

A mátrix metalloproteinázok és szöveti inhibitoraik változása szisztémás gyulladással és revaszkularizációs kórképekben

Doktori (Ph.D.) értekezés

Dr. Nagy Bálint

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola (D94)

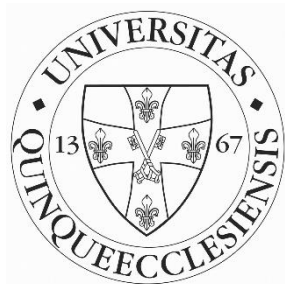
Doktori Iskola vezető: Dr. Kovács L. Gábor

Programvezető: Dr. Jancsó Gábor

Témavezetők:

Dr. Mühl Diána
Egyetemi docens

Dr. Lantos János
Egyetemi docens



Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Pécs, 2017.

Tartalom

1. Bevezetés	1
2. Célkitűzések.....	2
3. Módszerek.....	3
3.1 Az MMP-TIMP rendszer égésbetegség kapcsán kialakult SIRS-ben, betegek, beválasztási és kizárási kritériumok	3
3.2 Az MMP-TIMP rendszer súlyos szepszisben, betegek, beválasztási és kizárási kritériumok	4
3.3 Az MMP-TIMP rendszer CEA műtéten átesett betegeknél, betegek, beválasztási és kizárási kritériumok	4
3.4 Kontroll csoportok.....	5
3.5 Mérési módszerek	5
3.6 A minták feldolgozása és az MMP-TIMP mérések metodikája.....	6
3.7 Statisztikai módszerek.....	6
4. Eredmények.....	7
4.1 Az MMP-TIMP rendszer változása égésbetegség kapcsán kialakult SIRS-ben..	7
4.2 Az MMP-TIMP rendszer változása súlyos szepszisben	9
4.3 Az MMP-TIMP rendszer változása CEA műtéten átesett betegeknél	11
5. Összegzés.....	14
6. Tézisek.....	15
7. A szerző publikációi.....	17
8. Köszönetnyilvánítás	20

1. Bevezetés

Az MMP-k strukturálisan hasonló, genetikailag azonban különböző meghatározottsággal bíró cink és kalcium függő endopeptidáz enzimek, melyek kutatásának története több mint fél évszázados. Elsőként Gros és Lapiere tettek említést 1962-ben egy kollagenázról (MMP-1) ebihalak egyedfejlődésének vizsgálata kapcsán, melyet követően több mint 25 tagja került leírásra ezen enzimesaládnak. Az MMP-k az ECM alkotók teljes spektrumát képesek bontani, ezen túl azonban számos egyéb komplikált funkciójukra is fény derült (morfogenezis, angiogenezis, gyulladásos ízületi kórképek, stb.). Az első szöveti (endogén) inhibitor (TIMP-1) 1970-ben izolálták szérumból, majd a későbbiekben fedezték fel, hogy a TIMP-1 képes gátolni a kollagenázok működését. Napjainkig összesen négy TIMP került leírásra (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4). A TIMP-ek kisméretű, stabil fehérjék, melyek az MMP molekulákkal 1:1 arányban nem kovalens kötéseket létesítenek és képesek azok működését gátolni. Ez a gátlás azonban nem specifikus, vagyis az egyes TIMP-ek számos különböző MMP-t képesek gátolni. Az MMP-k működésének szabályozásán túl a TIMP-ek szerepe bizonyított számos más folyamatban, így a sejtek fejlődésében, differenciálódásában és az apoptózisban is (anti-apoptikus hatás).

A szepszis és a SIRS klinikai jelentősége a modern kor orvosa számára már egyértelmű. A szepszis okozta halálozás a fejlett társadalmakban már a kardiovaszkuláris kórképekhez mérhető, melyet a csökkenő mortalitási tendencia mellett megfigyelhető növekvő incidencia tart magas szinten. A jelentős mortalitás mellett a szepszis kezelés költségei sem elhanyagolhatóak, így világszerte élénk kutatás zajlik a szepszis és az azt megelőző gyulladásos folyamatok feltérképezése és mélyebb megértése céljából. Az iszkémiás-reperfúziós folyamatok számos, zömében sebészeti beavatkozás velejárái, melyek súlyos esetben SIRS vagy akár szepszis kialakulásának alapját is képezhetik. A napi orvosi gyakorlatban azonban e folyamatok egy jelentős része csak szubklinikai formában figyelhető meg, így a carotis sebészetében is zömében a lokálisan zajló, markáns tüneteket kevésbé gyakran okozó folyamatokkal jár együtt. A rendelkezésre álló irodalmi adatok alapján az MMP-TIMP rendszer számos tagjának a szerepe már részben bizonyított vagy feltételezhető SIRS-ben, szepszisben és a carotis sebészethez társuló iszkémiás-reperfúziós folyamatokban, így jelen dolgozatban az MMP-TIMP rendszer ez irányú további, zömében az időbeli kinetikát feltáró vizsgálatait tűztük ki célul.

2. Célkitűzések

Vizsgálni kívántuk, hogy az égésbetegség okozta SIRS-ben és annak időbeli lefolyása során:

1. van-e szignifikáns változás az MMP-9 és a TIMP-1 plazma koncentrációja tekintetében;
2. kóros-e és miként változik a plazma MMP-9-TIMP-1 aktivitása (MMP-9/TIMP-1 arány);
3. képes-e az MMP-9, a TIMP-1 vagy az MMP-9/TIMP-1 arány előre jelezni a szepszis kialakulását?

Vizsgálni kívántuk, hogy súlyos szepszisben és annak kezelése során:

4. észlelhető-e szignifikáns változás az MMP-2, az MMP-9, a TIMP-1 és a TIMP-2 plazma koncentrációja tekintetében;
5. mutat-e összefüggést az MMP-9 és a TIMP-1 kinetika a SIRS-ben tapasztaltakkal;
6. igazolható-e kapcsolat a halálozás és a TIMP-1 szintek között;
7. kóros-e és miként változik a plazma MMP-TIMP aktivitása (MMP-2/TIMP-1; MMP-2/TIMP-2; MMP-9/TIMP-1; MMP-9/TIMP-2 arányok);
8. van-e összefüggés a septicus betegek MMP-TIMP aktivitása és a szepszis lefolyása között;
9. kapcsolódik-e az MMP-9/TIMP-1 arány szepszisben tapasztalt időbeli alakulása a SIRS-ben észleltekhöz?

Vizsgálni kívántuk, hogy a CEA műtetre előjegyzett betegeknél a közvetlen perioperatív időszakban:

10. van-e szignifikáns időbeli változás az MMP-9 és a TIMP-1 plazma koncentrációja esetében;
11. kóros-e és miként változik a plazma MMP-9-TIMP-1 aktivitása (MMP-9/TIMP-1 arány);
12. igazolható-e összefüggés az MMP-9, a TIMP-1, valamint az MMP-9/TIMP-1 arány és a perioperatív szövődmények között;
13. a farmakoterápiás szekunder prevenció befolyásolja-e a plazma MMP-9 és TIMP-1 koncentrációját, valamint az MMP-9-TIMP-1 aktivitást?

3. Módszerek

A vizsgálatok tervezését és kivitelezését a 2003-as, majd a későbbi vizsgálatok esetében a 2008-as Helsinkai Deklarációban foglalt etikai ajánlások betartásával végeztük. A Pécsi Tudományegyetem Regionális Kutatásetikai Bizottsága előzetes, írásos engedélyének a birtokában kezdtük meg kutatásainkat (4282.316-2216/KK15/2011, 2406/2005, 4330/2011, 4330/2013), melyeket az engedélyezett protokolloknak megfelelően végeztünk.

3.1 Az MMP-TIMP rendszer égésbetegség kapcsán kialakult SIRS-ben, betegek, beválasztási és kizárási kritériumok

Egy korábbi, égett betegek bevonásával végzett vizsgálat során, 2005 márciusa és 2010 májusa között, összesen harmincegy (n=31) betegről gyűjtött vérmintákat használtuk fel retrospektív vizsgálatunk elvégzéséhez. A beválasztási és kizárási kritériumok - az eredeti vizsgálattal megegyezően – az alábbiak voltak:

- az égett testfelület nagysága (BSA) nagyobb volt a teljes testfelület 15%-ánál
- a beteg az égési sérülést követő első 6 órában felvételre került osztályunkra
- a beteg megfelelt a SIRS kritériumainak^{4,5}.

Kizárási kritériumok:

- 18 év alatti életkor
- áramütés
- már felvételkor észlelhető bakteriális infekció
- extrém nagy kiterjedésű égési sérülés (BSA > 80%)
- dokumentált krónikus bal szívfél és/vagy veseelégtelenség
- tumoros alapbetegség
- immunválaszt befolyásoló gyógyszeres kezelés (például szteroid, citosztatikum, stb.).

3.2 Az MMP-TIMP rendszer súlyos szepszisben, betegek, bevásztási és kizárási kritériumok

A vizsgálatba összesen harmincnyolc (n=38) súlyos szepszis kritériumainak megfelelő beteget vontunk be. A súlyos szepszis diagnózisának felállítása és a betegek bevásztása során több pontrendszert (SAPS II, SOFA, MODS) és az aktuális irányelveket is figyelembe vettük, így az alábbi kritériumokat alkalmaztuk⁴:

Bevásztási kritériumok:

- Többszervi elégtelenség (2 vagy több)
- Szepszis okozta hipotenzió és 5 ng/ml feletti PCT szint
- Szepszis okozta szöveti hipoperfúzió

Kizárási kritériumok:

- 18 év alatti életkor
- tumoros alapbetegség
- immunválaszt befolyásoló gyógyszeres kezelés (például szteroid, citosztatikum, stb.)

3.3 Az MMP-TIMP rendszer CEA műtéten átesett betegeknel, betegek, bevásztási és kizárási kritériumok

A Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központjában 2012. január. 01. és 2012. december. 31. között, elektív karotisz endarterektómiára (CEA) előjegyzett betegek bevonásával végeztük ez irányú vizsgálatunkat.

Kizárási kritériumok:

- 18 év alatti életkor
- ismert tumoros alapbetegség
- korábban lezajlott, az életminőséget jelentősen rontó stroke
- immunválaszt befolyásoló gyógyszeres kezelés (például szteroid, citosztatikum, stb.)

A bevonnai tervezett 66 főből 7 fő elutasította a vizsgálatban való részvételt, míg további 5 fő a kizárási kritériumok miatt nem került bevonásra, így összesen 54 beteg mintáinak vizsgálatát végeztük.

3.4 Kontroll csoportok

- Az égett SIRS-es betegek vizsgálata esetében 10 fő, még a súlyos szeptikus betegek vizsgálatánál 17 fő egészséges, korban és nemben egyező önkéntestől vett vérmintát használtunk kontrollként.
- A CEA műtéten átesett betegek vizsgálatánál húsz, érlemeszesedésben szenvedő, szemészeti vizsgálatra érkező beteget vontunk be önkéntes beleegyezésüket követően a kontroll csoportba. Kor, nem, társbetegségek és ezek gyógyszereinek hatástani csoportjai tekintetében nem volt szignifikáns különbség a CEA és a kontroll csoport között. A kontroll csoport tagjain végzett nyaki ultrahang vizsgálat segítségével a szignifikáns karotisz szűkület kizárásra került, mely kórkép hiányát az e tekintetben negatív anamnesztikus adatok és a hiányzó tünettan is alátámasztotta.

3.5 Mérési módszerek

A **kontroll csoportok** önkéntes tagjaitól mindösszesen egy alkalommal történt vérmintavétel. A **betegek esetében** a vérminták vétele az ellátásukhoz egyébiránt is behelyezett artériás kanülből fájdalommentesen történt az alábbiak szerint:

- **SIRS-es és szeptikus betegcsoportok:**

Az első mintavételre a szeptikus betegek súlyos szepszis okán történő ITO felvételét követően, még az égett betegek SIRS kritériumainak történő megfelelését követően került sor (első minta). Az ezt követő mintavételekre további 4 (szeptikus betegcsoport), illetve 5 (égett, SIRS betegcsoport) alkalommal, a felvételt követő napok reggelén 7 órakor (második-hatodik minták) végeztük.

- **CEA betegcsoport:**

A mintavételezést az alábbi négy időpontban végeztük (T₁-T₄): T₁: az artériás kanül behelyezését követően azonnal, a műtét kezdetét megelőzően; T₂: 60 perccel a kirekesztés felengedését követően; T₃: az első posztoperatív nap reggelén 7 órakor; T₄: a harmadik posztoperatív nap reggelén 7 órakor.

3.6 A minták feldolgozása és az MMP-TIMP mérések metodikája

Az artériás kanülből vett, heparinnal antikoagulált vérmintákat 4 °C-on alacsony sebességgel centrifugáltuk, plazmát izoláltunk, majd -80 °C-on tároltuk. A mintákból mértük az MMP-2, az MMP-9, a TIMP-1 és a TIMP-2 plazma koncentrációt „enzyme-linked immunosorbent assay” (ELISA) technikával a gyártó utasításainak megfelelően (R&D Systems, Inc, Minneapolis, MN). Az MMP-2, az MMP-9, a TIMP-1 és a TIMP-2 plazma koncentrációkat a 450 nanométeren mért fényelnyelés alapján határoztuk meg ng/ml egységben, standard görbékkel összevetve (Multiskan Ascent „microplate” fotométer, Típus: 354; Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA). A mérések a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karának Sebészeti Oktató és Kutató Intézetében történtek.

3.7 Statisztikai módszerek

A statisztikai analízisekhez a Statistical Package for the Social Sciences for Windows (SPSS, IBM Corporation, Armonk, NY, USA) programcsomagnak a 20., majd a későbbiekben a 21. verziószámú változatát használtuk. Adataink elemzését az eloszlás vizsgálatával kezdtük (Kolmogorov-Smirnov teszt). A normális eloszlást mutató paraméterek esetében Student-féle t tesztet, míg a többi paraméter esetében nem parametrikus teszteket (Wilcoxon, Mann-Whitney U-teszt) használtunk. A beteg és a kontroll csoportok adatait Mann-Whitney U-teszt segítségével elemeztük, míg a beteg csoportok adatainak időbeli alakulását Wilcoxon-tesztet használva vizsgáltuk. A vizsgált paramétereknek a minimum, maximum, valamint medián és interkvartilis (IQR, standard 25-75 percentilis) értékeit tüntettük fel. A szignifikáns trendek felkutatásához Jonckheere-Terpstra-tesztet, míg a paraméterek közötti korreláció vizsgálatára Spearman-tesztet használtunk. Egy és többváltozós lineáris regresszió segítségével vizsgáltuk a független változók hatását a függő változókon. Szignifikánsnak a $p < 0,05$ értéket tekintettük.

4. Eredmények

4.1 Az MMP-TIMP rendszer változása égésbetegség kapcsán kialakult SIRS-ben

Égett betegek esetében vezető halálokok a szepszis, a légzési elégtelenség, a szívelégtelenség és a veseelégtelenség. Vizsgálatunkban a mortalitás hátterében keringési (67%) és légzési (33%) elégtelenség volt megfigyelhető. A vizsgálat időtartalma alatt nem észleltük a szepszis kialakulását a bevont betegeknél, így beteganyagunk jól reprezentálja az égés indukált SIRS-t. Fentiek oka lehet, hogy az égésbetegség egyik rettegett, magas halálozási aránnyal járó szövődménye, a szepszis ritkán alakul ki az égési sérülést követő kezelés korai időszakában, így vizsgálatunk hat napos időablaka a szepszis kialakulását megelőző SIRS időszakára esett, melynek során nem sikerült szignifikáns kapcsolatot találnunk a mért biomarkerek és a betegség súlyosságának kifejezésére gyakorta használt pontrendszerek (MODS, SOFA, SAPS II) között.

Az MMP-9 mérések eredményei

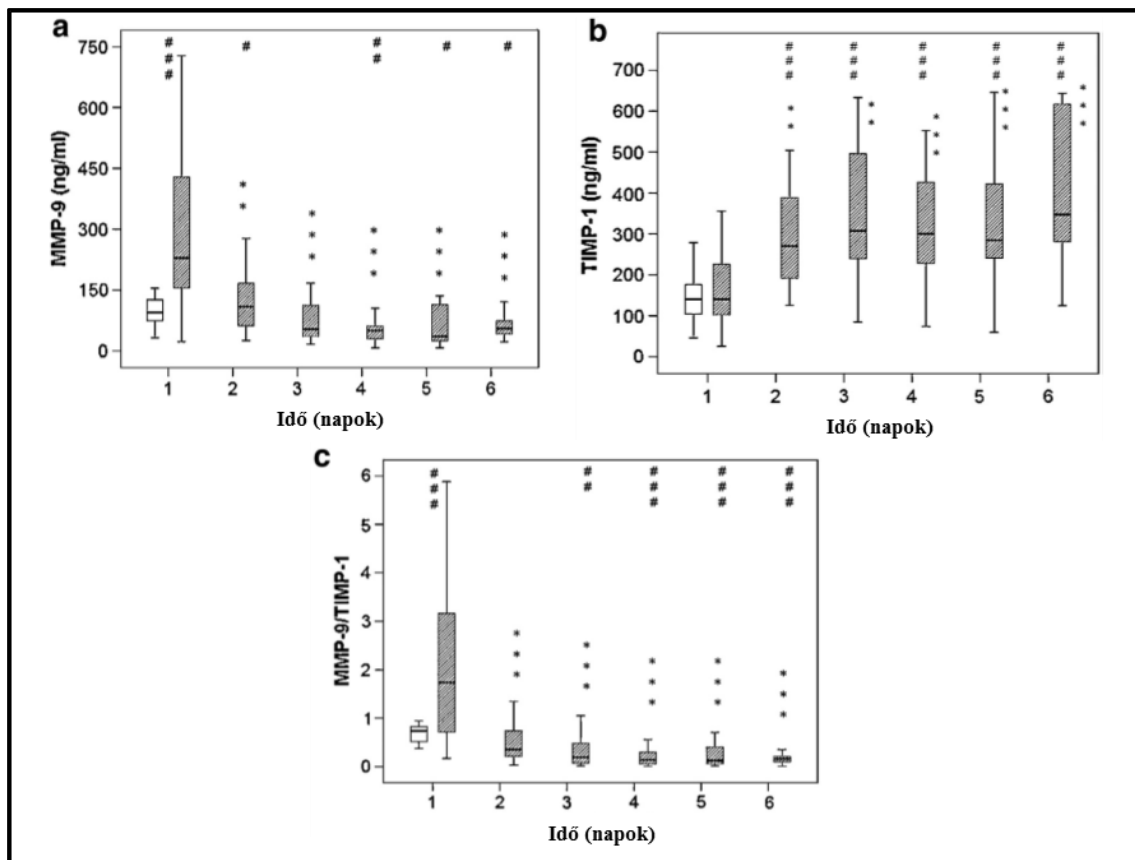
Az MMP-9 szignifikánsan magasabb volt a kontroll csoporthoz képest az első és második napon, majd a negyedik, ötödik és hatodik napon már szignifikánsan alacsonyabb szérumszintek voltak mérhetőek. A másodiktól egészen a hatodik napig szignifikánsan alacsonyabb MMP-9 értékek voltak mérhetőek a felvételtől értékekhez képest (1a. ábra).

A TIMP-1 mérések eredményei

A TIMP-1 tekintetében felvételtől nem volt különbség az égett és az egészséges kontroll csoportok között. A második napon azonban a TIMP-1 szignifikánsan megemelkedett a kontrollhoz képest és a továbbiakban ezen a magasabb szinten maradt a vizsgálati periódus végéig. A TIMP-1 tendenciájában emelkedett a vizsgálat teljes időtartalma alatt, így a másodiktól a hatodik napig mért értékek már szignifikánsan magasabbak voltak a felvételi szintekhez képest (1b. ábra).

Az MMP-9/TIMP-1 mérések eredményei

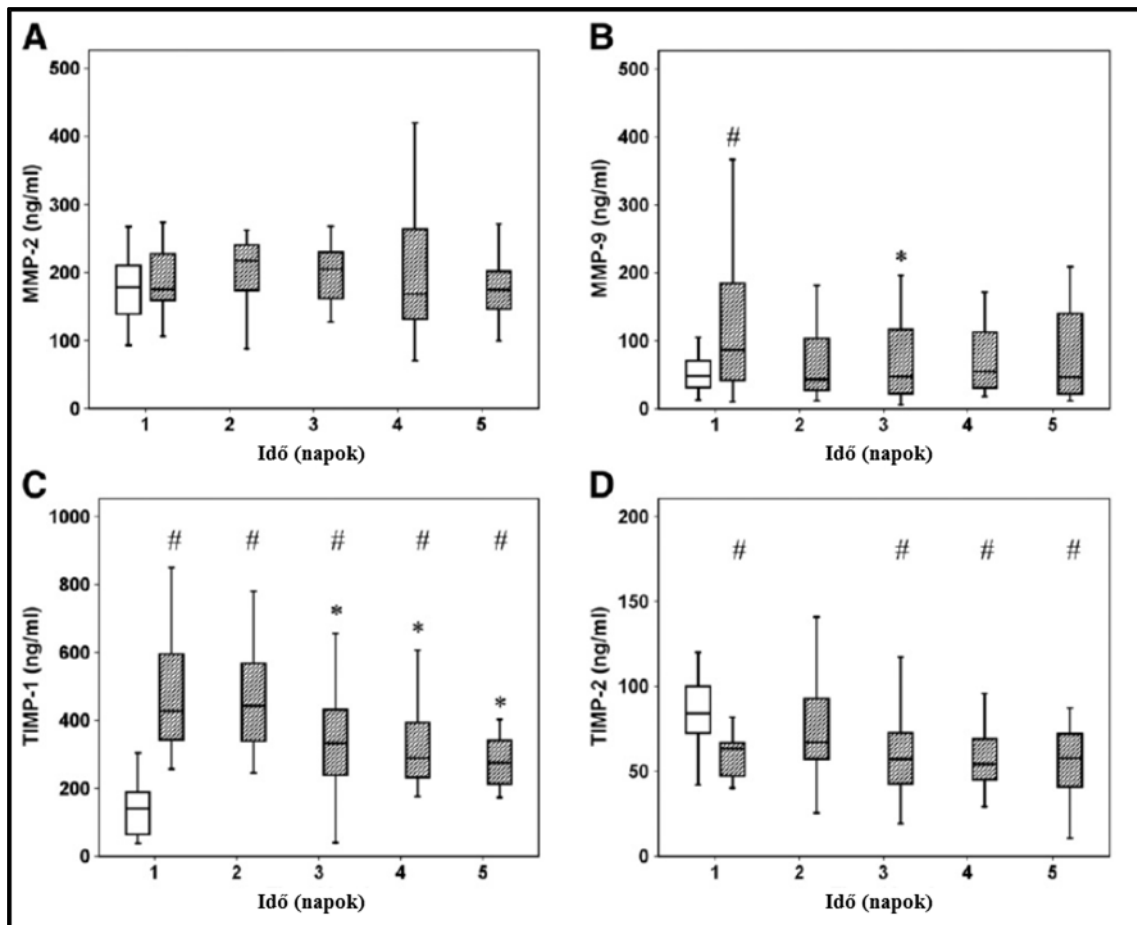
Az MMP-9/TIMP-1 hányados kinetikájában az MMP-9-et követte. A kontrollhoz képest kezdetben szignifikánsan magasabb volt, majd a második napra a kontroll értékek szintjére csökkent. Ezt követően további csökkenés okán a harmadik naptól már szignifikánsan a kontroll szinteknél alacsonyabb értéket mértünk egészen a vizsgálat végéig. E csökkenő tendencia miatt a második naptól a vizsgálat végéig szignifikánsan alacsonyabbak voltak az MMP-9/TIMP-1 értékek mint az első mérési pontban (1c. ábra).



1. ábra. MMP-9, TIMP-1 és MMP-9/TIMP-1 plazmaszintek SIRS-ben

Az MMP-9 (a) és a TIMP-1 (b) plazma szintek, valamint az MMP-9/TIMP-1 (c) arány a SIRS-es és a kontroll csoportban. Az adatokat minimum, maximum, medián és interkvartilis tartomány (IQR) formájában adtuk meg. Szürke színnel a SIRS-ben szenvedő betegekhez tartozó, míg fehér színnel a kontroll csoporthoz tartozó adatokat jelöltük. „*” szimbólummal a SIRS-es betegcsoporton belüli szignifikáns statisztikai különbséget (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001) adtuk meg az első vizsgálati napon mért értékhez képest, „#” szimbólummal a SIRS-es betegcsoport és a kontroll csoport közötti szignifikáns statisztikai különbséget (# p<0,05, ## p<0,01, ### p<0,001) jelöltük.

4.2 Az MMP-TIMP rendszer változása súlyos sepszisben



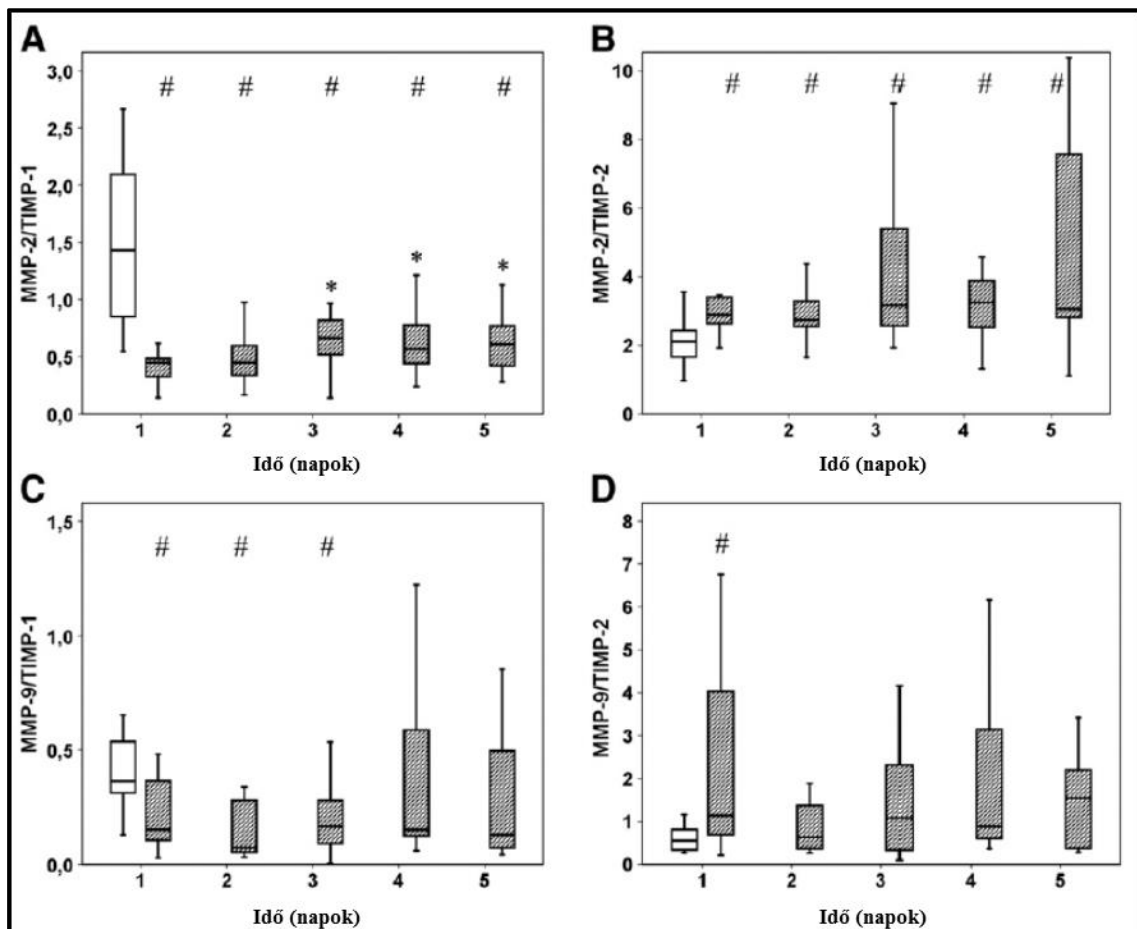
2. ábra. MMP-2, MMP-9, TIMP-1 és TIMP-2 plazmaszintek súlyos sepszisben

Az MMP-2, MMP-9, TIMP-1 és TIMP-2 plazmaszintek felvételtkor és az azt követő négy egymás utáni napon. Az adatokat minimum, maximum, medián és interkvartilis tartomány (IQR) formájában adtuk meg. Szürke színnel a súlyos szeptikus betegekhez tartozó, míg fehér színnel a kontroll csoporthoz tartozó adatokat jelöltük. „*” szimbólummal a súlyos szeptikus betegcsoporton belüli szignifikáns statisztikai különbséget ($p < 0,05$) adtuk meg a felvételi értékhez képest, „#” szimbólummal a súlyos szeptikus betegcsoport és a kontroll csoport közötti szignifikáns statisztikai különbséget ($p < 0,05$) jelöltük.

Az MMP és TIMP mérések eredményei

Az MMP-2 esetében nem találtunk szignifikáns eltérést sem a kontroll csoporttal való összevetés, sem pedig a szeptikus csoporton belüli dinamika tekintetében (2A. ábra). Ezzel szemben az MMP-9 már a betegek felvételekor szignifikánsan ($p < 0,005$) magasabb volt a szeptikus csoportban a kontrollhoz képest, majd ezt követően csökkenő tendenciát mutatott és a kontroll csoportnak megfelelő értékeket vett fel egészen a vizsgálati periódus végéig. A szeptikus betegeknél a harmadik nap MMP-9 értékei szignifikánsan alacsonyabbak voltak, mint az első napon mért értékek ($p < 0,009$) (2B. ábra). A TIMP-1 a vizsgálat teljes időtartama során szignifikánsan magasabb értékeket ért el a szeptikus betegek esetében, mint a kontroll

csoportban ($p < 0,002-0,004$) (2C. ábra), azonban a szeptikus csoporton belül csökkenő tendenciát észleltünk, aminek köszönhetően a harmadik, negyedik és ötödik vizsgálati napon már a felvételi értékekhez képest szignifikánsan alacsonyabb TIMP-1 értékeket mértünk ($p < 0,006$). A második nap kivételével minden mérési pontban szignifikánsan alacsonyabb TIMP-2 szinteket észleltünk a szeptikus betegek körében ($p < 0,05-0,009$) (2. ábra), míg a TIMP-2 szintek a szeptikus csoportban nem változtak szignifikánsan (2D. ábra).



3. ábra. MMP/TIMP plazmaszintek súlyos szeptiszben

Az MMP-2/TIMP-1, MMP-2/TIMP-2, MMP-9/TIMP-1 és MMP-9/TIMP-2 plazma mintákban mért értékei felvételtkor és az azt követő négy egymás utáni napon. Az adatokat minimum, maximum, medián és interkvartilis tartomány (IQR) formájában adtuk meg. Szürke színnel a súlyos szeptikus betegekhez tartozó, még fehér színnel a kontroll csoporthoz tartozó adatokat jelöltük. „*” szimbólummal a súlyos szeptikus betegcsoporton belüli szignifikáns statisztikai különbséget ($p < 0,05$) adtuk meg a felvételi értékhez képest, még „#” szimbólummal a súlyos szeptikus betegcsoport és a kontroll csoport közötti szignifikáns statisztikai különbséget ($p < 0,05$) jelöltük.

Az MMP/TIMP értékek eredményei

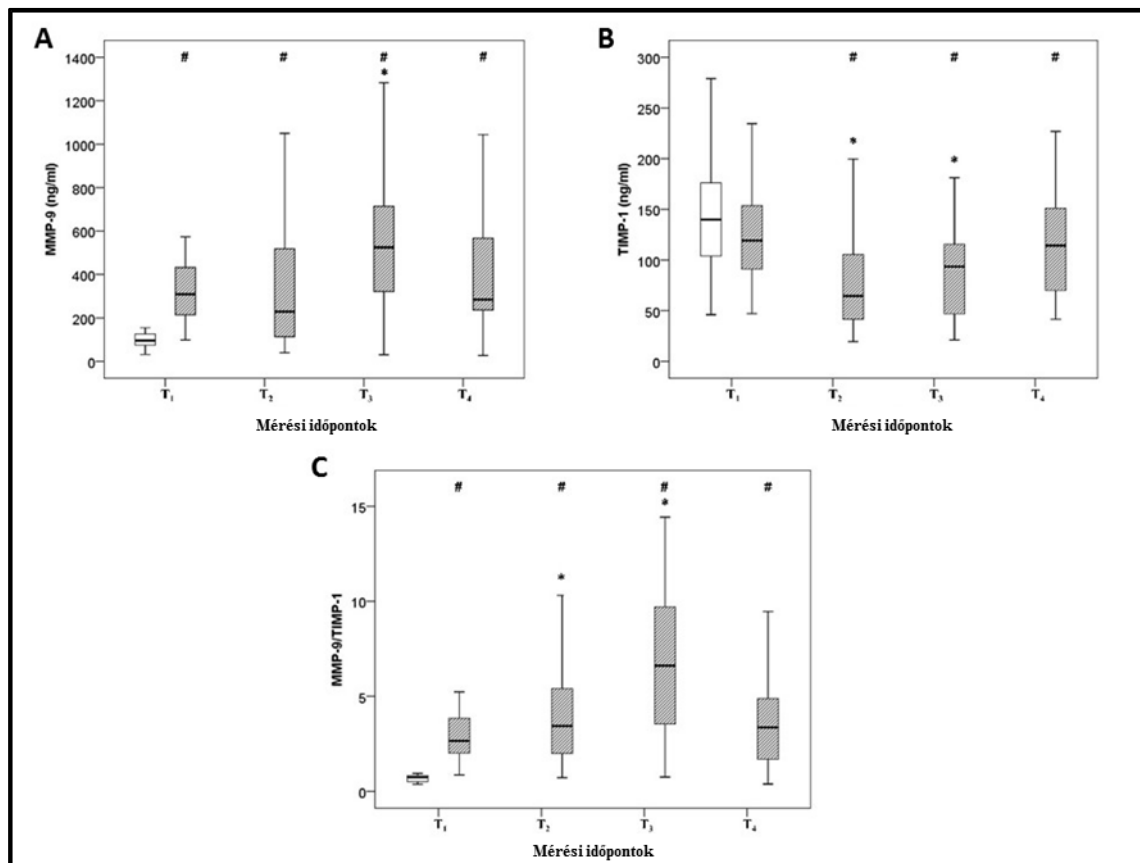
Az MMP-TIMP rendszer aktivitásának kifejezésére szolgáló MMP/TIMP hányadosok tekintetében is jelentős eltéréseket tapasztaltunk. Az MMP-2/TIMP-1 arány mindvégig szignifikánsan alacsonyabb volt a septicus betegek esetében ($p < 0,004-0,002$), annak ellenére, hogy a TIMP-1 szint csökkenésével párhuzamosan a harmadik naptól kezdve az arány emelkedő tendenciát mutatott ($p < 0,001$) (3A. ábra). Az MMP-2/TIMP-2 minden mérési ponton, érdemi változás nélkül, stabilan emelkedett volt a kontrollhoz képest ($p < 0,03-0,006$) (3B. ábra). Az első három vizsgálati nap tekintetében az MMP-9/TIMP-1 arány mutatkozott alacsonyabbnak a septicus betegekben ($p < 0,05-0,008$), azonban a két enzimszint időbeli dinamikájának köszönhetően ez a kontroll értékekkel szemben meglévő különbség a negyedik és ötödik napra már nem volt szignifikáns (3C. ábra). Az MMP-9/TIMP-2 csak a felvételi értékek tekintetében mutatott szignifikáns eltérést ($p < 0,006$), míg az összes többi mérési ponton jellemző változási tendencia nélkül, de emelkedett enzim szinteket mértünk (3D. ábra).

4.3 Az MMP-TIMP rendszer változása CEA műtéten átesett betegeknél

CEA műtéten átesett betegekben az MMP-9 és a TIMP-1 értékek függetlenek voltak az alábbi változóktól: a beavatkozás oldaliséga, az ellenoldali szűkület mértéke, nem, dohányzás, diabétesz, hipertónia. A szekunder prevenció gyógyszerei közül az ADP receptor antagonistát szedő betegek esetében az első mérési ponton (T_1) szignifikánsan ($p < 0,05$) alacsonyabb TIMP-1 szinteket mértünk, míg az acetilszalícilsav és a sztatinok esetében nem tapasztaltunk hasonló eltérést. Az előzetes elemzéseket követően az intraoperatív vérzést és a kirekesztési időt (CCT) választottuk ki egy olyan modell felállításához, melynek segítségével (lineáris többváltozós regresszió) a harmas mérési ponton (T_3) mért MMP-9 értékek teljes variabilitásának 15 %-a magyarázható ($p < 0,05$). Azoknál a betegeknél, akiknél a műtét során sönt behelyezése vált szükségessé, a preoperatív (T_1) TIMP-1 szinteket szignifikánsan alacsonyabbnak találtuk (Spearman $\rho = 0,35$, $p < 0,05$). A sönt behelyezés szükségességét előre jelző végső modell kialakításához lépcsőzetes, többváltozós logisztikus regressziót használtunk és az alábbi vizsgálati paramétereket határoztuk meg: diabétesz, preoperatív S-100 Béta és TIMP-1. Az általunk alkalmazott modell a betegek esetében 100%-ban képes volt a sönt behelyezés szükségességét előre jelezni (Nagelkerke $R^2 = 1$, Hosmer-Lemeshow teszt $P = 1,00$).

Az MMP és TIMP mérések eredményei

Az MMP-9, TIMP-1 és az MMP-9/TIMP-1 esetében a különböző mérési pontokon (T₁-T₄) tapasztalt eltéréseket a 4. ábra szemlélteti.



4. ábra. MMP-9, TIMP-1 és MMP-9/TIMP-1 plazmaszintek CEA kapcsán

Az MMP-9, TIMP-1 és MMP-9/TIMP-1 plazmaszintek az alábbi négy időpontban (T₁-T₄): T₁: az artériás kanül behelyezését követően, a műtét kezdetét megelőzően; T₂: 60 perccel a kirekesztés felengedését követően; T₃: az első posztoperatív nap reggelén; T₄: a harmadik posztoperatív nap reggelén. Az adatokat minimum, maximum, medián és interkvartilis tartomány (IQR) formájában adtuk meg. Szürke színnel a CEA csoporthoz tartozó, még fehér színnel a kontroll csoporthoz tartozó adatokat jelöltük. „*” szimbólummal a CEA csoporton belüli szignifikáns statisztikai különbséget (p<0,05) adtuk meg T₁-hez képest, még „#” szimbólummal a CEA betegcsoport és a kontroll csoport közötti szignifikáns statisztikai különbséget (p<0,05) jelöltük.

A TIMP-1 plazmaszintek az első mérési pont (T₁) kivételével a teljes vizsgálat alatt alacsonyabbak voltak a kontrollhoz képest (p<0,05). A TIMP-1 szintek a műtétet megelőzően (T₁) mért értékekhez viszonyítva szignifikánsan (p<0,05) csökkentek a reperfüzió során (T₂) és

az első posztoperatív napon (T_3), míg a harmadik posztoperatív napra (T_4) visszatértek a kiindulási (T_1), műtét előtti értékek szintjére (4B. ábra). Az MMP-9 azonban már az első mérési időpontban (T_1) szignifikánsan ($p < 0,05$) magasabb volt a kontroll értékekhez képest, és mindvégig ezen a szignifikánsan magasabb szinten maradt a vizsgálat teljes időtartama alatt (T_{2-4}). A műtétet megelőző értékhez (T_1) képest az első posztoperatív napon (T_3) észleltünk szignifikáns ($p < 0,05$) MMP-9 emelkedést, majd ez az emelkedett érték a harmadik posztoperatív napra (T_4) visszatért a preoperatív értékek (T_1) szintjére (4A. ábra). A CEA csoport MMP-9/TIMP-1 értékei a kontrollhoz képest a vizsgálat minden mérési pontján (T_{1-4}) szignifikánsan magasabbak voltak ($p < 0,05$). A műtétet megelőző értékekhez (T_1) viszonyítva már a reperfúzió (T_2) során szignifikáns ($p < 0,05$) emelkedett MMP-9/TIMP-1 szinteket észleltünk a CEA csoporton belül, melyek az első posztoperatív napra (T_3) tovább emelkedtek, míg a harmadik posztoperatív napra (T_4) visszatértek a preoperatív (T_1) értékek közelébe ($p > 0,05$) (4C. ábra).

A kirekesztési idő (CCT) szignifikáns pozitív korrelációt mutatott az életkorral és a cukorbetegséggel (Spearman $\rho = 0,35$, $p < 0,05$). Az előbbi két változó mellett a dohányzást, mint harmadik független változót - előzetes elemzést követően - kiválasztva többváltozós lineáris regressziós analízist végeztünk, melynek eredménye alapján a betegeinknél mért CCT teljes variabilitásának a 19% volt magyarázható a kiválasztott három változóval ($p < 0,05$). Az MMP-9, a TIMP-1 és az MMP-9/TIMP-1 arány valamint a mért CCT-k között azonban nem találtunk szignifikáns összefüggést.

5. Összegzés

Az elvégzett vizsgálatok eredményeit összegezve jól látható, hogy az MMP-TIMP rendszer és így az ECM sem tekinthető statikus struktúrának. A szervezetet érő hatások (sérülés, infekció, iszkémia) következtében elinduló folyamatok (gyulladásos mediátorok felszabadulása, MMP aktiváció, TIMP szupresszió/aktiváció) dinamikus kölcsönhatása okán vagy egy adott kórkép (szepszis, POCD, stroke) fejlődik ki, vagy regeneráció indul meg, és a szervezet a gyógyulás útjára lép. A fenti folyamatok időben dinamikusan változnak, melyet vizsgálataink is igazoltak. Akár a SIRS, a súlyos szepszis vagy éppen a CEA kapcsán kialakuló változásokra tekintünk, a lezajló folyamatokat nem szabad kizárólag egy kiragadott, szubjektív időpontban vizsgálni, hanem azok időbeli változását is figyelembe kell venni a helyes következtetésekhez. Az irodalmat áttekintve gyakoriak az MMP-TIMP rendszer esetében is a szubjektív módon meghatározott időpontokban történt vizsgálatok, melyek sajnos az időbeli kinetikát feltáró vizsgálatok alapján nem nyújtottak elegendő tudományos információt. Természetesen a kinetikai vizsgálatok is szubjektív módon kijelölt időpontokban történnek, azonban ezen időpontokban tapasztalt összességéből már tendencia rajzolódik ki, mely a későbbi mérési pontok tekintetében nagy segítséget jelent. Jelen dolgozat az MMP-TIMP rendszer tekintetében többek között e tendenciákat tárta fel égési sérülés indukálta SIRS, súlyos szepszis és CEA műtétek kapcsán.

Korábbi vizsgálatok prediktorként említik az MMP-TIMP rendszer tagjait különböző végpontok tekintetében. Az MMP-9 mind a szepszis kimenetele, mind a POCD kapcsán felmerült, míg az MMP-9/TIMP-1 és a TIMP-1 a szepszis mortalitásával összefüggésben került említésre. Ezen enzimek biomarker szerepét számos más kórkép esetében is hangsúlyozzák. Fontos megemlíteni, hogy a kimenetellel vagy valamely szövődménnyel összefüggésben tapasztalt statisztikailag szignifikáns kapcsolat nem feltétlenül jelent ok-okozati viszonyt. Az MMP-TIMP rendszer és a vele szoros, bonyolult kölcsönhatásban álló rendszerek (citokinek, interleukinek) esetében a szervezet biokémiai működésébe való beavatkozás a folyamatok részleteinek megértése nélkül nem feltétlenül a kívánt eredményt hozza. Így az enzimek gátlása, vagy specifikus antitestek alkalmazása esetén sem biztosítható feltétlenül a kedvező kimenetel.

6. Tézisek

Az MMP-TIMP rendszer vizsgálata során a SIRS-ben és a súlyos szepszisben szenvedő betegeknél igazoltuk, hogy:

1. a SIRS és a súlyos szepszis időbeli lefolyásával párhuzamosan dinamikusan változik a plazma MMP-9 és TIMP-1 koncentrációja, valamint következményesen az MMP-9-TIMP-1 aktivitása is. A különböző fázisokra (sérülés, SIRS, szepszis) jellemző MMP-9-TIMP-1 mintázatokat is sikerült azonosítanunk. Ezen időbeli változások oka lehet a különböző fázisokban aktív pro- és anti-inflammatorikus folyamatok időbeli lezajlása és az azok közötti egyensúly felborulása, melyet az irodalmi adatok is alátámasztanak;
2. a szöveti sérülést követően azonnal megemelkedik az MMP-9 koncentrációja, míg a TIMP-1 plazmaszint nem változik. Az, hogy az MMP-9 a szöveti sérülésnek vagy annak kiterjedésének markere, feltételezhető ugyan, de az e tárgyú irodalmi adatok ellentmondásosak;
3. a SIRS fázisában csökkenő MMP-9 és emelkedő TIMP-1 tendenciát sikerült igazolnunk, míg a szepszis fázisában normális vagy közel normális MMP-9 szinteket és jelentősen emelkedett TIMP-1 szinteket találtunk. Az MMP-9/TIMP-1 szepszisben szignifikánsan csökkent;
4. a szepszis gyógyulási folyamatával párhuzamosan normalizálódó tendencia jellemzi a TIMP-1-et és az MMP-9/TIMP-1-et, míg az MMP-9 normál tartományban van. A perzisztáló magas TIMP-1 és alacsony MMP-9/TIMP-1 az irodalmi adatok alapján a negatív kimenetellel társul;
5. két külön végzett vizsgálat során ugyan, de az irodalmi adatokkal összhangban sikerült igazolnunk, hogy az MMP-9-TIMP-1 plazmakinetika szempontjából időbeli kapcsolat áll fenn a sérülés, a SIRS és a szepszis, mint egymáshoz kapcsolódó, de különálló folyamatok között;
6. szepszis betegeinknél az MMP-2 szint érdemi időbeli kinetikát nem mutatott, így e marker szerepe szepszisben valószínűtlen;

7. az előbbi megállapítás tükrében az MMP-2 segítségével képzett aktivitás markerek (MMP-2/TIMP-1, MMP-2/TIMP-2) vizsgálatának jelentősége szépszisben nagyban megkérdőjelezhető;
8. a TIMP-2 plazma koncentrációja kórosan csökkent értékeket mutathat szeptikus betegeknel, azonban ennek jelentősége még nem tisztázott.

Az MMP-TIMP rendszer vizsgálata során a CEA műtéten átesett betegeknel igazoltuk, hogy:

1. a műtétet megelőzően normális, majd csökkent a TIMP-1 plazma koncentrációja, mely a fokozott ECM átalakulás jeleként értelmezhető;
2. a közvetlen perioperatív időszakban mindvégig emelkedett az MMP-9 plazma koncentrációja. Ennek háttérében a műtétet megelőzően a plakk instabilitása, míg a posztoperatív szakban a mikroembolizáció, a hipoperfúzió és a reperfúzió is állhat;
3. a közvetlen perioperatív időszakban mindvégig kóros a plazma MMP-9-TIMP-1 aktivitása (MMP-9/TIMP-1 arány), mely a műtétet megelőzően a plakk instabilitásának, míg a műtétet követően a fokozott ECM átalakulásának lehet a jele az irodalmi adatokat is figyelembe véve;
4. a közvetlen perioperatív időszakban dinamikusan változik a plazma MMP-9 és TIMP-1 koncentrációja, valamint az MMP-9-TIMP-1 rendszer aktivitás, ezek a változások a mikroembolizáció és az IRI következtében lezajló folyamatok időbeliségével, a kapcsolódó pro- és antinflammatorikus folyamatokkal, a BBB sérülésével és az ECM átalakulással hozhatóak összefüggésbe;
5. szignifikánsan alacsonyabb a TIMP-1 plazma koncentrációja a műtétet megelőzően, amennyiben a beteg ADP receptor antagonistát szed, ennek háttére azonban még nem teljesen tisztázott;
6. a műtétet megelőző alacsonyabb TIMP-1 értékek prediktívek lehetnek az intraoperatív sönt szükségességére. A háttér ok a csökkent TIMP-1 mellett jelenlévő fokozott MMP-9/TIMP-1 aktivitás lehet, ami az instabil plakkok mellett jellemző, azonban az MMP-9/TIMP-1 és a sönt szükségessége között szignifikáns kapcsolatot nem sikerült igazolnunk. Ezen eredményeink pontos megértéséhez további vizsgálatok szükségesek.

7. A szerző publikációi

A szerző értekezéssel kapcsolatos publikációi

Közlemények:

Mühl D*, Nagy B*, Woth G, Falusi B, Bogár L, Weber Gy, Lantos J: Dynamic changes of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in severe sepsis. *Journal of Critical Care*. 2011; 26(6):550-555.

* = equal contribution, teljes IF: 2.134, IF a szerzők döntése alapján: **1.067**

Nagy B*, Szélig L*, Rendeki Sz, Loibl Cs, Rézmán B, Lantos J, Bogár L, Csontos Cs: Dynamic changes of matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 after burn injury. *Journal of Critical Care*. 2015; 30(1):162-166.

* = equal contribution, teljes IF: 2.445, IF a szerzők döntése alapján: **1.223**

Nagy B, Woth G, Mérei Á, Nagy L, Lantos J, Menyhei G, Bogár L, Mühl D: Perioperative time course of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), its tissue inhibitor TIMP-1 & S100B protein in carotid surgery. *The Indian Journal of Medical Research*. 2016;143(2):220-226.

IF (2015): **1.446**

A felhasznált közlemények impakt faktora: 3.736

Hivatkozható előadás kivonatok:

Nagy B, Woth G, Mérei Á, Lantos J, Bogár L, Mühl D: Altered balance of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors during severe sepsis. *Infection*. 2013;41S:7-8.

IF: **2.864**

Nagy B, Woth G, Mérei Á, Nagy L, Lantos J, Menyhei G, Bogár L, Mühl D: Mátrix metalloproteinázok és endogén inhibitoraik vizsgálata carotis endarterectomián átesett betegeken. *Érbetegségek*. 2013;20(4):96-97.

Nagy B, Woth G, Bogár L, Lantos J, Mühl D: Mátrix metalloproteinázok és szöveti inhibitoraik jelentősége szepszisben. *Aneszteziológia és Intenzív Terápia*. 2013;43(S1):12.

Nagy B, Woth G, Mérei Á, Nagy L, Lantos J, Menyhei G, Bogár L, Mühl D: When should we measure matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 regarding postoperative cognitive dysfunction after carotid surgery? *European Surgical Research*. 2014;52S:134.

IF: **2.474**

Nagy B, Woth G, Mérei Á, Nagy L, Lantos J, Menyhei G, Bogár L, Mühl D: A mátrix metalloproteináz-9 (MMP-9) – endogén szöveti inhibitor-1 (TIMP-1) rendszer perioperatív vizsgálata carotis endarterectomián átesett betegeken. *Aneszteziológia és Intenzív Terápia*. 2014;44(S1):4.

A felhasznált absztraktok impakt faktora: 5.338

A szerző egyéb, az értekezéshez nem kapcsolódó publikációi

Közlemények:

Woth G, **Nagy B**, Mérei Á, Ernyey B, Vincze R, Kaurics Z, Lantos J, Bogár L, Mühl D: The effect of Na-selenite treatment on the oxidative stress–antioxidants balance of multiple organ failure. *Journal of Critical Care*. 2014;29(5):883e7-e11.

IF: **1.995**

Mérei Á, **Nagy B**, Woth G, Zsidó N, Lantos J, Mühl D: Effects of therapeutic hypothermia and kinetics of serum protein S100B after cardiopulmonary resuscitation. *Signa Vitae*. 2015;10(2):7.

IF: **0.154**

Hivatkozható előadás kivonatok:

Woth G, **Nagy B**, Ernyey B, Kaurics Z, Vincze R, Bogár L, Mühl D: Szelén szupplementáció hatása a súlyos szepszis során kialakuló oxidatív stresszre. *Aneszteziológia és Intenzív Terápia*. 2013;43(S1):19.

Woth G, **Nagy B**, Mérei Á, Ernyey B, Kaurics Z, Vincze R, Lantos J, Bogár L, Mühl D: The effect of sodium selenite substitution on oxidative stress markers and antioxidants in severe sepsis. *Infection*. 2013;41S:57.

IF: 2.864

Mérei Á, **Nagy B**, Woth G, Zsidó N, Lantos J, Mühl D: Terápiás hypothermia effektusa és protein S100B kinetika reanimációt követően. *Aneszteziológia és Intenzív Terápia*. 2014;44(S1):15.

Woth G, **Nagy B**, Rideg O: Több szervi elégtelen betegek plazma szabad DNS szintje fokozott Gram-negatív bakteriális fertőzésekben. *Aneszteziológia és Intenzív Terápia*. 2014;44(S1):14.

Nagy B, Woth G, Mérei Á, Lantos J, Bogár L, Mühl D: Dynamics of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) after cardiopulmonary resuscitation. *Resuscitation*. 2015;96S:137.

IF: 5.414

Kumulatív impakt faktor: 19.501

8. Köszönetnyilvánítás

Elsőként családomnak szeretném megköszönni, hogy nagy türelemmel és megértéssel fogadták miként kevés szabadidőm jelentős részét e dolgozat elkészítésének szenteltem.

Köszönet illeti témavezetőimet Dr. Mühl Diána (PTE KK AITI) és Dr. Lantos János (PTE ÁOK SOKI) egyetemi docenseket. Dr. Mühl Diána segítségével indulhattam el a tudományos kutatások rögzös útján, mely során példaértékű kitartásával, precíz és ösztönző hozzáállásával mind emberileg, mind szakmailag végig támogatott. Dr. Lantos János az évtizedek során felhalmozott kutatói tapasztalatával segítette e dolgozat alapját képező vizsgálatok sikeres elvégzését. Köszönöm munkahelyi vezetőmnek, Prof. Dr. Bogár Lajos intézetigazgató egyetemi tanárnak (PTE KK AITI), hogy a lehetőségekhez mérten maximálisan igyekezett segíteni tudományos céljaim elérését. Prof. Dr. Menyhei Gábor klinikaigazgató egyetemi tanár (PTE KK Érsebészeti Klinika) és kollégái támogatása és pozitív viszonyulása nagyban segítette munkámat, melyet ezúton is köszönök. Dr. Csontos Csaba egyetemi docens (PTE KK AITI) segítségével nyílt lehetőségem vizsgálataimat az égett betegek eredményeinek elemzésével kibővíteni, amiért és az évek során Tőle tanultakért külön hálás vagyok. Dr. Nagy Lilla egykori TDK hallgató sok szabadidőt fektetett a vérminták gyűjtésébe, amiért köszönet illeti. Hálával tartozom Döme Tiborné (PTE KK AITI) és Tóthné Fajtik Csilla (PTE ÁOK SOKI) minták vételezésében és feldolgozásában nyújtott segítségéért. Köszönöm Prof. Dr. Kovács L. Gábornak, hogy csatlakozhattam az általa vezetett Doktori Iskolához, Dr. Jancsó Gábor intézetigazgató egyetemi docensnek (PTE ÁOK SOKI) pedig, hogy a kutatásokhoz kapcsolódó mérések elvégzésére lehetőséget biztosított. Minden kutatótársamat, különösen Dr. Woth Gábort és Dr. Mérei Ákost köszönet illet, amiért velem együtt gondolkodva segítettek a nehézségek leküzdésében. Hálás vagyok Dr. Rendeki Szilárdnak, akinek segítségével lehetőségem nyílt a medicina új aspektusainak megismerésére is.

A PTE KK és ÁOK számos orvosa, szakdolgozója és adminisztrátora segíti nap mint nap kutató, gyógyító és oktató munkámat, melyért és áldozatos munkájukért is köszönet illeti őket.

Végül, de nem utolsó sorban, szeretnék köszönetet mondani azon betegeknek is, akik beleegyezésükkel hozzájárultak vizsgálataink elvégzéséhez.