Kijelenthetjük, hogy az AP igen súlyos, nemritkán életveszélyes megbetegedés. A komoly fájdalmat mindenképpen csillapítani kell és erre az ópiát természetű gyógyszerek kiválóan alkalmasak. Állatkísérletekben is adagolásuk mellett nem találtunk az AP kimenetelét illetően védő hatást patkányban, azonban szisztémás adagolás mellett a morfin, amely egy μ receptor agonista, dózis-függően javított az AP biokémiai, valamint szövettani paraméterein. A buprenorfin, amely részleges agonistája a μ receptornak és a κ ópiát receptoroknak, valamint antagonistája a δ receptornak dózis függően rontotta az AP szövettani, valamint biokémiai paramétereit. Ezen adatokból azt a következtetést vontuk le, hogy az ópiát receptorok igen fontos szerepet játszanak az AP pathogenesisében. Az ópiát receptorok aktivációja valószínűsíthetően védő hatással bír az AP-szel szemben, míg gátlásuk valószínűleg rontja azt. Az ópiát receptorok konkrét szerepe további vizsgálatokat igényel, de a védő/súlyosbító hatást a morfin/buprenorfin esetében valószínűsíthetően nem a vérkeringésre, vagy a gasztrointesztinális tranzitra kifejtett hatásuk okozza.

Referenciák

1. Pandol SJ et al. Acute pancreatitis: bench to the bedside. *Gastroenterology* 2007;132:1127-51.
2. Hegyi P et al. The acinar-ductal tango in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Gut* 2011;60:544–552.
3. Banks PA et al. Classification of acute pancreatitis-2012: Revision of the Atlanta classifications and definitions by international consensus. *Gut* 2013;62:102-111.
4. Freise H et al. Hepatic effects of thoracic epidural analgesia in experimental severe acute pancreatitis. *Anesthesiology*. 2009;111:1249-56.
5. Freise H et al. Thoracic epidural analgesia augments ileal mucosal capillary perfusion and improves survival in severe acute pancreatitis in rats. *Anesthesiology*. 2006;105:354-9.
6. Lauer S et al. The role of thoracic epidural analgesia in receptor-dependent and receptor-independent pulmonary vasoconstriction in experimental pancreatitis. *Anesth Analg*. 2007;105:453-9.
7. Li J et al. Somatostatin and octreotide on the treatment of acute pancreatitis - basic and clinical studies for three decades. *Curr Pharm Des*. 2011;17:1594-601.
8. Pallagi P et al. The role of pancreatic ductal secretion in protection against acute pancreatitis in mice. *Crit Care Med*. 2014;42:e177-88.
9. Rakonczay Z et al. A new severe acute necrotizing pancreatitis model induced by L-ornithine in rats. *Crit Care Med*. 2008;36:2117-27.
10. Kui B et al. Recent advances in the investigation of pancreatic inflammation induced by large doses of basic amino acids in rodents. *Lab Invest*. 2014;94:138-49.
11. Kui B et al. New insights into the methodology of L-arginine-induced acute pancreatitis. *PLoS One*. 2015;17:10:e0117588.