

SZAKMAI ZÁRÓJELENTÉS

Témavezető neve: **Dr. Lantos János**

A téma címe: **Reperfúziót követő mikrocirkulációs változások mechanizmusa: kísérletes és klinikai vizsgálatok.**

OTKA nyilvántartási szám: **T 038035**

A kutatás időtartama: **2002-2005.**

A kutatás célja

A szív és keringési betegségek vezetnek a mortalitási statisztikát hazánkban. A vérellátási zavar következményeként kialakuló sejtkárosodás meghatározott időn belül visszafordítható folyamat, azaz a vérellátást biztosítva a funkció helyreállítható. A reperfúzió paradoxona azonban, hogy az újrainduló keringés nemcsak javítja, hanem a létrejövő mikrocirkulációs zavar és szöveti gyulladás következtében súlyosbítja is a megelőzően kialakult ischémiás károsodást, és e folyamatban az oxidatív stressz és a leukocita-endotél sejt egymásra hatás meghatározó szerepet játszik. A négyéves kutatómunka célja az ischémiareperfúziós károsodás mechanizmusának és kivédési lehetőségének vizsgálata volt állatkísérletekben és klinikai beteganyagban.

A vizsgálatok során elért főbb eredmények összefoglalása

1. Krónikus állatkísérletekben kimutattuk, hogy szívizom ischémiát követően a keringő leukociták szabadgyök termelése és adhéziónak molekula expressziója a reperfúzió késői szakaszában is emelkedett. A monociták tartós adhéziónak molekula expresszió fokozódása e sejteknek az infarktusz gyógyulási szakaszában játszott jelentős szerepére utal.

2. Kimutattuk, hogy a szívizom ischémiás prekondicionálása során az NF- κ B bifázisos, míg az AP-1 monofázisos aktiválódást mutat, és e transzkripciós faktorok időbeli változását a prekondicionáló ischémiás ciklusok száma alig befolyásolja. Az acetilszalicilsav antitrombotikus és analgetikus dózisa nem, de a klinikailag alkalmazható maximális dózis gátolja az ischémiás prekondicionálás kardioprotektív hatását.

3. Kimutattuk, hogy a koronária műtétek következtében kialakuló gyulladáshozos reakciók jelentősen enyhébbek az off-pump módszerrel operált betegekben, mint a szív-tüdő géppel operáltakban, amit az extrakorporális keringés nélküli műtétek során a fehérvérsejtek adhéziónak molekula expressziójának és a gyulladáshozos citokinek mennyiségének jelentős mérséklődése igazol.

4. Kimutattuk, hogy a pulmonális embólia indukálta oxidatív stressz a trombolízis korai időszakában tovább fokozódik, különösen a hatékonyabb rögzoldó alteplase kezelés során. A keringő fehérvérsejtek emelkedett citokin termelése és adhéziónak molekula expresszió változása a pulmonális embólia trombolízisét kísérő gyulladáshozos folyamatok elhúzódását jelzi.

Részletes beszámoló

1. A szívizom ischemia-reperfúziós károsodás mechanizmusának vizsgálata krónikus állatkísérletes modellekben.

A szívizom ischemia és hosszú idejű reperfúzió során létrejövő leukocita funkció változásokat mellkasnyitással járó, illetve zárt mellkas mellett létrehozott kutyamodellen vizsgáltuk. A nyitott mellkasú modellben a szívizom ischemiát a r. desc. anterior (LAD) 1 és 3 órás leszorításával, míg a zárt mellkasú modellben PTCA katéter ballonjának 3 órás felfújásával idéztük elő. Ezt követően a koronária keringést helyreállítva az akut, szubakut és a krónikus túlélési időszakban végeztük vizsgálatainkat. Perifériás vénás vérmintát vettünk a műtétet megelőzően, az ischemiás periódus végén, a reperfúzió 5. és 60. percében, valamint az 1., 2., 3., 7., 14., 21., és 28. posztoperatív napon. Az oxidatív stressz paraméterek (malondialdehid, redukált glutathion, plazma SH csoport szint, kataláz, szuperoxid dizmutáz, mieloperoxidáz enzimaktivitás) és a sejtek aktivációját jelző izolált granulociták gyöktermelésének mérése mellett teljes vérből is meghatároztuk a reaktív oxigén intermedierek termelődését luminol dependens kemilumineszcenciás módszerrel. A kutya leukocitákkal keresztreakciót mutató antihumán monoklonális antitestet használva áramlási citometriával mértük a leukociták CD11a adhézios molekula expresszióját.

Az 1 és 3 órás LAD leszorítást követő 28 napos reperfúzió során nyert eredmények az oxidatív stressz elhúzódását mutatták. Ennek során a keringő granulociták gyöktermelésének maximuma megelőzte az adhézios molekula kifejeződésük maximumát. A granulociták és monociták CD11a expressziója az akut reperfúzió során kismértékben csökkent, majd az első posztoperatív naptól jelentősen megemelkedett. Maximumát a 3. napon érte el, és szintje emelkedett marad a reperfúzió késői időszakában is. Mindez kifejezettebb volt 3 órás ischemiát követően. Mivel a nyitott mellkasú modellben a szívizom ischemia-reperfúziós károsodás által előidézett változásokra a mellkasnyitással járó sebészi trauma is hatással lehet, ezért a további vizsgálatokat zárt mellkasú modellen folytattuk. Ezekben az esetekben a gyöktermelés csak az első posztoperatív naptól kezdett emelkedni, a csúcértékét szintén a második napon érte el. A CD11a expresszió emelkedése a monociták felszínén volt a legnagyobb mértékű a 3. napon, és még a 4 hetes reperfúzió végén is emelkedett szinten maradt. A monociták emelkedett adhézios molekula expressziója a késői reperfúzió során felhívja a figyelmet e sejteknek az infarktus gyógyulási szakaszában játszott jelentős szerepére. Álműtött, azaz megkötérezett, de nem ischemizált állatokon végzett vizsgálatokban a gyöktermelés csak kismértékben változott és a monociták CD11a expresszió emelkedése is csak az első posztoperatív napon volt szignifikáns. Ennek alapján megállapítható, hogy a zárt mellkas mellett előidézett időleges koronária elzárásos modell alkalmas a szívizom ischemia-reperfúzió indukálta leukocita funkció változások nyomon követésére és lehetőséget teremt kardioprotektív szereknek az infarktus gyógyulási szakaszában kifejtett hatásának vizsgálatára. Az állatvédelmi törvény 2004. január 1.-től hatályba lépett módosítása miatt azonban e tervezett vizsgálatokat nem tudtuk elvégezni,

mivel a kísérletekhez szükséges megfelelő méretű kutyákhoz jutást a törvénymódosítás ellehetetlenítette.

A fenti eredményekről 1 könyvfejezetben (Progress In Experimental Cardiology, 2003) és 6 folyóiratban megjelent absztraktban számoltunk be.

2. Az ischemiás prekondicionálás mechanizmusának, valamint az acetilszalicilsavnak a prekondicionálás jelátviteli folyamataira kifejtett hatásának vizsgálata.

A tervezett állatkísérletes vizsgálatokat az állatvédelmi törvény változása miatt módosítottuk és a korcs kutyákon tervezett PTCA modellben vizsgálandó kardioprotekció helyett rátértünk a szívizom ischemia-reperfúzió, az ischemiás prekondicionálás nyulakon végezhető vizsgálatára. A prekondicionálás a szervezet endogén védelmi mechanizmusainak aktiválásával járul hozzá a reperfúziós károsodás csökkentéséhez. A nyulakon végzett kísérletsorozatban megállapítottuk, hogy az ischemiás prekondicionálás során az NF- κ B bifázisos, míg az AP-1 monofázisos aktiválódást mutat, és e transzkripciós faktorok időbeli változását a prekondicionáló ischemiás ciklusok száma alig befolyásolja. Az ischemiás prekondicionálás hatásmechanizmusának további vizsgálata során megállapítottuk, hogy az acetilszalicilsav antitrombotikus (5 mg/kg) és analgetikus (25 mg/kg) dózisa nem, de a klinikailag alkalmazható maximális dózis (130 mg/kg) gátolja az ischemiás prekondicionálás kardioprotektív hatását.

A fenti eredményekről 3 közleményben (Cardiologia Hungarica 2003; Eur. Surg. Res. 2004; J. Cardiovasc. Pharmacol. 2005) és 4 folyóiratban megjelent absztraktban számoltunk be.

3. Hagyományos és pumpa nélkül végzett koronária műtéteket követően kialakuló oxidatív stressz és gyulladásoz válaszreakciók vizsgálata.

A reperfúziós szívizom-károsodás mechanizmusát klinikai beteganyagban is vizsgáltuk, melynek elsődleges célja a hagyományos kardiopulmonáris bypass (CPB) és a pumpa nélkül végzett (off-pump, OP) koszorúérműtéteket követően kialakuló gyulladásoz válaszreakciók összehasonlítása volt. A Zala Megyei Kórház Szívsebészeti Osztályával együttműködésben végzett prospektív, randomizált vizsgálatunk első körébe 10 CPB és 10 OP műtéten átesett beteget vontunk be, akiknél a műtét alatt (az anesztézia után, az ischemiás szakaszban, majd a reperfúzió 5. és 30. percében), illetve a posztoperatív 1-3. és 7. napon perifériás vérmintákat vettünk. A mintákban vizsgáltuk a szívizom károsodását jelző enzimek plazmaszintjét, valamint a gyulladásoz citokinek mennyiségét. A fehérvérsejtek adhéziós molekula expresszióját áramlási citometriával határoztuk meg. A vizsgálatok során a szívizomzat károsodását jelző CK-MB és troponin I nekrotikus enzimek jelentős emelkedését találtuk a CPB csoportban az első posztoperatív napon. A TNF- α és IL-8 proinflammatorikus citokinek plazmaszintjének emelkedése is szignifikánsan nagyobb volt a CPB csoportban az OP csoporttal összehasonlítva. A fehérvérsejtek adhéziós molekula expressziója (CD18, és

különösen a CD11a) ugyancsak fokozódott a hagyományos módszerrel operált betegeknél, szignifikáns eltéréssel a 2. posztoperatív napon. Az off-pump módszerrel operált betegekben a műtét alatt, illetve a műtét után kialakuló gyulladáshoz kapcsolódó reakciók jelentősen enyhébbek voltak, mint a hagyományosan operált betegeknél. Az extrakorporális keringés kiküszöbölésével a fehérvérsejtek adhéziós molekula expressziója, és a gyulladáshoz kapcsolódó citokinek termelése mérséklődik, mely feltehetően javítja a szívizom kapilláris keringését, csökkentve a posztoperatív szövődmények és az elhúzódó hospitalizáció kockázatát.

A koszorúérműtéteket követően kialakuló gyulladáshoz kapcsolódó válaszreakciók biokémiai monitorozását a továbbiakban a Zala Megyei Kórház Szívsebészeti Osztályával és a PTE ÁOK Szívgyógyászati Klinikájával együttműködésben vizsgáltuk. 20 CPB és 10 OP műtéten átesett betegtől a műtét alatt a sinus coronariusból és a perifériás vénából, a posztoperatív 1-3. és 7. napon pedig a perifériás vénából vettünk vérmintákat, melyekből mikrogyöngyös áramlási citometriás módszerrel mértük az IL-1 β , IL-6, IL-8; IL-12, TNF- α proinflammatorikus és az IL-10 antiinflammatorikus citokinek mennyiségét. A pro és antiinflammatorikus citokinek aránya CPB után nagyobb mértékű és elhúzódóbb emelkedést mutatott az OP műtéttel összehasonlítva. A citokinek szintje a sinus coronariusban meghaladta a szisztémásan mért értéket CPB során. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a különböző műtéti megoldások eltérő patológiai folyamatokat indukálnak, és a citokinek koncentrációváltozásának mérése alkalmas a kialakuló gyulladáshoz kapcsolódó folyamatok súlyosságának megítélésére. Ugyanezekből a betegek közül nyert vérmintákból a fehérvérsejtek adhéziós molekula expressziója mellett meghatároztuk a CD97 gyulladáshoz kapcsolódó marker kifejeződését is. A CD11a, CD18 és CD97 expresszió a granulocitákon és a monocitákon szignifikánsan megemelkedett a 2-3. posztoperatív napon a hagyományos módszerrel operált betegeknél. A CD97 markert egészséges körülmények között gyengén expresszáló limfocitákon azonban már az első posztoperatív napon szignifikánsan megemelkedett a CD97 expresszió, ami arra utal, hogy a limfociták erősen aktiválódva szerepet játszanak a CPB indukálta gyulladáshoz kapcsolódó folyamatokban.

A fenti eredményekről 3 közleményben (*Cardiologia Hungarica* 2004; *Exp. Clin. Cardiol.* 2004; *Eur. Surg. Res.* 2005) és 6 folyóiratban megjelent absztraktban számoltunk be.

4. A pulmonális embólia trombolízisét kísérő oxidatív stressz és leukocita aktiváció vizsgálata.

Munkatervünknek megfelelően a PTE ÁOK Anaesthesiológiai és Intenzív Therápiás Intézetével kollaborációban elvégeztük a szisztémás trombolízis oxidatív stresszre, trombocita és leukocita funkció változására kifejtett hatásának vizsgálatát szubtotális pulmonális embóliás betegeknél. Az előre meghatározott bevonási és kizárási kritériumok miatt elhúzódó vizsgálatokba összesen 15 beteget vontunk be, akik közül 8 beteg „ultra-high” dózisu streptokinase (UHSK), 7 beteg alteplase (tPA) kezelésben részesült. Perifériás vénás vérmintákat vettünk a trombolízist megelőzően, a lízis 8. órájában, majd a beavatkozást követő 1., 3., 5. és 28. napon. Az oxidatív stressz paraméterek (malondialdehid (MDA),

redukált glutathion (GSH), plazma SH (PSH) csoport szint, kataláz (KAT), szuperoxid dizmutáz (SOD), mieloperoxidáz (MPO) enzimaktivitás) mérése mellett kemilumineszcenciás módszerrel meghatároztuk a teljes vér gyöktermelését (ROS). Áramlási citometriával mértük a leukociták CD11a, CD18 adhéziós molekula és a CD97 gyulladáshoz köthető marker expresszióját, valamint forbol-mirisztát-acetáttal 4 órán át inkubált teljes vérből nyert plazma mintákból ELISA kittel mértük az IL-1 β , IL-6, IL-8 és TNF- α koncentrációt. Meghatároztuk továbbá a fibrinogén és D-dimer szintet és mértük a trombocita aggregációt is.

Eredményeink szerint a betegek felvételekor levett vérmintákban az emelkedett MDA, MPO valamint a csökkent PSH értékek a pulmonalis embóliát kísérő oxidatív stressz meglétére utaltak. A trombolízist követő szignifikáns MDA emelkedés és GSH csökkenés, valamint a ROS érték emelkedése jelezte az oxidatív stressz fokozódását. A granulocita és monocita CD11a és CD18 adhéziós molekula expresszió szignifikánsan csökkent a trombolízist követően. Ez a csökkenés nagyobb mértékűnek mutatkozott a monocitákon alteplase kezelést követően. A fehérvérsejtek indukált citokin termelése mindkét kezelést követően hasonlóan változott, de az alteplase kezelés hatására a citokin szintek jelentősebb mértékben emelkedtek és a maximális értéküket a kezelést követő 5. napon érték el. A trombocita aggregáció a lízist követő 8. óráig szignifikánsan csökkent, majd a 20. órától fokozódott. Az adrenalinral történő indukciót kivéve nem mutatkozott szignifikáns eltérés a két szerrel végzett kezelés hatása között, azonban a fibrinogén változása a két szer eltérő hatását jól jelezte. A reperfüzió sikerét a D-dimer változása mindkét szer esetében markánsan tükrözte. Összességében megállapítható, hogy a pulmonalis embólia indukálta oxidatív stressz a trombolízis korai időszakában tovább fokozódott, különösen a hatékonyabb rögzítő alteplase kezelés során. A fehérvérsejtek csökkent adhéziós molekula expressziója jelezte a trombolízist követő kóros leukocita-endoteliális sejt egymásra hatást, feltételezve az aktivált sejtek kapilláris falra történő jelentős kitapadását. A keringő fehérvérsejtek emelkedett citokin termelése és adhéziós molekula expresszió változása a gyulladáshoz köthető folyamatok elhúzódására utalt a pulmonális embólia trombolízise során. A streptokinase, vagy alteplase adásával történő lízis eltérő hatása felveti az antioxidáns terápia esetleges szükségességét is.

A fenti eredményeket 6 folyóiratban megjelent absztraktban ismertettük, és egy publikálásra elküldött, valamint egy előkészületben levő közleményben foglaltuk össze.