

# Thrombocyta és thrombocyta eredetű mikropartikulum vizsgálatok súlyos szepszisben

---

Szerző: Dr. Woth Gábor

Témavezető és iskolavezető: Prof. Dr. Kovács L. Gábor Ph.D.,  
Társ-témavezető: Dr. Mühl Diana Ph.D.

Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Intézet,  
Laboratóriumi Medicina Intézet,  
Pécsi Tudományegyetem

2013 Június



# Rövidítések listája

**ADP:** Adenozin difoszfát, **ADR:** Adrenalin, **BUN:** Szérum urea nitrogén, **COL:** Kollagén, **CRP:** C-reaktív protein, **GP:** Glycoprotein, **IL:** Interleukin, **MP:** Mikropartikulum, **PCT:** Procalcitonin, **PMP:** Thrombocyta eredetű mikropartikulum, **PS:** Foszfatidilszerin, **SAL:** Fiziológias, 0.9%-os NaCl oldat, **SIRS:** Szisztémás Gyulladásos Válaszreakció, **SSC2008:** Surviving sepsis Campaign 2008, **TF:** Szöveti faktor, **TLR:** Toll like receptor, **TNF- $\alpha$ :** Tumor nekrozis faktor-alpha, **VWF:** von Willebrand factor

## Bevezető

A gyulladás és szepszis tünetei már történelmi feljegyzésekben is fellelhetők, a szisztémás gyulladásos válaszreakció (*ang.* Systemic Inflammatory Response Syndrome, SIRS) pontos definíciója mégis csak 1991 –ben született meg. A SIRS diagnózisához legalább két diagnosztikus kritériumnak kell teljesülnie az alábbi feltételek közül: hypothermia vagy hyperthermia ( $<36^{\circ}\text{C}$ , vagy  $>38^{\circ}\text{C}$ ), szapora szívritmus ( $>90/\text{min}$ ), hyperventilatio (légzésszám:  $>20/\text{min}$ , vagy artériás parciális szén-dioxid nyomás:  $< 32$  Hgmm), fehérvérsejt szám  $> 12000$  sejt/ $\mu\text{l}$ , vagy  $< 4000$  sejt/ $\mu\text{l}$ . A jelenleg érvényben lévő definíció szerint szepszisnek tekintjük az infekciós háttér mellett kialakult SIRS-et. Súlyos szepszisben legalább egy életfontos szervfunkciók zavar áll fenn gyulladásos eredettel, míg septicus sokkban a megfelelő folyadékterápia ellenére a hypotenzió perzisztál egyéb oki tényező nélkül.

A szepszist általában egy fertőzés megjelenésére adott komplex, de nem megfelelő reakcióként lehet definiálni. Annak ellenére, hogy jelenlegi modelljeink alapján a szervezet válaszreakcióit tekintjük fő felelősnek, egyértelműen bizonyított, hogy az egyes kórokozók virulencia faktorai (pl. bakteriális ligandok, adhézis és kolonizációs faktorok) is részt vesznek a kórkép kialakításában. A veleszületett immunrendszer felelős a "nem-saját" és a "sérült-saját" struktúrák mintázatfelismerő (toll-like receptorok, TLR-ek) receptorokon keresztül történő azonosításáért. A patogén-asszociált és sérüléssel összefüggő mintázatok normálisan nem jelennek meg a gazdaszervezetben, viszont mind Gram-pozitív, Gram-negatív, bakteriális, gomba és virális felszíneken megtalálhatóak, vagy sejtsérülés kapcsán képződő struktúrákon vannak jelen. Az aktivált leukocyták felszínén lévő TLR-ek pro-inflammatórikus citokinek, interleukin-1 $\beta$  (IL), IL-6 és tumor nekrozis faktor alfa (TNF- $\alpha$ ) szekréciónak váltják ki, ezáltal aktiválják a veleszületett immunrendszer további sejtjeit, illetve a környező sejtszöveteket és további citokin kiválasztást indítanak el. Az aktivált leukocyták képesek elhagyni a keringést és a gyulladásos szövetek irányába migrálni. A pro-inflammatórikus citokinek indukálják az eikozanoid szintézist és thrombocyta aktiváló faktor kibocsátását, ezáltal fokozzák az érfal permeabilitását és thrombocyta aktivációt. A hiszocytákból és bazophil granulocytákból felszabaduló komplement C3a

és C5a anafilatoxinok tovább fokozzák a vaszkuláris permeabilitást és simaizom összehúzódást válthatnak ki.

A megváltozott vaszkuláris funkció kiemelt szerepet játszik a septicus szervenégtelenségek kialakulásában. Az endothel sejtek saját TLR receptoraikon keresztül és gyulladásos citokinek jelenléte miatt aktiválódnak, a helyi thrombomodulin koncentráció csökken, míg a szöveti faktor (*ang. tissue factor*, TF) és plazminogén aktivátor inhibitor-1 szintje emelkedik. Az aktivált endothel sejtek prokoaguláns felszínnel rendelkeznek, elősegítik a polimorfonukleáris sejtek kitapadását és diapedezését. A fokozott TNF- $\alpha$  szint intravaszkuláris folyadékvesztést okoz, helyi ödémák kialakulását és a szöveti oxigenizáció romlását idézi elő.

A renális keringés autoregulációjának károsodása a fokozott katekolamin szintek, endothel sérülés, mikroaggregátumok képződése és leukocyta diapedesis miatt tubuláris dysfunkciót okoz. A vesefunkció a septicus betegek közel felében csökken, a korábban említett faktorok mellett a nitrogén monoxid direkt hatása, az angiotenzin és az endothelin szerepe feltételezett. A metabolikus acidózis kialakulása kreatinin és szérum nitrogén termékek (*ang. blood urea nitrogen*, BUN) felszaporodása mellett egyértelmű jele a veseérintettség kialakulásának. Az akut szepszissel összefüggő vesefunkciós zavart a RIFLE kritériumok alapján osztályozhatjuk.

Súlyos szepszisben a Virchow triász klasszikus elemei is jelen vannak (fokozott koaguláció, endothel funkciós zavar, károsodott keringés). A kibocsátott citokinek és aktivált sejtcsoportok jelentősen hozzájárulnak a hemostasis egyensúlyának prokoaguláns irányú eltolódásához. Az antikoaguláns proteinek és koagulum bontásáért felelős enzimek leköötődnek a környéki sejtekhez, befolyásolják azok funkcióját. Ezen faktorok elősegítik a gyulladást, hozzájárulnak a szöveti faktor eredetű thrombin generációhoz, antikoagulációs zavart okoznak és csökkentik a fibrinolízist.

**Thrombocyta aktiváció és aggregáció:** A glycoproteineknek (GP) nevezett speciális felszíni glycoalyx elemek több thrombocyta funkcióban is fontos szerepet töltenek be. A haemostasisban kiemelt fontosságúak a GPIb-V-IX és GPIIb-IIIa fehérjék. Míg az előbbiek a thrombocyták nyíróerő általi aktivációjáért, a von Willebrand faktor (VWF) és kollagén kötéséért felelősek, a második csoport a fibrinogén kötésben és aggregátum képződésben játszik szerepet. Klasszikusan a thrombocyta aggregáció 3 fő lépését különböztetik el: iniciációs, extenziós és fenntartó fázis. A kezdeti lépést kiválthatja a kollagénnel való találkozás, VWF kötés a sérült érfalon és a thrombocyta monolayer kialakulása az érintett szakaszokon. A kollagén az  $\alpha 2\beta 1$  és GPIV receptorokon keresztül, a VWF a GPI $\alpha$  és  $\alpha 2\beta 3$  receptorokon hat. A VWF kötés létfontosságú az adhézió és rolling kialakulásában a magas nyíróerővel járó keringési szakaszokon. A kezdeti kötődést egy kismértékű  $Ca^{2+}$  csúcs követi, mely adenosin-difoszfát (ADP) felszabadulással jár, mely a P2Y<sub>1</sub> receptorokon aktiválja a környező nyugvó thrombocytákat, fenntart egy G<sub>i</sub> mediált pozitív visszacsatolást és fokozza a

thrombocyták ciklikus adenosin-monofoszfát szinteket. Az adhézió kialakulását követően a fokozott  $Ca^{2+}$  szint beindítja a thrombocyták aggregációt.

**A mikropartikulumok (MP) keletkezése és szerepe:** A MP-t Wolf írta le először 1967-ben, a thrombocyták szegény plazmában felfedezte a "thrombocyták port", valamint bemutatta, hogy ultracentrifugációval ez a por eltávolítható, így a plazma prokoaguláns képessége megszűnik. A jelenleg elfogadott elmélet szerint a MP képződés a lipid kettősmembránok aszimmetria vesztésével függ össze. Sejtaktiváció, apoptózis vagy fokozott nyíróerő hatására a külső membránban megjelenik a (ang. foszfatidylserine, PS). A „klasszikus” modell szerint az intracelluláris  $Ca^{2+}$  emelkedés szükséges a MP képződéshez. A cytoskeleton  $Ca^{2+}$  mediálta átrendeződését a kalpainok segítik elő. A lefűződött MP (elsősorban a thrombocyták eredetű, *ang.* platelet-derived MP, PMP) membránja közel 60% koleszterin, szfingomyelin, foszfatidiletanolamin, illetve PS.

Az elmúlt 20 évben a laboratóriumi eszközök fejlődése nagyban elősegítette a MP kutatást. Prokoaguláns szempontból a TF szállítása tekinthető egyik fő feladatuknak. Aktivációt és lefűzödést követően a PMP-k TF-t expresszálnak, felszíni receptoraik és ligandjaik segítségével képesek a keringő makrofágok, neutrophilek és nyugvó thrombocyták kötésére és aktivációjára. Del Conde és mtsai. szerint a monocyták/makrofág eredetű MP-k képesek aktivált thrombocytával fúzionálni PS és P-selectin glycoprotein ligand-1-en keresztül, így TF gazdag thrombocytát létrehozni, mely teoretikusan teljes hemostasis apparátussal rendelkezik. Koppler és Gasser megfigyelése szerint a korai gyulladáshoz való válaszból képződött MP-ok inkább anti-inflammatórikus (TGFB-1, IL-10), míg a késői válaszból pro-inflammatórikus tulajdonságokkal rendelkeznek (CCR3, CCR4, IL-6). Sejtvédő szerepükre Abid-Hussein és mtsai. hívták fel a figyelmet, kaszpáz-3 tartalmú MP lefűzödés gátlása egyértelműen fokozott apoptózissal járt a kezelt endothel sejteken. Több betegségben fokozott MP mennyiségeket mutattak ki különféle testfolyadékokban, de pontos szerepük a fiziológiai és patológiai folyamatokban egyelőre nem tisztázott.

# Célkitűzések

## **Thrombocyta aggregáció súlyos szepszisben:**

- 1, Vizsgáltuk az indukálható aggregáció változását súlyos szepszisben.
- 2, Mértük a csökkent thrombocyta szám hatását az indukálható aggregációra.
- 3, Vizsgáltuk a spontán aggregáció szerepét és megjelenését súlyos szeptikus betegekben.

## **Mikropartikulum vizsgálatok súlyos szepszisben:**

- 1, Vizsgáltuk az infekciót kiváltó különböző kórokozók szerepét a MP profilra szepszisben.
- 2, További adatokat gyűjtöttünk a jelenlegi szepszis-MP modell támogatására.
- 3, Vizsgáltuk a kapcsolatot az egyes szervegtelenségek kialakulása és a MP megjelenése között.

# Betegek és módszer

Betegbevételi kritériumunk a korán felismert súlyos szepszis (24 órán belül), kettő vagy több szervegtelenséggel. Szepszis kritériumaink megegyeztek a bevezetőben említett kritériumokkal, kiegészítve a 10 mg/l -t meghaladó C-reaktív protein és 2 ng/ml (a gombás MP studyban 5 ng/ml) feletti procalcitonin (PCT) szintekkel. A végstádiumú betegeket, bármilyen hematológiai alapbetegségben szenvedő beteget, az elmúlt 30 napban citostatikus kezelésben részesülteket, nagy dóziszú, hosszú ideig tartó szteroid terápiát kapó betegeket, azokat akiknél a disszeminált intravaszkuláris koagulációs pont 5 felett volt, illetve thrombocyta funkciót módosító gyógyszeres kezelésben részesülteket kizártuk tanulmányainkból.

Thrombocyta aggregációhoz 3 × 2,7ml Na<sub>3</sub>-citrát alvadásgátolt vért gyűjtöttünk betegeinktől, míg a MP tanulmányokban 2 × 2,7 ml Na<sub>3</sub>-citrátos vért használtunk fel valamennyi mérési időpontban. Az aggregációs mérések Carat TX4 optikai aggregométerrel készültek adrenalin (ADR, 10 μmol), ADP (10 μmol), kollagén (COL, 2 μg/ml) és fiziológiás sóoldat (SAL) induktorokkal. Mikropartikulum izolációt többlépéses centrifugálással végeztünk, utolsó lépésként 10 percen át 18000 g energiával MP-t pelletáltunk, majd PS tartalmukat annexin V-el, specifikus antigénjeiket fluoreszcens jelölt monoklonális antitestekkel jelöltük. Az aktivált thrombocyták fibrinolitik konformációjú α<sub>2</sub>β<sub>3</sub> receptorát a PAC-1 antitesttel, a konstitutívan expresszált GPIIb-IIIa receptor a CD41 és CD61 antitestekkel vizsgáltuk. Az adhéziós receptor GPIb-V-IX az anti-IX (CD42a)-el jelöltük. Az áramlási citometriás vizsgálatok Cytomics FC500

eszközrel készültek, CXP szoftverrel értékeltük az adatokat. MP kaput definiáltunk, a mérési háttérzaj minimalizálása érdekében, méretkapuként ismert 0,3, 0,5 és 1,0  $\mu\text{m}$  átmérőjű polisztiirén mikrogöngyöket használtunk. A forward és side scatter mérések logaritmikus skálán történtek, MP méretkapuba a 0,5-1,0  $\mu\text{m}$  tartományt vettük be. Az MP kapuba esett események közül csak az annexin V pozitív eseményeket értékeltük, pozitívnak tekintettük az izotípus feletti intenzitású jelölést. Thrombocytopenia kritériumaként a Surviving Sepsis Campaign 2008 (SSC2008) értékét fogadtuk el (100000 sejt/ $\mu\text{l}$ ). Mikrobiológiai eredményeink standard tenyésztéses vizsgálatokon alapultak. Az akut szeptikus veseelégtelenség kialakulását a RIFLE kritériumok „Injury” állapota alapján definiáltuk (szérum kreatinin normál  $\times 2$ ,  $>50\%$  csökkent filtrációs ráta, vagy vizelet produkció  $<0,5$  ml/ttk/óra).

## Eredmények

**Thrombocyta aggregációs vizsgálat:** 45 beteget vettünk be vizsgálatunkba, eredményeinket 30 fős kontroll csoporttal vetettük össze. A szeptikus csoportban szignifikánsan csökkent aggregációs eredményeket mértünk minden klasszikus induktorral ( $p < 0.05$ ), míg SAL esetében fokozott aggregáció volt szeptikus betegekben ( $p < 0.001$ ). Felvételkor 19 beteg került az alacsony thrombocyta számú, 26 beteg a normál thrombocyta számú csoportba a SSC2008 definíciója alapján. A betegcsoportok között nem volt szignifikáns eltérés a demográfiai és klinikai adatokban. Az ADP indukált aggregáció minden mérési napon, az ADR aggregáció a 2-5. napokon, a COL aggregáció az 1., 2., 3. napokon volt szignifikánsan csökkent az alacsony thrombocyta számú csoportban. A SAL aggregációban nem mutatkozott érdemi különbség, a normál thrombocyta csoportban lassú emelkedés volt tapasztalható az indukálható aggregációban a vizsgálat ideje alatt. A kontroll csoporthoz viszonyítva a normál thrombocyta számú csoport eredményei csökkentek voltak, kivéve az ADR aggregáció a 3., 4., 5. napokon és az ADP aggregáció az 5. napon ( $p < 0.05$ ). Az alacsony thrombocyta csoport minden eredménye szignifikánsan csökkent a kontrollhoz képest ( $p < 0.001$ ). 14 beteg halt meg a vizsgálat alatt, 31 beteg alkotta a túlélő csoportot. Nem találtunk szignifikáns eltérést a thrombocyta szám, az indukált és SAL aggregáció vonatkozásában a elhunytak és a túlélők között. A spontán aggregációs csoport (14 beteg) thrombocyta mennyisége szignifikánsan nem különbözött a spontán nem aggregáló csoporttól, de szignifikánsan alacsonyabb PCT és laktát szinteket mértünk ezeknél e betegeknel. A kortikoszteroid terápia hatását az aggregációra nem tudtuk bizonyítani vizsgáltunk során. Az összes vizsgált betegből 36 esetben volt pozitív mikrobiológiai diagnózis, 7 betegnél kizárólag Gram-negatív fertőzés volt jelen. Vizsgálatunk alapján a Gram-negatív fertőzés szignifikánsan nem járult hozzá a spontán aggregáció kialakulásához.

**Mikropartikulumok súlyos szepszisben:** Első MP tanulmányunk során 57 beteget készültünk bevonni, majd a kizárási kritériumok (16 fő) és beleegyező elutasítása miatt (8 fő), végül 33 beteg adta beleegyezését. A vizsgálat időtartama alatt vett mikrobiológiai minták alapján betegeinket kevert gombás és bakteriális fertőzésben szenvedő csoportokba soroltuk. A betegek demográfiai és klinikai paraméterei, prognosztikus pontszámai nem mutattak szignifikáns különbséget. Adatainkat 20 fő korban és nemi megoszlásban illesztett kontroll csoport és a szепtikus betegek adatai között sem mutatkozott különbség. Hat beteg alkotta a kevert gombás csoportot, míg 27 beteg került a nem-gombás csoportba. Mikrobiológiai mintavétel bizonyította a *C. albicans* jelenlétét mind a hat esetben. Kettő beteg a gombás és 5 a nem-gombás csoportból elhunyt a vizsgálati idő alatt. Felvételnkor a teljes annexin V<sup>+</sup> MP és CD41<sup>+</sup> PMP mennyisége emelkedett volt mind a kevert gombás, mind a nem-gombás csoportokban a kontrollokhoz képest. A MP-ok jelentős része (közel 60%) pozitív volt CD41-re, ezért PMP-nek tekintettük őket. Míg a kevert gombás csoport emelkedett MP mennyisége kis mértékben csökkent a 3. napon, a nem-gombás csoport folyamatosan, lassan csökkenő tendenciát mutatott. A kevert gombás csoport MP emelkedése szignifikáns volt az 1. napon a nem-szeptikushoz képest ( $p < 0,05$ ). A CD41<sup>+</sup> PMP-k mennyisége csökkent az 5. vizsgálati napig a nem-gombás csoportban, de folyamatosan magas volt a kevert gombás betegeknél. Statisztikailag szignifikáns volt az emelkedés az 1. napon ( $p < 0,05$ ). A CD61 eredmények statisztikailag megegyeztek a CD41 eredményekkel. Míg a CD42a<sup>+</sup> PMP-k mennyisége elhanyagolható volt a nem-gombás csoportban és kontrollokban, míg szignifikánsan emelkedett volt minden mérési időpontban a kevert gombás csoportban ( $p < 0,05$ ). Annak ellenére, hogy a PAC1<sup>+</sup> PMP-k kismértékű csökkenését figyeltük meg kevert gombás betegeknél az 5. napig, ezen betegeknél szignifikánsan emelkedett PAC1<sup>+</sup> PMP-k voltak az 1. és 5. mérési napon ( $p < 0,05$ ). ROC analízis alapján a PAC1 és CD42a PMP mérések 0,857 és 0,897 görbe alatti területtel rendelkeztek a kevert gombás fertőzés jelenlétére. A különböző bakteriális kórokozók (Gram-pozitív vagy Gram-negatív felosztásban) a nem-gomba fertőzöttekben nem okoztak szignifikáns különbséget a MP profilokban, ahogy a különböző csoportok (Gram-pozitív, Gram-negatív, gombás) thrombocytá számában sem találtunk szignifikáns különbséget.

A citometriás eredmények és betegadatok újraértékelését követően 37 beteg adatát vizsgáltuk az összesen 65 követett esetből. Ezen tanulmányunkban a szepszis kimenetelére, egyes szervelégtelenségek kialakulására, valamint ezek MP profillal egyezésére koncentráltunk. A szепtikus betegek jelentős része veseelégtelenségben szenvedett, így főleg ezen elváltozás hatásaira fókuszáltunk. A szепtikus betegek MP mennyiség mérése a kontroll csoporthoz képest szignifikánsan emelkedett eredményeket hozott az annexin V és CD41 pozitív partikulumok esetében ( $p < 0,001$ ). A CD42a<sup>+</sup> partikulumok mindvégig emelkedettek voltak a szепtikusokban ( $p < 0,001$ ). A PAC1 magas összmenyiségről indulva folyamatosan lassú emelkedést mutatott az 5.

napig ( $p < 0,05$ ). A CD41, CD42a, PAC1 partikulumok megjelenése nem korrelált a thrombocytá számmal.

Eredményeink alapján a túlélő és nem-túlélő betegek eredményei mind a 7 napos, mind a 28 napos mortalitás tekintetében nem mutattak szignifikáns MP mennyiségi különbséget. Az egyes szervelegtelenségek száma és a teljes MP, CD13 vagy CD14 pozitív mennyisége között sem volt összefüggés. Az egyes szervelegtelenség vizsgálata kimutatta, hogy a veselegtelenségben szenvedő betegek esetében szignifikáns különbség van a MP profilban a veselegtelenség nélkül felvettekkel szemben. A teljes annexin V pozitív, CD41<sup>+</sup> és CD13<sup>+</sup> MP-ok fokozott megjelenését találtuk akut veselegtelen septicus betegekben. Annak ellenére, hogy a betegek változó teljes MP mennyiséggel rendelkeztek, a veselegtelenek emelkedett mennyiségeket mutattak felvételnél és kismértékű csökkenést a 3. napig. A veselegtelenség nélkül felvettek eredményei fokozatosan emelkedtek a vizsgálat ideje alatt ( $p < 0,05$ ). A CD41<sup>+</sup> MP-ok mennyisége már emelkedett volt veselegtelenekben, míg a többi betegben inkább fokozatos emelkedést mutatott. A CD13<sup>+</sup> eredmények a CD41-hez hasonlóan mozogtak a vizsgálat ideje alatt.

Az összesített adatok alapján a CD42a<sup>+</sup> MP-ok mennyisége negatívan korrelált a szérumban kreatinin és BUN eredményekkel ( $p < 0,05$ ,  $r = -0,835$ ,  $r = -0,569$ ). Egyéb szepszis-eredetű szervfunkciós zavar esetében (keringési elégtelenség, tudatzavar, légzési elégtelenség, thrombocytopenia/csontvelő elégtelenség, májelégtelenség) nem találtunk hasonló összefüggéseket.

## Megbeszélés

Első vizsgálatunk fő célja az indukálható aggregáció vizsgálata volt súlyos septicus betegekben és annak megítélése, hogy mindez felhasználható-e mortalitás prediktorként? Korábbi, áramlási citometriát alkalmazó thrombocytá vizsgálatok már bemutatták a thrombocytá aggregációs funkció sérülését többszervi elégtelenségben. Adataink alapján az ADR, ADP és COL indukálható aggregáció csökkent a kontroll csoporthoz képest, de szignifikánsan nem változott a megfigyelési idő alatt. Yaguchi és mtsai. hasonlóan csökkent aggregációt találtak szepszisben, míg más tanulmányok fokozott aggregációt traumát követő septicus esetekben. Yaguchi eredményeivel megegyezően mi is csökkent aggregációt találtunk súlyos septicus betegekben, meglepő módon Yaguchi tanulmányában habár a PAC1 és a fibrinogén kötő képesség csökkent, a CD62P jelenléte fokozott volt septicus betegekben. Lundahl teóriája alapján a könnyebben aktiválható, fiatalabb thrombocyták használnak fel korábban a keringésből, ezért feltételezhető, hogy az aggregációs funkció csökkenni fog. Tanulmányunkban a túlélő és nem-túlélő csoportok spontán aggregációjában nem találtunk különbséget. Mivel a thrombocytá sequestratio bekövetkezhet septicus



állapotban, úgy gondoljuk eredményünk sem alátámasztani, sem cáfolni nem képes Eisen teóriáját, de bizonyítja, hogy az aggregációs vizsgálat nem jó mortalitási prediktor. Eddig súlyos szeptikus betegek esetében nem vizsgálták a SAL hatását és a spontán aggregáció jelenlétét, annak ellenére, hogy korábbi tanulmányokban már használták. Szeptikus betegek esetében fokozott spontán aggregációt figyeltünk meg egészséges kontroll esetekhez képest. A fokozott PCT szintek a spontán nem aggregáló csoportban feltételezik, hogy ezen csoportba került betegek súlyosabb állapotúak voltak a spontán aggregációs csoporthoz képest. Annak ellenére hogy tisztában vagyunk a laktát szintek gyenge specificitására és szenzitivitására a mikrocirkuláció megítélésében, ezen paraméter alapján úgy tűnik a szöveti oxigenizációban nem volt lényegi különbség a két csoport között. A laktát szintek eltéréseiben jelentkező hiány lehetséges velejárója a megfelelő folyadék és szervtámogató kezelésnek.

A hemosztázisban és aggregációban betöltött szerepük mellett a thrombocyták korai immunválaszban és gyulladásos folyamatokban való részvétele régóta kutatott téma. Yeaman és mtsai. vizsgálták a thrombocyták reakcióit a sérült endothel és patogének jelenléte irányában. Egyes baktérium és gomba törzsek képesek a thrombocyták aktivációját kiváltani, majd az aktivált thrombocyták aggregátum képzéssel a kórokozót a sérült érfa környékén "lehorgonyozni". Ezzel egyidőben a thrombocyták antimikrobiális anyagokat, thrombocidineket szekretálnak környezetükbe, melyek bakteriosztatikus, vagy -cid hatással rendelkeznek bizonyos törzsekkel szemben, míg mások rezisztenciát fejlesztettek ki. A thrombocyta aktiváció fokozódása és adhéziós markerek megjelenése a PMP felszínén a thrombocyták immunológiai szerepére utalhat. Korábban ellentmondó adatok jelentek meg a MP mennyiségéről szepszisben. Joop és mtsai. csökkent MP mennyiségről számoltak be (thrombocyta, erythrocyta, endothel, granulocyta eredetű) többszervi elégtelen betegcsoportban, míg egy másik publikációban Nieuwland és mtsai. emelkedett mennyiséget találtak meningococcalis szepszisben. Jelen tanulmányainkban a kontroll eredményekhez képest emelkedett mennyiséget találtunk szepszisben. Igazoltuk, hogy kevert gombás fertőzés esetében fokozottabb a PMP megjelenése, mint bakteriális szepszisben. Úgy gondoljuk a PAC1, CD42a PMP mérése fontos kiegészítő információt adhat a gombafertőzésre hajlamos betegek azonosításában és a korai antimikotikus terápia megkezdésében.

Második MP tanulmányunk eredményei megfelelnek Mostefai és mtsai. korábban közölt eredményeinek fokozott MP mennyiségekről szeptikus betegekben kontroll személyekhez képest. Soriano és mtsai. hasonlóan emelkedett szinteket mértek, különösen túlélő betegekben, viszont ezt a megfigyelést adataink nem erősítették meg. Vizsgálatunkkal nem találtunk egyértelmű összefüggést a teljes MP mennyiség és a szerveleltelenségek száma között, de az akut szeptikus veseelégtelenség fokozott MP, PMP és myeloid MP mennyiség emelkedéssel jár. A veleszületett immunrendszer aktivációja és a vese infiltrációja monocyták és makrofágok által hozzájárul a szeptikus veseelégtelenség kialakulásához. A monocyta-eredetű MP-ok a keringő TF egyik fő forrása és nagy mennyiségű foszfadiliszert szállítanak. Ezen partikulumok mennyiségi

fokozódása prokoaguláns eltolódást és rögzépződést okozhat a vese kapillárisokban. A CD13 elősegíti az endothel/monocyta kötődést, így ezen partikulumok segíthetik a helyi monocyta kitapadást és vese infiltrációt. A helyi rögzépződés és infiltráció miatt a keringés csökken, fokozódik a helyi hypoxia, citokin felszabadulás jön létre. A fokozott CD42a PMP szinteket már leírták korábban akut vasculitis okozta veseelégtelenségben. Jelen kutatásunkban a BUN és szérum kreatinin koncentrációk negatívan korreláltak, így felvetődik az ilyen partikulumok kitapadása a sérült endothelhez, ezáltal endothelialis dyszfunkció kialakulása. A fenti eltérések a 3. vizsgálati napra eltűntek, melyet a kiterjesztett szervtámogató kezelések és folyadékterápia hatásának vélünk.

## Összefoglalás

### **A thrombocyta aggregációs vizsgálat új eredményei:**

- 1, Az indukálható thrombocyta aggregáció mérés nem ajánlható a súlyos szepszis mortalitás prediktoraként.
- 2, Ezen tanulmány az első, ami bizonyította a spontán aggregáció jelenlétét súlyos szepszisben.
- 3, Eredményeink további bizonyítékkal szolgáltak a thrombocyta szám és az indukálható aggregáció kapcsolatára.

### **A mikropartikulum tanulmányok új eredményei:**

- 1, További bizonyítékkal szolgáltunk a MP szám emelkedésére súlyos szepszisben.
- 2, Klinikai tanulmányunk elsőként jelezte a MP profil változását gomba fertőzéssel komplikált szepszis esetekben, ez elősegítheti egy korai diagnosztikai eszköz fejlesztését.
- 3, Nem találtunk direct összefüggést a szervelelelenségek mennyisége és a MP száma között.
- 4, Tanulmányunk felveti a MP-ok szerepét az szepszis állapotban kialakult akut veseelégtelenség patofiziológiájában

## Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretnék köszönetet mondani családomnak és barátaimnak. Köszönöm Dr. Mühl Diana főorvosnő, Kovács L. Gábor Professor Úr, Bogár Lajos Professor Úr és Vermes István Professor Úr munkám során nyújtott segítségét. Köszönöm közvetlen munkatársaim, Dr. Tóké-Füzesi Margit, Ács Orsolya, Horváth Beáta és Döme

Zsuzsanna, valamint az Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Intézet és a Laboratóriumi Medicina Intézet minden dolgozójának a munkámban nyújtott segítségét.

# Publikációs és előadás lista

## A tézis a következő publikációkon alapul:

- 1, G Woth, A Varga, S Ghosh, M Krupp, T Kiss, L Bogár, D Mühl, Platelet aggregation in severe sepsis., J Thromb Thrombolysis. 2011;31(1):6-12. IF: 1.476.
- 2, G Woth, A Varga, M Krupp, K Jáksó, L Bogár, D Mühl., Thrombocyt-aggregációs vizsgálatok súlyos szepszisben. Aneszteziol Intenz Ter. 2011;41(3):126-131. (article in hungarian) IF: -.
- 3, G Woth, M Tőkés-Füzesi, T Magyarlaki, GL Kovács, I Vermes, D Mühl., Activated platelet-derived microparticle numbers are elevated in patients with severe fungal (Candida albicans) sepsis., Ann Clin Biochem. 2012;49:554-560. IF: 2.170.
- 4, M Tőkés-Füzesi, G Woth, T Magyarlaki, GL Kovács, I Vermes, D Mühl., Microparticles and acute renal dysfunction in septic patients., J Crit Care. 2012. IF: 2.134.

Összesített impakt faktor a szerzői hozzájárulások alapján: 3.628

Releváns közlemények teljes impakt faktora: 5.780

Citációk száma: 2

## Publikációk, melyek nem szerepelnek a tézisben:

- 1, D Mühl, G Woth, L Drenkovic, A Varga, S Ghosh, C Csontos, L Bogár, G Wéber, J Lantos., Comparison of oxidative stress & leukocyte activation in patients with severe sepsis & burn injury., Indian J Med Res. 2011;134:69-78. IF: 1.837.
- 2, D Mühl, B Nagy, G Woth, B Falusi, L Bogár, G Wéber, J Lantos., Dynamic changes of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in severe sepsis., J Crit Care. 2011;26(6):550-555. IF: 2.134.
- 3, D Mühl, G Woth, T Kiss, S Ghosh, JE Tanus-Santos., Pathophysiology, Diagnosis and Treatment of Pulmonary Embolism Focusing on Thrombolysis – New approaches. Book chapter, in: Pulmonary Embolism, ISBN:978-953-51-0233-5, 2012.

Összesített impakt faktor: 3.971

Citációk száma: 2

## A tézis részét képező előadások és poszterek

- 1, A Varga, G Woth., Súlyos szepszis és a thrombocyt-aggregáció (Prospektív analízis), University of Pécs, Annual Student Researchers Conference, 2009.
- 2, A Varga, G Woth, L Bogár, D Mühl., Súlyos sepsis és a thrombocyt-aggregáció (prospektív analízis). Aneszteziol Intenz Ter. 2009;39:(Suppl. 1.):18.
- 3, G Woth., Mikropartikulumok és a súlyos szepszis, University of Pécs, Annual Student Researchers Conference, 2010.
- 4, G Woth, M Tőkés-Füzesi, T Magyarlaki, D Mühl., Microparticles in severe sepsis, Annual congress of the Hungarian Medical Association of America, 2010.
- 5, M Krupp, G Woth, D Mühl., Thrombocyte aggregation in septic patients, Annual congress of the Hungarian Medical Association of America, 2010.

- 6, G Woth, M Tőkés-Füzesi, T Magyarlaci, D Mühl., Mikropartikulumok súlyos szepszisben. *Aneszteziol Intenz Ter.* 2010;40:(Suppl. 1.):9.
- 7, L Bogár, D Mühl, G Woth, M Tőkés-Füzesi., A keringő mikropartikulumok koncentrációváltozása súlyos szepszisben. *Érbetegségek* 2011;18:(Suppl. 1.):8.
- 8, D Mühl, G Woth, M Tőkés-Füzesi, T Magyarlaci, M Krupp, GL Kovács, L Bogár., Severe sepsis and the amount of blood microparticles *Acta Physiol.* 2011; 202:(Suppl. 684.):84.
- 9, G Woth, M Tőkés-Füzesi, T Magyarlaci, M Krupp, B Ernyey, E Pető, GL Kovács, L Bogár, D Mühl., The possible benefit of blood microparticle measurements in fungal sepsis. *Acta Physiol.* 2011;202:(Suppl. 684.):129-130.
- 10, D Mühl, G Woth, M Tőkés-Füzesi, T Magyarlaci, M Krupp, GL Kovács, L Bogár., A trombociták mikropartikulumok mennyiségi változása súlyos szepszis során. In: *Farmakológiai, anatómus, mikrocirkulációs és élettani (FAMÉ) társaságok 2011. évi közös tudományos konferenciája.* Pécs, Magyarország, 2011.06.08-2011.06.11. (Magyar Élettani Társaság) Pécs: p. 221. E12-04.
- 11, G Woth, M Tőkés-Füzesi, T Magyarlaci, M Krupp, B Ernyey, E Pető, GL Kovács, L Bogár, D Mühl., A mikropartikulum vizsgálatok használata a szepszis diagnosztikájában. In: *Farmakológiai, anatómus, mikrocirkulációs és élettani (FAMÉ) társaságok 2011. évi közös tudományos konferenciája.* Pécs, Magyarország, 2011.06.08-2011.06.11. (Magyar Élettani Társaság) Pécs: p. 221. E12-04.
- 12, G Woth, M Tőkés-Füzesi, T Magyarlaci, L Bogár, D Mühl., Microparticles in septic shock. In: *ESCHM 2011 : 16th Conference of the European Society for Clinical Hemorheology and Microcirculation. 30th Annual Conference of the German Society for Clinical Microcirculation and Hemorheology.* p. 142.
- 13, M Krupp, B Ernyey, G Woth, L Bogár, D Mühl., Indukált és spontán thrombocyták aggregáció súlyos szepszisben. *Aneszteziol Intenz Ter.* 2011;41:(Suppl. 1.):27.
- 14, G Woth, M Tőkés-Füzesi, T Magyarlaci, S Ghosh, M Krupp, GL Kovács, I Vermes, D Mühl, Platelet and endothelial receptor density changes in severe septic patients. *Clin Chem.* 2011;49:(Suppl. 1):S357.

#### **Tézis részét nem képező előadások és poszterek**

- 1, Zs Tucek, B Radnai, B Veres, T Dolowschiák, G Woth, J Pribér, M Schoenberg, F Gallyas jr., A ferulaldehid hatása LPS-indukálta gyulladási folyamatokra egérben. 37. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2007.
- 2, G Woth, A Varga, L Drenkovic, J Lantos, D Mühl., Oxidatív stressz súlyos szepszisben, 4th Annual CROatian Student Summit (CROSS4), 2008.
- 3, G Woth, A Varga, L Drenkovic., Oxidatív stressz súlyos szepszisben, prospektív analízis, University of Pécs, Annual Student Researchers Conference, 2009.
- 4, G Woth, A Varga, L Drenkovic, J Lantos, L Bogár, D Mühl., Oxidatív stressz vizsgálata súlyos szepszisben (pilot study). *Aneszteziol Intenz Ter.* 2009;39:(Suppl.1.):18.
- 5, T Kőszegi, P Kustán, A Ludány, E Györgyi, G Woth, D Mühl, GL Kovács. Urinary orosomucoid in sepsis. 56th annual congress of the Hungarian Society of Laboratory Medicine, 2012, Budapest.
- 6, T Kőszegi, Z Horváth-Szalai, A Ludány, E Györgyi, G Woth, D Mühl, GL Kovács. Serum actin/gelsolin ratio: new biomarker in sepsis? 56th annual congress of the Hungarian Society of Laboratory Medicine, 2012, Budapest.