

Komplement C5a-antagonista-terápia hatása nem okklúzív mesenterialis ischaemia állatmodelljeiben

Effects of complement C5a inhibitor therapy in animal models of non-occlusive mesenteric ischemia

NÓGRÁDY MIKLÓS^{1,2}, VARGA GABRIELLA¹, SZÜCS SZILÁRD¹, KASZAKI JÓZSEF¹,
BOROS MIHÁLY¹, ÉRCES DÁNIEL^{1,@}

Szegedi Tudományegyetem, Szeged

¹Sebészeti Műtéttani Intézet (igazgató: Dr. Boros Mihály)

²Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika (igazgató: Dr. Németh Gábor)

Bevezetés: A nem okklúzív mesenterialis ischaemia (NOMI) anatómiai okok nélkül alakul ki, korai diagnosztizálása nehéz, terápiája sem megoldott. Modellkísérleteinkben a komplement C5a gátlásán keresztül a komplementaktiváció szerepét vizsgáltuk a kórfolyamatban. **Anyagok és módszerek:** A NOMI rövid és hosszú távú hemodinamikai és gyulladásos következményeinek jellemzéséhez Sprague–Dawley patkányokban ($n = 28$) 60 perces parciális aortaokklúziót (PAO; hasi aorta, truncus coeliacustól proximálisan; arteria femoralis középnyomása: 30–40 Hgmm), míg vietnami törpesertésekben ($n = 19$) 60 perces pericardialis tamponádot (artériás középnyomás: 40–50 Hgmm) hoztunk létre. A PAO, valamint a tamponád 45. percében komplement C5a-gátló kezelést alkalmaztunk (acetyl-peptid-A; 4 mg/kg *iv.*). Az állatokban monitoroztuk a makro- és mikrokeringést, mértük a leukocytainfiltrációt, a gyulladásos mediátorok (endothelin, HMGB-1) plazmaszintjét. **Eredmények:** Patkányokban a PAO megszüntetése után 24 órával a C5a gátlása csökkentette a szisztémás gyulladásos válasz részeként megemelkedett perctérfogatot ($203,1 \pm 5$ vs. $269,6 \pm 8,1$ ml/min/kg) és arteria mesenterica superior (AMS) áramlását, fokozta az ileum mucosa mikrokeringését ($833,5 \pm 33,8$ vs. $441,9 \pm 22,4$ μ m/s). Az acetyl-peptid-A sertésekben átmenetileg növelte az AMS áramlását és tartósan az ileummucosa-kapillárisáramlást ($648,1 \pm 45,4$ vs. $329,8 \pm 12,6$ μ m/s). A kezelt állatoknál alacsonyabb gyulladásos mediátorszintet és szöveti leukocytainfiltrációt mértünk mindkét NOMI-modellben. **Következtetések:** A komplementaktiváció jelentős szerepet játszik a NOMI alatt bekövetkező makro- és mikrokeringési zavar kialakulásában, a C5a gátlása a gyulladásos folyamat mérséklése mellett befolyásolja a NOMI hemodinamikai következményeit is.

Kulcsszavak: vékonybél, komplement C5a, mikrokeringés, endothelin, high mobility group box protein-1

Introduction: Non-occlusive mesenteric ischemia (NOMI) develops without anatomical causes. Early diagnosis is challenging and treatments are of questionable effectiveness. We investigated the role of complement activation in the pathophysiology of NOMI in animal models through the inhibition of complement C5a. **Materials and methods:** 60-min partial aortic occlusion (PAO; abdominal aorta, proximal to celiac trunk; mean arterial pressure: 30–40 mmHg) was established in Sprague–Dawley rats ($n = 28$) and 60-min cardiac tamponade in minipigs ($n = 19$; mean arterial pressure: 40–50 mmHg) to observe short- and long-term circulatory and inflammatory consequences of NOMI. Macro- and micro-hemodynamics, leukocyte infiltration, plasma levels of inflammatory mediators (endothelin, HMGB-1) were measured. C5a inhibitor (Acetyl-Peptid-A; 4 mg/kg *iv.*) was administered at the 45th min of PAO or tamponade, respectively. **Results:** Twenty-four hours after PAO systemic inflammatory response increased cardiac output and superior mesenteric artery flow (SMAF). C5a inhibition reduced the elevated cardiac output (203.1 ± 5 vs 269.6 ± 8.1 ml/min/kg) and SMAF and increased ileal microcirculation (833.5 ± 33.8 vs 441.9 ± 22.4 μ m/s). In pigs, after the tamponade, C5a inhibition reduced the immediate hemodynamic disturbances, temporarily increased SMAF and permanently the ileal microcirculation. The Acetyl-Peptid-A treatment reduced leukocyte infiltration and plasma levels of inflammatory mediators in both NOMI models. **Conclusions:** Complement activation plays central role in the macro- and microcirculatory disturbance during NOMI. C5a inhibition reduces the inflammatory activation and influences the hemodynamic consequences of experimental NOMI.

Keywords: small intestine, complement C5a, microcirculation, endothelin, high mobility group box protein-1

Beérkezett: 2016. október 4.; *elfogadva:* 2017. május 15.

@Levelezési cím/Corr. address: Dr. Érces Dániel, Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Sebészeti Műtéttani Intézet, 6720 Szeged, Szőkefalvi-Nagy Béla u. 6. Telefon: +36 62 545 103; Fax: +36 62 545 672;
E-mail: erces.daniel@med.u-szeged.hu

Rövidítések: AcPepA = acetil-peptid-A; AMS = arteria mesenterica superior; CO = thermodilútiós perctérfogat; ET = endothelin; HMGB-1 = high-mobility group box protein-1; HR = szívfrekvencia; MAP = artériás középnyomás; MPO = mieloperoxidáz; NOMI = nem okkluzív mesenterialis ischaemia; OPS = orthogonális polarizációs spektrális; PAO = parciális aortaokklúzió; PT = pericardialis tamponád; RBCV = vörösvértestek átlagos áramlási sebessége

Bevezetés

Nem okkluzív mesenterialis ischaemia (NOMI) az arteria mesenterica superior (AMS) vagy más splanchnicus verőérágak fizikai elzáródásai nélkül alakul ki. Az érintett területen a bélfal károsodása változó mértékű lehet, akár gangraena kialakulása is előfordulhat. A kórkép magas mortalitású, a jelenlegi terápiás lehetőségek mellett eléri az 50–70%-ot.^{1,2} Fontos problémát jelent, hogy leggyakrabban nem specifikus tünetek jelentkeznek, nehezen diagnosztizálható, még modern képalkotó eljárások segítségével is, ezért vagy egyáltalán nem, vagy csak a folyamat késői szakaszában kerül felismerésre, amikor a súlyos szövődmények – peritonitis, szepszis – már bekövetkeztek.¹ Elsődlegesen ritkán alakul ki, ezekben az esetekben a betegek általában idősek, krónikus szívelégtelenségben szenvednek. Gyakrabban jelentkezik szövődményként alacsony perctérfogattal járó állapotok során, de szívsebészeti beavatkozások alatt az extracorporalis keringés miatt kialakuló gyulladós reakció és az alkalmazott vazopresszor-terápia is hozzájárulhat a NOMI kialakulásához.³

A NOMI létrejöttében kiemelkedő jelentőséggel bír az AMS ellátási területén kialakuló reaktív vasoconstrictio. A splanchnicus területre nyugalmi állapotban a perctérfogat 25%-a esik, ezért amennyiben a létfontosságú szervek (központi idegrendszer, vese, szív) vérellátása csökken, a keringés átszerveződése, redisztribúciója jön létre. Ilyenkor az AMS áramlása lecsökken a rezisztenciaerek vasoconstrictiójának következtében. A feltételezések szerint e folyamatban fontos szerepet játszhat a komplementrendszer aktivációja, különösen a képződő C5a-fragmentum. A komplement C5a simaizom-kontrakciót okoz, amellyel közvetlenül is hozzájárul a mikropertúzió csökkenéséhez. Mediátorok felszabadulásának (hisztamin, tromboxán-A₂) szabályozásán keresztül ugyanakkor közvetett módon is szerepet játszik az egyes szervek vérátáramlásának csökkenésében,⁴ és a szisztémás, artériás hipotenzió kialakulásában is.⁵ Kemo-taktikus hatása révén neutrophilgranulocytá-akkumulációt vált ki, citokinek és reaktívoxigén-származékok termelését fokozza, amellyel a gyulladós folyamat súlyosbodásához is hozzájárul.^{6–8}

A komplement C5a szerepét a NOMI kórtanában az acetyl-peptid-A (AcPepA) mesterséges, 17 aminosavból álló (ASGAPAPGPAGPLRPMF), szelektív C5a-antagonista peptid segítségével vizsgáltuk. *In vitro* vizsgálatok igazol-

ták, hogy az AcPepA koncentrációfüggő módon kötődik a komplement C5a központi régiójához.⁹ Az AcPepA korábbi kísérletek során hatékonyan bizonyult C5a-dependens endotoxinsokk-modellekben is, ahol jelentősen javította a kezelés nélkül letális inzultus túlélési arányát.¹⁰

Nagy klinikai jelentősége ellenére a NOMI-ra vonatkozó ismereteink jórészt esetmegfigyelésekből, valamint az érelzáródással kiváltott (okkluzív, az AMS teljes, mes-terseges elzárásával létrehozott) mesenterialis ischaemia állatmodelljeiből gyűjtött adatokból származnak. Utóbbiak azonban csak korlátozottan használhatók a NOMI során kialakuló változások, keringési zavarok kórélettanának megismeréséhez. Mivel a nemzetközi irodalomban nem találtunk megfelelő kisállatmodellt, kidolgoztunk egy eljárást a részleges aortaleszorítással kiváltott NOMI tanulmányozására, patkányokban. E modell alkalmas a NOMI késői hatásainak vizsgálatára is.¹¹ Egy további, nagyállatmodellünkben igazoltuk, hogy a pericardialis tamponád által kiváltott változások alkalmasak a NOMI akut hemodinamikai és gyulladós következményeinek részletes vizsgálatára.¹²

Jelen tanulmányunk célja a komplement C5a kóroki szerepének és a korai gátlás hatékonyságának vizsgálata volt, a NOMI általunk már validált állatkísérletes modelljeinek alkalmazásával, különös figyelemmel a rövid és hosszú távú hemodinamikai és gyulladós következményekre.

Anyagok és módszerek

Kísérleteinkhez 28 hím, Sprague–Dawley patkányt (300 g) és 19 vietnami törpesertést (mindkét nem; 24 ± 3 kg) használtunk. A vizsgálatokat a NIH irányelvei (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) és a tudományos célokra felhasznált állatok védelméről szóló 2010/63 számú EU-direktíva és a 40/2013 (II/14.) kormányrendelet szerint végeztük a Szegedi Tudományegyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága jóváhagyásával (engedélyszám: V/148/2013).

Patkány részleges aortaokklúziója – sebészeti beavatkozások

A kísérlet 0. napján nátrium-pentobarbitál anesztéziát (50 mg/kg *ip*; pentobarbital sodium salt C-II; Sigma-Ald-

rich Inc, St. Louis, Missouri, Amerikai Egyesült Államok) követően az állatokat hanyatt fekvő helyzetben fűtőpadra helyeztük és kanüláltuk a bal oldali arteria femoralist az artériás középnyomás (MAP) és a szívfrekvencia (HR) mérése céljából. Median laparotomiát követően az aorta abdominalis proximális részét kiproparáltuk a rekeszizomtól distalisán és a truncus coeliacus eredésétől proximálisan, majd egy 2 mm átmérőjű szilikonkatéterből (Silastic Medical Grade Tubing, Dow Corning Corporation, Midland, Michigan, Amerikai Egyesült Államok) kialakított érleszorítót helyeztünk az ér köré. A műtétet követően 30 perc nyugalmi szakasz következett, amely alatt az állatok intraperitonealis folyadékpótlásban részesültek (Ringer laktát; 10 ml/kg/h). A vizsgálatokat követően a laparotomia sebét két rétegben suturával zártuk. Az arteria femoralisból a kanült eltávolítottuk. Az ér lekötését követően a bemetszés helyén a bőrt Donati szerint zártuk. Ezt követően az anesztéziát megszüntettük, az állatok szoros megfigyelés mellett obszervációs ketrecre kerültek, ahol *ad libitum* folyadékot és a posztoperatív 10. óráig táplálékot kaptak. A posztoperatív fájdalom csillapítására 40 mg/kg dózisban intraperitonealis adagolt metamizolt (Algopyrin 1 g/2 ml injekció, Sanofi-Aventis Zrt., Budapest, Magyarország) adtunk, szükség esetén (a fájdalom szubjektív tüneteit mutató állatoknál: púpos testtartás, viselkedésmintázat) 20 mg/kg dózisban egyszeri ismétlést alkalmaztunk (álműtött: $n = 2$; PAO: $n = 3$; PAO + AcPepA: $n = 2$).

Az állatokat újra elaltattuk 24 óra elteltével a már leírt módon, majd a spontán légzés megkönnyítésére tracheostomiát hajtottunk végre. A jobb oldali vena jugularist kanüláltuk folyadékpótlás (Ringer laktát infúzió, 10 ml/kg/h) és gyógyszeres kezelés céljából. A MAP és HR mérése céljából kanüláltuk a bal arteria carotis communist. A jobb arteria carotis felől termisztorkatétért (PTH-01; Experimentia Ltd., Budapest, Magyarország) vezettünk az aorta ascendensbe thermodilutiós perctérfogat (CO) mérése céljából (SPELL Haemosys; Experimentia Kft., Budapest, Magyarország). A median laparotomia sebét újra kinyitottuk, majd a mesenterialis véráramlás mérésére ultrahangos áramlásmérő fejet (Transonic Systems Inc., Ithaca, New York, Amerikai Egyesült Államok) helyeztünk az AMS köré.

Patkány részleges aortaokklúziója – kísérleti csoportok és protokoll

Az állatokat véletlenszerűen osztottuk három kísérleti csoportba. Az első csoport ($n = 8$) álműtötként szolgált, míg a második ($n = 8$) és a harmadik ($n = 9$) csoportnál PAO-t váltottunk ki egy órán keresztül, amelynek során a szilikonkatéterből (Silastic Medical Grade Tubing, Dow Corning Corporation, Midland, Michigan, Amerikai Egyesült Államok) kialakított tourniquet részleges megszorításával az arteria femoralisban mért középnyomást 30–40 Hgmm között tartottuk. Az álműtött csoport esetében a műtét beavatkozások és a kísérleti protokoll megegyezett a másik két cso-

portban alkalmazottakkal, azzal a különbséggel, hogy nem került megszorításra az aorta köré vezetett tourniquet. Az első és a második csoportnál az AcPepA vivóanyagát (1 ml fiziológiás sóoldat) a farokvénába adtuk *iv.*, míg a harmadik csoportnál AcPepA-kezelést (4 mg/kg 1 ml fiziológiás sóoldatban *iv.*) alkalmaztunk 15 perccel a PAO vége előtt. A kontrollidőpontban (0. perc), 30 perccel a PAO indukciója után (30. perc), közvetlenül a PAO megszüntetése előtt (60. perc), valamint a 90. percen mértük a MAP és HR értékeit. A megfigyelési idő leteltével az arteria femoralis katétert eltávolítottuk, a sebet pedig suturával zártuk. Az állatokat azonnal kizártuk a kísérletből, ha a vizsgálat alatt vagy azt követően az arteria femoralis kanülálásának szövödményeként hátsó végtagi ischaemia kialakulását (cyanosis) vagy a végtag merevségét, mozgásképtelenségét figyeltük meg (PAO: $n = 2$; PAO + AcPepA: $n = 1$). A tartós senyvedés elkerülése érdekében ezekben az esetekben a kísérlet terminálásra került (Na-pentobarbitál; 120 mg/kg *iv.*; pentobarbital sodium salt C-II; Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, Missouri, Amerikai Egyesült Államok).

A PAO-t követő napon, a műtétet követő 30 perc nyugalmi szakasz után, a PAO megszüntetését követő 24. órában minden csoportnál makrohodinamikai (MAP-, CO-, AMS-áramlás) méréseket végeztünk, valamint 5 cm-re proximálisan a coecumtól a vékonybél-nyálkahártya mikrokeringését orthogonális polarizációs spektrális (OPS) technikával vizsgáltuk. A vizsgálatokat követően a vena cava inferiorból vérmintákat vettünk HMGB-1 és ET-1 plazmaszint meghatározásához. Szöveti mintákat vettünk az ileumból (coecumtól proximálisan 3 cm-re, 1 cm hosszúságban kimetszve) a leukocytaakkumuláció szövettani vizsgálatának céljából, majd az állatokat Na-pentobarbitállal (120 mg/kg *iv.*; pentobarbital sodium salt C-II; Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, Missouri, Amerikai Egyesült Államok) túllaltattuk.

Sertés pericardialis tamponádja – sebészi beavatkozások

A kísérleteket vietnami törpesertéseken végeztük ($n = 19$; 24 ± 3 kg; mindkét nem), amelyeket a műtétet megelőzően 12 órán át éhezettünk, és vizet *ad libitum* fogyaszthattak. Az anesztéziát ketamin (20 mg/kg; CP-ketamin 10% injekció A.U.V. 25 ml; Produlab Pharma B.V., Raamsdonksveer, Hollandia) és xylazin (2 mg/kg; CP-Xylazin 2% injekció A.U.V. 50 ml; Produlab Pharma B.V., Raamsdonksveer, Hollandia) *im.* kombinációjával indukáltuk, majd fenntartását folyamatos propofolinfúzióval (50 μ l/min/kg; Propofol 2% MCT/LCT; Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Németország) végeztük. Altatást követően az állatokat hanyatt fekvő helyzetben fűtőpadra helyeztük és a testhőmérsékletüket 36–37 °C között tartottuk. Az endotrachealis intubációt követően az állatok mechanikus lélegeztetést alkalmaztunk (Harvard Apparatus, South Natick, Massachusetts, Amerikai Egyesült Államok). A légzési térfogatot (10 ± 2 ml/kg) és a légzésszámot úgy ál-

lítottuk be, hogy a $p\text{CO}_2$ értékét vérgázellenőrzés mellett a 35–40 Hgmm-es tartományban tartottuk. A bal oldali arteria femoralist és vena jugularist kanüláltuk a MAP és a CO thermodilutiós (PiCCO Plus, PULSION Medical Systems AG, München, Németország) méréséhez, valamint folyadékpótlás és gyógyszeres kezelés céljából. Az állatok Ringer laktát infúziót kaptak (10 ml/kg/h) a kísérlet teljes időtartama alatt. Median laparotomiát követően az AMS gyökét preparáltuk, amely köré a mesenterialis véráramlás mérése céljából ultrahangos áramlásmérő fejet (Transonic Systems Inc., Ithaca, New York, Amerikai Egyesült Államok) helyeztünk. A pericardialis tamponád létrehozása céljából bal oldali lateralis thoracotomia után a pericardiumba dohányzacskóöltésen keresztül vékony kanült (K31 nasogastricus szonda, Laboratori Don Baxter S.p.A., Trieszt, Olaszország) helyeztünk el, majd rögzítettük. A műtét után 30 perc nyugalmi szakasz következett.

Sertés pericardialis tamponádja – kísérleti csoportok és protokoll

Az állatokat véletlenszerűen három kísérleti csoportba osztottuk. Az első csoport (álműtött, $n = 6$) kontrollként szolgált. Az álműtött csoport esetében a műteti beavatkozások és a kísérleti protokoll megegyezett a második ($n = 7$) és harmadik ($n = 6$) csoportnál alkalmazottal, azzal a különbséggel, hogy itt nem hoztunk létre pericardialis tamponádot. A második és harmadik csoportban intrapericardialis beadott kolloidoldattal (120 ± 30 ml 6% hidroxietil-keményítő) pericardialis tamponádot hoztunk létre, mialatt a MAP-ot 40–50 Hgmm között tartottuk. A tamponád 60 percig tartott, majd a folyadék lebocsátását követően az állatokat további 180 percig obszerváltuk. A harmadik csoport a tamponád 45. percében C5a-antagonista (AcPepA-) kezelést kapott (4 mg/kg bolus, 5 ml fiziológiás sóoldatban *iv.* a vena jugularison keresztül). Az AcPepA-t együttműködő partnerünk állította elő és bocsátotta rendelkezésünkre (Biologica Co. Ltd., Nagoja, Japán). A kontroll és a kezeletlen tamponádos csoportok 0,9%-os NaCl-oldatot kaptak azonos protokoll szerint. A tamponád kezdete jelöli a 0. percet, vérmintákat vettünk a kontrollperiódusban (–90. és 0. perc), valamint a 75., 150. és 240. percekben, amelyekből meghatároztuk a HMGB-1- és a big-ET-szintet. Hemodinamikai monitorozást folyamatosan végeztük. A kísérlet minden 30. percében thermodilutiós perctérfigurat mérés és a hemodinamikai adatok rögzítése történt. Az ileum mucosa mikrokeringését a coecumtól proximálisan 5, 10, illetve 15 cm-re vizsgáltuk három időpontban (–30. perc, 60. perc, 240. perc). A kísérletek végén vékonybél-biopsziát vettünk az ileumból az MPO-aktivitás mérésére. (A coecumtól proximálisan 20 cm-re, az antimesenterialis oldal felől 2 cm legnagyobb szélességben, ék alakban kimetszve.) A mintavételeket követően az állatokat Na-pentobarbitál adásával túltartattuk (120 mg/kg *iv.*; pentobarbital sodium salt C-II; Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, Missouri, Amerikai Egyesült Államok).

Hemodinamikai mérőmódszerek

Patkányok esetében a MAP-, a CO-, HR- és az AMS-áramlás értékeit számítógépes adatgyűjtő rendszerrel (SPELL Haemosys; Experimetria Kft., Budapest, Magyarország) rögzítettük. A sertések monitorozása során a MAP, a CO és a HR adatainak mérésére PiCCO Plus (PULSION Medical Systems AG, München, Németország) rendszert használtunk, az AMS-áramlást számítógépes mérőrendszerrel vizsgáltuk (SPELL Haemosys; Experimetria Kft., Budapest, Magyarország).

A mikrokeringés funkcionális és strukturális vizsgálata képalkotó módszerrel

Mind a sertés-, mind a patkánymodellben a vékonybél-nyálkahártya mikrokeringésének vizsgálata OPS-technikával történt (Cytoscan A/R, Cytometrics, Philadelphia, Pennsylvania, Amerikai Egyesült Államok), amellyel a nyálkahártya felszíni 200 μm -es mélységében levő kapillárisokban keringő vörösvértestek tehetőek láthatóvá kontrasztanyag alkalmazása nélkül.¹³ Az ileum megnyitását követően a nyálkahártya mikrokeringéséről vizsgálatonként három darab látótérről, egyenként 30 s hosszúságú S-VHS videofelvétel készült (Panasonic AG-TL 700, Matsushita Electric Ind. Co. Ltd., Oszaka, Japán), amelyeket off-line analizáltunk (IVM Pictron, Budapest, Magyarország) és meghatároztuk a vörösvértestek átlagos áramlási sebességét (RBCV; $\mu\text{m/s}$).

Vazoaktív és gyulladáshoz vezető mediátorok plazmaszintjének meghatározása

Sertések esetében a vena jugularisból, míg patkányok esetében a vena cava inferiorból 5 ml-nyi vérmintákat vettünk EDTA-t tartalmazó polipropilén csövekbe, majd 1200 G-vel 4 $^{\circ}\text{C}$ -on 15 percig centrifugáltuk (Hettich Universal 32 R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Németország). A plazmamintákat felhasználásig -70 $^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A big-endothelin (big-ET; sertések esetén) és az endothelin-1 (ET-1; patkányok) plazmakoncentrációit ELISA-módszerrel (Big-endothelin ELISA és Endothelin ELISA, Biomedica Medizinprodukte GmbH, Bécs, Ausztria) határoztuk meg. A high-mobility group box protein-1 (HMGB-1) plazmakoncentráció mérésére nagy szenzitivitású és specifikitású lépcsős szendvics ELISA-módszert használtunk (HMGB-1 ELISA Kit II, Shino-Test Corporation, Kanagawa, Japán).

Fehérvérsejt-infiltráció meghatározása

Patkányok esetében a fehérvérsejt-infiltrációt szövettani vizsgálattal határoztuk meg. A PAO-t követő napon, a kísér-

letek végén az ileumból teljes vastagságú szövetmintákat vettünk minden csoportban, amelyeket 6%-os formalinban fixáltuk, paraffinba ágyztuk és belőlük 4 μm vastag metszeteket készítettünk. Hematoxilin-eozin festést követően az ileum nyálkahártyáját infiltráló leukocyták számlálását 400-szoros nagyításon végeztük. A számolást vak módszerrel ugyanaz a személy végezte (Sz. Sz.).

A sertések terminális ileumból származó szövetminták mieloperoxidáz (MPO) enzimaktivitása, a szövetbe akkumulálódott neutrophilgranulocyt-aktivációt jellemzi, amelyet Kübler módszere alapján határoztunk meg.¹⁴ Az MPO enzimaktivitását a minta fehérjetartalmára vonatkoztatva adtuk meg.

Statistikai analízis

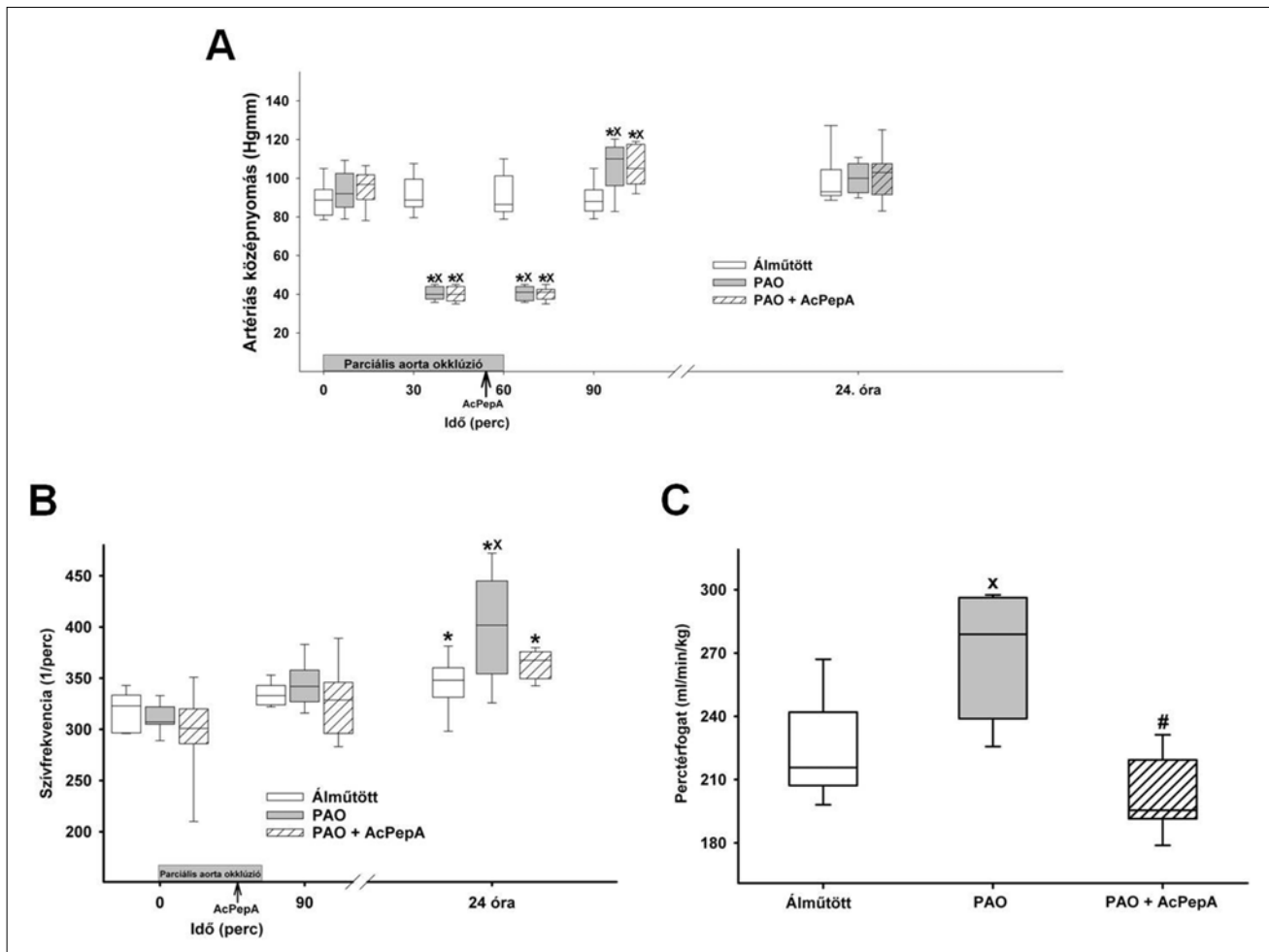
Az adatok kiértékelését statisztikai szoftvercsomag segítségével végeztük (SigmaStat for Windows, Jandel Scientific, Németország), nemparametriás módszereket alkalmazva.

A csoporton belüli eltéréseket Friedman-próbával vizsgáltuk, ezen belül a kontrollértéktől való eltérést Dunn-próbával teszteltük. A csoportok közötti különbségek meghatározása Kruskal–Wallis- és Dunn-próbával történt. A grafikonokon a medián értéket és az interkvartilis fél terjedelmet ábrázoltuk. A szignifikanciaszintet $p < 0,05$ -nél határoztuk meg.

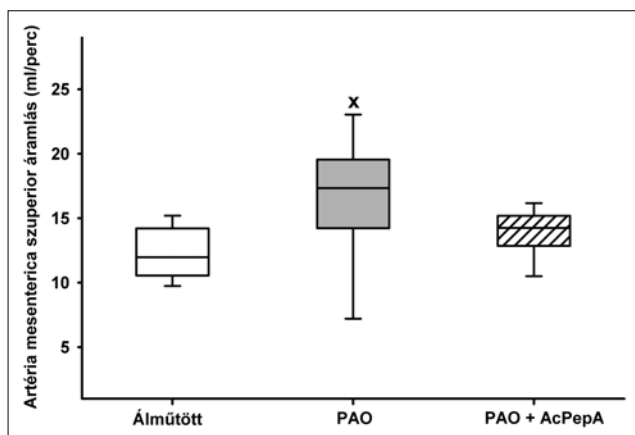
Eredmények

Hemodinamikai változások

A patkányokon végzett kísérleteink során a PAO alatt a MAP-ot egy órán keresztül 30 és 40 Hgmm közti értékeken tartottuk. 30 perccel a PAO vége után a MAP szignifikánsan magasabb értéket ért el az álműtött csoporthoz képest. Az AcPepA-kezelés nem befolyásolta ezeket az értékeket és az álműtött csoporton belül sem alakult ki jelentős változás az első napon (1A. ábra).



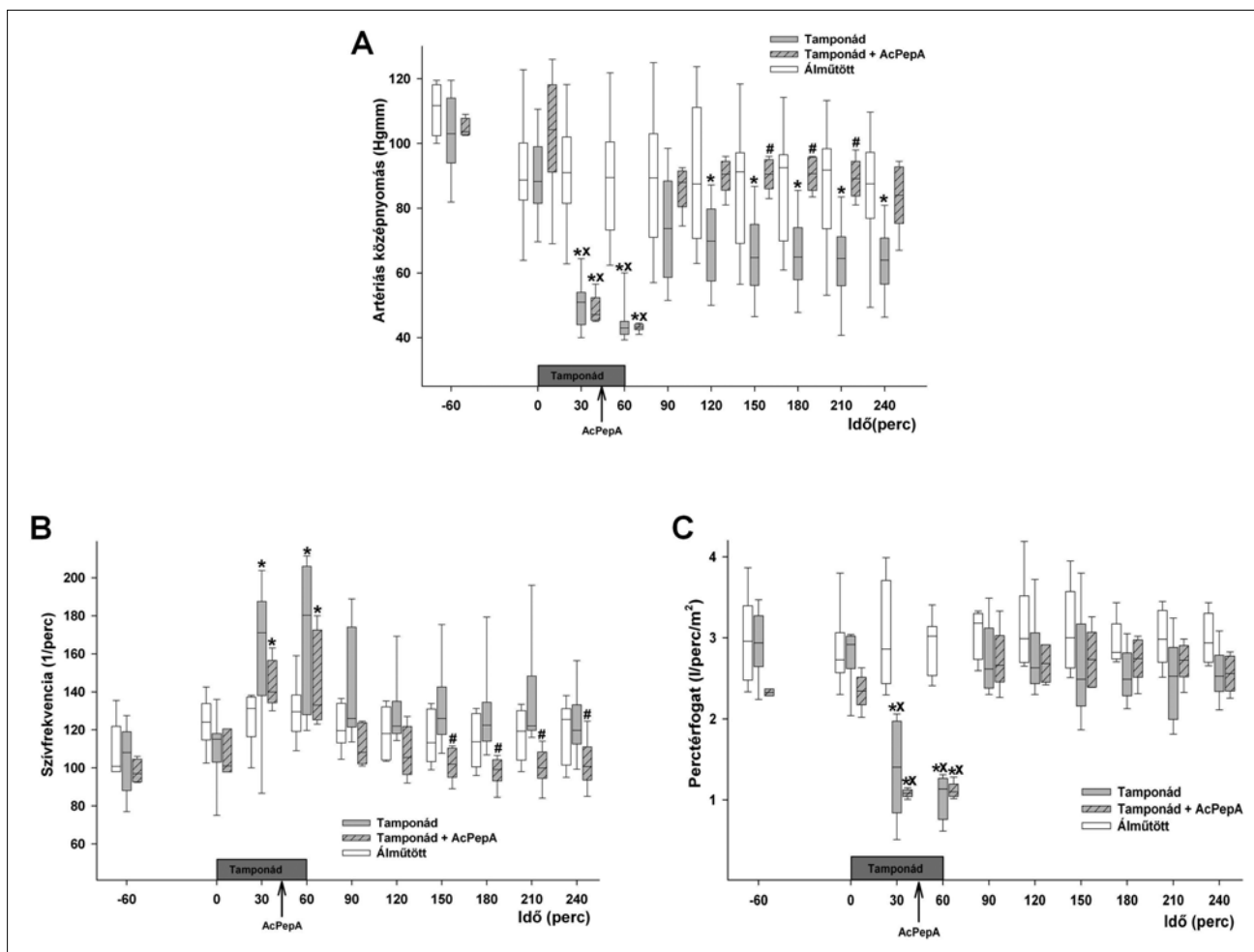
1. ábra. Az artériás középnyomás (A), a szívfrekvencia (B) változásai és perctérfogatértékek (C; 24 órával a parciális aortaokklúzió megszüntetését követően) patkányban az álműtött (fehér oszlop), a parciális aortaokklúziós (PAO; szürke oszlop) és a PAO + AcPepA (sávozott fehér oszlop) csoportokban. Az oszlopgrafikonon a medián értéket és a szórás jellemzésére a 25 és 75 percentilis értékeket tüntettük fel. * $p < 0,05$ csoporton belüli szignifikáns változást mutatja a kontrollértékhez képest; ^X $p < 0,05$ az álműtött csoporthoz képest; [#] $p < 0,05$ PAO + AcPepA csoport szignifikáns változása a PAO-csoporthoz képest



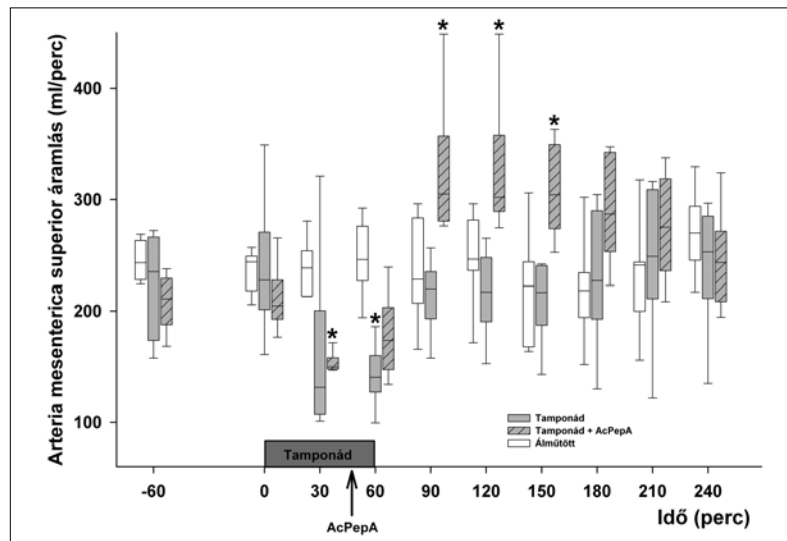
2. ábra. Az arteria mesenterica superior véráramlása patkányban, az álmutött (fehér oszlop), a parciális aortaokklúziós (PAO; szürke oszlop) és a PAO + AcPepA (sávazott fehér oszlop) csoportokban 24 órával a PAO megszüntetését követően. Az oszlopgrafikonon a medián értéket és a szórás jellemzésére a 25 és 75 percentilis értékeket tüntettük fel. $x p < 0,05$ az álmutött csoporthoz képest

Huszonegy órával a PAO megszüntetését követően, a MAP-értékekben nem volt szignifikáns különbség a kontrollértékekhez képest és a csoportok között. A műtéti beavatkozás fokozott HR-t eredményezett a második nappalra, azonban a pulzusszám a PAO-n átesett állatok esetében még az álmutött állatok megemelkedett értékeihez képest is szignifikánsan magasabb volt. Az AcPepA-kezelésen átesett állatokban a HR emelkedése nem ért el szignifikáns mértéket az álmutöttökhöz viszonyítva (*1B. ábra*). A kezelt csoportoknál az AMS-áramlás nem változott a kontrollértékekhez képest. A kezeltlen csoport esetében ugyanakkor jelentős AMS-áramlás-emelkedés volt megfigyelhető az álmutött csoporthoz képest (*2. ábra*). A C5a-gátló kezelés szignifikánsan csökkentette az emelkedett CO-t (*1C. ábra*).

Akut pericardialis tamponád sertésmodellünk esetében a hemodinamikai értékeket PiCCO monitorral regisztráltuk. A tamponád alatt, 1 órán át 40–50 Hgmm között tartottuk a MAP-ot, amely időszak alatt a CO 65%-kal csökkent,



3. ábra. Az artériás középnyomás (A), a szívfrekvencia (B) és a perctérfogat (C) változásai sertésekben, az álmutött (fehér oszlop), a pericardialis tamponád (PT; szürke oszlop) és a PT + AcPepA (sávazott szürke oszlop) csoportokban. Az oszlopgrafikonon a medián értéket és a szórás jellemzésére a 25 és 75 percentilis értékeket tüntettük fel. $* p < 0,05$ csoporton belüli szignifikáns változást mutatja a kontrollértékhez képest; $x p < 0,05$ az álmutött csoporthoz képest; $# p < 0,05$ PT + AcPepA csoport szignifikáns változása a PT-csoporthoz képest



4. ábra. Az arteria mesenterica superior véráramlásának változásai sertésekben, az álműtött (fehér oszlop), a pericardialis tamponád (PT; szürke oszlop) és a PT + AcPepA (sávozott szürke oszlop) csoportokban. Az oszlopgrafikonon a medián értéket és a szórás jellemzésére a 25 és 75 percentilis értékeket tüntettük fel. * $p < 0,05$ csoporton belüli szignifikáns változás mutatja a kontrollértékhez képest

jelentős HR-emelkedéssel. A tamponád megszüntetését követően a perctérfogat és a szívfrekvencia is normalizálódott a MAP jelentős csökkenése ellenére (3A–C. ábra).

A csökkenő CO eredményeként kialakuló redisztribúciót jelezte a szignifikánsan csökkent AMS-áramlás, amely a pericardialis folyadék eltávolítását követően visszatért a kiindulási tartományba (4. ábra).

A komplement C5a-gátló AcPepA-kezelés hatására a CO rendeződése mellett a MAP elérte a kontrollértéket a tamponádot követő időszak alatt. A HR jelentősen csök-

kent, amelyet az AMS áramlásának emelkedése kísért (3A–C. és 4. ábra).

Változások a biokémiai paraméterekben

PAO után 24 órával szignifikánsan megemelkedett a gyulladáshoz köthető mediátor HMGB-1 koncentrációja, amelyet a C5a-gátló kezelés csökkentett. Az ET-1 szintje szintén emelkedett, amit az AcPepA-kezelés szignifikánsan csökkentett (1. táblázat).

1. táblázat. A parciális aortaokklúzió (PAO) és a komplement C5a-gátló AcPepA-kezelés hatása a plazmaendothelin- és -HMGB-1-szintre patkányokban 24 órával a PAO megszüntetését követően

		Álműtött	PAO	PAO + AcPepA
Endothelin (fmol/ml)	Medián	5,77	8,9 ^x	5,23 [#]
	25 p; 75 p	5,11; 6,1	8,34; 9,87	3,8; 5,8
HMGB-1 (ng/ml)	Medián	0,66	2,84 ^x	0,89 [#]
	25 p; 75 p	0,24; 0,87	2,68; 3,23	0,17; 1,96

^x $p < 0,05$ szignifikáns eltérés az álműtött csoporthoz képest.

[#] $p < 0,05$ PAO + AcPepA csoport szignifikáns változása a PAO-csoporthoz képest.

2. táblázat. A pericardialis tamponád (PT) és a komplement C5a-gátló AcPepA-kezelés hatása a plazma big-endothelin- és HMGB-1-szintre sertésekben

		-90. perc	0. perc	75. perc	150. perc	240. perc
Big-endothelin-szint (fmol/ml)						
PT	Medián	0,21	2,11	4,54 ^{**}	5 ^{**}	4,8 ^{**}
	25 p; 75 p	0,02; 0,4	1,03; 3,67	3,8; 5,7	4,03; 5,5	2,66; 5,35
PT + AcPepA	Medián	0,05	0,81	0,93 [#]	1,08 [#]	1,17 [#]
	25 p; 75 p	0,04; 0,07	0,48; 0,87	0,14; 1,11	0,4; 1,38	0,77; 1,44
Álműtött	Medián	0,01	1,136	0,99	0,77	0,95
	25 p; 75 p	0; 0,011	0,3; 1,98	0,31; 1,68	0,35; 1,19	0,31; 1,58

2. táblázat. A pericardialis tamponád (PT) és a komplement C5a-gátló AcPepA-kezelés hatása a plazma big-endothelin- és HMGB-1-szintre sertésekben (folyt.)

		-90. perc	0. perc	75. perc	150. perc	240. perc
		HMGB-1 szint (ng/ml)				
PT	Medián	1,28	2,04	3,7 **	3,5 **	4,8 **
	25 p; 75 p	0,2; 2,7	1,34; 2,98	3,25; 4,4	2,8; 5,5	3,2; 5,6
PT + AcPepA	Medián	0,25	0,82	1,49 #	1,36 #	1,76 #
	25 p; 75 p	0,08; 0,77	0,53; 1,57	0,98; 2,48	0,794; 2,7	1,19; 3,02
Álműtött	Medián	0,78	1,95	1,29	1,34	1,25
	25 p; 75 p	0,01; 1,41	1,03; 2,43	0,95; 1,62	1,03; 1,64	1,0; 1,5

* $p < 0,05$ csoporton belüli szignifikáns változás a kontrollértékhez képest.

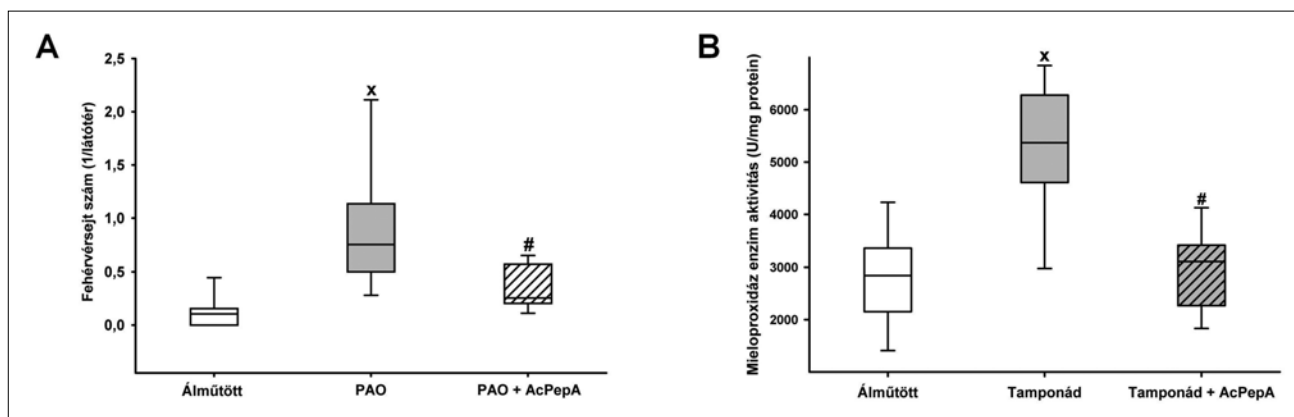
^x $p < 0,05$ szignifikáns eltérés az álműtött csoporthoz képest.

[#] $p < 0,05$ PT + AcPepA csoport szignifikáns változása a PT-csoporthoz képest.

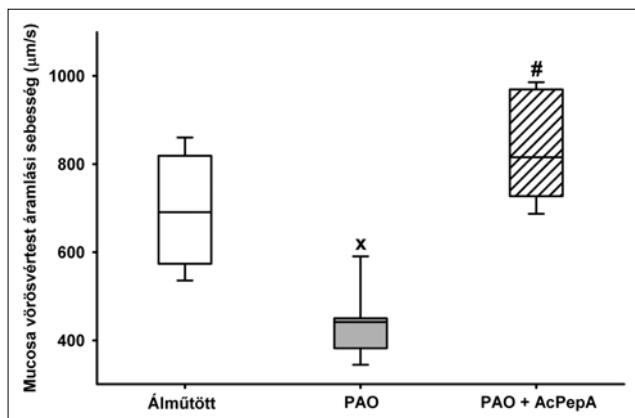
Sertés pericardialis tamponádja során az ET-1 stabil prekursor big-ET jelentősen, négy-ötszörösére emelkedett a C5a-gátló kezelést nem kapott csoportban a tamponádot követően. Jelentős emelkedés volt megfigyelhető a HMGB-1 szintjében is (2. táblázat).

Szöveti leukocytainfiltráció

Patkányokban a PAO megszüntetését követően 24 órával az ileumból vett szövetmintákban szignifikánsan emelkedett fehérvérsejt-infiltráció volt megfigyelhető a PAO-n átesett



5. ábra. A szöveti leukocytainfiltráció mértéke patkányban (A) az álműtött (fehér oszlop), a parciális aortaokklúziós (PAO; szürke oszlop) és a PAO + AcPepA (sávozott fehér oszlop) csoportokban 24 órával a PAO megszüntetését követően. Sertésileumban mért szöveti mieloperoxidáz enzimaktivitás (B) változásai az álműtött (fehér oszlop), a pericardialis tamponád (PT; szürke oszlop) és a PT + AcPepA (sávozott szürke oszlop) csoportokban. Az oszlopgrafikonon a medián értéket és a szórás jellemzésére a 25 és 75 percentilis értékeket tüntettük fel. * $p < 0,05$ csoporton belüli szignifikáns változást mutatja a kontrollértékhez képest; ^x $p < 0,05$ az álműtött csoporthoz képest; [#] $p < 0,05$ PT + AcPepA csoport szignifikáns változása a PT-csoporthoz képest



6. ábra. A patkány vékonybélmucosájában mért átlagos vörösvérsejt-áramlási sebesség változásai az álműtött (fehér oszlop), a parciális aortaokklúziós (PAO; szürke oszlop) és a PAO + AcPepA (sávozott fehér oszlop) csoportokban 24 órával a PAO megszüntetését követően. Az oszlopgrafikonon a medián értéket és a szórás jellemzésére a 25 és 75 percentilis értékeket tüntettük fel. ^x $p < 0,05$ az álműtött csoporthoz képest; [#] $p < 0,05$ PAO + AcPepA csoport szignifikáns változása a PAO-csoporthoz képest

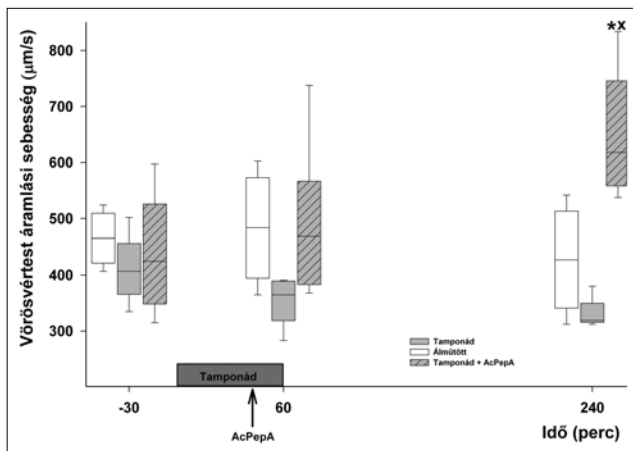
csoportnál az álműtött csoporthoz képest. Az AcPepA-kezelés szignifikánsan csökkentette a fehérvérsejtes beszűrődés mértékét a vékonybél falban (5A. ábra).

Sertések esetében a tamponádot kísérő NOMI következtében az ileum nyálkahártyáját érintő gyulladás alakult ki, amelyet a szövetek között akkumulálódó fehérvérsejtek mennyiségét jellemző szöveti MPO-enzim aktivitásának emelkedése is igazolt. Az AcPepA-kezelés hatására a szöveti MPO-aktivitás jelentősen csökkent (5B. ábra).

A vékonybél-nyálkahártya mikrokeringési változásai

Patkányok esetében a PAO megszüntetése utáni 24. órában a nyálkahártya mikrokeringését az OPS-felvételek alapján szignifikánsan csökkent átlagos RBCV jellemezte az áloperált csoporthoz képest. Az AcPepA-kezelés hatására a vékonybél-nyálkahártya RBCV-értékei a mikrokeringés jelentős javulását mutatták 24 órával az inzultust követően (6. ábra).

A NOMI következtében kialakult akut mikrokeringési változásokat a sertés pericardialistamponád-modelljében tudtuk vizsgálni. Az átlagos RBCV-ben egyértelmű különbség alakult ki a kísérlet végére az AcPepA-kezelés hatására, a mikrokeringés mind a kontrollértékhez, mind a kezelést nem kapott csoporthoz képest is szignifikánsan felgyorsult (7. ábra).



7. ábra. A sertés vékonybél-mucosájában mért átlagos vörösvérsejt-áramlási sebesség változásai az álműtött (fehér oszlop), a pericardialis tamponád (PT; szürke oszlop) és a PT + AcPepA (sávozott szürke oszlop) csoportokban. Az oszlopgrafikonon a medián értéket és a szórás jellemzésére a 25 és 75 percentilis értékeket tüntettük fel. * $p < 0,05$ csoporton belüli szignifikáns változást mutatja a kontrollértékhez képest; x $p < 0,05$ az álműtött csoporthoz képest

Megbeszélés

Sertéseken végzett vizsgálatainkban a NOMI során létrejövő korai, akut hemodinamikai változásokat figyeltük meg. A tamponádot követően a makrohemodinamikai paraméterek közül a csökkent MAP, valamint a szignifikánsan

emelkedő HR volt a meghatározó. E változásokat kifejezett gyulladásos folyamat kísérte, amely során vazóaktív és proinflammációs mediátorok szabadultak fel. A szisztémás keringéssel párhuzamosan a splanchnicus terület mikrokeringése is romlott, amelyet a szöveti MPO-aktivitás növekedése kísért, jelezve ezzel a neutrophilleukocytá-akkumulációt.^{15,16}

A tamponád megszüntetését követően a MAP csökkent, de a CO kompenzált volt, és nem volt különbség a kontrollcsoporthoz képest. Ez a megnövekedett HR-nek volt köszönhető, amely a szívizom fokozott terhelésére utal. Az AcPepA-kezelést követően a MAP a kontrollértékek szintjére emelkedett a CO-hoz hasonlóan, azonban a HR emelkedése nem volt megfigyelhető. Utóbbi változás jelentősége igen fontos, ha figyelembe vesszük azt a tényt, hogy a szívizom keringése a diasztolés fázis alatt biztosított, a szisztolés alatt pedig majdnem teljesen megáll. Az alacsonyabb HR mellett megtartott CO-nál jobb a szívizom oxigénellátása. Elképzelhető, hogy ezeket a változásokat a csökkent ET-felszabadulás eredményezte az AcPepA-kezelés után. Kimutatták, hogy a nem szelektív ET-receptor-antagonista fokozza a CO-t és csökkenti a perifériás ellenállást szív-éltelenségben szenvedő betegeknél.¹⁷ Az AMS-áramlás a tamponád alatt lecsökkent, jelezve ezzel az ellátási terület vérellátásának csökkenését, azonban a tamponádot követően az áramlás visszatért a kontrollértékekre és nem volt szignifikáns különbség az álműtött csoporthoz képest. A kezelt csoportnál az AMS-áramlás szignifikánsan emelkedett a tamponádot követően, majd fokozatosan visszaállt a kontrollértékekre a kísérlet végéig. Ez a korai áramlásemelkedés feltehetően a vasoconstrictor ET-1 relatív hiányának is köszönhető. Ezt támasztja alá, hogy korábbi vizsgálatok igazolták, hogy hasonló körülmények között az ET-A receptor gátlása képes javítani a zsigeri keringést.¹⁸

A késői hemodinamikai változásokat patkányokon végzett kísérleteink során figyeltük meg, ezek hasonlóak voltak a szisztémás gyulladásos válaszban leírt változásokhoz, amely miatt lényeges különbségeket figyeltünk meg a sertésekben mért akut változásokhoz képest. A NOMI indukcióját követő napon, annak ellenére, hogy a MAP a normáltartományban volt, a HR és a CO szignifikánsan megemelkedett. Ez kompenzációs mechanizmus részeként értelmezhető; a szisztémás gyulladás kezdeti szakaszában az oxigénkereslet megemelkedik a fokozott anyagcsereráta következtében. A fokozott oxigénigény kielégítéséhez az oxigénszállítás is növekszik a CO emelkedésével, azonban a sejtek oxigenizációja nem javítható a megfelelően működő mikrokeringés nélkül. A rossz kapilláris perfúzió nem teszi lehetővé az oxigénfelhasználást a látszólag emelkedett oxigénszállítás ellenére sem. Mindkét modell esetében a mikrokeringés jelentős károsodást szenvedett, amelyet a bélnyálkahártya csökkent RBCV-je jelzett, amely azt jelenti, hogy a normális vagy emelkedett AMS-áramlás ellenére kimutatható mikrocirkulációs károsodás volt jelen a bél falban.¹⁵ Az AcPepA-val kezelt csoportoknál a vékonybélben mért RBCV szignifikánsan nagyobb volt. A jobb mikrokeringési paramétereket azonban nem emelke-

dett CO- és AMS-áramlás mellett mértük, amely az oxigén-felhasználás javulását jelezheti. A C5a-gátló kezelés után mért alacsonyabb ET-1-értékek szintén hozzájárulhattak a mikrokeringés javulásához. A fokozott ET-1-fel szabadulás fontos szerepet játszhat az intenzív gyulladáshoz vezető reakció kialakulásában, a komplementrendszer aktiválódása mellett. Az ET-1-fel szabadulás, a kifejezett vasoconstrictor hatás miatt hozzájárul a mikrokeringés zavarához, valamint befolyásolja a citokinek fel szabadulását is.^{16,19} Az AcPepA-val kezelt csoportnál a mikrokeringés javulása valószínűleg több tényezőn alapul, amelyhez a csökkent ET-1-fel szabadulás és leukocitaaktiváció is hozzájárul.

Mind a sertésekben – a tamponádot követő korai szakaszban –, mind a patkányok esetében – az inzulust követő napon – magasabb HMGB-1-szinteket mértünk, amelyet az AcPepA-kezelés szignifikánsan csökkentett. A HMGB-1 fontos proinflammációs citokin, „alarmin”, amely hatékonyan aktiválja a neutrophil granulocytákat és citokintermelésüket fokozza. Eredményeink korrelálnak egy korábbi endotoxinsokk-modellben mért adatokkal, ahol az AcPepA-kezelés hatását vizsgálták.¹⁰ A korábban jelátvitelhez nem kapcsolt úgynevezett „scavenging” C5a receptornak gondolt C5L2 receptorról a közelmúltban megjelent kutatások eredményei bizonyították, hogy fontos szerepe van a gyulladáshoz vezető folyamatok kialakulásában és a komplement C5a rajta keresztül közvetlenül képes szabályozni a HMGB-1-kibocsátást. A C5L2 receptor jelentőségét mutatja, hogy a C5L2 gén kiütése egereknél nagyobb túlélési arányt eredményezett coecum ligatio-punctióval kiváltott szepsziszmodellben a vad típusúhoz képest.²⁰

A fentieket összefoglalva, eredményeink azt igazolják, hogy a komplementrendszer korai aktivációja, ezen belül is a C5a fontos szerepet játszik a NOMI alatt bekövetkező szisztémás hemodinamikai és mikrokeringési zavar kialakulásában. A NOMI kezelési lehetőségei limitáltak, korai diagnózis esetén az egyetlen hatékony lehetőség az AMS-be juttatott vasodilatator kezelés, de a beavatkozás eredményességét a technikai és személyi feltételek korlátozzák. Az intravénásan alkalmazható C5a-gátló kezelés a gyulladáshoz vezető folyamat mérséklése mellett hatékonyan befolyásolhatja a NOMI hemodinamikai következményeit is.

Támogatás: NKFI-116861; NKFIH-K116689; OTKA-K104656; TÁMOP 4.2.4. A/2-11-1-2012-0001; GINOP-2.3.2-15-2016-00015

Irodalomjegyzék

- ¹ Klar E, Rahmanian PB, Bücker A, et al.: Acute mesenteric ischemia: a vascular emergency. *Dtsch Arztebl Int* 2012; 109: 249–256
- ² Trompeter M, Brazda T, Remy CT, et al.: Non-occlusive mesenteric ischemia: etiology, diagnosis, and interventional therapy. *Eur Radiol* 2002; 12: 1179–1187
- ³ Klotz S, Vestring T, Rötter J, et al.: Diagnosis and treatment of nonocclusive mesenteric ischemia after open heart surgery. *Ann Thorac Surg* 2001; 72: 1583–1586

- ⁴ Ito BR, Engler RL, Balzo U, et al.: Role of cardiac mast cells in complement C5a-induced myocardial ischemia. *American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology* 1993; 264: H1346–H1354
- ⁵ Lundberg C, Marceau F, Hugli TE: C5a-induced hemodynamic and hematologic changes in the rabbit. Role of cyclooxygenase products and polymorphonuclear leukocytes. *Am J Pathol* 1987; 128: 471–483
- ⁶ Ehrenguber MU, Geiser T, Deranleau DA: Activation of human neutrophils by C3a and C5A comparison of the effects on shape changes, chemotaxis, secretion, and respiratory burst. *FEBS Letters* 1994; 346: 181–184
- ⁷ Sacks T, Moldow CF, Craddock PR, et al.: Oxygen radicals mediate endothelial cell damage by complement-stimulated granulocytes. An in vitro model of immune vascular damage. *Journal of Clinical Investigation* 1978; 61: 1161–1167
- ⁸ Ember JA, Sanderson SD, Hugli TE, et al.: Induction of interleukin-8 synthesis from monocytes by human C5a anaphylatoxin. *Am J Pathol* 1994; 144: 393–403
- ⁹ Fujita E, Farkas I, Campbell W, et al.: Inactivation of C5a anaphylatoxin by a peptide that is complementary to a region of C5a. *J Immunol* 2004; 172: 6382–6387
- ¹⁰ Okada H, Imai M, Ono F, et al.: Novel complementary peptides to target molecules. *Anticancer Res* 2011; 31: 2511–2516
- ¹¹ Ércses D, Nógrády M, Varga G, et al.: Complement C5a inhibition improves late hemodynamic and inflammatory changes in a rat model of nonocclusive mesenteric ischemia. *Surgery* 2016; 159: 960–971
- ¹² Ércses D, Nógrády M, Nagy E, et al.: Complement C5A antagonist treatment improves the acute circulatory and inflammatory consequences of experimental cardiac tamponade. *Crit Care Med* 2013; 41: e344–e351
- ¹³ Groner W, Winkelmann JW, Harris AG, et al.: Orthogonal polarization spectral imaging: A new method for study of the microcirculation. *Nat Med* 1999; 5: 1209–1212
- ¹⁴ Kuebler WM, Abels C, Schuerer L, et al.: Measurement of neutrophil content in brain and lung tissue by a modified myeloperoxidase assay. *Int J Microcirc Clin Exp* 1996; 16: 89–97
- ¹⁵ Tao W, Zwischenberger JB, Nguyen TT, et al.: Gut mucosal ischemia during normothermic cardiopulmonary bypass results from blood flow redistribution and increased oxygen demand. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 1995; 110: 819–828
- ¹⁶ Boros M, Massberg S, Baranyi L, et al.: Endothelin 1 induces leukocyte adhesion in submucosal venules of the rat small intestine. *Gastroenterology* 1998; 114: 103–114
- ¹⁷ Lüscher TF, Barton M: Endothelins and endothelin receptor antagonists therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. *Circulation* 2000; 102: 2434–2440
- ¹⁸ Wolfárd A, Vangel R, Szalay L, et al.: Endothelin-A receptor antagonism improves small bowel graft perfusion and structure after ischemia and reperfusion. *Transplantation* 1999; 68: 1231–1238

¹⁹ Szabó A, Suki B, Csonka E, *et al.*: Flow motion in the intestinal villi during hemorrhagic shock: a new method to characterize the microcirculatory changes. *Shock* 2004; 21: 320–328

²⁰ Rittirsch D, Flierl MA, Nadeau BA, *et al.*: Functional roles for C5a receptors in sepsis. *Nat Med* 2008; 14: 551–557