

Szakmai zárójelentés

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

A téma címe: **Légúti biomarkerek krónikus obstruktív tüdőbetegségben**

OTKA nyilvántartási szám: **K 83338**

Kutatási időtartam: **2011.02.01 – 2016.01.31**

A krónikus légúti gyulladás számos, különböző etiológiájú tüdőbetegség, így a **krónikus obstruktív tüdőbetegség (COPD)** alapvető patofiziológiai jellegzetessége. A légúti gyulladás kialakulásában számos gyulladásosejt és mediátor vesz részt. A gyulladásosejtek leggyakrabban citokinek, kemokinek, növekedési faktorok, oxidánsok vagy egyéb vasoaktív anyagok, melyek részben a hörgőnyálkahártyát infiltráló gyulladásosejtekben, részben a tüdő parenchyma strukturális sejtjeiben termelődnek. Mivel a COPD aktivitásának megfelelően változik a gyulladásosejtek és mediátorok aránya a légutakban, és mivel a COPD-nek többféle fenotípusa is ismert, az egyes betegekben eltérő gyulladásosejt és mediátor *mintázatok* fordulnak elő.

Közismert, hogy a mindennapi klinikai gyakorlatban a tüdőbetegekben zajló légúti gyulladásra nem vagy csak indirekt módon lehet következtetni. A tüdőbetegségek diagnosztikájában használt spirometriás paraméterek ugyan fontos jellemzők, azonban a légúti gyulladás megítélésére nem alkalmasak. Hasonlóan, a vérvizsgálatok sem adnak megfelelő információt e gyulladásosejt-folyamatokról.

Mindezekkel szemben, a **kilégzett gázok, a kilégzett levegő kondenzátum (EBC)** vagy az **indukált köpet** vizsgálatával a légutakban zajló gyulladásosejt-folyamatok közvetlenül megítélhetők. E *non-invasív* vizsgálómódszerek közül az indukált köpet vizsgálata és a frakcionált kilégzett nitrogén-monoxid (FENO) mérése néhány gyógyintézetben már a klinikai gyakorlatban is hozzáférhető, bár hasznosságuk még az asztmás típusú légúti gyulladás vizsgálatában is mai napig vitatott. A FENO-mérés szerepe más tüdőbetegségek, így például a COPD-t illetően még bizonytalanabb.

Az elmúlt években számos kutatócsoport közölt mérési eredményeket gyulladásosejt-folyamatokról a köpetben és/vagy az EBC-ben való kimutathatóságáról különböző tüdőbetegségekben. Egyes szerzők a kimutatott mediátoroknak biológiai nyomjelző, ún. *biomarker* funkciót is tulajdonítanak. A biomarkerek a gyulladás fenotipizálásában és monitorozásában, vagy a betegek terápiás válaszkészségének megítélésében segíthetik a klinikusokat. Az **eikozanoidok** a mediátorok fontos csoportját képviselik, szerepük az

asztmában jól ismert, míg más kórképekben, így például a COPD-ben funkciójuk sok szempontból tisztázatlan.

Az EBC egyik legígéretesebb biomarkere a **kémhatása**, azaz a pH-ja. A feltételezések szerint a légutak savasodása a légúti gyulladás egyik jellemző kísérője. Az eddigi adatok azonban ellentmondásosak, és úgy tűnik, hogy az alkalmazott mérés technika jelentősen befolyásolja a kapott eredményeket. Megfelelően standardizált módszer kimunkálásával korábban széleskörű méréseket nem végeztek.

Az eddig ismert biomarkerek egy másik csoportja a tüdőben zajló **oxidatív stressz** mértékéről ad információt. Az oxidatív stressz lényege az oxidáns anyagok légúti felhalmozódása, ami a gyulladás fenntartásán, különböző vazo- és bronchokonstriktor hatású mediátorok termelődésén és a tüdő szöveti struktúráinak közvetlen károsításán keresztül járul hozzá a tüdőbetegségek kialakulásához. Az oxidatív stressz különösen a COPD-ben játszik központi patofiziológiai szerepet a dohányfüst nagy mennyiségű oxidáns tartalma miatt. Az oxidatív stressz monitorozásának egyik módszere lehet a **malondialdehidnek** (MDA-nak) – mint a lipidperoxidáció egyik ismert melléktermékének – a légúti mintákban való koncentráció változásának mérése.

Mindezen megfontolások alapján, az OTKA pályázatban leírt vizsgálataink részben a fent említett gyulladásos mediátorok és oxidatív stressz markerek mennyiségi kimutatására, részben a légúti pH mint biomarker szerepének tisztázására irányultak. Vizsgálataink egy másik csoportjában a FENO-mérés lehetséges klinikai felhasználását elemeztük COPD-s betegekben.

A kutatási tervben leírt célkitűzések – biomarkerenként csoportosítva – az alábbiak szerint kerültek megvalósításra:

1. A FENO és a köpet sejtprofil kapcsolatának vizsgálata COPD akut exacerbációjában, valamint a köpet eosinophilia szerepének megítélése.

Követéses vizsgálatunkban kimutattuk, hogy az exacerbációban lévő és köpet eosinophiliát (>3%) mutató COPD-s betegek funkcionális válaszkészsége (ΔFEV_1) nagyobb a köpet eosinophiliával nem rendelkező, azaz kizárólag neutrophil légúti gyulladással jellemzett betegekhez képest. Vizsgálatunk során azt is igazoltuk, hogy *(i)* a FENO szint szoros pozitív korrelációt mutat a köpet eosinophilszámával, továbbá *(ii)* a FENO jó prediktív értékű biomarkere (ROC AUC: 0.89) a köpet eosinophiliának exacerbációban lévő COPD-s betegekben. A korreláció kimutathatóságát nem befolyásolta a betegek inhalációs kortikoszteroid (ICS) státusza a kórházi felvétel előtt. A köpet sejtprofilját tekintve a köpet

neutrophilsejtszáma csökkent a COPD akut exacerbációjának kezelése során, míg a lymphocyták, makrophagok és eosinophilejtek száma és százalékos megoszlása a köpetben nem változott. A köpet eosinophiliával jellemzett alcsoportban ugyanakkor a kezelés hatására csökkent az eosinophilejtszám. Köpet eosinophilia megjelenésével az exacerbációban lévő COPD-s betegek 20.4%-ában találkoztunk.

2. A FENO és a súlyos akut exacerbációk gyakoriságának vizsgálata COPD-s betegekben.

Három éves követési időt alapul véve vizsgálatunk eredményei azt mutatják, hogy a FENO szint alapján alcsoportokra bontott COPD-s betegek exacerbációs gyakorisága különböző. A magas FENO (>26.8 ppb) szinttel jellemzett betegek ritkábban kerülnek hospitalizációra akut exacerbáció miatt, míg az alacsony FENO (<26.8 ppb) szinttel jellemzett betegben az exacerbációs gyakoriság nagyobb. Az exacerbáció során mért magasabb FENO szint viszonylag jó szenzitivitással (66%) és specificitással (78%) vetíti előre (ROC AUC: 0.81) a magasabb exacerbációs gyakoriságot (>2 exacerbáció/év) e betegekben. Az alacsony FENO szinttel jellemzett betegek többször részesülnek antibiotikus kezelésben, gyakoribb a pozitív köpet tenyésztési lelet, és magasabb az intenzív osztályos ellátás igénye is a hospitalizáció időtartama alatt.

3. Az EBC pH-jának vizsgálata COPD akut exacerbációjában.

Követéses vizsgálatunkban kimutattuk, az exacerbációban lévő és kórházi ellátásra szoruló COPD-s betegek EBC mintái nem savasabbak az egészségesekhez képest. Az exacerbáció kezelése során a betegek EBC pH-ja nem változott, ami nem támogatja e betegcsoportban a pH lehetséges légúti biomarker szerepét a kórkép monitorozásában. Munkánk során azt is igazoltuk, hogy *(i)* az R-Tube típusú kondenzátorral gyűjtött EBC minták pH-ja számszerűségét tekintve kisebb az EcoScreen készülékkel gyűjtött mintákéhoz képest, *(ii)* a dohányzás csökkenti a kondenzátum pH-ját, *(iii)* az EBC minták nyállal való kontaminációja kizárható, továbbá *(iv)* a pH a spirometriai paraméterekkel korrelációt nem mutat.

Tekintettel ezen eredményekre, más tüdőbetegségekben is végeztünk EBC pH-méréseket, annak megítélésére, hogy a kapott eredmények mennyire specifikusak a COPD-re. Keresztmetszeti vizsgálataink eredményei szerint: *(i)* az EBC pH-ja cisztás fibrózisban (CF) vagy rosszindulatú tüdődaganatban szenvedő betegekben sem tér el az egészségesekben mért értéktől, *(ii)* a tüdőtranszplantált betegeken végzett követéses vizsgálataink szerint a

bronchiolitis obliterans szindróma (BOS) kialakulása sem okoz savasodást, valamint *(iii)* a számszerű pH értékek vizitek közötti variabilitása a BOS-ban szenvedő és a BOS-mentes betegekben is hasonló. Mivel a transzplantáltak nagy része BOS 1 stádiumba került a vizsgálat során, megállapításunk mindenekelőtt a BOS korai időszakában helytálló. Összességében, e mérési eredmények nem támogatják a pH-mérés esetleges alkalmazását e kórképek diagnosztikájában. A fizikai terhelés hatására kialakuló bronchokonstriktio patomechanizmusában ugyanakkor szerepe lehet a légúti savasodásnak, mivel bronchokonstriktióval válaszoló betegek kondenzátumának pH-ja csökkent, és a csökkenés mértéke arányos a bronchokonstriktio súlyosságával. Munkánk során azt is bizonyítottuk, hogy a pH-csökkenés a kondenzátum hígulásától független.

4. Oxidatív stressz vizsgálata COPD-ben a légúti malondialdehid koncentráció meghatározása alapján.

Követéses vizsgálatunkban kimutattuk, hogy *(i)* a köpet MDA koncentrációja stabil COPD-s betegekben szignifikánsan magasabb az egészséges emberekéhez képest, *(ii)* COPD akut exacerbációja során a köpet MDA szintje tovább emelkedik, majd *(iii)* az exacerbáció kezelés után az MDA szint csökken. Az MDA szintjének csökkenése leginkább azokban a betegekben volt kimutatható, akiknek a légúti áramláskorlátozottsága (ΔFEV_1) is jelentősen javult a kezelés során. Az MDA meghatározására HPLC technikát használtunk, a mérések intra- és inter-assay variabilitása, valamint napok-közötti reprodukálhatósága igen kedvező volt a köpetben. A köpetindukció, mint szemi-invazív beavatkozás önmagában nem befolyásolta a köpet MDA szintjét. Összességében, eredményeink arra utalnak, hogy a köpet MDA koncentrációjának mérésén keresztül a légutakban zajló oxidatív stressz-hatás mértéke jól nyomon követhető (monitorozható) COPD-s betegekben.

Mindezen klinikai szempontból kedvező megállapításainkkal ellentétesek azok a mérési eredményeink, amelyek COPD-es betegek és egészségesek EBC mintáiban az MDA koncentrációinak összehasonlításaira vonatkoznak. A nevezett két vizsgálati csoport EBC mintáinak MDA szintje nem mutatott különbséget, aminek elsődleges okát a markernak az EBC-ben észlelt nagyfokú napi koncentráció-variabilitásában lehet keresni.

Az oxidatív stressz patofiziológiai szerepének szélesebb körű megítélése céljából meghatároztuk az MDA légúti koncentrációját két másik tüdőbetegségben, így az asztmában és a CF-ben is. A CF-es betegek köpetében és kondenzátum folyadékában az MDA szintje magasabbnak bizonyult a COPD-s betegekéhez képest, míg az asztmásokban a marker szintje alacsonyabb volt. Az MDA értékek a spirometriai paraméterekkel, illetve a köpet neutrophil-

és eosinophilesejtszámával korrelációt egyik betegcsoportban sem mutattak. Eredményeink arra utalnak, hogy az oxidatív stressz mértéke a különböző tüdőbetegségekben eltérő.

5. Oxidatív stressz vizsgálata a légúti hidrogén-peroxid mérésén keresztül.

Vizsgálataink során kimutattuk, hogy a hidrogén-peroxid (H_2O_2) könnyen mérhető az EBC-ben, bár a mérések napszaki variabilitása igen jelentős (20-30%). Jóllehet a mérések reprodukálhatósága megfelelő, vizsgálataink során azt is kimutattuk, hogy a mért koncentráció értékeket jelentősen befolyásolja az EBC gyűjtése során alkalmazott légzési manőver, amelynek standardizálása elengedhetetlen, és alapvetően meghatározza a módszer klinikai felhasználhatóságát a jövőben.

6. Eikozanoidok és a 8-izoprosztán mint lipidperoxidációs marker koncentrációjának vizsgálata COPD-s betegek köpetében.

Vizsgálataink során kimutattuk, hogy stabil állapotú COPD-s betegek köpetében a prosztaglandin E_2 (PGE_2) koncentrációja nagyon alacsony, ugyanakkor a koncentráció szintje exacerbáció esetén kifejezetten megemelkedik, majd az exacerbáció kezelését követően csökken. A köpet leukotrién B_4 (LTB_4) és 8-izoprosztán szintje szintén emelkedik COPD exacerbációban, azonban e mediátorok koncentrációja a betegek kezelése után továbbra is magas marad.

A stabil COPD-s betegek köpetének neutrophilsejtszáma és a köpet 8-izoprosztán és LTB_4 szintje között szignifikáns pozitív korreláció volt. A köpet lymphocytasejtszáma szintén korrelációt mutatott a 8-izoprosztán szinttel. Az exacerbációban lévő COPD-s betegek között szignifikáns összefüggést igazoltunk a köpet PGE_2 és a köpet neutrophil-, illetve lymphocytasejtszáma között. Emellett a köpet neutrophilsejtszáma és a köpet LTB_4 szintje között is korreláció mutatkozott. Az eikozanoid mérések inter-assay reprodukálhatósága 10-20% között mozgott, a leggyengébb reprodukálhatóság a LTB_4 -mérést jellemezte, míg a legjobb reprodukálhatósági mutatója a PGE_2 mérésének volt.

A ciszteinil-leukotrién (cisz-LT) szintek a köpetben exacerbációban számottevően nem változtak, ami arra utal, hogy az eikozanoidok ezen csoportja feltételezhetően nem játszik meghatározó szerepet az exacerbációval összefüggő gyulladásos folyamatokban és légzésfunkciós romlásban COPD-s betegekben. Eredményeink alapján viszont ígéretesnek tűnik a PGE_2 -nek légúti biomarkerként való alkalmazása a jövőben, bár ennek is még további vizsgálata szükséges.

A fenti eikozanoid-méréseket korlátozott számban stabil COPD-sekből származó bronchoalveolaris lavage (BAL) folyadékban is el tudtuk végezni összehasonlítás céljából. A mérések során megállapítást nyert, hogy az eikozanoidok szintje rendre magasabb a köpetben, mint a BAL-ban. A legalacsonyabb koncentráció az EBC-ben volt mérhető. A köpet sejtprofil a BAL-ban mért koncentrációval korrelációt nem mutatott. Eredményeink alapján a légúti gyulladás és oxidatív stressz monitorozására a köpet létszik a legmegfelelőbb légúti mintának.

7. Antioxidánsok aktivitásának vizsgálata COPD-s betegekben.

Az oxidatív stressz további vizsgálata céljából meghatároztuk a szuperoxid-dizmutáz (SOD) enzim aktivitását stabil állapotú és exacerbációban lévő COPD-s betegek köpetében, valamint egy egészséges kontroll csoportban. Követéses vizsgálatunkban kimutattuk, hogy (i) a SOD aktivitása nagyobb a stabil COPD-s betegekben az egészséges emberekhez képest, valamint (ii) COPD akut exacerbációja során a köpet SOD aktivitása megemelkedik. Az exacerbáció kezelése után az enzimaktivitás a betegeknek csak egy alcsoportjában csökkent szignifikánsan.

A pályázatban leírtaknak megfelelően a glutation méréshez szükséges HPLC oszlopok és kitek is beszerzésre kerültek, és a mérés technika is beállításra került. Problémát okozott azonban, hogy sem a köpetfelülúszóban, sem a kondenzátumban nem kaptunk detektálható jelet. A protokollt módosítva és a köpet sejtes frakciójában a méréseket megismételve már értékelhető koncentráció értékeket kaptunk. A módszer beállítását azonban nehezíti, hogy megfelelő számú sejtet tartalmazó köpet nem minden COPD-s betegről nyerhető. A köpet sejtes frakciójának mennyiségét és minőségét különböző (dithiothreitol [DTT]-alapú és DTT-mentes) feldolgozási technikák alkalmazásával, illetve az izolálás egyéb paramétereinek változtatásával próbáltuk növelni. Eddigi eredményeink alapján elmondható, hogy a különböző köpet feldolgozási módszerek jelentősen befolyásolják mind a köpet sejtes frakciójának minőségét, mind a felülúszóból kinyerhető fehérjék és nukleinsavak mennyiségét.

8. Szisztémás biomarkerek szerepe a légúti gyulladás monitorozásában COPD-s betegekben

Vizsgálatainkban részben azt mutattuk ki, hogy a pozitív tenyésztési lelettel rendelkező COPD-s betegekben a szérum C-reaktív protein (CRP) szintje szignifikánsan magasabb a negatív lelettel rendelkező betegekhez képest, illetve hogy a CRP jó prediktív értékkel (ROC AUC=0.8) vetíteti előre a pozitív tenyésztési eredményt exacerbáció miatt hospitalizált COPD-s betegekben. A betegekben leggyakrabban *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* és *Pseudomonas aeruginosa* tenyésztett ki. A teszt szenzitivitása, specificitása,

pozitív és negatív prediktív értéke 69 és 76% között mozgott. A felvételi vérképben meghatározott fehérvérsejtszám (WBC) prediktív értéke a tenyésztési lelet szempontjából jóval gyengébbnek bizonyult (ROC AUC=0.54).

Megállapítottuk továbbá, hogy az oxidatív stressz vizsgálatára a köpetből (AUC: 0.94, $p<0.0001$) és EBC-ből (AUC: 0.98, $p<0.0001$) történő MDA-mérés szenzitívebb és specifikusabb módszer, mint a plazmából történő meghatározás (AUC: 0.68, $p<0.05$). A betegeket a FEV1% alapján két csoportra bontva a súlyosabb betegekben (FEV1<50%) szignifikánsan magasabb volt a köpet és az EBC MDA szintje, mint az enyhe és középsúlyos betegekben (FEV1%>50). A plazma MDA szintje a súlyos és az enyhe-középsúlyos betegcsoportok között különbséget nem mutatott, ami szintén arra utal, az oxidatív stressz markerek mérése légúti mintákból előnyösebb a plazmából történő meghatározáshoz képest.

9. Kilégtett szén-monoxid változása COPD akut exacerbáció kezelése során

Vizsgálati eredményeink szerint a kilégtett szén-monoxid (eCO) szintet elsősorban a beteg dohányzási aktivitása határozza meg: a dohányzókban a marker szintje mindig sokkal magasabb, mint az ex-dohányosokban vagy a nem dohányzókban, függetlenül a COPD-s beteg aktuális klinikai állapotától (stabil állapot vs. exacerbáció). Az exacerbáció kezelése nem befolyásolja az eCO szintet. További, egészségeseken végzett méréseink során azt is kimutattuk, hogy a különböző dohányzási formáknak az eCO szintre gyakorolt hatása eltérő: így a vízpipázás, mint egy újszerű, fiatalok körében egyre gyakrabban előforduló dohányzási forma 3-4-szer nagyobb CO szint-emelkedést generál a kilégtett levegőben, mint cigarettázás hasonló kísérleti körülmények és elégetett fajlagos dohánytartalom mellett. A nagyobb CO terhelés kifejezettebb füstexpozícióra utal, és egyben felveti a súlyosabb egészségkárosító, esetleg karcinogén hatások lehetőségét is. A vízpipázó egyénnel zárt térben való tartózkodás (passzív vízpipázás) a dohányzással megegyező eCO szint-emelkedést okozott az egészségesekben. A vizelet kotinin szint-emelkedés 12 órával a dohányzás befejezése után érte el csúcspontját, és mind a cigarettázóknál, mind a vízpipázóknál hasonló mértékű volt.

10. Köpet és EBC citokin mintázatának elemzése stabil és exacerbációban lévő COPD-s betegekben

A köpetben elvégzett mérések eredményeit tekintve a 120 citokinből 96 adott megfelelő intenzitású jelet mind az exacerbációban (kórházi felvétel), mind az exacerbáció kezelése után (kórházi távozás) COPD-s betegekben. A kezelés során 12 citokin szintje csökkent

szignifikánsan, melyek közül kiemelendők az IL-1, IL-2, Acrp30 és a TGF-beta-1 és -3 faktorok. A citokin mintázatok tekintetében különbség mutatkozott a bakteriális és a nem bakteriális (feltehetően virális) exacerbációk között, és a citokin profilból a betegek funkcionális válaszkészségére (ΔFEV_1) is következtetni lehetett. A köpet differenciált sejtprofilja ugyanakkor a citokin mintázatokkal összefüggést nem mutatott. Az assay reprodukálhatósági indexe a detektálható citokinekre nézve 6-8% között mozgott. A köpetfeldolgozás során rutinszerűen alkalmazott DTT kezelés nem befolyásolta a kapott eredményeket. Az indukció során nyert és a spontán úton ürített köpet citokin mintázata hasonló volt.

A stabil COPD-s betegek szintén elkülöníthetőnek bizonyultak az egészséges kontroll személyektől a köpet citokin mintázat alapján. Eredményeink szerint az IL-1 β , IL-6, Gro- α , BMP-4 és CK β 8-1 citokinek szintje a köpetben szignifikánsan magasabb volt a stabil, ex-dohányos COPD-sekben, mint az ex-dohányos egészségesekben. Összességében, az eredmények tükrében, a köpetfelülűszó antitest microarray technikával való vizsgálata a légutak proteomikai analízisére alkalmas módszer. Mindezen kedvező mérési eredményekkel ellentétben, az EBC citokin mintázata a COPD-s betegekben nem különbözött szignifikánsan az egészséges kontroll mintában felvett mintázattól, ami arra utal, hogy a kondenzátum folyadékban a citokinek jelintenzitása nagyon alacsony, amely megbízható detektálást nem tesz lehetővé.

A fenti, tételes eredmények publikálása a *Lung, Respiration, Respirology, Inflammation, Acta Physiologica Hungarica, American Journal of Transplantation, Transplantation, Inflammation Research, Lung Cancer* és *Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery* c. folyóiratokban történt. Ezen felül, az OTKA pályázat támogatásával több összefoglaló közlemény is született. A közleményekben részletesen tárgyaltuk az oxidatív stressz szerepét a COPD patofiziológiájában, összefoglalásra kerültek az ismertebb oxidatív stressz markerek, ismertettük e markerek bioszintézisének lépéseit, a légúti mintákban való kimutathatóságukat és lehetséges klinikai felhasználásukat. A közleményeket a *Current Medicinal Chemistry* és *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* c. folyóiratokban publikáltuk.