

Kísérletes munkáinkkal két, párhuzamosan futó, majd egymással találkozó kutatási irányban indultunk el; *in vitro* és *in vivo* vizsgálataink egymással szorosan összefüggenek. Kiindulási pontként feltételeztük egy olyan intracelluláris kémiai rendszer működését, ami az aerob sejtekben az oxigénhiány (ischaemia) miatt fellépő reduktív stresszt késlelteti, és így az oxigén jelenlétében fellépő (reperfúziós) oxidatív károsodást befolyásolhatja. Feltételeztük, hogy ezt a rendszer olyan elektrofil tulajdonságú, metilcsoportokat tartalmazó (EM) biomolekulák alkotják, melyek metán gáz liberációja révén hatékonyan befolyásolják az oxido-reduktív stressz kialakulásával járó kór állapotokat.

In vitro, kémiai kísérleteink elsődleges célja a reduktív stresszt kísérő metánképződést leíró reakció igazolása volt; majd ezt követően arra a kérdésre kerestünk választ, hogy **1.** kimutatható-e metánképződés *in vitro* körülmények között különféle redukálószerrel, reaktív oxigén intermedierek (gyökeltetés) és EM molekulák (kolin, foszfatidilkolin, betain, stb.) jelenlétében; illetve **2.** mik a reakció (metánképződés) optimális feltételei. Munkáink során sikerült a fenti kérdések mindegyikére egyértelmű választ kapni.

1. *In vitro* hipoxia + elektrofil metil csoportokat tartalmazó biomolekulák → metán képződés (M. Ghyczy, C. Torday, M. Boros: Simultaneous generation of methane, carbon dioxide and carbon monoxide from choline and ascorbic acid – a defensive mechanism against reductive stress? The FASEB Journal, 2003).

1.1. Elsőként mutattuk ki, hogy *in vitro* körülmények között a fenti reakció valóban bekövetkezhet; bizonyítottuk, hogy elektrofil metil gyököket tartalmazó biomolekulákból (pl. foszfatidilkolin) metán képződhet reduktív körülmények között. Kimutattuk, hogy anoxia, hidrogén peroxid, katalitikusan aktív fémionok és aszkorbinsav jelenlétében a kolin molekulákból metán, és ezzel párhuzamosan az aszkorbinsavból széndioxid és szénmonoxid képződik.

1.2. Patkány máj mitochondriumokat vizsgálva bizonyítottuk, hogy a reakció *in vivo* körülmények között is lejátszódhat; igazoltuk a metángáz megjelenését a reakcióközegben hipoxia alatt és után (meg kell itt jegyezni, hogy a reakciót tisztázó közleményünk megjelenése után három évvel egy analóg folyamatot figyeltek meg német kutatók: a napsugárzás intenzitásával fokozódó metánképződés mutatható ki növényekben (Keppler, F et al.: Nature 439, 187–191, 2006).

Mivel feltételeztük, hogy a metán felszabadulással járó exotherm reakció *in vivo* körülmények között a hipoxiát kísérő intracelluláris redox egyensúlyzavar mérséklődésében játszik szerepet, *in vitro* kísérleteink folytatásaképpen megvizsgáltuk a gasztrointesztinális nyálkahártya reakcióját reduktív/oxidatív stressz állapotokban. Olyan állatkísérletes modelleket alkalmaztunk, ahol lehetőségünk nyílt a helyi és szisztémás keringési viszonyok megfigyelésére és összehasonlítására, és a mucosa funkcionális és strukturális károsodásának meghatározására. A bélfal intramurális mikrokeringésének vizualizálására intravitális mikroszkópiás módszert alkalmazunk orthogonális spektrális képalkotási (OPS) technikával, ezt bizonyos esetekben fluoreszcens videó-mikroszkópos vizsgálattal egészítettük ki. A nyálkahártya mikrokeringési viszonyainak megítélése, és az oxido-reduktív stressz által okozott károsodás mikrokeringési paramétereinek meghatározása közben felmerült, hogy a szöveti perfúzió heterogenitásának fokozódása (melyet hipoxia-reoxigenizáció alatt és után karakterisztikusan észleltünk) a mucosa mikrokeringési zavar lényegi jellegzetessége lehet (a mikrokeringés legfontosabb állapotváltozásairól készített videofelvételek megtekinthetők a <http://web.szote.u-szeged.hu/expSUR/> webhelyen). Kérdésként merült fel tehát, hogyan lehet meghatározni vagy összehasonlítani az egyes terápiák, EM vegyületek, vazóaktív,

stb. beavatkozások hatékonyságát a térben és időben változó intenzitású mikrokeringés esetében.

2. Új vizsgálati módszer/eljárás kidolgozása (Vajda K, Szabó A, Kucska K, Suki B, Boros M: Microcirculatory heterogeneity in the rat small intestine during compromised flow conditions. Microcirculation 2004).

Mivel az oszcilláló perfúziós mintázatokat nem jellemezhetjük hagyományos módszerekkel, új matematikai megközelítést dolgoztunk ki a mikrokeringési változások számszerűsítésére, melynek segítségével a különböző struktúrák mikrokeringési változásai az egyes kórállapotokban, kísérleti fázisokban is összehasonlíthatóvá váltak.

2.1. A perfúzió időbeli heterogenitása jellemzésére a vörösvértest áramlási sebesség idővel súlyozott számtani átlagolását használtuk, vagyis mind a csúcsáramlási, mind pedig az alapáramlási sebességeket megszoroztuk a hozzájuk tartozó idővel, majd ezek összegét elosztottuk az idők összegével:

$$\frac{V_1 T_1 + v_1 t_1 + V_2 T_2 + v_2 t_2 + \dots + V_n T_n + v_n t_n}{T_1 + t_1 + T_2 + t_2 + \dots + T_n + t_n}$$

A fenti képletben V_n és T_n a csúcsáramlási periódusokhoz tartozó vörösvértest áramlási sebesség és a periódusokhoz tartozó relatív időtartam; v_n és t_n pedig az alapáramlási periódusokat jellemző sebesség illetve relatív időtartam értékeket jelenti (a részletes magyarázatot és képleteket a fenti hivatkozás tartalmazza).

2.2. A térbeli heterogenitás számszerűsítésére, vagyis az adott területre vonatkoztatható átlagos áramlási sebesség kalkulálásához a relatív érhosszal súlyozott számtani átlagolást használtuk az alábbi képlet szerint:

$$\frac{VL + vl}{L + l}$$

A képletben V a magasabb, v pedig az alacsony átlagos áramlási sebességgel jellemezhető érhosszhoz (L és l) tartozó áramlási sebességet jelöli.

Ezt követően számítógépes képanalízis és a fenti képletekre alapozott kiértékelési módszerrel kvantifikáltuk a térben és időben egyaránt változó, oszcilláló perfúziós mintázatokat. Igazoltuk, hogy az eljárás reprodukálható, és lehetővé teszi az intramurális mikrokeringési viszonyok számszerűsítését.

3. A gasztrointesztinális traktus egyes rétegeinek mikrokeringési változásai klinikailag fontos kórállapotokban (A. Szabó, B. Suki, E. Csonka, E. Eszlári, K. Kucska, K. Vajda, J. Kaszaki, M. Boros: Flowmotion in the intestinal villi. A method to characterize the microcirculatory changes in a canine model of hemorrhagic shock. Shock 2004)

A továbbiakban a fenti kiértékelési módszert alkalmaztuk a vékonybél villusokban és simaizom struktúrákban megfigyelhető mikrokeringési állapot objektív leírására. Megvizsgáltuk a vékonybél mikrokeringését élettani és kóros körülmények között (endotoxaemiában és a nitrogén monoxid (NO) szintézis szisztémás gátlása alatt), s emellett összehasonlítottuk a helyi (artériás elzáródás, ischaemia-reperfúzió) és szisztémás makrohemodinamikai zavar (haemorrhagiás shock) következtében kialakuló intramurális mikrokeringési diszfunkciót is. A fenti módszerek alkalmazásával (a kapott eredmények időbeli-logikai sorrendjét megtartva) az alábbi fontosabb következtetésekre jutottunk.

3.1. A bélfalon belül a keringés heterogenitásának fokozódása mind térben (az egyes anatómiai rétegek között és egy rétegen belül is), mind időben fluktuáló jelleggel jelentkezik, s mindezek alapján a noxa jellegétől függően három alapvető heterogenitási formát különböztethetünk meg. **A.** Hipoxia-reoxigenizáció alatt a vékonybél villusokban a mikrokeringés időbeli heterogenitása („flowmotion”) általános jelenség. **B.** A splanchnikus keringést befolyásoló szisztémás keringési zavarokban

(vérzésemes shock és endotoxaemia) a vékonybél egymáshoz párhuzamosan kapcsolt mikrokeringési rendszerek között eltérő mértékű térbeli heterogenitás alakul ki: az izom mikrokeringése a villusokénál jobban károsodik, vagyis a vékonybél különböző rétegei között is redisztribúció alakul ki (a mucosa javára). **C.** A vazodilatátor NO szintézis teljes, nem-szelektív gátlása hatására az egymással sorosan kapcsolt mikrokeringési rendszerekben (villusok) alakul ki heterogenitás.

Kísérleteinket folytatva jellemeznünk kellett a klinikumban hatékonynak tartott standard folyadékterápia következményeit az oxido-reduktív stressz által okozott makro- és mikrokeringési változásokra. A folyadékterápiák által kiváltott intramurális mikrokeringési válaszreakció jórészt ismeretlen volt, de az összehasonlító vizsgálatok a tervezett, EM csoportokat tartalmazó oldatok (PC) alkalmazása előtti kontrollként is szolgáltak.

4. Az intramurális mikrokeringési zavarok és a mikrokeringés effektivitása a perfúzió heterogenitásának változásával jellemezhető (Vajda K, Szabó A, Boros M: **Heterogeneous microcirculation in the rat small intestine during hemorrhagic shock: quantification of the effects of hypertonic-hyperoncotic resuscitation. Eur Surg Res 2004).**

4.1. Igazoltuk, hogy vizsgálómódszereinkkel az egyes keringési kórállapotokban alkalmazott folyadékterápiák mikrokeringési következményei objektíven összehasonlíthatók és a beavatkozások hatékonysága jól megítélhető. Kimutattuk, hogy a reszuszcitációs oldatok (krisztalloidok és/vagy kolloidok, hipertóniás-hiperonkotikus oldatok) egymástól eltérő módon, és több-kevesebb szövődémmel, de hatékonyan befolyásolhatják a gasztrointesztinális mucosa és az egyes intramurális struktúrák mikrokeringését.

4.2. Kimutattuk, hogy a hipertóniás/hiperonkotikus oldatokkal jelentősen javítható a vékonybél mikrokeringése vérzésemes shockot követően. Hasonló megközelítéssel sikerült bizonyítani a szelektív endothelin-A receptor antagonistá által kiváltott jelentős mikrokeringési hatást a vékonybél esetében. Igazoltuk azt is, hogy a megfelelő terápiai megközelítéssel a mikrokeringési változásokat kísérő gyulladásmos reakció és a szöveti károsodás is befolyásolható.

A mikrokeringés heterogenitását (a térben és/vagy időben oszcilláló kapilláris véráramlást) elsőként a vékonybél (ileum) vértelenségét követő reoxigenizáció alatt észleltük; de az adatgyűjtés során nyilvánvalóvá vált, hogy a gyógyszeres terápia k próbálása előtt a jelenséget karakterizálni kell más gasztrointesztinális struktúrák esetében is.

5. A gyomor mikrokeringési változásai és a következményes szövetkárosodás vizsgálta (Lázár G, Kaszaki J, Ábrahám S, Horváth G, Wolfárd A, Szentpáli K, Paszt A, Balogh A, Boros M. **Thoracic epidural anesthesia improves the gastric microcirculation during experimental gastric tube formation. Surgery 2003).**

5.1. Állatkísérletes modellünkben elsőként vizsgáltuk a gyomorfal mikrokeringését *in vivo* körülmények között OPS technikával.

5.2. Jellemeztük a gyomor eltérő anatómiai struktúráinak mikroperfúziós viszonyait kóros klinikai körülmények között (gyomorresektio, előkészítés nyelőcsőpótláshoz).

6. A nyelőcső mikrokeringési változásai és a következményes szövetkárosodás vizsgálta (Szentpáli, K Erős, G Kaszaki, J Tiszlavicz, L Lázár, G Wolfárd, A Balogh, A Boros, M: **Microcirculatory changes in the canine oesophageal mucosa during experimental reflux oesophagitis: Comparison of the effects of acid and bile. Scand J Gastroenterology 2003).**

6.1. Állatkísérletes modellünk elsőként vizsgálta a nyelőcső mikrokeringését *in vivo* körülmények között; leírtuk az intramurális perfúzió objektív paramétereit, ezeket intravitális videomikroszkóppal detektáltuk.

6.2. Meghatároztuk a heveny gyulladásmos nyálkahártya reakció (savas és epés kezelés) mikrokeringési és biokémiai következményeit. Kísérleteinkben különösen az

epés expozíció okozott jelentős (és jellegzetes) mikrokeringési zavart a nyelőcső nyálkahártyájában. A venulák átmérője növekedett és az áramlási sebesség fokozódott, s ez arra utal, hogy epés reflux alatt jelentős venodilatátor tényező működik a nyálkahártyában.

6.3. Megállapítottuk, hogy epés regurgitáció mellett súlyos funkcionális károsodás alakul ki, jelentősen fokozódik az epithelialis és a vascularis permeabilitás, sérül a mucosa integritása. *In vivo* vizsgálati adataink szerint az epe több - egymással összefüggő - mechanizmus révén károsítja a nyálkahártya barriert. A lumenbe jutott epe csökkenti a szöveti ATP mennyiségét, gátolja a cNOS aktivitását, fokozza az iNOS aktivitását, hízósejt degranulációt és leukocytá akkumulációt vált ki, és súlyos morfológiai károsodást okoz.

Vizsgálataink folytatásaképpen először olyan kísérletes modellt választottunk, ahol egyértelműen igazolhatónak tűnt, hogy az oxido-reduktív stressz által okozott nyálkahártya károsodás csökkenthető EM anyagok (foszfatidilkolin) kezeléssel.

7. A nyelőcső nyálkahártya károsodás befolyásolása EM vegyületek (foszfatidilkolin) alkalmazásával (Erős G, Kaszaki J, Czóbel M, Boros M. Systemic phosphatidylcholine pretreatment protects canine esophageal mucosa during acute experimental biliary reflux. World J Gastroenterol 2006).

7.1. Valószínűnek látszott, hogy a neuronális NOS (nNOS) által termelt NO a nyelőcső nyálkahártya homeosztázisának fontos tényezői lehet, ezért megvizsgáltuk, hogy az akut epés expozíció milyen hatással van az nNOS aktivitására, a nyálkahártya hízósejtek reakcióira, s ebben az összefüggésben megvizsgáltuk az nNOS gátlás következményeit is. Kimutattuk az nNOS izoenzim döntő szerepét a folyamatban (az nNOS szelektív gátlószere az epe által kiváltott káros hatásokat fokozta).

7.2. Az intravénás PC előkezelésben részesült állatok esetén az epe által okozott ATP szint csökkenés, cNOS gátlás és hízósejt degranuláció jelentősen mérséklődött. Igazoltunk, hogy a PC kezelést követően szignifikánsan csökken a mikrokeringési diszfunkció; és ezzel párhuzamosan a leukocyták helyi, szöveti aktivációja is.

7.3. Eredményeink alapján - korábbi megfigyeléseinkkel összhangban - azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a parenteralisan bejuttatott PC az epe által okozott oesophagitis terápiás lehetősége lehet.

Ezt követően további *in vivo* kísérleteinkben megvizsgáltuk a foszfatidilkolin előkezelés hatását más, oxido-reduktív stresszel járó kórállapotokban is. Ezekben a modellekben is igazoltuk, hogy a PC rendkívül hatékonyan csökkenti a mucosa mikrokeringési zavarát, mérsékli a helyi gyulladósos reakciót, és szignifikánsan kivédi a szöveti károsodást.

8. PC előkezelést követően csökken a vékonybél gyulladósos sejt infiltrációja endotoxaemia alatt (A. Szabó, G Sahin-Tóth, J. Kaszaki, M. Ghyczy, M. Boros: Phosphatidylcholine-enriched diet ameliorates the inflammatory processes in endotoxemic rats. Eur Surg Res (37), 2005).

8.1. PC kezelést követően szignifikáns keringési védőhatást igazoltunk intravénás endotoxin alkalmazásával kiváltott kísérletes hyperdinámiás szepszis alatt

8.2. Hét napos szájon át történő előkezelés (PC-vel dúsított tápot tartalmazó előtetés) után az endotoxinnal kezelt csoportokban szignifikánsan csökkent a vékonybél mikrokeringési diszfunkciója és a leukocyták aktivációja.

9. A PC kezelés védőhatása végtag ischaemia-reperfúzió alatt és után (R. Varga, L. Gera, J. Kaszaki, A. Szabo, M. Ghyczy, M. Boros: Phosphatidylcholine treatment improves the periosteal microcirculation following hindlimb ischemia and reperfusion. *Eur Surg Res* (36 S1), 2004; és L. Gera, R. Varga, L. Török, J. Kaszaki, A. Szabó, K. Nagy, M. Boros: Beneficial effects of phosphatidylcholine during hindlimb reperfusion. *J Surg Res* 2006, *in press*).

9.1. Végtag ischaemiát követő reoxigenizáció alatt jelentősen fokozódik a csontthártya intravitális videómikroszkópos vizsgálatokkal igazolt mikrokeringési diszfunkciója (csökken az áramlási sebesség és a funkcionális kapilláris sűrűség) és jelentős leukocita aktiváció észlelhető (gördülő és kitapadt leukocyták száma megnő). Ezzel párhuzamosan a csontot körülvevő izomzatban hízósejt degranuláció és gyulladásos sejtes infiltráció észlelhető.

9.2. Eredményeink azt bizonyítják, hogy a periosteum és a vázizomzat hipoxia-reoxigenizációs károsodás *in vivo* modelljében a PC kezelés nagyon hatékonyan gátolja a videó-mikroszkóppal igazolt leukocyta aktivációt és mikrokeringési zavart, és szignifikánsan csökkenti a hízósejt degranulációt

9.3. Szisztémás PC kezelés (vagyis az EM terápia) hatékonyan gátolja az ischaemia-reperfúzió által kiváltott másodlagos gyulladásos folyamatokat, így megerősítve látjuk korábbi, hasonló tárgyú vizsgálataink eredményeit.

Végezetül a 2002 és 2006 között a fenti tárgyban folytatott kutatási eredményeink összegzésekképpen elmondható, hogy feltérképeztük egy korábban ismeretlen, endogén anti-inflammációs mechanizmus lényegi összetevőit; véleményünk szerint felismeréseinknek klinikai-terápiás konzekvenciái lehetnek az oxido-reduktív stressz és a következményes gyulladásos reakciók befolyásolása terén.