

Az elért eredmények ismertetése:

## **I. A csőgyomor képzés és a thoracalis epidurális anaesthesia hatása a gyomor mikrokeringésére, a bél motilitására**

A gasztrointesztinális anasztomózisok elégtelen gyógyulásának, szövődményeinek kiemelkedő jelentősége van a sebészi beavatkozások morbiditásában és mortalitásában. Nyelőcső reszekciót követően a gyomorpótlás a leggyakrabban alkalmazott módszer a bélcsatorna folytonosságának helyreállítására. A műtét során átvágjuk az arteria gastrica sinistrat, az arteria gastroepiploica sinistrat és a gastricae breveseket. Az onkológiai radikalitás és a megfelelő hosszúságú csőgyomor készítése céljából a gyomor kigörcbületti oldalát is reszekáljuk. Mindezek a csőgyomor proximális részének vérellátását jelentősen csökkentik, ritkán súlyos, életveszélyes szövődményekhez, varratelégtelenséghez, akár a gyomor proximalis részének necrosisához is vezethetnek.

**Tekintettel a fenti szövődmény veszélyekre, munkánk egyik fő célkitűzése az volt, hogy megvizsgáljuk a gyomorcsövesítés hatását a csőgyomor mikrocirkulációjára.**

Korábbi kísérletes és klinikai megfigyelések azt valószínűsítik, hogy a thoracalis epidurális anaesthesia jótékonyan befolyásolja a gyomor-bélrendszer mikrokeringését és motilitását. **Kísérleteinkben objektív módszerek alkalmazásával választ kerestünk azon kérdésekre, hogy a thoracalis epidurális anaesthesia (TEA) milyen hatást gyakorol a gyomor mikrokeringésére, a bélmotilitásra, valamint a legfontosabb hemodinamikai paraméterekre.**

A kísérleteinket pentobarbitállal altatott, laparotomizált keverék kutyákon végeztük. Monitorizáltuk az artériás középnyomást, a gyomor és a mesenterialis erek vérátáramlását (Transonic Systems Inc.), továbbá az intramucosális pH és a bél motilitásának változásait (strain gauge technique). A TEA-hoz bupivacain (1 mg/kg-ot) alkalmaztunk, a csőgyomor képzést Akiyama szerint végeztük el. A csőgyomor mikrocirkulációjának változásait ortogonális spektrális képalkotás (Cytoscan A/R, Cytometrics, PA, USA) módszerével vizsgáltuk. Az új diagnosztikus módszer, a visszaverődő polarizált fény segítségével láthatóvá teszi a hemoglobin tartalmú sejteket, illetve egyéb szöveti struktúrákat. E módszer felhasználásával *in vivo* körülmények között tanulmányoztuk a gyomor mikrocirkulációjának jellegzetességeit.

### **Eredmények, legfontosabb következtetések**

1. Vizsgálatainkban kimutattuk, hogy a csőgyomor képzés szignifikánsan csökkenti az intramucosális pH-t és a vörösvértestek áramlási sebességét a csőgyomor proximális részében a mucosális és a serosális felszínen. Eredményeink egyértelműen igazolják, hogy a gyomorcsövesítés drámaian károsítja a csőgyomor cranialis harmadának vérellátását.
2. Az epidurális anaesthesia alkalmazását követően a gyomor intramucosális pH-ja és a vörösvértestek áramlási sebessége is emelkedett. Az artériás középnyomás 30 %-kal csökkent, míg a gyomor és a mesenterialis artériák vérátáramlása szignifikánsan emelkedett.
3. Igazoltuk továbbá, hogy az epidurális anaesthesia szignifikánsan fokozza mind a vékonybél, mind pedig a gyomor motilitását

4. **Eredményeink új adatok arra vonatkozóan, hogy a TEA fokozza a vasculárisan károsodott csőgyomor proximális harmadának mikrocirkulációját, egyben javítja a szöveti oxigenizációt és a belek motilitását is.** Jelen megfigyeléseink alapján is javasoljuk a TEA rutinszerű klinikai alkalmazását a nyelőcső-sebészeti gyakorlatban.
5. **Kísérleteink alapján megállapíthatjuk, hogy az orthogonális spektrális képalkotás (OPS) módszere lehetővé teszi a mikrocirkuláció közvetlen megfigyelését, a vérellátás és a viabilitás pontosabb értékelését is.**

## II. A máj mikrokeringésének vizsgálata mechanikus icterusban

### *A) Kupffer sejt blokád hatása a mechanikus icterus és az endotoxin okozta mikrocirkulációs változásokra és májkárosodásra*

Korábbi vizsgálatainkban igazoltuk, hogy gadolinium kloriddal ( $GdCl_3$ ) előidézett Kupffer sejt (KS) blokád csökkenti az endotoxin indukálta gyulladással járó válaszciklust kísérletes epeút lezárás során. Kimutattuk továbbá, hogy a máj Kupffer sejtek működésének felfüggesztése csökkenti a neutrofil granulociták aktivitását. (Lázár G Jr és mtsai, *Inflamm Res* 51(10): 511-8, 2002.) Irodalmi adatok azonban még nem állnak rendelkezésünkre, hogy ezek a hatások hogyan jellemezhetők a máj mikrokeringési változásain keresztül. Mindezek alapján kísérleteink célja az volt, hogy megvizsgáljuk a májban az obstructio icterus mikrokeringésre gyakorolt következményeit akut endotoxaemia során, valamint a Kupffer sejt blokád hatását ezen körülmények között.

A máj mikrokeringését fluoreszcens intravitális mikroszkóppal (IVM) vizsgáltuk. Kapilláris perfúziót, neutrofil-endotheliális interakciót és KS aktivitást (fluoreszcens Latex mikroszemcse-kitapadás/acinus) off-line számítógépes képanalízis segítségével mértünk. A mikrokeringési paramétereket álműtött, hím Wistar patkányokban, *E. Coli* lipopolysaccharid kezelt (LPS, 1 mg/tskg i.v. 2 órával az IVM előtt,) és epeút lezárított (EUL, 3 nappal az IVM előtt) állatokban, valamint ezek kombinációjában (EUL+LPS) vizsgáltuk. További csoportokban a  $GdCl_3$  indukálta KS gátlás (24 órás előkezelés 10 mg/tskg i.v.  $GdCl_3$ -dal) hatását mértük álműtött és EUL+LPS kezelt patkányokban. A máj mikrokeringési változásai mellett (perfundált és nem perfundált kapillárisok aránya, leukocita – endothelsejt interakció) mértük a szérum proinflammatorikus citokin szintjeit (IL-6, TNF- $\alpha$ ), a neutrofil granulociták szöveti akkumulációját (mieloperoxidáz enzimaktivitás) valamint a máj szöveti károsodását (H&E festés, fénymikroszkóp).

A KS aktivitás az EUL illetve LPS csoportban háromszor emelkedettebb volt, mint az álműtött állatokban (3,4/acinus), és ötször magasabb volt az EUL+LPS csoportban. Az acinális kapilláris perfúziós ráta az álműtött csoportban  $83\pm 3\%$ , az LPS-kezelt csoportban  $71\pm 3\%$  volt, ami szignifikánsan csökkent az EUL valamint az EUL+LPS állatokban ( $55\pm 0,5\%$  és  $48\pm 1\%$ ,  $p < 0.01$ ). EUL csoport esetében a pericentrális véna falához kitapadt leukociták száma megegyezett az álműtöttével ( $115\pm 31/mm^2$ ), azonban szignifikánsan ötszörösére emelkedett az LPS-re adott válaszciklust során, illetve hatszorosára az EUL+LPS állatokban. A  $GdCl_3$ -dal létrehozott KS blokád nem volt hatással az EUL+LPS okozta kapilláris perfúziós károsodásra, de szignifikánsan, több mint 50 %-kal javította a neutrofil-endotheliális sejt interakciót.

Kimutattuk, hogy mechanikus icterusban jelentősen fokozódik az LPS indukálta proinflammatorikus citokin felszabadulás (TNF- $\alpha$ , IL6) és hasonlóképpen emelkedik a májban a szöveti myeloperoxidase (MPO) aktivitás. A Kupffer sejtek működésének

felfüggesztésével szignifikánsan csökkenthető volt az LPS indukálta gyulladási válaszreakció (TNF –alpha, IL-6, MPO) és szöveti károsodás is.

### **Eredmények, legfontosabb következtetések**

1. Vizsgálataink alapján megállapíthatjuk, hogy az epeút lekötés révén létrejött mechanikus icterus súlyos mikrocirkulációs károsodáshoz vezet.
2. A bakteriális endotoxin jelentősen fokozza a mikrokeringési károsodásokat és jelentősen emeli a Kupffer sejtek aktiválódását.
3. Az obstructio icterusban fokozódik az endotoxin okozta Kupffer sejt aktivitás, valamint a perfúziós károsodások is.
4. A mechanikus icterus jelentősen fokozza az LPS indukálta gyulladási válaszreakciót (TNF, IL-6, MPO) és szöveti károsodásokat.
5. A Kupffer sejt blokádj jelentősen javította a máj mikrokeringésének romlását és csökkentette a neutrofil endoteliális sejt interakciót.
6. Mechanikus icterusban a Kupffer sejtek működésének felfüggesztése szignifikánsan csökkentette az LPS indukálta fokozott gyulladási válaszreakciót és szöveti károsodásokat.
7. Eredményeink felvetik a ritkaföldfémekkel (GdCl<sub>3</sub>) kiváltott Kupffer sejt gátlás módszerének klinikai alkalmazhatóságát cholestasisban szenvedő betegeknél.

#### *B) A foszfatidylcholin hatása a mechanikus icterus és az endotoxin okozta mikrocirkulációs változásokra és máj károsodásra*

Az epeúti elzáródás okozta gyulladási folyamatok kivédésére a lehetőségek korlátozottak. A foszfatidylcholin (PC) a máj Kupffer sejtjei (KS) veszik fel. Korábbi *in vitro* vizsgálatokban igazolták, hogy a PC jelentősen csökkenti az oxidatív stressz okozta károsodásokat (FASEB J. 17: 1124-6, 2003). Mindezek alapján érdemesnek láttuk megvizsgálni a PC diéta hatását mechanikus icterus valamint endotoxaemia körülményei között. A PC hatását a fent ismertetett kísérleti protokollban vizsgáltuk.

A máj mikrokeringési változásai mellett (perfundált és nem perfundált kapillárisok aránya, leukocita – endothelsejt interakció) mértük a szérumban proinflammatorikus citokin szintjeit (IL-6, TNF- $\alpha$ ), a neutrofil granulociták szöveti akkumulációját (mieloperoxidáz enzimaktivitás) valamint a máj szöveti károsodását (H&E festés, fénymikroszkóp).

Az állatok első 4 csoportja 1 hétig standard laboratóriumi diétán volt (Placebo, SSNIFF Spezialdiäten GmbH, Soest, Germany). Az állatokat álműtött (n=6), epeút lekötött (EUL csoport, 3 nappal a mérések előtt, n=6) csoportokba soroltuk. A harmadik csoportban alacsony dózisú LPS iv. beadásával endotoxaemiát hoztunk létre (LPS csoport, n=6) 2 órával a mikrokeringési mérések megkezdése előtt. A negyedik csoportban ezen körképeket kombináltuk (EUL+LPS, n=6). A kísérlet második felében az előző 4 kísérletet megismételtük, de 1 héttel a méréseket megelőzően 1 %-os PC dús táppal etettük az állatokat (SSNIFF GmbH).

### **Eredmények, legfontosabb következtetések**

1. Az EUL jóval nagyobb kapilláris perfúziós károsodást okozott ( $63 \pm 2,8$  %) mint az endotoxaemia önmagában ( $73 \pm 5,2$  %), a gyulladási válaszreakciók mértéke szignifikánsan alacsonyabb volt. A leukocita aktivitás a kontroll  $115 \pm 30/\text{mm}^2$ -ről

186±33/mm<sup>2</sup>-re illetve 548 ±100/mm<sup>2</sup>-re emelkedett, a máj MPO aktivitása 31,8±1,9 mU/mg-ról 58,2±8,7 mU/mg illetve 126,7±22,4 mU/mg-ra változott.

2. Amikor az LPS-t az EUL-sel kombináltuk, az további perfúziós károsodáshoz (>50 %), leukocita kitapadás emelkedéshez (731±38/mm<sup>2</sup>) vezetett. A KS-aktivitás LPS kezelést valamint az EUL-t követően szignifikánsan emelkedett, mely a kombinált csoportban további fokozódást mutatott.

3. A PC előkezelés szignifikánsan javította az EUL+LPS okozta perfúziós károsodást (65±2 %), a leukocita aktivitást (178±12/mm<sup>2</sup>) és csökkentette a KS-aktivitást. Ugyanezen csoportban a PC megelőzte az MPO aktivitás, a szérum IL-6 és TNF- $\alpha$  produkció fokozódását és csökkentette a periportális szöveti károsodást.

4. A PC előkezelés szignifikánsan javította az EUL+LPS okozta perfúziós károsodást (65±2 %), a leukocita aktivitást (178±12/mm<sup>2</sup>) és csökkentette a KS-aktivitást. Ugyanezen csoportban a PC megelőzte az MPO aktivitás, a szérum IL-6 és TNF- $\alpha$  produkció fokozódását és csökkentette a periportális szöveti károsodást.

**5. A PC-ben gazdag táp adása kedvezően befolyásolja a obstructios icterusban az endotoxaemia okozta lokális/szisztémás gyulladást, a perfúziós károsodást valamint szöveti károsodást. Eredményeink bizonyítják, hogy a PC megfelelő terápiás lehetőséget nyújthat a cholestasis okozta gyulladást követő következményekkel szemben.**

### **III. Glükokortikoid hormonok által szabályozott mechanizmusok szerepe kísérletes akut pancreatitis lefolyásában**

*A) Az akut pancreatitis, a korszerű terápiás módszerek alkalmazása ellenére, napjainkban is magas halálozással járó megbetegedés. A glükokortikoid hormonok terápiás alkalmazása akut pancreatitisben (AP) mai napig vita tárgyát képezi.*

1. Vizsgálni kívántuk a glükokortikoid agonista dexamethason (DEX) és hydrocortison (HYD), valamint a glükokortikoid antagonistá, RU-38486 (RU) kezelés lokális és szisztémás hatásait a heveny, kísérletes (taurcholsavval előidézett) pancreatitis pathogenezisében és lefolyásában.

#### **Eredmények, legfontosabb következtetések**

A glükokortikoid analog vegyületek (hydrocortison, dexamethason) csökkentették a szérum IL 6 és amiláz szintjét, míg az antiglükokortikoid RU 38486 ezzel ellentétesen szignifikánsan emelte. Kísérleteinkben tanulmányoztuk a glükokortikoid agonisták, valamint a glükokortikoid antagonistá RU 38486 hatásait a heveny pancreatitis extrapancreaticus szövődésének (tüdő, máj) kialakulásában. Ezen vizsgálatainkat hagyományos szövettani módszerek és a szöveti ATP, myeloperoxidase (MPO) meghatározás segítségével végeztük. Kimutattuk, hogy a heveny kísérletes pancreatitis jelentősen csökkenti a máj és a tüdő ATP tartalmát és ezzel párhuzamosan jelentősen fokozza az MPO aktivitását. A glükokortikoid analog vegyületek jelentősen mérsékelik a gyulladást okozó válaszreakció mértékét (szöveti MPO emelkedését) és a szöveti ATP csökkentését. Az antiglükokortikoid RU 38486 azonban fokozza a szöveti MPO aktivitás és ATP csökkenés mértékét. Vizsgálataink szerint az antiglükokortikoid RU 38486 szignifikánsan csökkenti, a glükokortikoid agonisták pedig

szignifikánsan növelik a kísérleti állatok rezisztenciáját az akut kísérletes pancreatitis lethális hatásával szemben.

**2. Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy az endogén glükokortikoid hormonok lényeges szerepet játszanak a heveny kísérletes pancreatitis által előidézett gyulladási válaszreakció kontrolljában és az extrapancreatikus szervek (tüdő, máj) károsodásainak mérséklésében.**

*B. A glükokortikoid hormonok szerepe az Arginin indukálta akut pancreatitis lefolyásában az NF- $\kappa$ B és MIF szekréció változásának tükrében*

Ezen vizsgálati sorban egy új kísérletes pancreatitis modellt állítottunk be, melyet kísérleti patkányokon L-Arginin intraperitoneális adásával hoztunk létre (a kísérletet megelőzően két alkalommal, egy órással 250 mg/100 g dózisban). Vizsgáltuk a glükokortikoid agonista methylprednisolone (MP) és glükokortikoid antagonistá RU 38486 (RU) hatását a kísérletes L-Arginin indukálta hasnyálmirigy gyulladás lefolyására, a szérumban amiláz, az IL-6 koncentráció, az NF- $\kappa$ B aktiváció, és a szérumban makrofág migrációt gátló faktor (MIF) változásait.

#### **Eredményeink, legfontosabb következtetések:**

1. Az L-Arginin intraperitoneális adagolásával jól standardizálható kísérletes hasnyálmirigy gyulladás idézhető elő (fokozatosan emelve a szérumban amiláz, IL-6 és NF- $\kappa$ B aktivációt).

2. A methylprednisolone előkezelés szignifikánsan csökkentette a kísérletes akut pancreatitis okozta szérumban amiláz, IL-6 emelkedést és az NF- $\kappa$ B aktivációt, továbbá csökkentette a MIF termelést a kontroll csoportban képest.

3. A glükokortikoid antagonistá RU jelentősen fokozta a MIF koncentrációt (8 illetve 12 órával a pancreatitis indukcióját követően) és az akut hasnyálmirigy szérumban markereinek (amiláz, IL-6) koncentrációját a kontroll és a methylprednisolonnal kezelt állatcsoportban képest.

**4. Vizsgálataink megerősítik a glükokortikoid hormonok szerepét az akut hasnyálmirigy gyulladás során létrejövő válaszreakció kontrolljában, melynek magyarázatában kulcsfontosságú szerepet tölt be a glükokortikoid hormonok NF- $\kappa$ B aktiváció gátlásával létrehozott hatása. A MIF gyulladási folyamatokban betöltött szerepére vonatkozóan további vizsgálatokra van szükség.**

**A fent ismertetett eredményekből számos publikáció történt és előadás hangzott el (ld. a mellékletet és az alábbiakat). A legfrissebb eredményeinkből még legalább további 3-4 publikáció megjelenése várható, ezek közül kettőt (ld. alább) már közlés céljából benyújtottunk.**

Ábrahám Sz., Szabó A., Kaszaki J., Éder K., Duda E., Lázár Gy., Tizslavicz L., Boros M., ifj. Lázár Gy.:

Kupffer cell blockade improves endotoxin-induced microcirculatory inflammatory response in obstructive jaundice (Közlésre benyújtva)

Paszt A., Szabolcs A., Szentpáli K., Tizslavicz L., Duda E., Lázár Gy., Takács T., ifj. Lázár Gy.:

Glucocorticoid-dependent mechanism in the pathogenesis of L-arginine-induced acute pancreatitis in the rats (Közlésre benyújtva)

**Itt kell megemlíteni azt is, hogy a munkában résztvevő fiatal kutató az ESSR 2005. évi kongresszusán "Kupffer cell blockade ameliorates the obstructive jaundice-induced microcirculatory inflammatory reaction in the liver" című előadását a kongresszus tudományos bizottsága "Young Investigator Award"-dal jutalmazta.**

**A munkából ezen túlmenően a Magyar Sebészek Alapítványához benyújtott pályázataink Kulka Frigyes, illetve Földes Ferenc díjban részesültek.**

Lázár Gy., Kaszaki J., Ábrahám Sz., Wolfard A., Horváth G., Szentpáli K., Paszt A.: „A thoracalis epidurális anaesthesia javítja a gyomor mikrokeringését kísérletes csőgyomorképzés során”

**Magyar Sebészek Alapítványa - Tauber Alapítvány – Kulka Frigyes Díj**

Paszt Attila, Rakonczay Zoltán, Kaszaki József, Szentpáli Károly, Wolfard Antal, Tizslavicz László, Lázár György: Glucocorticoid hormonok által szabályozott mechanizmusok szerepe kísérletes akut pancreatitis lefolyásában.

**Magyar Sebészek Alapítványa - Tauber Alapítvány – Földes Ferenc Díj**

### **Előadások jegyzéke:**

1. Ábrahám Sz., **Lázár Gy.**, Horváth G., Kaszaki J., Boros M.: A nyelőcső pótlásra előkészített csőgyomor mikrokeringése. A thoracalis epiduralis anaesthesia hatása.  
3. Magyar Mikrokeringési Kongresszus, Balatonkenese 2003. máj. 9-10.
2. Ábrahám Sz., **Lázár Gy.**, Szabó A., Kaszaki J., Boros M.: A máj mikrokeringésének vizsgálata patkányban.  
A Magyar Sebész Társaság Kísérletes Sebész Szekció XIX. Kongresszusa, Siófok, 2003 szept. 11-13.
3. **Lázár Gy.**, Kaszaki J., Ábrahám Sz., Wolfard A., Horváth G., Szentpáli K., Paszt A., Balogh Á., Boros M.: Thoracalis epiduralis anaesthesia hatása a csőgyomor mikrokeringésére és a gasztointesztinális motilitásra.  
Magyar Sebész Társaság Kísérletes Sebész Szekció XIX. Kongresszusa, Siófok, 2003 szept. 11-13.
4. Paszt A., Rakonczay Z., Kaszaki J., Szentpáli K., Wolfard A., Tizslavicz L., **Lázár Gy.**: Glucocorticoid hormonok által szabályozott mechanizmusok szerepe kísérletes akut pancreatitis lefolyásában.  
Magyar Sebész Társaság Kísérletes Sebész Szekció XIX. Kongresszusa, Siófok, 2003 szept. 11-13.

5. Ábrahám Sz., Szabó A., Kaszaki J., Tiszlavicz L., Duda E., Lázár Gy., Boros M., ifj. **Lázár Gy.:** A máj mikrokeringés vizsgálata epeút elzáródást követő endotoxaemiában – a Kupffer sejt gátlás hatása.

A Magyar Sebész Társaság Kísérletes Sebészeti Szekció XX. Jubileumi Kongresszusa, Hajdúszoboszló, 2005. szept. 8-10.

6. Ábrahám Sz., Szabó A., Lázár Gy., ifj. **Lázár Gy.:** Kupffer cell blockade ameliorates the obstructive jaundice-induced microcirculatory inflammatory reaction in the liver  
40th Congress of the European Society for Surgical Research (ESSR),  
Konya, 2005. május 25-28.

7. Paszt A., Ábrahám Sz., Tiszlavicz L., Duda E., Takács T., **Lázár Gy.:** Glucocorticoid dependent mechanisms in the progression of L-arginine-induced acute pancreatitis in rats: the role of NF- $\kappa$ B activation  
40th Congress of the European Society for Surgical Research (ESSR)  
Konya, 2005. május 25-28.

8. Paszt A., Ábrahám Sz., Tiszlavicz L., Duda E., Takács T., **Lázár Gy.:** Glucocorticoid hormonok hatása L-arginin indukálta kísérletes akut pancreatitisben: az NF- $\kappa$ B aktiváció szabályozó mechanizmusai

A Magyar Sebész Társaság Kísérletes Sebészeti Szekció XX. Jubileumi Kongresszusa, Hajdúszoboszló, 2005. szept. 8-10.

9. Ábrahám Sz., Szabó A., Kaszaki J., Lázár Gy., Tiszlavicz L., Duda E., Boros M., ifj. **Lázár Gy.:** Kupffer cell blockade improves liver microcirculation in endotoxemia following experimental bile duct ligation

A Magyar Gasztroenterológiai Társaság 48. Nagygyűlése, Szeged, 2006. június 17-21.

10. Ábrahám Sz., Szabó A., Kaszaki J., Lázár Gy., Tiszlavicz L., Boros M., ifj. **Lázár Gy.:** Beneficial microcirculatory consequences of phosphatidylcholine pretreatment in endotoxemic rats with obstructive jaundice

41st Congress of the European Society for Surgical Research, Rostock, 2006. május 17-20.

11. Paszt A., Szabolcs A., Tiszlavicz L., Duda E., Takács T., **Lázár Gy.:**

Effects of glucocorticoids in the L-arginine-induced acute pancreatitis: the mechanism of NF- $\kappa$ B activation

A Magyar Gasztroenterológiai Társaság 48. Nagygyűlése, Szeged, 2006. június 17-21.