

**Állatorvostudományi Egyetem  
Állatorvostudományi Doktori Iskola**

**Az újszülött csikók  
idegrendszerének klinikai és  
kísérleti vizsgálata. Neuroendokrin  
átmenet a magzati állapotból a  
perinatális életbe**

**PhD disszertáció**

**Tóth Balázs**

**2019**

**Témavezető:**

Bakos Zoltán

Egyetemi docens

Lógyógyászati Tanszék és Klinika

Állatorvostudományi Egyetem

Üllő

**Témabizottsági tagok:**

John Madigan

Distinguished Professor

Department of Medicine and Epidemiology

School of Veterinary Medicine

University of California-Davis

Davis-Ca, USA

Monica Aleman

Professor

Department of Medicine and Epidemiology

School of Veterinary Medicine

University of California-Davis

Davis-Ca, USA

## Tartalomjegyzék

<b>1.1. Általános bevezető és hipotézisek</b>	<b>Hiba!</b>	<b>A</b>
könyvjelző nem létezik.		
<b>1.2. Anyag és módszer</b>	<b>.....</b>	<b>6</b>
<b>1.3. Eredmények és megbeszélés</b>	<b>.....</b>	<b>15</b>
<b>2. Összefoglalás és új tudományos eredmények</b>	<b>....</b>	<b>24</b>
<b>3. A disszertációval összefüggő lektorált folyóiratban megjelent publikációk</b>	<b>.....</b>	<b>27</b>
<b>4. A disszertációval nem összefüggő, lektorált folyóiratban megjelent publikációk</b>	<b>.....</b>	<b>28</b>
<b>5. Konferenciák (szóbeli és poszter előadások):</b>	<b>....</b>	<b>31</b>

## **1.1. Általános bevezető és hipotézisek**

Az újszülött csikók különösen érzékenyek a születés utáni napokban, és betegségeik gyakran járnak idegrendszeri tünetekkel. Az idegrendszeri tüneteket a vemhesség és az ellés alatt felmerülő komplikációk egyaránt okozhatják. Egy elhúzódó nehézellés már egy óra után megközelítőleg 100%-os mortalitást eredményez, míg 30 perc után a legtöbb esetben már egyértelmű hypoxiával kapcsolatos idegrendszeri károsodást láthatunk (Madigan 1997). A csikók perinatális morbiditását az is fokozza, hogy a kanca méhlepénye nem teszi lehetővé az immunglobulinok átjutását, emiatt a csikók kórokozókkal szemben kizárólag a felvett főcstejre támaszkodnak. Figyelmebe véve az előbbieket, valamint a csikók igen nagy kalória- és folyadékszükségletét, egyáltalán nem meglepő, hogy a perinatális mortalitás magas (Platt 1973, Cohen 1995).

Lovasok körében ismertek egyszerű szabályok, amellyel az egészséges és a beteg csikók elkülöníthetők, ilyen például az 1-2-3 szabály, ami arra utal, hogy a csikó 1 órán belül áll, 2 órán belül szopik és 3 órán belül megkezdi a bélszurok ürítését. Állatorvosi szemmel a különbségtétel sokkal összetettebb, hiszen a csikók kóros

idegrendszeri tüneteit és átmeneti, de normális viselkedési sztereotípiáit nem lehet mindig egyszerűen szétválasztani, mivel a csikók idegrendszeri vizsgálatának ép lelete számos ponton eltér a felnőtt lovak ép leletétől (Adams and Mayhew 1984). Példaként hozhatók a koraszülött csikók, amik gyakran hyperreflexiások (Rossdale and Leadon 1979, Madigan 1997), míg az elhúzódo vemhességből születő csikók (>360 napos vemhesség után) gyakran gyengébbek, lassabbak, valamint kórosan viselkednek: úgymint a céltalan bolyongás és az elégtelen szopási reflex. Vannak olyan csikók is, amelyek egészségesnek tűnnek születéskor, majd az első 24-48 órában válnak tompulttá, elfekvővé (Bernard et al 1995, Rossdale 1972).

A ló neonatalis neurológia úttörői: Rossdale, Ousey, Palmer, Mayhew és Madigan; írták le a csikók részletes neurológiai vizsgálatát, valamint a gyakoribb elváltozásokat (Jeffcott and Rossdale 1979, Adams and Mayhew 1984, Bernard et al. 1995, Palmer and Rossdale 1976). Nekik köszönhetően tudjuk azt is, hogy bizonyos korai, átmeneti sztereotip viselkedések nem kórosak. Az egyik ilyen fenotípusosan már lejegyzett jelenség, ahogy a csikók a testüket ért szorítás hatására kollabálnak (Mayhew 1988). Ezt korábban egyes szerzők a "flopping

reaction” vagy a “relaxációs reflex” nevekkel illeték (Jeffcott and Rossdale 1979). A folyamat pontos háttéréről azonban korábban semmilyen ismeret nem állt rendelkezésre.

A sztereotip viselkedések megléte és számos, nem specifikus idegrendszeri tünet előfordulása a különböző oktanú és kórfejlődésű betegségek esetén világossá teszi, hogy miért olyan nehéz egyes idegrendszeri betegségeket pusztán klinikai megjelenésük alapján differenciálni. Továbbá ismereteink hiányosságát az is mutatja, hogy minden újszülött csikót, ami idegrendszeri tüneteket mutat, jellemzően a “dummy” vagy a “hypoxiás” jelzővel illetünk.

Előzetes klinikai felméréseink és kérdés felvetéseink alapján az alábbi hipotéziseket állítottuk fel:

- 1) Újszülött csikók mechanikus fékezése olyan viselkedésbeli, hormonális és elektroencefalográfiás változásokat okoz, ami az alvás és az analgészia során jellemző.
- 2) Az agyhártyagyulladás a csikók szeptikémiájának egyik gyakori szövődménye.

- 3) A „neonatal maladjustment syndrome”-ban (NMS-ben) szenvedő csikók progesztagén profilja eltér az egészséges és más betegségben szenvedő társaikétól.
- 4) Az exogén adagolt neuroszteroidok (allopregnanolon) az NMS-hez hasonló tüneteket okoznak.
- 5) A plazma adrenomedullin emelkedett szeptikémiás újszülött csikókban az egészséges kontrollhoz viszonyítva, és prognosztikai értéke van a túlélést illetően.

## **1.2. Anyag és módszer**

**Az első kísérletbe** nyolc csikót vontunk be. A csikók normális hosszúságú és szabályosan lefolyó ellésből születtek, és az idegrendszeri és klinikai vizsgálatok alapján egészségesek voltak.

A csikókon egy 6 méter hosszúságú, puha, 1,25 cm átmérőjű kötelet használtunk, amit az egyik elsős végtag alatt és a nyak körül Palstek csomóval rögzítünk, majd két félhurokkal a mellkas körül meghúztunk. A jelenség előidézése során a kötélt szabad végét egy csikó mögött álló személy húzta, amíg egy másik asszisztált az

elfektetésben. A klinikai alapértékeket a mechanikus fékezés előtt és közben is megmértük. A viselkedést kategórikus skálán definiáltuk, éberségnek és testhelyzetnek megfelelően (áll-fekszik, élénk-aluszékony).

Az elektroencefalográfiás (EEG) vizsgálatot egy 32 csatornás telemetriás egységgel végeztük (WEE-1000 AirEEG, Nihon-Kohden Corp, Tokió, Japán), akvizíciós rendszer, (EEG-9100 Neurofax, Nihon-Kohden Corp, Tokió, Japán.), laptop (Dell Inspiron, Dell Corp, Round Rock, Texas, USA) és megfelelő értékelő fájlok (EEG-9200, Nihon-Kohden Corp, Tokió, Japán) segítségével. Az EEG során rozsdamentes acél tűelektrodokat alkalmaztunk egy korábbi protokollnak megfelelően (Aleman et al. 2006). Három centrális, két aurikuláris és egy föld elektródot használtunk, és az EEG vizsgálat minimum 15 percig tartott. A felvételek értékelése a tudatállapot megítélésére korábbi humán és lovas tanulmányoknak megfelelően történt. (Williams et al. 2008, Mysinger et al. 1985).

A fájdalomtűrést egy négyzetes pulzáló stimulátorral végeztük (S48 square pulse stimulator, Grass Technologies, West Warwick, RI, USA). A stimuláció során 27G-s tűket helyeztünk egymás alá a farokrépától



50 és 100 mm távolságra. (Safelead F-E3-48, Grass Technologies, West Warwick, RI, USA). A stimuláció korábban publikált módon történt (Natalini és Robinson, 2000). Pozitív fájdalomreakciókat az adott terület összerándulása, farokcsapkodás, odafordulás, stb. jelezte.

A vérgázanalízis egy 3 ml-es előzetesen heparinizált műanyag fecskendőből történt. Az elemzést egy kereskedelmi forgalomban kapható géppel végeztük. (ABL-705, Radiometer, Copenhagen, Denmark). A vért szérum, üveg, műanyag EDTA-s valamint heparinos csövekbe gyűjtöttük. A mintákat 10 percig centrifugáltuk 3400/perc fordulaton, majd -80 °C-on tároltuk (Revco ultra-low-temperature freezer, Thermo Fisher Scientific Inc, Franklin, MA, USA). Az ACTH és kortizol mérése szilárd fázisú kemilumineszcenciás immunometriával történt egy korábban közölt protokoll alapján (IMMULITE 2000, Siemens AG, München, Germany) (Perkins et al. 2002). A plazma szteroidok mérése folyadék kromatográfiás tömeg spektroszkópon (LC-MS) történt turbulens áramlásos kromatográfiával (TFC) (Fisher Scientific Inc, Franklin, MA, USA) korábban közzétett módon (Yu et al. 2008). A  $\beta$ -endorfinok mérése RIA módszerrel történt (S2013, Bachem Inc, St Helens,

Merseyside, UK), amely módszer lovakra korábban validálva lett (Bossut et al. 1983).

Az állatok saját kontrolljukként szolgáltak ebben a prospektív, intervenciók kísérletben. 15 perc akklimatizáció után, a mechanikus fékezés előtt felvettük a klinikai paramétereiket, majd ezután levettük a vérmintákat. A fékezés során EEG-vizsgálatot végeztünk, majd 15 perc múlva az újabb vérminták levétele és végül a fájdalomtűrő képesség tesztelése zajlott. A statisztikát Minitab programmal végeztük (version 15, Minitab Inc, State College, PA, USA). Az adatok eloszlását a Kolmogorov-Smirnov teszttel vizsgáltuk. Wilcoxon-próbával hasonlítottuk össze a fékezés előtt és közben kapott kvalitatív adatokat. Fisher-egzakt teszttel vetettük össze a dichotóm kategorikus adatokat. Spearman-rank korrelációs elemzést használtunk a plazma  $\beta$ -endorfin és fájdalom tűrőképesség közötti kapcsolat felmérésére. A  $P < 0,05$ -ben határoztuk meg a szignifikancia szintet.

A **második kísérletbe** olyan lovakat vontunk be, ahol a meningitisz definitív diagnózisa felállítható volt a liquor citológia és mikrobiológia vagy pedig posztmortem kórszöveti vizsgálat alapján.

A William R. Pritchard Oktatókórház (University of California-Davis, USA) elektronikus adatbázisában 1985

és 2010 közötti keltezésű, olyan klinikai, laboratóriumi és patológiai leleteket kerestünk, amelyekben a meningitis, a meningoencephalitis, és a meningoencephalomyelitis szavak szerepeltek. Az így kiszűrt kórlapokat áttekintve a továbbiakban azokat használtuk fel, ahol az elfogadott feltételek alapján a betegség diagnózisa egyértelműen felállítható volt. A kórlapokból ezek után kigyűjtöttük a nacionálét, kórelőzményt, klinikai tüneteket, laboratóriumi eredményeket, diagnosztikai beavatkozásokat, kezeléseket és a kimenetelt. Az adatokból leíró statisztikai analízist végeztünk a Minitab 15 szoftverrel (Minitab Inc, State College, PA, USA). A számított értékek a következők: átlag, medián, szórás, terjedelem, minimum és maximum.

**A harmadik kísérletben** a „neonatal maladjustment syndrome (NMS)” csoportba 32 csikó, az egyéb betegség csoportba 12 csikó, míg a kontroll csoportba 10 állat került (>320 napos vemhesség, eseménytelen ellés, normál fizikális vizsgálat). A csikók 2010 és 2011 között érkeztek be a UC Davis Oktatókórházba (USA) vagy a Rosedale and Partner magánkórházba (Newmarket, UK). A diagnózis felállítása és a csoportosítás a rendelkezésre álló objektív adatok alapján történt (fizikális vizsgálat,

publikált szepszis pontozási rendszer (Brewer and Koterba 1988), leukogram, vér biokémia, vérgáz, vérnyomás, vizelet vizsgálat, hasúri ultrahang stb). Kórelőzményi adatok szintén rögzítésre kerültek. Az NMS klinikai tünetei a következőket foglalták magukban: megváltozott tudatállapot: depresszió, komatosus állapot, csökkent kancához történő affinitás, hangadások, céltalan bolyongás, hyper és hyporeflexiák, epileptiform görcsök, abnormális fülpozíció. Az egyéb betegségben szenvedő csikók (beteg nem-NMS csoport) tulajdonosi beleegyezés és mintavételi lehetőség alapján lettek választva. A kezelések sztandardizálva nem lettek. A kontroll állatokból a mintavétel 0, 24 és 48 órán történt. A beteg állatokból a mintavétel a beérkezéskor (<6 óra), majd 24 és 48 órán történt. A teljes vér azonnal lecentrifugálásra került, majd a plazmát -80°C-on tároltuk analízisig, amit LC-MS módszerrel végeztünk (Isd. 1. kísérlet). Leíró stasztikai adatok során mediánt és terjedelmet használtunk. Friedman-tesztet alkalmaztunk az ismételt mérések esetén. Kruskal–Wallis tesztet használtunk több csoport összehasonlítására, majd az egyes csoportokat egymással Mann-Whitney próbával hasonlítottuk össze és ilyenkor Bonferroni korrekciót is alkalmaztunk. A nem-parametrikus tesztek

alkalmazására azért volt szükség, mert az adatok Kolmogorov-Smirnov teszt elvégzése alapján nem voltak normál eloszlásúak. A szignifikancia szintet  $P < 0.05$ -ben állapítottuk meg.

**A negyedik kísérletben** egy egészséges újszülött csikónak allopregnanolon infúziót adtunk az alábbi protokoll alapján: a vénakanült a v. jugularisba helyeztük, majd etanolban feloldott 1% alloprenanolont (5 alpha-pregnan-3 alpha-ol-20-on) adtunk be intravénásan. A csikó 0,05 mg/ttkg kezdő iv. bolus után 0,02 mg/ttkg/perc fenntartó dózist kapott cseppinfúzióban. Ez a koncentráció extrapolálva lett in vivo patkányokban használt adagból (Naert *et al.* 2007). Ezt követően a csikó 5 perc múlva egy újabb 0,1 mg/ttkg iv. bolust kapott, amit 0,04 mg/ttkg/perc fenntartó dózissal folytattunk. Az infúziót 30 perc múlva fejeztük be és a csikó viselkedési és idegrendszeri (továbbiakban: NB (neurobehavioural)) státuszát ellenőriztük. Ezután a csikó egy utolsó 0,2 mg/kg dózist kapott.

NB státusz elbírálása során egy súlyozott, többszemponτος pontozási rendszert alkalmaztunk, amit magunk fejlesztettünk ki többéves, nagy esetszámú klinikai adatok alapján. A csikók NB pontszáma 0-20 között lehet és 8 fölötti érték esetén az NMS erős gyanúja

merül fel. NB pontozásnál 5 paramétert vizsgáltunk egyenként, 0-4 skálán (ambulálás, kancához való affinitás, szopás, mentális állapot). Heparinos vérmintákat vettünk születéskor, 6 órásan (infúzió előtt) majd az infúzió közben 15 percenként, melyeket azonnal  $-80^{\circ}\text{C}$  ra helyeztünk analízisig, szintén LC-MS módszerrel (lásd: 1. kísérlet).

Az **ötödik kísérletbe** 2011 és 2012 között a Purdue Egyetem Oktatókórházában (USA) vagy a Hagyard magánlóklínán (Lexington- KY, USA) kezelt, egy hetesnél fiatalabb csikók lettek bevonva, összesen 90 állat.

A vérmintákat az adrenomedullin meghatározáshoz a v. jugularisból vettük. **A beteg állatokat 2 csoportba soroltuk, melyek a következők: szeptikémiás (>11 szépszis pont és/vagy pozitív hemokultúra) és beteg-nem szeptikémiás csoportba.**

Az anyagi okok miatt túlaltatott csikókat kizártuk a vizsgálatból. Az egészséges kontroll csikókat egy magán és egy egyetemi állományból vontunk be a vizsgálatba (68 darab).

A csikókkal kapcsolatban a következő adatokat gyűjtöttük: nationale, kórelőzmény, fizikális vizsgálat,

klinikopatológiai vizsgálat (vérgáz, biokémia, hematólóga, hemokultúra, vizeletvizsgálat, bélsár bakteriológia, liquor és synovia analízis), képalkotó diagnosztikai vizsgálatok (rtg, ultrahang) eredményei, kórházi napok hossza, kezelési költség és túlélés.

Összesen 30 ml vénás vért vettünk aseptikus technikával, amelynek egy részét hemokultúrák palackba (BBL SEPTI-CHEK TSB (Tryptic Soy Broth), Becton Dickinson Microbiology Systems, Becton Dickinson and Company, Cockeysville, MA, USA) a maradékot pedig EDTA és natív csövekbe tettük. Az EDTA csöveket 3200/ perc fordulaton 15 percig centrifugáltuk 4 °C-on majd 5 darab egyenként 1 ml-es aliquotot Eppendorf csőbe helyeztünk és -20 °C vagy -80 °C fokon fagyasztottunk le, a stabilitási ismereteknek megfelelően ((Nishio et al. 1997).

A plazma adrenomedullin koncentráció meghatározása egy korábban, a gyártó által lovakra belsőleg validált, kereskedelmi forgalomban elérhető ELISA kittel történt (USCN Life Technologies, Wuhan, China). A biokémiai és hematóológiai vizsgálatot a Cell-Dyn 3500R, (Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL, USA), a Vitros 5,1 FS (Ortho-Clinical Diagnostics, Inc, Rochester, NY) és a

Olympus AU400 (Beckman Coulter, Inc, Brea, CA, USA) rendszerekkel végeztük.

A statisztikai elemzést a SAS 9.3 (SAS Institute Inc, Cary, NC, US) programmal végeztük. Az adatok eloszlásának vizsgálatára a Shapiro-Wilk próbát használtuk. A folyamatos adatokat mediánban és terjedelemben fejeztük ki. Mann-Whitney U próbát használtunk a beteg és egészséges, a szeptikus és nem szeptikus, túlélő és nem-túlélő csikók adatainak összehasonlítására. A többszemponτος logisztikus regresszió analízissel meghatározott p[AM] határértékeket ROC görbe analízissel vizsgáltuk. A szignifikancia szintet  $P < 0.05$ -ben állítottuk be.

### **1.3 Eredmények és megbeszélés**

**Az első kísérletben** azt találtuk, hogy a kötéllel elvégzett beavatkozás (továbbiakban: „squeeze”) hatására a csikók elfekszenek és oldalfekvésben maradnak. A squeeze csökkentette az állatok motoros aktivitását, klinikai alapértékeit és aluszékonyt okozott, amit az EEG-n megjelenő alvás/ébrenlét állapot váltakozása, a delta-hullámok és K-komplexek megjelenése is alátámasztott.



Ez utóbbiak megegyeznek a lovakban és emberben is dokumentált lassú hullámos alvással (Berger et al. 1988, Williams et al. 2008, Mysinger et al. 1985). A csikók nem mutattak narkolepsziát az EEG, vagy kataplexiát a viselkedésük alapján, amit korábban mások előterjesztettek (Adams and Mayhew 1984). A jelenséget “squeeze induced somnolence (SIS)”-nek neveztük el. Habár a csikók fájdalomtűrő képessége szignifikánsan nőtt, nem találtunk összefüggést a szintén növekedő plazma  $\beta$ -endorfin koncentrációval, valamint az analgészia mértéke nem volt elegendő mérsékelt vagy fokozottan fájdalmas beavatkozásokhoz. Fontos eredmény, hogy a csikók plazma ACTH koncentrációja a SIS során szignifikánsan emelkedett, amely véleményünk szerint a szülőcsatornán való átpréseléshez hasonló neuroendokrin érési folyamatokat indít el.

**A második tanulmányban** retrospektív vizsgálat céljából egy nagy esetszámú kórház 25 éves betaganyagából gyűjtöttük ki a meningitis vagy meningoencephalomyelitis diagnózisával kezelt lovakat, összesen 28 állatot. A vizsgálat eredményei a következők: a meningitis igen ritka megbetegedés lovakban, ebben az állományban a lovak 0,04%-nál került diagnosztizálásra (28/70.000). A

kórházba referált kritikusan beteg csikók mindössze 0,2%-nak volt ilyen megbetegedése. Ez alapján azonban az is kimondható, hogy a beteg csikóknál ötször gyakoribb volt a meningitis, mint felnőtt lovakban. A fertőzés csikókban hematogén úton vagy közvetlen áttérjedéssel alakult ki. Gyakori idegrendszeri eltérések közé tartozott a mentális státusz változása, az agyidegek működési zavarai, ataxia és vestibularis zavarok. A leggyakoribb hematológiai eltérések a következők voltak: leukocitózis, neutrophilia, lymphopénia és hiperfibrinogénémia. A neutrofil pleocytosis jellemző volt a liquorban, habár a bakteriális meningitis nem zárható ki a citológia során látható degenerált neutrophilok vagy baktériumok hiányában sem. A liquor laktát meghatározás szintén javasolható a szeptikus folyamatok feltárására, valamint az alacsony érzékenység ellenére is minden esetben indokolt antemortem bakteriológiai vizsgálatot végezni. Ebben a tanulmányban öt olyan meningitist okozó patogént azonosítottunk, melyeket korábban nem publikáltak, ebből három kórokozó izolálása antemortem történt. Habár a prognózis kedvezőtlen, az állatok kezelése mégis ésszerű lehet, mivel bizonyos esetek kedvezően reagálnak az agresszív multimodális terápiára és a gyógyulás lehetséges.

**A harmadik kísérletben** megállapítottuk, hogy statisztikai különbség van a beteg és az egészséges csikók plazma pregnán koncentrációiban mind születésük, mind az első 48 órában. Az egészséges csikókban a pregnánok koncentrációja az első 48 óra alatt gyakorlatilag nullára csökkent, hasonlóan egy korábbi vizsgálathoz (Houghton et al. 1991). A csikómagzatokban a pregnánok koncentrációja igen magas, ami létfontosságú az aktivitás csökkentés és az idegrendszeri működés gátlásának érdekében. (Holtan et al. 1991, Mellor et al. 2005). A placenta eredetű precursorok megszűnése után a mellékvesekéreg eredetű precursorok megjelenése miatt markáns csökkenés mutatkozik a pregnánok koncentrációjában (Hirst et al. 2006). Ebben a vizsgálatban beteg csikókban az epitesztoszterontól eltekintve, minden mért pregnánok magasabb volt a koncentrációja a kontrollhoz képest. Az NMS csikókban a pregnánok koncentrációja tovább emelkedett az első 48 órában szemben a más betegségben szenvedő társaikkal, ahol mennyiségük szintén magas volt, de lassú csökkenést mutatott. Ezek a megfigyelések megerősítik azt a hipotézist, hogy az NMS csikókban az intrauterin állapotból az extrauterin állapotba történő átalakulás zavart szenved. Ez a

mechanizmus hasonló ahhoz, amit olyan lassabban adaptálódó csikóknál látunk, ahol a kancák a vemhesség alatt altrenogesztet kapnak (Neuhauser et al. 2007). A jelen tanulmányban mért szteroidok valószínűleg mellékvesekéreg és nem pedig exogén eredetűek, hasonlóan a bárányokhoz (Mellor et al. 2005). A kísérletünk és egy másik független munka is azt találta, hogy az NMS-ben szenvedő csikók esetén az endogén szteroid termelés kell, hogy okozza az emelkedő pregnán koncentrációt (Rossdale et al. 1997).

**A negyedik kísérletben** azt tapasztaltuk, hogy az allopregnanolon infúzió újszülött csikókban kifejezett „Neurobehavioural (NB)” hatást produkál. Ez pedig konzisztens a klinikailag is alkalmazott szteroid anesztetikumok hatásával, mint amilyen az alphaxalon (Naert et al. 2007). Az allopregnanolon más állatfajokban átjut a vér-agy gáton és anesztetikus hatását a GABA-A receptorokon fejt ki (Zhu et al. 2001). A csikónak adott allopregnanolon infúzió hatása alátámasztotta, hogy az 5-alpha pregnánok csikóban is átjutnak a vér-agy-gáton. Az allopregnanolon koncentráció maximuma és a maximális NB pontok időben egybe estek. A rövid hatástartam arra enged következtetni, hogy a vegyület egészséges csikókban gyorsan metabolizálódik. A klinikai

gyakorlatban használt szteroid altatók (alphaxalon) szintén igen rövid hatásúak. (Leece *et al.* 2009). Ezzel szemben az NMS tünetei nem ritkán több napig tarthatnak, ami a neuroaktív szteroidok folyamatos termelődésére utal. Az szintén nem világos, mi váltja ki és állítja meg a szteroidok termelődését. A pregnánok koncentrációi a vizsgált csikónál folyamatosan csökkentek, hasonlóan a korábbi vizsgálatok során tapasztaltakhoz (Holtan *et al.* 1991).

Az allopregnanolon által indukált tünetek alátámasztják a hipotézist, miszerint az NMS része a „perzisztens magzati hypophysis-mellékvesekéreg státusznak”, amit intrauterin a pregnánok tartanak fenn (Warnes *et al.* 2004). A magzatnak gyorsan kell alkalmazkodnia egy nyugodt, szuppresszált állapotból egy aktív, stresszes méhen kívüli állapothoz. Ennek az átalakulásnak a zavara fontos lehet az NMS kialakulásában. Eredményeink alapján még inkább valószínű, hogy a mellékvesék és/vagy az agy által termelt pregnánok okozzák az NMS-t és, hogy emiatt lehetséges a betegségből történő gyors felépülés reziduális tünetek nélkül (Zhu *et al.* 2001). Az nem világos, hogy születéskor látszólag egészséges csikónál hogyan alakul ki az első 48 órában az NMS. Azt feltételezzük, hogy ez a folyamat hasonló újszülött

juhokéhoz, ahol bizonyos stresszorok hatására születés után az agyban több allopregnanolon képződik, valamint a mellékvesében telelődő dezoxikortikoszteronból az agyba jutva egyéb neuroaktív szteroidok (Hirst *et al.* 2008).

Habár az NMS tünetei között nem csak a depresszió és a bágyadság szerepel, hanem epileptiform görcsök is, ez utóbbi szintén megmagyarázható, hiszen egyes neuroszteoidok excitatórikusak (Rogawski and Reddy 2004). A különböző neuroszteroid hatások emellett NMS-ben jóval komplexebbek, mint egy vegyület infudálása során tapasztaltak.

**Az ötödik kísérletben** az tapasztaltuk, hogy a plazma adrenomedullin koncentráció (p[AM]) nem korrelál a túléléssel. Hatszor magasabb volt a medián p[AM] kritikusan beteg csikók esetén a kontrollhoz képest. Abból kiindulva, hogy a csikók betegségei több, mint 20 féle klinikai diagnózist foglaltak magukban, arra utal, hogy a p[AM] inkább az egészség prediktora, mintsem egy specifikus betegség indikátora. Szintén nem volt szignifikáns korreláció a súlyozott szepszis pontok és a p[AM] között, ami utalhat a tényleges összefüggés hiányára, ha azt feltételezzük, hogy a konvencionálisan

használt kategorizáció a szepszis pontokat és/vagy szeptikémia kategorizációt illetően helyes.

A humán vizsgálatok különböző mértékű p[AM] változásokat találtak egyes betegségek esetén, és akár 50-szeres emelkedést szepsziszénél (Gibbons 2007, Ueda et al. 1999).

A lipopoliszacharidok és a gyulladáshoz kapcsolódó citokinek fokozzák az AM génexpresszióját különböző szövetekben és ez szeptikus sokk esetén a legjelentősebb (Hirata 1996). Ennek ellenére nem találtunk szignifikáns különbséget a szeptikus és kontroll csikók között, ami az alkalmazott szepszis kategorizáció tökéletlensége miatt is lehetséges. Az is előfordulhat, hogy a kórfejlődés és a betegség lefolyása csikók szeptikémiája esetén eltérő. A laboratóriumi állatokon elvégzett kísérletek progresszív és markáns p[AM] növekedést mutatnak a szepszis során, ami 2 órával a kiváló inzultus után kezdődik (Koo et al. 2001). A szeptikus csikók közel fele 2 óráig vagy annál fiatalabb volt, és ez eredményezhette az alacsonyabb p[AM] értéket. Az emelkedés laboratóriumi állatokban 20-30 órán keresztül folyamatos (Koo et al, 2001), ezért a koncentráció görbe alakulása reprezentatívabb lehetne, mint egy egyszeri mérés. Nem volt statisztikai eltérés a p[AM]-ban a túlélők és a nem-

túlélők között. Ez utalhat a közvetlen és közvetett hatás hiányára, habár humán vizsgálatok azt mutatják, hogy a p[AM] nem csak a betegség súlyosságának felmérésére alkalmas, hanem a szervi diszfunkciókra és a túlélés predikciójára is (Ueda et al. 1999). Habár az anyagi ok miatt elaltatott csikók ki lettek zárva a vizsgálatból, és a túlaltatásról magasan képzett és tapasztalt lóbelgyógyász specialisták döntöttek, elképzelhető, hogy egyes csikók további kezelés mellett túléltek volna. Egyes humán klinikai vizsgálatokban a különböző születési komplikációk (preeklampszia, koraszülés, alacsony születési súly) esetén szignifikáns eltéréseket találtak a p[AM]-ban (Lenhart and Caron 2012), míg a születési hypoxia esetén az AM értékek magasabbak (Di Iorio et al. 2004).

A p[AM] statisztikai vizsgálata ezért a következő csoportokban is megtörtént: immunglobulin ellátási hiány, nehéz ellés, császármetszés, koraszülöttség és NMS. Ezek a csoportok egyikének sem volt a p[AM]-ja szignifikánsan eltérő



## 2. Összefoglalás és új tudományos eredmények

1. A csikókra a „squeeze” erős stresszszignálként hat, amit az emelkedő plazma ACTH koncentráció bizonyít.
2. Az alkalmazott technika csökkenti a csikók önkéntes motoros tevékenységét és aluszékonyságot okoz, ami a viselkedés mellett az EEG-n látható alvás/ ébrenlét állapot változásában és a megjelenő delta hullámokban és K-komplexekben nyilvánul meg.
3. A jelenséget „squeeze induced somnolence (SIS)”-nek neveztük el.
4. Az agyhártyagyulladás ritka betegség lovakban. A teljes vizsgált állományban a prevalencia 0,04% (28/70.000) volt. Az újszülött, beteg csikók között a betegség prevalenciája 0,2% volt (2/1000).
5. A leggyakoribb idegrendszeri tünetek meningitis esetén a kóros mentális állapot, az agyvelői idegek működési zavarai és a mozgás koordinációs zavarok.
6. Az agyhártyagyulladás leggyakoribb klinikopatológiai elváltozásai a perifériás vérben a leukocitózis, hyperfibrinogenaemia, míg a liquorban az emelkedett fehérje és neutrophil pleocytosis.

7. Agyhártyagyulladás esetén 5 patogén kórokozót azonosítottunk, amelyekből három antemortem került diagnosztizálásra.
8. Bebizonyítottuk, hogy szignifikáns különbség van az egészséges és a beteg csikók pregnán profiljában születéskor.
9. Egészséges csikók esetén a pregnánok plazma koncentrációja fokozatosan csökken, 48 órán belül gyakorlatilag 0-ra.
10. Az NMS csikókban a pregnán (pregnenolon, progeszteron) koncentrációja magas marad, sőt tovább emelkedik az első 48 órában, ami alátámasztja a hipotézisünket a megszakadt magzati és újszülöttkori állapot között.
11. Csikóban az allopregnanolon intravénás adása markáns viselkedésbeli és idegrendszeri elváltozásokat okoz, ami az NMS szindrómához hasonlít.
12. Allopregnanolon infúzió adásával igazoltuk, hogy csikóban az  $5\alpha$ -pregnánok átjutnak a vér-agy gáton.
13. Az allopregnanolon infúzió adása során tapasztalt rövid hatástartam arra utal, hogy a pregnánok felezési

- ideje rövid, ezért a napokig tapasztalható klinikai tünetek NMS során folyamatos termelődésre utalnak.
14. Csikóban a plazma adrenomedullin koncentráció nem mutat statisztikailag szignifikáns összefüggést a szeptikémia meglétével vagy a túléléssel.
  15. A beteg csikók esetén átlagosan 6-szor nagyobb a  $p[AM]$ , ami alapján ez a vegyület a nem-egészséges állatok kiszűrését teszi lehetővé.

### **3. A disszertációval összefüggő lektorált folyóiratban megjelenő publikációk**

1. **Tóth B**, Horti K, Bakos Z. Special considerations for the neurological examination of foals and most common perinatal neurologic diseases. *Magyar Állatorv Lapja* 2018:140:259-270 **IF: 0,196**
2. Auth A. K, Rompos L, **Tóth B**. Primary care of neonatal foals II. Literature review. *Magyar Állatorv Lapja* 2017:139:131-142 **IF: 0,196**
3. Auth A. K, Rompos L, **Tóth B**. Primary care of neonatal foals I. Literature review. *Magyar Állatorv Lapja* 2017:139:67-78 **IF: 0,196**
4. **Tóth B**, Jerzsele Á, Horti K, Korenchy L, Bakos Z. Antibiotic therapy in neonatal foals. A literature review. *Magyar Állatorv Lapja* 2015:137:331-342 **IF: 0,212**
5. **Tóth B**, Slovis NM, Constable PD, Taylor SD. Plasma adrenomedullin concentrations in critically ill neonatal foals. *J Vet Int Med* 2014:28:1294-1300. **IF: 2,064**
6. Aleman M, Pickles KJ, Conley AJ, Standley S, Haggett E, **Tóth B**, Madigan JE. Abnormal plasma neurosteroid concentrations in ill, neonatal foals presented to the neonatal intensive care unit. *Equine Vet J* 2013:45:661-665 **IF: 1,456**
7. Madigan JE, Haggett E, Pickles KJ, Conley AJ, Stanley SD, Moeller B, **Tóth B**, Aleman M.

Allopregnanolone infusion induced neurobehavioral alterations in a neonatal foal: Is this a clue to the pathogenesis of neonatal maladjustment syndrome? *Equine Vet J* 2012;41 (Suppl):109-112 IF: **1,799**

8. **Tóth B**, Aleman M, Brosnan PJ, Dickinson PJ, Conley AJ, Stanley AJ, Madigan JE. Evaluation of the squeeze induced somnolence in neonatal foals. *Am J Vet Res* 2012;73:1881-1889. IF: **1.269**
9. **Tóth B**, Aleman M, Nogradi N, Madigan JE: Meningitis and meningoencephalo-myelitis in horses. 28 cases. *J Am Vet Med Assoc* 2012;240:580-587. IF: **1.715**

#### **4. A disszertációval nem összefüggő, lektorált folyóiratban megjelenő publikációk**

1. Albert, E., Biksi, I., Német, Z., Csuka, E., Kelemen, B., Morvay, F., Bakos Z, Bodó G, **Tóth B**, Collaud A, Rossano A, Verreten V. Outbreaks of a Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clone ST398-t011 in a Hungarian Equine Clinic: Emergence of Rifampicin and Chloramphenicol Resistance After Treatment with These Antibiotics. *Microbial Drug Resis.* 2019 IF: **2,397**
2. **Tóth, B.**, Auth, A., Rompos, L., & Bakos, Z. Effect of feed deprivation on selected parameters of lipid mobilisation and hepatic function in healthy Akhal Teke horses. *Equine Vet J.* 2018;50, 98-103 IF: **2.115**

3. Tuska, P., **Tóth, B.**, Vásárhelyi, G., Hangody, L., Papp, M., & Bodó, G. Evaluation of biomarkers following autologous osteochondral transplantation in the equine stifle joint—An experimental study. *Acta Vet Hung* 2017;64:164-178. **IF: 1,042**
4. Taylor SD, **Tóth B**, Baseler LJ, Charney VA, Miller MA. Lack of Correlation Between Papillomaviral DNA in Surgical Margins and Recurrence of Equine Sarcoids. *J Equine Vet Sci* 2014;34:722-725. **IF: 0.993**
5. Taylor SD, **Tóth B**, Townsend WM, Bentley TR. Mechanical ventilation and management of an adult horse with presumptive botulism. *J Vet Em Crit Care* 2014;24:594-601. **IF: 1,052**
6. **Tóth B**, Bertin FR, Miller MA, Charney VA, Kritchevsky JE. Evaluation of a technique for percutaneous endoscopic gastrostomy tube placement in horses. *Am J of Vet Res* 2014;75:354-360. **IF: 1,335**
7. Tóth P, Hinton G, Horváth Cs, Ferencz V, **Tóth B**, Szenci O, Bodó G. Bone mineral density and computer tomographic measurements in correlation with failure strength of the equine metacarpal bones. *Acta Vet Brno* 2014;83:45-50. **IF: 0,469**
8. Charney V, **Tóth B**, Couetil L, et al. Ichthyosis in a cria. *J Am Vet Med Assoc.* 2013; **IF: 1,672**
9. Crocker GH, **Tóth B**, Jones JH. Combined effects of inspired oxygen, carbon dioxide and carbon monoxide on oxygen transport and aerobic capacity. *J Appl Phys* 2013;115:643-52. **IF: 3,434**

10. Siska WB, Tuttle RE, Messick JB, Bisby TM, **Tóth B**, Kritchevsky JE. Clinicopathologic characterization of six cases of equine granulocytic anaplasmosis in a nonendemic area (2008-2011). *J Eq Vet Sci* 2013;33:653-7 **IF: 0.92**
11. Tóth P, Horváth C, Ferencz V, **Tóth B**, Váradi A, Szenci O, Bodó G. Bone mineral density (BMD) and computer tomographic measurements of the equine proximal phalanx in correlation with breaking strength. *Pol J Vet Sci* 2013;16:3-8. **IF: 0.712**
12. Guimaraes AMS, **Tóth B**, Santos AP, et al.. Genome Sequence of “Candidatus Mycoplasma haemolamae” Strain Purdue, a Red Blood Cell Pathogen of Alpacas (*Vicugna pacos*) and Llamas (*Lama glama*). *J Bacteriol* 2012;194:6312-3. **IF: 3,194**
13. Nogradi N, Spier SJ, **Tóth B**, Vaughan B. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection as a cause of lameness in horses (35 cases, 1999 – 2009). *J Am Vet Med Assoc* 2012;240:771-777. **IF: 1,715**
15. Spier SJ, **Tóth B**, Edman J, Quave A, Habasha F, Garrick M, Foster MS, Byrne BA. Survival of *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*equine biovar*) in soil. *Vet Rec* 2012;170:180. **IF: 1,803**
16. Nogradi N, Slovis NM Gebhart CJ, Wolfsdorf KE, McCracken JL, Scoggin CN, **Tóth B**, PH Kass, SM Mapes, ML Lundquist, N Pusterla. Evaluation of the field efficacy of an avirulent live *Lawsonia intracellularis* vaccine in foals. *Vet J*. 2012;192:511-3. **IF: 2,424**

17. Nógrádi N, **Tóth B**, MacGillivray KC: Peritonitis in Horses: 55 cases. *Acta Vet Hung* 2011;59:181-193. **IF: 0,673**
18. Német Z, Szenci O, Horváth A, Makrai L, Kis T, **Tóth B**, Biksi I. Outbreak of *Klebsiella oxytoca* enterocolitis on a rabbit farm in Hungary. *Vet Rec* 2011;168:243. **IF: 1,248**

## **16. Konferenciák (szóbeli és poszter előadások)**

1. **Toth. B**, Bakos Z. Effect of enteric coated omeprazol on the calcium homeostasis of horses. ECEIM poster. 2018
2. Kovacs Sz., **Tóth B**, Bakos Z. Weight estimation of foals. BEVA abstract. 2017.
3. Bakos Z, Auth A. Rompos L.,**Tóth B**. Effect of feed deprivation on selected variables of lipid mobilization and liver function in horses. ECEIM oral abstract. Helsinki. 2016.
4. **Tóth B**. Prognostic value of amylase and lipase in proximal enteritis of horses. ECEIM oral abstract. Utrecht 2015
5. Sojka-Kritchevsky JE, **Toth B**. Feeding the dysphagic horse. *ACVIM Proceedings*. 06. 2013.
6. **Toth B**. Plasma adrenomedullin concentration as a predictor of survival in neonatal foals. *ACVIM Proceedings*. Oral abstract. Seattle, USA 2013
7. **Toth B**, Bertin F, Kritchevsky JE. Percutaneous endoscopic gastrostomy tube placement in horses. *ACVIM Proceedings*. Seattle, USA. 2013.



8. Charney VA, Bertin FR, **Toth B**, Couëtil LL, Kritchevsky JE, Taylor SD, Miller MA, Ramos-Vara JA. Ichtyosiform dermatitis in camelids. *ACVP Proceedings, Seattle, USA 2012*
9. **Toth B**, Taylor SD. Rhodococcus equi pneumonia in foals. Indiana Veterinary Medical Association. Indianapolis, USA 2012.
10. **Toth B** et al. Evaluation of the squeeze induced somnolence in neonatal foals. *Proceedings of the 57<sup>th</sup> Annual Meeting of AAEP*. San Antonio, USA 2011
11. **Tóth B**, Nógrádi N. Hasi és mellkasi ultrahangvizsgálat lovakban. Magyar Lógyógyász Állatorvosok Egyesülete. Budapest. 2011
12. Reed LT, **Toth B**, Taylor S, Miller MA. Equine renal adenocarcinoma with metastasis to the cervical musculature and brain. *ACVP Proceedings*. 62<sup>nd</sup> annual meeting. Nashville, USA. 2011
13. Sojka-Kritchevsky JE, **Toth B**, Bertin FR, Messick JB. Progression of parasitemia and clinical course in a splenectomized alpaca with *Mycoplasma haemolamae* infection. *ACVIM Proceedings*. Denver. 2011
14. **Tóth B**. Bevezetés az újszülött csikók antibiotikum terápiájába és az újszülött csikó ellátásának alapjai. XVIII. MLGYÁE konferencia. Cegléd, 2010.
15. Nogradi N., Slovis NM, Gebhart CJ, Wolfsdorf KE, McCracken JL, Scoggin, A, **Toth B**, Kass PH, Mapes SM, Lundquist ML, Pusterla N. Field efficacy trial of an intra-rectally administered avirulent administered avirulent, live vaccine on endemic horse farms in

central Kentucky. *ACVIM proceedings*. Anaheim, USA 2010.

16. Nogradi N, Spier SJ, **Toth B**, Vaughan B, *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection as a cause of lameness in horses (35 cases, 1999 – 2009). *Proceedings of the 56<sup>th</sup> Annual Meeting of AAEP*. Baltimore, USA 2010