

A komplement rendszer szerepe nanorészecskékhez  
köthető kóros immunfolyamatokban

Doktori tézisek

**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

Dr. Gadó Klára, osztályvezető főorvos, PhD

Budapest  
2013

## **Bevezetés**

A nanorészecskék egyre nagyobb mennyiségben vannak jelen környezetünkben, ezért egyre fontosabb egészségügyi hatásaikkal is foglalkozni. Az emberi szervezetbe indirekt úton levegővételrel jutnak a tüdőbe ultrafinom részecskék, melyek közül a 10-100nm és az 1-10 $\mu$ m közötti mérettel rendelkező szemcsék ülepednek jól a kislégutakban. A 10 $\mu$ m-nél nagyobb részecskék normálisan kiszűrődnek a felső légutakban, de ha nagyon magas a légköri koncentrációjuk, bejuthatnak a tüdőbe. Ebbe a mérettartományba esnek az asztmát kiváltani képes mikrorészecskék: a pollenek, poratka ürülék, kutya-, macskaallergének, és penészgomba spórák. A 10-100nm közötti részecskék között találhatóak meg a COPD-vel kapcsolatba hozható dohányfüst, azbesztszemcsék, szénalapú tonerfesték. Mindezek a nano- és mikrorészecskék hosszú távú jelenléte a tüdőben krónikus gyulladást tartanak fenn, és többek között a komplement rendszert is mozgósíthatják. Míg az asztmában a bronchusokban figyelhető meg simaizom proliferáció és neovaszkularizáció, COPD-ben a mélyebben fekvő alveolusok fala degradálódik, és ezáltal csökken a légzőfelület.

A szervezetbe direkt úton is juttathatnak nanorészecskéket gyógyszer formájában. Ezekben az esetekben a kórokozókhoz hasonló méret miatt fokozott a veszélye az immunreakcióknak. Nanogyógyszerek esetében a komplement aktivációhoz kötődő pszeudoallergiás (CARPA) reakciók kialakulását írták le micelláris, liposzómális és mikrobuborék tartalmú gyógyszerek kapcsán. A CARPA reakció során a vérbe jutó infúziós nanogyógyszer aktiválja a komplement fehérjét, és a képződő C3a és C5a molekulák stimulálják a bazofil granulocitákat C3aR-jaikon és C5aR-jaikon keresztül. A sejtaktiváció következménye a granulumban tárolt hisztamin, triptáz és más proteázok kiürülése, és a membránból lipidmediátorok (leukotriének, prosztaglandinok, tromboxán, PAF) kihasadása. Mindezek a mediátorok anafilaktoid tünetek kialakulásáért felelősek bronchokonstriktív, érpermeabilitást és vérnyomást befolyásoló hatásuk révén.

IgE mediált allergia során ugyanezek a mediátorok képződnek az eozinofil granulociták és hízósejtek FcεR-on keresztüli aktiválódása révén, mely az asztmában pathomechanizmusának fontos része, és az asztmás bronchokonstriktiók kiváltója. Asztmában a komplement rendszer alternatív útvonalának tulajdonítanak kiemelt szerepet a bronchiális hiperreaktivitás kialakulásában. Az

alternatív útvonal regulátoráról, a H faktorról COPD-sek plazmájában is leírták down-regulált jelenlétét proteomikai elemzés útján.

## **Célkitűzés**

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 tarthatnak fenn a szervezetben. Mindkét esetben feltételezhető a komplement rendszer érintettsége. Ezért a következő célokat tűztük ki:

### ***1. komplement mediált pseudoallergia:***

- 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.
- 1.3. A gyógyszerek által kiváltott komplement aktiváció mechanizmusának megismerése:
- 1.4. A gyógyszerek által kiváltott komplement aktiváció klinikai jelentőségének vizsgálata:
  - A gyógyszerek által kiváltott komplement aktiváció és a hiperszenzitivitási reakció

kialakulásának esélye, erőssége közötti kapcsolat vizsgálata,

- A Paclitaxel által kiváltott komplement aktiváció és a kezelés hatékonysága közötti kapcsolat vizsgálata.

## ***2. krónikus gyulladáson alapuló obstruktív tüdőbetegségek:***

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

## **Módszerek**

A CARPA reakciókat modellező in vitro tesztekhez 140 egészséges önkéntestől gyűjtöttünk szérumot, és ebből a biobankból válogattuk a vizsgálati szérumokat a gyógyszeres tesztekhez. A vizsgált gyógyszerek méretét Zetasizer S (Malvern Ltd) készülékkel határoztuk meg. A tesztek során a vizsgálandó gyógyszert együtt inkubáltuk 37°C-on a kiválasztott szérumokkal, majd az inkubációs idő letelte után EDTA hozzáadásával állítottuk le a beinduló komplement aktivációt. A mintákból ezután ELISA módszerrel (Quidel Ltd) meghatároztuk a C3a, C5a, SC5b-9 és Bb koncentrációkat, és összevetettük a gyógyszerrel nem kezelt szérumok komplement szintjeivel. Mivel a koncentrációk normális eloszlást mutattak, párosított t-teszttel, illetve Bonferroni posztteszttel kiegészített ANOVA analízissel kerestük a szignifikáns komplementszint emelkedést mutató szérumokat.

A CARPA klinikai vizsgálatában 29 kemoterápia előtt álló tumorbetegtől gyűjtöttünk kiindulási szérum és plazma mintákat, majd a kemoterápia során monitoroztuk az anafilaktoid reakcióra utaló jeleket ICG-NHMS kardiográffal (ASKIT Kft). A kezelés előtt gyűjtött szérumokon a fent leírt módszerrel komplement aktivációs tesztet végeztünk a

kemoterápiára kijelölt gyógyszerrel, majd összevetettük a kemoterápiás kezelés során tapasztalt tünetek meglétével és erősségével. Az eredményeket ROC analízisnek vetettük alá, hogy megállapítsuk, hogy előrejelzi-e a pozitív komplement aktivációs teszt az anafilaktoid reakció kialakulását.

Az asztma és COPD vizsgálatok során 26 stabil asztmás, 17 stabil COPD-s beteget és 21 egészséges személyt vontunk be. Mindenkitől gyűjtöttünk plazmát, köpetet, és mértük a légzésfunkciós paramétereket és kilégzett levegő NO-tartalmát (FENO-t). Az asztmások aktuális állapotát ACT, a COPD-sek aktuális állapotát CAT kérdőívek segítségével vizsgáltuk. Mind plazmából, mind köpet felülűszóból mértük a SC5b-9 és a H faktor koncentrációját ELISA módszerrel (SC5b-9: Quidel, H faktor: Hycult). A különböző kohorszokban mért koncentrációkat egymással összevetettük Mann-Whitney és Kruskal-Wallis tesztek segítségével, mivel a köpet felülűszóban mért koncentrációk nem normális eloszlást követtek. A komplement koncentrációk és a betegek klinikai paramétereinek kapcsolatát Spearman-korrelációs teszt segítségével vizsgáltuk.

## **Eredmények**

Az AmBisome és a Caelyx komplement aktivációs képességének összehasonlításakor azt találtuk, hogy míg az AmBisome minden vizsgált szérumban komplement aktivációt okozott, addig a Caelyx-reaktív donorok aránya 0,7% volt. Az AmBisome Bb képződést váltott ki minden vizsgált szérumban, az SC5b-9 képződéssel arányos mértékben.

15 különböző fizikai-kémiai tulajdonságokkal rendelkező kemoterápiás gyógyszert szűrtünk komplement aktivációs képességre. Az eredmények azt mutatták, hogy kizárólag a micelláris szerkezetű Taxol és Taxotere váltott ki SC5b-9 termelődést a szérumok 25, illetve 40%-ában. A kis molekulájú platinok, a Gemzar, Vinblastin, Doxorubicin, Fluorouracil, Endoxan, Mitomycin és Irinotecan nem hatott a komplement aktivációra, csakúgy, mint a vizsgált két monoklonális antitest (Erbitux, Herceptin) sem. Kimutattuk, hogy a Taxolhoz hasonlóan a Taxotere komplement aktiváló hatása is a benne lévő micellaképzőnek, a Tween 80-nak köszönhető. Mind a Taxol oldószere, a Cremophor EL, mind a Taxotere oldószere, a Tween 80 kifejtett C3a és C5a képződést, ugyanakkor Bb képződést nem tudtunk kimutatni a vizsgált szérumokban. A Tween 80 és a Cremophor EL komplement aktiváló hatását friss szérumban és friss



plazmában is reprodukálni tudtuk. 100, 300 és 1000kDa-ra szűrt szérumokon végezve a komplement aktivációt azt tapasztaltuk, hogy már az 1000kDa-os szűrőn átszűrt szérumban sem megy végbe a Cremophor EL, illetve a Tween 80 által indukált komplement aktiváció. Ezzel szemben a zimozán csak a 100kDa-os szűrőn átszűrt szérumban nem fejtette ki aktiváló hatását. Tumorbetegek szérumában az egészségesekhez hasonlóan a Taxol és a Taxotere C3a, C5a és SC5b-9 képződést váltott ki.

Asztmás és COPD-s betegek légúti és plazma mintáit vizsgálva, COPD-ben magasabbnak találtuk a komplement aktiváció mértékét, mint egészségesekben és asztmásokban. Asztmában a súlyos asztmások légúti mintáiban magasabb SC5b-9 szinteket találtunk, mint enyhe-középsúlyos betegtársaiknál.

Ezzel szemben a H faktor szintje plazmában nem mutatott eltéréseket; légúti mintákban viszont mind az asztmások, mind a COPD-s betegek emelkedett H faktor szintekkel voltak jellemezhetőek. A súlyos asztmás alkohorszoban szignifikánsan magasabb légúti H faktor szinteket mértünk, mint egészségesekben és enyhe-középsúlyos asztmásokban. Asztmában a légúti H faktor szint pozitívan korrelált a súlyossággal, a gyógyszerelési lépcsőfokkal, a köpet eozinofil

sejtszámmal, és negatívan korrelált az asztma kontrollal és a légzésfunkciós értékekkel.

### **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 válthatnak 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 hörgőkben sokkal intenzívebben jelentkeznek, mint perifériás vérben nézve. A bronchiális H faktor szintek esetében asztmában pozitív összefüggést mutattunk ki a betegség súlyosságával és a légúti obstrukció mértékével. Csak további vizsgálatok után tudunk kijelentéseket tenni a H faktor és a komplement aktiváció szerepéről az asztma és COPD pathomechanizmusában, csakúgy, mint a H faktor esetleges biomarkerként való felhasználhatóságáról. A H faktor biomarkerként esetleg szerepet játszhat megfelelő megerősítés esetén pl. a súlyos asztma és COPD elkülönítésében, vagy a különböző kezelési protokollt igénylő asztma fenotípusok azonosításában.

## Saját publikációk 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, Weiszhár 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.