

Szakmai zárójelentés

A témavezető neve: **dr. Antus Balázs**

A téma címe: **A bronchiolitis obliterans szindróma pathomechanizmusa**

OTKA nyilvántartási szám: **F 046526**

Kutatási időtartam: **2004-2008.**

A kutatási munkatervnek megfelelően célkitűzéseink két altéma keretei között kerültek megvalósításra:

1. altéma: A kilégzett levegő biomarkerjeinek vizsgálata a tüdő allograftot érintő patológiás folyamatokban.

Az elmúlt években számos új, non-invazív vizsgáló módszer jelent meg a krónikus légúti gyulladással járó tüdőbetegségek diagnosztikájában. Ilyen új vizsgáló módszer a kilégzett levegő vizsgálata. A kilégzett levegő vizsgálata során lehetőség van a levegő gázfázisában gázmolekulák (nitrogén monoxid [NO], szén monoxid [CO], stb.) vagy a levegő kondenzálása után a kondenzátum folyadékból gyulladáshoz vezető mediátorok, metabolitok vagy citokinek meghatározására. A jelenlegi elképzelések szerint e molekulák, mint „biomarkerek” utalnak a légúti gyulladás mértékére, típusára és annak sejtes összetételére.

A kilégzett levegő biomarkerjeinek vizsgálata a tüdőtranszplantált betegekben is hasznos diagnosztikai módszer lehet a tüdő allograftokat érintő patológiás folyamatok felismerésében. A tüdőtranszplantáció komplex beavatkozás, ami számos szövődmény kialakulásával járhat. A leggyakoribb pulmonális szövődmény az infekció és a kilökődés. Ez utóbbi akut és krónikus formában jelentkezhet. A krónikus kilökődés következtében a tüdő allograftokban megjelenő kórképet bronchiolitis obliterans szindrómának (BOS) hívják. Kutatómunkánk során a kilégzett biomarkerek alkalmazhatóságát vizsgáltuk e szövődmények diagnosztikájában.

Munkánk során sokoldalú módszertani megközelítést alkalmaztunk. A kilégzett NO mint a legismertebb biomarker mérése „on-line” történt az erre a célra kifejlesztett és a kemilumineszcencia elve alapján működő mérőműszer segítségével (Logan Research Model LR2000). A kilégzett CO mérésére kézi detektorral (Smokerlyzer CO Monitor, Bedford Scientific) történt. A kilégzett levegő kondenzátumát egy erre a célra kifejlesztett kondenzáló berendezéssel gyűjtöttük (Jaeger, EcoScreen) standardizált körülmények között. A kilégzett levegő kondenzátumában ELISA technika segítségével határoztuk meg a különböző arachidonsav metabolitok (prostaglandinok, thromboxánok, cys-leukotriének), valamint

egyres citokinek (interleukin [IL]-1, IL-6, tumor nekrozis faktor [TNF]- α) koncentracióját. A kondenzátum pH-ját a rutin klinikai gyakorlatban is használt vérgáz analizátorral mértük a laboratóriumunkban korábban beállított és a standard alveoláris pCO₂ koncentrációra normalizált mérés technika segítségével (Kulmann és mtsai. Eur Respir J, 2007).

A kilégzett NO szerepének vizsgálata

Vizsgálataink során kimutattuk, hogy a tüdőtranszplantált beteget légúti infekciója során a kilégzett NO szint emelkedik a stabil (infekciómentes) alapvonalhoz képest. Az emelkedés mértéke jóval meghaladja az NO szintek vizitek közötti variabilitását. A diagnosztikai módszer specificitása magas, szenzitivitása ugyanakkor alacsony. A légúti infekciók antibiotikus kezelése után az NO szint az alapvonalis értékre tért vissza. Kimutattuk azt is, hogy a transzplantált betegek alapvonalis NO szintje hasonló az egészséges, nem transzplantált emberekéhez. Az akut kilökődési epizódok során az NO szintben változást nem tapasztaltunk.

A transzplantált betegek között a transzplantációhoz vezető diagnózis nem befolyásolta az alapvonalis NO szintet és annak variabilitását. Ezzel szemben, a tüdőátültetés előtt a cisztás fibrózisban (CF) szenvedő betegek alapvonalis NO szintjét alacsonyabb volt az egészségesekhez képest. A CF akut exacerbatiója során a kilégzett NO koncentráció megemelkedett, de csak szerény mértékben, és inkább csak az egészségesekre jellemző értéket érte el.

A tüdőtranszplantált betegek követéses vizsgálataiban kimutattuk, hogy a BOS-ban a kilégzett NO ugyan megemelkedik, de csak előrehaladottabb stádiumban (grade 2-3), és itt is csak szerény mértékben.

A kilégzett CO szerepének vizsgálata

Méréseink szerint a tüdőtranszplantált betegek alapvonalis CO szintje hasonló az egészséges, nem transzplantált emberekéhez. A kilégzett CO szintek és a transzplantáltakban előforduló szövődmények (rejekció, infekció, BOS) között összefüggést nem találtunk.

A kondenzátum gyulladási citokin mintázatának vizsgálata

ELISA technikával történt méréseink szerint a stabil tüdőtranszplantált betegek kondenzátum mintáiban az IL-1 β citokin koncentraciója magasabb az egészséges, nem transzplantált emberekéhez képest. Infekció vagy akut kilökődési epizód során a kondenzátum IL-1 β szintje megemelkedett. IL-2, IL-6 és TNF- α citokinek ELISA technikával nem voltak megbízhatóan kimutathatóak a kondenzátum mintákban.

Tekintettel az ELISA módszerek optimalizálási nehézségeire, illetve a kapott eredmények alacsony reprodukálhatóságára, a továbbiakban a protein microarray technikát használtunk a kondenzátum citokin mintázatának vizsgálatára. E módszer előnye a magasabb szenzitivitás, jobb reprodukálhatóság, valamint a nagyszámú faktor paralel vizsgálatának lehetősége. Méréseink szerint a protein microarray technika segítségével 120 citokin közül 108 detektálható a BOS-ban szenvedő betegek kondenzátum mintáiban. A detektált citokinek közül 9 szintje emelkedett (pl.: IL-13, INF- γ , MIP-3 α , VEGF), míg 4 faktor (pl.: Angiop-2, FGF-4) szintje csökkent a BOS-mentes kontroll csoporthoz képest.

A kondenzátum pH mérése tüdőtranszplantált betegekben

Munkánk során számos olyan megfigyelés látott napvilágot, amelyek arra utaltak, hogy a kondenzátum kémhatása légúti biomarker szerepét tölti be. Több munkacsoport arról számolt be, hogy a kondenzátum pH-jának csökkenéséből a légúti gyulladás mértékére lehet következtetni számos krónikus tüdőbetegségben.

Ennek megfelelően kísérleteink további fókuszpontja a kondenzátum pH mérésének beállítása, standardizálása és a metodikának tüdőtranszplantált betegekben való klinikai vizsgálata volt. Vizsgálataink során kimutattuk, hogy (1) a kondenzátum pH mérése megbízható, jól reprodukálható és könnyen kivitelezhető módszer; (2) a stabil tüdőtranszplantált betegek kondenzátumának pH-ja és ennek variabilitása megegyezik az egészséges nem-transzplantált emberekével. A pH nem mutatott korrelációt sem a klasszikus légzésfunkciós paraméterekkel, sem a kilégzett NO szinttel. A CF miatt operált és különböző baktériumokkal kolonizált betegekben a kondenzátum pH variabilitása megnövekedett, ami e betegekben zajló folyamatos szubklinikai légúti gyulladása utalhat.

Mindezek az eredmények alapján a kondenzátum pH mérése ígéretes diagnosztikai eszköz lehet a jövőben a tüdő allograftok érintő patológiás folyamatok felismerésében.

2. altéma: Új terápiás lehetőségek a BOS progressziójának csökkentésére.

Kísérleteinket a BOS egy nemzetközileg elfogadott patkánymodelljén végeztük. A modell beállítása során néhány metodikai újítást vezettünk be. A beágyazás előtt a fixált tracheákat sztereomikroszkóp alatt metsztük le. A sztereomikroszkóp alatti metszés bevezetése alapvetően javítja az eredmények reprodukálhatóságát, mivel az obliteráció pontos meghatározása csak a tracheára merőleges metszési síkokban lehetséges. Eredményeink megbízhatóságát tovább növelte, hogy az obliterációt és az epithelialis nekrozist nem semi-quantitatív formában, hanem morpometriai szoftver segítségével pontosan kiszámolva,

százalékosan adtuk meg. A trachea transzplantátumokban az különböző citokinek, növekedési faktorok mRNA expresszióját real-time PCR segítségével határoztuk meg.

A donor és a recipiens nemének szerepe a trachea graftok kilökődésére

Munkánk során kimutattuk, hogy sem a donor, sem a recipiens neme nem befolyásolja a trachea graftokban kialakuló obliteratív légúti betegség kialakulását. A szövettani eredményekkel egyezően az IL-2, IL-10, transforming growth factor (TGF)- β 1 és INF- γ citokinek intragraft mRNA expressziójában sem tudunk nemi különbségeket kimutatni.

Eredményeink különböznek a transzplantátum krónikus kilökődésének egy másik, általunk korábban használt vesetranszplantációs állatmodelljében kimutatottakkal, miszerint a krónikus kilökődés mechanizmusában nemi különbözőségek vannak, amelyek - legalábbis részben - a nemi hormonoknak tulajdoníthatók. A nemi hormonok közül a tesztoszteron és progeszteron fokozza, míg az ösztrogének csökkentik a kilökődés progresszióját.

Az ischaemia hatása az obliteratív légúti betegség progressziójára

Munkánk során igazoltuk, hogy ebben a transzplantációs állatmodellben még az igen hosszú hideg ischaemiás idő sem vezet a luminalis obliteratio gyorsabb progressziójához, illetve profibrotikus növekedési faktorok (TGF- β 1) és Th1-es citokinek (IL-2, INF- γ) fokozottabb intragraft mRNA expressziójához. Az ischaemia patogenetikai szerepének hiánya azzal függhet össze, hogy ebben a modellben az átültetett trachea graftokban nem revascularizáció, hanem neovascularizáció történik.

A renin-angiotenzin és az endothelin rendszer gátlásának hatása

Kísérleti eredményeink szerint a renin-angiotenzin rendszer (RAS) gátlása ACE-inhibitorokkal (ramipril) és az endothelin rendszer gátlása receptor antagonistákkal (bosentan) hasonló mértékben csökkentik az obliteratív légúti betegség kialakulását trachea allograftokban. A két farmakon együttes adása során az obliteratív folyamat még jobban visszaszorul. A ramiprillal és a bosentannal kezelt állatokban az intragraft TGF- β 1 és platelet-derived growth factor (PDGF)-A növekedési faktorok mRNA szintje csökkent, míg az IL-2, IL-10 és INF- γ faktorok mRNA expressziójában változás nem volt. Hasonló kedvező hatást észleltünk a RAS gátlása során az AT1 receptor gátló candesartan alkalmazásával a krónikus allograft nephropathia kísérletes állatmodelljében is. Az AT2 receptor blokkolóval való kombinált kezelés additív hatást nem mutatott. Az apoptotikus sejtek száma és a p53 mRNA expresszió az AT1 kezelés mellett csökkent.

Kísérleteink folytatásaként kimutattuk, hogy a bosentan és a ramipril kombinált alkalmazása gátolja a trachea allograftok kilökődését még olyan esetben is, ha a kezelést nem a kilökődési folyamat kezdetén, hanem későbbi időpontban kezdjük el. A bosentan vagy a ramipril késői alkalmazása monoterápia formájában nem volt hatékony. A kombinált kezelés csökkentette a TGF- β 1 és a PDGF-A és -B növekedési faktor intragraft mRNS expresszióját, míg az általunk vizsgált kemokinek (MCP-1, RANTES, IP-10, MIP-2) intragraft mRNS expressziójában nem találtunk változásokat.

Eredményeink szerint e gyógyszerek, mint az immunszuppresszív terápia kiegészítői elemei jöhetnek szóba a jövőben tüdőtranszplantáltak kezelése során.