

# **A neurogén hólyag szindróma mikrokeringésének szempontjai**

Dr. Járomi Péter

Ph.D. Tézis

Multidiszciplináris Doktori Iskola

Témavezető: Dr. habil. Szabó Andrea Ph.D.

Sebészeti Műtéttani Intézet

Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar

Szeged

2020

## 1. BEVEZETÉS

A húgyúti rendszer patológiájában a gyulladásos kórképek hangsúlyos szerepet játszanak, ugyanakkor a gyulladás minden lényegi eleme (*rubor, tumor, dolor, calor*) a mikrocirkuláció szintjén zajló jelenségekre vezethető vissza. A mikrokeringés juttatja el az inflammációs jeleket közvetítő molekulákat és sejteket az érintett szövetekhez, és e funkció ellátása során a mikroereket határoló endothel sejtek működése is megváltozhat. Az endothelium aktivációja az antigénekre adott „klasszikus” gyulladásos válasz során azonban nem iniciáló, hanem következményes tényező. Ugyanakkor más esetekben, így például az oxidatív károsodással járó hypoxia-reoxigenizációs folyamatokban az endothel réteg tekinthető a károsodás fő célszervének. A kimenet mindkét esetben hasonló lesz, végeredményképpen endothel aktiváció és/vagy az endothel sejtek diszfunkciója jelentkezik. Ennek következtében az endothelből származó vasoactiv mediátorok felszabadulása módosul, fokozódik a gyulladás sejtes fázisában szerepet játszó adhéziós molekulák expressziója, és e folyamat részeként a sejt-sejt közötti reakciók (köztük a leukocytá–endothel sejt interakciók) véráramlási zavarokat okoznak. Az endothelium diszfunkció létrejöttében főleg szabad gyökök által mediált reakciók feltételezhetők, de a reperfüzió során aktiválódó proteolitikus enzimek (pl. elasztáz, cathepsin G, proteáz III) felszabadulásának is nagy jelentőséget tulajdonítanak. Ismert az is, hogy a mikrokeringés szintjén a sejtes gyulladásos reakciók a vérlemezkék és a polimorf magvú leukocyták (PMN) fokozott kitapadásával, szöveti migrációval és további lokális reakciókkal járhatnak együtt. Az ischaemia/reperfüziós (IR) károsodás által okozott mikrovaszkuláris diszfunkció végül (1) jellegzetes mikrocirkulációs reakciókban nyilvánul meg, amelyeket (a) a funkcionális kapilláris sűrűség, (b) a vörösvérsejt áramlási sebesség, (c) a venuláris és arterioláris átmérő csökkenése és (d) a szöveti permeabilitás fokozódása jellemez; ugyanakkor (2) PMN-ekhez kötődő mikrokeringési gyulladásos reakciókat is előidézik a posztkapilláris vénákban.

Az egyik leggyakoribb, nem fertőzőes eredetű hólyaggyulladás az interstitialis cystitis (IC), ahol a szövetkárosodás az epitheliumot érinti, ami a nyálkahártya mélyebb rétegeit érintve fekélyes szöveti változásokat (Hunner lézió) eredményez. A barrier funkció károsodása felelős a klinikai tünetekért, de a hipoperfüzió is szerepet játszhat a nyálkahártyasérülés kialakulásában. A húgyhólyag másik gyakori gyulladásos betegsége a haemorrhagias cystitis (HC), amely alkiláló hatású kemoterápiás szerek, így a

cyclophosphamid (CYP) toxikus metabolitjának (acrolein) gyakori iatrogén mellékhatása, mely szintén az urothelium felől vált ki gyulladási reakciót, ami aztán hatással van az intesztinumra és annak mikroereire, de a folyamatnak neurogén komponensét is feltételezik. A PMN-ek és egyéb gyulladási tényezők jelenlétét igazolták IC-ben és HC-ben, de patogenezisükben a mikrocirkulációs reakciók szerepe nem tisztázott.

A neurogén hólyag egy gyűjtőfogalom, mely magában foglalja azokat vizelettárolási és ürítési rendellenességgel járó betegségeket, melyek háttérben neurológiai ok áll. A leggyakoribb tünetek közé tartoznak a stressz inkontinencia és a hiperaktív hólyag, melyek érintik mind a húgyhólyag, mind a hólyagnyak és záróizom („bladder outlet”) funkcióját, így erre a komplex rendellenességre „az alsó húgyutak neurogén diszfunkciója” kifejezést használják napjainkban. A változatos kiváltó okok közé soroljuk a lokális funkcionális rendellenességeket és idegkárosodásokat, de háttérben állhatnak felső- és alsó motoneuron sérülés vagy degeneratív neurológiai betegségek is, melyek a hólyag és a záróizom összehangolt működésének zavarát okozhatják. Fontos megjegyezni, hogy a „neurogén alsó húgyúti diszfunkció” jellegzetesen eltérő tünetekkel jár a mögöttes neurogén ok lokalizációjától függően. A betegségnek két fő megnyilvánulási formája van: a hiperaktív (1. típus) és az alulműködő (2. típus) hólyag. Mindkét formában csökkent compliance/tágulékonyság jellemző, illetve mindkét idegrendszeri folyamat következményeképpen megnövekedett hólyagnyomás, vesico-ureteralis reflux, valamint ebből eredő ureter- és vese üregrendszeri tágulat, hydronephrosis és veseelégtelenség jöhet létre. A differenciáldiagnosztika különösen nehéz, mert a túlműködő hólyag háttérben nemcsak neurogén ok állhat, ismert idiopathiás vagy myogén formája is, jellemzően nem specifikus tünetekkel. Ezek fényében a vesekárosodás megelőzése érdekében az urodinamikai vizsgálaton észlelt változások pontos diagnózisa kiemelten fontos.

A kemoszenzitív primer szenzoros neuronok C-rostokon keresztül különféle szerveket és szöveteket innerválnak, és ezek a neuronok „transient receptor potential vanilloid 1” (TRPV1) típusú receptorokkal rendelkeznek. A TRPV1 receptorok szerepe még nem teljesen ismert, de élettani modulációs és protektív funkciókat tulajdonítanak ezekben. Kóros állapotokat jelző ingerek hatására a TRPV1 receptorok neuropeptidok felszabadulását eredményezik a stimulált idegvégződésekből (pl. calcitonin gene-related peptide; CGRP és substance P), melyek helyi szöveti reakciók és neurogén gyulladási reakciók (vazodilatáció és plazma extravazáció) kialakulásával járnak. A húgyhólyagban a TRPV1 gazdagon expresszálódik az afferens rostokban és az urothelsejtekben is, szabályozva ezzel a vizelési reflexet is a húgyhólyag szenzoros beidegzésén keresztül.

A húgyhólyag esetében számos kórfolyamat a C-afferens rostok működésének változásával jár, beleértve a neurogén detrusor túlműködést, az idiopátiás detrusor túlműködést és a hólyag kimeneti obstrukcióját is. IC-ben szenvedő betegeknél a klinikai tünetek és a gyulladás súlyossága korrelációt mutat a TRPV1-immunreaktív idegrostok fokozott expressziójával a húgyhólyagban és az urotheliumban, mely együtt jár ezen sejtek magas capsaicin érzékenységgel. A TRPV csatornák szerepét a túlműködő hólyag és neurogén detrusor túlműködés esetén is igazolták. A TRPV1 részt vesz a húgyhólyagfájdalom kialakulásában, így a TRPV1 agonisták segítségével terápiásan is befolyásolható a capsaicin-szenzitív idegek által közvetített fájdalomérzet.

A TRPV1 aktivációról ismert, hogy számos szervben jellegzetes mikrocirkulációs reakciókat vált ki vazóaktív peptidek (CGRP és substance P) felszabadulása révén, ami a helyi véráramlás rapid növekedésében és a helyi permeabilitás fokozódásában manifesztálódik. A perivaszkuláris idegekből felszabaduló neurotranszmitterek szerepet játszanak a neurogén gyulladás kialakulásában is. A vasodilatáció részben a CGRP felszabadulásához köthető, de ennek kialakulásában közvetett mechanizmusok is szerepet játszhatnak, úgymint az endotheliális  $Ca^{2+}$ -dependens nitrogénmonoxid (NO)-szintáz fokozott aktiválódásának következtében felszabaduló NO, melyet a TRPV1-függő intracelluláris  $Ca^{2+}$  emelkedés révén vált ki. A TRPV1 receptorok aktiválása által kiváltott ödéma kialakulása azonban a substance P felszabadulásához és az endotheliális neurokinin-1 (NK1) receptorokhoz való kötődéséhez kapcsolódik, ami az érrendszeri permeabilitás és a PMN infiltráció dóziszfüggő növekedéséhez vezet. A plazma extravazációt a capsazepin vagy az NK1 receptor antagonizmus gátolhatja. Annak ellenére, hogy a húgyhólyag betegségeinek gyógyszeres kezelésében korábban TRPV1 agonistákat alkalmaztak, a TRPV1 aktivációjának potenciális akut mikrocirkulációs mellékhatásait még nem vizsgálták. A jelen tanulmány egyik célja ezért az archetipikus TRPV1 agonista capsaicin hatásainak vizsgálata volt a patkány húgyhólyag mikrocirkulációja vonatkozásában, különös tekintettel a PMN–endothel sejt interakciókra, intravitális videomikroszkópia (IVM) és immunhisztokémia alkalmazásával. A szenzoros idegek szerepét ezekben a gyulladásos jelenségekben a szenzoros neuropeptidek (substance P és CGRP) farmakológiai antagonistái és szelektív szenzoros kemodenerváció segítségével vizsgáltuk.

## 2. A KUTATÁS FŐ CÉLKITŰZÉSEI

- Direkt és indirekt endotheliális károsodással járó állatmodellekben a húgyhólyag gyulladásszerű mikrocirkulációs válaszainak összehasonlító elemzése, az IC és a HC mikrokeringési következményeinek összehasonlítása révén a húgyhólyag IR által kiváltott mikrokeringési reakciókat véve alapul.
- Annak ellenére, hogy a húgyhólyag egyes betegségeinek kezelésében a TRPV1 agonistákat korábban széleskörben alkalmazták, a TRPV1 aktivációjának potenciális akut mikrocirkulációs mellékhatásait még nem vizsgálták. Következő célul ezért az archetipikus TRPV1 agonista capsaicin mikrokeringési hatásainak vizsgálatát tűztük ki a PMN–endothel sejt kölcsönhatások vonatkozásában (IVM és immunhisztokémia segítségével) patkányban. A szenzoros idegek, valamint a substance P és CGRP szenzoros neuropeptidek szerepét ezekben a gyulladásszerű jelenségekben szelektív szenzoros kemodenzervációs kezelés és farmakológiai antagonisták segítségével elemeztük.
- A kiváltó októl függően a neurogén hólyag túlműködő és alulműködő hólyagot egyaránt eredményezhet. A kísérő tünetek (azaz sürgető inkontinencia +/- vizeletinkontinencia +/- vizeletretenció) nem specifikusak a neurogén hólyagra és eltérő súlyosságot mutatnak, illetve az alsó húgyutak patofiziológiai változásai retrográd módon károsíthatják az uretert és a vesét is. Ezen okokból további célunk egy algoritmus kidolgozása volt, mely segíthet a neurogén hólyag urodinamikai jellegzetességeinek és súlyosságának gyors és hatékony feltérképezésében, ezzel a hazai urológiai gyakorlatot és képzést segítve. Egy ilyen algoritmus segíthet a gyógyszeres vagy invazív kezelés stratégiák megválasztásában, ami pedig a felső húgyutak védelmét is szolgálja a húgyhólyag nyomásértékek mérséklése révén.

## 3. ANYAG ÉS MÓDSZER

A jelen dolgozat kísérletes része két állatkísérletes tanulmányon alapul. Az első kísérleti sorozatban (1. Tanulmány) a leggyakoribb urológiai betegségek mikrocirkulációs következményeit vizsgáltuk a patkány húgyhólyagjában. A második kísérletes vizsgálatban (2. Tanulmány) a topikális capsaicin mikrocirkulációs mellékhatásait és mögöttes receptorfüggő mechanizmusait vizsgáltuk. Egy további összefoglalóban (3. Tanulmány) egy diagnosztikai algoritmus felállítását tűztük ki célul a neurogén hólyag betegség

súlyosságának megfelelő diagnosztizálása és urodinamikai következményeinek elemzése érdekében.

### **3.1. Kísérleti terv és protokoll (1-2. Tanulmány)**

Az első tanulmányban négy csoportban végeztük a kísérleteket. Az első csoportban a hólyag ischaemiáját a hólyag artériáinak reverzibilis lekötésével végeztük 60 percig, majd további 30 perc után megvizsgáltuk a mikrocirkulációs következményeket. A második csoportban az IC korai szakaszát a protamin-szulfát (2 mg/200µl fiziológias sóoldatban) 30 perces intravesicalis instillációjába indukáltuk, amely szelektív urotheliális károsodást okoz, ketamin- és xilazin-altatásban végzett laparotomia után a hólyagkupola steril punkciójával. A protamin-szulfát expozíció után a hólyagot steril sóoldattal átmostuk, és a hasat steril körülmények között két rétegben zártuk. A gyulladáshoz vezető reakciókat 24 órával az indukció után vizsgáltuk. A harmadik csoportban HC-t modelleztünk, ahol az állatokat intraperitoneálisan nagy dózissal CYP-val (40 mg kg<sup>-1</sup>; 0,1 ml/100g) kezeltük. A mikrocirkulációs vizsgálatokat 24 óra elteltével végeztük. Az álműtött állatokon is laparotómiát végeztünk és a húgyhólyagot fiziológias sóoldattal instilláltuk.

A második tanulmány kísérleteinek célja a capsaicin (50 µM) 15 perces, húgyhólyag felületén történő topikális alkalmazásával társuló mikrocirkulációs gyulladáshoz vezető következmények vizsgálata volt. Két fő sorozatban végeztük a kísérleteket. Az 1. sorozatban a TRPV1 receptor antagonistájaként capsazepint (200 µM felületen/topikálisan) és a TRPV1-pozitív idegek ablációját végeztük (capsaicin újszülöttkori beadásával; 50 mg kg<sup>-1</sup> az állatok két napos korában). A 2. sorozatban a szelektív CGRP receptor antagonistájaként CGRP<sub>8-37</sub>-et (10 µM) és az NK1 receptor antagonistájaként RP67580-at (10 µM) capsaicinnel együtt a húgyhólyag felületén (topikálisan) alkalmaztuk. Az IVM felvételeket a kezelések után 15, 30 és 45 perccel készítettük.

### **3.2. Intravitális mikroszkópia (1-2. Tanulmány)**

**Mikroszkóp:** Zeiss Axiovert 100HD mikroszkóp; Carl Zeiss GmbH, Jena, Németország; 100 W-os HBO higanylámpa; Acroplan 20x vízimmersiones objektív.

**Jelöléstechnika:** fluorescein-izotiocianát (FITC) -jelölt erythrocyták (0,2 ml iv), rhodamin 6G-jelölt PMN-ek (0,2%, 0,1 ml iv, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA)

**Analízis:** off-line, frame-to-frame (IVM Software; Pictron Ltd, Budapest, Magyarország)

**Paraméterek:** vörösvérsejt áramlási sebesség (µm sec<sup>-1</sup>), PMN-endothel sejt interakciók (gördülés/rolling, kitapadás/sticking)

### ***3.3. Immunohisztokémia (E-selectin and ICAM-1) (1-2. Tanulmány)***

**Fixálás:** 4% paraformaldehid foszfátpufferben (0,1 M, pH = 7,4) két órán át 4 ° C-on,

**Metszés:** fagyasztás mellett, 15 µm vastagságban

**Jelölés:** közvetett kettős jelölés

**Antitestek:** elsődleges: egér patkányellenes anti-ICAM-1 (1A29 klón; BD Pharmingen, San Jose, Kalifornia, USA; 1:1000) és kecske anti-patkány E-selectin (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; 1:1200) 0,3% Triton X-100 tartalmú foszfáttal pufferolt sóoldatban oldva; másodlagos: DyLight® 488 konjugált szamár anti-egér és Cy3-konjugált szamár anti-kecske szekunder antitestek (mindkettő a Jackson ImmunoResearch Europe-tól, Newmarket, Egyesült Királyság). **Fedés:** DAPI-t tartalmazó ProlongGold közeg.

**Analízis:** krioszekciónként 5–9 régió, Zeiss LSM 700 konfokális mikroszkóp ImagePro Plus 6 képelemző szoftvercsomag (Media Cybernetics, USA)

### ***3.4. A neurogén hólyag diagnosztikai algoritmusának kidolgozásához használt módszerek (3. Tanulmány)***

Kidolgoztunk egy algoritmust a neurogén hólyag szindróma diagnosztizálására, amely magában foglalja a diagnosztikai beavatkozásokat a vizsgálatok javasolt sorrendjében, beleértve a vizsgálatok által adott specifikus információkat (besorolás és a betegség súlyossága tekintetében) a jelenlegi irodalmi adatok és saját klinikai tapasztalataink alapján.

### ***3.5. Statisztikai analízis***

A csoportonkénti állatok minimális számát a „PS: Power and Sample Size Calculator” szoftvercsomag alapján határoztuk meg. Az adatok elemzését a SigmaStat statisztikai szoftvercsomaggal (Jandel Corporation, San Rafael, Kalifornia, USA) végeztük. Az 1. Tanulmányban a csoportok közötti különbségeket egyszempontos ANOVA teszttel értékeltük, amelyet Bonferoni post hoc teszt követett. A 2. Tanulmányban a mikrocirkulációs változók csoportokon belüli és közötti változásait kétirányú, ismételt mérésen alapú ANOVA teszttel, majd a Holm–Sidak teszttel elemeztük. Az immunhisztokémiai adatokat kétszempontos ANOVA teszt segítségével elemeztük. Ábráinkon az átlagot ± az átlag standard hibájaként (SEM) fejezzük ki, és a  $P < 0,05$  értékeket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

## 4. EREDMÉNYEK

### ***4.1. A PMN gördülésének (rolling) és kitapadásának (sticking) változásai a húgyhólyag posztkapilláris venuláiban a húgyhólyag-gyulladás különböző urológiai modelljeiben (1. Tanulmány)***

Az első kísérletes vizsgálatban a húgyhólyag endothelium direkt károsodásával járó IR körülbelül hétszer magasabb értéket eredményezett a posztkapilláris venulákban a gördülő PMN-ek számában, mint az áloperált állapot. Huszonnégy órával a PS beadása után ez a különbség körülbelül háromszoros volt; a CYP-kezelés után 24 órával körülbelül ötszörösére emelkedett. A PMN kitapadás szignifikáns növekedését figyeltük meg az összes vizsgált csoportban, amely hasonló mértéket (megközelítőleg hétszeres különbség) ért el az álcsoporthoz képest.

### ***4.2. A vörösvérttest sebességének változásai a húgyhólyag kapillárisaiban a húgyhólyag-gyulladás különböző urológiai modelljeiben (1. Tanulmány)***

A különböző modellek közül csak az IR eredményezett jelentős különbségeket a vörösvérttestek áramlási sebességében az álműtött állatokkal összehasonlítva. A IR körülbelül 30%-kal alacsonyabb értékeket váltott ki, mint az álműtött állatoknál, míg a vörösvérttestek áramlási sebességei hasonlóak voltak az álműtött, az IC és HC modelleknél.

### ***4.3. A szelektív szenzoros kemodenerváció és a TRPV1 antagonizmus hatása a húgyhólyag capsaicin által kiváltott mikrocirkuláció változásaira (2. Tanulmány)***

A helyi capsaicin kezelés a PMN–endotheliális interakciók mértékének jelentős növekedését váltotta ki a húgyhólyag posztkapilláris venuláiban. Az elsődleges (gördülő/rolling) és a másodlagos (adhéziós/sticking) interakciók száma szignifikánsan fokozódtak 15 percen belül helyi capsaicin kezelés után, és ez az emelkedés fennmaradt a teljes 45 perces megfigyelési időszakban. Az újszülöttkori capsaicin-kezeléssel kiváltott egész életen át tartó szenzoros kemodenerváció teljesen megakadályozta a capsaicin által kiváltott érrendszeri változásokat (egyben rámutatva arra is, hogy a capsaicin érhatásai a szenzoros idegekből származó vazoaktív anyagok felszabadulása révén valósulnak meg). Hasonlóképpen, a kompetitív TRPV1 antagonistának a capsazepinnel való együttes alkalmazása jelentősen gátolta a capsaicin által kiváltott intravaszkuláris gyulladásoos reakciókat. Végül sem a capsazepin, sem pedig a capsaicin vivőanyaga nem befolyásolta a PMN által közvetített reakciókat.



#### ***4.4. A CGRP és NK1 receptor antagonisták hatása a húgyhólyag TRPV1 aktivációja által kiváltott mikrocirkulációs reakciókra***

A capsaicin-okozta leukocytá gördülés/rolling fokozódását a specifikus CGRP receptor antagonista CGRP<sub>8-34</sub> megakadályozta a húgyhólyagban, de az NK1 receptor antagonista RP67580 erre nem volt hatással. A PMN kitapadást/adhéziót azonban mind a CGRP, mind pedig az NK receptor antagonisták jelentősen csökkentették.

#### ***4.5. A capsaicin hatása az E-selectin és az ICAM-1 expressziójára a húgyhólyag mikroereiben***

A kontroll húgyhólyagok kis venuláiban halvány-közepes mértékű festődést detektáltunk az E-selectin és ICAM-1 elleni antitestekkel. A capsaicin helyi alkalmazása mind az E-selectin, mind pedig az ICAM-1 immunreaktivitás kifejezett növekedését eredményezte a kis venulákban: a festés intenzitásának kvantitatív értékelése a relatív pixel intenzitás szignifikáns növekedését mutatta ki mind az E-selectin, mind pedig az ICAM-1 immunfestés esetében.

#### ***4.6. A neurogén hólyag szindróma ajánlott diagnosztikai algoritmusa a javasolt vizsgálati módszerek sorrendjében***

(1) Első lépésként a pontos anamnézis felvétele kell, hogy információt szolgáltasson a már felismert neurológiai tünetekről és vizelési rendellenességekről. (2) A kérdőívek és a vizelési naplók segítenek a tünetek súlyosságának objektív értékelésében. (3) A rutin urológiai fizikális- és vizeletvizsgálatok, valamint (4) a hólyag és a vese ultrahangos vizsgálata jelezheti a betegség előrehaladott stádiumának jeleit, de nem képes megkülönböztetni a neurogén hólyag két típusát. (5-6) Az urodinamikai vizsgálatok (cisztometria és uroflowmetria) azonban elengedhetetlenek a neurogén hólyag két fő formájának megkülönböztetéséhez, illetve (7-8) neurológiai és elektromiográfiai vizsgálatokat is kell végezni a lézió lokalizációjának pontosítása céljából. Ezekkel a módszerrel hatékonyan vizsgálhatjuk a detrusor- és a záróizom funkciókat, detektálhatjuk az akaratlan összehúzódásokat és kiszámíthatjuk a hólyag compliance-t/tágulékonyságát. (9) A video-cisztográfia alkalmas a hólyagnyak disszinerg működésének és a belső záróizom és a hólyagnyak szűkületének kimutatására.

## 5. MEGBESZÉLÉS

### ***5.1. Az urológiai betegségek mikrocirkulációs hatásai, melyek direkt vagy indirekt endotheliális károsodással hozhatók összefüggésbe***

A húgyhólyagban az IR funkcionális károsodást okoz, melyben a mikrocirkulációs változások potenciális szerepet játszanak. A funkcionális és mikrocirkulációs változások közötti ok-okozati összefüggést megerősítették egy olyan tanulmányban, amelyben az ischaemiás prekondicionálás nemcsak a hólyag postischaemiás mikrocirkulációs változásait mérsékelte, hanem kivédte a hólyag kontraktilitásában bekövetkező romlást is. Az indirekt endotheliális károsodás (IC vagy HC) más modelljeiben azonban ez a kapcsolat még tisztázásra vár.

Kísérleteink célja a mikrocirkuláció szintjén bekövetkező változások elemzése volt olyan modellekben, ahol az endotheliális aktiváció/károsodás egy következményes folyamat. Az IC pontos etiológiája nem teljesen ismert, létrejöttében fertőzés, toxikus metabolitok felhalmozódása, urotheliális diszfunkció és neurogén hatások játszhatnak szerepet. Kimutatták továbbá a gyulladáshoz vezető citokinek és kemokinek fokozott felszabadulását, illetve ezek gátlásának jótékony hatását, ami arra utal, hogy a gyulladáshoz vezető tényezők is szerepet játszhatnak a kórkép patogenezisében. Arra is fény derült, hogy a gyulladáshoz vezető citokinek hatással vannak bizonyos immunológiai reakciókra és a húgyhólyag szenzoros folyamataira, miáltal közvetlenül befolyásolhatják a vizelés szabályozását is. Ezt a feltételezést klinikai megfigyelések is alátámasztják, ahol fokozott gyulladáshoz vezető infiltrációról számoltak be IC-s betegeknel. Ezen túlmenően a kemotaktikus kemokin receptor jelátvitel útvonal fokozódását is detektálták egy HC modellben, ahol ennek a folyamatnak a gátlása a húgyhólyag túlműködésének csökkenését eredményezte, ami patkányokban a húgyhólyag jobb compliance-t is eredményezte.

Kísérleteinkben az indirekt endotheliális sérülés modelljeiben bekövetkező mikrocirkulációs gyulladáshoz vezető reakciókat az IR által okozott változásokkal hasonlítottuk össze. Az IR kísérletes modelljében kimutatták ugyanis, hogy a mikrokeringés romlása és a mikrovaszkuláris permeabilitás növekedése szorosan összefügg a sejt-sejt közötti gyulladáshoz vezető interakciókkal, illetve a PMN-ek által kiváltott károsodást kedvezően lehetett befolyásolni a PMN adhézió gátlását szolgáló antitestekkel. A húgyhólyag urotheliumban, az izomszövetben és az endothel sejteken egyaránt kifejeződő endothelin receptoroknak is szerepe lehet a hólyag IR által kiváltott mikrocirkulációs változásokban. A húgyhólyag esetében a reperfüziót hipoperfüzió jellemzi, amely háttérben (1) az endothelium által

termelt vasoconstríciót okozó mediátorok relatív túlsúlya és/vagy (2) maga az endotheliális károsodás, vagy (3) a szöveti ödéma állhat.

Az IC korai szakaszát jól modellezhetjük a protamin-szulfát intravesicalis instillációjával, amely reverzibilisen inaktiválja a glükózaminoglikán réteget. Ezeket a reakciókat a hám sérülése és a permeabilitás ebből adódó növekedése közvetíti. IC-ben szenvedő betegeknél a hólyaggyulladás súlyossága nemcsak a fájdalommal és a kérdőíven jelzett sürgősségi pontszámokkal, hanem a TRPV1-immunreaktív idegrostok sűrűségével is korrelál. Leukocita invázióról és a hízósejt aktivációról korábban már beszámoltak protamin-szulfát által kiváltott cystitis esetén, de a kapcsolódó mikrocirkulációs eltéréseket csoportunk először írta le a jelen közleményben.

Eredményeink azt mutatják, hogy az indirekt endothelium károsodással összefüggő betegségek az IR-hoz hasonló mikrocirkulációs zavarokat okoznak. A mikrocirkulációs változások fontosságát az IC patogenezisében olyan megfigyelések is alátámasztják, amelyekben a hólyag barrier funkciójának javulása enyhítette a klinikai tüneteket, ugyanakkor a fekélyek (Hunner léziók) száma is csökkent. Feltételezik továbbá irritáló ágensek felszabadulását, a NO-termelés relatív hiányát és a helyi szabadgyökök felszabadulását is a betegség patogenezisében. Az IC-vel végzett humán vizsgálatokban jelentős változásokat mutattak ki a PMN funkciókkal összefüggő génexpresszióban és ezek fokozott szöveti felhalmozódásában, valamint az ICAM-1 adhéziós molekula expressziójában.

A CYP által kiváltott HC a klinikai gyakorlatban nagyon gyakori nem fertőző cystitis, amelyet markáns hólyagödéma, vérzés és urothelsejt károsodás jellemez, ugyanakkor a PMN aktivációban szerepet játszó citokinek (TNF- $\alpha$  és IL-1 $\beta$ ) patofiziológiai szerepe szintén kulcsfontosságú a betegség előrehaladásában. A neurogén komponens jelenléte a HC-ban szintén feltételezhető a húgyhólyag megnövekedett neuropeptid (CGRP és substance P) koncentrációja, valamint a TRPV1 mRNS fokozott expressziója miatt. A húgyhólyag barrier diszfunkciójának károsodása együtt jár az idegvégződések és a gerincvelő (L6 és S1) sejtek károsodásával. Ebben a modellben leírták az NK1-függő PMN felhalmozódást is, amelyet szintén gátolni lehetett TRPV1 antagonizmussal. Itt kell megjegyezni, hogy kísérleteink a PMN-endothel sejt kölcsönhatásokat betegség korai szakaszában vizsgálták, amikor a kemoterápiával összefüggő leukopoenia még nem alakult ki és a PMN-ek szerepe a CYP által kiváltott mikrocirkulációs reakciók későbbi szakaszában már nem valószínű.

## ***5.2. TRPV1 által közvetített akut neuropeptid felszabadulás mikrocirkulációs következményei a húgyhólyagban***

A TRPV1 agonisták alkalmazása a hiperaktív hólyag szindróma egyik lehetséges kezelési módját képezte korábban. Tanulmányunkban a TRPV1 agonista capsaicin helyi alkalmazása révén kiváltott sejtes gyulladási folyamatokat és azok dinamikáját vizsgáltuk a húgyhólyagban. A PMN-endotheliális interakciók rendkívül korai fokozódását detektáltuk a hólyag postkapilláris venuláiban (már 15 perccel a capsaicin beadását követően), és ezek a gyulladási folyamatok az egész kísérleti periódus alatt (45 perc) fennmaradtak. A capsaicin beadását követő korai gyulladási változásokról számoltak be az NK1 receptor aktivációval összefüggő ödéma képződés és PMN akkumuláció vonatkozásában a bőrben, a hasnyálmirigyben és a légcsőben is capsaicin hatására.

Kimutattuk azt is, hogy a capsaicin mikrovaszkuláris hatásai specifikusan a TRPV1 receptorok közvetítésével valósultak meg, hiszen ezen sejtes gyulladási reakciók mind a TRPV1 receptor antagonizmus, mind pedig a TRPV1-et expresszáló nociceptív neuronok eliminációja (újszülöttkori deszenzitizációja) révén megelőzhetőek voltak. Ezek a megfigyelések a húgyhólyagban kialakuló gyulladási folyamat neurogén eredetére utalnak a capsaicin helyi beadása után. Eredményeink azt is alátámasztják, hogy a capsaicin hatása TRPV1-et expresszáló szenzoros idegekben bekövetkező gyulladási neuropeptid felszabadulás révén valósul meg. A CGRP és a substance P egyaránt hozzájárul a PMN-ek capsaicin által kiváltott endotheliális adhéziójához (sticking), de a rolling fokozódásában elsősorban a CGRP játszik szerepet.

A sejtes gyulladási mikrovaszkuláris változásokkal párhuzamosan az E-selectin és az ICAM-1 adhéziós molekulák immunreaktivitása is fokozódik a húgyhólyag postkapilláris venuláiban a capsaicin hatására. Hasonló változásokat detektáltak a substance P helyi artériás injekciója után egy órával is, amikor ICAM-1 expresszió NK1 receptor-dependens növekedést észlelték a húgyhólyagban. A substance P által kiváltott leukocita akkumuláció fokozódás másik lehetséges mechanizmusa a hízósejtek közvetítésével valósulhat meg egy másik tanulmány szerint.

A capsaicin hatására kialakuló TRPV1 aktiváció és következményes neuropeptid felszabadulás miatt létrejövő mikrokeringési gyulladási reakciók patomechanizmusa azonban még nem teljesen ismert. Az itt bemutatott endotheliális adhéziós molekula expresszió figyelemreméltóan gyors (kevesebb, mint 60 percen belüli) növekedése valószínűleg nem magyarázható az NF- $\kappa$ B útvonalak legidőigényesebb  $Ca^{2+}$ -függő aktivációjával. Eredményeink ugyanakkor más szervek neurogén gyulladási folyamatai

szempontjából is relevánsak lehetnek. A mikrokeringési gyulladáshoz vezető folyamat dinamikája és mértéke ugyanakkor függhet nemcsak a szenzoros beidegződési és a TRPV1 receptorok eloszlási sűrűségétől, de a CGRP és a substance P receptorok szövet-specifikus denzitásától is és az adott szövet specifikumaitól is az adhéziós molekulák expressziója vonatkozásában. Eredményeink ugyanakkor a terápiás célból, elsősorban az IC-ben szenvedő betegek kezelésében alkalmazott TRPV1 agonista kezelések potenciális mikrokeringési komplikációira is felhívják a figyelmet.

### ***5.3. A neurogén hólyag két fő klinikai manifesztációjának elkülönítését és súlyossági besorolását segítő kivizsgálási algoritmus. Terápiás szempontok.***

A neurogén hólyag differenciáldiagnosztikai nehézségei abból adódnak, hogy sok betegség a neurogén hólyagéhoz hasonló tüneteket okoz, ugyanakkor számos betegségben megfigyelhetők ezen eltérések neurogén komponens nélkül is. A felvázolt diagnosztikai algoritmus segíthet az elváltozás helyének meghatározásában és annak tisztázásában, hogy a neurogén hólyag „hiperaktív vagy petyhüdt típusával” állunk-e szemben, amelyet fontos elsőként tisztáznunk a kivizsgálás során. Invazív urodinamikai vizsgálatokra van szükség a vizezés dinamikus és funkcionális változásainak észleléséhez, kiegészítve neurológiai és elektromiográfiai vizsgálatokkal.

#### ***Differenciáldiagnosztikai megfontolások***

A differenciáldiagnózis során az első lépés a vizeletfertőzés okának felderítése, mert a „nem komplikált húgyúti infekció” hasonló tüneteket okoz, mint a neurogén hólyag hiperaktív formája. A neurogén hólyag hiperaktív formáját tekintve ki kell zárni az IC, HC okozta formákat és a húgyhólyag tumorokat. Az IC-ben a tünetek hasonlóak az 1. típusú neurogén hólyaghoz, gyakori vizeléssel, de a húgycsőben észlelt fájdalom gyakori tünet, továbbá a cisztoszkópia megerősíti Hunner-lézióknak megfelelő képet. A HC anamnesztikus adatok alapján ismerhető fel. A húgyhólyag tumorok gyakran hiperaktív hólyagra jellemző tüneteket is okoznak, gyakori és sürgető vizelési ingerrel, elkülönítésében a vizeletüledék- és citológiai vizsgálatoknak, a hólyag ultrahangnak és a cisztoszkópiának van szerepe. A prosztatata hiperplázia és a kismencedei daganatok a 2. típusú neurogén hólyagnál megfigyelhető tárolási/vizelési rendellenességeket okozhatnak, míg a húgycső szűkülete és székrekedés elsősorban vizeletürítési zavarokkal jár együtt; ezek elkülönítésében kérdőívek, az ultrahang vizsgálatok és az uroflowmetria segíthetnek.

### ***Terápiás megfontolások***

A neurogén hólyag esetében a tünetek enyhülése legtöbbször nem oldható meg a kiváltó ok kezelésével, ugyanakkor hasonló tüneteket mutató egyéb betegségek kezelésére alkalmazott gyógymódokkal érhetünk el eredményt. A terápia fő célja a felső húgyúti károsodás megelőzése a betegek szubjektív tüneteinek csökkentése mellett. A vizsgálati eredmények a megfelelő, optimális és egyénre szabott terápia kiválasztását szolgálják, miközben minimalizálják a lehetséges szövődményeket. A neurogén hólyag hiperaktív formájának lehetséges terápiái közé tartozik a detrusor izom lazítása (antimuszkarin szerek), a vizeletretenció megelőzése (alfa adrenerg receptor antagonisták), a hólyag compliance javítása (triciklusos antidepresszáns) és a vizeletkiválasztás gátlása (vazopresszin). A tünetek enyhítésére a kannabinoidok és a szelektív szerotonin–noradrenalin újrafelvételt gátlók is alkalmazhatóak. A vizelési reflex szenzoros részének modulálása (capsaicin és reziniferatoxin alkalmazásával) manapság kevésbé alkalmazott módszer, mert ez a terápia csak akkor lehet sikeres, ha a detrusor túlműködésével együtt a TRPV1 fokozottan expresszálódik az urotheliumban és a suburotheliumban. Terápiarezisztens esetekben a detrusor izom motoros funkciójának blokkolását érhetjük el botulinum toxin helyi alkalmazásával. Petyhüdt hólyag esetén a húgyhólyag ellazulása (alfa adrenerg receptorok gátlásával) enyhítheti a gyenge vizeletáramlást és az erőltetett vizeletürítést. Az invazív terápiák (neuromoduláció, szalagplasztikák, vizeleteltérés, műszfinkter, urethrotomia és hólyag-augmentáció) szintén megfontolandó eljárások, ha a konzervatív kezelések hatástalanok vagy súlyos mellékhatások jelentkeznek. Bizonyos esetekben a katéterezés/önkatéterezés jelenti az egyetlen megoldást a felső húgyutak védelme érdekében neurogén hólyag esetén.

## **6. AZ ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA**

1. Az indirekt endothelium károsodással járó IC és HC hasonló mikrokeringési gyulladáshoz vezető folyamatokat vált ki (a PMN–endothel sejt interakciók vonatkozásában), mint a direkt endothelium károsodással járó IR. Ez a megfigyelés felveti a mikrokeringési gyulladáshoz vezető folyamatok potenciális szerepét e betegségek patogenezisében.
2. A helyi capsaicin kezelés a PMN–endothel sejt interakciók fokozódását váltja ki (mind a rolling, mind pedig a kitapadás vonatkozásában) a húgyhólyag postcapillaris venuláiban, mely együtt jár az E-selectin és ICAM-1 adhéziós molekulák

expressziójának növekedésével. Ezek a változások hatékonyan kivédhetők capsaicinnal végzett szenzoros kemodenerváció és kompetitív TRPV1 antagonizmus révén. A specifikus receptor antagonisták hatásai arra utalnak, hogy a TRPV1 által kiváltott CGRP felszabadulás elsősorban a PMN rollingért, míg a PMN adhézióért a CGRP és substance P együttesen lehet felelős.

3. A rendelkezésre álló irodalmi adatok és saját klinikai tapasztalataink alapján javasolunk egy kivizsgálási algoritmust, mely segítségével a neurogén hólyag diagnózisa és differenciáldiagnosztikája időben és hatékonyan elvégezhető. Ez megkönnyítheti a neurogén hólyag optimálisan személyre szabott és egyedi tüneti kezelésének megkezdését, a lehető legkisebbre csökkentve a felső húgyutak lehetséges szövödményeit. Ezért ez az algoritmus különösen hasznos lehet a neuro-urológia iránt érdeklődő kollégák (neurológusok, urológusok és rehabilitációs szakemberek) számára magyarországi képzésük során.

## 7. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni a Sebészeti Műtéttani Intézet igazgatójának, Prof. Boros Mihálynak, hogy lehetővé tette kutatásom elvégzését intézetében, illetve, hogy áttekintette és kijavította publikációimat és javaslataival emelte azok minőségét. Hálás vagyok Dr. Szabó Andreának a kísérletek megtervezésében és elvégzésében, a kutatásomról szóló cikkek és előadások megírásában, valamint a jelen tézis elkészítésében nyújtott útmutatásaiért. Az ő vezetésével elsajátítottam a tudományos kutatás végzéséhez szükséges alapokat, beleértve a kísérletek elvégzését és a tudományos cikkek publikálásának ismereteit.

Külön köszönet Jancsó Gábor professzornak és Dr. Sántha Péternek az Élettani Intézetből tudományos támogatásukért és az immunhisztokémiai vizsgálatok elvégzésért.

Ezenkívül köszönetemet szeretném kifejezni a Sebészeti Műtéttani Intézet minden munkatárának, valamint az összes technikusának a kísérletekhez és a biokémiai vizsgálatokhoz szükséges feltételek biztosításáért.

Ezúton is szeretnék köszönetet mondani főnökömnek, Dr. Papp Ferencnek és kollégáimnak a Bács-Kiskun Megyei Kórház Urológiai Osztályán, hogy támogatták kutatásomat.

Köszönet a családomnak is a kutatásaim és publikációim támogatásáért.

Kutatási támogatások: OTKA 104656, OTKA 109388, GINOP-2.3.2-15-2016-00015, GINOP-2.3.2-15-2016-00034, NKFIH K116689, EFOP 3.6.2-16-2017-00006, NKFIH-1279-2/2020.

## **AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ TELJES TERJEDELMŰ KÖZLEMÉNYEK**

- I. **Járomi P**, Szabó A, Garab D, Bodnár D, Uhercsák G, Boros M, Hartmann P. Experimental studies on microcirculatory inflammatory reactions of the urinary bladder. *Magy Seb.* 2012;65(4):184-190. doi: 10.1556/MaSeb.65.2012.4.3.
- II. **Járomi P**, Garab D, Hartmann P, Bodnár D, Nyíri S, Sántha P, Boros M, Jancsó G, Szabó A. Capsaicin-induced rapid neutrophil leukocyte activation in the rat urinary bladder microcirculatory bed. *Neurourol Urodyn.* 2018;37(2):690-698. doi: 10.1002/nau.23376. (IF 2018: 2.36)
- III. **Járomi P**, Banyó T, Boros M, Papp F, Szabó A. Clinical aspects and therapeutic possibilities of neurogenic bladder. *Orv Hetil.* (in press) (IF: 0.53)

## **AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ TELJES ELŐADÁSKIVONATOK**

- IV. **Járomi P**, Hartmann P, Szabó A, Garab D, Lakatos Á, Boros M. Antigén dependens és independens gyulladássos mikrokeringési reakciók összehasonlító vizsgálata. XVth Congress of the Hungarian Society of Urology, Debrecen, 2010, Experimental Urology Session, P 12
- V. **Járomi P**, Hartmann P, Garab D, Bodnár D, Boros M, Szabó A. Inflammatory microcirculatory changes in different experimental models of cystitis in rats. 9th World Congress on Urological Research, 15-17 September 2011, Innsbruck, Austria, WCUR11-0076