

Zárójelentés

„A leukocita és trombocita funkció változások prediktív értékének vizsgálata intenzív betegellátást igénylő kórképekben”

című, K060227 számú OTKA pályázatról

A pályázati munkatervnek megfelelően munkánk során elsősorban a Pécsi Tudományegyetem Anaesthesiológiai és Intenzív Therápiás Intézetével, továbbá a Baranya Megyei Kórház Sebészeti Tanszékével és a Zala Megyei Kórház Szívsebészeti Osztályával együttműködve vizsgáltuk a leukocita és trombocita funkció változásokat intenzív ellátást igénylő betegekben. Célul tűztük ki olyan ismeretek megszerzését a szervezet szisztémás gyulladásos válaszreakcióját meghatározó mechanizmusokról, melyek kórjelző értékkel bírhatnak, alkalmasak lehetnek a terápiás beavatkozások hatásosságának megítélésére, és hozzájárulhatnak újabb terápiás lehetőségek kimunkálásához.

Vizsgálataink eredményei betegcsoportok szerint

1. A kardiopulmonáris bypass hatásának vizsgálata a keringő citokinek szintjére és a szívizom citokin termelésére

A vizsgálat során a hagyományos kardiopulmonáris bypass (CPB) és a pumpa nélkül végzett (off-pump, OP) koszorúérműtétet követően kialakuló gyulladásos válaszreakciót hasonlítottuk össze 20 CPB és 10 OP műtéten átesett betegben. Vérmintákat vettünk a műtét alatt a sinus coronariusból és a perifériás vénából, valamint a posztoperatív 1-3. és 7. napon a perifériás vénából. Mikrogyöngyös áramlási citometriás módszerrel mértük az IL-1b, 6, 8, 12, és TNF- α proinflammatorikus valamint az IL-10 antiinflammatorikus citokinek mennyiségét és arányát. A pro- és antiinflammatorikus citokinek aránya a CPB-t követően közvetlenül csökkent, amit jelentős és elhúzódó emelkedés követett. OP műtét után a gyulladásos válasz jóval kisebb mértékű volt. A citokinek szintje a sinus coronariusban csak CPB során haladta meg a szisztémásan mért értéket. Vizsgálataink igazolták, hogy a CPB műtét nagyobb mértékben terheli a szívizmot, melyet annak jelentősebb proinflammatorikus citokin termelése is jelez. (*Clin Cardiol* 2006; 29: 311-315. IF: 0,989)

2. A pulmonális embólia (PE) trombolitikus kezelését kísérő oxidatív stressz és sejtaktiváció vizsgálata

A pályázat keretében munkatervünknek megfelelően vizsgáltuk az oxidatív stressz, sejtaktiváció és a hemosztázis paraméterek változását életveszélyes tüdőembólia ultra-high dózisú streptase (SK), és alteplase (tPA) kezelését követően. E pályázat vezető kutatójának témavezetése mellett dr. Mühl Diana sikeresen megvédte e témában írt PhD értekezését.

a./ Oxidatív stressz és a leukocita aktiváció vizsgálata

Akut pulmonális embóliás betegekből vérmintákat vettünk a trombolízis előtt, majd a kezelést követően 8 óra, 1, 3, 5 és 30 nap múlva. Oxidatív stressz markerként mértük a malondialdehid (MDA), redukált glutation (GSH), plazma SH csoport (PSH) szintet, valamint a szuperoxid dizmutáz (SOD), mieloperoxidáz enzim (MPO) aktivitást, továbbá a teljes vér indukált gyöktermelését (ROS). A fehérvérsejtek felszíni CD11a, CD18, és CD97 kifejeződéséből a leukocita aktiválódás és kitapadás mértékére következtettünk. Az

emelkedett MDA, ROS és MPO, a csökkent GSH és PSH szintek jelezték a PE indukálta oxidatív stresszt, mely a trombolízist követően tovább fokozódott (MDA, ROS tartósan és szignifikánsan emelkedett, a GSH szignifikánsan csökkent). A trombolízist követő kóros leukocita endotél sejt egymásra hatást a granulocita és monocita CD11a, CD18, valamint CD97 kifejeződés átmeneti, de szignifikáns csökkenése jelezte. A PE trombolízisét követően az oxidatív stresszt és a leukocita aktivációt jelző paraméterek csak a 30. napra normalizálódtak. (*Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 2006; 22; 221-8. IF: 1,155; *Orvosi Hetilap* 2008; 149: 935-948.)

b./ Trombocita funkció változások vizsgálata

A masszív tüdőembólia trombolitikus kezelésének komplikációjaként vérzés vagy re-embólia jöhet létre, mely indokolja a trombocita funkció és a fibrinogén szint alakulásának követését. A vizsgált betegcsoportokban e téren tett megállapítások az alábbiak: 1. A PE kialakulásában kórokként szerepelő vagy a korai reembóliát magyarázó spontán trombocita aggregáció nem volt igazolható a masszív/szubmasszív PE-ás betegek körében. 2. Az indukálható trombocita aggregáció mindkét terápiás csoportban a normál értéknél alacsonyabb volt a TL előtt, majd azt követően tovább csökkent. Eredményeink azt mutatják, hogy maga a masszív/szubmasszív PE és az alkalmazott trombolitikus terápiás eljárások károsítják a trombocita funkciókat. 3. A szakirodalomban részletezett vérzéses szövödmények és a trombocita aggregáció csökkenése között nem találtunk összefüggést, a betegeknél hemodinamikai jelentőséggel járó vérzést nem észleltünk. 4. Az irodalom által taglalt SK és tPA által kiváltott jelentős trombocita aggregáció fokozódás egy esetben sem lépett fel, ezért a re-embólia és a trombocita aggregáció fokozódása között nem tartjuk valószínűnek az összefüggést. Vizsgálatunkban egyetlen betegnél sem lépett fel re-embólia. 5. A PE reperfüziója során a fibrinogén szint csökkenése szignifikáns negatív korrelációt mutat tüdőperfúzió javulásával, ezek alapján a fibrinogén szint változása jól alkalmazható marker a TL eredményességének akut felmérésére. (*Blood Coagul Fibrin* 2007; 18(7): 661-667. IF: 1,373; *Orvosi Hetilap* 2008; 149: 935-948.)

c./ Matrix metalloproteinázok és azok inhibitorainak vizsgálata

E vizsgálatokból származó plazma mintákból brazil partnerekkel együttműködve vizsgáltuk a matrix metalloproteinázok és azok inhibitorainak változását is. Korábbi tanulmányok igazolták, hogy a matrix metalloproteinázok (MMP) szerepet játszanak a PE patomechanizmusában, valamint a fibrinolitikus terápiát kísérő MMP emelkedés hozzájárul a vérzéses szövödmények kialakulásához. Mindez ideig azonban nem ismeretesek az akut PE trombolitikus kezelését követő MMP változásokra vonatkozó adatok. Munkánk során ezért célul tűztük ki a matrix metalloproteinázok (MMP-2 és MMP-9), valamint endogén inhibitoraik (TIMP-1 és TIMP-2) változásának vizsgálatát streptase és alteplase kezelt akut PE betegekben. Eredményeink szerint a trombolitikus terápiát követő első napon megemelkedett a pro-MMP-9 szintje, mely a kezelést követő 3-5. napra normalizálódott, de az MMP-2, TIMP-1 és TIMP-2 koncentrációban nem jött létre szignifikáns változás. Eredményeink alátámasztják azt a feltételezést, hogy az emelkedett MMP-9 szint hozzájárulhat a trombolitikus kezelést követő intrakraniális vérzés, és más vérzéses komplikációk kialakulásához. (*Thrombosis Research*, 2010; (Közlésre elfogadva) IF: 2.449)

3. Alsó végtagi revaszkularizációs műtétek során végzett vizsgálatok

A Baranya Megyei Kórház Sebészeti Tanszékével való együttműködésben - e pályázatban még nem szerepeltetve, de célkitűzésével teljesen egyező módon - vizsgálatokat folytattunk 10 alsó végtagi akut revaszkularizációs műtéten átesett betegen. A trombocita

funkcióban és az oxidatív stressz markereiben mért változások jelezték a revaszkularizációs műtétet követő jelentős reperfúziós károsodást, és felhívták a figyelmet ezek monitorozásának fontosságára, mely hozzájárulhat a betegek hatékonyabb kezelésének kidolgozásához, a trombózis rizikó csökkentéséhez. A fenti akut műtetre szoruló betegek vizsgálatának eredményeit elektív revaszkularizációs műtetre előjegyzett perifériás artériás érbetegek (n=10) adataival is összehasonlítottuk. Megállapítottuk, hogy az ischemia időtartamával arányos az antioxidáns kapacitás csökkenésének, valamint a szabadgyök termelés és lipid peroxidáció fokozódásának a mértéke. A betegcsoportokban az ADP és kollagén indukálta aggregáció az izolált trombocita dús plazmában a kontroll csoportéhoz képest alacsonyabb volt, mely megfelelő aggregáció gátló terápiát jelzett, azonban a teljes vérben mért aggregáció szignifikánsan nőtt az akut csoportban a műtétet követően egy héttel. Feltételezésünk szerint ebben a jelenségben a vér más alakos elemeinek trombocita aggregációt befolyásoló hatása játszhat szerepet. A trombocita funkció alakulását, a pro- és antioxidáns rendszer egyensúlyának jelentős változása is befolyásolja, így e paraméterek monitorozása hozzájárulhat a betegek hatékonyabb kezelésének kidolgozásához, a trombózis rizikó csökkentéséhez. (*Perfusion* 2007; 20: 187-194.; *Clin Hemorheol Microcirc.* 2008; 39: 79-85. *IF: 1,814*)

4. Égett betegeken végzett vizsgálatok

A pályázati periódus alatt vizsgálatunkba 40 súlyos égési traumát szenvedett beteget vontunk be. Eredményeink megerősítették, hogy az égési traumát jelentős oxidatív stressz és leukocita aktiváció kíséri. A kiterjedtebb égést ugyan fokozottabb leukocitózis, nagyobb mértékű oxidatív stressz kísérte, azonban a 25 % alatti, illetve a 30 % feletti égett testfelület közötti változások nem mutattak szignifikáns különbséget, tehát az égési trauma kiváltotta reakciók mértékét egy küszöbértéken túl az égett testfelület nagysága már nem befolyásolta jelentősen.

E pályázat vezető kutatójának témavezetése mellett dr. Csontos Csaba sikeresen megvédte e témában írt PhD értekezését.

Az égett betegek vizsgálatával az alábbi részkérdésekre kerestünk választ.

a. Folyadékterápia hatása az égési trauma kiváltotta oxidatív stresszre

Célunk a súlyos égési traumát szenvedett betegek kezelésére leggyakrabban alkalmazott folyadékpótlási módszerek hatásának vizsgálata volt összefüggésben a szervezet oxidatív stressz válaszával. 8-8 beteget bevonva a vizsgálatba a folyadékterápiát az óradiurézis, vagy az intratorakális vérvolumen index alapján vezettük. Eredményeink azt jelezték, hogy az általunk alkalmazott két folyadékpótlási forma eltérő hatással bír a szervezet prooxidáns állapotára és a granulociták funkciójára, de nem befolyásolja jelentősen a szervezet endogén antioxidánsainak szintjét. (*Journal of Burn Care & Research* 2009; 30: 957-966. *IF: 1.513*; *Orvosi Hetilap* 2009; 150: 629-639.)

b. A citokin-egyensúly alakulása égési sérültekben

Az égési trauma megemeli a citokinek szintjét, azonban kevés adat áll rendelkezésre e folyamatok időbeni változásáról. Vizsgálatainkban a pro- és anti-inflammatorikus citokinek időbeli változásának dinamikáját 26 égett beteg plazmájában monitoroztuk mikrogyöngyös áramlási citometriás technikával. Az IL-6 és IL-8 a 2. naptól emelkedett meg jelentősen, maximumát a 4. napon érte el. Az IL-10 felvételkor volt a legmagasabb, majd fokozatosan csökkent. A felvételkor mért adatok ROC analízise 14 pg/ml-es IL-10 koncentrációnál 85,4 %-os szenzitivitással és 84,2 %-os specificitással jelezte a halálozást, így prognosztikus értékkel bír. A pro- és anti-inflammatorikus arány a sérülés utáni harmadik napig magasabb

volt a túlélőkben, majd fokozatosan csökkent, mialatt a később elhunytakban ennek az aránynak további folyamatos emelkedését észleltük. A traumát közvetlenül követő anti-inflammatorikus túlsúly kedvezőtlen a betegek későbbi gyógyulási kilátásait illetően. (*Burns* 2010; 36: xxx–xxx, 2009 Dec 30. [Epub ahead of print] IF: 1.605)

c. A high mobility group box protein 1 (HMGB1) szint változása égési traumát követően

A HMGB1 a sejtmagban található protein, mely gyulladásos mediátorok hatására a monocitákból és makrofágokból aktívan, a sérült vagy elhalt sejtekből passzívan szabadul fel, és maga is citokinként viselkedik. Kísérletes adatok szerint égési trauma hatására a plazma HMGB1 szint megemelkedik, azonban változásának dinamikájáról égett betegekben nincs még adat. 26 beteg plazmájában ELISA technikával meghatározva magas HMGB1 koncentrációt mértünk a kórházi felvételkor, mely a kezelés során fokozatosan csökkent. A felvételkor mért érték a később elhunytakban ($26,9 \pm 5,4$ ng/ml) szignifikánsan meghaladta a túlélők szintjét ($7,9 \pm 1,9$ ng/ml). ROC analízis 16 ng/ml-es koncentrációnál 75,0 %-os szenzitivitással és 83,3 %-os specificitással jelezte a halálozást, így a felvételkor mért HMGB1 érték prognosztikus értékkel bír. A HMGB1 szint égési traumát követő nagyon korai megemelkedése jelentős befolyásolja a traumát szenvedett betegek immunfunkcióját. (*Shock* 2010; 33: xxx–xxx, 2009 Dec 7. [Epub ahead of print] IF: 3.394)

d. Folyadékterápia hatása a citokin-egyensúly és adhéziós molekula expresszió változásra égési traumát követően

Célunk az óradiurézis (HUO, n=15) és az intratorakális vérvolumen index (ITBVI, n=15) alapján vezetett folyadékterápia összehasonlítása volt a citokin-egyensúly és leukocita sejtfelszíni markerek változása alapján. Eredményeink szerint az ITBVI csoportban az IL-6 szint, az IL-6/IL-10 arány a traumát követő 2-3. napon, míg az IL-8/IL-10 arány a 3-5. napon szignifikánsan magasabb volt a HUO csoporthoz képest. Ugyanakkor a HUO csoportban az IL-10 szint volt szignifikánsan magasabb a 4-5. napon. A sejtfelszíni markerek közül a granulocita CD11a szint a 2., a CD11b szint a 4-6., a limfocita CD11a az 5-6., a CD11b a 3-6., a CD49d a 2-6., a CD97 a 6., és a monocita CD11a, CD11b, CD18 szintek a 4-6., a CD14 szint a 3-5. napokon volt szignifikánsan magasabb a HUO csoportban. Eredményeink arra utalnak, hogy az égett betegek korai folyadék reszuscitációja a hagyományos folyadékterápiával szemben tompítja a szervezet anti-inflammatorikus válaszreakcióját és a leukocita sejtfelszíni markerek expresszióját. (*Journal of Burn Care and Research (közlésre elfogadva)* IF: 1.513)

e. N-acetilcisztein (NAC) kezelés hatása az égési trauma kiváltotta oxidatív stresszre

Az égési trauma jelentős oxidatív stresszt vált ki a szervezetben, azonban még kevés adat áll rendelkezésre az égették antioxidáns terápiájának hatékonyságáról. Vizsgáltuk ezért a kiegészítő NAC kezelés hatását súlyosan égett betegek oxidatív stressz válaszára. 8-8 beteget bevonva, az első csoportban csak folyadékterápiát alkalmaztunk, amit a második csoportban NAC kezeléssel egészítettünk ki. A NAC kezelés kifejezetten megemelte a plazma szulfhidril csoportok szintjét, és a glutation szint is hamarabb normalizálódott. A szuperoxid dizmutáz és kataláz enzimek aktivitásának alakulását a NAC kezelés nem befolyásolta. Az n-acetilciszteinnel kezelt csoportban magasabb volt a betegek túlélése a kezeletlen csoporthoz viszonyítva (63 % vs. 37 %), azonban ez a különbség statisztikailag nem volt szignifikáns. Eredményeink szerint az égett betegek kiegészítő NAC kezelése megemeli a szervezet endogén, nem enzimikus antioxidáns szintjét, de nem csökkenti a prooxidáns paramétereket, különösen nem a fehérvérsejtek aktiválódását. (*Érbetegségek* 2009; 14: 35-44.)

5. Az oxidatív stressz vizsgálata súlyos szeptikus betegekben

Munkánk célja a műtéti traumát követően súlyos szepszisben szenvedő betegek oxidatív stressz státuszának vizsgálata volt. Választ kerestünk arra, hogy az oxidatív stressz markerek alkalmasak-e a szepszis progressziójának előre jelzésére, használhatóak-e a mortalitás jelzésére. 14 súlyos szeptikus beteget vizsgálva a prooxidáns markerek emelkedett, az endogén antioxidánsok csökkent szintje egyértelműen jelezte a tartós oxidatív stressz fennállását. E változások az elhunytak csoportjában még kifejezettebbnek mutatkoztak. A plazma malondialdehid szint szignifikáns pozitív, a teljes vér stimulált gyöktermelésének indukciós ideje szignifikáns negatív korrelációt mutatott a MODS és SOFA score értékekkel, így alkalmasak lehetnek a várható mortalitás jelzésére. *(Közlés alatt)*

Eredményeinkről a pályázati periódus alatt 44 kongresszusi előadásban és 14 megjelent közleményben számoltunk be (IF: 15,805). A pályázatban résztvevő kutatók közül ketten PhD fokozatot szereztek. A kutatás eredményei újabb ismeretekkel szolgáltak a szervezet szisztémás gyulladásos válaszreakciójában meghatározó mechanizmusokról, melyek kórjelző értékkel bírhatnak, alkalmasak lehetnek a terápiás beavatkozások hatásosságának megítélésére, és hozzájárulhatnak újabb terápiás lehetőségek kimunkálásához. Az újabb biomarkerek vizsgálata javíthatja az intenzív ellátást igénylő betegek korai diagnózisát, és ennek következtében hatással lehet e betegek mortalitására és morbiditására.

Pécs, 2010. február 22.



Dr. Lantos János
témavezető