

A kilégzett levegő vizsgálatát befolyásoló metodikai és élettani tényezők

Doktori tézisek

Bikov András

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Horváth Ildikó egyetemi tanár, az orvostudományok doktora

Hivatalos bírálók: Dr. Novák Zoltán egyetemi docens, Ph.D.

Dr. Pavlik Gábor egyetemi tanár, az MTA tagja

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Cserhádi Endre egyetemi tanár, az MTA tagja

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Mezei Györgyi egyetemi adjunktus, Ph.D.

Dr. Hirschberg Andor főorvos, Ph.D.

Budapest
2013

1. Bevezetés

A kilégzett levegő vizsgálatát az orvostudomány már az ókor óta használja a különböző betegségek diagnosztizálására. Az 1970-es években Linus Pauling munkásságának köszönhetően bebizonyosodott, hogy a kilégzett levegő több ezernyi, a légúti és szisztémás anyagcserével illetve oxidatív stresszel szorosan összefüggő illékony molekulából áll. Az 1980-as években Sidorenko és munkatársai lecsapatták a kilégzett levegő páráját, és a kilégzett levegő kondenzátumában (exhaled breath condensate, EBC) sikeresen mutattak ki fehérjéket, ezzel lehetőséget teremtve a légutak nem illékony anyagainak vizsgálatára. Az elmúlt évtizedekben számtalan vizsgálat bizonyította, hogy a kilégzett levegő összetétele megváltozik a különböző pulmonális és extrapulmonális betegségekben. A napi gyakorlatban használt kilégzési tesztek száma ugyanakkor limitált. Ez elsősorban annak köszönhető, hogy a kilégzett levegő eredményeket befolyásoló metodikai és élettani tényezők még nem teljesen feltártak.

Az EBC-ben leggyakrabban vizsgált biomarker a pH. Feltételezhető, hogy az EBC kémhatását nemcsak a légúti folyadékcseppek savassága, hanem a kondenzátumba beleoldódó illékony szerves savak és bázisok is befolyásolják. Az EBC eredmények interpretálását komplikáló tényező továbbá, hogy a légúti folyadékcseppek alveoláris vízzel történő hígulása rendkívül változó (1:50-1:50000). Munkacsoportunk korábban validálta az EBC vákuumos feldolgozása után mért vezetőképesség méréseket a hígulás mértékének megbecsülésére, ugyanakkor korábban nem vizsgálták hígulás befolyását az EBC pH-ra.

A kilégzett illékony anyagok analízisére alkalmas technika az elektronikus orr, mely az emlős orrhoz hasonlóan nem képes a gázkeverék molekuláinak kvalitatív és kvantitatív tulajdonságainak meghatározására, de alkalmas a különböző gázkeverékek elkülönítésére azok mintázata alapján. A pulmonológiai kutatásokban leggyakrabban használt elektronikus orr a Cyranose 320, mely segítségével sikeresen lehetett elkülöníteni az asztmás, COPD-s és tüdőrákos betegek leheletét az egészségesekétől. Ugyanakkor a Cyranose 320 rövid- és hosszú-távú visszamérhetőségét kevés kutatás vizsgálta.

Ismert, hogy számos élettani folyamat, így a fizikai terhelés és a terhesség, is megváltoztathatja a kilégzett biomolekulák szintjét.

Fizikai terhelés során nő a perctérfogat, a percventilláció, megváltozik a légúti és szisztémás anyagcsere és oxidatív stressz, illetve különösen az asztmás légutakban lokális gyulladásoos válasz indul.

Az élettani terhesség során felgyorsul az anyagcsere, megváltozik a szisztémás oxidatív stressz mértéke illetve a keringő hormonok szintje, immuntolerancia alakul ki és a szervezet szaganyagokat, úgynevezett feromonokat választ ki.

A következőkben ismertetett vizsgálatok célja volt, hogy elsőként elemezze az eddig nem feltárt metodikai és élettani folyamatok jelentőségét a kilégzett biomarkerek összetételére, így elősegítse a módszer klinikai alkalmazását.

2. Célkitűzések

1. Az EBC pH összefüggésének vizsgálata a légúti folyadékcspek hígulásával
2. A Cyranose 320 rövid és hosszú távú visszamérhetőségének vizsgálata
3. A fizikai terhelés hatásának vizsgálata a kilégzett levegő illékony komponenseire és az EBC pH-ra.
4. A terhesség hatásának vizsgálata a kilégzett levegő illékony komponenseire.

3. Módszerek

3.1. A vizsgálatokba bevont önkéntesek

A vizsgálatokban összesen 308 önkéntes vett részt.

Az asztmás betegeket a Semmelweis Egyetem Pulmonológiai Klinika asztma ambulanciáján toboroztuk. A betegség diagnózisa a Global Initiative for Asthma (GINA) nemzetközi ajánlásnak megfelelően történt, a reverzibilis hörgőobstrukció (400 µg salbutamol inhalációja következtében a kiindulási FEV₁ több mint 12% és 200 ml-es növekedése) megerősítése után. Egyik asztmás beteg sem került kórházba betegsége fellángolása miatt, így az asztmás betegek stabilnak voltak tekinthetőek.

A várandós önkénteseket a Semmelweis Egyetem I. sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáján toboroztuk. A 78 terhes nő közül 63-t a terhesség 3. trimeszterében, 15-t a terhesség 2. trimeszterében vizsgáltunk.

Az egészséges kontrollok a Semmelweis Egyetem hallgatói és dolgozói közül kerültek ki.

Minden bevont vizsgálati alany a vizsgálatokat megelőzően önkéntes beleegyező nyilatkozatot írt alá.

3.2. Vizsgálati protokollok

Az EBC pH-hígulás összefüggését 55 egészséges és 57 asztmás önkéntesben vizsgáltuk. Minden vizsgálati személytől kilégzett levegő kondenzátum gyűjtés történt pH illetve a dilúció meghatározásának céljából. A két változót korreláltattuk az asztmás és egészséges csoportokban illetve az összes önkéntest egybevéve.

A Cyranose 320 elektronikus orr rövid távú visszamérhetőségét 56 egészségesben, hosszú távú reprodukálhatóságát 12 egészséges önkéntesben

vizsgáltuk. Előbbi esetben 10 perc különbséggel gyűjtöttünk kilégzett levegő mintát, utóbbi esetben 8 héten keresztül követtük a kilégzett levegőmintázat változását.

A fizikai terhelés hatását a kilégzett biomarkerekre 10 egészséges önkéntesben vizsgáltuk. A szabadtéri futás előtt, illetve azt követően 0, 15, 30 és 60 perccel kilégzett levegő mintákat gyűjtöttünk pH, illetve az illékony anyagok meghatározására.

A terhesség hatását 118 női önkéntesben vizsgáltuk. A vizsgálat első fázisában 48 3. trimeszterben lévő terhes és 25 nem-terhes vett részt. A levegőmintákból felállított statisztikai modellhez 15 2. trimeszterben lévő, 15 3. trimeszterben lévő terhest és 15 nem-terhest hasonlítottunk.

3.3. Kilégzett levegő tesztek

A kilégzett levegő kondenzátumát 10 percen keresztül gyűjtöttük az Rtube eszköz (Respiratory Research, Charlottesville, VI, USA) segítségével. A vizsgált alanyok nyugodt légzéssel lélegeztek és nem viseltek orrcsipeszt. A hűtőcsövet a vizsgálat előtt $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra fagyasztottuk. A mintákat a mérésekig $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -n tároltuk.

A kilégzett levegő illékony anyagait teflonbevonatú illetve poli-vinil-klorid mintazsákokba gyűjtöttük. A VOC-szűrőn át történő mély belégzést követően a reziduális térfogatig tartó kilégzés során kontrolláltuk a kilégzési sebességet (50 ml/sec) és ellenállást (15-20 cmH_2O). A kilégzett levegő első 500 ml-t (anatómiai holtter) elkülönítettük és az alveoláris teret reprezentáló levegőmintát elemeztük. A fizikai terhelés vizsgálata során ettől eltérő mintagyűjtést használtunk, a vizsgálati személyektől 1 kilégzés helyett 3-szor gyűjtöttünk

kilégzett levegőt, de az anatómiai holtter kizárása nélkül és a kilégzési sebességet nem kontrollálva.

Az EBC pH argonos kiűzési technikával, illetve széndioxidos telítési módszer segítségével került meghatározásra.

Az EBC hígulási faktorát a kondenzátum minták illetve fiziológiás sóoldat hígítási sorának 24 órán keresztül történő vákuumos lepárlása, majd desztillált vízzel történő visszavétele után határoztuk meg vezetőképesség mérésével.

A kilégzett levegő illékony anyagait a Cyranose 320 elektronikus orr (Smiths Detection, Pasadena, USA) segítségével elemeztük. A kilégzett vízpára zavaró hatását a 4 vízre szenzitív szenzor (5,6,23,31) kizárásával elimináltuk. A 28 szenzorjelet, melyek a vizsgált anyag illetve a háttér gáz (vizsgálataink során a VOC-szűrt szobalevegő) közötti arányokból adódnak, főkomponens analízis (principal component analysis, PCA) segítségével 3 főkomponensre (PC) redukáltuk.

3.4. Statisztikai analízis

A vizsgálataink során kereskedelmi forgalomban kapható statisztikai programokat használtunk (Statistica 8.0, SPSS 15, Graph Pad Prism 5.03).

Az EBC pH-t és hígulást az asztmás és egészséges csoportok között Mann-Whitney teszttel hasonlítottuk össze. Az EBC pH és hígulás közötti összefüggést Spearman-korrelációval vizsgáltuk.

A Cyranose 320 rövid távú visszamérhetősége során a két 10 perc különbséggel levett mintákat reprezentáló főkomponenseket párosított t-próbával és Pearson-korrelációval hasonlítottuk össze. A hosszú távú visszamérhetőség során a főkomponenseket ANOVA-val és Pearson-korrelációval hasonlítottuk össze.

A fizikai terhelés hatását a kilégzett biomarkerekre „mixed-linear model” teszt segítségével elemeztük. Az EBC pH-t a kilégzett illékony anyagokkal Pearson-teszttel hasonlítottuk össze.

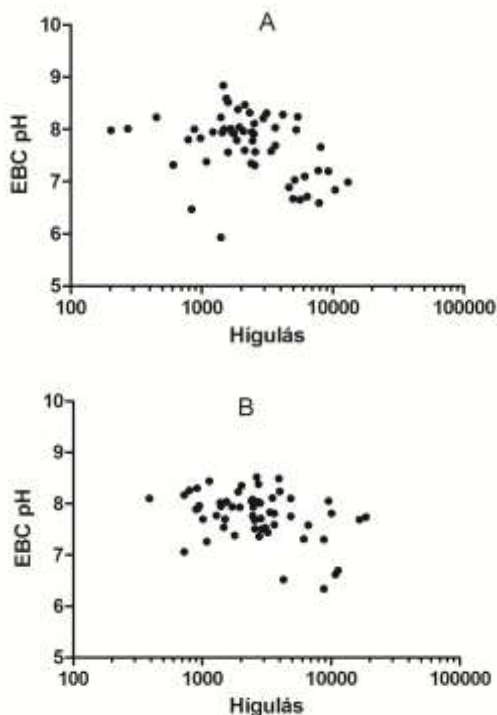
A terhes és nem terhes csoportokat egy diszkriminációs analízis, a Mahalanobis távolság segítségével hasonlítottuk össze. Szintén a Mahalanobis távolságot használtuk, amikor a 45 új mintát hasonlítottuk a korábban felállított modellhez. A kilégzett levegőmintákat reprezentáló főkomponenseket a terhességi korrrelációval Pearson-teszttel korreláltattuk.

4. Eredmények

4.1. Az EBC pH-hígulás összehasonlítása

Nem találtunk szignifikáns különbséget az asztmás és egészséges csoportok között sem az EBC pH-t (7,91 (7,31-8,04)) sem a hígulás mértékét (2326 (1460-4630) vs. 2646 (1435-3969)) tekintve ($p>0,05$).

Az EBC pH és hígulás között szignifikáns, negatív korreláció állt fenn mind az asztmás ($r=-0,35$, A), mind az egészséges ($r=-0,29$, B) csoportokon belül (1. Ábra).



1. Ábra

Az EBC pH és hígulás közötti összefüggés az asztmás (A) és egészséges (B) csoportokban

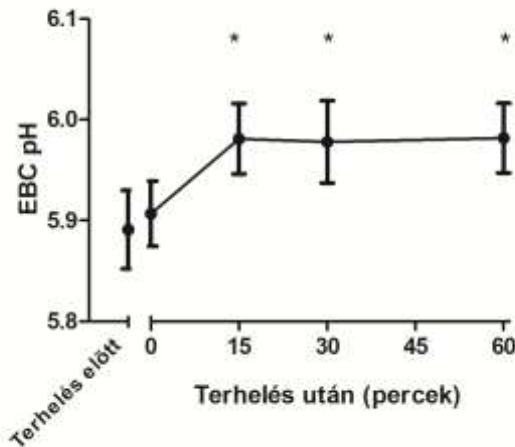
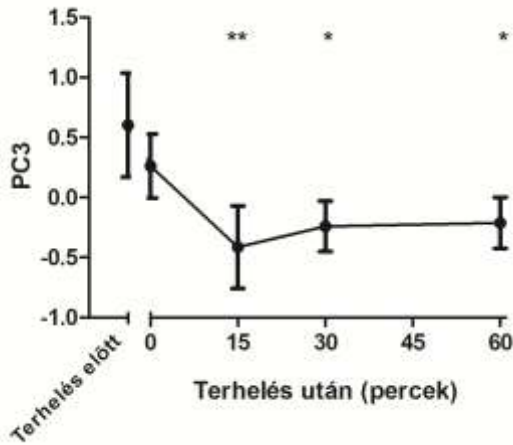
4.2. *A Cyranose 320 visszamérhetősége*

Nem találtunk szignifikáns különbséget a két, 10 perc különbséggel legyűjtött minta között egyik főkomponenst tekintve sem ($p=0,85$, $0,41$ és $0,63$, PC1, PC2 és PC3). Ugyanakkor a két minta között szignifikáns összefüggés állt fenn mindhárom főkomponens esetén ($r=0,51$, $0,75$, és $0,37$, PC1, PC2 és PC3, $p<0,05$).

Az elektronikus orr eredményeket 8 héten keresztül követve nem találtunk szignifikáns eltérést a vizsgált időszak során ($p>0,05$).

4.3. *A fizikai terhelés hatása a kilégzett biomarkerekre*

A fizikai terhelés hatására szignifikánsan nőtt az EBC pH és megváltozott a kilégzett levegő illékony anyagainak összetétele (2. Ábra).



2.Ábra

A fizikai terhelés hatása a kilégzett illékony anyagok összetételére és az EBC pH-ra

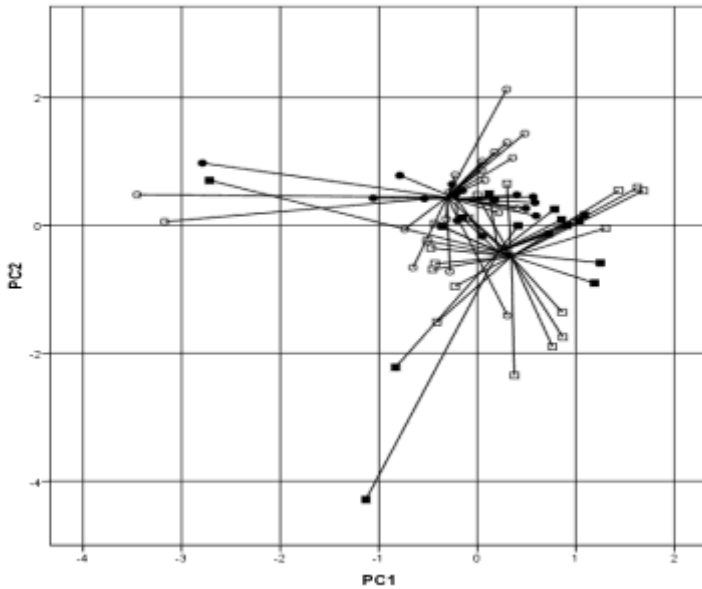
Szignifikáns összefüggést kaptunk az EBC pH és az illékony anyagok összehasonlítása során ($p=0,01$, $r=-0,34$).

4.4. A terhesség hatása a kilégzett levegő illékony anyagraira

A 48 terhes és 25 nem-terhes önkéntes kilégzett levegőmintáit összehasonlítva szignifikáns különbséget tapasztaltunk ($p=0,015$). Ha kizártuk a társbetegségekből (allergiás nátha, cukorbetegség, hypothyreosis) szenvedőket, illetve a dohányos személyeket a különbség mértéke magasabb volt ($p=0,001$).

A kilégzett levegő illékony anyag összetétele szignifikáns összefüggést mutatott a terhességi hetek számával ($p=0,01$, $r=-0,36$).

A 20 terhes és 18 nem-terhes egészséges, nem dohányos nőben felállított modellhez hasonlítva a 15 3. trimeszterben lévő terhest és a 15 nem-terhest az elektronikus orr 87% szenzitivitással, 73% specifitással, 76% pozitív prediktív értékkel, 84% negatív prediktív értékkel sorolta be (3. Ábra). Ugyanakkor a 15 2. trimeszterben lévő várandós önkéntest nem tudta elkülöníteni egyik csoporttól sem.



3. Ábra

Az ábrán a körök a terhes, a négyzetek a nem-terhes mintákat jelzik, az üres jelek az eredeti (20 terhes és 18 nem-terhes), a tömött jelek az új (15 terhes és 15 nem-terhes) mintákat jelzik.

5. Következtetések

5.1. *Az EBC pH-hígulás összehasonlítása*

- Nincs szignifikáns különbség a stabil asztmások és egészségesek között sem az EBC pH-ban, sem az EBC hígulásában.
- Az EBC pH-t befolyásolja a légúti folyadékcspek hígulásának mértéke

5.2. *A Cyranose 320 visszamérhetősége*

- Az elektronikus orr eredmények reprodukálhatóak rövid (1 nap) és hosszú távon (8 hét).

5.3. *A fizikai terhelés hatása a kilégzett biomarkerekre*

- A fizikai terhelés hatására nő az EBC pH és megváltozik a kilégzett levegő illékony anyag összetétele.
- Az EBC pH-t befolyásolják a kilégzett levegő illékony anyagai.

5.4. *A terhesség hatása a kilégzett levegő illékony anyagaira*

- A terhesség megváltoztatja a kilégzett levegő illékony anyagainak összetételét.
- A kilégzett illékony anyagok termelődése megváltozik a terhesség során.

6. Saját publikációk jegyzéke

6.1. *A disszertáció témájához kapcsolódó közlemények*

- Kovacs D, **Bikov A**, Losonczy G, Murakozy G, Ildiko Horvath. (2013) Follow up of lung transplant recipients using electronic nose. J Breath Res, 7: 017117.

Impakt faktor: 2.541 (2011)

- **Bikov A**, Galffy G, Tamasi L, Lazar Z, Losonczy G, Horvath I. (2012) Exhaled breath condensate pH is influenced by respiratory droplet dilution. J Breath Res, 6: 046002.

Impakt faktor: 2.541 (2011)

- **Bikov A**, Pako J, Kovacs D, Tamasi L, Lazar Z, Rigo J, Losonczy G, Horvath I. (2011) Exhaled breath volatile alterations in pregnancy assessed with electronic nose. Biomarkers, 16: 476-84.

Impakt faktor: 2.215

- **Bikov A**, Lazar Z, Schandl K, Antus B, Losonczy G, Horvath I. (2011) Exercise changes volatiles in exhaled breath assessed by an electronic nose. Acta Phys Hung, 98: 321-328.

Impakt faktor: 0.821

Σ Impakt faktor: 8.118

6.2. *A disszertáció témájához nem kapcsolódó közlemények*

- Eszes N, **Bikov A**, Lazar Z, Bohacs A, Muller V, Stenczer B, Rigo J, Losonczy G, Horvath I, Tamasi L. (2013) Changes in exhaled breath condensate pH in healthy and asthmatic pregnant women. Acta Obstet Gynecol Scand, 92: 591-597.

Impakt faktor: 1.771 (2011)

- Weiszhar Z, **Bikov A**, Galffy G, Tamasi L, Ungvari I, Szalai C, Losonczy G, Horvath I. (2013) Elevated Complement Factor H Levels in Asthmatic Sputa. J Clin Immunol, 33: 496-505.

Impakt faktor: 3.077 (2011)

- **Bikov A**, Bohacs A, Eszes N, Weiszhar Z, Ivancso I, Muller V, Rigo J, Losonczy G, Tamasi L, Horvath I. (2012) Circulating and exhaled vascular endothelial growth factor in asthmatic pregnancy. Biomarkers, 17: 648-54.

Impakt faktor: 2.215 (2011)

- Eszes N, Bohács A, Cseh Á, Toldi G, **Bikov A**, Ivancsó I, Müller V, Horváth I, Rigó J, Vásárhelyi B, Losonczy G, Tamási L. (2012) Relation of circulating T cell profiles to airway inflammation and asthma control in asthmatic pregnancy. Acta Phys Hung, 99: 302-10.

Impakt faktor: 0.821 (2011)

- Ungvári I, Hullám G, Antal P, Kiszél P, Gézsi A, Hadadi É, Virág V, Hajós G, Millinghoffer A, Nagy A, Kiss A, Semsei Á, Temesi G, Melegh B, Kisfali P, Széll M, **Bikov A**, Gállfy G, Tamási L, Falus A, Szalai C. (2012) Evaluation of a partial genome screening of two asthma susceptibility regions using Bayesian network based Bayesian multilevel analysis

of relevance. Plos One, 7: e33573.

Impakt faktor: 4.092 (2011)

- Ungvári I, Hadadi E, Virág V, **Bikov A**, Nagy A, Semsei A, Gálffy G, Tamási L, Horváth I, Szalai C. (2012) Implication of BIRC5 in asthma pathogenesis. Int Immun, 24: 293-301.

Impakt faktor: 3.415 (2011)

- Toldi G, Molvarec A, Stenczer B, Müller V, Eszes N, Bohács A, **Bikov A**, Rigó J, Vásárhelyi B, Losonczy G, Tamási L. (2011) Peripheral Thelper1/Thelper2/Thelper17/ regulatory T cell balance in asthmatic pregnancy. Int Immun, 23: 669-77.

Impakt faktor: 3.415

- Gajdocsi R, **Bikov A**, Antus B, Horvath I, Barnes PJ, Kharitonov SA. (2011) Assessment of Reproducibility of Exhaled Hydrogen Peroxide Concentration and the Effect of Breathing Pattern in Healthy Subjects. J Aerosol Med Pulm Drug Deliv, 24: 271-275.

Impakt faktor: 2.200

- **Bikov A**, Gajdócsi R, Huszar É, Szili B, Antus B, Losonczy G, Horváth I. (2010) Exercise increases exhaled breath condensate cysteinyl leukotriene concentration in asthmatic patients. J Asthma, 47:1057-62.

Impakt faktor: 1.341

- Lázár Z, Cervenak L, Orosz M, Gálffy G, Komlósi ZI, **Bikov A**, Losonczy G, Horváth I. (2010) Adenosine triphosphate concentration of exhaled breath condensate in asthma. Chest, 138: 536-42.

Impakt faktor: 6.519

- Tamasi L, Bohács A, **Bikov A**, Andorka Cs, Rigó J Jr. Losonczy Gy, Horváth I. (2009) Exhaled nitric

oxide in pregnant healthy and asthmatic women. *J Asthma*, 46: 786-791.

Impakt faktor: 1.372

- Lázár Z, Huszár É, Kullmann T, Barta I, Antus B, **Bikov A**, Kollai M, Horváth I. (2008) Adenosine triphosphate in exhaled breath condensate of healthy subjects and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Infl Res*, 57: 367-373.

Kumulatív impakt faktor: 39.813