

# A komplement rendszer szerepe nanorészecskékhez köthető kóros immunfolyamatokban

Doktori értekezés

**Weiszhár Zsóka**

Semmelweis Egyetem,  
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Prof. Dr. Horváth Ildikó, egyetemi tanár, MD DSc

Hivatalos bírálók: Dr. Farkas Henriette, egyetemi docens, PhD DSc  
Dr. Józsi Mihály, tudományos főmunkatárs, PhD

Szigorlati bizottság elnöke: Prof. Dr. Somogyi Anikó, egyetemi tanár, MD DSc

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Vér Ágota, egyetemi docens, PhD habil.  
Dr. Gadó Klára, osztályvezető főorvos, PhD

Budapest  
2013

## TARTALOMJEGYZÉK

<b>1.RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE</b>	<b>4</b>
<b>2.BEVEZETÉS</b>	<b>7</b>
2.1. Nano- és mikrorészecskék egészségügyi jelentősége	7
2.2. Nanorészecskék által kiváltott akut és krónikus immunreakciók	7
2.2.1. Túlérzékenységi reakciók általános áttekintése	10
2.2.2. A gyulladásos folyamatok általános jellemzői	12
2.2.2.1. Ultrafinom részecskék szerepe gyulladásos obstruktív tüdőbetegségek pathomechanizmusában	16
2.3. A komplement rendszer szerepe nanorészecskékkel szembeni immunreakciókban	18
2.3.1. A komplement rendszer működése	18
2.3.2. Infúziós gyógyszerek által kiváltott komplement mediált pseudoallergia	24
2.3.2.1. Liposzómális gyógyszerek által kiváltott komplement mediált pseudoallergia	29
2.3.2.2. Micelláris gyógyszer emulgeátorok által kiváltott komplement mediált pseudoallergia	32
2.3.3. A komplement rendszer szerepe asztmában és COPD-ben	38
<b>3. CÉLKITŰZÉSEK</b>	<b>42</b>
<b>4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</b>	<b>44</b>
4.1. A klinikai vizsgálatokba bevont személyek	44
4.2. Klinikai vizsgálatok menetrendje	44
4.3. A biológiai minták legyűjtésének és tárolásának körülményei	46
4.4. A kísérletekhez felhasznált reagensek és gyógyszerek	48
4.5. A laboratóriumi vizsgálatok során alkalmazott módszerek	50
4.5.1. Gyógyszerek által kiváltott komplement reaktivitás mérése	50
4.5.2. A H faktor mennyiségének és allélfrekvenciáinak meghatározása	50
4.5.3. Összfehérjeszint mennyiségi meghatározása	51
4.5.4. Méreteloszlás meghatározás	51
4.5.5. Endotoxin szennyeződés vizsgálata	51
4.5.6. Szérumok részecskeméret alapján történő frakcionálása	52
4.6. Statisztikai számítások	52

<b>5. EREDMÉNYEK</b>	<b>54</b>
5.1. Nanogyógyszerek által kiváltott komplement mediált pszeudoallergia	54
5.1.1. Liposzómális készítmények által kiváltott komplement aktiváció	54
5.1.1.1 Az AmBisome és a Caelyx liposzóma tartalmának jellemzése	54
5.1.1.2 Az AmBisome és a Caelyx komplement aktiváló hatásának összehasonlítása	56
5.1.2. Micelláris gyógyszerek által kiváltott komplement aktiváció	59
5.1.2.1. Különböző részecskeméretű kemoterápiás szerek komplement aktiváló hatásának összehasonlítása egészséges emberek szérumain	59
5.1.2.2. A Docetaxel, Paclitaxel és oldószereik méret eloszlási tulajdonságai	63
5.1.2.3. A Tween 80 és Cremophor EL in vitro komplement aktiváló hatásának vizsgálata	65
5.1.3. Tumorbetegség taxolszármazékokkal szembeni komplement reaktivitása	72
5.2. Komplement aktiváció asztmában és COPD-ben	74
5.3. Komplement H faktor asztmában és COPD-ben	76
5.3.1. Szisztémás és légúti H faktor koncentrációk asztmás és COPD betegekben	76
5.3.2. A légúti H faktor összefüggései az asztma és COPD klinikai jellemzőivel	80
<b>6. MEGBESZÉLÉS</b>	<b>83</b>
<b>7. KÖVETKEZTETÉSEK</b>	<b>93</b>
<b>8. ÖSSZEFOGLALÁS</b>	<b>94</b>
<b>9. SUMMARY</b>	<b>95</b>
<b>10. IRODALOMJEGYZÉK</b>	<b>96</b>
<b>11. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE</b>	<b>115</b>
<b>12.KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</b>	<b>117</b>

## 1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ADCC	Antibody Dependent Cell mediated Cytotoxicity
C	Complement
CARPA	Complement Activation Related PseudoAllergy
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
CR	Komplement Receptor
CRP	C Reaktív Protein
DAF	lebomlást gyorsító faktor (Decay Accelerating Factor)
DSPE	DiStearoyl-PhosphatidylEthanolamine
DSPG	DiStearoyl-PhosphatidylGlycerol
EC50	half maximal effective concentration
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
EMA	European Medicines Agency (Európai Gyógyszerügynökség)
FcεRI	IgE Fc részét kötő Receptor I. típusa
FDA	U.S. Food and Drug Administration (Egyesült Államok Élelmiszer és Gyógyszerellenőrző Hivatala)
FEF25-75	Forszírozott kilégzési áramlás a forszírozott vitálkapacitás 25-75%-ánál (Forced expiratory flow at 25-75 percentage of FVC)
FENO	Kilégzett nitrogén-monoxid hányados (fractional exhaled nitric oxide)
FEV1	Forszírozott kilégzési térfogat egy másodperc alatt (forced expiratory volume in one second)
FVC	Forszírozott vitálkapacitás (forced vital capacity)

GINA	Nemzetközi asztma irányelvek (Global Initiative for Asthma)
GM-CSF	Granulocyte and macrophage-colony stimulating factor
GOLD	Nemzetközi COPD irányelvek (Global Initiative for chronic Obstructive Lung Disease)
HRF	homológ restrikciós faktor
HSPC	fully Hydrogenated Soy PhosphatidylCholine
ICS	Inhalációs kortikoszteroid
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LABA	Hosszú hatású $\beta$ 2 agonista (long acting $\beta$ 2-agonist)
LPS	Lipopoliszacharid
MAC	Membrane Attack Complex (membrán károsító komplex)
MASP	Mannose binding lectin Associated Serine Protease
MBL	Mannose Binding Lectin (mannóz kötő lektin)
MIRL	CD59, reaktív lízis gátlója
MMP	Mátrix metalloproteináz
MPEG	MethoxyPolyEthylene Glycol 2000
NE	Nemzetközi Egység (endotoxin mennyiségének WHO által megállapított egysége)
NO	Nitrogén monoxid
PAF	Platelet Activating Factor (vérlemezke aktiváló faktor)
PEF	Kilégzési csúcsáramlás (peak expiratory flow)
PEG	Poli Etilén Glikol

RA	Rheumatoid Arthritis
SABA	Rövid hatású $\beta$ 2-agonista (short acting $\beta$ 2-agonist)
SAP	Serum Amyloid Protein
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SLE	Szisztémás Lupus Erythematosus
TAT	Transactivating regulatory protein
TGF	Tumor growth factor (rák növekedési faktor)
TNF	Tumor Nekrózis Faktor
WHO	World Health Organization (Egészségügyi Világszövetség)

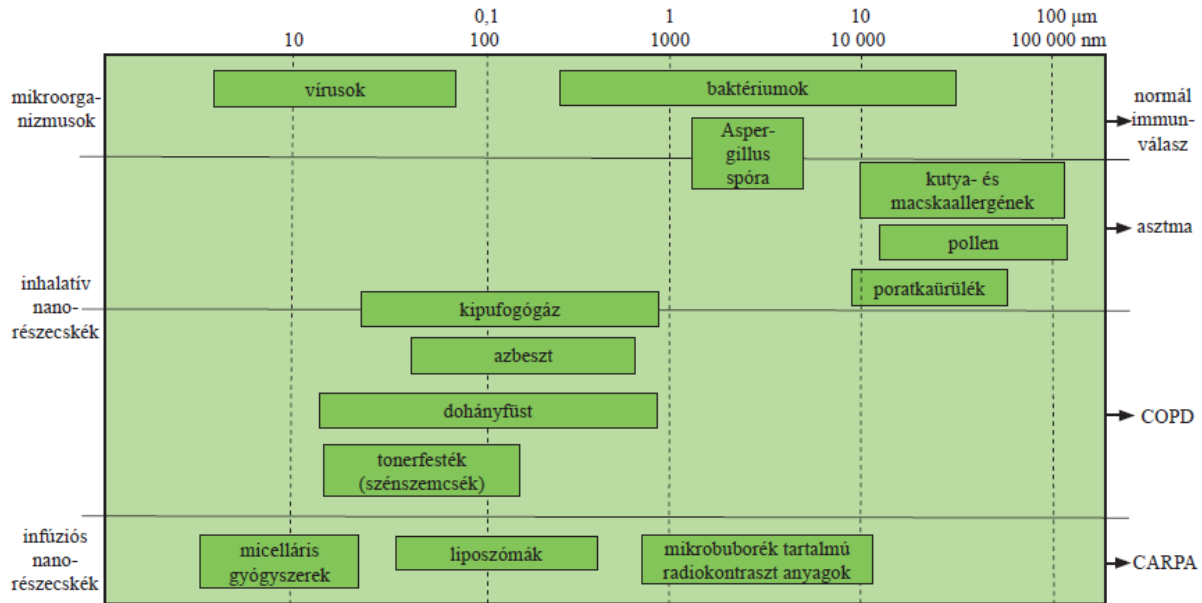
## 2. BEVEZETÉS

### 2.1. Nano- és mikrorészecskék egészségügyi jelentősége

Nanorészecskéknek a nm-es mérettartományba eső részecskemérettel rendelkező anyagokat nevezzük. A nanorészecskék kutatása, azaz a nanotudomány napjainkban rendkívül dinamikus fejlődő tudományág, mivel folyamatosan nő a lehetséges felhasználási területek száma. Sokan a jövő ipari fejlődésének útját látják a nanorészecskék (pl. szén nanocsőből készült ruhák, épületelemek) előállításában, forgalmazásában és alkalmazásában, mely várhatóan jelentősen növelni fogja a nanorészecskék által okozott környezeti terhelést.

Jelenleg is találhatóak a levegőben nanorészecskék vagy más néven ultrafinom szemcsék, melyek többek között a városi szállópor szennyezés okozói. Természetes úton általában nagyon magas hőmérsékleten keletkeznek égési végtermékként (pl. vulkánkitöréskor, erdőégéskor), de a vírusok is ebbe a mérettartományba tartoznak. Kicsit nagyobb természetes eredetű finomrészecskék (1-10 $\mu$ m) a virágpor, szemcsék, gombaspórák, baktériumok. Ember által létrehozott nanorészecskék többek között a kipufogógáz, cigarettafüst, a tonerfesték szemcséi, egyes ipari vegyületek, mint az azbeszt, szilikon, de számos innovatív gyógyszer alapanyag is ide tartozik. A pulmonológiai szempontból fontos nanostruktúrák hozzávetőleges méretét a 1. ábra mutatja be részletesebben.

Az orvostudomány számára a nanorészecskék kettős kihívást jelentenek. Egyfelől a liposzómák, szén nanocsövek, kvantum dotok új lehetőségeket rejtenek a gyógyszeripar számára a képzési eljárások, illetve a szisztémás toxicitás nélküli célzott tumorterápia területén. A tüdőgyógyászatban jelenleg is használnak nanogyógyszereket, ezekről az 1. Táblázat ad ízelítőt. Az inhalációs gyógyszerek a nanorészecskék azon tulajdonságát használják ki, hogy az 5 $\mu$ m-nél kisebb részecskék nem szűrődnek ki a felső légutakban, hanem bejutnak a tüdőbe és ott a gravitáció hatására leülepednek [1]. A 10 $\mu$ m-nél nagyobb szemcsék csak akkor jutnak le az alsó légutakba, ha a belélegzett levegőben olyan magas a koncentrációjuk, hogy a felső légutak kapacitása nem elegendő a belélegzett levegő megszűrésére.



**1. ábra: Természetes és ember által létrehozott nanorészecskék mérete és egészségügyi veszélyei.**

A nanorészecskék speciális penetrációs tulajdonságai sok esetben azonban káros egészségügyi következményekkel is járhatnak, amennyiben a tüdőben lerakódó belégzett nanorészecskék krónikus immunaktiválódást tarthatnak fenn. A tüdő depozíció lokális maximuma 1-3 $\mu$ m és 10-50nm között van [1]: az előbbi tartományba esik számos asztmát kiváltó inhalatív allergén, míg zömmel az utóbbi tartományban találhatóak a COPD kialakulásáért felelős nanorészecskék (dohányfüst szemcsék, azbeszt, stb.). Az ilyen immunogén nanorészecskék nemcsak hosszú távon fejthetnek ki káros hatást, hanem a meglévő betegség akut exacerbációját is kiválthatják. Többmillió ember szenved ezekben a légúti betegségekből, az asztmások száma pl. minden évtizedben 50%-kal emelkedik [2]. Csak Magyarországon a regisztrált asztmások száma 170000, de a valódi prevalencia 6-9% lehet (400-600.000 ember), a COPD esetében pedig 6-7% (400-500.000 ember). A mérgező légszennyező anyagok légúti jelenléte karcinogén folyamatok elindulását is eredményezheti. További veszélyt jelentenek a nanogyógyszerekkel szembeni túlérzékenységi reakciók, illetve szív érrendszeri hatásai, melyek egyes kutatások szerint a szívinfarktus és a stroke kockázatát növelő tényezők lehetnek.



**2. Táblázat: Tüdőgyógyászatban használatos nanogyógyszerek.**

Név	Hatóanyag	Nanohordozó	Méret	Pulmonológiai alkalmazási terület
Taxotere	Docetaxel	Tween 80 (micella)	10nm	Tüdőrák
Paclitaxel	Paclitaxel	Cremophor EL (micella)	14nm	Tüdőrák
AmBisome	Amphotericin B	Liposzóma	100nm	Gombafertőzések (pl. tüdőtranszplantáció után)
Inhalációs gyógyszerek	ICS, ICS+LABA, SABA, antikolinerg	Aeroszol	Szárzpor belégzők:  <1 $\mu$ m 1-5%  1-5 $\mu$ m 20-30%	Asztma, COPD

Jelen dolgozat a nanogyógyszerek beadásakor, illetve asztmában és COPD-ben lezajló komplement rendszert érintő változásokkal foglalkozik.

## 2.2. Nanorészecskék által kiváltott akut és krónikus immunreakciók

### 2.2.1. Túlérzékenységi reakciók általános áttekintése

A túlérzékenységi reakciók jelenleg elfogadott osztályozását Coombs és Gell alkotta meg, melyet a 3. táblázat foglal össze.

### 3. Táblázat: A túlérzékenységi reakciók csoportosítása Coombs és Gell nyomán [3]

Elnevezés	Reakció kezdete	Mechanizmus
I. Azonnali típusú túlérzékenységi reakció	1-2 percen belül	Az allergén keresztköteése a hízósejtek és bazofil granulociták felszínén található FcεRI-IgE komplexszel aktiválja a hízósejteket és bazofil granulocitákat, melyekből különböző mediátorok szabadulnak fel.
II. Ellenanyag közvetített citotoxikus reakció	4-8 órán belül	Különböző sejt felszíni antigénekkal reagáló IgG és IgM molekulák komplementaktiválás vagy citotoxikus T sejtek által közvetített ADCC révén pusztítják el a célsejtet.
III. Immunkomplex közvetített reakció	2-8 órán belül	A szövetekben lerakódó antigén-ellenanyag (IgG/IgM) komplexek komplementet aktiválnak, és ezáltal gyulladást indukálnak.
IV. Késői típusú túlérzékenységi reakció	1-3 napon belül	Szenzibilizált Th1 sejtekből felszabaduló citokinek aktiválják a makrofágokat és citotoxikus T sejteket.

Az I. típusú, IgE mediált túlérzékenységi reakció (allergia) kialakulásához az allergénnel való többszöri találkozás szükséges. Az első allergén inger fellépésekor az allergént az antigén prezentáló sejtek felveszik, feldolgozzák és bemutatják a CD4+ T sejteknek, melyek Th2 sejtekké differenciálódnak. Ezek a Th2 sejtek részben közvetlen kapcsolat, részben az általuk termelt IL-4 és IL-13 által döntő szerepet játszanak az allergénre specifikus B-sejtek IgE termelő plazmasejtté válásában. A termelő allergénspecifikus IgE azonnal a szöveti hízósejtek és a vérben keringő bazofil granulociták felszínén található receptorokhoz (FcεRI) kötődik.

Ismételt allergén inger esetén az IgE-vel már szenzibilizált hízósejtek és bazofil granulociták FcεRI receptorait keresztköti az allergén, mely szinte azonnali sejt aktiválódáshoz és degranulációhoz vezet [4]. A granulumból preformált mediátorok (hisztamin, triptáz, kimáz, karboxipeptidáz A, heparin, katepszin G, karboxipeptidáz, hexozaminidáz) szabadulnak fel. Másfelől újonnan szintetizálódó lipid mediátorok (leukotrién C4/D4/E4, prosztaglandin-D2, PAF), citokinek (interleukin 3/4/5/13, GM-CSF, MIP-1α, TNF-α) termelődnek [5]. A hisztamin vazodilatációt és bronchokonstriktiót idéz elő, ödémát okoz a kis erek permeabilitásának növelése által és fokozza a nyáktermelő mirigyek működését. A TNFα aktiválja a neutrofil granulocitákat, serkenti a prosztaglandinok, gyulladáscsökkentő citokinek és kemokinek szintézisét. A lipid mediátorok egy közös prekursorból, a membrán foszfolipidek enzimatis bontásából származó arachidonsavból keletkeznek eltérő enzimek hatására. Közülük a leukotrién-C4 és metabolitjai, a leukotrién-D4 és E4 bronchokonstriktiót váltanak ki, növelik az ér permeabilitást, és értágító hatásúak. A prosztaglandin-D2 hatékony bronchokonstriktor. A PAF szintén bronchokonstriktor, emellett vazodilatátor hatással rendelkezik, a vérlemezkéket és eozinofil granulocitákat aktiválja és fokozza a leukociták kemotaxisát. [6, 2. ábra]

Az IgE mediált túlérzékenységi reakció késői fázisa 2-8 órával az azonnali reakció után alakul ki, és több napig eltarthat. A késői fázisban a hízósejtek, bazofil és eozinofil granulociták, valamint Th2 sejtek de novo különböző citokineket (IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 és TNFα) szintetizálnak. A citokinek egy része (pl. IL-6, TNFα) kemotaktikus és gyulladáskeltő hatással bír, más részük (pl. IL-5) az eozinofil granulociták termelődését és aktiválódását eredményezi [7].

Az allergiás reakciók legsúlyosabb formája a szisztémás anafilaxis, mely gyors lefolyású és végzetes kimenetelű is lehet. Prevalenciáját 0,05-2,0% közöttire becsülik [8], mely az esetek 2-20%-ában válik halálos kimenetelűvé [9]. A bőrreakciók (generalizált urticaria, angioedema) és a légzőszervi tünetek (laringeális ödéma, bronchus görcs, dyspnea) jelennek meg elsőként az anafilaxis során, de a kórlefordulás súlyosságát a keringési rendszeri manifesztációk szabják meg. Az anafilaxis kardiovaszkuláris tünetei a vérnyomásesés, szívritmuszavarok, kamrai diszfunkció súlyos esetben szívmegállást okozhatnak [7]. További kísérő tünetek lehetnek a hányinger és más gasztrointesztinális tünetek, görcsök, láz, ájulás.

A klasszikus anafilaxis patomechanizmusa az IgE mediált, azonnali típusú túlérzékenységi reakciónál leirtakkal egyezik meg. Az azonnali fázisban felszabaduló kimáz nagy részét a szívben található hízósejt szubpopuláció szekretálja [10]. A kimáz képes a szívben képződő angiotenzin I-et angiotenzin II-vé konvertálni, ezáltal lokálisan megnöveli a noradrenalin

termelődését [11]. Részben ez az adrenerg hiperaktivitás lehet felelős az anafilaxishoz társuló ritmuszavarokért, infarktusért és hirtelen szívhalálért [12]. Anafilaxiás betegek szérumban a PAF szintje emelkedett, és korrelál a reakció súlyosságával. A PAF-ot az LDL-hez asszociált acetil hidroláz inaktíválja. Az acetil hidroláz és a PAF szérumban koncentrációja között, továbbá az acetil hidroláz szint és az anafilaxis súlyossága között negatív korreláció áll fenn [13]. A PAF szintjének megemelkedése anafilaxisban a perifériás erek tágítása által súlyos vérnyomáseséshez [14], a trombociták aktiválásán keresztül disszeminált intravaszkuláris koagulációhoz vezet [15]. A hisztamin ritmuszavarokat és a koronária artériák görcsét okozhatja [16]. A hisztamin a szöveti faktor termelését is indukálja endotélsejteken és simaizomsejteken [17]. A szöveti faktor a X. véralvadási faktort aktiválja, mely trombin képződéshez vezet. Az endothélium a keringő hisztamin, PAF, leukotriének és TNF $\alpha$  hatására NO-t termel, mely az erek simaizomsejtjeit relaxálja, hozzájárulva az anafilaxiás vérnyomásesés kialakulásához [18]. A ritkán előforduló bifázisos vagy elhúzódó anafilaxisért a késői fázisú citokintermelés a felelős [7].

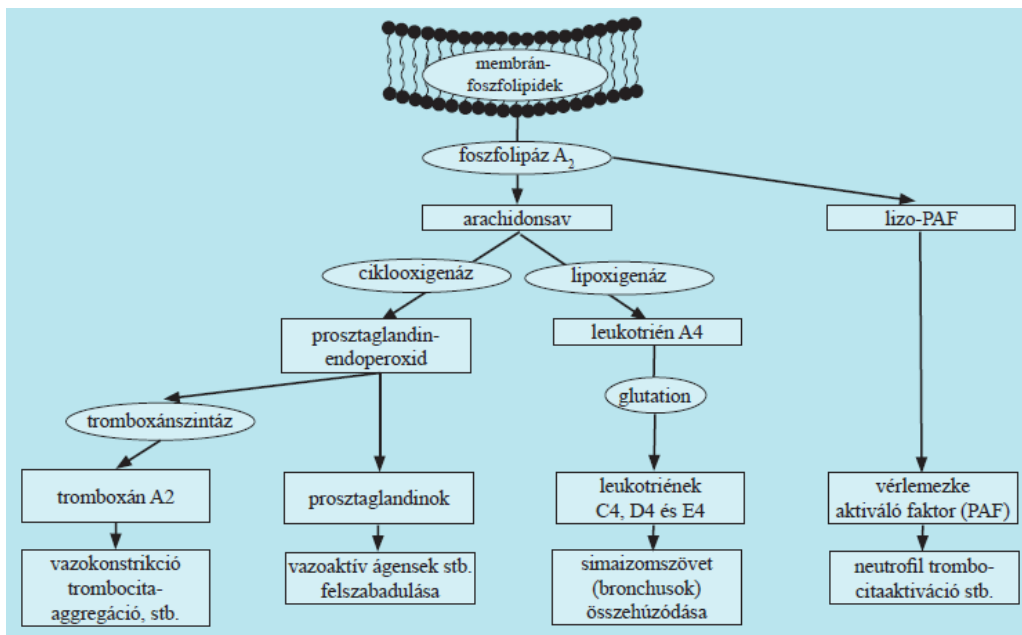
Az anafilaktoid reakciók klinikai kép tekintetében hasonlóak a klasszikus anafilaxiás reakciókhoz, azonban allergén specifikus IgE nem mutatható ki a beteg szervezetéből. Ebben az esetben a hízósejtek és bazofil granulociták más úton történő aktivációja áll a folyamat hátterében: a kiindulási lépés lehet a komplement rendszer aktivációja (2.2.2.1. fejezet), de léteznek állatkísérletekkel igazolt alternatív mechanizmusok is, melyek az IgG izotípusú ellenanyagok Fc $\gamma$ RIII-hoz kötődésén [19], immunkomplex képződésén, valamint T sejt, vérlemezke és/vagy makrofág aktiváción, illetve ezek kombinációján alapulnak [20,21].

### **2.2.2. A gyulladáshoz vezető folyamatok általános jellemzői**

A gyulladáshoz vezető folyamatok kezdeti lépése a lokálisan kialakuló trombocita aggregáció [22, 23], aminek következtében beindulnak a véralvadási és komplement aktiválódási (2.2.2.1. fejezet) folyamatok, a fagociták kemotaxisa és aktiválása, valamint a távolabbi ér endotélsejtek, tüdő epithélisejtek és fibroblasztok aktiválódása. Mindezek a folyamatok gyulladáshoz vezető citokinek (pl. TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, stb) és lipidmediátorok (leukotriének, prosztaglandinok, PAF, tromboxán, lsd. 2. ábra) termelődését váltják ki, amely lokálisan vazodilatációt, hiperémiát, és kapilláris permeabilitás növekedést okoznak [24, 25]. Mindezek a vaszkuláris változások segítik a plazmafehérjék kijutását a vérből az intersticiumba. A keletkező fehérjedús szövetnedvet hívjuk **exudatum**nak. A kötőszövetben bekövetkező

fehérje feldúsulás az ozmotikus nyomás növekedését eredményezi, ami vizenyőt és fájdalomérzetet vált ki.

A gyulladásos és az allergiás folyamatok közös jellemzője a hízósejtek és bazofil granulociták aktiválódása és annak következményeként a részben hasonló tünetek kialakulása: a granulomokban raktározott mediátorok (pl. hisztamin, bradikinin, triptáz, kimáz, karboxipeptidáz) a sejteken kívülre kerülnek, és a sejtmembránban zajló enzimatikus reakciók következtében lipidmediátorok (2. ábra) szabadulnak fel. A hisztamin értágító és permeabilitás növelő hatású, emellett bronchokonstriktiót okoz, valamint a thrombociták, hízósejtek és granulocitákra hat. A bradikinin a hisztaminhoz hasonló hatással bír, hozzá köthető a helyi fájdalomérzet kialakulása is.



2. ábra. Lipidmediátorok keletkezése gyulladásos sejtek membránjából.

A gyulladásos mediátorok szisztémás emelkedése **akut fázis reakció** kialakulását eredményezheti [26]. A szisztémás gyulladás jelei a láz, leukocita szám növekedése, glükokortikoid és adrenokortikotrop hormonok szintézisének fokozódása, a vas és cink mennyiségének csökkenése a vérben. Az akut fázis reakcióban felhalmozódó citokinek hatására bizonyos plazmafehérjék mennyisége nő, míg másoké csökken. Ezek az úgynevezett **akut fázis fehérjék**, melyeket a 4. Táblázat mutat be. A gyulladásos citokinek makrofágok és fibroblasztok proliferációját, valamint prosztoglandin és MMP termelést váltanak ki. A gyulladásos citokinek endotélsejteken és simaizomszöveteken az extravazációt segítő adhéziós

molekulák (ICAM, VCAM, integrin), prosztaglandin, IL-6, IL-8, GM-CSF és TNF termelését stimulálják.

**Krónikus gyulladás** esetén megfigyelhető a szövetekben a gyulladásoos sejtek (makrofágok, neutrofil granulociták, hízósejtek, fibroblasztok) akkumulációja, és az extracelluláris mátrix átépülése, illetve degradációja, mely a szöveti funkciók csökkenéséhez, súlyos esetben elvesztéséhez vezethetnek. Az odamigrált leukociták és egyéb sejtek által kibocsátott MMP-k, elasztázok és lizoszómális enzimek az extracelluláris mátrixból (pl. fibronektin, laminin) kemotaktikus hatású bomlástermékeket képeznek, mely tovább fokozza a szöveti sejt migrációt. A sejtek gyulladt szövetbe áramlását segíti elő az intenzív angiogenezis is (pl. asztmás bronchusokban), ugyanakkor a szöveti destrukció az erek számának csökkenését is járhat (pl. emphysemas típusú COPD-sek bronchusaiban) [27].

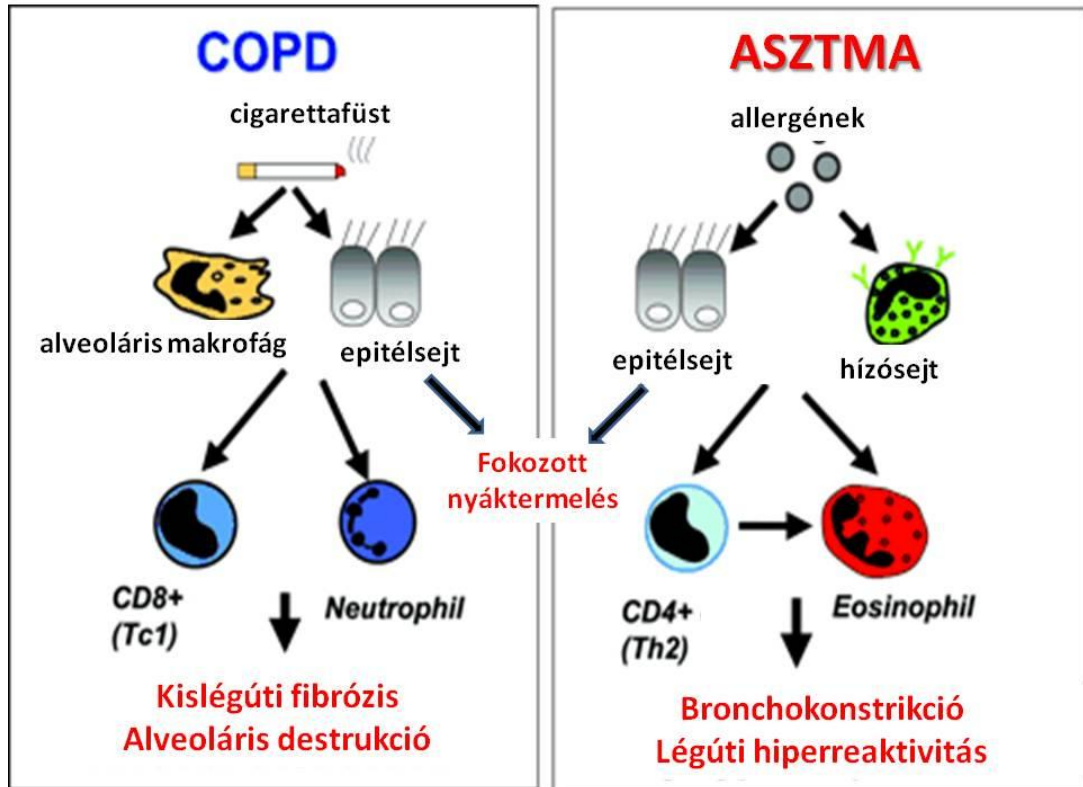
4. Táblázat: Szisztémás gyulladásban szerepet játszó akut fázis fehérjék [28].

Funkció	Név	Expresszió változás
Komplement fehérje	C3	Nő
	B faktor	Nő
	C1-inhibitor	Nő
	CRP	Nő
	MBL	Nő
	SAP, SAA	Nő
Véralvadási faktor	Fibrinogén	Nő
Proteáz inhibitor	$\alpha$ 2-makroglobulin	nő
	$\alpha$ 1-antitripszin	Nő
Gyökfogó	Dizmutáz	Nem változik (letális esetekben nő)
	Kataláz	Nem változik (letális esetekben nő)
Transzportfehérje	Albumin	Csökken
	Transzferrin	Csökken
	Cöruoplazmin	Nő

### 2.2.2.1. Ultrafinom részecskék szerepe gyulladással obstruktív tüdőbetegségek pathomechanizmusában

Míg a keringésbe jutó nanorészecskéknek akut immunreakciót kiváltó hatását ismerjük, a belélegzett nanorészecskék akut egészségügyi panaszok (tüdőbeteg akut exacerbációja) mellett krónikus gyulladással folyamatokat is okozhatnak. A nano- és mikroszemcsék viszonylag nagy méretüknek köszönhetően kilélegzéskor nem tudnak távozni, ezáltal lerakódnak a hörgők és alveolusok falában, ahonnan gyakran az immunrendszer sem képes eltávolítani őket [2.1. fejezet]. Az ily módon folyamatos immunaktivációt fenntartó pollen, poratka ürülék, állati verejtékcseppek, porszemcsék asztmát, a dohányfüst és egyes mesterséges vegyületek szemcséi COPD-t tudnak előidézni hosszú távon. A felhalmozódott immunogén anyagoktól a szervezet a gyulladás korai fázisában fokozott bronchiális váladéktermelés és ürítés útján próbál megszabadulni, miközben exudáció és visszatérő bronchusgörcsök figyelhetők meg. A krónikus gyulladás során a képződő mediátorok odavonzzák a különböző gyulladással sejteket, amik jellemzően eozinofil és/vagy neutrofil granulociták, makrofágok és limfociták [29]. Asztmában lehetnek eozinofil, neutrofil vagy mindkét sejttípus akkumulációja a bronchusokban, míg COPD-ben a neutrofil granulociták bronchiális túlsúlya dominál, mely mellett előfordulhat emelkedett eozinofilszám is [30, 31]. A krónikus stádiumban asztmában a hörgők fala alakul át struktúrállisan (simaizom hipertrofia mellett a bronchiális epithéllréteg károsodása figyelhető meg), COPD-ben pedig az alveolusokban figyelhető meg szerkezeti leépülés [32]. Az asztmás és COPD-s gyulladás során megfigyelhető strukturális különbségek kapcsolatba hozhatóak a betegségekhez kötődő ultrafinom részecskék méretkülönbségeivel, mivel az asztma pathomechanizmusában inkább a gyorsabban ülepedő mikrorészecskék játszanak szerepet, míg COPD-ben a lassabban ülepedő, ezért mélyebbre jutó nanorészecskék felelősek (1.ábra). Asztmában intenzív angiogenezis és következményes vérbőség jellemző, míg COPD-ben ez betegenként eltérő lehet attól függően, hogy emphysemás vagy bronchitises típusú betegségről van szó.





3. ábra: Az asztma és a COPD pathomechanizmusának vázlatos sémája. [32]

### **2.3. A komplement rendszer szerepe nanorészecskékkel szembeni immunreakciókban**

#### **2.3.1. A komplement rendszer működése**

A komplementrendszer egyike az immunrendszer elsőként aktiválódó elemeinek, képes a fertőzés bekövetkezésekor szinte azonnal működésbe lépni, és azonnali allergiás és/vagy gyulladáshoz vezető tüneteket kialakítani. Bár a komplement rendszer fő funkciójaként a patogének felismerését és eliminációját tartják [33,34], az utóbbi évtizedekben számos publikáció jelent meg a komplement rendszer immunológiai szabályozó szerepéről is: nem csak a humorális immunitáshoz járul hozzá [35], de a T sejt immunitást [36, 37], a természetes ellenanyagok képződését [38, 39], és a saját nukleáris antigénekkal (DNS, kromatin) szembeni toleranciát [40, 41] is befolyásolja. Az apoptotikus sejtek eltávolításában játszott szerepe fontos tényező a szöveti ontogenezis és homeosztázis fenntartásában [42,43].

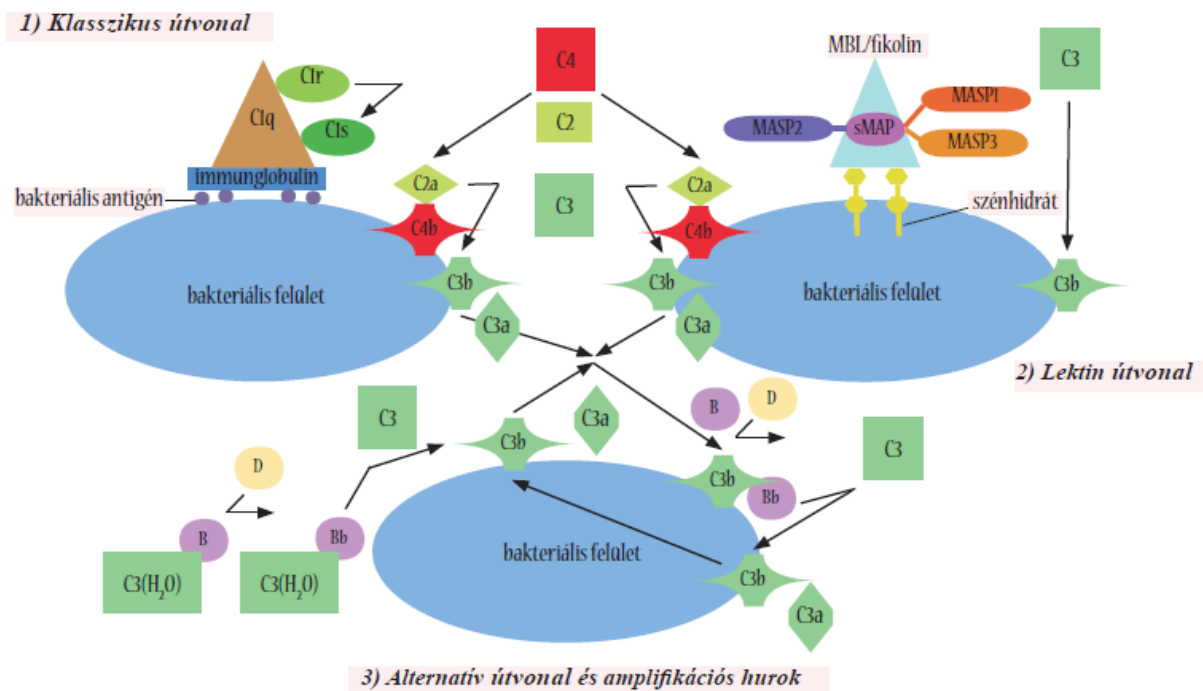
A szérumban található komplement fehérjék többségét a hepatociták termelik, de lokálisan fontos szerepe lehet az egyéb sejtek által előállított komplement komponenseknek is. A monociták, fibroblasztok, epitélsejtek és endotélseltek is képesek a legtöbb komplement komponens szintézisére [44]. Vannak extrahepatikusan képződő komplement fehérjék is, ilyen a C1q, a D faktor, és a C7 [45]. A C1q mRNS-e elsődlegesen a lép, a timusz, és a szív szöveti makrofágjaiban és epitélsejtjeiben expresszálódik [46]. A D faktor főként az adipocitákban termelődik.

A szolubilis komplement komponensek inaktív állapotú prekursor molekulaként vannak jelen a szérumban. Aktiváció hatására limitált proteolízisen alapuló enzimikus láncreakció jön létre, melynek során a prekursorok egy nagyobb "b" és egy kisebb "a" fragmentummá hasítódnak. A "b" fragmentumok általában a kaszkád továbbviteléhez szükségesek, míg az "a" fragmentumok a szöveti környezetbe diffundálva fejtik ki hatásukat. Mivel egy enzim számos prekuzort aktiválhat, és a keletkezett fragmentumokból újabb és újabb enzimkomplexek állhatnak össze, a kaszkád elemei megsokszorozódnak, és a reakció több ponton is felerősödhet. Ez biztosítja a komplementrendszer nagyfokú hatékonyságát.

A komplement kaszkád különböző útvonalakon aktiválódhat: a klasszikus útvonalon, a lektin útvonalon, és az alternatív útvonalon keresztül.

A klasszikus útvonalat elsődlegesen az antigénhez kötődött IgG és IgM komplexek indítják be, de más molekulák is képesek a klasszikus útvonal felismerő molekulájához, a C1q-hoz

kötődve aktivációt kiváltani. Ilyen tulajdonsággal bírnak többek között egyes polianionok (pl. LPS, DNS, RNS), egyes virális membrán komponensek, továbbá a CRP, a SAP és a mielin [47]. A C1q kötődése ezekhez az aktiváló molekulához a két hozzá asszociált szerin proteáz, a C1r és C1s aktiválódását okozza. Az aktivált C1s hasítja a C4-et és a C2-t, melyek hasítási termékei alkotják a klasszikus út C3 konvertázát (=C4b2a). A C3 konvertáz a C3-at hasítja, a keletkező C3b pedig hozzákötődik a C4b2a-hoz, és ezzel létrejön a klasszikus út C5 konvertáza (=C4b2a3b).



4. ábra: A komplementrendszer klasszikus, lektin és alternatív útvonalának aktivációja.

A lektin útvonalon keresztül történő komplement aktivációt az MBL és a fikolinok kötődése váltja ki. Ezek elsősorban különböző, bakteriális sejtfelszíneken található szénhidrát csoportokat ismernek fel [48]. A kötődés hatására az MBL-hez és fikolinokhoz asszociált MASP enzimek aktiválódnak. A MASP-2 hasítja a C4-et és a C2-t, létrehozva a klasszikus útonal közös C3 konvertázt, a C4b2a enzimet [49]. A MASP-1 a C3-at képes hasítani [50], lehetőséget adva a folyamat alternatív útvonalon keresztüli felerősödésére [51, 4. ábra].

Az MBL és a fikolinok a C1q-hoz hasonló homológ szerkezetek: mindhárom molekula olyan oligomer, mely 3-6 alegység virágcsokorszerű összefonódásával jön létre. Egy alegység 3 polipeptidből áll. A polipeptidek C-terminális végén található a felismerő helyeket tartalmazó globuláris fej, mely az N-terminális felé kollagénszerű régióban folytatódik. Ez a régió felelős

a polipeptidek trimerizációjáért, és a trimerek oligomerekké kapcsolódásáért. A molekulák nyaki része szerint proteáz enzimek dokkolására szolgál.

Míg a C1q kizárólag hexamer formában van jelen, az MBL-nek számos oligomer formája található meg humán szérumban. Ezek között a trimer, a tetramer, a pentamer és a hexamer forma a leggyakoribb, a legnagyobbak mérete a 300-650 kDa mérettartományba esik [52]. A humán fikolinoknak három típusa ismert: az L- és H-fikolinok májban termelődő szérumfehérjék, míg az M-fikolin leukociták felszínén és szekretoros granulumaiban mutatható ki [52,53]. Mindhárom típus képes a komplement rendszer aktivációjára a MASP-ok közvetítésével. A fikolinok normálisan tetramer formában vannak jelen, a leggyakoribb formájuk 420 kDa méretű [53].

Az alternatív útvonal az ún. „C3 tickover” mechanizmuson alapszik: a C3 vizes közegben spontán hidrolizálódhat, és az így keletkező C3H<sub>2</sub>O kikötődhet a sejt felszíni hidroxil- vagy amin csoportokhoz. A C3 spontán hidrolízise igen kis mértékű, a teljes C3 mennyiségnek csak kb. 1%-át érinti [54]. A szérumban lévő, szolubilis C3H<sub>2</sub>O inaktivációjáért a H- és I-faktor felelős [55]. A gazdasejt felszínéhez kötődő C3H<sub>2</sub>O-t az emlősejtek felszínén nagy mennyiségben található szialsav inaktiválja. A vírusok, baktériumok, élesztő- és tumorsejtek többsége azonban nem rendelkezik ezzel a szabályozó mechanizmussal, így ezek felszínén a C3H<sub>2</sub>O aktív marad és a reakció továbbfejlődik [56]. A C3H<sub>2</sub>O megköti a B faktort, amely így hasíthatóvá válik a konstitutíven aktív D faktor számára. A keletkező Bb a C3H<sub>2</sub>O-vel asszociációban marad és azt C3b-vé alakítja. Az így képződő C3bBb az alternatív útvonal C3 konvertáza, mely további C3 molekulákat képes C3b-vé alakítani, melyek a C3bBb-hez kötődve az alternatív C5 konvertázt hozzák létre (4. ábra). A C3bBb a properdin nevű fehérje kötődésének hatására stabilizálódik [57]. Az alternatív útvonalat a klasszikus vagy lektin úton képződő C3b is beindíthatja a B faktorhoz való kötődésén keresztül, ez az ún. „amplification loop” mechanizmus [34].

A klasszikus, a lektin és az alternatív útvonal egy közös terminális szakaszban folytatódik. A különböző úton létrejött C5 konvertázok hasítják a C5-öt, és az így keletkező C5b kötődik a C6-hoz és C7-hez. A C5b67 komplexen lévő hidrofób régiók lehetővé teszik, hogy a komplex a célsejt membránjába ékelődjön. A C5b67 reagál a C8-cal, majd a C5b678 komplexhez további 10-16 db C9 molekula kötődik, melyek asszociációja során egy kb. 10 nm átmérőjű pórust képződik [58]. A membránkárosító komplexnek (MAC) is nevezett C5b-9 nagy mennyiségű felhalmozódása a membránban végül a célsejt lízisét idézi elő. Ha a komplement aktiváció nem sejt felszínen jött létre, a szérumba kerülő C5b-7 és C5b-9 komplexekhez az S-

protein (más néven vitronektin) kötődik, így akadályozva meg, hogy a MAC a szervezet saját sejtjeihez kötődve azokat károsítsa.

**5. Táblázat: A komplement aktivációban szerepet játszó molekulák mérete [59].**

Név	Molekula méret [kDa]
Klasszikus út komplementfehérjei	
C1q	410
C1r, C1s	85
C1q(r2s2)	750
C4	210
C2	110
Klasszikus út aktivációjában részt vevő egyéb szérumfehérjék	
IgM	950
IgG	150
CRP	120
Lektin út komplement fehérjei	
MBL	300-650
MASP1, MASP2	85
MBL-MASP123 komplex	Kb. 810-1160
Fikolin	420
Fikolin-MASP123 komplex	Kb. 930
Alternatív út komplement fehérjei	
B faktor	93
D faktor	25
Properdin	220
Közös komponens	
C3	190
Terminális komponensek	
C5	190
C6	120
C7	110
C8	150
C9	70
Szolubilis szabályozó fehérjék	
C1 inhibitor	105
C4bp	560
H faktor	150
I faktor	90
S protein	85

Effektor funkcióval azonban nem csak a terminális C5b-9 komplex bír, hanem számos köztes komplement termék is. A C3a és a C5a termékek kis méretű, könnyen diffundáló polipeptidek, melyeket anafilatoxinnak is neveznek az allergiás gyulladás kiváltásában játszott szerepük miatt. Hatásukat a G fehérje kötő C3aR-on, illetve C5aR-on keresztül fejtik ki. Ezek számos sejt típuson megtalálhatóak, többek között simaizomsejteken, hízósejteken,

granulocitákon, monocitákon, makrofágokon, vérlemezkéken és idegsejteken is [60,61,62]. A C3a és C5a simaizom kontrakciót idéznek elő. A bazofil granulocitákhoz és hízósejtekhez kötődve a sejtek aktivációját okozzák, mely degranulációhoz vezet. A granulumból kiszabaduló hisztamin a simaizomokra hatva az erek permeabilitását fokozza, a szintén granulumban tárolt TNF $\alpha$  felszabadulása pedig adhéziós molekulák (E-, P-szelektin) sejt felszíni expressziójának fokozódását eredményezi az érendothélen [63]. A permeabilitás növekedése és az adhéziós molekulák felszaporodása az érfalon elősegítik a fagocitasejtek emigrációját. A C3a és C5a kemoattraktáns tulajdonságuk révén a granulocitákat, monocitákat, makrofágokat, és hízósejteket vonzanak a fertőzés helyszínére [45].

A C3b, és további hasítási termékei, az iC3b és C3d a kórokozó felszínéhez kötődve opsoninként viselkednek, azaz a makrofágok és neutrofil granulociták komplement receptoraihoz (CR1, CR3, CR4) kötődve fagocitózist váltanak ki [45]. A C3b és iC3b az immunkomplexek eltávolításában is fontos szerepet játszik: az C3-fragmentumokkal borított immunkomplexeket a vörösvértestek a rajtuk található CR1-en keresztül megkötik és elszállítják a májban és a lépben található makrofágokhoz [64]. A CR1 mintegy 70-80%-a a vörösvértesteken található.

A C3d-nek a humorális immunválasz kialakításában is fontos szerepe van: a C3d a B sejteken és folliculáris dendritikus sejteken található CR2 (=CD21) liganduma. B sejteken a CR2 ún. „ko-receptor komplexet” alkot a CD19-cel és CD81-gyel. A kórokozót a B sejtek antigénreceptora és a CR2 sok esetben egyidejűleg ismeri fel, előbbi az antigén determinánshoz, utóbbi a kórokozóhoz kötődött C3d-hez kapcsolódik. Az egyidejű kereszt-kötés csökkenti a B sejt aktiváció küszöbét, ami az antigénspecifikus ellenanyagok mennyiségének növekedését eredményezheti [65]. A folliculáris dendritikus sejtek a nyirokszervek csíráközpontjaiban a felszínükön található CR2 segítségével hosszú ideig visszatartják a C3d-vel borított antigéneket, fontos szerepet töltve be ezáltal a germinális centrum reakcióban és a memória B sejtek fenntartásában. Az antigén visszatartás alapvető fontosságú a magas titerű ellenanyag szint kialakításában és az immunológiai emlékezet előhívásában [66].

További komplement aktivációt gátló fehérjék a C1-inhibitor és  $\alpha$ 2-makroglobulin, melyek a klasszikus és lektin út szein proteázait gátolják. A klasszikus C3 konvertázt az I-faktor és a hozzá kötődő C4bp vagy CR1 vagy MCP, valamint a DAF gátolja, illetve bomlását gyorsítja. Az alternatív C3 konvertáz hatását gátolja szintén az I-faktor, de nem C4bp-hez kötve, hanem H-faktorhoz, és a DAF. A H faktor nemcsak az alternatív C3 konvertáz destabilizálásában vesz részt, hanem azáltal, hogy köt bizonyos sejt felszíni molekulákat, részt vesz az

apoptotikus sejtek clearance-ében, megvédi a saját sejteket a membránt érő komplement alapú támadásoktól, de ezt a tulajdonságát használják ki bizonyos patogének és ráksejtek is az immunrendszer előli elbújás során [67,68]. A MAC hatását és összeállítását gátolja az S-protein, MIRL, és HRF. A C3a-t és a C5a-t a karboxipeptidáz N inaktíválja tovább hasítás útján.

A komplement mediált gyulladási folyamatok számos patológias állapothoz kapcsolhatóak: nem csak az ischemia-reperfúzióban, szervkilökődésben, spontán vetelésben, autoimmun betegségekben (SLE, RA) és neurodegeneratív betegségekben (Alzheimer-, Parkinson-kór) játszanak szerepet [69, 70], de az allergiás kórképek bizonyos eseteiben is kulcsfontosságúak lehetnek.

### 2.3.2. Infúziós gyógyszerek által kiváltott komplement mediált pszeudoallergia

A káros gyógyszerreakcióknak két csoportját különböztetik meg: az „A” típusú reakciók előre jósolhatók, gyakoriak, és a gyógyszer farmakológiai hatásához köthetők, míg a „B” típusba az előre nem jósolható, nem gyakori és nem a farmakológiai hatással összefüggő reakciók sorolhatók. A káros gyógyszerreakciók többsége az A típusba tartozik. Tipikus példái a gyógyszer által kiváltott toxicitás, a mellékhatások, és a gyógyszer interakciók. A B típusba tartoznak a gyógyszer intolerancia, az idioszinkratikus reakciók és a hiperszenzitivitási reakciók [71]. Ez utóbbi az összes káros gyógyszerreakció 6-10%-át teszi ki, de egyes becslések szerint a gyógyszer allergiák prevalenciája a jövőben növekedni fog [72].

Sokszor a gyógyszer összetevőinek részecske mérete dönti el, hogy kivált-e immunológiai reakciót. A hagyományos, kis molekulájú gyógyszerek 500 Da-nál kisebbek [73], ezeket eredeti formájukban az immunrendszer képtelen felismerni. Ahhoz, hogy ezek a gyógyszer-molekulák immunogénné váljanak, nem csak nagyobb méretű komplexeket kell képezniük, hanem sikeres antigén bemutatáson és felismerésen kell átesniük. A nagyobb méretű gyógyszer-tartalmú komplexek képződése kis molekulájú hatóanyagokból több módon is létrejöhet: (1) kötődhetnek fehérjékhez, és okozhatnak közvetlenül szöveti károsodást, (2) kötődhetnek nukleinsavakhoz, ami megváltozott géntermék képződéséhez vezethet, (3) vagy a vízben gyengén oldódó gyógyszerek kiválhatnak nagyobb kristályok formájában [71,74].

A makromolekuláris gyógyszerek (hormonok, antitestek) biológiai természetüknél fogva immunogének. A nano-, ill. mikro tartományba (10-1.000 nm) eső részecskeméretű nanomedicinális gyógyszerek (liposzómák, mikrobuborékok, és egyéb nano-hordozók) mérete megegyezhet az immunrendszer által felismerhető kórokozók, vírusok és baktériumok méretével. Ezek kémiai összetétele és felszíni tulajdonságai nagymértékben meghatározzák, hogy az immunrendszer számára láthatatlanok maradnak-e, vagy felismerésre kerülnek és immunválaszt, vagy toleranciát váltanak-e ki.

A Coombs és Gell féle világos osztályozás ellenére a valóságban sokszor nehéz egy adott gyógyszerreakciót a négy típus valamelyikébe besorolni, mivel legtöbbször csak a reakció klinikai képe ismert, a mechanizmusról viszont ritkán áll rendelkezésre információ. A hiperszenzitivitási reakciók jelentős része nem IgE mediált folyamat, ezért ezeket az allergiától eltérően pszeudoallergiás reakcióknak is nevezik. Egyes felmérések szerint a pszeudoallergiás reakciók száma eléri az összes gyógyszer túlérzékenységi reakció 77 %-át [75]. Számos gyógyszer vált ki pszeudoallergiás reakciót, többek között egyes radiokontraszt anyagok, nem szteroid típusú gyulladáscsökkentők, analgetikumok, morfin és rovar mérgek,



liposzómák és micelláris oldószerek. Ezek közül a radiokontraszt anyagok, liposzómák és egyes micelláris oldószerek által kiváltott reakciók esetén bizonyítottá vált a komplement rendszer aktiválódása [76]. A 6. Táblázat 80 anafilaktoid reakciót okozó intravénás gyógyszert és diagnosztikumot mutat be, melyek közül legalább 25 esetében ismert, hogy a reakció komplement aktiváción alapul. További 15 gyógyszer esetében valószínűleg mind a komplementrendszer aktivációja, mind IgE mediált folyamatok szerepet játszanak a folyamat beindításában. A többi gyógyszer esetében még bizonyításra vár, hogy érintett-e a komplementrendszer a patomechanizmusban. A komplement aktiváción alapuló túlérzékenységi reakciók megjelenésére leggyakrabban a CARPA (Complement Activation Related PseudoAllergy) összefoglaló nevet használják [76].

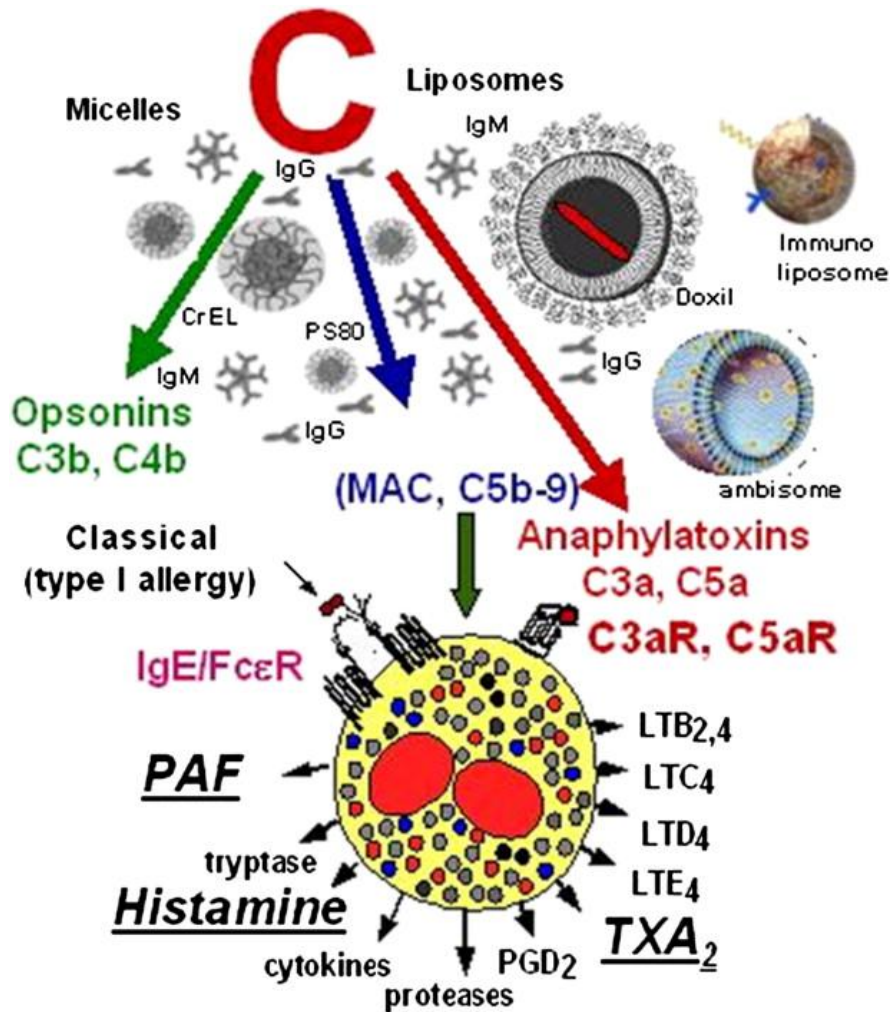
A CARPA legtöbb tünete megegyezik a klasszikus IgE mediált allergiáéval, úgy mint angiodéma, asztma, bronchokonstriktió, hidegrázás, fulladás, konjunktivitisz, köhögés, mellkasi fájdalom, dermatitisz, diaforézis, dispnoea, ödema, erythema, láz, fejfájás, vérnyomás változások, hypoxemia, hát és derékfájdalom, metabolikus acidózis, hányinger, pruritus, bőrkiütések, rhinitis, tüszögés, tachypnea, urticaria, esetenként keringési sokk és halál. Fontos különbség azonban, hogy a CARPA kialakulásához nincs szükség előzetes szenzitizációra, szemben az I. típusú túlérzékenységi reakcióval, mert már az első kezeléskor megjelennek a tünetek. Ismételt expozíció során a tünetek nem felerősödnek, hanem gyakran enyhébbé válnak vagy megszűnnek. A CARPA előfordulási aránya 3-45 % közé tehető gyógyszertől és premedikációtól függően, mely messze meghaladja az IgE mediált reakciók gyakoriságát, mely 2 % alatti [76].

## 6. Táblázat: Anafilaktoid reakciót okozó intravénás gyógyszerek

A gyógyszer által kiváltott reakció mechanizmusa:	Gyógyszer neve:
<i>Bizonyítottan CARPA</i>	1. <u>Liposzómába zárt gyógyszerek:</u> Abelcet, AmBisome, Amphotec, DaunoXome, Doxil/Caelyx, Myocet 2. <u>Micelláris vívőanyagban oldott gyógyszerek:</u> Taxol (paclitaxel), Taxotere (docetaxel) 3. <u>Radiokontraszt anyagok:</u> Acetriozone, Diatriozone, Magnevist, Ioxaglate (Hexabrix), Iodamide iodipamide, Iodixanol (Visipaque), Iohexol (Omnipaque), Iopamidol, Iopanoate, Iothalamate, Meglumin amidotriz, Melitraz, Metrizamide, Metrizoate (Isopaque 350), Iriombrast, Ultravist
<i>IgE+komplement aktiválás</i>	<u>Monoklonális antitestek:</u> Avastin, Bexxar, Campath, Erbitux, Herceptin, Mylotarg, Orenzia, Orthocione OKT3, Raptiva, Remicade, ReoPro, Rituxan, Synagis, Tysabri, Vectibix, Xolair <u>Kismolekulájú kemoterápiás szerek:</u> Alkeran, Blenoxane, Eposin, Methotrexate, Ptenaxis <u>Fehérjék/Peptidek:</u> Antivenin/CroFab/FabAV, Copaxone, Protamin-szulfát, Recludan, Trasylol, Vancocin <u>Plazmapótlók:</u> Dextrán, Hydroxethyl starch, Gelatin, Albumin
<i>mechanizmus ismeretlen</i>	<u>Enzimek:</u> Abbokinase (urokinase), Aldurazyme (Iaronidase), Alteplase (tissue plasmin activator), Cerezyme (imiglucerase), Elaprase (idursulfase), Elitek/Fasturtek (urate oxide), Eminase (anistreptase), Fabrazyme (agalactidase beta), Myozyme (aglucosidase alfa), Naglazyme (galsulfase), Retavase (reteplase), Streptase (streptokinase), Uricozyme <u>Egyéb kis molekulák:</u> Acetadote (acetylcysteine), Cancidas (caspofungin), Daktarin IV (miconazole), Diflucan IV (fluconazole), Ketoconazole, Uromitexan (mesna), Vfend (voriconazole) <u>Vitaminok és ásványok</u> Hidroxcobalamin (vit B12), vas-dextrán, vas-szukróz, Na-vas-glukonát, thiamine (vit B1)

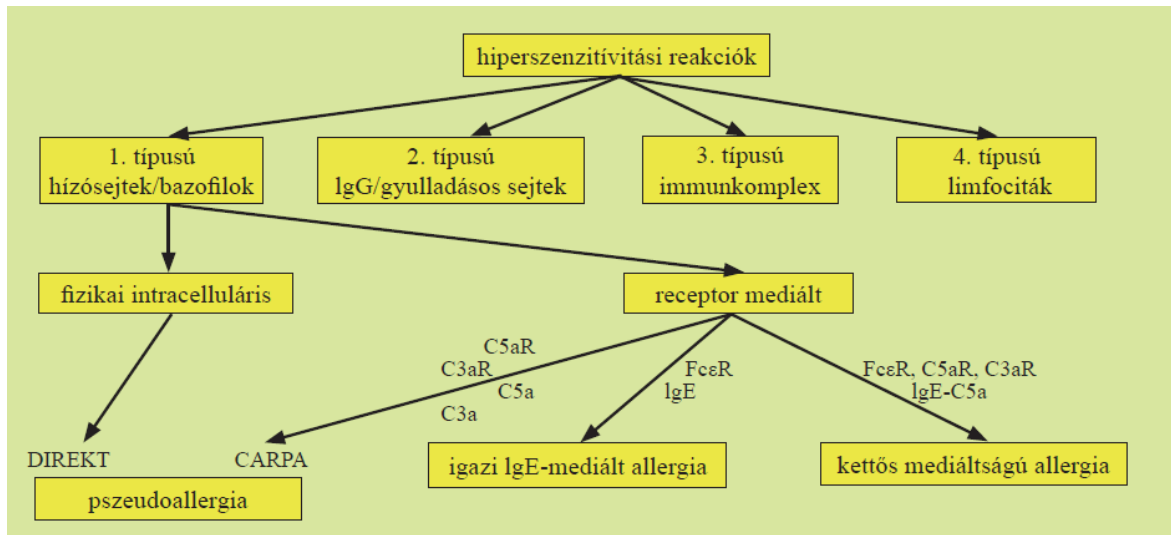
Az eltérő mechanizmus miatt, a hagyományos allergiát, vagyis az allergén és a sejtfelszíni specifikus IgE kölcsönhatását kimutató bőrpróbák a CARPA előrejelzésére nem alkalmasak. Jelenleg a klinikai gyakorlatban világszerte csak az anamnézis alapján becsülik meg a betegek gyógyszerekkel szembeni CARPA-érzékenységet, bár az illetékes amerikai felügyeleti szerv (FDA) ajánlásában 2002 óta szerepel a komplement tesztek alkalmazása a gyógyszerek pszeudoallergiás potenciáljának kimutatására [77]. A CARPA reakciókat az infúzió időbeni elnyújtásával, és aspecifikus premedikációval (antihisztaminok, szteroidok) próbálják megelőzni [78], de még így is számottevő az anafilaktoid reakciók kialakulásának gyakorisága. A már kialakult reakciók kezelése az infúzió leállításával, immunszuppresszánsok és/vagy antihisztamin adásával, illetve tüneti kezeléssel (szívmasszázs, adrenalin, elektrokonverzió) történik.

A CARPA patogenezise során az első lépés a gyógyszer vagy vívőanyaga által kiváltott komplement aktiváció. Az még nem ismert, hogy pontosan milyen felismerési mechanizmusok vehetnek részt a komplement rendszer aktiválásában: feltételezhető, hogy természetes ellenanyagok kötődése váltja ki a klasszikus útvonal aktiválódását, vagy valamelyik mintázat felismerő receptor közvetíti a hatást. Bizonyos esetekben lehetőség kínálkozik a C3 fehérje kötődésre és az alternatív útvonal beindulására is, mivel ehhez egyes gyógyszer formulációk megfelelő méretű és tulajdonságú felszín biztosíthatnak, melyet nem borítanak a szervezet saját sejtjeire jellemző komplement gátló struktúrák. Radiokontraszt anyagok esetében leírták a klasszikus és az alternatív útvonal aktiválódását is [79, 80], valamint nem szokványos mechanizmusokat is, mint a H és I faktor gátlása [79], és a C4, C3 tioszter kötéseivel való közvetlen interakció [81]. A komplement aktiváció során keletkező C3a és C5a a hízósejtek, bazofil granulociták, trombociták és más sejtek C3aR-aihoz és C5aR-aihoz kötődnek [61]. A hízósejtek és bazofil granulociták anafilatoxin R-okon keresztüli aktivációja során nagyrészt ugyanazok a mediátorok szabadulnak fel, mint az IgE/FcεRI-en keresztüli aktiváció következtében [82-84], (5. ábra), ezért a hatások és tünetek is hasonlóak az I. típusú túlérzékenységi reakciókhoz (2.2.1. fejezet).



5. ábra: A CARPA feltételezett patomechanizmusa [85]

A CARPA a túlérzékenységi reakciók Coombs és Gell által definiált négy típusának egyikébe sem sorolható, bár patomechanizmusa alapján az I. típusú reakciókhoz áll legközelebb. A különböző pseudoallergiák leírása óta több próbálkozás is született a hiperszenzitivitási reakciók minden válfajának besorolására alkalmas rendszer felállítására: a Descotes és Choquet-Kastylevsky által felállított 3 kategória a pseudoallergia, az Ig-mediált, és sejtmediált túlérzékenységi reakció [86], míg Aronson és Ferner időkinetika, dóziszfüggés és fogékonyság alapján csoportosították a túlérzékenységi reakciókat [87]. Szebeni továbbfejlesztve Coombs és Gell rendszerét az I. típusú túlérzékenységi reakción belül a következő alcsoportok megkülönböztetését javasolta: (1) közvetlen fizikai okok miatt bekövetkező hízósejt és bazofil aktiváció, (2) receptor közvetített aktiváció; ezen belül (2a) IgE által kiváltott FcεRI-en keresztüli aktiváció, (2b) anafilatoxinok által kiváltott C3a/C5aR közvetített aktiváció, (2c) kevert (IgE és komplement mediált) reakció [6. ábra].



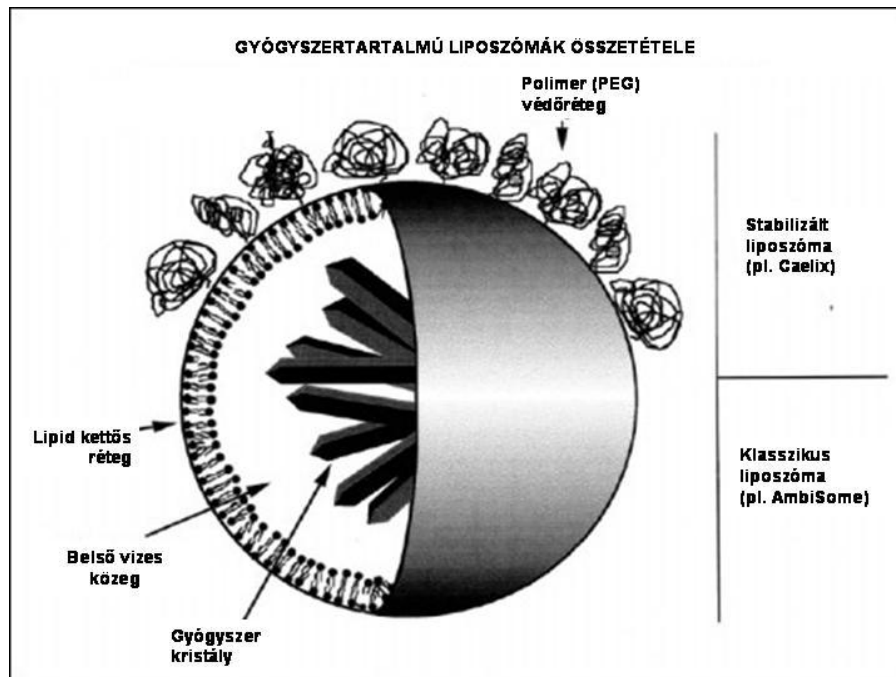
6. ábra: A CARPA helye a túlérzékenységi reakciók rendszerében.

### 2.3.2.1. Liposzómális gyógyszerek által kiváltott komplement mediált pszeudoallergia

A liposzómák a gyógyszer vívőanyagok új generációját képviselik, szerkezetileg gömb alakú foszfolipid membrán kettősrétegek. Foszfolipidek vizes oldatában spontán is képződnek, magukba zárva az őket körülvevő közeg egy részét. A liposzóma membrán külső és belső felülete, valamint a liposzóma belső tere hidrophil, a kettősmembrán belseje viszont lipofil. Ennek eredményeképp a liposzóma képes megtartani és szállítani hidrophil és lipofil anyagokat egyaránt: a vízdékony anyagokat a belső vizes térben (pl. doxorubicint a Caelyx és Doxil esetében), míg a zsírdékony hatóanyagokat membránban oldva (pl. amphotericin-B-t az AmBisome esetében) (7. ábra). A jelenleg forgalomban lévő liposzómális gyógyszerek listáját a 7. táblázat mutatja be.

A liposzómába zárt gyógyszerek számos tulajdonságuk tekintetében előnyösebbek a szabad hatóanyagot tartalmazó gyógyszereknél. Így például farmakokinetikai tulajdonságaik és terápiás indexük kedvezőbb lehet, kiküszöbölik egyes hatóanyagok oldékonysági problémáit, és képesek lehetnek a hatóanyagot irányítottan a célszövetekbe juttatni. Ez utóbbi tulajdonságuk abból ered, hogy 50-200 nm-es méretüknél fogva a normál érfalon nem jutnak át, viszont a tumoros, hypoxiás, vagy gyulladt területeken jellemző endotél szokásosnál nagyobb átmérőjű fenestrumain keresztül kijuthatnak a környező szövetbe [88, 89]. Ennek köszönhetően a hatóanyag koncentrációja a célterületen magasabb, máshol viszont elenyésző a hagyományos gyógyszerformulációkhoz képest. A célszövetekben a sejtek a liposzómákat

kaveoláris transzport útján veszik fel, így a hatóanyag hatását közvetlenül a célsejtek belsejében fejtheti ki. Emiatt kevesebb a mellékhatás, jobb a terápiás hatékonyság, és rendszerint a gyógyszeres kezelés gyakorisága is csökkenthető. A célsejtekhez való eljutást tovább fokozható azzal, ha a liposzóma membránba a célsejtekre specifikus ellenanyagot, vagy más targeting fehérjéket/peptideket (pl. TAT fehérje) építenek be.



**7. ábra: Gyógyszer tartalmú liposzómák szerkezete: klasszikus és stabilizált liposzóma.**

A liposzómák rendkívül heterogének lipid összetétel, felszíni töltés és méret tekintetében. A hagyományos, „klasszikus” liposzómák felszíni töltése jelentős a módosítatlan foszfolipid származékok poláros csoportjai miatt, melyeket a stabilitás fokozása érdekében alkalmaznak. Ezek a nagy felületű, anionos vagy kationos felszínek igen jól opsonizálódnak részben komplement komponensek által, elősegítve a gyors fagocitózist és lebontást a vérkeringésben [90]. Kutatások sora mutatta ki, hogy az erős felszíni töltés [91], a nagy méret és polidiszperzitás [92], és a magas (>45%) koleszterol tartalom [93] növelik a liposzómák komplement aktiváló képességét. A komplement aktiváló képességgel összefüggésbe hozható, hogy a klasszikus liposzómákat tartalmazó AmBisome [94,95], Abelcet [95], és DaunoXome [96, 97] betegekben való alkalmazása során valamennyi esetben leírták a CARPA-ra jellemző tünetek, (2.3.2. fejezet), hiperszenzitivitási reakciók nagy gyakoriságát.

**7. Táblázat: A jelenleg forgalomban lévő, intravénásan alkalmazott liposzómális gyógyszerek, és CARPA-ban való érintettségük.**

Név	Hatóanyag	Felhasználási terület	CARPA-ra utaló hiperszenzitivitási reakció
Doxil	Doxorubicin	Tumor	+ [98]
Caelyx			+ [99]
Myocet			?
DaunoXome	Daunorubicin	Tumor	+ [96, 97]
DepoCyt	Cytarabin	Tumor	+
AmBisome	Amphotericin B	Szisztémás gombafertőzések	+ [93, 94, 95]
Abelcet			+ [95]
Amphotec			+ [95]
Epaxal	Inaktivált HAV	Hepatitis A	?
Visudyne	Verteporfin	Időskori macula degeneráció	?

A hosszabb keringési idő és az extravaszkuláris célpontok elérése érdekében fejlesztették ki az ún. lopakodó vagy „stealth” liposzómákat [7. ábra]. Ezek felszínét polietilén-glikol (PEG) burok veszi körül, melyet egy pegilált foszfolipid komponens biztosít. A pegiláció csökkenti a felszíni töltést, ezáltal véd az opsonizáció és a keringésben történő gyors elimináció ellen [100]. Az ilyen típusú liposzómák keringési féléletideje 55 óra emberben. A keringésben lévő hatóanyag mindenkori mennyiségének több, mint 90%-a a liposzómába zárva tartózkodik a keringési rendszerben [101]. Ilyen pegilált liposzómákat tartalmaz a Doxil és a Caelyx. Bár farmakológiailag a pegiláció kedvező hatású, a stabilizált liposzómák alkalmazása során is előfordulnak CARPA-ra utaló hiperszenzitivitási reakciók [98, 99]. Mivel a szabad doxorubicin alkalmazása során infúziós reakciók előfordulása nem ismert, nagy valószínűséggel a Doxil/Caelyx esetében tapasztalt reakciókat a liposzómális alkotórész váltja ki.

### 2.3.2.2. Micelláris gyógyszer emulgeátorok által kiváltott komplement mediált pszeudoallergia

A megfelelő gyógyszerformuláció kiválasztása fontos lépés egy gyógyszer kifejlesztésekor. Az intravénás formulálás számos hátránya mellett előnye, hogy ritkábbak a gasztrointesztinális mellékhatások, azonnal hatni kezd, és van lehetőség a kezelési dózis megváltoztatására vagy akár az infúzió felfüggesztésére is. Az intravénásan beadott gyógyszerek biológiailag elérhetősége közel 100%-os, az adszorpciós veszteségek elhanyagolhatók szemben más adminisztrációs útvonalakkal. A legtöbb rákellenes gyógyszer esetében ezt a lehetőséget választják a gyógyszerfejlesztők, annak ellenére, hogy az intravénás alkalmazás veszélyeket is rejthet magában (pl. katéter környéki fertőződés, trombózis és extravazáció) [102].

Intravénás adagolású gyógyszerekkel szemben alapvető követelmény, hogy vízben jól oldódjanak, hiszen a vérben kicsapódó kristályok a hajszálerek elzáródását és különböző toxikus hatásokat okozhatnak. Vízben gyengén oldódó hatóanyagok oldékonyságát többféleképpen is lehet növelni: pl. kolloidális rendszerbe építés, gyógyszer előalak kifejlesztése, vagy szolubilizáció által. A kolloidális rendszerek, mint pl. az emulziók, liposzómák, fullerének, karboncsövek, mikrogömbök és egyéb hordozók megvédhetik a hatóanyagot a keringésben az idő előtti degradációtól vagy inaktivációtól. A gyógyszer előalakokból spontán degradáció vagy enzimatis hasítás hatására jönnek létre az aktív gyógyszeralakok. A szolubilizáció további oldószerek (pl. etanol, glicerol) vagy felületaktív anyagok hozzáadásával történik.

A felületaktív anyagok –vagy más néven detergens- olyan molekulákat tartalmaznak, melyek hidrofil feji résszel és lipofil farki résszel rendelkeznek. Ezek a molekulák amfifil tulajdonságuknak köszönhetően oldatban aggregálódnak, és ha mennyiségük eléri a kritikus micella koncentrációt, 50-100 molekulából álló micellát képeznek. A hidrofil feji rész tulajdonságai alapján megkülönböztetünk amfoter (pl. lecitin, zselatin), ionos (pl. zsírsavak Na-sói, SDS) és nem ionos (pl. Cremophor EL, Tween-ek, Nonidet, Pluronic, Saponin, Thesit) detergenset.

A Poliszorbát vagy más néven Tween vegyületcsalád tagjai olyan nemionos felületaktív anyagok, melyek lipofil részét a szorbitán zsírsavakkal alkotott észtere képezi, hidrofil része a



szorbitánhoz kötött etilén oxid polimerekből áll. Számozásuk a zsírsav fajtájából és a polioxietilén lánc hosszából adódó különbségekre utal. A lipofil csoport a Tween 80 esetében a telítetlen kötést tartalmazó, 18 szénatomos olajsav észtere, míg a Tween 20-at telített, 12 szénatomos laurát alkotja (12. táblázat).

A Cremophor EL szintén nemionos felületaktív anyag, ricinusolaj és etilén-oxid 1:35 molarányú keverékének reakciója során keletkezik. A ricinusolajat a Ricinus communisból nyerik, és főként ricinusolajsav és izoricinusolajsav gliceridjei alkotják. Fő komponense a glicerol-PEG-ricinoleát, amely a PEG zsírsavészterével együtt alkotja a hidrofób részt (12. táblázat). A ricinusolajsav a Tween 80-ban található olajsavtól mindössze annyiban különbözik, hogy az olajsavhoz viszonyítva egy extra hidroxilcsoportot tartalmaz (12. táblázat). A Cremophor EL kisebbik, hidrofil része PEG-t és etoxilált glicerolt tartalmaz.

A 8. táblázatban foglaltuk össze a fenti gyógyszer oldószerként is használatos felületaktív anyag néhány jellemző fizikai-kémiai tulajdonságát.

**8. Táblázat: A Tween 80, Tween 20 és a Cremophor EL fontosabb fizikai-kémiai tulajdonságai.**

	Cremophor EL	Tween 20	Tween 80
Molekulásúly	2560	1228	1310
Kritikus micella koncentráció [mM]	0,02	0,06	0,012
Sűrűség [g/ml]	1,05-1,06	1,095	1,07
Viszkozitás [cps]	700-800	250-450	400-620

A Cremophor EL számos intravénás gyógyszer alkotóeleme: nem csak rákellenes gyógyszerekben található meg, hanem többek között altatókban, nyugtatókban és immunszuppresszánsokban is (

**9. Táblázat).** Ezeknél a gyógyszereknél az egy infúzióval bevitt Cremophor EL mennyisége átlagosan 5 mL/m<sup>2</sup>. Ez alól kivételt képez a paclitaxel, mivel ennek alkalmazása során jóval nagyobb mennyiségű, kb. 26 mL/m<sup>2</sup> Cremophor EL jut a szervezetbe.

**9. Táblázat: Cremophor EL tartalmú intravénás gyógyszerek [103].**

Gyógyszer neve	Felhasználási terület	Szervezetbe jutó Cremophor EL/ infúzió [mL/m <sup>2</sup> ]
Aplidine	Kemoterapeutikum	1,5
Clanfenu	Kemoterapeutikum	10,3
Cyclosporin A	Immunszuppresszáns	3,5
Diazepam	Nyugtató	1,5
Didemnin B	Kemoterapeutikum	2,0
Paclitaxel	Kemoterapeutikum	25,8
Propofol	Altató	7,0
Teniposide	Kemoterapeutikum	1,5

Az antitumor aktivitást mutató paclitaxel hatóanyagot a *Taxus brevifolia* etanolos kivonatából izolálták [104], de mivel vízben oldhatatlan, formulálása hosszú ideig megoldatlan volt. Az elsőként forgalomba kerülő taxol típusú gyógyszerben, a Taxolban a paclitaxelt Cremophor EL és etanol 1:1 arányú keverékében oldották (30mg paclitaxel/5ml oldószer kiszerelesben). A Taxolról hamar kiderült, hogy akut hiperszenzitivitási reakciót képes kiváltani, mely főként vérnyomáseséssel, dyspnoeával, bőrkiütésekkel, hasi és mellkasi fájdalmakkal jár [105]. Az ennek kivédésére bevezetett premedikáció (nagy dózisú kortikoszteroidok, H1 és H2 antagonisták) alkalmazásának ellenére is a betegek 41-44%-ánál előfordultak enyhe anafilaktoid tünetek (bőrkiütés, hidegrázás), a betegek 1,5-3%-ánál súlyos, életveszélyes, esetenként halálos kimenetelű reakció alakult ki [106, 107]. A paclitaxel alkalmazása során kialakuló hiperszenzitivitási reakciók zömmel az első vagy második infúzió alatt fordulnak elő, és az infúzió átfolyási sebességének csökkentésével sok esetben megszüntethetőek. Ez arra utal, hogy a reakció nem IgE-mediált módon zajlik, és a bazofil granulociták és hízósejtek degranulációján alapulhat [108].

A Cremophor EL szerepét vetették fel azok a közlemények, melyek a Paclitaxelhez hasonló klinikai képet mutató hiperszenzitivitási reakciókról számoltak be más Cremophor EL tartalmú gyógyszerek esetén is (teniposide: [109], cyclosporin A: [110], diazepam [111]). Már az 1970-es években megjelentek publikációk, melyek Cremophor EL tartalmú gyógyszerek (Althesin, Stesolid MR) in vivo C3 aktiváló képességét mutatták ki [111, 112]. Az első direkt bizonyíték a Cremophor EL komplement aktiváló hatására egy olyan kísérletsorozat volt,

melyben mind a Paclitaxel, mind az oldószer önmagában (Cremophor EL és etanol 1:1 arányú keveréke) szignifikáns SC5b-9 szint emelkedést váltott ki egészséges és tumorbeteg donorok szérumában egyaránt, míg az etanol önmagában a terminális komplex képződést nem befolyásolta [113]. Más in vitro vizsgálatok a Cremophor EL komplement aktiváló hatásának dóziszfüggését mutatták ki, és azt is megállapították, hogy a legkisebb, még aktiváló hatású Cremophor EL koncentráció (0,2%) beleesik a paclitaxel standard adagolásakor a betegek plazmájában létrejövő Cremophor EL koncentráció tartományába [114]. A cyclosporin A infúzióval kapcsolatosan figyelték meg azt a problémát, hogy az infúziós üvegben a Cremophor EL leülepszik, és ha nem keverik össze az oldatot megfelelően az infúzió megkezdése előtt, a beteg szervezete a szokásosnál magasabb Cremophor EL koncentrációval találkozik, és ez vezethet a hiperszenzitivitási reakció kialakulásához [115]. Azok a betegek, akik az intravénás cyclosporin A-ra allergiások voltak, a Cremophor EL-mentes orális változatot jól tolerálták [116]. A Cremophor EL orális adagolású gyógyszerek alkotórészeként nem okoz allergiás tüneteket, mivel a bélrendszerben az emésztőenzimek lebontják, és ezért eredeti formájában nem jut át a vérkeringésbe [117].

A Cremophor EL nem kívánatos hatásai miatt a következő taxol típusú gyógyszert, a Taxotere-t (docetaxel) úgy fejlesztették ki, hogy a hatóanyagot ne Cremophor EL segítségével tegyék vízben oldhatóvá, hanem Tween 80-nal (80mg docetaxel/2ml Tween 80 kiszerezésben). A Tween 80 megtalálható más intravénás gyógyszerekben is (10. Táblázat).

#### 10. Táblázat: Tween 80 tartalmú intravénás gyógyszerek [118].

Gyógyszer neve	Felhasználási terület
Adozelesin	Kemoterapeutikum
Amiodarone	Antiarrhythmias szer
Bizelesin	Kemoterapeutikum
Carzelesin	Kemoterapeutikum
Etoposide	Kemoterapeutikum
Taxotere	Kemoterapeutikum

A Tween 80 tartalmú Taxotere esetében is előfordulnak azonban súlyos anafilaktoid reakciók, melyek klinikai kép és gyakoriság tekintetében közel azonosak a paclitaxel által okozott reakciókéval [119, 120]. Kutya kísérletekben bizonyították, hogy a Cremophor EL által kiváltott hisztamin felszabadulás a detergens olajsav tartalmának köszönhető [121]. Az

olajsav a Tween 80-ban is megtalálható, és ezért egyes közlemények szerint a docetaxel terápia során kialakuló hiperszenzitivitási reakciókért is felelős lehet [108]. A hiperszenzitivitási reakciók nem IgE-mediált voltát támasztja alá az a megfigyelés is, mely szerint docetaxellel kezelt, túlérzékenységi reakciót adó betegek plazmájában nem mutatható ki emelkedett hisztamin és szérum triptáz szint [122].

A Cremophor EL-ről több kutatócsoport is bizonyította, hogy aktiválja a komplementrendszer, a Tween 80-nal kapcsolatban azonban mindezidáig nem láttak napvilágot erre vonatkozó kutatási eredmények.

### 2.3.3. A komplement rendszer szerepe asztmában és COPD-ben

A komplement rendszer aktív részese a gyulladási folyamatok hajtóerőinek, mégis gyulladási tüdőbetegségeknél a komplementek szerepét csak kevesen vizsgálták. Az alternatív és a lektin útvonal felismerő struktúrái nagy valószínűséggel képesek kötődni az asztmában szerepet játszó ultrafinom részecskék felszínéhez, míg a klasszikus úton való aktiválódás kevésbé valószínű, mivel az IgE molekulák nem kötik a komplementeket [123]. Az asztmát indukálni képes mikro részecskék közül a Dermatophagoides fajok proteázairól, az Aspergillus fumigatus és a parlagfű kivonatról mutatták ki, hogy C3a és C5a képződést váltanak ki [124, 125]. A dohányfüst közvetlenül a C3-at hasítja, és hoz létre aktív komplement komponensből [126]. Az asztmás szövetekben fellelhető aktivált hízósejtek és más gyulladási sejtek által kibocsátott proteázok (pl. tripszin, trombin, elasztáz, tripszáz) szintén képesek a C3 és a C5 közvetlen hasítására [123, 127].

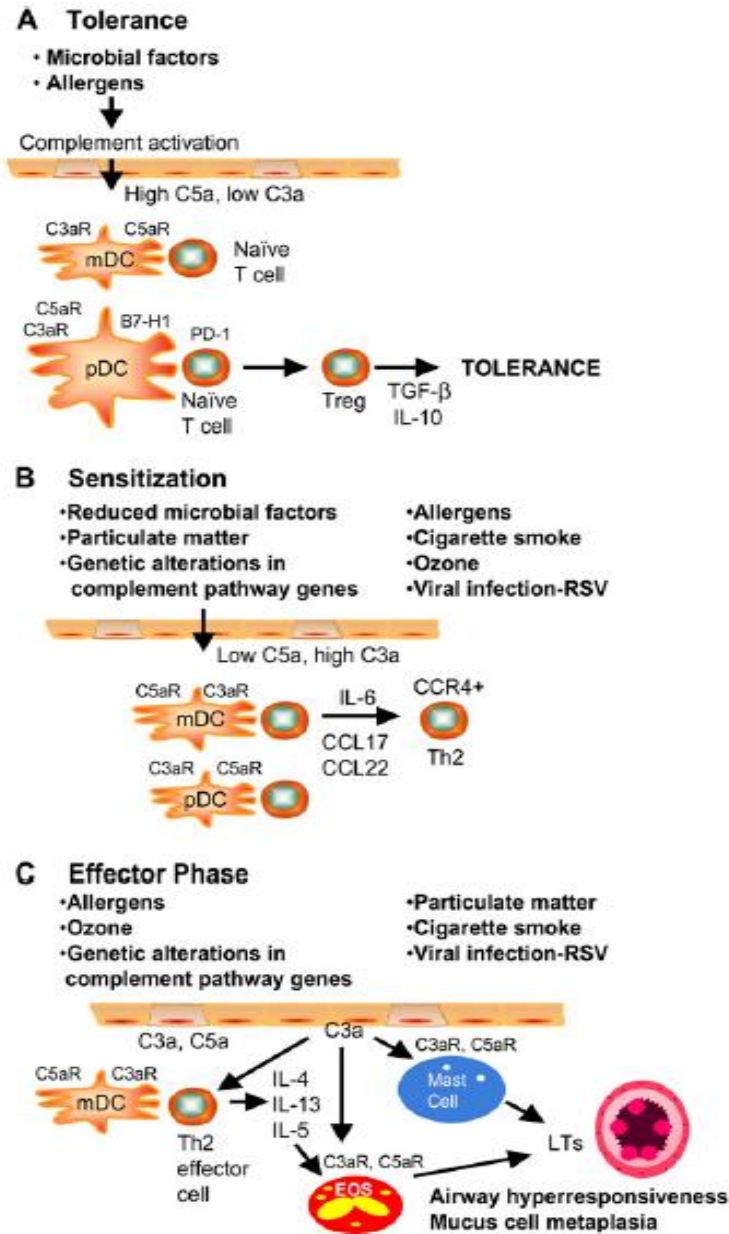
A komplement aktivációs termékek nemcsak a gyulladási sejtek toborzásában és aktivációjában vehetnek részt, hanem az asztmában és COPD-ben létrejövő légúti obstrukció következtében kialakuló hipoxia okozta szöveti destrukcióban is szerepük van [128]. A C3a és C5a emelkedett szintjét nemcsak plazmában [129], hanem BAL-ban [130] és a C5a emelkedett szintjét köpetben [131] is kimutatták asztmában. A C3a és C5a plazma szintje és az asztma terápia hatékonysága valamint a betegség aktivitása között találtak összefüggést is [132]. COPD-ben mind a plazma, mind a köpet C5a koncentrációit emelkedettnek találták, mely akut exacerbáció alatt további emelkedést mutatott [133]. A köpetben mérhető C3a szintekkel kapcsolatban ellentmondásosak az adatok a szakirodalomban [11. táblázat].

#### 11. Táblázat. C3a és C5a szintek változásai asztmában és COPD-ben.

	C3a		C5a	
	lokális	szisztémás	lokális	szisztémás
Asztma	- [131] ↑ [130]	↑ [129]	↑ [130, 131]	nincs adat
stabil COPD	↑ [133] - [131]	- [133]	↑ [133] ↑ [131]	↑ [133]
COPD exacerbáció	↑ [133]	- [133]	↑↑ [133]	↑ [133]

A komplement rendszernek kettős szerepet tulajdonítanak az asztma pathomechanizmusában. Egészségesek tüdejében megfigyelhető a mucosában a C5aR alacsony szintű aktivációja, mely feltehetőleg az inhalációs tolerancia fenntartásában játszhat szerepet [134]. Ebben a plazmacitoid dendritikus sejtek szerepét tartják fontosnak, minthogy a naív T sejtek Treg sejtekké alakulását képesek facilitálni [135]. A Treg sejtek citokintermelése (TGF $\beta$ , IL-10) tolerancia irányában hat az immunsejteket. Állatkísérletek alapján az asztma szenzitizációs fázisában a C5aR helyett főleg a C3aR-on keresztül kapnak aktivációs szignált a dendritikus sejtek, amire a mieloid dendritikus sejtek olyan kostimulációs molekulák expressziójával válaszolnak, amik a Th2 sejtek érését segítik. Az asztma kialakulása során a plazmacitoid dendritikus sejteken a C5aR-ok száma lecsökken. Visszatérő vagy folyamatos inger (allergének, cigarettafüst, fertőzések) hatására mind a C3aR, mind a C5aR-on keresztül az odavándorolt granulociták és hízósejtek aktivációja és degranulációja zajlik, melyet a Th2 effektor sejtek IL-4, IL-5, IL-13 termeléssel támogatnak [136]. Ez az asztma effektor fázisa, melyben egyes megfigyelések szerint a C3aR és C5aR-on keresztüli szignalizáció szinergisztikus.

Embereken végzett gyógyszerkísérletek közül a C5 blokkolása anti-C5 ellenanyaggal (eculizumab) bizonyult sikeresnek, mivel hatékonyan csökkentette az enyhe asztmában szenvedő betegek allergén-indukált légúti reakcióit [137].



**8. ábra: A komplementrendszer szerepe az asztma különböző fázisaiban.** mDC: mieloid dendritikus sejt, pDC: plazmacitoid dendritikus sejt, EOS: eozinofil granulocita. (Reprinted with permission of the American Thoracic Society. Copyright © 2013 American Thoracic Society. [123])

COPD-ben és dohányos asztmásokban fontos szerepe lehet annak, hogy már az 1980-as években kimutatták a cigarettafüsttel kezelt szérumokban in vitro komplement aktivációt. A properdin, B faktor és C3 hasadása az alternatív útvonal direkt érintettségét mutatják. A cigarettafüsttel kezelt szérum szignifikánsan több neutrofil és monocitát vonzott, mint a



normál humán szérumban [138]. A cigarettafüst emberi bronchiális epithélszöveteken növeli a C5aR expresszióját és válaszképességét [139]. Viszont maga a C5a szintje nem bizonyult emelkedettnek egészséges dohányosok szérumaiban [133, 140]. Ezzel szemben COPD-s szérumban tömegspektrometriás analízisével 10 komplement fehérjét azonosítottak (C1s, C3, C4B, C5, C6, S-protein és az alternatív útvonal alábbi fehérjéi: B faktor, D faktor, H faktor, I faktor), amelyek szintje eltért a lassan és gyorsan progresszív betegekben [141]. A B faktor deficiens egerek védettnek bizonyultak a légúti hiperreaktivitással szemben egér asztma modellben, jelentős szerepet feltételezve az alternatív útvonalnak az asztma kialakulásának korai fázisában [142]. Az alternatív útvonal szabályozó fehérjéjének, a H faktornak a szerepét kevésbé vizsgálták gyulladásos tüdőbetegségekből, pedig nemcsak az alternatív úton aktiválódó komplementeket bontja, hanem fontos eleme a saját sejtek krónikus gyulladással szembeni védekezésének [67], és szerepet játszik légúti patogének immunválasz előli elbűrésében [68]. A H faktor mindezen funkciói fontossá tehetik mind az asztma, mind a COPD patomechanizmusában.

### 3. CÉLKITŰZÉSEK

A szervezetbe jutó nanorészecskék a vérben akut nem IgE mediált allergiás reakciót tudnak kiváltani, míg a belélegzett és a tüdőben leülepedett nano- és mikrorészecskék krónikus gyulladást tartanak fenn a szervezetben. Mindkét esetben feltételezhető a komplement rendszer érintettsége. Ezért a következő célokat tűztük ki:

#### 1. komplement mediált pszeudoallergiában:

- 1.1. Túlérzékenységi reakciót okozó intravénás gyógyszerek szűrése in vitro komplement aktiváló képességre.
- 1.2. Komplement aktivációt okozó készítményekben a hatást kiváltó gyógyszer komponens azonosítása:
  - A Paclitaxel és a Taxotere esetében az oldószerként használt felületaktív anyagok komplement aktiváló képességének vizsgálata.
  - Különböző lipidösszetételű liposzómális gyógyszerek (AmbiSome, Caelyx) komplement reaktivitásának összehasonlítása.
- 1.3. A gyógyszerek által kiváltott komplement aktiváció mechanizmusának megismerése:
  - az aktivációt beindító felismerő struktúrák méretének becslése méret szerint frakcionált szérumkomponensek felhasználásával ( Paclitaxel/Cremophor EL és Taxotere/Tween 80 által kiváltott komplement aktiváció esetében),
  - az alternatív útvonal aktiválódásának (Bb termelődés) vizsgálata (Paclitaxel/Cremophor EL, Taxotere/Tween 80, Caelyx és Ambisome esetében),
  - Effektor funkcióval rendelkező komplement termékek (C3a, C5a) képződésének vizsgálata (Paclitaxel/Cremophor EL, Taxotere/Tween 80, Caelyx és Ambisome esetében).
- 1.4. A gyógyszerek által kiváltott komplement aktiváció és a hiperszenzitivitási reakció kialakulásának esélye, erőssége közötti kapcsolat vizsgálata.

#### 2. krónikus gyulladáson alapuló obstruktív tüdőbetegségekből:

- 2.1. A komplement aktiváció mértékének összehasonlítása vérben és légúti váladékban asztmában és COPD-ben.

- 2.2. A H faktor szintjének összehasonlítása vérben és légúti váladékban asztmában és COPD-ben.
- 2.3. A H faktor és a komplement aktiváció kapcsolatának vizsgálata az obstrukció mértékével és a betegség súlyosságával.

## **4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

### **4.1. A klinikai vizsgálatokba bevont személyek**

A gyógyszerek in vitro complement reaktivitásának szűréséhez 140 egészséges önkéntest toboroztunk.

A CARPA reakciók előrejelezhetőségét tanulmányozó klinikai vizsgálatba 29 tumorbetegét vontunk be. A MabTherát kapó betegek krónikus limfoid leukémiában szenvedtek, a Herceptint és Erbituxot kapók primer betegsége mellrák volt, a taxolszármazékokat pedig petefészek-, méh- és mellrák indikációkban adták a bevont betegeknek.

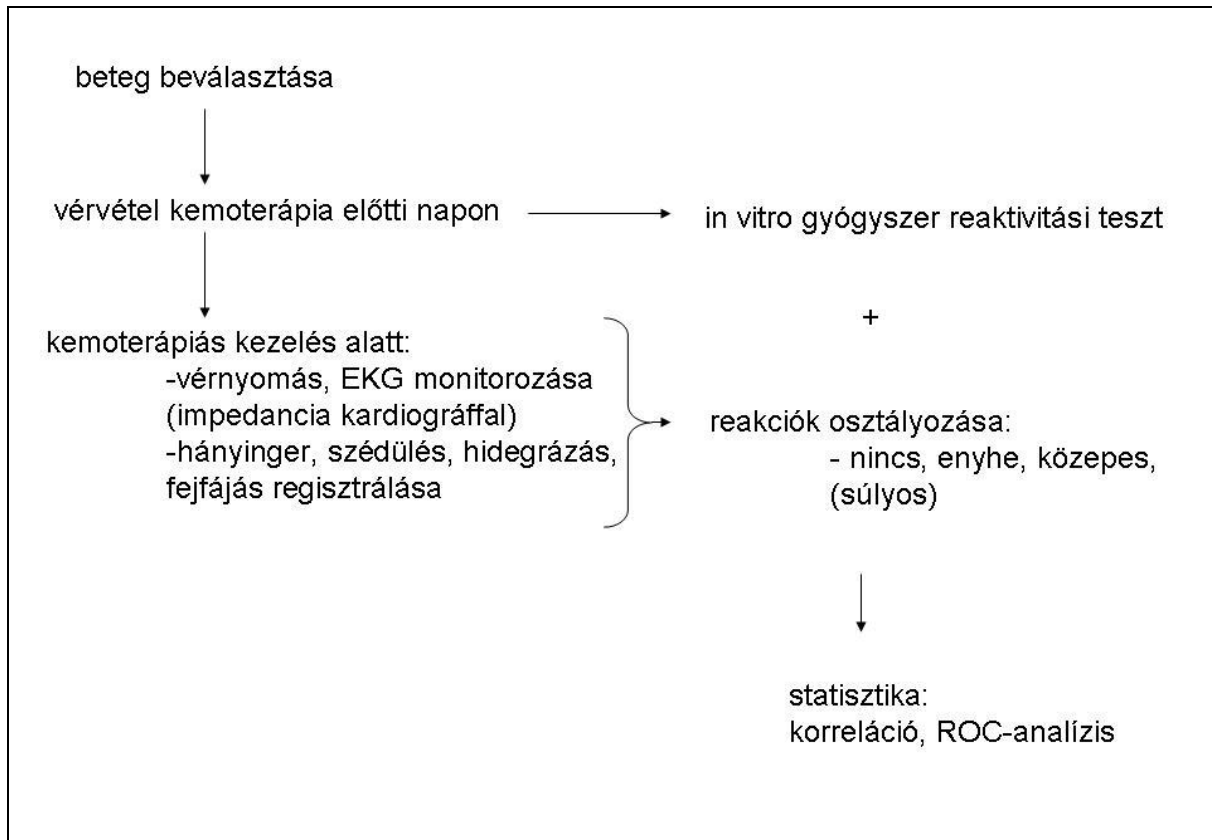
A H faktor légúti jelenlétét vizsgáló tanulmányba 21 egészséges személyt, 26 asztmást és 16 stabil COPD beteget vontunk be. Az asztma diagnózisát az aktuális GINA útmutatói alapján, a COPD diagnózisát az aktuális GOLD protokoll [143, 144] szerint állították fel a vizsgálatban részt vevő klinikusok. Az asztmás betegeket tovább osztályoztuk enyhe, közepes és súlyos kategóriákba a GINA 2011. évi útmutatói alapján [143], és két alkohorszót hoztunk létre az asztma csoporton belül: enyhe-közepes (n=10), súlyos (n=16). A betegek más szisztémás gyulladásos vagy autoimmun, illetve malignus betegségben nem szenvedtek, és a bevonást megelőző 1 hónapban akut légúti megbetegedésük nem volt.

A donorok minden esetben a megfelelő etikai engedélyhez (TUKEB 103/2007, 110/2007 és 142/2008) tartozó beteg tájékoztatót megismerték, a beleegyező nyilatkozatot kitöltötték és aláírták.

### **4.2. Klinikai vizsgálatok menetrendje**

A CARPA reakciók előrejelezhetőségét vizsgáló tanulmányba bevont tumorbetegektől a kemoterápiás infúziók megkezdése előtt és a kemoterápiás infúzió adása alatt is vettünk vért, melyből az 4.3. fejezetben leírtak szerint szérumot, illetve plazmát állítottunk elő. A kezelés előtti szérumokat in vitro complement aktivitási tesztnek vetettük alá az 4.4. fejezetben leírtak szerint a kezelésre kijelölt gyógyszer (paclitaxel/docetaxel/terápiás antitest) felhasználásával, és a komplement aktiváció mértékét SC5b-9, C3a and C5a ELISA kitek segítségével mértük. Az infúziók alatt a betegek vérnyomását és EKG-ját ICG-NHMS kardiográfval (ASKIT Kft, Budapest, Magyarország) monitoroztuk, és mindennemű CARPA tünetet feljegyeztünk,

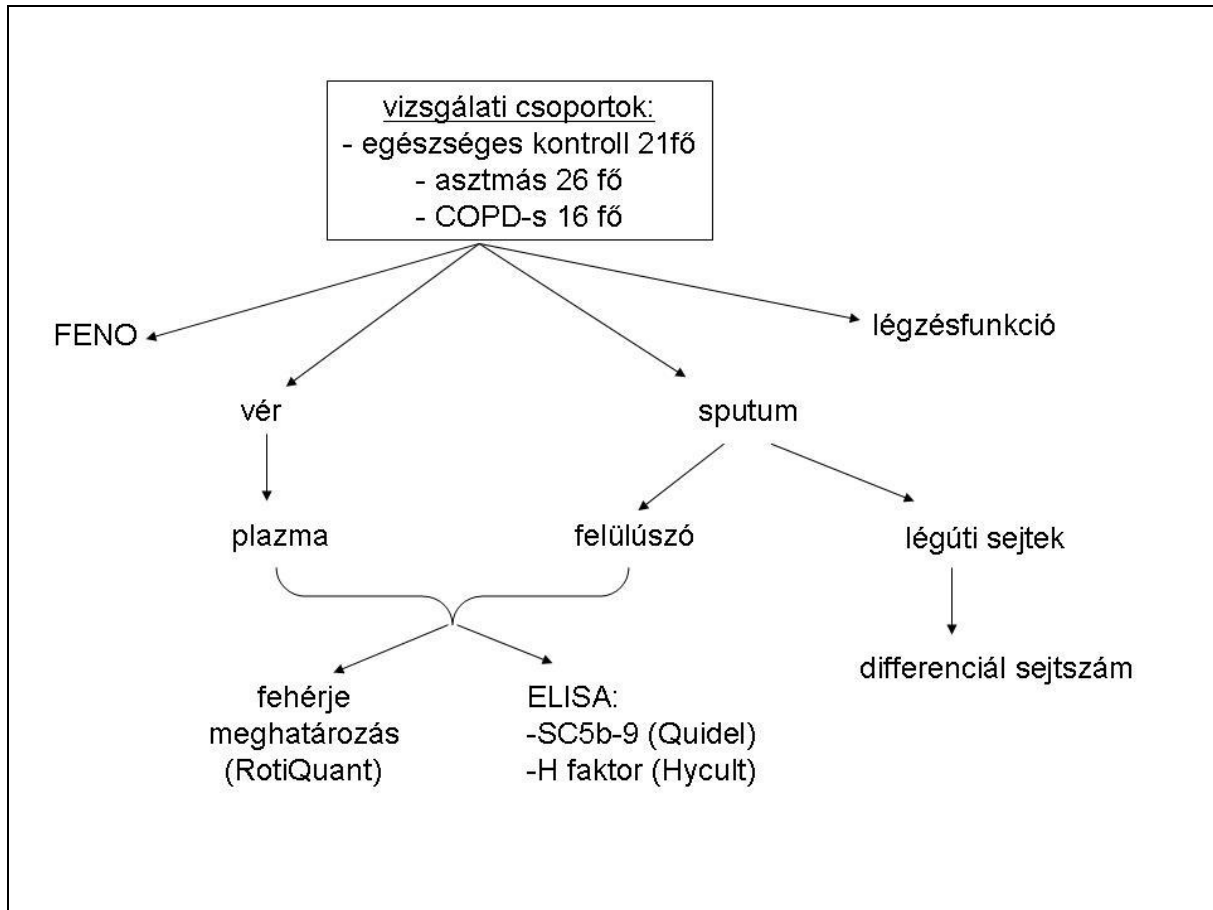
beleértve a brady/tachycardiát, hypo/hypertenziót, fejfájást, hányingert, hidegrázást vagy szédülést. A reakciókat Chanan-Khan és társai [145] osztályozását alapul véve soroltuk be enyhe, közepes és súlyos kategóriákba, majd összevetettük a kezelés előtti gyógyszerreaktivitási adatokkal (9. ábra).



**9. ábra: A CARPA klinikai vizsgálat folyamatábrája.**

Az obstruktív légúti betegségekben szenvedő betegek légúti komplement változásainak vizsgálatában a betegeket először kikérdeztük kórtörténetükről és dohányzási szokásaikról, majd az asztmások kitöltötték az Asztma Kontroll Kérdőívet (ACQ), a COPD-s betegek a COPD Assessment Test-et (CAT). Ezután lemértük a betegek kilégzett levegőjének NO tartalmát az érvényes FENO irányelvek szerint [146], NIOX MINO készülék segítségével (Aerocrine, Solna, Svédország). Spirometriát végeztünk ezután, majd 400 $\mu$ g salbutamol adása után 10 perccel ismét megmértük a légzésfunkciós értékeket. A két spirometriából a következők szerint számoltunk reverzibilitást:  $(\text{postsalbutamol FEV1} - \text{presalbutamol FEV1}) / (\text{presalbutamol FEV1})$ . A spirometria méréseket PDD-301/s (Piston, Budapest, Magyarország) készüléssel végeztük a legfrissebb spirometria irányelvek szerint [147]. Az Európai Szén- és Acélközösség (ECSC) adatbázisát használtuk a referencia értékek

képzéséhez az Európai Tüdőgyógyász Társaság (ERS) hivatalos ajánlásának megfelelően [148]. A vizitet köpetindukció zárta az 4.3. fejezetben leírtak szerint. A légúti komplementek vizsgálatának folyamatábráját a 10. ábra mutatja be.



**10. ábra:** Folyamatábra a légúti komplementszintek változásainak vizsgálatához obstruktív tüdőbetegségekben.

### 4.3. A biológiai minták legyűjtésének és tárolásának körülményei

A CARPA vizsgálatokhoz használt szérum, plazma és vérmintákat egészséges önkéntesek perifériás véréből állítottuk elő. A szérumok előállításához a natív vért centrifugáltuk (3.500g, 7 perc), majd a keletkezett vérszérumokat tiszta csőbe gyűjtöttük, és frissen felhasználtuk vagy  $-80^{\circ}\text{C}$ -on helyeztük el. Plazma előállításához heparin tartalmú vérvételi csőbe gyűjtöttük a vért, és centrifugálás után (2.000g, 7 perc) a felülúszókat frissen felhasználtuk vagy  $-80^{\circ}\text{C}$ -on helyeztük el. A  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tárolt szérumokból és plazmákból 140 fős donorbankot hoztunk létre, melyből a fagyasztott mintákon alapuló vizsgálatokat végeztük. A vizsgálatokhoz a szérumok kiválasztása véletlenszerűen történt.

Az asztmás és COPD-s betegek vérvétele közvetlenül a légúti mintavételek után történt EDTA tartalmú csövekbe (VACUETTE, Greiner Bio One, Kremsmünster, Ausztria), melyeket 30 percen belül lecentrifugáltuk 1.500g fordulatszámmal 10 percig szobahőmérsékleten. A felülúszó plazmát szétadagolva lefagyasztottuk -80°C-ra későbbi felhasználásig.

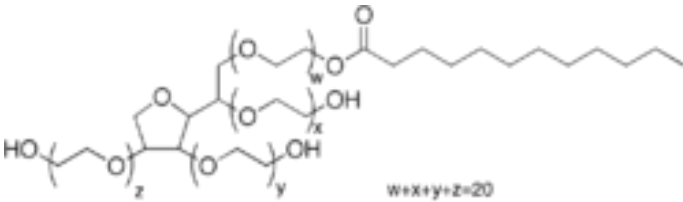
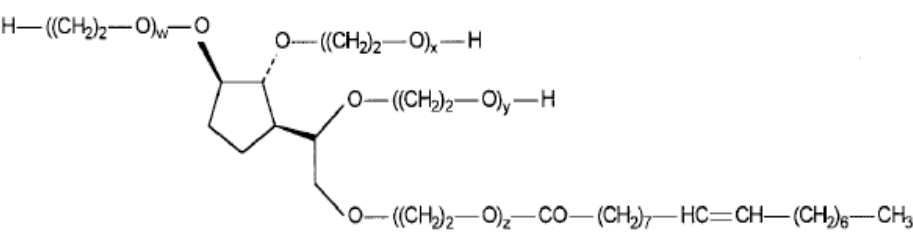
A köpet indukció során az egészséges önkéntesek és enyhe asztmások 4.5%-os porlasztott sóoldatot inhaláltak, míg a súlyos asztmások 0.9%-os sóoldat belélegzésével kezdték az inhalálást a mellékhatások elkerülése érdekében. Ha a súlyos asztmások jól tolerálták a 0.9%-os sóoldatot, a koncentrációt növeltük 3%-ra, majd végül 4.5%-ra. Az inhaláció időtartama 3x5 perc volt, melyhez DeVilbiss 3000 ultrahangos porlasztót használtunk (DeVilbiss Healthcare, Somerset, USA). Minden 5. inhalációs perc után a vizsgálati személyek csapvízzel alaposan kimosták a szájukat, majd mintát adtak, végül a légzésfunkciós értékeiket leellenőriztük a bronchokonstriktív adverz reakció kizárása érdekében. Amennyiben a FEV1 vagy PEF értékek több mint 20%-ot estek a kiindulási értékhez képest, az indukciót abbahagytuk, és salbutamolt kaptak a légzés normalizálása érdekében. Erre 3 beteg esetében volt szükség.

A köpetmintákat közvetlenül legyűjtés után azonnal feldolgoztuk. A nyákplakkokat kisselektáltuk és 0.1% dithiothreitolban (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) inkubáltuk 30 percig rázaton. A homogenizátumot 40µm lyuk átmérőjű sejtszűrőn (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA), átszűrtük, majd lecentrifugáltuk 1500 g-n 10 percig. A sejtmentes felülúszót szétadagolva -80 °C-on tároltuk a későbbi mérésekhez. A sejttabletából 10<sup>6</sup>/ml sejt koncentrációjú szuszpenziót készítettünk, melyet citospinek előállításához használtunk fel. A citospineket Reag-Quick Panoptic festékkel (Reagens Kft, Budapest, Magyarország) festettük. A sejtszámokat a nem laphámsejtek össz sejtszámának százalékában adtuk meg. A citospineket akkor tekintettük validnak, ha a laphámsejtek aránya nem érte el a 80%-ot, az élő sejtek aránya pedig meghaladta az 50%-ot..

## 4.4. A kísérletekhez felhasznált reagensek és gyógyszerek

A kísérletekhez felhasznált reagensek és gyógyszerek legfontosabb adatait a 12. és 13. táblázat tartalmazza.

12. Táblázat: A kísérletekhez felhasznált reagensek adatai.

Név	Kémiai tulajdonság, szerkezet	Gyártó
Cremophor EL	<p>Polietoxilált ricinusolaj</p> $\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{-O-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-O)}_x\text{-CO-O-(CH}_2\text{)}_7\text{-CH=CH-CH}_2\text{-CHOH-(CH}_2\text{)}_5\text{-CH}_3 \\   \\ \text{HC-O-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-O)}_y\text{-CO-O-(CH}_2\text{)}_7\text{-CH=CH-CH}_2\text{-CHOH-(CH}_2\text{)}_5\text{-CH}_3 \\   \\ \text{CH}_2\text{-O-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-O)}_z\text{-CO-O-(CH}_2\text{)}_7\text{-CH=CH-CH}_2\text{-CHOH-(CH}_2\text{)}_5\text{-CH}_3 \end{array}$ <p style="text-align: center;"><math>(x + y + z \sim 35)</math></p>	
Tween 20	<p>Polietoxilált szorbitán monolaurát</p>  <p style="text-align: center;"><math>w+x+y+z=20</math></p>	Sigma- Aldrich
Tween 80	<p>Polietoxilált szorbitán monooleát</p>  <p style="text-align: center;"><math>(w + x + y + z \sim 80)</math></p>	
Zymosan A	Élesztő sejtfa kivonat	



13. Táblázat: A kísérletekben szereplő gyógyszerek legfontosabb tulajdonságai.

Infúziós készítmény neve	Tulajdonság	Hatóanyag	Gyártó
Paclitaxel	Taxol típusú citoskeletális gátlók	paclitaxel	Teva
Taxotere		docetaxel	Sanofi
AmBisome	Klasszikus liposzómába zárt antimikotikum	amfotericin b	Gilead
Caelyx	Pegilált liposzómába zárt doxorubicin	doxorubicin	Shering
Carboplatin	DNS keresztköti platina koordinációs citosztatikumok	carboplatin	Mayne
Oxaliplatin		oxaliplatin	Teva
Platidiam		ciszplatin	Lachema
Doxorubicin	DNS-keresztköti ágens; kemoterapeutikum	doxorubicin	Teva
Endoxan		ciklo-foszfamid	Baxter
Fluorouracil		fluorouracil	Teva
Gemzar		gemcitabin	Eli Lilly
Irinotecan	DNS szintézis gátló	irinotecan	Mayne
Mitomycin C	DNS interkaláló	mitomycin	Kyowa
Vinblastin	citoskeleton blokkoló	vinblasztin	Richter
Erbitux	monoklonális ellenanyag (kiméra)	ellenanyag	Merck
Herceptin		ellenanyag	Roche

#### **4.5. A laboratóriumi vizsgálatok során alkalmazott módszerek**

##### 4.5.1. Gyógyszerek által kiváltott komplement reaktivitás mérése

A komplement aktivációs méréseknél a humán szérum, plazma vagy teljes vér mintákat a vizsgálati anyagokkal 37°C-on aktiváltuk, majd 10 mM EDTA-val leállítottuk a reakciót. A komplement aktiváció elsődleges meghatározására az S-fehérjéhez kötött komplement terminális komplex, az ún. SC5b-9 kimutatására alkalmas ELISA kitet választottuk (Quidel Inc., San Diego, USA). A vizsgált szérumok aktiválhatóságát zimoszán A segítségével igazoltuk, mely egy glükán és mannán komponensekből álló élesztő sejtfa poliszacharid származék. A komplement rendszert elsősorban az alternatív- és lektin útvonalon keresztül aktiválja.

Azon esetekben, ahol a terminális komplex teszt pozitívnak bizonyult, további komplement aktivációs termékek képződését is mértük. Az alternatív útvonal aktiválódását a Bb fragmentum képződését mérő ELISA kit (Quidel Inc., San Diego, USA) segítségével mértük. A c3a és a c5a anafilatoxinok mennyiségi meghatározását szintén ELISA módszerrel végeztük (c3a: Quidel Inc., San Diego, USA, c5a: BD Biosciences, Franklin Lakes, USA). A mérések kivitelezését a kitekhez mellékelt használati útmutatók szerint végeztük.

##### 4.5.2. A H faktor mennyiségének és allélfrekvenciáinak meghatározása

A H faktor koncentrációját ELISA módszerrel határoztuk meg (Hycult, Uden, The Netherland). A sputum minták mérésekor a standardok és blankek dithiothreitol (DTT) koncentrációját a mintákéhoz igazítottuk. A detektációs küszöb 3.9 ng/ml volt, a mérésen belüli CV (n=40 párhuzamos)  $2.0\% \pm 0.2\%$  volt, a mérések közötti variabilitás pedig 14.5% volt. A H faktor H402 és Y402 variánsainak jelenlétét a "CFH H402/Y402 variant detection ELISA kit"-tel mértük (Hycult, Uden, The Netherlands).

#### 4.5.3. Összfehérjeszint mennyiségi meghatározása

Az indukált köpetminták összfehérje mennyiségét Roti-Nanoquant kittel határoztuk meg (Roth GMBH, Germany), human szérum albumint (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) használva standardként. DTT-t adtunk a standardokhoz és a blankekhez az esetleges interferenciák kiegyenlítése érdekében, de az általunk hozzáadott 0.1% DTT nem okozott csökkenést a fehérjék kimutathatóságában.

#### 4.5.4. Méreteloszlás meghatározás

A vizsgálati anyagok részecske méret eloszlását dinamikus fényszórás módszerrel, Zetasizer Nano S készülékkel (Malvern Ltd., Worcestershire, Egyesült Királyság) határoztuk meg. A vizsgálati anyagok méréshez szükséges (többnyire 100szoros) hígítását steril injekciós víz, Salsol A (TEVA Magyarország Kft) vagy steril, 0,22 $\mu$ m-re szűrt PBS segítségével állítottuk be. A mintaoldatokat a műszer lézersugárral megvilágítva a fényszórás intenzitásának fluktuációját méri. Az intenzitásadatokból DTS Nano 5.10 (Malvern Ltd., Worcestershire, Egyesült Királyság) szoftver segítségével számoltuk ki a mintaoldatban található részecske méreteket, és ábrázoltuk a méret eloszlást. Minden mintát háromszor mértünk 37°C-on, és a 3 mérés intenzitás eloszlás eredményének átlagát vettük alapul a méretek meghatározásakor. A mintaoldatokhoz használt oldószerek méreteloszlási profilja azt mutatta, hogy az 1 nm feletti méret tartományban partikuláris szennyeződés nem volt.

#### 4.5.5. Endotoxin szennyeződés vizsgálata

A vizsgálati anyagok endotoxin szintjének meghatározásához a Limulus Amoebocyte Lysate (LAL) módszeren alapuló 'PyroGene Recombinant Factor C' tesztet (Lonza Inc., Basel, Svájc) használtuk. Az általunk választott kit előnye a hagyományos LAL-tesztekkel szemben, hogy nem megy végbe az endotoxin jelenlétében beinduló teljes koagulációs kaszkád, hanem az enzimaszkád tagjai közül kizárólag az első lépést katalizáló, rekombináns úton előállított Faktor C-t adjuk a mintákhoz. Ezáltal a minta és a koagulációs enzimek közötti interferencia lehetősége jelentősen csökken. A mérés elve, hogy a mintában található endotoxin aktiválja a rekombináns Faktor C-t, melynek eredményeképp az aktivált Faktor C egy szintetikus

fluorogén szubsztrátot hasít. A fluoreszcens jel végpontos mérése nagy érzékenységű, kvantitatív endotoxin meghatározást tesz lehetővé.

A méréseket a kithoz mellékelt használati útmutató instrukciói szerint végeztük. A vizsgált anyagokat akkor tekintettük endotoxinmentesnek, ha a mért endotoxin koncentráció nem érte el az FDA által intravénás készítményekre megadott endotoxin tolerancia limitet (0,5 NE/ml, [149]).

#### 4.5.6. Szérumok részecskeméret alapján történő frakcionálása

A szérumokat 100 kDa, 300 kDa, illetve 1.000 kDa pórusméretű Vivaspin 500 ultrafiltráló oszlopok (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, Németország) segítségével választottuk szét különböző frakciókra. A 0,22 $\mu$ m pórusátmérőjű szűrőn (Millipore Ltd, Billerica, USA) előszűrt szérumokat az ultrafiltráló oszlopokban 15.000g-n 20 percig 4°C-on centrifugáltuk. Az így keletkezett szűrletek azonnal felhasználásra kerültek a komplement aktivációs tesztekben.

#### 4.6. Statisztikai számítások

Az ELISA mérések eredményeit GraphPad Prism 4.02 (San Diego, USA) szoftver segítségével elemeztük és ábráztuk. Mivel a gyógyszervizsgálatok esetében az egyes csoportok értékei normál eloszlást (Kolmogorov-Smirnov teszt,  $p > 0.1$ ) mutattak, ezért adatainkat a csoportok számától és típusától függően párosítatlan vagy párosított t-teszttel, illetve egy szempontos vagy két szempontos varianciaanalízissel hasonlítottuk össze. A kontrolltól való eltérés vizsgálatára egy szempontos varianciaanalízis esetén a Dunnett-poszttesztet választottuk. Az egyes donorok válaszképességét két szempontos ANOVA utáni Bonferroni-teszttel vizsgáltuk.

Mivel a légúti komplement koncentrációk nem normális eloszlást mutattak, a koncentrációkat median (és interkvartilis tartomány) formájában adtuk meg. A különböző kohorszok közötti különbségeket két csoport esetén Mann-Whitney vagy több csoport esetén Kruskal-Wallis teszttel (Dunn's Multiple Comparison posztteszttel párosítva) vizsgáltuk. A CFH és SC5b-9 szintek és a klinikai paraméterek közötti összefüggések kereséséhez two-tailed Spearman-tesztet használtunk.

Ha a p érték kisebb volt, mint 0.05, az eltérést szignifikánsnak tekintettük. Az ábrákon és táblázatokban egységesen az alábbi jelöléseket alkalmaztuk:

Ns: nem szignifikáns

\*:  $p < 0,05$

\*\* :  $p < 0,01$

\*\*\*:  $p < 0,001$

## 5. EREDMÉNYEK

### 5.1. Nanogyógyszerek által kiváltott komplement mediált pszeudoallergia

#### 5.1.1. Liposzómális készítmények által kiváltott komplement aktiváció

##### 5.1.1.1. Az AmBisome és a Caelyx liposzóma tartalmának jellemzése

A Magyarországon leggyakrabban alkalmazott liposzómális készítmények közül vizsgálatainkba két infúziós gyógyszert választottunk: a klasszikus liposzómát tartalmazó AmBisome-ot, és a stabilizált liposzóma tartalmú Caelyxet.

Az AmBisome-ot szisztémás gombafertőzések ellen alkalmazzák, Aspergillus, Candida, cryptococcalis meningitis, és visceralis leishmaniasis indikációiban [150]. A Caelyx kemoterapeutikumként használatos metasztatikus emlőkarcinómában, ovariumkarcinómában és AIDS-hez társuló Kaposi-szarkómában [151].

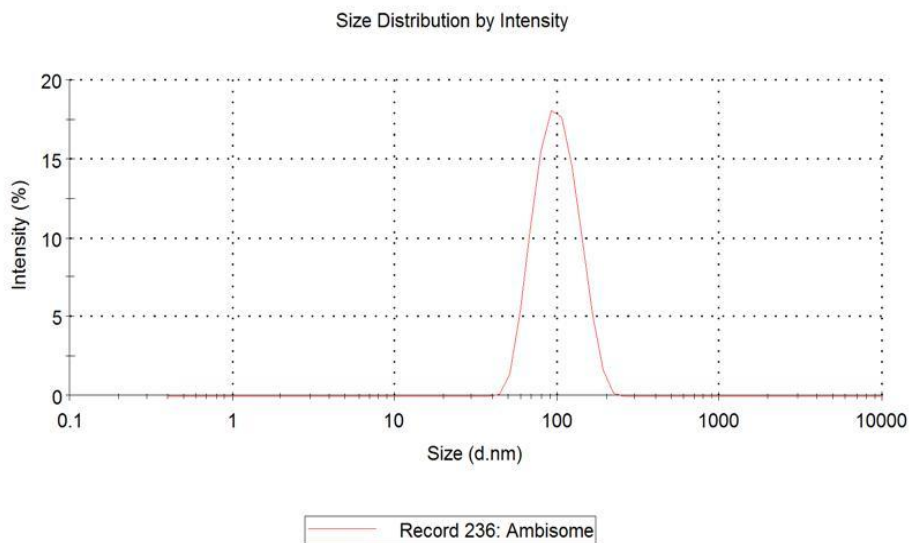
Az AmBisome az amfotericin B hatóanyag mellett HSPC-t (17,75 mg/ml), koleszterint (4,33 mg/ml, 15%) és negatív felszíni töltést okozó DSPG-t (7 mg/ml) tartalmaz [150], (14. táblázat). A Caelyxben a DSPG helyett alkalmazott MPEG-DSPE (3,19 mg/ml) a liposzómák szerkezeti stabilitását növeli, és fokozott védelmet biztosít az opszonizáció és fagocitózis ellen. A Caelyx többi alkotója az AmBisome-hoz hasonlóan a HSPC (9,58 mg/ml) és a koleszterol (3,19 mg/ml, 20%) [151, 101], (14. táblázat).

#### 14. Táblázat: Az AmBisome és a Caelyx liposzóma tartalmának összetétele.

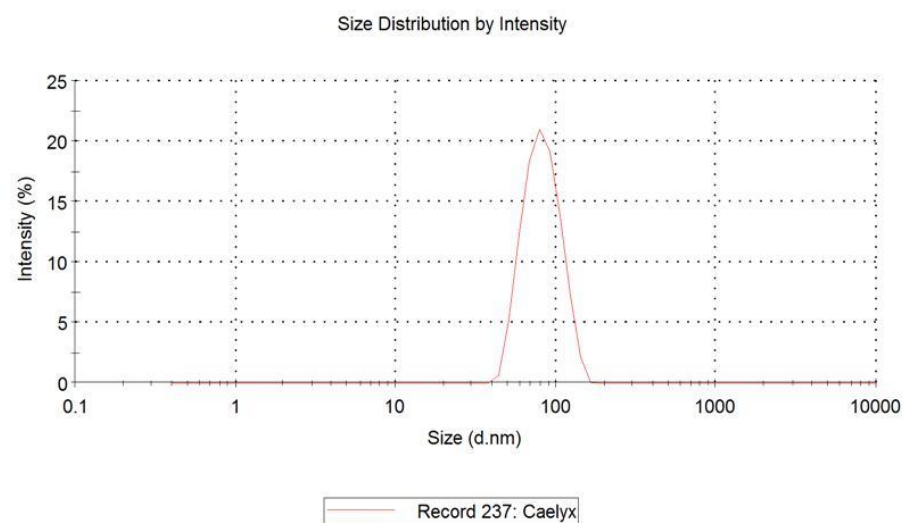
AmBisome	Caelyx
HSPC	HSPC
koleszterol	Koleszterol
DSPG	MPEG-2000-DSPE

Saját méréseink alapján a két infúziós gyógyszer liposzóma mérete (steril PBS-ben, 37°C-on) a 80-100nm tartományba esik: az AmBisome átlagos átmérője  $102,1 \pm 30,6$  nm (11. ábra), a Caelyxé  $83,3 \pm 21,3$  nm (12. ábra). Mindkét készítmény monodiszperznek bizonyult.

Az általunk mért liposzóma átmérők megfelelnek a gyógyszerek gyári leírásai szerinti méreteknél. A méret eloszlási eredmények azt is igazolják, hogy a kísérletekhez felhasznált liposzóma oldatok szennyeződésmentesek voltak.



**11. ábra: Az AmBisome méreteloszlása (100x hígítás, átmérő csúcs=102,1nm).**



**12. ábra: A Caelyx méreteloszlása (100x hígítás, átmérő csúcs=83,3nm).**

## 5.1.1.2. Az AmBisome és a Caelyx komplement aktiváló hatásának összehasonlítása

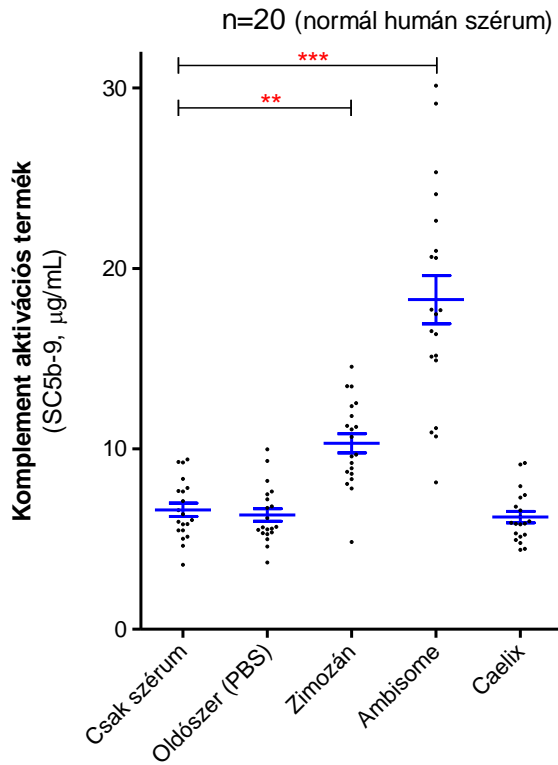
Az első SC5b-9 komplement aktivációs tesztben 20 donoron vizsgáltuk a két liposzómális készítmény hatását az alkalmazható legkönyvebb adagolásban. Az AmBisome igen erős aktivátornak bizonyult, a szérumok 100%-ában (n=20) mutattunk ki emelkedett SC5b-9 szintet (.15. táblázat), [152]. Ezzel szemben a Caelyx ezekben a szérumokban nem fejtett ki komplement aktiváló hatást [153]. A Caelyxet további 120 donoron tesztelve találtunk egy Caelyxre reagáló donort, így a mi szűrésünk esetében a Caelyx komplement reaktivitásának gyakorisága  $1/140=0,7\%$  volt.

Mivel az AmBisome liposzómái eléggé nagy felületűek, érdekesnek találtuk megvizsgálni, hogy érinti-e az alternatív útvonalat a liposzómák által okozott komplement aktiváció. Az AmBisome mindegyik vizsgált szérumban kiváltotta a B faktor hasadását Bb-vé, és a képződött Bb mennyisége egyenesen arányos volt a képződött terminális komplex mennyiségével (13. ábra.) [153]. A Caelyx jelenléte a reaktív donor szérumában szintén Bb képződést eredményezett (13. ábra).



**15. Táblázat: Az AmBisome és a Caelyx komplement aktiváló hatása 20 donoron vizsgálva.** A: SC5b-9 koncentrációk ábrázolása az átlag±SEM feltüntetésével, statisztikai próba egyszempontos ANOVA és Dunnett-posztteszt segítségével. B: A 21.A. ábrán bemutatott értékek statisztikai elemzésének eredménye (kétszempontos ANOVA, Bonferroni-posztteszt). [152, 153]

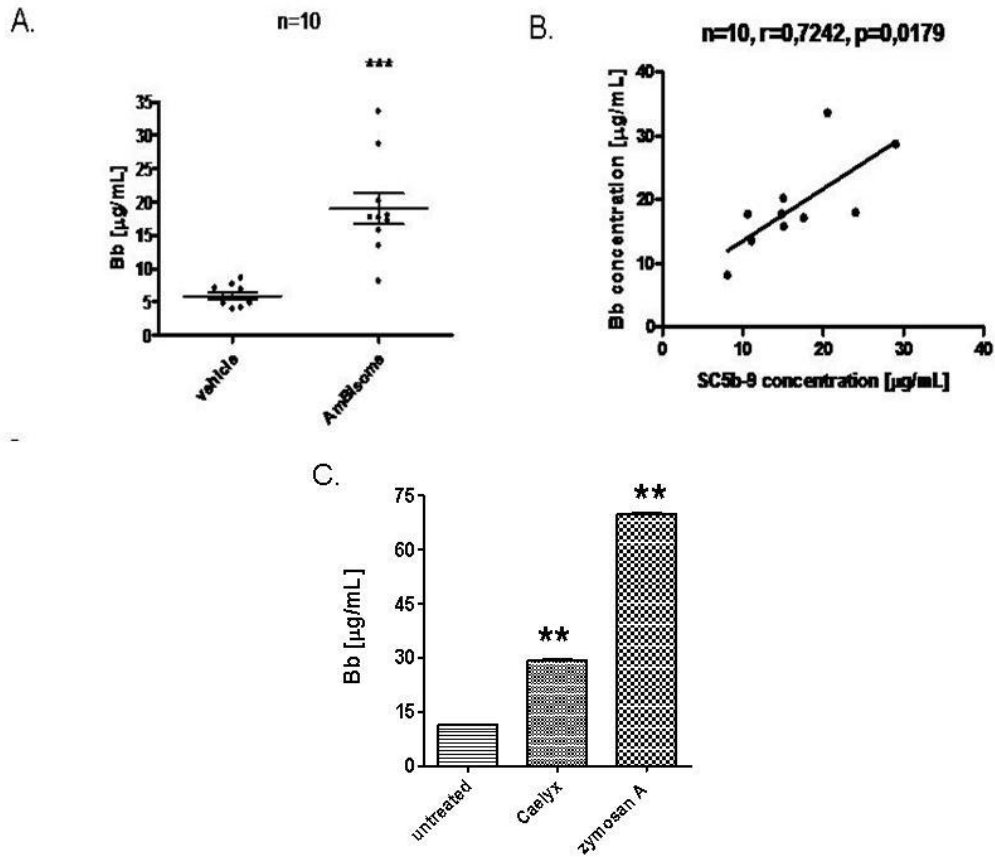
A.



B.

Kezelések szérum kontrolltól való eltérése:

Szérium	PBS	Zymosan	AmBisome	Caelyx
1	ns	***	***	ns
2	ns	***	***	ns
3	ns	***	***	ns
4	ns	***	***	ns
5	ns	***	***	ns
6	ns	***	***	ns
7	ns	***	***	ns
8	ns	***	***	ns
9	ns	***	***	ns
10	ns	***	***	ns
11	ns	ns	***	ns
12	ns	*	***	ns
13	ns	***	***	ns
14	ns	***	***	ns
15	ns	***	***	ns
16	ns	***	***	ns
17	ns	**	***	ns
18	ns	*	***	ns
19	ns	*	***	ns
20	ns	***	***	ns
aktiváció		95	100	



**13. ábra: Az AmBisome hatása az alternatív útvonal aktiválódására [153, 154].**

A: Az AmBisome hatása a Bb képződésre (Egyszemponos ANOVA,  $n=10$  normál humán szérum). B: Az AmBisome hatására képződött SC5b-9 és Bb mennyiségének összefüggése (Pearson-teszt,  $n=10$  normál humán szérum). C: A Caelyx hatása a Bb képződésre a Caelyx-reaktív donor szérumában (Párosítatlan kétoldali t-teszt).

## 5.1.2. Micelláris gyógyszerek által kiváltott komplement aktiváció

### 5.1.2.1. Különböző részecskeméretű kemoterápiás szerek komplement aktiváló hatásának összehasonlítása egészséges emberek szérumain

Elsőként 15 db, különböző szerkezetű és hatásmechanizmusú infúziós gyógyszert (16. táblázat) vetettünk alá in vitro komplement aktivációs tesztnek, annak eldöntésére, hogy a klinikai alkalmazásuk során leírt túlérzékenységi reakciók háttérében állhat-e CARPA mechanizmus. A hagyományos, kis molekulású gyógyszerek mellett teszteltünk monoklonális antitesteket és liposzómális készítményeket is.

A vizsgált gyógyszerek közül kizárólag a micelláris szerkezetű Paclitaxel és a Taxotere okozott szignifikáns komplement aktivációt (14. ábra), 1,5-15,5szeres növekedést okozva a szérumok terminális komplex szintjeiben [155]. Mindkét gyógyszer nagy előfordulási gyakorisággal váltott ki szérumreakciót (Paclitaxel: 25%, Taxotere: 40%, 17. táblázat).

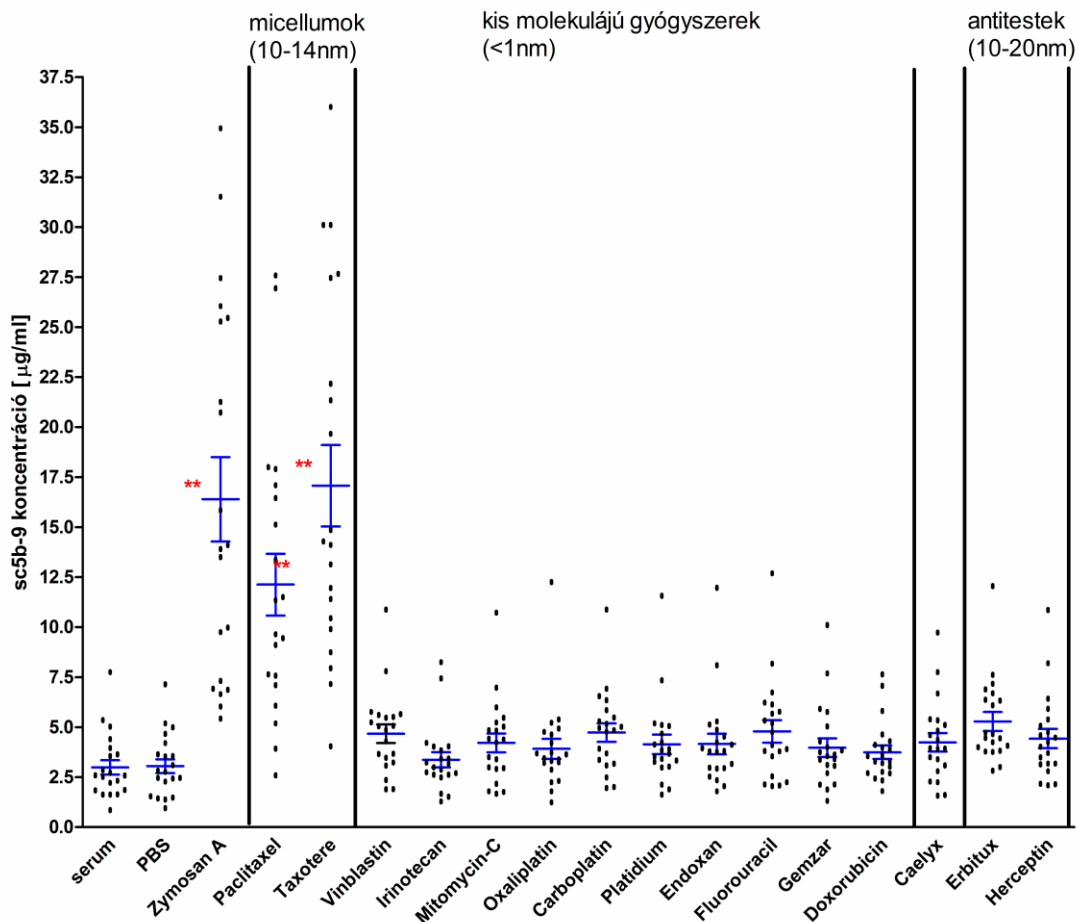
A kis molekulású gyógyszerek (platinaszármazékok, a Doxorubicin, Endoxan, Fluorouracil, Gemzar, Irinotecan, Mitomycin, Vinblastin), a monoklonális antitestek (Erbix és Herceptin), és a pegilált liposzóma tartalmú Caelyx nem aktiválta a terminális komplex képződését a vizsgált szérumokban [155]. A pozitív kontrollként alkalmazott zimozán A a szérumok 100%-ában váltott ki komplement aktivációt, míg a gyógyszerek oldására használt PBS nem okozott változást a szérumok SC5b-9 koncentrációjában.

**16. Táblázat: A vizsgálatban szereplő gyógyszerek csoportosítása hatásmechanizmus és szerkezet alapján.**

Hatás	Szerkezet	A vizsgált gyógyszerek: ( $\Sigma=15$ )	Részecske méret	Azonnali infúziós reakció
Mitotikus orsó gátlói	Taxolok	Paclitaxel, Taxotere	10-14nm	5-20%
		Vinblastin	<1nm	<5%
Topoizomeráz gátló		Irinotecan	<1nm	<5%
DNS keresztkötkök		Mytomicin C	<1nm	<5%
	Platinaszármazékok	Oxaliplatin, Carboplatin, Platidium	<1nm	<5%
		Endoxan (ciklofoszfamid)	<1nm	<5%
Nukleinsav szintézis gátló	Nukleotid analógok	Fluorouracil	<1nm	<5%
		Gemzar	<1nm	<5%
DNS interkaláló		Doxorubicin	<1nm	<5%
	liposzómális doxorubicin	Caelyx	83,3nm (12. ábra)	5-10%
Növekedési faktor antagonisták	Monoklonális ellenanyag	Erbitux, Herceptin	10-20nm	<5%

A Paclitaxel komplement aktiváló hatása a szakirodalomból is ismert jelenség, melyért a készítmény Cremophor EL tartalma tehető felelőssé (2.3.2.2. fejezet). A Cremophor EL-t azért adják a hatóanyaghoz, hogy a vízben gyengén oldódó taxolszármazékok oldhatóságát növelje, kicsapódását megakadályozza.

A Paclitaxellel szerzett tapasztalatok alapján a Cremophor EL toxikus hatását elkerülendő a Taxotere-ben egy másik felületaktív anyagot, a Tween 80-at használják a szintén taxol típusú hatóanyag szolubilizálására (2.3.2.2. fejezet). Az oldószercsere ellenére is előfordulnak infúzió alatti allergiás reakciók a Taxotere klinikai alkalmazása során, azt azonban csak ezután vizsgáltuk, hogy állhat-e komplement aktiváció az anafilaktoid tünetek hátterében.



14. ábra: Különböző infúziós gyógyszerkészítmények komplement aktiváló hatása (Egyszempontos ANOVA, Dunnett-teszt) [155].

**17. Táblázat: Különböző infúziós gyógyszerkészítmények komplement aktiváló hatása a vizsgált 20 donorra: kétszemponos ANOVA analízis, Bonferroni-teszt (ns: nem szignifikáns).**

Szérium Donor		Carboplatin	Oxaliplatin	Platidiam	Paclitaxel	Taxotere	Doxorubicin	Endoxan	Fluorouracil	Gemzar	Irinotecan	Mitomycin	Vinblastin	Erbitux	Herceptin	Caelix
1		Ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	Ns	ns	Ns	ns	ns	Ns	Ns	ns
2		Ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	Ns	ns	Ns	ns	ns	Ns	Ns	ns
3		Ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	Ns	ns	Ns	ns	ns	Ns	Ns	ns
4		Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	Ns	Ns	ns
5		Ns	ns	ns	***	***	ns	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	Ns	Ns	ns
6		Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	Ns	Ns	ns
7		Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	Ns	Ns	ns
8		Ns	ns	ns	ns	**	ns	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	Ns	Ns	ns
9		Ns	ns	ns	***	***	ns	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	Ns	ns
10		Ns	ns	ns	ns	**	ns	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	Ns	ns
11		Ns	ns	ns	*	***	ns	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	Ns	ns
12		Ns	ns	ns	*	***	ns	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	Ns	ns
13		Ns	ns	ns	ns	***	ns	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	Ns	ns
14		Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	Ns	ns
15		Ns	ns	ns	**	ns	ns	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	Ns	ns
16		Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	Ns	ns
17		Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	Ns	ns
18		Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	Ns	ns
19		Ns	ns	ns	ns	***	ns	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	Ns	Ns
20		Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	Ns	Ns
aktiváció %		0	0	0	25	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

## 5.1.2.2. A Docetaxel, Paclitaxel és oldószereik méret eloszlási tulajdonságai

A továbbiakban az alábbi három micellaképző anyagot vizsgáltuk:

1. a Tween 80-at (mely a Taxotere oldószere),
2. a Tween 80 kontrolljaként Tween 20-at,
3. és a Cremophor EL-t (mely a Paclitaxel oldószere).

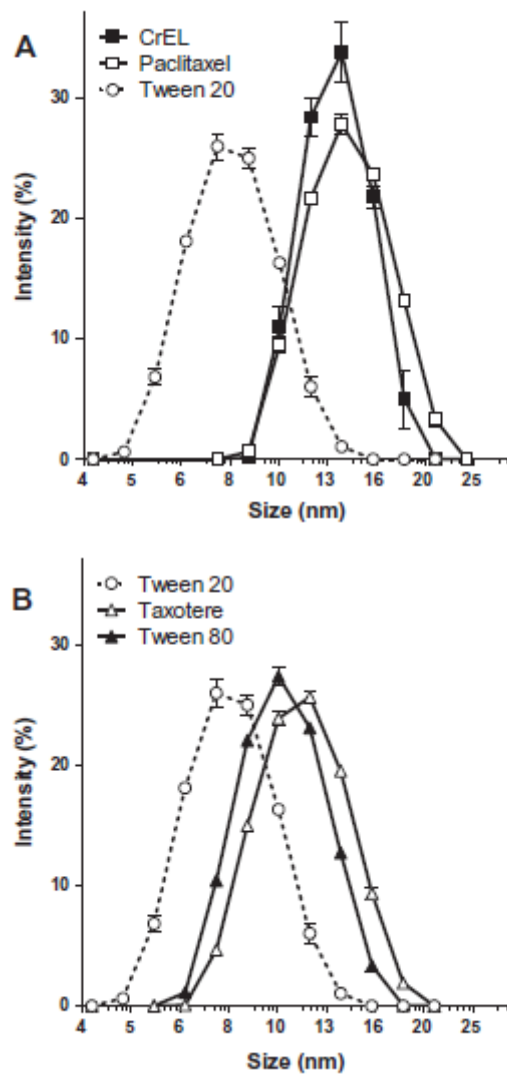
Meghatároztuk a Paclitaxel, Cremophor EL, Taxotere, Tween 80 és Tween 20 vizes oldatainak micella méretét 37°C-on (15. ábra). Átlagos micella átmérőjük a vizsgált körülmények között a következők szerint alakult:

**18. Táblázat: A Paclitaxel, a Taxotere, és a vizsgált micellaképző vegyületek részecskemérete [155].**

	Méret	Polidiszperzitási index
Paclitaxel	13.66 ± 0.08	0.04 ± 0.005
Cremophor EL	13.05 ± 0.03	0.03 ± 0.012
Taxotere	11.05 ± 0.1	0.05 ± 0.007
Tween 80	10.08 ± 0.02	0.06 ± 0.010
Tween 20	7.89 ± 0.01	0.06 ± 0.017

Az eredmények azt mutatják, hogy a szérum aktiváció céljára használt nem ionos detergensnek monodiszperz micellákat képeznek, melyeknek méret eloszlása vizes oldatban viszonylag kis variabilitást mutat (átlagos méretük: 7,4-13,7 nm). A legkisebb micella méret átlag értéket a Tween 20 esetében mértük, ennél a Tween 80 kb. 1,2-szer, a Cremophor EL kb. 1,7-szer nagyobbak bizonyult.

A nm-es tartományba eső anyagok gyakran használt jellemzője a méreten kívül a felületi töltés (zeta potential) is, mely a részecske felületi ionrétege és az oldat elektroneutrális felszíne közötti töltéskülönbséget jelzi. Az általunk használt műszer nem rendelkezett felületi töltés mérésére alkalmas egységgel, így erre vonatkozóan saját mérési eredményekkel nem rendelkezünk. Mivel azonban az általunk vizsgált micellaképző detergensnek nemionos tulajdonságúak, feltételezhető, hogy a felületi töltésük sem lehet számottevő.



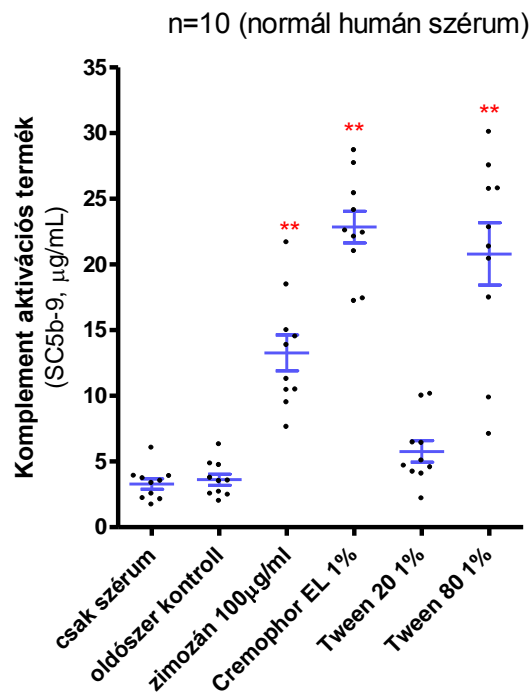
15. ábra: A vizsgált taxán gyógyszerek és oldószereik méreteloszlási tulajdonságai 37°C-on 0.5%-os vizes oldatban. A: Paclitaxel és Cremophor EL méretének összevetése. B: Taxotere és Tween 80 méreteloszlása.

[155]



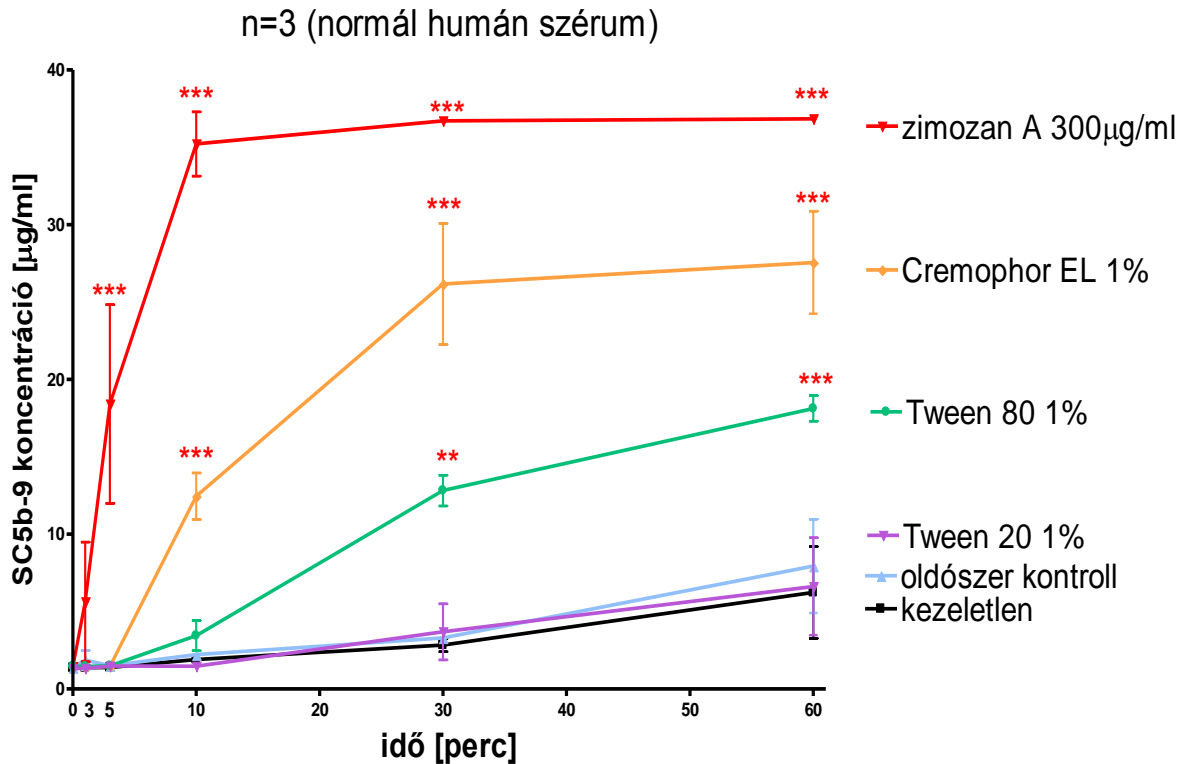
### 5.1.2.3. A Tween 80 és Cremophor EL in vitro komplement aktiváló hatásának vizsgálata

Terminális komplex mennyiségi meghatározására alkalmas ELISA módszer segítségével kimutattuk, hogy a Tween 80 és a Cremophor EL szignifikáns komplement aktivációt okozott, míg a Tween 20 hatása nem különbözött az oldószer kontrollétól (16. ábra).



16. ábra: Micelláris gyógyszer oldószerek hatása a komplement aktivációra (Egy szempontos ANOVA) [155].

Meghatároztuk a komplement aktiváció kinetikáját, és összehasonlítottuk a zimoszán A komplement aktiváló hatásával, melyet a maximum közeli komplement aktivációt okozó (300 µg/mL-es) dózisban alkalmaztunk. A Cremophor EL és a Tween 80 hatása méréseink szerint kb. 3-10-szer lassúbb a zimoszánénál. A vizsgált donorok esetében a fél-maximális (EC50) komplement aktivációs szintet a nagy dózisú zimoszán 2-3 perc alatt váltotta ki, míg a Cremophor EL kb. 10 perc, a Tween 80 pedig kb. 30 perc alatt idézte elő (17. ábra, 19. táblázat).



17. ábra: Felületaktív gyógyszer adalékanyagok komplement aktiváló hatásának időfüggése [155].

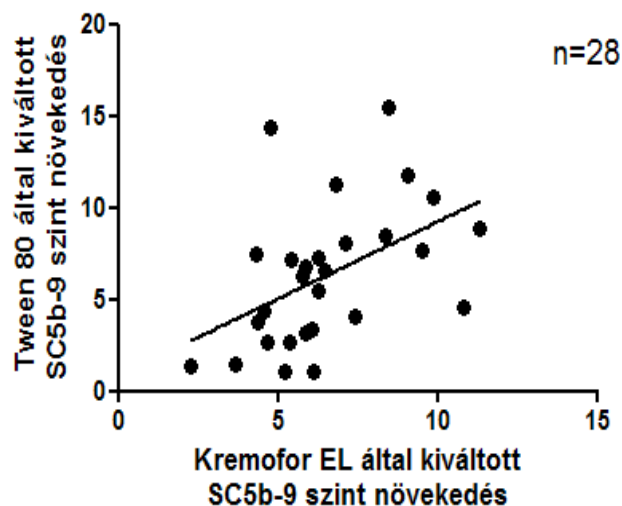
Átlag±SEM-et jelöltük az ábra minden mérési pontjánál.

Megállapítottuk, hogy a hatás nem tulajdonítható a detergens készítmények endotoxin szennyeződésének, mert mindhárom oldószer esetében a kimutatott endotoxin szint értékhatár alatti volt és a mért endotoxin szintek nem korreláltak a kimutatott komplement aktiváló hatással (19. táblázat).

**19. Táblázat: A Cremophor EL, Tween 80 és Tween 20 hatáserősségét leíró EC50 és ugyanezen oldatok endotoxin tartalma.**

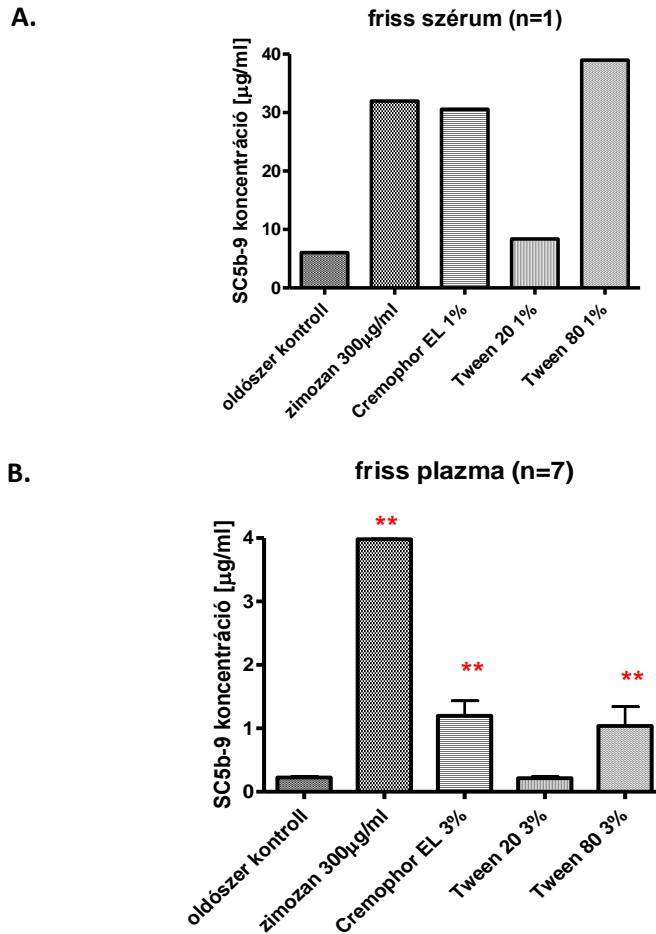
	zimosán A (300µg/ml)	Cremophor EL (1%)	Tween 80 (1%)	Tween 20 (1%)
EC50 [min]	2,306	10,32	23,05	Nem aktivál
Endotoxin tartalom [EU/ml]		0,022	0,040	0,080

A Cremophor EL és a Tween 80 által kiváltott komplement aktiváció mértéke a különböző szérumban szignifikáns korrelációt mutatott (18. ábra). Ez azt támasztja alá, hogy e két gyógyszer adalékanyag a komplement rendszert azonos hatásmechanizmuson keresztül aktiválja.



**18. ábra: A Cremophor EL és a Tween-80 komplement aktiváló képessége közötti korreláció (Pearson teszt,  $r=0,4726$ ,  $p=0,0111$ ). [153]**

A Cremophor EL és a Tween 80 komplement aktiváló hatását nemcsak fagyasztott szérumban, de friss szérumban és friss vérplazmában is kimutattuk (19. ábra). Ezek az eredmények megerősítik a kimutatott reakció fiziológiai relevanciáját.

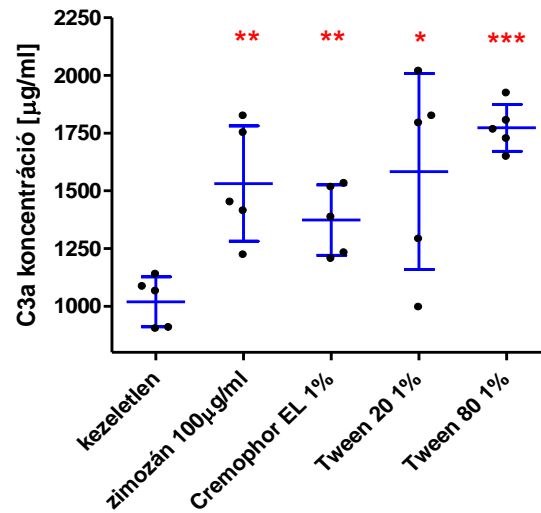


19. ábra: Micelláris gyógyszer oldószerek komplement aktiváló hatása friss szérumban (A), és plazmában (B) .

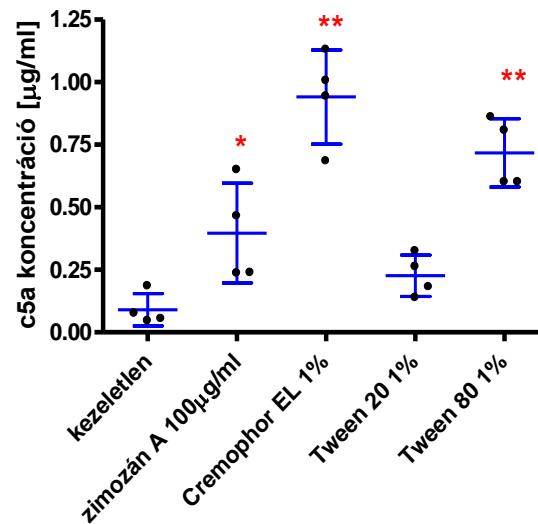
Statisztika: ANOVA-analízis. [155]

Mivel a komplement komponensek közül a C3a és C5a anafilatoxinoknak kitüntetett szerepe van a CARPA tüneteinek kialakulásában, a micelláris gyógyszer adalékanyagok által kiváltott komplement aktiváció jellemzése során is fontos a C3a és C5a szintekre gyakorolt hatásuk meghatározása. A Cremophor EL és a Tween 80 mindkét anafilatoxin koncentrációját szignifikánsan emelte, míg a Tween 20 a C5a keletkezését nem serkentette, a C3a képződés fokozódása pedig csak bizonyos donorok esetében volt megfigyelhető a Tween 20 hatására (20. ábra).

A.

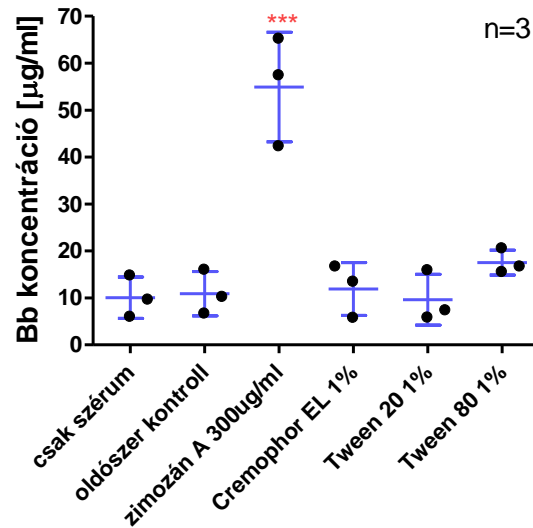


B.



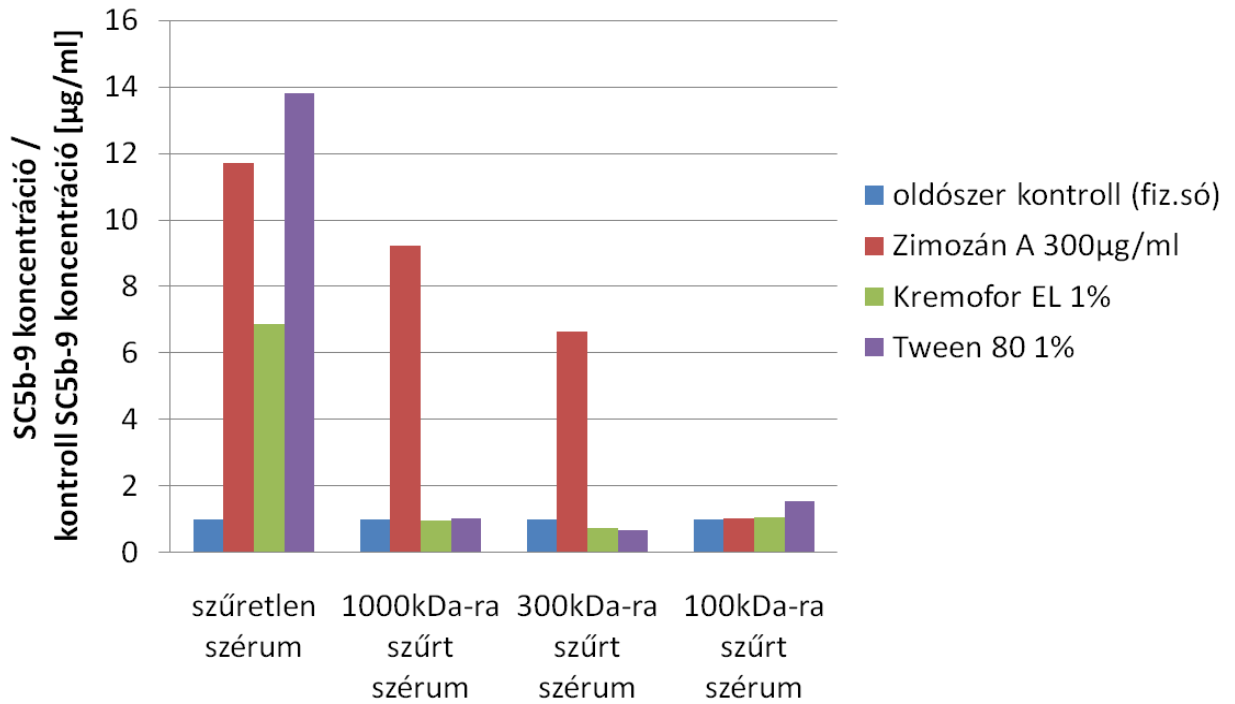
20. ábra: Gyógyszer oldószerek hatása a C3a szintre (A.) és a C5a szintre (B.). Statisztikai elemzés: kétoldalú párosított t-teszt, ANOVA analízis. [155]

A micelláris emulgeátorok hatásmechanizmusának megértése érdekében teszteltük, hogy mely útvonalakon keresztül jön létre a komplement aktiváció. Az alternatív útvonal kezdeti szakaszában keletkező Bb fragmentum szérumban koncentrációját egyik vizsgált anyag sem befolyásolta (21. ábra). Ez arra enged következtetni, hogy az alternatív útvonal nem játszik szerepet a komplement aktiváló hatás közvetítésében, helyette inkább a klasszikus (és/vagy a lektin) útvonalnak lehet jelentősége a Cremophor EL és a Tween 80 esetében.



21. ábra: A Cremophor EL, Tween 20 és Tween 80 hatása a szérumban a Bb szintre (n=3, 60 perc kezelési idő, ANOVA analízis). [153]

A következő kísérletekben a szérumokat a komplement aktiváció előtt méret szerint szétválasztottuk különböző frakciókra (teljes szérum, 1000kDa-ra szűrt, 300kDa-ra szűrt és 100kDa-ra szűrt szérum), hogy következtetni tudjunk arra, mely szérumkomponensek szükségesek a detergensnek komplement aktiváló hatásának kiváltásához. Eredményeink alapján a Tween 80 és a Cremophor EL által kiváltott komplement aktivációt már az 1000kDa-t meghaladó méretű szérumkomponensek eltávolítása teljes mértékben megszünteti (22. ábra). Ebbe a nagy molekulású mérettartományba a komplement rendszer aktivációjához szükséges szérum komponensek közül ismereteink szerint az IgM molekulák, az MBL-MASP komplex, és a fikolin-MASP komplexek tartoznak.

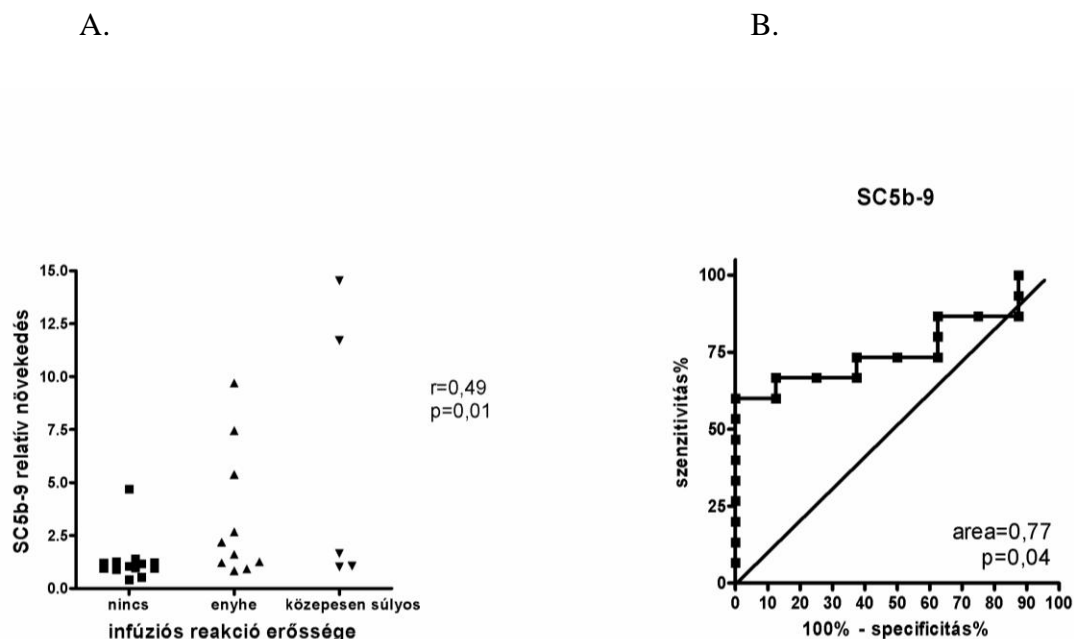


22. ábra: Szérum méret szerinti szűrésének hatása a Cremophor EL és a Tween 80 által kiváltott komplement aktivációra. [153]

### 5.1.3. Tumorbetegek taxolszármazékokkal szembeni komplement reaktivitása

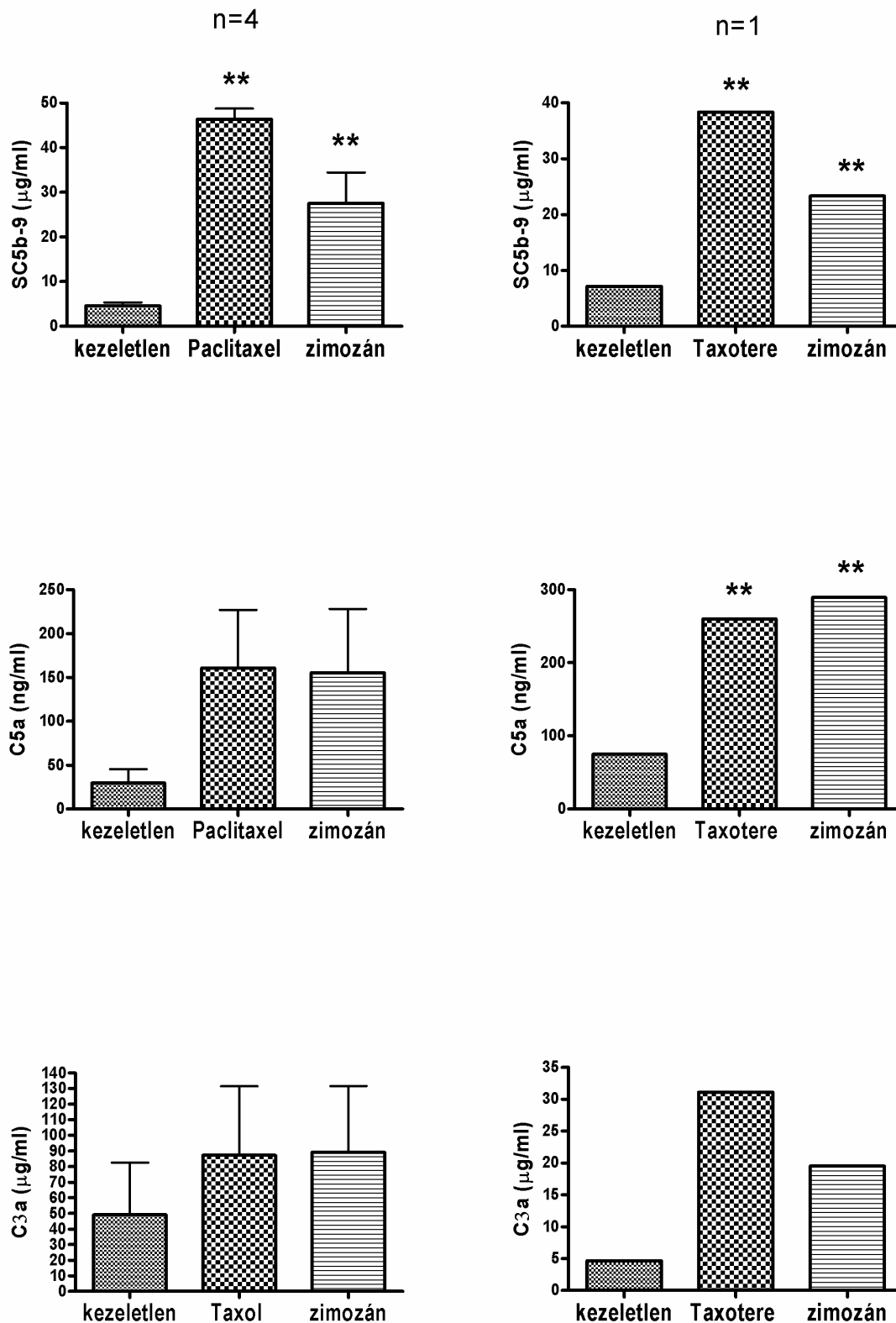
A 4.1-3. fejezetekben leírtak szerint vért vettünk 29 tumorbetegtől a kemoterápiás kezelések előtt, amikből szérumot állítottunk elő. Minden szérumon a donor számára előírt kemoterápiás szerrel in vitro komplement aktivációs tesztet végeztünk. A paclitaxellel és docetaxellel végzett in vitro tesztek során mintegy 6-10szeres SC5b-9 szint emelkedést tapasztaltunk (24. ábra), mely megerősíti, hogy a normál humán szérumokon mért erős komplement aktiváló hatás tumorbetegek vérében is létezik.

A kemoterápia előtti szérumokon mért komplement reaktivitást összevetettük a kezelés során tapasztalt hiperszenzitivitási reakció meglétével, és erősségével. A 23.A. ábrán látható, hogy enyhe pozitív összefüggés ( $r=0.49$ ,  $p=0.01$ ) tapasztalható az in vitro SC5b-9 képződés és az infúziós reakció erőssége között. Az adatokat ROC analízisnek alávetve (23.B. ábra), a kezelés előtt mért pozitív komplement reaktivitási teszt infúziós reakciót előrejelző szerepe szignifikánsnak mutatkozott (görbe alatti terület  $0.77$ ,  $p=0.04$ ).



**23. ábra: A kezelés előtti komplement reaktivitás potenciális szerepe kemoterápia alatti hiperszenzitivitási reakciók előrejelzésében.** A: infúziós reakció erőssége és a kezelés előtti szérumon mért SC5b-9 szint emelkedés közötti kapcsolat. B: A bemutatott ROC görbe a kezelés előtti szérumokon mért komplement aktiváció infúziós reakciót előrejelző értékét mutatja. [156]



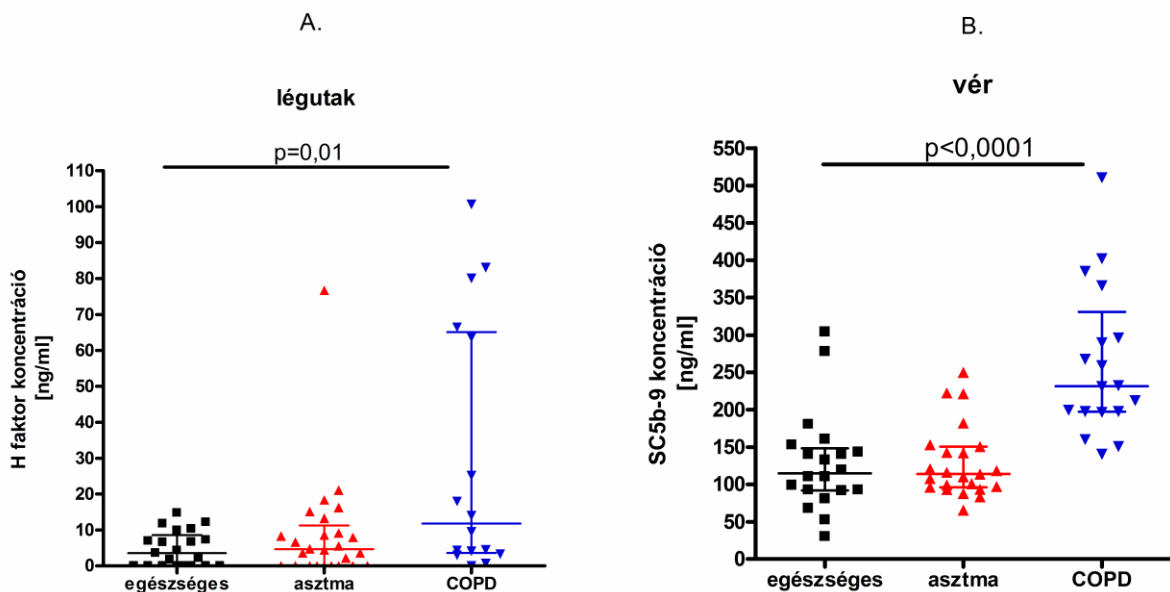


24. ábra: Taxolszármazékok in vitro komplement reaktivitása kemoterápia előtt álló tumorbetegek szérumaiban. A: SC5b-9 szint, B: C5a szint, C: C3a szint változások Taxol (paclitaxel, n=3) és Taxotere (docetaxel, n=1) kezelések hatására. Minden komplement teszt esetében zimoszán A-t használtunk pozitív kontrollnak. Statisztika: Egyszempontos ANOVA. [156]

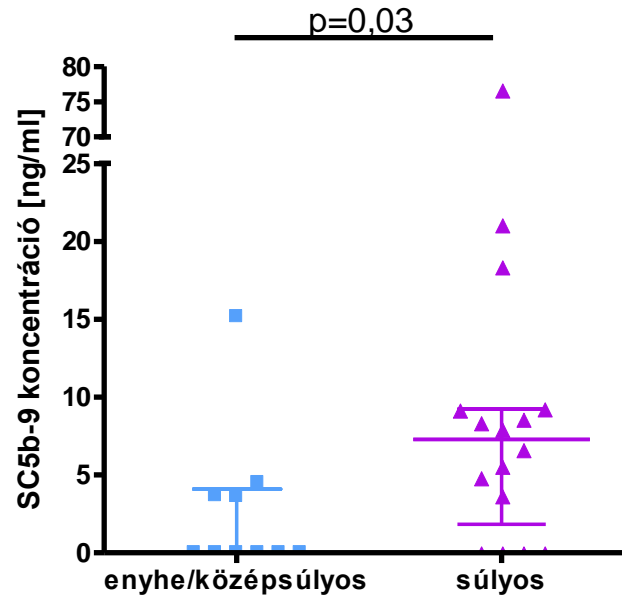
## 5.2. Komplement aktiváció asztmában és COPD-ben

21 egészséges önkéntes, 26 asztmás és 16 stabil COPD-s beteg plazmájában és indukált köpetében vizsgáltuk az SC5b-9 mennyiségét. Az SC5b-9 az egészségesek légúti mintáinak 62%-ában, az asztmás köpetek 85%-ában, és a stabil COPD-s köpetének 87,5%-ában volt kimutatható.

Bár nem volt szignifikáns a különbség az egészségesek és asztmások légúti SC5b-9 koncentráció értékei között (25. ábra), súlyos asztmásokban magasabb komplement aktivációs szinteket kaptunk, mint enyhe-középsúlyos asztmások légúti mintáiban ( $p=0,03$ , 26. ábra). Stabil COPD-sok légúti és plazmamintáiban fokozott SC5b-9 képződést tapasztaltunk (25. ábra). Az SC5b-9 szinteket összfehérjemennyiségre normalizálva a fentiekkel megegyező eredményeket kaptunk.



25. ábra: Komplement aktiváció mértéke egészséges, asztmás és COPD-s emberek légútaiban (A.) és vérében (B.). A statisztikai összehasonlítást Mann-Whitney teszttel végeztük. Az ábrán vonalakkal jeleztük a medián $\pm$ interkvartilis tartományokat. [157, 158]



26. ábra: Légúti SC5b-9 szint függése az asztma súlyosságától.

A statisztikai összehasonlítást Mann-Whitney teszttel végeztük. Az ábrán vonalakkal jeleztük a medián±interkvartilis tartományokat. [157]

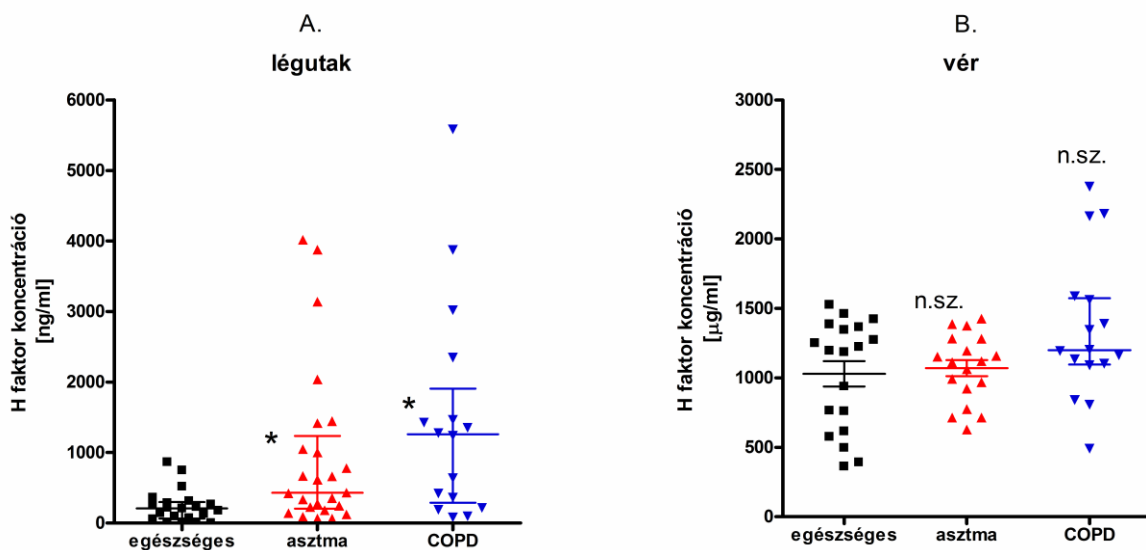
Plazmában asztmások és COPD-sek esetében egyaránt magasabb SC5b-9 szintekre utaló tendenciát láttunk, amely a mi vizsgálati esetszámunk mellett nem értre el a szignifikancia küszöböt.

A légúti SC5b-9 koncentrációk és a FEV1 (%) között gyenge negatív összefüggést találtunk asztmában (21. táblázat), de COPD-ben a légzésfunkciós értékekkel nem korrelált a SC5b-9 koncentráció. Pozitív kapcsolat mutatkozott a légúti SC5b-9 koncentrációk és az asztma súlyossága között, valamint a SC5b-9 koncentrációk és a H faktor koncentrációk között asztmában és COPD-ben. Nem volt összefüggés a SC5b-9 koncentrációk és a dohányzás, nem, életkor, inhalációs szteroid dózisa, leukotrién antagonistá használata, antihisztamin használata, FENO, köpet és vér sejt számok, valamint a bevonást megelőző egy évben elszenvedett exacerbációk száma között asztmában és COPD-ben.

### 5.3. Komplement H faktor asztmában és COPD-ben

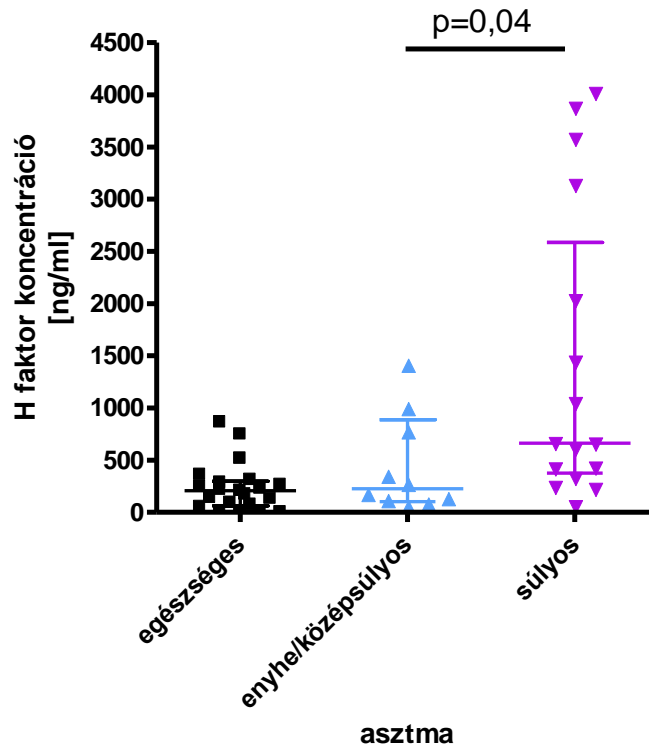
#### 5.3.1. Szisztémás és légúti H faktor koncentrációk asztmás és COPD betegekben

21 egészséges önkéntes, 26 asztmás és 16 stabil COPD-s beteg plazmájában és indukált köpetében vizsgáltuk a H faktor mennyiségét. A H faktor a kontroll személyek alsó légúti váladékának 81%-ában, míg az asztmás és COPD-s sputumok 100%-ában volt kimutatható. A CFH légúti koncentrációja szignifikánsan magasabb volt asztmásokban és COPD-sekben, mint egészségesekben, de az asztmások és stabil COPD-sek légúti H faktor szintje között nem volt különbség (asztma vs egészséges  $p < 0,05$ , COPD vs egészséges  $p < 0,05$ , 27. ábra.). A H faktor szintje egészséges, asztmás és stabil COPD-s betegek plazmamintáiban nem különbözött szignifikánsan, bár stabil COPD-ben emelkedésre utaló tendenciát észleltünk (27. ábra). A plazma H faktor szintek nem korreláltak a légúti H faktor szintekkel [157].



**27. ábra:** A H faktor koncentrációja asztmás és COPD-s betegek légúti (A.) és vérmintáiban (B.). Kruskal-Wallis tesztet alkalmaztunk az adatsorok statisztikai összehasonlításakor. A medián  $\pm$  interkvartilis tartományt vonalakkal jelöltük az ábrán. n.sz.: nem szignifikáns. [157, 158]

A légúti H faktor koncentrációja súlyos asztmásokban szignifikánsan magasabb volt, mint enyhe-középsúlyos asztmásokban ( $p = 0,04$ , 28. ábra) [157]. A köpet eozinofília és köpötmennyiség is a súlyos asztmásokban volt a legnagyobb (20. táblázat).

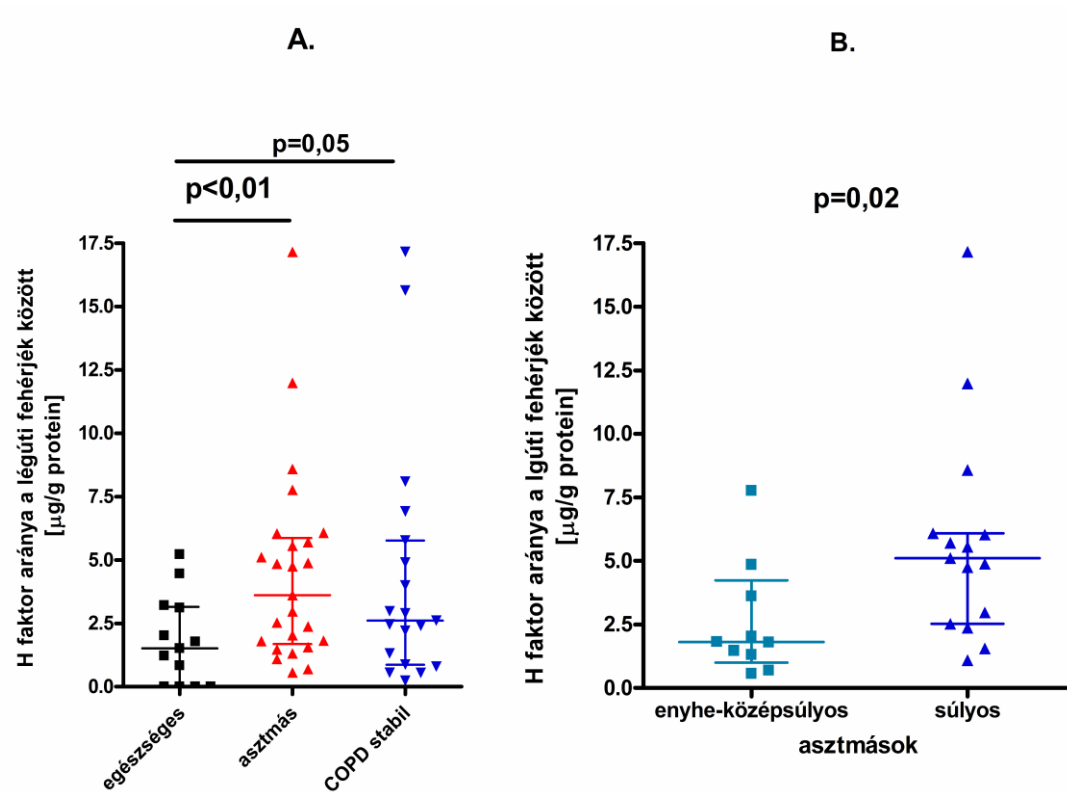


**28. ábra: Enyhe-középsúlyos és súlyos asztmások légúti H faktor koncentrációja.** Az enyhe-középsúlyos és súlyos asztmások H faktor koncentrációinak statisztikai összehasonlítását Mann-Whitney teszttel végeztük. Az ábrán vonalakkal jeleztük a medián $\pm$ interkvartilis tartományokat. [157]

**20. Táblázat: Köpet sejtarányok egészséges és asztmás betegekben. A csoportok létszáma (n) a valid citospin eredménnyel rendelkező személyek számát jelenti az adott csoportban. Az értékek átlag ± szórás formátumban, az összes nem- laphámsejt %-ában vannak megadva. \*: p<0.05, \*\*\*: p<0.001 az egészséges csoporthoz viszonyítva. [157]**

	egészséges (n=18)	asztmás (n=22)	Enyhe- középsúlyos asztmás (n=8)	Súlyos asztmás (n=14)
Köpet eozinofil sejtszám	0.2 ± 0.4	13.7 ± 18.1 ***	5.0 ± 9.8 *	18.2 ± 20.0 ***
Köpet neutrofil sejtszám	22.8 ± 19.4	20.8 ± 17.9	21.5 ± 20.6	20.4 ± 17.4
Köpet makrofág sejtszám	73.4 ± 20.9	64.2 ± 22.5	72 ± 20	60.2 ± 23.5
Köpet bronchialis epithélsejtszám	2.1 ± 4.9	1.0 ± 1.4	1.2 ± 1.8	0.9 ± 1.1
Köpet súly (g)	1.2 ± 0.6	2.0 ± 1.4 *	1.8 ± 1.8	2.1 ± 1.2 *

A légúti faktor H mennyiségét a minták összfehérjeszintjére normalizált módon is megnéztük 12 egészségesben, 25 asztmásban és 16 stabil COPD-s betegben, és azt találtuk, hogy mind asztmában, mind stabil COPD-ben a H faktor aránya az összfehérje szinthez viszonyítva magasabb volt (29.A. ábra). Az asztma kohorszon belül a H faktor/összfehérje arány a súlyos asztmásokban szignifikánsan nagyobb volt, mint az enyhe-középsúlyos csoportban (p=0,02, 29.B. ábra) [157, 159].



**29. ábra: A H faktor aránya légúti minták összfehérje mennyiségéhez viszonyítva.** A: Asztmában és stabil COPD-ben szignifikánsan nagyobb arányban van jelen H faktor a köpetfehérjék között, mint egészségesekben. B: A súlyos asztmásokban a légúti fehérjék nagyobb hányadát képezi H faktor, mint enyhe-középsúlyos asztmásokban. A statisztikai összehasonlítást Mann-Whitney teszttel végeztük. Az ábrán vonalakkal jeleztük a medián±interkvartilis tartományokat. [157, 159]

A CFH 402H allél frekvenciája 0.433 volt az asztma betegek között, és 0.438 az egészségesekben. A CFH Y402H polimorfizmus genotípusa nem korrelált a légúti H faktor koncentrációkkal asztmás betegekben [157].

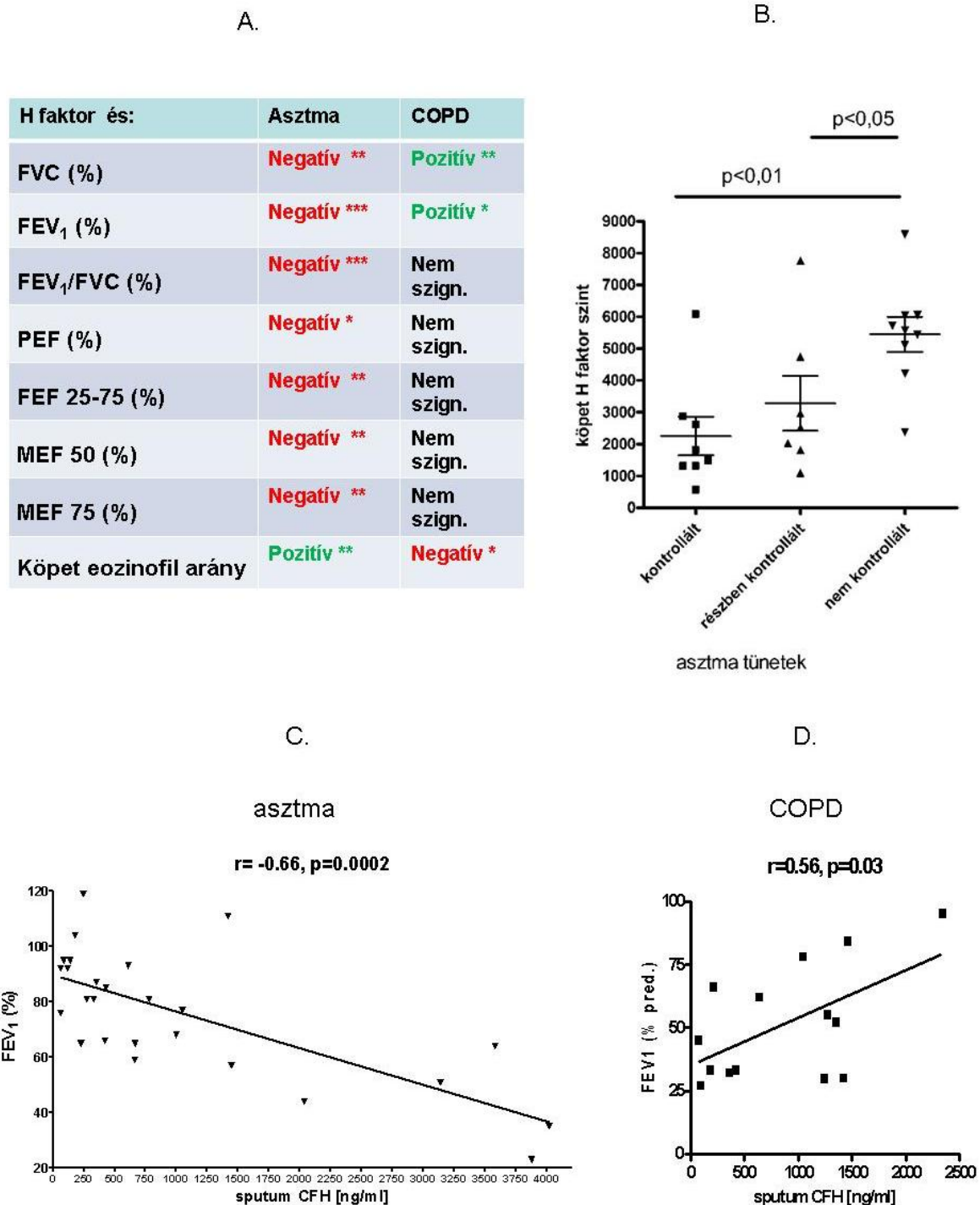
### 5.3.2. A légúti H faktor összefüggései az asztma és COPD klinikai jellemzőivel

A légúti H faktor koncentrációkat összevetettük a betegek légzésfunkció értékeivel és köpet sejtszámával (20. táblázat, 21. táblázat). Asztmában a légúti H faktor koncentrációja negatívan korrelált a FVC%, FEV1%, FEV1/FVC%, PEF%, FEF25-75%, MEF50% and MEF75% értékekkel és az asztma kontrollal (30. ábra). A légúti H faktor koncentrációja pozitívan korrelált az asztma súlyosságával, és a mintavételt megelőző 1 évben elszenvedett exacerbációk számával (21. Táblázat). COPD-ben a légúti H faktor koncentrációja az asztmával ellentétben pozitív összefüggést mutatott a FVC (%) és FEV1 (%) értékekkel, és negatívan függött a köpet eozinofil sejtszámtól (30. ábra).

A H faktor/fehérje arány asztmában szignifikáns korrelációt mutatott a légzésfunkció értékekkel, asztma kontrollal, súlyossággal és gyógyszerkezéssel. A köpet eozinofilszám a H faktor/fehérje aránnyal pozitívan korrelált (21. Táblázat).

Nem találtunk összefüggést a H faktor szintek és a dohányzás, nem, életkor, inhalációs szteroid dózis, leukotrién antagonisták használata, antihisztamin használat, anti-IgE kezelés, FENO, köpet neutrofil, makrofág és bronchiális epithelsejtszám, valamint a vérsejtszámok között.





30. ábra. A légúti H faktor kapcsolata a betegek klinikai jellemzőivel.

A: A légúti H faktor szintjének összefüggései a klinikai paraméterekkel asztmában és COPD-ben. Spearman-korreláció számítás eredményei, \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ . B: A légúti H faktor szint összefüggése az asztma kontrollal. Statisztika: Kruskal-Wallis-teszt. C: A FEV<sub>1</sub> (%) összefüggése a légúti H faktor koncentrációval asztmában. D: A FEV<sub>1</sub> (%) összefüggése a légúti H faktor koncentrációval COPD-ben. [157, 159]

**21. Táblázat. A légúti komplement szintek és a betegek klinikai jellemzői közötti összefüggések asztmában. [157]**

	H faktor koncentráció (ng/ml sejtmentes felülúszó)	H faktor/összfehérje arány (µg/ g fehérje)	SC5b-9 koncentráció (ng/ml sejtmentes felülúszó)	SC5b-9/ Összfehérje arány (ng/ g fehérje)
FEV1 (%)	r=-0.66 p=0.0002	r=-0.58 p=0.002	r=-0.40 p=0.04	n.s.
FEV1/FVC (%)	r=-0.59 p=0.002	r=-0.49 p=0.01	n.s.	n.s.
PEF (%)	r=-0.54 p=0.004	r=-0.51 p=0.009	n.s.	n.s.
FEF 25-75 (%)	r=-0.61 p=0.0008	r=-0.59 p=0.002	n.s.	n.s.
MEF 50 (%)	r=-0.64 p=0.003	r=-0.54 p=0.02	n.s.	n.s.
MEF 75 (%)	r=-0.63 p=0.002	r=-0.57 p=0.009	n.s.	n.s.
Köpet eozinofil sejtszám	n.s. (r=0.38 p=0.09)	r=0.57 p=0.006	n.s. (r=0.38 p=0.09)	n.s. (r=0.39 p=0.07)
Asztma kontrol (jól/részlegesen/nem kontrollált)	r=-0.45 p=0.02	r=-0.62 p=0.001	n.s. (r=-0.36 p=0.08)	r=-0.42 p=0.04
súlyosság (enyhe/közepes/súlyos)	r=0.42 p=0.03	r=0.50 p=0.01	r=0.47 p=0.02	r=0.49 p=0.01
Gyógyszerezési lépcsőfok (1-5)	n.s. (r=0.34 p=0.09)	r=0.45 p=0.02	r=0.47 p=0.02	r=0.51 p=0.01
Exacerbációk száma elmúlt egy évben	r=0.43 p=0.03	n.s.	n.s.	n.s.

## 6. MEGBESZÉLÉS

Munkáim során a keringési rendszerbe és légútakba jutó nanorészecskékhez köthető patológiás állapotokban vizsgáltam a komplementrendszer különböző fehérjéinek szintjét és működését.

Az első vizsgálatsorozatban infúziós nanogyógyszerek két csoportjának, a liposzómális és micelláris gyógyszereknek a komplement aktiváló képességét térképeztük fel, majd vizsgáltuk az in vitro eredmények élettani szerepét.

Liposzómális gyógyszerek közül egy első generációs (Ambisome) és egy modernizált összetételű liposzómális szer (Caelyx) hatásait hasonlítottuk össze. Megállapítottuk, hogy az Ambisome valamennyi vizsgált szérum esetében szignifikánsan aktiválta a szérum komplementet. Az AmBisome alkalmazásakor a liposzómába „csomagolás” miatti fokozott komplement aktiváció megnövekedett antimikotikus hatást biztosíthat a vízben oldott amfotericin B-hez képest, ugyanakkor növelheti a nem kívánt infúziós reakciók kialakulásának veszélyét is.

Az újabb fejlesztésű Caelyx csak nagyon ritkán okoz komplement reakciót normál humán szérumban, amely valószínűleg a liposzómafelszín pegilálásának köszönhető (DSPG → MPEG2000-DSPE szubsztitúció). Egyes mérések szerint a pegilált liposzómák (pl. Caelyx) által kiváltott komplement aktivációért a foszfolipid-PEG konjugátumok foszfát csoportjainak anionos töltése felelős [160]. Moghimi és társai sikeresen védtek ki a pegilált liposzóma által mediált komplement aktivációt azzal, hogy a foszfolipid-MPEG összetevőket metilálták. Más vizsgálatok azt találták, hogy a PEG molekulák méretétől és koncentrációjától függ, hogy milyen mértékben aktiválja a nem liposzómális PEG a SC5b-9, Bb, C3a és C4d képződését [161].

Az AmBisome esetében bizonyítottuk, hogy ebben a folyamatban a komplement kaskád alternatív útvonala (is) részt vesz. A Doxilról mások is leírták, hogy megemeli a Bb szérum koncentrációját donorfüggő mértékben [162]. A klasszikus útvonal érintettségét is

kimutatták, bár jelentős egyéni különbségek mutatkoztak az aktiváció EGTA/Mg<sup>2+</sup>-mal történő gátolhatóságában. A klasszikus útvonalat liposzóma ellenes antitestek kötődése tudja beindítani illetve felerősíteni [163], de ellenanyagok hiányában is képes a klasszikus útvonal működésbe lépni. Ebben az esetben a C1q közvetlenül kötődik a foszfolipidekhez, vagy a liposzómába épített fehérjékhez/proteinekhez. A PEG által kiváltott komplement aktivációban a lektin útvonal is részt vesz, mivel a folyamat N-acetil-glükózaminnal és anti-MASP ellenanyagokkal gátolható volt [161].

A komplement reaktivásban mutatkozó egyéni különbségek okairól keveset tudunk, az azonban bizonyított, hogy az emelkedett szérum LDL és HDL szintek képesek csökkenteni a liposzómák által kiváltott komplement aktivációt, feltételezhetően a liposzómafelszínhez asszociálódásuknak köszönhetően [160]. Ugyanakkor egy klinikai vizsgálat során a Caelyx-szel azonos összetételű Doxilra hiperszenzitivitási reakcióval reagáló tumorbetegeknél 92%-ában mutattak ki emelkedett SC5b-9 szintet [145]. Ez egyrészt azt sejteti, hogy rákbetegekben magasabb eséllyel alakulhat ki komplement aktiváció, mint egészséges donorokban, másfelől szoros kapcsolatot mutat a túlérzékenységi reakció és a komplement aktiváció kialakulása között.

A donorok AmbiSome-ra és a Caelyxre adott válaszképessége gyökeresen eltérő, ami azt sejteti, hogy a Caelyx csak akkor lép reakcióba az Ambisome-mal közös komplement komponensekkel, ha jelen van egy olyan faktor is, ami csak kis százalékban fordul elő humán vérben. Ez felveti valamilyen polimorf gén ritka alléljének szerepét a Caelyx által kiváltott komplement aktivációban, így a hiperszenzitivitási reakciók kutatásában is érdemes lenne – a más területeken már elterjedt - SNP (Single Nucleotide Polimorphism) analíziseket végezni.

Az Ambisome készítmények reaktogenitása arra utal, hogy a különféle lipid alapú gyógyszer formulációkban a DSPG használata immunotoxicitási kockázattal jár. Feltételezhető, hogy a DSPG immuntoxikus hatása annak tulajdonítható, hogy az általa létrehozott erősen negatív töltésű határfelületek kölcsönhatásba léphetnek legalább egy komplement aktiváló mintázat felismerő receptorral.

15 különböző részecskeméretű kemoterápiás szer komplement aktivációs tesztje azt mutatta, hogy csak a micelláris struktúrájú Paclitaxel (mely megerősíti a korábbi megfigyeléseket [113]) és Taxotere rendelkezik in vitro komplement aktiváló képességgel. Megerősítettük, hogy a Paclitaxel a Cremophor EL, és kimutattuk, hogy a Taxotere pedig a Tween 80 tartalma miatt aktiválja a komplement rendszert. Mindkettőt oldhatóság növelés érdekében alkalmazzák a gyógyszer formulációkban. A hatás friss és fagyasztott szérumban, plazmában és teljes vérben egyaránt megfigyelhető, amely alapján valószínűsíthető, hogy hasonló körülmények között in vivo is lejátszódnak ezek a reakciók (a Cremophor EL-lel kapcsolatos összes eddigi publikációban fagyasztott szérumokat vagy plazmákat használtak a mérésekhez).

Kimutattuk, hogy a Tween 80 és Cremophor EL hatására képződik C3a és C5a humán szérumban. Mivel ez a két peptid képes anafilaktikus tünetek kialakítására, az általunk megfigyelt komplement aktiváció in vivo lejátszódása esetén lehet esély a hiperszenzitivitási reakció kialakulására. A Tween 80 által kiváltott komplement aktiváció szerepet játszhat a Taxotere-en kívül más, Tween 80-at tartalmazó gyógyszerek alkalmazása során fellépő anafilaktoid reakciókban is, így pl. egyes kemoterápiás szerek (adozelesin, bizelesin, carzelesin, etoposide), szívritmusszabályozó (amiodarone) és parenterális vitamin készítmények kapcsán merülhet fel a leírt jelenség jelentősége. Például egy Tween 80 tartalmú multivitamin infúzió alatt kialakult anafilaxiás esetről egy nemrég megjelent publikációban pszeudoallergiás mechanizmusra gyanakodtak, miután az anafilaxiás sokkon átesett beteg szérumában nem volt kimutatható Tween 80 specifikus IgE [164].

Mind a Paclitaxel, mind a Taxotere infúzióval kezelt betegek plazmájában az oldószerek maximális koncentrációja meghaladja a kritikus micella koncentrációkat (Cremophor EL:  $10 \mu\text{L}/\text{mL} = 4,1 \text{ mM}$  vs  $\text{CMC}(\text{CremophorEL})=0,02\text{mM}$ , Tween 80:  $0,16 \mu\text{L}/\text{mL} = 0,13 \text{ mM}$  vs  $\text{CMC}(\text{Tween 80})=0,012\text{mM}$  [108]), mely arra utal, hogy a vizsgált gyógyszerek detergens összetevői micellumokat képeznek az emberi szervezetben. Saját méréseink kísérleti körülmények között szintén azt mutatták, hogy a Cremophor EL, Tween 20 és Tween 80 micellába szerveződik az alkalmazásott töménységben, de az általunk mért 7-15nm részecskeméret valószínűleg nem elég nagy ahhoz, hogy érdemleges Bb lerakódás

jöjjön létre a micellumok felszínén. A Tween 20 és a Tween 80 mérete közötti nem különbözik olyan mértékben, hogy az magyarázatul szolgálhat a gyökeresen eltérő biológiai hatásukért. Az ok sokkal inkább keresendő a kémiai összetételben és a felületi tulajdonságokban lévő különbségekben. A vizsgált micellák felszínén található OH csoportokat egyes szerzők szerint felismerhetik a természetes koleszterinellenes autoantitestek, keresztreaktivitást mutatva a Cremophor EL-re és más, felületi OH csoportokkal rendelkező detergenszerekre [113]. Ilyen antikoleszterol antitestek jelentős mennyiségben vannak jelen a legtöbb ember vérében, és képesek a komplement rendszer aktiválására a klasszikus és az alternatív útvonalon keresztül. Mindazonáltal nem világos, miért megy végbe a reakció a Cremophor EL és Tween 80 esetében, míg a Tween 20 esetében nem jut el a folyamat az anafilatoxin képződésig. A Cremophor EL és Tween 80 közös tulajdonsága az oxietilált telítetlen zsírsavak jelenléte a lipidrétegben. A telítetlen zsírsavak közismert tulajdonsága, hogy a telített zsírsavak által alkotott szabályos gömbfelületet megtörik, a micella alakját módosítják, ezáltal kedvezőbbé teszik a micellumok térszerkezetét a szérumfehérjék (enzimek, ellenanyagok, komplement fehérjék) lerakódása számára. Elektron mikroszkópos felvételek tanúsdága szerint a Taxollal kezelt plazmákban de novo képződő 50-300nm méretű lipidcseppek láthatóak, melyek feltételezhetőleg a Cremophor micellumok és szérum lipoproteinek összeolvadásából jöhetnek létre [74].

A Cremophor EL és a Tween 80 terminális komplex képződésre kifejtett hatása között kimutatott korreláció arra utal, hogy hasonló a hatásmechanizmusuk. Egy kutyakísérletekre alapozott feltevés szerint az anafilaktoid reakció kialakulása a Cremophor EL esetében a benne lévő kettős kötést tartalmazó oxietilált olajsav komponensnek köszönhető [165]. Ilyen oxietilált kettős kötés a Tween 80-ban is található (12. táblázat). Más vizsgálatok szerint maguk a micellumok, vagy a Taxollal kezelt plazmában korábban megfigyelt, plazma lipoproteinek és mesterséges gyógyszermicellumok egybeolvadásából létrejövő lipidkimérák váltják ki a komplement rendszer aktiválódását [74]. A Cremophor EL in vitro és in vivo vizsgálatokban a HDL és (kisebb mértékben) az LDL molekulák méretét növeli, és elektroforetikus mobilitásukat csökkenti. Ugyanezt a jelenséget a Tween 80 esetében is

megfigyelték [166]. Cremophor EL-lel végzett kísérletekben az eredetileg éles HDL és LDL csíkok elmosódottá váltak, és egy új sáv jelent meg, mely enyhén a katód felé vándorolt [167]. Ez arra utal, hogy az eredetileg apoláris Cremophor EL-ből pozitív töltésű részecskék alakulnak ki, melyek hozzájárulhatnak ahhoz, hogy az inert Cremophor EL (és Tween 80) molekulákból reaktogén termékek keletkezzenek. Liposzómák esetében a pozitív felszíni töltés bizonyítottan kiváltja a komplementrendszer alternatív útvonalon keresztüli aktivációját [168].

Mindezek alapján úgy tűnik, hogy a vizsgált, önmagukban semleges detergensok immunogénné válhatnak azáltal, hogy a keringési rendszerbe jutva szérumban lipoproteinekkal olvadhatnak össze, szérumfehérjékkel reakcióba léphetnek és ezáltal pozitív felszíni töltést szerezhetnek.

Az alternatív útvonal érintettségét az általunk kapott Bb szint vizsgálati eredmények nem igazolták, mely a kiválasztott 3 donor kismértékű stimulálhatóságával lehet összefüggésben. Egy korábbi publikáció sikeres Bb stimulációról számolt be Paclitaxel és Cremophor EL kezelés hatására, amit az EGTA/Mg<sup>2+</sup> hozzáadása tovább növelt [113]. Az EGTA/Mg<sup>2+</sup> alkalmas a klasszikus és az alternatív útvonalon keresztül történő komplement aktiváció elkülönítésére, mert az EGTA Ca<sup>2+</sup> kötő tulajdonsága révén gátolja a C1q-hoz asszociált szerin proteázok aktiválódását, viszont a lektin és az alternatív útvonal Mg<sup>2+</sup> jelenlétében még működőképes marad. Ugyanez a munkacsoport mutatta ki, hogy a SC5b-9 képződésre gátló hatást fejt ki az EGTA/Mg<sup>2+</sup> jelenléte, ami arra utal, hogy a Cremophor EL az alternatív és klasszikus útvonalat egyaránt működésbe hozza.

Adataink szerint a komplement aktivációhoz egy nagy méretű (kb. 1.000 kDa) plazma ill. szérumban komponens elengedhetetlenül szükséges, melynek hiányában a komplement aktiváció nem jön létre. Ez a klasszikus vagy esetleg a lektin útvonal elsődleges szerepére utal. 1000kDa-t meghaladó méretű, komplement aktiváló felismerő struktúrák közé az IgM molekulák, a fikolin-MASP és MBL-MASP komplexek tartoznak. Korábban is felvetődött már, hogy a klasszikus útvonal beindulásában a Cremophor EL-lel keresztreakáló természetes anti-koleszterol antitestek általi opszonizáció játszhat szerepet [113]. Az anti-koleszterol antitestek nagy mennyiségben vannak jelen a legtöbb ember vérében. Az általuk

felismert építő hiroxilcsoportot tartalmaz, amiben a Cremophor EL felszíne is bővelkedik, azonban a Tween 80-ra ez nem igaz. Mivel méréseink alapján a két micelláris oldószer hatása nagyon hasonló jellegű, valószínűleg egy másik, mindkét szerrel reagáló molekula tölt be központi szerepet az aktiváció kiváltásában.

A szérum lipoproteinek közül csak a kilomikronok tartoznak az 1000 kDa feletti mérettartományba, így nem a HDL vagy LDL eltávolítása okozza az 1000 kDa-ra szűrt szérumok komplement válaszában elmaradását Cremophor EL és Tween 80 kezelés hatására. (A HDL molekulák nagysága (7-20 nm) és sűrűsége (1,063-1,21 g/ml) megegyezik az általunk vizsgált detergens micella méreteivel és fajsúlyával (8. táblázat).) A Paclitaxel és Taxotere kezelésekkor előforduló veszélyes infúziós reakciók elkerülésének egyik lehetősége olyan taxoltartalmú gyógyszerek kifejlesztése lehet, melyek nem tartalmaznak sem Cremophor EL-t, sem Tween 80-at. Számos alternatív szolubilizálási technikával (pl. vízdékony polimerek (PEG), emulziók (pl. triacetin), ciklodextrinek, liposzómák és más nanohordozók) alkalmazásával próbálkoznak [118, 119]. Az egyik legígéretesebb ilyen gyógyszerfejlesztés az Abraxane, mely albumin nanoszemcsékhez kötött paclitaxelt tartalmaz. A klinikai tesztek premedikáció nélkül, rövidebb infúziós idő alkalmazása mellett is biztonságosnak találták [169], 2008 óta Európában is engedélyezett kemoterápiás szer.

A CARPA klinikai vizsgálat eredményei alapján azt feltételezzük, hogy a CARPA reakciót kiváltó intravénás gyógyszerek jövőbeni alkalmazása során tovább lehetne csökkenteni az anafilaxis kialakulásának veszélyét, ha az antihisztamin premedikáció helyett vagy mellett komplementgátlót kapnának a betegek. Az antihisztaminok alkalmasságát docetaxel által kiváltott anafilaxiás tünetek megelőzésében Ardavanisa és munkatársai [122] kérdésesnek találták az alapján, hogy saját tanulmányukban docetaxellel kezelésre hiperszenzitivitási reakcióval reagáló betegek szérumában nem tudtak kimutatni hisztamin és triptáz felszabadulást.

Asztmában és COPD-ben az alternatív komplement aktivációt gátló fehérjének, a H faktornak a szintje bizonyult emelkedettnek. Eredményeink jól kiegészítik Pio és mtsai



[170] megfigyeléseit, akik tüdőrákban írtak le hasonló H faktor feldúsulást, nemcsak sputumban, hanem BAL-ban is. Ezek a vizsgálatok azt sugallják, hogy a H faktor nemcsak jelen van a légúti váladékokban, hanem kóros légúti állapotokban képes a normális koncentráció tartománytól olyan nagymértékben eltérni, hogy a H faktor koncentrációja ng/ml helyett akár µg/ml tartományba eső értékeket érjen el. A H faktor légúti mennyiségét nemcsak koncentráció formájában, hanem az összfehérjeszinthez viszonyított arányban is kifejeztük, és itt is emelkedés volt tapasztalható mind asztma, mind COPD tekintetében.

A H faktor mennyiségi emelkedésén túlmenően összefüggést találtunk a H faktor szintje és a légúti obstrukció mértéke, valamint a betegség súlyossága között asztmában. A H faktor szintje a GINA szerinti súlyossági kategóriákkal egyenes arányosságot, illetve az asztma kontroll mértékével fordítottan arányosságot mutatott asztmában.

Bár ezek az összefüggések nem mutatnak ok-okozati összefüggéseket, felvetik a lehetőségét annak, hogy a pathomechanizmusban szerepet játszó biomarker lehet a H faktorból a vizsgált betegségekben. A H faktor biomarkerként való validálásához azonban további, nagyobb esetszámú keresztmetszeti és utánkövetéses vizsgálatok sorára lenne szükség.

A komplement aktiváció mérésére tüdőbetegségekben az SC5b-9-et, azaz a komplement kaskád stabilizált terminális komplexét választottuk a CARPA-reakciók vizsgálatához hasonlóan, tekintettel arra, hogy stabilabb, mint az anafilatoxinok. Ebből fakad, hogy erősebb jelintenzitást és jobb reprodukálhatóságot lehet elérni tapasztalataink szerint az SC5b-9 detektálásakor, mint C3a vagy C5a mérésekor azonos módszer alkalmazása esetén [155]. Habár a H faktor gátolja a terminális komplex képződését, a súlyos asztmásokban tapasztalt bronchiális H faktor szint emelkedés nem járt együtt csökkent komplement termék képződéssel, mely arra utalhat, hogy a komplement rendszert állandó vagy visszatérő stimulusok tartják folyamatosan aktívan.

A gyulladási folyamatok egyik jellemző kísérőjelensége a plazma nagy mértékű exudációja, melyet a gyulladt érfalakon megjelenő és kiszélesedő fenestrák tesznek lehetővé, és ez okozza a jól ismert gyulladási tünetet, az ödémát is. A komplement fehérjék fokozott exudációja lehetséges magyarázat lehet a légutakban tapasztalt emelkedett komplement szintekre gyulladási légúti betegségekben. Asztmában ismeretes

a bronchialis kiserek permeabilitásának növekedése [171], mely fokozott extravazációt, és az epitelsejtes réteg integritásának sérülését eredményezheti. Ezek a tényezők vezetnek a hörgők átjárhatóságát akadályozó nyákdugók kialakulásához [172], mely obstruktív tényező mind asztmában, mind COPD-ben. A prekapillaris permeabilitás növekedését számos gyulladáshoz köthető mediátor képes kiváltani, ezek egy része az eozinofilok granulumaiból szabadul fel. Ez magyarázatul szolgálhat a H faktor szintek és köpet eozinofil számok közötti pozitív összefüggésre. A H faktor 155kDa-os és 4.4nm-es méretével át tud jutni a diafragmákon is, míg az SC5b-9 kijutásához nagyobbra nyílt fenestrák szükségesek, mivel az SC5b-9 mérete 855-1150kDa/10nm körüli. A két fehérje exudációs tulajdonságaiban rejlt különbségek, illetve a felezési idejükben mutatkozó különbségek (H faktor: 6 nap, SC5b-9: 0.7 óra 37°C-on [173, 174]) okozhatják az eltérő eredményeinket a légúti minták koncentrációit és súlyarányait illetően. A plazma és köpet H faktor koncentrációk függetlensége arra utalhat, hogy a H faktor bronchusokba jutásának nem szisztémás, hanem lokális hajtóerői lehetnek.

A C5b-9-et stabilizáló S-protein (vagy más néven vitronektin) jórészt mint vérben keringő plazmafehérje ismert, de az extracelluláris mátrixnak is alkotóeleme, így az esetlegesen keringési rendszeren kívül képződő SC5b-9 stabilizálásában is részt tud venni. Akármelyik úton kötődik az S-protein a terminális komplexhez, a SC5b-9 jelenléte a bronchusokban a hörgők falának sérülését jelezheti.

Az érpermeabilitás becslésére általában azt a módszert használják, hogy összevetik egy másik akut fázis fehérje (pl. albumin) mennyiségét a köpetben, illetve a vérben. Pio és mtsai [170] nem találtak emelkedett albumin szinteket a magas H faktor szintű köpetmintákban. Az exudáció mellett egy másik lehetséges magyarázat a komplement felszaporodásra a helyi bronchiális komplement szintézis up-regulációja. Kimutatták, hogy a tüdőben az alveoláris makrofágok és bronchiális epitelsejtek képesek H faktort és C5-9-et termelni, a bronchiális neutrofilek pedig C5-9-et [175, 176]. Extrahepatikus komplement fehérjék szintézisét már évtizedekkel ezelőtt kimutatták, extracirkuláris komplement aktivációt azonban tudomásunk szerint eddig még nem bizonyítottak, ezért ennek lezajlása a bronchiális lumenben kérdéses.

Az emelkedett H faktor szint légúti fertőzések jele is lehet. Akut fázis reakciók során nagy mennyiségben termelődik, mint a folyamatot féken tartó fehérje, ugyanakkor bizonyos patogének képesek a H faktort felhasználni saját szaporodásukhoz és túlélésükhöz. Ez az ún. molekuláris mimikri oly módon jön létre, hogy a H faktorhoz kapcsolódva a patogének bejutnak a gazdasejtbe és/vagy elbújnak a komplement mediált immunválasz elől [68]. A kizárási kritériumok figyelembe vételével az exacerbációk követésére retrospektív módszert alkalmazva (12 hónappal a bevonás előtt) gyenge pozitív korrelációt találtunk az asztma exacerbációk száma és a légúti H faktor koncentrációk között, melyet COPD-ben nem sikerült igazolni. A légúti H faktor szintek és az exacerbációkra való hajlam közötti esetleges összefüggést nagyobb esetszámú prospektív vizsgálatok pontosabban tudnák tisztázni, mint amilyen például az Európai Unió támogatású többszáz beteget felölelő asztma vizsgálat, az U-BIOPRED [177] és a hasonló betegszámú COPD-vizsgálat, az Eva [178], melyek adatfeldolgozási fázisa jelenleg is folyamatban van.

Elméletileg a szedett gyógyszerek is hatással lehetnek egy-egy adott fehérje szintjére a szervezetben. Az asztma vizsgálatban a legtöbb beteg ICS-LABA kombinációs kezelésben részesültek, de néhányan ezen felül anti-IgE-t, antileukotriént, vagy antihisztamint is kaptak. Humán bronchiális és alveoláris epithelsejt tenyészetek komplement szintézisét a kortikoszteroid kezelés önmagában nem befolyásolja, de serkentheti azt gyulladásozó mediátorok jelenlétében (pl. TNF $\alpha$  vagy TLR agonista mellett) [179]. A mi vizsgálatunkban nem volt korreláció az ICS dózis és a bronchiális H faktor szintek között. Az antihisztaminokról szintén kimutatták, hogy monociták és hepatociták komplement szintézisét befolyásolják [180], az antileukotriének hatásai a komplement szintézisre és aktivációra nem ismertek. Bár nem találtunk különbséget a különböző gyógyszereket kapó és nem kapó betegek H faktor szintjei között az általunk bevont betegek esetén, az SC5b-9 szintek enyhén korreláltak az antihisztamin és omalizumab (anti-IgE) szedés tényével. A mi vizsgálatunk power-e nem volt elégséges ilyen típusú interakciók vizsgálatához, melyet tovább bonyolíthat az, hogy egyéni érzékenységek is különbségek mutatkozhatnak az egyes asztma gyógyszerekkel szemben. Ennek speciális, de viszonylag gyakori esete a kortikoszteroid rezisztencia, mely az asztma egyik lehetséges súlyosbító tényezője.

Az ICS nagy dózisú használata, a dohányzás és a magas FENO független előrejelzői a köpet eozinofiliának, melyek közül a FENO rendelkezik a legerősebb prediktív értékkel [181]. Tekintettel arra, hogy a köpet eozinofília is csak laza kapcsolatot mutatott a H faktor koncentrációkkal, nem ellentmondásos, hogy a FENO, az ICS dózis és a dohányzás Spearman-teszttel vizsgálva nem korrelált a köpet H faktor szinttel. Korai vizsgálatokban azt találták, hogy a dohány szemcsék aktiválják az alternatív útvonalat a C3-ra hatva, és csökkentik a C3 kötőképességét a H és I faktorhoz [126]. Bár a dohányzás hatással van számos légúti marker szintjére (pl. csökkenti a FENO-t [182], és növeli a gyulladásos légúti neutrofilát [183]), a mi vizsgálatunkban nem gyakorolt befolyást a H faktor és terminális komplex szintekre. A dohányzással összefüggő negatív eredményeinket Marc és mtsai vizsgálata is alátámasztja [133], akik nem tudtak kimutatni különbséget dohányosok és nem dohányosok C5a szintjei között.

A H faktor gén mutációi és polimorfizmusai befolyásolhatják a génről készülő fehérjetermék exudációs tulajdonságait és kötőképességét más fehérjékhez illetve patogén struktúrákhoz. Számos tanulmány írta le a H faktor aminosavszekvenciájának megváltozását gyulladásos betegségek önálló kockázati tényezőjeként (a legismertebb ezek közül a H402Y polimorfizmus és az időskori macula degeneráció kapcsolata [184]). Az általunk mért 43.3-43.8%-os allélfrekvencia a 402H allélre vonatkozóan jó egybeesést mutat a korábban magyar populációban leírt 42.6%-os allélfrekvenciával, amit 271 egészséges önkéntes genotipizálásával nyertek [185]. A H faktor szintje nem mutatott összefüggést a H faktor gén 402. nukleotidjának Y/H allélváltozataival., mely arra utal, hogy nem a Y402H polimorfizmus által kódolt H faktor fehérje szerkezeti variánsaihoz köthetők a vizsgálatunkban tapasztalt eltérő H faktor szintek.

A különböző H faktor génváltozatok hatásait a bronchiális H faktor szintekre és az asztma patomechanizmusára, illetve a légúti H faktor szintek eltéréseinek szerepét a különböző asztma súlyossági szintekre és fenotípusokra további, lényegesen nagyobb esetszámú vizsgálatok keretében lehetne nagy statisztikai biztonsággal kivizsgálni.

## 7. KÖVETKEZTETÉSEK

Kimutattuk, hogy az AmBisome, a Caelyx, a Taxol és a Taxotere infúziós gyógyszerek képesek komplement aktivációt kiváltani arra érzékeny emberek vérében. A fenti gyógyszerekre komplement aktivációval reagáló egyének előfordulási arányában jelentkező különbségek arra utalnak, hogy a különböző gyógyszerek által kiváltott CARPA reakciók mechanizmusában eltérések lehetnek. Erre utal az is, hogy a vizsgált liposzómális gyógyszerek az alternatív útvonalat aktiválták, míg a két micelláris gyógyszernél ezt nem sikerült kimutatni. Érdeemes lenne további vizsgálatokat folytatni arra vonatkozóan is, hogy az egyéni érzékenységbeli különbségek köthetők-e genetikai eltérésekhez. A CARPA-hipotézisben központi szerepet játszó anafilatoxinokról sikerült bebizonyítani, hogy valóban termelődnek taxolszármazékok hatására egészségesekben és tumorbetegekben is, így ezek lehetnek felelősek az anafilaktoid tünetek kialakulásáért. Az eredmények biológiai relevanciáját alátámasztja, hogy méréseink szerint a reakciók dózis- és időfüggő módon zajlanak, és nemcsak szérumban, hanem plazmában is kimutathatóak.

Míg a vérben akut hiperszenzitivitási reakciót váltanak ki a nanoméretű gyógyszerek, addig a nano- és mikroszemcsék tüdőben való lerakódása kapcsán krónikus gyulladás és perzisztens vagy visszatérő allergiás reakciók alakulhatnak ki, hosszú távon asztmát vagy COPD-t váltva ki. A komplement rendszer aktivációját is beindíthatják ezek a folyamatok, melyek saját méréseink szerint a H faktor tekintetében a tüdőben sokkal intenzívebben jelentkeznek, mint szisztémásan (perifériás vérben nézve). A bronchiális H faktor szintek esetében asztmában pozitív összefüggést mutattunk ki a betegség súlyosságával és a légúti obstrukció mértékével, míg COPD-ben ez nem állt fenn. A H faktor és a komplement aktiváció szerepéről az asztma pathomechanizmusában csak további vizsgálatok után tudunk kijelentéseket tenni, csakúgy, mint a H faktor esetleges biomarkerként való felhasználhatóságáról. A H faktor biomarkerként esetleg szerepet játszhat megfelelő megerősítés esetén pl. a korai asztma és COPD elkülönítésében, vagy a különböző kezelési protokollt igénylő asztma fenotípusok azonosításában.

## 8. ÖSSZEFOGLALÁS

A környezetünkben egyre nagyobb mennyiségben jelen lévő nanorészecskék évről évre egyre jelentősebb egészségügyi problémát jelentenek. Az asztma prevalenciája például évtizedenként 50%-kal emelkedik, jelenleg 6-9% a magyar lakosság körében, a COPD prevalenciáját Magyarországon 6-7% körülire becsülik. A gyógyszeriparban is sorra jelennek meg az újabb és újabb nanogyógyszerek, melyek alkalmazásának kockázatairól jelenleg még kevés ismerettel rendelkezünk.

A komplement mediált pszeudoallergia (CARPA) során a vérbe kerülő nanogyógyszerek komplement aktiváció kiváltásán keresztül idézik elő az anafilaktoid tünetek kialakulását az infúziók során, arra érzékeny személyeknél. Kimutattuk az AmBisome és a Caelyx liposzómális gyógyszerek összehasonlításakor, hogy az AmBisome (feltehetőleg erősen negatív töltésű DSPG tartalma miatt) minden vizsgált szérumban komplement aktivációt okoz, míg a pegilált, semleges felszínű Caelyxre 140 donorból mindössze egy volt reaktív. Mindkét liposzómális gyógyszer esetében sikerült bizonyítani az alternatív útvonal aktivációját.

Kemoterápiás szerek közül a micelláris oldószert tartalmazó Taxol és Taxotere váltott ki komplement aktivációt, melyet oldószereik, a Cremophor EL és Tween 80 is képesek voltak kiváltani. A komplement aktiváció C3a és C5a képződésével járt, de Bb képződéssel nem. Tumorbeteg kemoterápiás szerekkel szembeni komplement válasza összefüggést mutatott a hiperszenzitivitási reakciók erősségével.

A tüdőben felhalmozódó nano- és mikroszemcsék krónikus gyulladással járó tüdőbetegségekhez (asztma, COPD) vezethetnek. Mindkét betegségben ismert a komplementrendszer érintettsége. Saját méréseink szerint COPD-szek légúti és plazmamintáiban intenzívebbnek találtuk a komplement aktivációs folyamatokat, mint egészségesekben és asztmásokban. A komplement aktivációt gátló H faktor szintje is emelkedett volt mind asztmás, mind COPD-s légúti mintákban. A H faktor szintje asztmában pozitív összefüggést mutatott a légúti beszűkülés mértékével.

## 9. SUMMARY

The number of nanoparticles is increasing in the environment and causes ever and ever health care problem worldwide. For example, prevalence of asthma increases by 50% in every decade, and reaches 6-9% now in the Hungarian population; prevalence of COPD is estimated 6-7% in Hungary. The drug industry releases also increasing number of nanomedicines, although the risks of their use are poorly understood.

Complement mediated pseudoallergy (CARPA) is identified as a possible side effect during parenteral administration of nanomedicines, causing complement activation in the blood and resulting anaphylactic symptoms in susceptible subjects. We compared two liposomal nanomedicines, AmBisome and Caelyx, and found different complement reactivity in healthy subjects. AmBisome, which has highly negative surface charge related to its DSPG content, caused complement activation in every tested serum; while Caelyx with neutral surface charge activated only one serum from the tested 140 sera. Both AmBisome and Caelyx could induce activation of the alternative pathway.

We tested 15 chemotherapeutic agents for complement reactivity. Taxol and Taxotere - having micellar structure - showed capacity for complement activation in a subset of donors. The solvents of the two drugs, Cremophor EL and Tween 80 were also able to increase SC5b-9, C3a and C5a generation, but not Bb formation. Taxol and Taxotere induced in vitro complement activation also in pretreatment sera of tumor patients, which seemed to be associated with the grade of hypersensitivity during chemotherapeutic infusions.

Nano- and microparticles accumulating in the lung can lead to chronic inflammatory lung diseases, such as asthma and COPD. Both diseases are characterised by the activation of complement system. According to our results, complement activation was more intensive in airway and blood samples of COPD patients than in healthy and asthmatic subjects. The level of factor H was elevated in airway samples of both asthma and COPD patients. However, Level of factor H was in positive correlation with the level of airway obstruction and disease severity in asthma.

**10. IRODALOMJEGYZÉK**

1. J Heider. (2004) Deposition of Inhaled Particles in the Human Respiratory Tract and Consequences for Regional Targeting in Respiratory Drug Delivery. Proc Am Thorac Soc; Vol 1. pp 315–320.
2. SS Braman (2006) The global burden of asthma. Chest;130;4S-12S.
3. Erdei A. Kóros folyamatok kialakulásához vezető túlérzékenységi reakciók. In: Gergely J, Erdei A (szerk), Immunbiológia. Medicina, Budapest, 2000: 329-343.
4. Marone G, Patella V, de Crescenzo G, Genovese A, Adt M. (1995) Human heart mast cells in anaphylaxis and cardiovascular disease. Int Arch Allergy Immunol; 107: 72–5.
5. Marone G, Triggiani M, de Paulis A. Mast cells and basophils: friends as well as foes in bronchial asthma? Trends Immunol 2005; 26: 25–31.
6. Ogawa Y, Grant JA. (2007) Mediators of anaphylaxis. Immunol Allergy Clin North Am; 27: 249–260.
7. Golden DB. (2007) What is anaphylaxis? Curr Opin Allergy Clin Immunol; 7: 331–6.
8. Lieberman P, Camargo CA Jr, Bohlke K, Jick H, Miller RL, Sheikh A, Simons FE. (2006) Epidemiology of anaphylaxis: findings of the American College of Allergy, Asthma and Immunology Epidemiology of Anaphylaxis Working Group. Ann Allergy Asthma Immunol; 97: 596–602.
9. Pumphrey R. (2004) Anaphylaxis: can we tell who is at risk of a fatal reaction? Curr Opin Allergy Clin Immunol; 4: 285–90.
10. Patella V, Marino I, Lamparter B, Arbustini E, Adt M, Marone G. (1995) Human heart mast cells. Isolation, purification, ultrastructure, and immunologic characterization. J Immunol; 154: 2855–65.
11. Reid AC, Silver RB, Levi R. (2007) Renin: at the heart of the mast cell. Immunol Rev; 217:123–40.
12. M. Triggiani, V. Patella, R. I. Staiano, F. Granata and G. Marone. (2008) Allergy and the cardiovascular system. Clin Exp Immunol; 153: S7-11.



13. Vadas P, Gold M, Perelman B, Liss GM, Lack G, Blyth T, Simons FE, Simons KJ, Cass D, Yeung J. (2008) Platelet-activating factor, PAF acetylhydrolase, and severe anaphylaxis. *N Engl J Med*; 358: 28–35.
14. Braquet P, Touqui L, Shen TY, Vargaftig BB. (1987) Perspectives in platelet-activating factor research. *Pharmacol Rev*; 39:97–145.
15. Choi IH, Ha TY, Lee DG, Park JS, Lee JH, Park YM, Lee HK. (1995) Occurrence of disseminated intravascular coagulation (DIC) in active systemic anaphylaxis: role of platelet-activating factor. *Clin Exp Immunol*; 100: 390–4.
16. Vigorito C, Giordano A, De Caprio L, Vitale DF, Maurea N, Silvestri P, Tuccillo B, Ferrara N, Marone G, Rengo F. (1987) Effects of histamine on coronary hemodynamics in humans: role of H1 and H2 receptors. *J Am Coll Cardiol*; 10: 1207–13.
17. Steffel J, Akhmedov A, Greutert H, Luscher TF, Tanner FC. (2005) Histamine induces tissue factor expression: implications for acute coronary syndromes. *Circulation*; 112: 341–9.
18. Evora PR, Simon MR. (2007) Role of nitric oxide production in anaphylaxis and its relevance for the treatment of anaphylactic hypotension with methylene blue. *Ann Allergy Asthma Immunol*; 99: 306–313.
19. Nauta A, Knippels L, Garssen J, Redegeld F. (2007) Animal models of anaphylaxis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*; 7: 355–359.
20. Simons FE, Frew AJ, Ansotegui IJ, Bochner BS, Golden DB, Finkelman FD, Leung DY, Lotvall J, Marone G, Metcalfe DD, Müller U, Rosenwasser LJ, Sampson HA, Schwartz LB, van Hage M, Walls AF. (2007) Risk assessment in anaphylaxis: current and future approaches. *J Allergy Clin Immunol*; 120: S2–24
21. Kemp SF, Lockey RF. (2002) Anaphylaxis: a review of causes and mechanisms. *J Allergy Clin Immunol*; 110: 341–8.
22. Hoylaerts MF, Vermynen J. (2007) The procoagulant effects of air pollution. *J Thromb Haemost*;5(2):250-251.
23. Nemmar A, Hoet PH, Vandervoort P, Dinsdale D, Nemery B, Hoylaerts MF. (2007) Enhanced peripheral thrombogenicity after lung inflammation is mediated by platelet-leukocyte activation: role of P-selectin. *J Thromb Haemost*;5(6):1217-1226.

24. Fujii T, Hayashi S, Hogg JC, Mukae H, Suwa T, Goto Y, Vincent R, van Eeden SF. (2002) Interaction of alveolar macrophages and airway epithelial cells following exposure to particulate matter produces mediators that stimulate the bone marrow. *Am J Resp Cell Mol Biol*; 27(1):34-41.
25. van Hinsbergh VW. (2012) Endothelium--role in regulation of coagulation and inflammation. *Semin Immunopathol.*; 34(1):93-106.
26. Peters A, Frohlich M, Doring A, Immervoll T, Wichmann HE, Hutchinson WL, Pepys MB, Koenig W. (2001) Particulate air pollution is associated with an acute phase response in men. *Eur Heart J*; 22(14):1198-1204.
27. Vignola AM, Paganin F, Capiieu L, Scichilone N, Bellia M, Maakel L, Bellia V, Godard P, Bousquet J, Chanez P. (2004) Airway remodelling assessed by sputum and high-resolution computed tomography in asthma and COPD. *Eur Respir J.*; 24:910-7.
28. Falus András: Gyulladás-akut fázis reakció, akutfázis-fehérjék, szabályozás; a fertőzések elleni védekezés. in: szerk: Mandl J, Machovich R. *Orvosi Patobiokémia. Medicina, Budapest, 2007. p128-130.*
29. Passalacqua G, Ciprandi G. (2008) Allergy and the lung. *Clin Exp Immunol.*; 153 Suppl 1:12-6.
30. Gibson PG. (2009) Inflammatory phenotypes in adult asthma: clinical applications. *Clin Respir J*; 3(4):198-206.
31. Barnes PJ. (2008) Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol*; 8:183-92.
32. Barnes PJ. (2004) Mediators of chronic obstructive lung disease. *Pharmacol Rev*; 56(4):515–548.
33. Brown E J. (1991) Complement receptors and phagocytosis. *Curr Opin Immunol*; 3:76-82.
34. Thurman J M, Holers V M. (2006) Alternative complement pathway in human disease. *J Immunol*; 176: 1305-1310.
35. Molina H, Holers V M, Li B, Fung Y, Mariathasan S, Goellner J, Strauss-Schoenberger J, Karr W R, Chaplin D D. (1996) Markedly impaired humoral immune response

- response in mice deficient in complement receptors 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci USA*; 93: 3357-3361.
36. Kaya, Z., M. Afanasyeva, Y. Wang, K. M. Dohmen, J. Schlichting, T. Tretter, D. Fairweather, V. M. Holers, and N. R. Rose. (2001) Contribution of the innate immune system to autoimmune myocarditis: a role for complement. *Nat. Immunol.* 2: 739–745.
  37. Kerekes K, Prechl J, Bajtay Z, Józsi M, Erdei A. (1998) A further link between innate and adaptive immunity: C3 deposition on antigen-presenting cells enhances the proliferation of antigen-specific T cells. *Int Immunol*;10(12):1923-30.
  38. Heyman B. (2000) Regulation of antibody responses via antibodies, complement, and Fc receptors. *Annu Rev Immunol*; 18: 709–737.
  39. Fleming, S. D., T. Shea-Donohue, J. M. Guthridge, L. Kulik, T. J. Waldschmidt, M. G. Gipson, G. C. Tsokos, and V. M. Holers. (2002) Mice deficient in complement receptors 1 and 2 lack a tissue injury-inducing subset of the natural antibody repertoire. *J. Immunol.*, 169: 2126–2133.
  40. Prodeus, A. P., S. Goerg, L. M. Shen, O. O. Pozdnyakova, L. Chu, E. M. Alicot, C. C. Goodnow, and M. C. Carroll. (1998) A critical role for complement in maintenance of self-tolerance. *Immunity*. 9: 721–731.
  41. Carroll, MC. (2000) The role of complement in B cell activation and tolerance. *Adv. Immunol.* 74: 61–88.
  42. Franc, N.C., White, K., Ezekowitz, R.A. (1999) Phagocytosis and development: back to the future. *Curr. Opin. Immunol.* 11: 47–52.
  43. Ogden, C.A., deCathelineau, A., Hoffmann, P.R., Bratton, D., Ghebrehiwet, B., Fadok, V.A., Henson, P.M. (2001) C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *J. Exp. Med.*, 194: 781–795.
  44. Morgan, B.P., Gasque, P. (1997) Extrahepatic complement biosynthesis: where, when and why? *Clin. Exp. Immunol.*, 107: 1–7.
  45. Gasque P. (2004) Complement: a unique innate immune sensor for danger signals *Mol Immunol*; 41: 1089–1098

46. Petry, F., Reid, K.B.M., Loos, M. (1991) Gene-expression of the a-chain and B-chain of mouse C1q in different tissues and the characterization of the recombinant a-chain. *J. Immunol.*, 147: 3988–3993.
47. Gewurz, H., Ying, S.C., Jiang, H., Lint, T.F. (1993) Nonimmune activation of the classical complement pathway. *Behring Inst. Mitt.*. 93: 138–147.
48. Fujita T, Endo Y, Nonaka M. (2004) Primitive complement system—recognition and activation. *Mol Immunol*; 41: 103–111.
49. Rossi, V., Cseh, S., Bally, I., Thielens, N.M., Jensenius, J.C., Arlaud, G.J. (2001) Substrate specificities of recombinant mannan-binding lectin-associated serine proteases-1 and -2. *J. Biol. Chem.*; 276: 40880–40887.
50. Thiel S, Petersen SV, Vorup-Jensen T, Matsushita M, Fujita T, Stover CM, Schwaeble WJ, Jensenius JC. (2000) Interaction of C1q and mannanbinding lectin (MBL) with C1r, C1s, MBL associated serine proteases 1 and 2, and the MBL-associated protein MAp19. *J Immunol*; 165: 878–887.
51. Matsushita M, Fujita T. (1995) Cleavage of the third component of complement (C3) by mannose-binding protein-associated serine protease (MASP) with subsequent complement activation. *Immunobiology*; 194: 443–448.
52. Holmskov U, Thiel S, Jensenius JC. (2003) COLLECTINS AND FICOLINS: Humoral Lectins of the Innate Immune Defense. *Annu. Rev. Immunol.*, 21:547–78
53. Runza V L, Schwaeble W, Männel DN. (2008) Ficolins: Novel pattern recognition molecules of the innate immune response. *Immunobiology*; 213: 297–306
54. Muller-Eberhard, HJ. (1988) Molecular organization and function of the complement system. *Annu. Rev. Biochem.*; 57: 321–347.
55. Isenman DE. (1983) Conformational changes accompanying proteolytic cleavage of human complement protein C3b by the regulatory enzyme factor I and its cofactor H. Spectroscopic and enzymological studies. *J Biol Chem.*; 258(7):4238-44.
56. Farries, T.C., Lachmann, P.J., Harrison, R.A. (1988) Analysis of the interactions between properdin, the third component of complement (C3), and its physiological activation products. *Biochem. J.*; 252: 47–54.

57. Rus H, Cudrici C, Niculescu F. (2005) The role of the complement system in innate immunity. *Immunologic Research*; 33/2:103–112
58. Morgan, B.P. (1989) Complement membrane attack on nucleated cells—resistance, recovery and non-lethal effects. *Biochem. J.*, 264: 1–14.
59. Erdei A. A komplementrendszer. In: Gergely J, Erdei A (szerk), *Immunbiológia. Medicina, Budapest, 2000: 249-269.*
60. Martin, U., Bock, D., Arseniev, L., Tornetta, M.A., Ames, R.S., Bautsch, W., Kohl, J., Ganser, A., Klos, A. (1997) The human C3a receptor is expressed on neutrophils and monocytes, but not on B or T lymphocytes. *J. Exp. Med.*; 186: 199–207.
61. Zwirner, J., Gotze, O., Begemann, G., Kapp, A., Kirchhoff, K., Werfel, T. (1999) Evaluation of C3a receptor expression on human leucocytes by the use of novel monoclonal antibodies. *Immunology*; 97: 166–172.
62. Gasque, P., Singhrao, S.K., Neal, J.W., Wang, P., Sayah, S., Fontaine, M., Morgan, B.P. (1998) The receptor for complement anaphylatoxin C3a is expressed by myeloid cells and nonmyeloid cells in inflamed human central nervous system: analysis in multiple sclerosis and bacterial meningitis. *J. Immunol.*; 160: 3543–3554.
63. Prodeus A, Zhou X, Maurer M, Galli S, Carroll MC. (1997) Impaired mast cell-dependent natural immunity to acute septic peritonitis in C3 deficient mice. *Nature*; 390: 172–175.
64. Nardin A, Lindorfer MA, Taylor RP. (1999) How are immune complexes bound to the primate erythrocyte complement receptor transferred to acceptor phagocytic cells? *Mol Immunol.*; 36(13-14):827-35.
65. Carter RH, Fearon DT. (1992) CD19: lowering the threshold for antigen receptor stimulation of B lymphocytes. *Science*; 256: 105–107.
66. Barrington R, Zhang M, Fischer M, Carroll MC. (2001) The role of complement in inflammation and adaptive immunity. *Immunol Rev*; 180: 5–15
67. Józsi M, Manuelian T, Heinen S, Oppermann M, Zipfel PF. (2004) Attachment of the soluble complement regulator factor H to cell and tissue surfaces: relevance for pathology. *Histol Histopathol.*;19:251–8.

68. Ferreira VP, Pangburn MK, Cortés C. (2010) Complement control protein factor H: the good, the bad, and the inadequate. *Mol Immunol.*;47:2187–97.
69. Beinrohr L, Dobó J, Závodszy P, Gál P. (2008) C1, MBL–MASPs and C1-inhibitor: novel approaches for targeting complement-mediated inflammation. *Trends in Molecular Medicine*; 14 (12): 511-521.
70. Tichenor, J. R., L. B. Bledsoe, M. S. Opsahl, and D. S. Cunningham. (1995) Activation of complement in humans with a first-trimester pregnancy loss. *Gynecol. Obstet. Invest.*; 39: 79–82.
71. Gruchalla RS. (2003) Drug allergy. *J Allergy Clin Immunol*; 111: S548-559.
72. Lawson JA, Senthilselvan A. (2005) Asthma epidemiology: has the crisis passed? *Curr Opin Pulm Med*; 11: 79–84.
73. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. (2001) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev.*; 46(1-3):3-26.
74. Szebeni J, Alving C R, Savay S, Barenholz Y, Prieve A, Danino D, Talmon Y. (2001) Formation of complement-activating particles in aqueous solutions of Taxol: possible role in hypersensitivity reactions. *Int Immunopharm*; 1: 721-735.
75. Demoly, P., Lebel, B., Messaad, D., Sahla, H., Rongier, M., Daures, J.P., Godard, P., Bousquet, J. (1999) Predictive capacity of histamine release for the diagnosis of drug allergy. *Allergy*; 54: 500–506.
76. Szebeni J. (2005) Complement activation-related pseudoallergy: A new class of drug-induced acute immune toxicity. *Toxicology*; 216: 106–121
77. Hastings, KL. (2002) Implications of the new FDA/CDER immunotoxicology guidance for drugs. *Int. Immunopharmacol.*; 11, 1613–1618.
78. Shepherd GM. (2003) Hypersensitivity Reactions to Chemotherapeutic Drugs. *Clin Rev Allergy Immunol*; 24: 253-262.
79. Lieberman, P. (1991) Anaphylactoid reactions to radiocontrast materia. *Clin. Rev. Allergy*; 9, 319–338.

80. Napolovlu, K. (1997) The effect of epsilon-aminocaproic acid and prednisolone on the activation of the complement system due to X-ray contrast agents in rats in vitro.; *Eksp. Klin. Farmakol.*, 62–64.
81. Vik, H., Froyso, A., Sonstevold, A., Toft, K., Stov, P.S., Ege, T. (1995) Complement activation and histamine release following administration of roentgen contrast media. *Acta Radiol.; Suppl.* 399, 83–89.
82. Siraganian, R. P., and W. A. Hook. (1976) Complement-induced histamine release from human basophils. II. Mechanism of the histamine release reaction. *J. Immunol.*; 116:639-646.
83. Johnson, A. R., T. E. Hugli, and H. J. Muller-Eberhard. (1975) Release of histamine from rat mast cells by the complement peptides C3a and C5a. *Immunology.*; 28: 1067-1080.
84. Stimler-Gerard NP. (1986) Immunopharmacology of anaphylatoxin-induced bronchoconstrictor responses. *Complement.*; 3(3):137-51.
85. Szebeni J, Muggia F, Gabizon A, Barenholz Y. (2011) Activation of complement by therapeutic liposomes and other lipid excipient-based therapeutic products: prediction and prevention. *Adv Drug Deliv Rev.*;63(12):1020-30.
86. Descotes, J., Choquet-Kastylevsky, G. (2001) Gell and Coombs's classification: is it still valid? *Toxicology*; 158, 43–49.
87. Aronson, J.K., Ferner, R.E. (2003) Joining the DoTS: new approach to classifying adverse drug reactions. *Br. Med. J.*; 327, 1222–1225.
88. Maeda, H. (1991) SMANCS and polymer-conjugated macromolecular drugs: advantages in cancer chemotherapy. *Adv. Drug Delivery Rev.*; 6: 181–202.
89. Yuan, F., Leunig, M., Huang, S. K., Berk, D. A., Papahadjopoulos, D., and Jain, R. K. (1994) Microvascular permeability and interstitial penetration of sterically stabilized (stealth) liposomes in a human tumor xenograft. *Cancer Res.*; 54: 3352–3356.
90. Gabizon A. (2001) Stealth Liposomes and Tumor Targeting: One Step Further in the Quest for the Magic Bullet. *Clin Cancer Res*; 7, 223–225.

91. Gabizon, A., and Papahadjopoulos, D. (1992) The role of surface charge and hydrophilic groups on liposome clearance in vivo. *Biochim. Biophys. Acta*; 1103: 94–100.
92. Senior, J. H. (1987) Fate and behavior of liposomes in vivo: a review of controlling factors. *CRC Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 3: 123–193.
93. Ishida T, Yasukawa K, Kojima H, Harashima H, Kiwada H. . (2001) Effect of cholesterol content in activation of the classical versus the alternative pathway of rat complement system induced by hydrogenated egg phosphatidylcholine-based liposomes. *Int J Pharm*;224(1-2):69-79.
94. Schneider, P., Klein, R.M., Dietze, L., Sohngen, D., Leschke, M.,Heyll, A. (1998) Anaphylactic reaction to liposomal amphotericin (AmBisome). *Br. J. Haematol.* 102, 1108.
95. de Marie, S. (1996) Liposomal and lipid-based formulations of amphotericin B. *Leukemia*; 10 (Suppl. 2), S93–S96.
96. Cabriales, S., Bresnahan, J., Testa, D., Espina, B.M., Scadden, D.T., Ross, M., Gill, P.S. (1998) Extravasation of liposomal daunorubicin in patients with AIDS-associated Kaposi's sarcoma: a report of four cases. *Oncol. Nurs. Forum.* 25, 67–70.
97. Richardson, D.S., Kelsey, S.M., Johnson, S.A., Tighe, M., Cavenagh, J.D., Newland, A.C. (1997) Early evaluation of liposomal daunorubicin (DaunoXome, Nexstar) in the treatment of relapsed and refractory lymphoma. *Invest. New Drugs*; 15, 247–253.
98. Skubitz KM, Skubitz AP. (1998) Mechanism of transient dyspnea induced by pegylated-liposomal doxorubicin (Doxil). *Anticancer Drugs*; 9: 45–50.
99. Uziely B, Jeffers S, Isacson R, Kutsch K, Wei-Tsao D, Yehoshua Z, Libson E, Muggia FM, Gabizon A. (1995) Liposomal doxorubicin: antitumor activity and unique toxicities during two complementary phase I studies. *J Clin Oncol*; 13: 1777–1785.
100. Oku N, Namba Y. (1994) Long-circulating liposomes. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.*;11(4):231-70.
101. FDA Doxil Revised Draft Labeling. NDA 50-718/S-019, page 6.
102. Pinedo HM. (1986) Review: Development of new anticancer drugs. *Med Oncol Tumor Pharmacother*, 3, 63–69.



103. H. Gelderblom, J. Verweij, K. Nooter, A. Sparreboom. (2001) Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. *Eur J Cancer*; 37: 1590–1598.
104. Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT. (1971) Plant antitumor agents. VI: the isolation and structure of Taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc*; 93: 2325–2327.
105. Shepherd GM. (2003) Hypersensitivity reactions to chemotherapeutic drugs. *Clin Rev Allergy Immunol*; 24: 253–262.
106. Rowinsky EK, Eisenhauer EA, Chaudhry V, Chaudhry V, Arbuck SG. (1993) Clinical toxicities encountered with paclitaxel (Taxol). *Semin Oncol*, 20, 1–15.
107. Weiss RB, Donehower RC, Wiernik PH, Ohnuma T, Gralla RJ, Trump DL, Baker JR Jr, Van Echo DA, Von Hoff DD, Leyland-Jones B. (1990) Hypersensitivity reactions from Taxol. *J Clin Oncol*, 8, 1263–1268.
108. van Zuylen L, Verweij J, Sparreboom A. (2001) Role of formulation vehicles in taxane pharmacology. *Invest N Drugs*; 19: 125–141.
109. Hayes FA, Abromowitch, Green AA. (1985) Allergic reactions to teniposide in patients with neuroblastoma and lymphoid malignancies. *Cancer Treat Rep*; 69: 439–441.
110. Howrie DL, Ptachcinski RJ, Griffith P, Hardesty RJ, Rosenthal JT, Burckart GJ, Venkataramanan R. (1985) Anaphylactoid reactions associated with parenteral cyclosporine use: possible role of Cremophor EL. *Drug Intell Clin Pharm*; 19: 425–427.
111. Hüttel MS, Schou Olesen A, Stoffersen E. (1980) Complement-mediated reactions to diazepam with Cremophor as solvent (stesolid MR). *Br J Anaesth* ; 52, 77–79.
112. Watkins J, Ward AM, Appleyard TN. (1977) Adverse reactions to intravenous anaesthetic induction agents. *Br Med J*; 2: 1084–1085.
113. Szebeni, J., Muggia, F.M., Alving, C.R. (1998) Complement activation by Cremophor EL as a possible contributor to hypersensitivity to paclitaxel: an in vitro study. *J. Natl. Cancer Inst.*; 90: 300–306.

114. Van Zuylen L, Gianni L, Verweij J, Mross K, Brouwer E, LoosWJ, Sparreboom A. (2000) Interrelationships of paclitaxel disposition, infusion duration and Cremophor EL kinetics in cancer patients. *Anti-Cancer Drugs*; 11: 315–324.
115. Theis JGW, Liau-Chu M, Chan HSL, Doyle J, Greenberg ML, Koren G.. (1995) Anaphylactoid reactions in children receiving high-dose intravenous cyclosporine for reversal of tumor resistance: the causative role of improper dissolution of Cremophor EL. *J Clin Oncol*; 13: 2508–2516.
116. Volcheck GW, van Dellen RG. (1998) Anaphylaxis to intravenous cyclosporine and tolerance to oral cyclosporine: a case report and review of the literature. *Am Allergy Asthma Immunol*; 80: 159–163.
117. Sparreboom A, van Asperen J, Mayer U, Schinkel AH, Smit JW, Meijer DK, Borst P, Nooijen WJ, Beijnen JH, van Tellingen O. (1997) Limited oral bioavailability and active epithelial excretion of paclitaxel (Taxol) caused by P-glycoprotein in the intestine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94, 2031–2035.
118. van Zuylen L., Verweij J, Sparreboom A. (2001) Role of formulation vehicles in taxane pharmacology. *Investigational New Drugs*; 19: 125–141.
119. Syrigou E, Makrilia N, Notia I, W. Saif M., Kostas N. Syrigos. (2009) Hypersensitivity reactions to antineoplastic agents: an overview. *Anti-Cancer Drugs*, 20: 1–6.
120. Nannan Panday VR, Huizing MT, Ten Bokked Huinink WW, Vermorken JB, Beijnen JH. (1997) Hypersensitivity reactions to the taxanes paclitaxel and docetaxel. *Clin Drug Invest*; 14: 418–427.
121. Lorenz WM, Reimann HJ, Schmal A, Dormann P, Schwarz B, Neugebauer E, Doenicke A. (1977) Histamine release in dogs by Cremophor EL and its derivatives: oxyethelated oleic acid is the most effective constituent. *Agents Actions*; 7: 63–67.
122. A. Ardavanisa, D. Tryfonopouloa, I. Yiotisa, G. Gerasimidisa, N. Baziotis and G. Rigatos. (2004) Non-allergic nature of docetaxel-induced acute hypersensitivity reactions. *Anti-Cancer Drugs*, 15: 581–585.
123. Wills-Karp M. (2007) Complement activation pathways: a bridge between innate and adaptive immune responses in asthma. *Proc Am Thorac Soc.*;4(3):247-51.

124. Nagata S, Glovsky MM. (1987) Activation of human serum complement with allergens. I. Generation of C3a, C4a, and C5a and induction of human neutrophil aggregation. *J. Allergy Clin. Immunol*;80(1):24–32.
125. Maruo K, Akaike T, Ono T, Okamoto T, Maeda H. (1997) Generation of anaphylatoxins through proteolytic processing of C3 and C5 by house dust mite protease. *J. Allergy Clin. Immunol*;100(2):253–260.
126. Kew RR, Ghebrehiwet B, Janoff A. (1985) Cigarette smoke can activate the alternative pathway of complement in vitro by modifying the third component of complement. *J Clin Invest.*;75(3):1000-7.
127. Fukuoka Y, Xia HZ, Sanchez-Muñoz LB, Dellinger AL, Escribano L, Schwartz LB. (2008) Generation of anaphylatoxins by human beta-tryptase from C3, C4, and C5. *J Immunol.*;180(9):6307-16.
128. Haun JB, Baldwin WM 3rd, Alevriadou BR. (2005) Clearance of complement by human vascular endothelial cells: effects of hypoxia/reoxygenation and IL-1beta activation. *Transpl Int.*;18(4):475-82.
129. Nakano Y, Morita S, Kawamoto A, Suda T, Chida K, Nakamura H. (2003) Elevated complement C3a in plasma from patients with severe acute asthma. *J Allergy Clin Immunol.*;112:525–30.
130. Krug N, Tschernig T, Erpenbeck VJ, Hohlfeld JM, Köhl J. (2001) Complement factors C3a and C5a are increased in bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen provocation in subjects with asthma. *Am J Respir Crit Care Med.*;164:1841–3.
131. Marc MM, Korosec P, Kosnik M, Kern I, Flezar M, Suskovic S, Sorli J. (2004) Complement factors c3a, c4a, and c5a in chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.*;31:216–9.
132. Bowser C, Erstein DP, Silverberg JI, Nowakowski M, Joks R. (2010) Correlation of plasma complement split product levels with allergic respiratory disease activity and relation to allergen immunotherapy. *Ann Allergy Asthma Immunol.* ;104(1):42-9.
133. Marc MM, Kristan SS, Rozman A, Kern I, Flezar M, Kosnik M, Korosec P. (2010) Complement factor C5a in acute exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Scand J Immunol.*;71(5):386-91.

134. Zhang X, Köhl J. (2010) A complex role for complement in allergic asthma. *Expert Rev Clin Immunol.*; 6(2): 269–277.
135. de Heer HJ, Hammad H, Soullie T, Hijdra D, Vos N, Willart MA, Hoogsteden HC, Lambrecht BN. (2004) Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen. *J Exp Med*;200:89–98.
136. De Heer HJ, Hammad H, Kool M, Lambrecht BN. (2005) Dendritic cell subsets and immune regulation in the lung. *Semin Immunol*;17:295–303.
137. Gail G, Boulet L-P, Severino B, Watson R, Peng T, Obminski G, Prince P, Deschesnes F, Strinich T, K.J. Killian, Cote J, O’Byrne P, Wang Y (2009) The effect of C5 inhibition by eculizumab on allergen induced asthmatic responses in patients. *Mol. Immunol*;46:2837–2838.
138. Robbins RA, Nelson KJ, Gossman GL, Koyama S, Rennard SI. (1991) Complement activation by cigarette smoke. *Am J Physiol.*; 260(4 Pt 1):L254-9.
139. Allen-Gipson DS, Floreani AA, Heires AJ, Sanderson SD, MacDonald RG, Wyatt TA. (2005) Cigarette smoke extract increases C5a receptor expression in human bronchial epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther.*;314(1):476-82.
140. Kurzius-Spencer M, Foster K, Littau S, Richey KJ, Clark BM, Sherrill D, Goodman RB, Boitano S, Burgess JL. (2008) Tracheobronchial markers of lung injury in smoke inhalation victims. *J Burn Care Res.*;29(2):311-8.
141. G S. J. B. Rana, T P. York, J S. Edmiston, B K. Zedler, J G. Pounds, J N. Adkins, R D. Smith, Z Liu, G Li, B T. Webb, E L. Murrelle, J W. Flora. (2010) Proteomic biomarkers in plasma that differentiate rapid and slow decline in lung function in adult cigarette smokers with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Anal Bioanal Chem.*; 397:1809–1819.
142. Taube C, Thurman JM, Takeda K, Joetham A, Miyahara N, Carroll MC, Dakhama A, Giclas PC, Holers VM, Gelfand EW. (2006) Factor B of the alternative complement pathway regulates development of airway hyperresponsiveness and inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA.*; 103:8084-9.
143. Global Strategy for Diagnosis, Management, and Prevention of COPD. Available from: <http://www.goldcopd.org/>

144. Global Strategy for Asthma Management and Prevention, Global Initiative for Asthma (GINA) 2011. Available from: <http://www.ginasthma.org/>
145. Chanan-Khan, A., Szebeni, J., Savay, S., Liebes, L., Rafique, N.M., Alving, C.R., Muggia, F.M. (2003) Complement activation following first exposure to pegylated liposomal doxorubicin (Doxil): possible role in hypersensitivity reactions. *Ann. Oncol.*; 14, 1430–1437.
146. Dweik RA, Boggs PB, Erzurum SC, Irvin CG, Leigh MW, Lundberg JO, Olin A-C, Plummer AL. D. Robin Taylor, and on behalf of the American Thoracic Society Committee on Interpretation of Exhaled Nitric Oxide Levels (FENO) for Clinical Applications. (2011) An Official ATS Clinical Practice Guideline: Interpretation of Exhaled Nitric Oxide Levels (FENO) for Clinical Applications. *Am J Respir Crit Care Med.*;184:602–15.
147. Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Coates A, Crapo R, Enright P, van der Grinten CPM, Gustafsson P, Jensen R, Johnson DC, MacIntyre N, McKay R, Navajas D, Pedersen OF, Pellegrino R, Viegi G, Wanger J. (2005) Standardisation of spirometry. *Eur Respir J.*;26:319–38.
148. Quanjer PH, Tammeling GJ, Cotes JE, Pedersen OF, Peslin R, Yernault J-C. (1993) Lung volumes and forced ventilatory flows. Report Working Party Standardization of Lung Function Tests, European Community for Steel and Coal. Official Statement of the European Respiratory Society. *Eur Respir J.*;6 Suppl 16:5–40.
149. Guideline on validation of the Limulus Amoebocyte Lysate test as an end-product endotoxin test for human and animal parenteral drugs, biological products, and medical devices. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, December 1987.
150. AmBisome Prescribing Information. Astellas Pharma US, Inc. 2008.
151. Caelyx Prescribing Information. Schering-Plough Europe, 2006.
152. Szebeni J, Bedőcs P, Rozsnyay Z, Weiszhar Z, Urbanics R, Rosivall L, Cohen R, Garbuzenko O, Báthori G, Tóth M, Bünger R, Barenholz Y. (2012) Liposome-induced complement activation and related cardiopulmonary distress in pigs: factors promoting reactogenicity of Doxil and AmBisome. *Nanomedicine*;8(2):176-184.

153. Weiszhar Zsóka, Révész Csaba, Szalay Balázs, Vatankhah Ali, Ghaffari Reza, Báthori György, Treszl András, Vásárhelyi Barna, Szabó András, Rosivall László, Szebeni János, Rozsnyay Zoltán: Infúziós gyógyszer- és diagnosztikum készítmények komplement reaktogenitása. Magyar Élettani Társaság LXXIII. kongresszusa, Budapest, 2009. augusztus 27-29.
154. J Szebeni, Z Weiszhar, Z Rozsnyay, T Martinsky, J Kádas, J Lázár, L Takács, I Kurucz. (2013) Plasma Proteome Profiling with Monoclonal Antibody Libraries: A Pilot Biomarker Analysis for Nanomedicine-Induced Complement Activation. *Advances in Nanoparticles*; 2, 133-144.
155. Weiszhar Z, Czucz J, Révész C, Rosivall L, Szebeni J, Rozsnyay Z. (2012) Complement activation by polyethoxylated pharmaceutical surfactants: Cremophor-EL, Tween-80 and Tween-20. *Eur J Pharm Sci.*;45(4):492-8.
156. Zs Weiszhar, R Urbanics, T Bián, T Schneider, Z Horváth, I Láng, G Kiss, L Rosivall, J Szebeni. Relationship between in vitro complement activation by reactogenic anticancer drugs and infusion hypersensitivity in cancer patients. 5th European Conference for Clinical Nanomedicine (CLINAM), Basel, Switzerland, 6-9th May, 2012.
157. Z. Weiszhar, A. Bikov, G. Gálffy, L. Tamasi, I. Ungvari, C. Szalai, G. Losonczy, I. Horvath. (2013) Elevated complement factor H levels in asthmatic sputa. *J Clin Immunol*, 33 (2):496-505.
158. Z. Weiszhar, G. Gálffy, L. Tamasi, A. Bikov, I. Ungvari, C. Szalai, G. Losonczy, I. Horvath. Comparison of complement activation and regulatory protein levels in asthmatic and COPD sputa. 10th EAACI GA<sup>2</sup>LEN Immunology Winter School, Åre, Sweden, 12 – 15 February 2012.
159. Z Weiszhar, G Gálffy, Z Lázár, A Bikov, G Losonczy, I Horváth. Elevated sputum complement factor H levels in COPD: relationship with disease severity. Annual Congress of the European Respiratory Society (ERS), Vienna, Austria, 1-5 September 2012.
160. Moein Moghimi S, Hamad I, Bünger R, Andresen TL, Jørgensen K, Hunter AC, Baranji L, Rosivall L, Szebeni J. (2006) Activation of the human complement system

- by cholesterol-rich and PEGylated liposomes-modulation of cholesterol-rich liposome-mediated complement activation by elevated serum LDL and HDL levels. *J Liposome Res.*;16(3):167-74.
161. Hamad I, Hunter AC, Szebeni J, Moghimi SM. (2008) Poly(ethylene glycol)s generate complement activation products in human serum through increased alternative pathway turnover and a MASP-2-dependent process. *Mol Immunol*;46(2):225-32.
162. Szebeni, J., Baranyi, L., Savay, S., Bodo, M., Morse, D.S., Basta, M., Stahl, G.L., Bunger, R., Alving, C.R. (2000) Liposome induced pulmonary hypertension: Properties and mechanism of a complement-mediated pseudoallergic reaction. *Am. J. Physiol.* 279: H1319–H1328.
163. Wassef NM, Johnson SH, Graeber GM, Swartz GM Jr, Schultz CL, Hailey JR, Johnson AJ, Taylor DG, Ridgway RL, Alving CR. (1989) Anaphylactoid reactions mediated by autoantibodies to cholesterol in miniature pigs. *J Immunol.*; 143(9):2990-5.
164. Coors EA, Seybold H, Merk HF, Mahler V. (2005) Polysorbate 80 in medical products and nonimmunologic anaphylactoid reactions. *Ann Allergy Asthma Immunol.*; 95(6):593-9.
165. Lorenz WM, Reimann HJ, Schmal A, Dormann P, Schwarz B, Neugebauer E, Doenicke A. (1977) Histamine release in dogs by Cremophor EL and its derivatives: oxyethelated oleic acid is the most effective constituent. *Agents Actions*; 7: 63–67.
166. Woodburn K, Kessel D. (1994) The alteration of plasma lipoproteins by cremophor EL. *J Photochem Photobiol B.*; 22(3):197-201.
167. Kessel D, Woodburn K, Decker D, Sykes E. (1995) Fractionation of Cremophor EL delineates components responsible for plasma lipoprotein alterations and multidrug resistance reversal. *Oncol Res.*; 7(5):207-12.
168. A. Chonn, P.R. Cullis and D.V. Devine. (1991) The role of surface charge in the activation of the classical and alternative pathways of complement by liposomes, *J. Immunol.*; 146, 4234–4241.
169. Sparreboom, A., Scripture, C.D., Trieu, V., Williams, P.J., De, T., Yang, A., Beals, B., Figg, W.D., Hawkins, M., Desai, N. (2005) Comparative preclinical and clinical pharmacokinetics of a cremophorfree, nanoparticle albumin-bound paclitaxel (ABI-

- 007) and paclitaxel formulated in Cremophor (Taxol). *Clin. Cancer Res.*; 11, 4136–4143.
170. Pio R, Garcia J, Corrales L, Ajona D, Fleischhacker M, Pajares MJ, Cardenal F, Seijo L, Zulueta JJ, Nadal E, Witt C, Lozano MD, Schmidt B, Montuenga LM. (2010) Complement factor H is elevated in bronchoalveolar lavage fluid and sputum from patients with lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*;19:2665–72.
171. Chung KF, Rogers DF, Barnes PJ, Evans TW. (1990) The role of increased airway microvascular permeability and plasma exudation in asthma. *Eur Respir J.*;3:329–37.
172. Zanini A, Chetta A, Imperatori AS, Spanevello A, Olivieri D. (2010) The role of the bronchial microvasculature in the airway remodelling in asthma and COPD. *Respir Res.*;11:132.
173. J. D. Greenstein, P. W. Peake, J. A. Charlesworth. (1995) The kinetics and distribution of C9 and SC5b-9 in vivo: effects of complement activation *Clin Exp Immunol*; 100:40-46
174. Habbig S, Mihatsch MJ, Heinen S, Beck B, Emmel M, Skerka C, Kirschfink M, Hoppe B, Zipfel PF, Licht C. (2009) C3 deposition glomerulopathy due to a functional factor H defect. *Kidney Int.*;75(11):1230-4.
175. Strunk RC, Eidlen DM, Mason RJ. (1988) Pulmonary alveolar type II epithelial cells synthesize and secrete proteins of the classical and alternative complement pathways. *J Clin Invest.*;81:1419–26.
176. Morgan BP, Gasque P. (1997) Extrahepatic complement biosynthesis: where, when and why? *Clin Exp Immunol.*;107:1–7.
177. Bel EH, Sousa A, Fleming L, Bush A, Chung KF, Versnel J, Wagener AH, Wagers SS, Sterk PJ, Compton CH. (2011) Unbiased Biomarkers for the Prediction of Respiratory Disease Outcome (**U-BIOPRED**) Consortium, Consensus Generation. Diagnosis and definition of severe refractory asthma: an international consensus statement from the Innovative Medicine Initiative (IMI). *Thorax.*;66(10):910-7.
178. Ziegler-Heitbrock L, Frankenberger M, Heimbeck I, Burggraf D, Wjst M, Häussinger K, Brightling C, Gupta S, Parr D, Subramanian D, Singh D, Kolsum U, Boschetto P, Potena A, Gorecka D, Nowinski A, Barta I, Döme B, Strausz J, Greulich T, Vogelmeier C, Bals R, Hohlfeld JM, Welte T, Venge P, Gut I, Boland A, Olaso R,



- Hager J, Hiemstra P, Rabe KF, Unmüssig M, Müller-Quernheim J, Prasse A. (2012) The EvA study: aims and strategy. *Eur Respir J.*;40(4):823-9.
179. Zhang N, Truong-Tran QA, Tancowny B, Harris KE, Schleimer RP. (2007) Glucocorticoids enhance or spare innate immunity: effects in airway epithelium are mediated by CCAAT/enhancer binding proteins. *J Immunol.*;179:578–89.
180. Falus A, Walcz E, Brozik M, Rokita H, Füst G, Hajnal A, Meretey K. (1989) Stimulation of histamine receptors of human monocytoïd and hepatoma-derived cell lines and mouse hepatocytes modulates the production of the complement components C3, C4, factor B, and C2. *Scand J Immunol.*;30:241–8.
181. Schleich FN, Seidel L, Sele J, Manise M, Quaedvlieg V, Michils A, Louis R. (2010) Exhaled nitric oxide thresholds associated with a sputum eosinophil count  $\geq 3$  % in a cohort of unselected patients with asthma. *Thorax.*;65:1039–44.
182. Malinovschi A, Janson C, Holmkvist T, Norbäck D, Meriläinen P, Högman M. (2006) Effect of smoking on exhaled nitric oxide and flowindependent nitric oxide exchange parameters. *Eur Respir J.*;28:339–45.
183. Chalmers GW, MacLeod KJ, Thomson L, Little SA, McSharry C, Thomson NC. (2001) Smoking and airway inflammation in patients with mild asthma. *Chest*;120:1917–22.
184. Holliday EG, Smith AV, Cornes BK, Buitendijk GH, Jensen RA, Sim X, Aspelund T, Aung T, Baird PN, Boerwinkle E, Cheng CY, van Duijn CM, Eiriksdottir G, Gudnason V, Harris T, Hewitt AW, Inouye M, Jonasson F, Klein BE, Launer L, Li X, Liew G, Lumley T, McElduff P, McKnight B, Mitchell P, Psaty BM, Rohtchina E, Rotter JI, Scott RJ, Tay W, Taylor K, Teo YY, Uitterlinden AG, Viswanathan A, Xie S; Wellcome Trust Case Control Consortium 2, Vingerling JR, Klaver CC, Tai ES, Siscovick D, Klein R, Cotch MF, Wong TY, Attia J, Wang JJ. (2013) Insights into the genetic architecture of early stage age-related macular degeneration: a genome-wide association study meta-analysis. *PLoS One.*;8(1):e53830.
185. Biró A, Prohászka Z, Füst G, Blaskó B. (2006) Determination of complement factor H functional polymorphisms (V62I, Y402H, and E936D) using sequence-specific

primer PCR and restriction fragment length polymorphisms. *Mol Diagn Ther.*;10:303–10.

## 11. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

### *Értekezésben összefoglalt saját közlemények:*

1. Szebeni J, Bedőcs P, Rozsnyay Z, Weiszhár Z, Urbanics R, Rosivall L, Cohen R, Garbuzenko O, Báthori G, Tóth M, Bünger R, Barenholz Y. (2012) Liposome-induced complement activation and related cardiopulmonary distress in pigs: factors promoting reactogenicity of Doxil and AmBisome. *Nanomedicine*, 8(2):176-184. **Impact factor: 6.692\***
2. Weiszhár Z, Czúcz J, Révész C, Rosivall L, Szebeni J, Rozsnyay Z. (2012) Complement activation by polyethoxylated pharmaceutical surfactants: Cremophor-EL, Tween-80 and Tween-20. *Eur J Pharm Sci*, 45(4):492-8. **Impact factor: 3.212\***
3. Weiszhár Z, A. Bikov, G. Galffy, L. Tamasi, I. Ungvari, C. Szalai, G. Losonczy, I. Horvath. (2013) Elevated complement factor H levels in asthmatic sputa. *J Clin Immunol*, 33 (2):496-505. DOI: 10.1007/s10875-012-9807-8. **Impact factor: 3.077\***

### *Nem az értekezés témájában megjelent közlemények:*

1. A Bikov, A Bohacs, N Eszes; Weiszhár Z; I Ivancso; V Muller; J Rigo Jr.; Gy Losonczy; L Tamasi; I Horvath. (2012) Circulating and exhaled vascular endothelial growth factor in asthmatic pregnancy. *Biomarkers*, 17(7):648-54. **Impact factor: 2.215\***
2. Makó V, Czúcz J, Weiszhár Z, Kiszél P, Herczenik E, Matkó J, Prohászka Z, Cervenak L. (2010) Proinflammatory activation pattern of human umbilical vein endothelial cells induced by IL-1, TNF and LPS. *Cytometry Part A*, 77(10):962-70. **Impact factor: 3,749**
3. Gergely P Jr, Blazsek A, Weiszhár Z, Pazar B, Poor G. (2006) Lack of genetic association of the Toll-like receptor 4 (TLR4) Asp299Gly and Thr399Ile

polymorphisms with spondylarthropathies in a Hungarian population. *Rheumatology (Oxford)*, (10):1194-6. **Impact factor: 4,052**

4. É Morschl, I Bretus, I Pávó, L Topa, Weiszhar Z, F László. (2000) Nitric oxide-mediated mucus hypersecretion protects the stomach of ovariectomized rats. *Eur J Pharmacol*, 392(1-2): R5-R7. **Impact factor: 2,236**

\*: 2011-es impakt faktor alapján becsült érték.

## 12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A Semmelweis Egyetem Doktori Iskoláját **Prof. Füst György**<sup>†</sup> laborvezető és **Prof. Romics László**<sup>†</sup> témavezető támogatásával kezdtem meg nappali tagozatos hallgatóként a SE-ÁOK 3.sz. Belgyógyászati Klinika kutatólaborjában. Itt **dr. Cervenák Lászlótól** tanultam meg a tudományos kutatómunkához szükséges gondolkodásmódot, ő irányította mindennapi munkámat. Első gyermekem születése félbeszakította ezt az ösztöndíjat, amit 3 év kihagyás után a Seroscience Kft munkatársaként igyekeztem folytatni. Ezúton is köszönöm **Dr. Szebeni János** és **Prof. Rosivall László** igazgatóknak, hogy cégük alkalmazásába vettek, ahol a kutatómunka gyakorlati alkalmazásaival ismerkedhettem meg. Itt **dr. Rozsnyay Zoltán** irányította munkámat, akinek első saját cikkem megszületését is köszönhetem. Második szülési szabadságom alatt Prof. Romics László<sup>†</sup> témavezetőm sajnálatos halála miatt új témavezetőt és új témát kényszerültem választani. Hálás vagyok **Prof. Dr. Horváth Ildikónak**, hogy elvállalta a témavezetőséget, és lendületesen végigsegített a hátralévő úton a doktori munkám befejezéséig. Az új témám révén a SE Pulmonológiai Klinikájának állományába kerültem, ahol részállásban GYES mellett kezdtem meg küzdelmemet egy újabb publikációért. Köszönöm **Prof. Dr. Losonczy Györgynek**, hogy intézetében és doktori programjában fejezhetem be PhD dolgozatomat. Második elsőszerzős cikkem nem születhetett volna meg, ha nem tanít meg **dr. Bikov András** a nem invazív mintavételi technikák használatára, és **dr. Gálffy Gabriellával** nem segítenek a beteganyag összeállításában.

Köszönöm a mindennapi segítséget közvetlen munkatársaimnak (SE-ÁOK 3.sz. Belgyógyászati Klinika: dr. Makó Vera, dr. Kiszél Petra, Czúcz Judit és mások; Seroscience Kft: **Révész Csaba**, **Czúcz Judit** és mások; SE-ÁOK Pulmonológiai Klinika: dr. Bikov András, dr. Lázár Zsófia és mások) és a kollaborációs partnereknek (SE-ÁOK 1.sz. Gyermekeklinika: dr. Szabó András, dr. Szalay Balázs, dr. Kis Éva, Bernáth Mária; az Országos Onkológiai Intézet orvosai: dr. Láng István, dr. Schneider

Tamás, dr. Horváth Zsolt és nővérei; Országos Korányi TBC és Pulmonológiai Intézet: dr. Antus Balázs házi opponens, dr. Barta Imre, Mikoss Mária).

Végül, de nem utolsósorban nagy köszönet illeti kis családomat, legfőképp **édesanyámat**, hogy mindvégig mellettem álltak ezen a rögös úton, és bíztattak a hosszú távú kitartásra. Köszönettel tartozom **bátyámnak** az ábrák készítéséért, és Zentai Lászlónak az angol nyelvi lektorálásért. Gyermekeim, **Lilla és Júlia** erőt adtak mindehhez szerető ragaszkodásukkal, akiknek nagyon köszönöm elnéző türelmüket a számítógép mellett töltött jelentős idő miatt.