Az immunrendszer érzékenységében bekövetkezett változások vizsgálata cardiopulmonalis bypasson és intervenciós kardiológiai beavatkozáson átesett betegeknél.

Doktori tézis

Dr. Erdős Gábor

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola, Semmelweis Egyetem

Programvezető:	Prof. Vásárhelyi Barna egyetemi tanár, PhD.
Témavezető/Konzulens:	Dr. Kocsis István egyetemi docens, PhD.
Hivatalos bírálók:	Dr. Székely Andrea egyetemi docens, Ph.D., Dr. Padányi Rita tudományos munkatárs, Ph.D.
Szigorlati bizottság elnöke:	Dr. Várbíró Szabolcs egyetemi docens, Ph.D.
Szigorlati bizottság tagjai:	Prof. Dr. Darvas Katalin, egyetemi tanár, MTA doktora, Dr. Hupuczi Petronella, szakmai igazgató, Ph.D.

Budapest,

2015

Bevezetés

A szisztémás gyulladásos válasz szindróma (systemic inflammatory response syndrome, SIRS) súlyos, élet-veszélyes klinikai állapot. A SIRS prevalenciája magas, a hospitalizált betegek egyharmadát érinti.

Szívsebészeti beavatkozások esetén korábban fennálló problémák (pl. rossz balkamra-funkció, diabetes) és sebészeti tényezők (pl. sternotomia, pericardectomia vagy szívizom-ischaemia) patológiás gyulladásos választ válthatnak ki, és szervkárosodáshoz vezethetnek. Ezen kívül az extracorporalis keringés (extracorporeal circulation, ECC) is vezethet SIRS kialakulásához. Az ECC körben a vérnek levegővel vagy idegen felületekkel történő találkozása gyulladásos, véralvadási vagy komplement rendszert érintő reakciók komplex kaszkádját indíthatja be. Ha több olyan tényező is fennáll, amely hozzájárulhat ezekhez a reakciókhoz (pl. előre-haladott életkor, beavatkozás előtti egészségi állapot, perfúziós technika), az tovább ronthat a helyzeten, a pro- és antiinflammatorikus rendszer egyensúlya felborulhat, és SIRS alakulhat ki.

Az intervenciós kardiológiai beavatkozások közé tartozik a transzkatéteres aortabillentyű-implantáció (transcatheter aortic valve implantation, TAVI) transzfemoralis (TF-TAVI) vagy transzapikális úton (TA-TAVI). Bár TAVI esetén nincs ECC, a SIRS gyakori szövődmény. TAVI esetén 40-60 %-ban alakul ki SIRS, mely független rizikótényezője a a betegek rövidtávú kimenetelének és mortalitásának. A szívműtétek esetén látott mechanizmussal ellentétben a SIRS patogenezise és kiváltó tényezői TAVI esetén nem teljes mértékben ismertek. Jelenleg a beavatkozás alatt észlelt alacsony perctérfogat csak részben tehető felelőssé az ischeamias szervkárosodások és a SIRS kialakulásáért.

Célok

A jelen doktori tézis célja a különböző szívműtétek és kardiológiai intervenciók esetén a beavatkozás körüli időszakban kialakuló gyulladásos válasz és az immunrendszerben tapasztalt változások részletes megismerése.

1. CECC által kiváltott immun-moduláció vizsgálata CD62L leválási teszttel. A vizsgálat célja a konvencionális extracorporalis keringést (conventional extracorporeal circulation, CECC) alkalmazó szívműtétek körüli időszakban az immunrendszer érzékenységének változásának megismerése volt. A CECC által kiváltott immunmodulációt vizsgáltuk. Ehhez az immunválaszban résztvevő molekulák (azaz interleukinok) mennyiségét határoztuk meg. Továbbá az immunrendszer funkcionális állapotának meghatározásához új módszereket alkalmaztunk, mely során értékeltük a gyulladásos effektor sejtek válaszkészségét. Ez a módszer az úgynevezett CD62L leválási teszt, amely egy L-szelektin adhéziós molekulának (CD62L) a mikroorganizmusok által kiváltott stimulációja után a neutrophil sejtek felszínéről történő leválásának mértékét határozza meg, tehát információt ad a granulociták és monociták érzékenységéről.

2. A gyulladásos válaszreakció vizsgálata az AS kezelésében alkalmazott beavatkozások során. A vizsgálat célja az volt, hogy súlyos tünetekkel járó aorta stenosisban (AS) szenvedő betegeknél vizsgáljuk a gyulladásos választ a beavatkozás körüli időszakban.

Elsősorban az AS kezelésében alkalmazott szívsebészeti beavatkozásokat hasonlítottuk össze az intervenciós kardiológiai beavatkozásokkal. Noha CECC-t alkalmazó sebészi aortabillentyű-csere (surgical aortic valve replacement, SAVR) jelenleg az elsőként választandó eljárás, a TAVI egyre több központban elérhető bizonyos magas kockázatú betegeknél, akik több társbetegségben is szenvednek. Ezen betegeknél így elkerülhető az CECC.

3. *Az AS kezelésében alkalmazott* szívsebészeti *beavatkozások összehasonlítása a gyulladásos válasz szempontjából.* A vizsgálat az AS miatt kizárólag szívsebészeti beavatkozással kezelt betegeknél kialakuló gyulladásos választ vizsgálta. Elsősorban a CECC-t hasonlítottuk össze annak kevésbé invazív változatával, a minimalizált extracorporalis keringéssel (minimized extracorporeal circulation, MECC).

Módszerek

A szívsebészeti és a kardiológiai intervenciós beavatkozások az intézményi protokolloknak megfelelően történtek. A beavatkozások után 4 (2. és 3. vizsgálat), 24 (2. és 3. vizsgálat) és 48 órával (1., 2. és 3. vizsgálat) határoztuk meg a gyulladásos markerek szintjét és a CD62L leválás mértékét. Az első vérmintát (kiindulási érték) a beavatkozás előtt vettük, az anesztetikumok adása előtt.

CD62L leválás vizsgálata. A CD62L leválás vizsgálatához 25 ml citrátos teljes vért stimuláltunk lipoteicholsav (lipoteichoic acid, LTA) és tumor nekrózis faktor (TNF) 10-szeresére titrált oldataival, melyek kezdő koncentrációja 10 mg/ml és 20 ng/ml volt. Inkubáció után 1 %-os PBS/BSA-val mostuk, majd 15 percig 25 ml APC-vel jelölt anti-humán CD33 és FITC-vel jelölt anti-humán CD62L antitesteket tartalmazó 1 %-os PBS/BSA-val megfestettük a sejteket. A vörösvértesteket 200 ml FACS oldatban lizáltuk. A monocitákat és a granulocitákat a CD33 expresszió és az ún. „side scatter” alapján különítettük el. Az FITC fluoreszcencia intenzitásának medián értékét meghatároztuk minden minta granulocitái

és monocitái esetében, és a hígítási tényező függvényében ábrázoltuk, hogy párhuzamosan több agonista elemzését is elvégezhessük. Négyparaméteres görbéket illesztettünk non-lineáris regressziót alkalmazva, és meghatároztuk a LogEC50 értékeket. A LogEC50 értékét annál a hígításnál látjuk, ahol 50 %-os a granulociták vagy monociták CD62L leválásának mértéke. Kiszámítottuk a megfelelő ligandkoncentrációt, és minden ligand esetén elkészítettük a görbét.

HLA-DR expresszió. A humán leukociták (HLA-DR) expressziójához 50 µl heparinnal kezelt vért festettünk meg 20 µl anti-humán HLA-DR antitesttel szobahőmérsékleten, sötétben, 25 percig. A vörösvértesteket FACS lizáló oldattal lizáltuk, és az oldatot kétszer átmostuk foszfát puffert tartalmazó sóoldattal, majd 400 µl 4 %-os paraformaldehiddel fixáltuk. A minták flureszcenciájának mértékét LSR II áramlási citométerrel határoztuk meg. Összesen 500-1000 monocita-eseményt rögzítettünk. A FACS adatokat CD14- és CD64-pozítív monocita kapuzással analizálni tudjuk. A HLA-DR csatornát a PE gyöngyökből szár-mazó adatokkal kalibráltuk, ezáltal a fluoreszcencia intenzitását össze tudtuk hasonlítani a sejtenkénti PE molekulák átlagos számával. Az

eredményeket az egyes minták esetén a kalibrált PE csatorna esetén kapott fluoreszcencia intenzitás medián értékeként rögzítettük.

Citokin szint meghatározás. A citokineket (IL-6, IL-8, IL-10) ELISA módszerrel határoztuk meg a betegek plazmájában az egyes időpontokban. A plazmát 5 ml EDTA-val kezelt teljes vérből állítottuk elő 3000 g 5 perces centrifugálással, és a mintát -80 °C-on tároltuk.

sCD62L szint meghatározás. A solubilis L-szelektin (sCD62L) szintjét ELISA módszerrel határoztuk meg. A rendelkezésre álló 96 zsebes lemezt a gyártó utasításainak megfelelően kezeltük, és minden kontrollt és mintát kétszer vizsgáltunk. Az optikai denzitást eL800 mikrolemez leolvasóval mértük 450 és 630 nm-es szűrővel. Az üres értékeket és a 630 nm esetén mért OD értékeket kivontuk minden 450 nm esetén mért OD értékből, és minden minta sCD62L-szelektin koncentrációját standard 4-paraméteres görbe illesztésével határoztuk meg.

sTLR-2 szint meghatározás. A solubilis toll-like receptor (sTLR)-2 koncentrációt humán TLR-2 ELISA készlettel mértük. Az észlelési tartomány (standard görbe) 0,312–20 ng/ml volt, a vizsgálaton belüli (ún. intra-assay) és a

vizsgálatok közötti (ún. inter-assay) variáció 8 és 10% CV volt a gyártó leírásának megfelelően. Az ADAM17 mérése minden minta esetén hígítatlanul történt TACE humán ELISA készlet alkalmazásával a gyártó utasításainak megfelelően. Az észlelési tartomány (standard görbe) 78,15–5000 pg/ml volt, a vizsgálaton belüli és a vizsgálatok közötti variáció 10 és 12 % CV volt.

Eredmények

1. CECC által kiváltott immun-moduláció vizsgálata CD62L leválási teszttel. A granulociták és monociták érzékenysége az LTA-ra csökkent a szívműtét végére, de 48 óra múlva visszatért a kiindulási értékre. Az immunrendszer szenzitivitásának csökkenése nyilvánvaló volt, közel 10-szeresére nőtt a granulociták és monociták sejtfelszínéről 50 %-os CD62L leválás kiváltásához szükséges LTA koncentráció a kiindulási értékhez képest.

A granulociták TNF stimulációja csökkent érzékenységet mutatott a szívműtét végén, a CD62L membránhoz kötött részének 50 %-os leválásához a TNF koncentrációját 10-

szeresére kellett emelni. Ezzel szemben a monociták érzékenysége nem csökkent a műtét végén és 48 órával később sem.

A felszíni HLA-DR deniztásának medián értéke szignifikánsan csökkent a műtét végére. 48 órával később a monociták denzitása nem tért vissza a kiindulási értékre, de az első mintavételhez képest alacsonyabb maradt.

Az IL-8 szint szignifikánsan emelkedett a műtét végére az első mintavételhez viszonyítva. 48 órával később az IL-8 szintje csökkent a műtét alatt vett mintával összehasonlítva, a műtét előtti értéket azonban nem érte el. Az IL-8 koncentráció 48 órával később továbbra is szignifikánsan magasabb volt az első mintavételhez képest.

Az sCD62L plazmaszintje szignifikánsan csökkent a műtét végére. 48 órával később ez az érték továbbra is alacsonyabb volt az első mintavételhez képest, ami arra utal, hogy az sCD62L 48 óra múlva nem érte el a műtét előtti értéket.

Az sTLR-2 szignifikánsan emelkedett a műtét végére. A csúcs után az sTLR-2 szintje csökkeni kezdett, mini-

mumát 48 óra múlva érte el, a műtét végén mért értékhez képest ez szignifikánsan alacsonyabb volt.

Az ADAM17 szint folyamatosan emelkedett a peri-operatív időszakban, szignifikáns különbség a két mintavételi időpont között azonban nem alakult ki.

2. A gyulladásos válaszreakció vizsgálata az AS kezelésében alkalmazott beavatkozások során valamint a 3. *Az AS kezelésében alkalmazott* szívsebészeti *beavatkozások összehasonlítása a gyulladásos válasz szempontjából.* A plazma HLA-DR szintje a négy kezelési modalitás esetén másképp változott. A HLA-DR legmagasabb kiindulási értéke MECC-vel kezelt betegeknél volt látható. Ebben a betegcsoportban a HLA-DR folyamatosan csökkent, minden időpillanatban más értéket kaptunk a kiindulási értékhez viszonyítva. CECC, TF-TAVI és TA-TAVI betegeknél a HLA-DR szintje sokkal alacsonyabb volt. CECC és TA-TAVI esetén a betegek HLA-DR szintje eltért a kiinduláskor mért értéktől minden mintavételi időpontban. TF-TAVI betegeknél a HLA-DR értéke a műtét után 4 és 24 órával szignifikánsan csökkent a kiindulási értékhez viszonyítva. 48 órával később a HLA-DR szintje TF-TAVI esetén nem

különbözött szignifikánsan a kiinduláskor látott értékektől.

A plazma IL-6 szintje eltérő módon változott a négy kezelési modalitás esetén. A legnagyobb emelkedés a TA-TAVI csoportban alakult ki, és a legmagasabb értéket a beavatkozás után 4 órával érte el. A TA-TAVI, MECC és CECC csoportokban is a beavatkozás után 24 órán belül alakult ki a legmagasabb érték, de az utóbbi értékek alacsonyabbak voltak. A legkisebb IL-6 felszabadulás a TF-TAVI csoportban volt tapasztalható, csupán kis emelkedés jött létre a megfigyelés alatt. Az IL-6 plazmaszintje minden csoportban eltért a kiindulási értéktől. A megfigyelési időszak végére egyik csoportban sem tért vissza az érték a kiindulási értékre. Az IL-8 szintje eltérő módon változott a négy kezelési modalitás esetén. A legnagyobb emelkedés a beavatkozás után 4 órával alakult ki a CECC csoportban, második legmagasabb érték a MECC csoportban volt látható. A TF-TAVI és TA-TAVI csoportokban a legmagasabb érték a beavatkozás után 4, illetve 24 órával alakult ki. Kardiológiai intervención áteső betegeknél nem alakult ki szignifikáns különbség a megfigyelés alatt. Ezzel szemben az IL-8 plazmaszintjének változása a CECC és MECC csoportokban

szignifikánsan különbözött a beavatkozás körüli időszakban. A MECC csoportban az IL-8 plazmaszintje 4 és 48 órával a beavatkozás után szignifikánsan eltért a kiindulási értéktől. A CECC csoportban az IL-8 szignifikánsan különbözött a kiindulási értéktől a beavatkozás után 4, 24 és 48 órával. Szívsebészeti beavatkozások esetén az IL-8 értéke nem tért vissza a kiindulási szintre a megfigyelés végére szemben a kardiológiai intervenció esetén tapasztalt változásokkal. Az IL-10 szintje hasonló módon változott a négy kezelési modalitás esetén. A legmagasabb IL-10 értéket a CECC csoportban mértük, ezt követte a MECC csoport. Az intervenciós csoportban az IL-10 legmagasabb szintje TA-TAVI után 4 órával és TF-TAVI után 24 órával alakult ki, ezek az értékek azonban alacsonyabbak voltak, mint a szívsebészeti beavatkozás esetén látott értékek. Kardiológiai intervenció esetén az IL-10 plazmaszintje szignifikánsan különbözött a kiindulási értéktől a beavatkozás után 4 és 24 órával. Az IL-10 szintje mindkét csoportban visszatért a kiindulási értékre a megfigyelési időszak végére. Hasonlóan a MECC csoportban sem különbözött szignifikánsan az IL-10 szintje az egyes mintavételi időpontokban és a megfigyelési időszak végén. A CECC csoport-

ban az IL-10 értéke a beavatkozás után 4 és 24 órával eltért a kiindulási értéktől. A megfigyelés végén azonban az IL-10 szintje a CECC csoportban hasonló volt a kiindulási értékhez.

A sCD62L szintje eltérő módon változott a négy kezelési modalitás esetén. A legmagasabb értékek a MECC csoportban alakultak ki, a második legmagasabb értékeket pedig a CECC csoportban mértük. A MECC csoportban az sCD62L szintek csupán a beavatkozás után 4 és 48 órával különböztek a kiindulási értékektől, a CECC csoportban azonban a sCD62L értékei minden időpontban eltértek a kiindulási értékektől. A szívsebészeti beavatkozáson átesett betegeknél a sCD62L értéke tehát nem tért vissza a kiindulási értékre a megfigyelési időszak végén. A kardiológiai intervención átesett betegeknél a sCD62L szintjében nem tapasztaltunk kiemelkedő értékeket a megfigyelési időszakban.

Következtetések

- Munkánk eredményei alapján a SIRS és az ehhez társuló csökkent immunitás minden szívsebészeti beavatkozás és kardiológiai intervenció esetén megfigyelhető.

- A perioperatív immunmoduláció mértéke mérhető hagyományos gyulladásos markerek szintjének mérésével és a CD62L leválás vizsgálatával is. Az utóbbi információt szolgáltathat a perioperatív immunmoduláció mértékéről, és többet megtudhatunk a beavatkozások körüli időszakban a gyulladásos folyamatok modulációjáról.

- Az ECC hatással van a gyulladásos válaszra.

- A CECC-vel kezelt betegeknél látható a legkifejezettebb gyulladásos válasz.

- A TF-TAVI-n átesett betegeknél kisebbmértékű a gyulladásos válasz.

- Az extracorporalis rendszer alkalmazása nem az egyetlen tényező, amely befolyásolja a gyulladásos molekulák felszabadulásának mértékét.

- A betegek kezelés előtti állapota és a myocardium károsodásának mértéke is befolyásolja a gyulladásos folyamatokat.

- Adott kezelési modalitás után a gyulladásos válasz időbeli lefolyása és mértéke nem jósolja meg előre a betegség lefolyását a posztoperatív időszakban, és a beteg kimenetelével sem áll közvetlen kapcsolatban.

- Az eredményeink alapján a vizsgált változók (CECC, MECC, TAVI) csupán egy-egy tényezőt képviselnek azon tényezők közül, amelyek a betegek beavatkozás utáni kimenetelét befolyásolják.

Doktori tézishez kapcsolódó publikációk:

- **Gabor Erdoes**, Christoph Lippuner, Istvan Kocsis, Marcel Schiff, Monika Stucki, Thierry Carrel, Stephan Windecker, Balthasar Eberle, Frank Steuer, Malte Book. (2015) Technical Approach Determines Inflammatory Response After Surgical and Transcatheter Aortic Valve Replacement. PLoS One, DOI: 10.1371/journal.pone.0143089 (in press). **IF 3.234**

- **Erdoes G**, Balmer ML, Slack E, Kocsis I, Lehmann LE, Eberle B, Stuber F, Book M. (2013) CD62L (L-selectin) shedding for assessment of perioperative immune sensitivity in patients undergoing cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. PLoS One, 8: e53045. **IF 3.354**

- Wenaweser P, Pilgrim T, Kadner A, Huber C, Stortecky S, Buellesfeld L, Khattab AA, Meuli F, Roth N, Eberle B, **Erdos G**, Brinks H, Kalesan B, Meier B, Juni P, Carrel T, Windecker S. (2011) Clinical outcomes of patients with severe aortic stenosis at increased surgical risk according to treatment modality. J Am Coll Cardiol, 58: 2151-2162. **IF 14.156**

- Wenaweser P, Pilgrim T, Roth N, Kadner A, Stortecky S, Kalesan B, Meuli, F, Bullesfeld L, Khattab AA, Huber C, Eberle B, **Erdos G**, Meier B, Juni P, Carrel T, Windecker S. (2011) Clinical outcome and predictors for adverse events after transcatheter aortic implantation with the use of different devices and access routes. Am Heart J, 161: 1114-1124. **IF 4.651**

A Doktori tézishez nem kapcsolódó publikációk (kivonat a 2015. évből)

- Reineke D, Winkler B, Konig T, Meszaros K, Sodeck G, Schonhoff F, **Erdoes G**, Czerny M, Carrel T. (2015) Minimized extracorporeal circulation does not impair cognitive brain function after coronary artery bypass grafting. Interact Cardiovasc Thorac Surg, 20: 68-73. **IF 1.155**

- Boehme S, Bentley AH, Hartmann EK, Chang S, **Erdoes G**, Prinzing A, Hagmann M, Baumgardner JE, Ullrich R, Markstaller K, David M. (2015) Influence of inspiration to expiration ratio on cyclic recruitment and derecruitment of atelectasis in a saline lavage model of acute respiratory distress syndrome. Crit Care Med, 43: e65-74. **IF 6.312**

- **Erdoes G**, Kadner A, Hutter D, Eberle B. (2015) Transcranial Doppler-guided deairing of a pediatric ventricular assist device: experience with twins. A A Case Rep, 4: 5-7. **IF 3.472**

- **Erdoes G**, Gerster G, Colucci G, Kaiser H, Alberio L, Eberle B. (2015) Prediction of Post-Weaning Fibrinogen Status during Cardiopulmonary Bypass: An Observational Study in 110 patients. PloS One, 10: e0126692. **IF 3.234**

- Schiefer J, Lebherz-Eichinger D, **Erdoes G**, Berlakovich G, Bacher A, Krenn CG, Faybik P. (2015) Alterations of Endothelial Glycocalyx During Orthotopic Liver Transplantation in Patients with End-Stage Liver Disease. Transplantation, 2015 Mar 9. [Epub ahead of print] **IF 3.828**