

Bronchiolitis obliterans kialakulásának vizsgálata patkány trachea transzplantációs modellen

Doktori értekezés

Dr. Fillinger János

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Antus Balázs osztályvezető, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Müller Veronika egyetemi docens, Ph.D.
Dr. Csoma Zsuzsanna adjunktus, Ph.D.

Szigorlati Bizottság elnöke: Dr. Nagy Péter, egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Pápay Judit egyetemi adjunktus, Ph.D.
Dr. Simon Károly, egyetemi magántanár

Budapest
2011

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	4
2. Bevezetés	6
3. Irodalmi háttér	9
3.1. Tüdőtranszplantáció rövid története.....	9
3.2. A bronchiolitis obliterans szindróma definíciója	11
3.3. A bronchiolitis obliterans szindróma klinikai képe	11
3.4. Bronchiolitis obliterans szövettana	12
3.5. Bronchiolitis obliterans pathogenesisé.....	13
3.6. Rizikófaktorok.....	19
3.6.1. Hisztokompatibilitás	19
3.6.2. Akut kilökődés.....	20
3.6.3. Ischaemiás-reperfúziós károsodás	21
3.6.4. Életkor	21
3.6.5. CMV infekció	22
3.7. Állatmodellek a bronchiolitis obliterans vizsgálatára	24
3.7.1. Teljes tüdő transzplantáció	24
3.7.2. Heterotrop trachea transzplantáció	25
3.7.4. Nagy állatmodellek.....	26
4. Célkitűzések	28
5. Módszerek	29
5.1. Első kísérletsorozat	29
5.1.1. Állatok	29
5.1.2. Transzplantáció.....	29
5.1.3. Kísérleti protokoll.....	29
5.1.4. Szövettan	30
5.1.5. RNS izoláció és reverz-transzkripció	30
5.1.6. Real-time PCR.....	31
5.1.7. Statisztikai analízis	31
5.2. Második kísérletsorozat	32
5.2.1. Állatok	32

5.2.3. Kísérleti protokoll.....	32
5.2.4. Szövettan	32
5.2.5. Molekuláris analízis.....	33
5.2.6. Statisztikai analízis	33
5.3. Harmadik kísérletsorozat	33
5.3.1. Állatok	33
5.3.3. Kísérleti protokoll.....	34
5.3.4. Szövettan	34
5.3.5. Molekuláris analízis.....	35
5.3.6. Statisztikai analízis	35
6. Eredmények	36
6.1. Első kísérletsorozat	36
6.1.1. Szövettan	36
6.1.2. Real-time PCR	37
6.2. Második kísérletsorozat	38
6.2.1. Állatok	38
6.2.2. Szövettan	38
6.2.3. Molekuláris analízis.....	40
6.3. Harmadik kísérletsorozat	41
6.3.1. Állatok	41
6.3.2. Szövettan	41
6.3.3. Molekuláris analízis.....	43
7. Megbeszélés	45
8. Következtetések.....	54
9. Összefoglalás	55
10. Summary.....	56
11. Irodalomjegyzék	57
12. Saját közlemények bibliográfiai adatai.....	78
12.1. Közlemények az értekezés tárgykörében	78
12.2. Közlemények az értekezés tárgykörén kívül.....	78

1. Rövidítések jegyzéke

ACE	angiotenzin-konvertáló enzim
APC	antigénprezentáló sejt
BAL	bronchoalveolaris lavage
BN	Brown-Norway
BO	bronchiolitis obliterans
BOS	bronchiolitis obliterans szindróma
CF	cisztás fibrózis
COPD	krónikus obstruktív tüdőbetegség
CMV	cytomegalovírus
DTH	késői-típusú túlérzékenységi reakció
EBV	Epstein-Barr vírus
ET	endothelin
HHV	humán herpervírus
IGF-1	insulin-like growth factor-1
IL	interleukin
INF- γ	interferon- γ
IPF	idiopathias tüdőfibrózis
ISHLT	International Society of Heart and Lung Transplantation
Lew	Lewis
LMWH	kis molekulásúlyú heparin
MCP-1	monocyta chemotactic protein-1
MHC	Major Histocompatibility Complex
NO	nitrogén-monoxid
OAD	obliteratív légúti betegség
OB	obliteratív bronchiolitis
PDGF-A	platelet-derived growth factor-A
PGI ₂	prostaglandin I ₂
PPH	primer pulmonalis hipertonia
RANTES	regulated on activation, normal T-cell-expressed and -secreted
RAS	renin-angiotenzin rendszer

TGF- β_1	transforming growth factor- β_1
TNF- α	tumor nekrosis faktor- α
VCAM-1	vascularis sejtadhéziós molekula-1

2. Bevezetés

A légzőszervi megbetegedések közül számos kórkép vezet végállapotú tüdőbetegség kialakulásához. Ezekben az esetekben – a megfelelő betegkiválasztás után – a betegek számára a tüdőtranszplantáció jelenti az egyedüli esélyt az életminőség javítására, illetve a túlélésre. Az elmúlt két évtized során a műtéti technika fejlődésének, az újabb és hatékonyabb immunszuppresszív gyógyszerek bevezetésének, a peri- és posztoperatív betegellátás korszerűsödésének és a transzplantációs immunológia területén elért tudományos eredményeknek köszönhetően a sikeres tüdőátültetések száma sokszorosára emelkedett.

Korábban az akut kilökődés megelőzése, a beültetett szerv megtartása jelentette a legnagyobb kihívást a tüdőtranszplantáció után. A nagy transzplantációs centrumok adatai szerint a modern immunszuppresszív gyógyszerek bevezetése jelentősen visszaszorította az életet veszélyeztető akut kilökődések gyakoriságát. A hatékonyabb immunszuppresszió – a korábbi várakozásokkal ellentétben – azonban csak kismértékben befolyásolta a transzplantátumok hosszú távú túlélését.

Napjainkban, a transzplantált tüdő késői elvesztésének leggyakoribb oka a krónikus szervdiszfunkcióval járó obliteratív bronchiolitis (OB) (1,2). A kórkép legfontosabb sajátossága a bronchiolusok falának fibroproliferatív átépülése és irreverzibilis elzáródása. A folyamat a bronchiolusok epitheliumának immun- és nem immunfolyamatok által kiváltott sérülése okozta leukocytás beszűrődésével (lymphocitás bronchiolitis) indul, amely kemokinek, valamint növekedési faktorok termelésével fibroblaszt és myofibroblaszt felszaporodást indukál a bronchiolus szubmukózális rétegeiben. Az egymásra épülő és egymást folyamatosan generáló reakciók a bronchiolus fal koncentrikus/excentrikus fibrosus megvastagodását, lumenének szűkületét, illetve elzáródását okozzák. Klinikailag, a kiváltó októl függetlenül megfigyelhető krónikus szervdiszfunkciót bronchiolitis obliterans szindrómának (BOS) nevezzük, melyben folyamatos légzésfunkció romlás észlelhető. Jelenleg a kórképnek sem pontos pathofiziológiája, sem hatékony kezelése nem ismert.

A BOS nemzetközileg elfogadott állatmodellje a heterotrop patkánytrachea transzplantációs modell (3,4), amely hazánkban először az Országos Korányi TBC és Pulmonológiai Intézet Kórleltani Osztályán került beállításra (5). A patkánymodellben

trachea átültetés történik, melynek falában a humán OB-hez hasonló hegesedési folyamat indul el (obliteratív légúti betegség, OAD) és a trachea graftok lumene fibrotikus granulációs szövetrel rövid idő alatt elzáródik. A trachea falának fibroproliferatív átépülésével párhuzamosan a légúti epithelium is elpusztul, nekrotizál.

Az elmúlt évtizedben a szervtranszplantáltak körének folyamatos követése során figyeltek fel arra, hogy egyes parenchymás szervek átültetése esetében a donor és a recipiens nemi különbözőségének jelentősége van a transzplantáció késői kimenetelére és/vagy az allograftok kilökődése szempontjából (6,7). Feltételezhető, hogy a nemi különbözőségek kialakulásában genetikai tényezőknek és a nemi hormonoknak egyaránt szerepük van. E kérdések tüdőtranszplantált betegek körében kevésbé tisztázottak, experimentális adatok nem állnak rendelkezésre.

A nemi különbözőség mellett az BOS kialakulásában számos egyéb tényező is szerepet játszhat. Az angiotenzin II, a renin-angiotenzin rendszer (RAS) fő effektor peptidje haemodinamikai hatásai mellett, számos szervben fibroproliferációt indukáló hatással is rendelkezik. Hasonlóan, a vazokonstriktor hatású endothelin (ET)-1-nek számos szövetben pro-fibrotikus és növekedést indukáló hatása ismert. Számos megfigyelés támasztja alá e két molekula központi pathofiziológiai szerepét szív- és vesetranszplantátumok krónikus kilökődésében (8,9). A RAS és az ET rendszer farmakológiai gátlása terápiás hatású, amely a vesében a krónikus allograft nephropathia, míg a szívben a graft vasculopathia progressziójának csökkenésében nyilvánul meg. Néhány évvel ezelőtt állatkísérletekben azt is igazolták, hogy a RAS és az ET rendszer részt vesz az OAD kialakulásában (10,11). E két rendszer között számos, a szöveti károsodást elősegítő interakció ismert. A két rendszer együttes gátlása során a kedvező hatások összeadódnak. Jelenleg nem ismert, hogy a két rendszer együttes gátlása milyen terápiás hatású az OAD kialakulása szempontjából.

A thromboemboliás megbetegedések profilaxisában és kezelésében széles körben használt kis molekulású heparinok (LMWH) különböző lánchosszúságú glükózaminoglikán molekulák keveréke. Kísérletes eredmények alapján elmondható, hogy a heparin immunszuppresszív és antiproliferatív hatással is rendelkezik, amely független az antikoaguláns aktivitásától (12,13). Úgy tűnik, hogy a heparin immunszuppresszív és antiproliferatív hatásai a szervtranszplantáció területén is jelentőséggel bírnak, legalábbis experimentális körülmények között. LMWH adásával kedvező

hatást tudtak kimutatni patkány bőr- és szívtranszplantációs modellekben (14), amely felveti annak lehetőségét, hogy e készítmények tüdőtranszplantációs állatmodellben is jótékony hatással rendelkeznek.

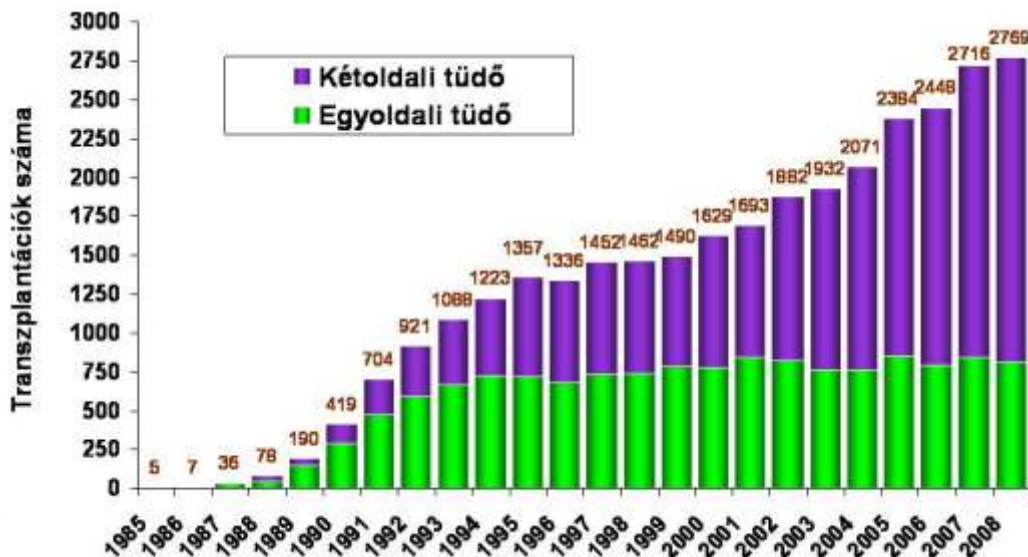
Jelen disszertáció témája szorosan kapcsolódik a fenti, eddig minden részletében nem tanulmányozott és tudományosan kevésbé feltárt megállapításokhoz. Munkánk megtervezésekor – az irodalomban közölt eredményekből kiindulva – két szempont vezérelt bennünket. Egyrészt, a nemi különbségek hatását kívántuk pontosabban megismerni az OAD pathogenesis során. Másrészt, a RAS és az ET rendszer, valamint a heparinnal összefüggő élettani folyamatok befolyásolásán keresztül a terápiás beavatkozás lehetőségét az említett kórképben.

3. Irodalmi háttér

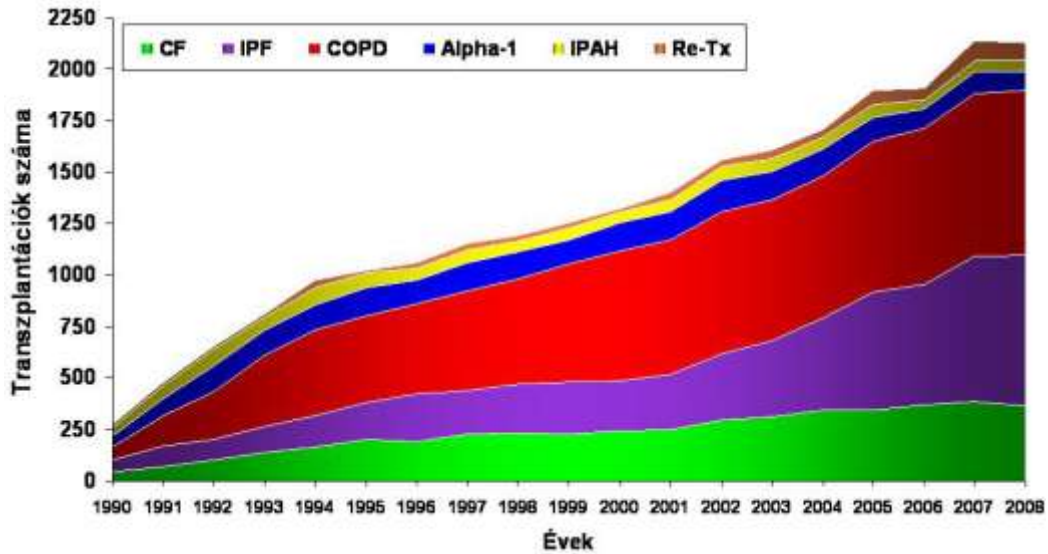
3.1. Tüdőtranszplantáció rövid története

Az első tüdőtranszplantációt emberen 1963-ban James Hardy végezte Missouriban (15). A recipiens egy súlyosan emphysemás beteg volt bal főhörgőt obstruáló carcinomával. A beteg a bal oldali tüdőtranszplantációt 18 nappal élte túl. Ezzel bizonyítottá vált, hogy a tüdőátültetés technikailag megvalósítható. A valódi sikert, a beültetett tüdő hosszú túlélését, a 80-as évek elejétől, az immunszuppresszív hatású cyclosporin bevezetése hozta meg (16) (1. ábra). A megfelelő immunszuppresszív kezelés mellett megvalósulhattak a sikeres transzplantációk, amely azt jelenti, hogy a beteg a műtétet legalább 6 hónappal éli túl.

Ezzel párhuzamosan a tüdőátültetések indikációs köre fokozatosan kiszélesedett (17). A primer pulmonalis hipertónia (PPH) és az Eisenmenger-szindróma esetein túl az indikációs körbe került a végstádiumú idiopathias tüdőfibrózis (IPF), a krónikus obstruktív tüdőbetegség (COPD), illetve a bronchiectasia és a cisztás fibrózis (CF) is (18,19) (2. ábra).



1. ábra. Az egy- és kétoldali tüdőtranszplantációk számának alakulása az utóbbi két évtizedben az ISHLT adatbázisa alapján (22).



2. ábra. A tüdőtranszplantációk indikációinak változása betegségek szerint az utóbbi két évtizedben az ISHLT adatbázisa alapján (22).

A transzplantációk sikerességét a hatékony gyógyszeres kezelés mellett a sebészi technikák fejlődése, a donorszervet konzerváló oldatok kifejlesztése is fokozta. A beültetett szervet elsődlegesen károsító ischaemiás-reperfúziós folyamat kutatása a pathomechanizmus jobb megértéséhez vezetett. Ennek alapján kidolgozott technikáknak köszönhetően ma már jelentősen csökkent a primer graft elégtelenség előfordulása, következésképpen a korai halálozások száma. Az immunuszuppresszív szerek fejlesztésével, valamint az elmúlt több mint két évtized során szerzett tapasztalatok alapján kidolgozott diagnosztikus és terápiás protokollok alkalmazásával folyamatosan javul a tüdőtranszplantáltak túlélése (20,21).

Az International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT) 2010-ben megjelent statisztikai adatai szerint 2009-ben összesen 2769 tüdő-transzplantációt végeztek világszerte (*1. ábra*), így a 80-as évek óta már több mint 20 ezer műtét történt (22). Az adatok szerint 7 olyan tüdőtranszplantációs központot tartanak nyilván a világon, ahol évente 50-nél több tüdőátültetést végeznek. Ezek egyike Bécsi Orvosi Egyetem (Medizinische Universität Wien, MUW) Szív- és Mellkasebészeti Klinikáján működik, ahol a magyar betegeket 1996 óta operálják. Mint ismeretes a betegek műtét előtti kivizsgálása, felkészítése, majd teljes poszt-operatív gondozása már Magyarországon történik, részben az Országos Korányi Tbc és Pulmonológiai Intézetben, részben a Semmelweis Egyetem Pulmonológiai Klinikáján.

3.2. A bronchiolitis obliterans szindróma definíciója

A transzplantált tüdő késői elvesztésének leggyakoribb oka a BOS kialakulása. A hazai szakirodalomban először munkacsoportunk közölt összefoglaló közleményt a BOS klinikai és kóréletteni vonatkozásairól (23). A kórképben klinikailag a légzésfunkció fokozatos csökkenése jelentkezik, melynek háttérében a kislégutak fokozatos, végleges elzáródása áll. A folyamat progresszív jellegű, amely krónikus légzési elégtelenséghez, illetve különböző fertőzések szövődmények megjelenéséhez, és végül a beültetett szerv elvesztéséhez vezet.

Fontos elkülöníteni a klinikai szindróma fogalmát a háttérben rejlő szövettani diagnózistól. A klinikumban a légzésfunkció fokozatos, irreverzibilis romlását tekintik a BOS kialakulására jellemzőnek, ezért mind a diagnosztika, mind a stádiumbeosztás erre épül. Ezt nevezik - utalva a háttérben meghúzódó kislégúti elzáródásra - BOS-nak (1,2,23,24). A mintavételi módszerek behatárolt lehetőségei miatt, a klinikailag megállapított diagnózis mögött a szövettanilag BOS-nak megfeleltethető kórfolyamatot a biopsziás mintából ritkábban sikerül kimutatni.

3.3. A bronchiolitis obliterans szindróma klinikai képe

A BOS klinikai megjelenési formája rendkívül változatos. Sok beteg hosszú ideig panaszmentes, és a kórkép előrehaladását csak a légzésfunkció lassú romlása jelzi (23). Másoknál a BOS hirtelen kezdődik, pl. egy terápiára rezisztens akut kilökődési epizód vagy infekció után. A tünetek aspecifikusak: dyspnoe, köhögés, a terhelhetőség csökkenése a leggyakoribb panasz. Később recurráló infekciók alakulnak ki, amelyek különböző baktériumok (pl.: *Pseudomonas* vagy *Staphylococcusok*) vagy gombák (pl.: *Aspergillus fumigatus*) kolonizációja miatt jönnek létre. A folyamat végén terápiás beavatkozásokra nehezen vagy alig reagáló légzési elégtelenség tünetei lépnek fel és a beteget emiatt veszítjük el.

Betegenként erősen különböző lehet a transzplantáció és a BOS kialakulása között eltelt idő is. A klinikai tanulmányok szerint átlagosan 16-20 hónap telik el, de ez az idő néhány hónaptól akár hosszú évekig is terjedhet (1,2).

3.4. Bronchiolitis obliterans szövettana

A klinikailag megfigyelt krónikus graftdiszfunkció (BOS) hátterében hisztológiailag a konstriktív BO áll. Fénymikroszkóposan a bronchiolusok falában, a submucosalis rétegben koncentrikusan/excentrikusan felszaporodott kötőszövet látható, amely a kislégút szerkezetét deformálja, lumenét elzárja. A belső felszínt borító hám eltűnik. A bronchiolus maradványaként sokszor csak szabálytalan alakú heg fedezhető fel. A hegesedés jól megfigyelhető gyulladásos fázissal (akut bronchiolitis) indul, amelyet a bronchialis epithelium, illetve a bronchiolus mellett futó ér endotheljének sérülése által kiváltott immunfolyamat indít be. A szöveti reakció aspecifikus, a normális tüdőszövetben is észlelhető. A kiváltó tényezők között infekciók mellett gyógyszerhatás, kollagén betegségek, stb. szerepelnek. Néhány esetben a kiváltó tényezőre nem derül fény. Ez az un. idiopáthiás típus (1. táblázat).

1. táblázat.

Az akut bronchitist kiváltó tényezők

akut bronchitis

infekciók (vírusok, *Chlamidia*, *Mycoplasma*)

mérgező gázok

gyomortartalom aspirációja

csontvelő transzplantáció

tüdőtranszplantáció

kollagén-vaszkuláris megbetegedések

gyulladásos bélbetegségek

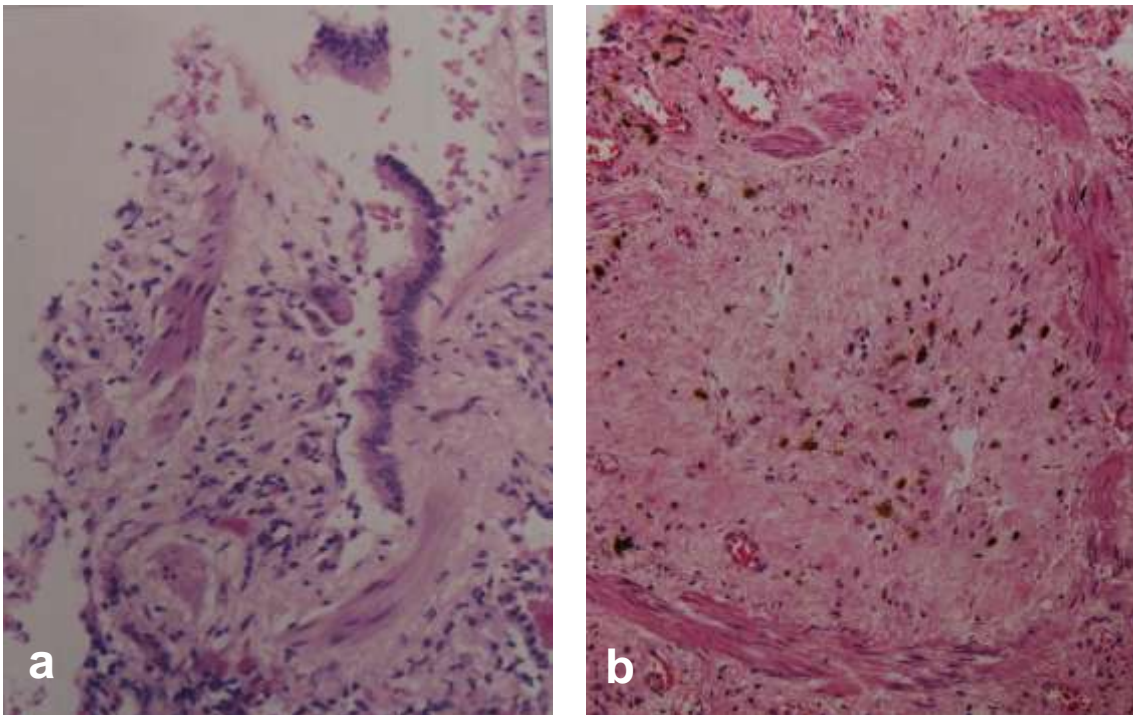
Wegener-betegség

idiopathiás

Az akut bronchiolitisben, melyet gyulladásos fázisnak is neveznek, a sérült sejtekből felszabaduló citokinek hatására polimorfonuklearis sejtek, dendritikus sejtek, illetve makrofágok vándorolnak a helyszínre. E sejtek által prezentált antigének, termelt citokinek alakítják ki a kislégutak körül, sokszor azok falában, helyenként az

epitheliumot is érintve látható lymphocytas infiltrációt, melyek között neutrophil granulocytak, néha eosinophil granulocytak is megjelennek. A folyamat általában időben szakaszosan és mozaikszerűen érinti a tüdőparenchymat. Ez a fázis tehát erős immunológiai befolyás alatt áll, következésképp ekkor még reverzibilis, immunszuppresszív terápiával befolyásolható a folyamat.

Később, a T-lymphocyták által termelt citokinek, növekedési faktorok beindítanak egy ún. késői vagy proliferációs fázist (konstriktív bronchiolitis), melynek során a kislégutak falának submucosalis rétegében koncentrikus/excentrikus kötőszövet felszaporodás történik. Ez utóbbit lehet lument elzáró „dugóként” észlelni egyes metszetekben (3. ábra). Ilyenkor már a lobsejtes infiltráció jelentős csökkenést mutat, helyenként el is tűnik. Az elváltozásokat ekkor már irreverzibilisnek tartjuk (25,26).

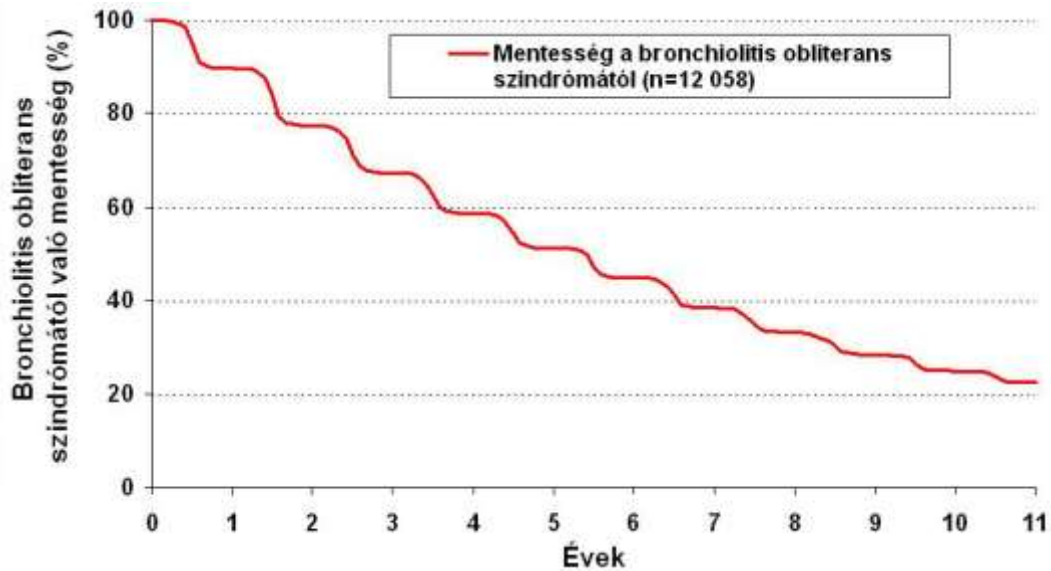


3. ábra. A humán bronchiolitis obliterans-ra jellemző szövettani kép a korai (a) és a késői (b) fázisban. (HE festés, $\times 20$)

3.5. Bronchiolitis obliterans pathogenesis

A transzplantáció után kialakuló krónikus allograft diszfunkció (krónikus kilökődés) előfordulási gyakorisága a különböző parenchymás szervek közül a tüdőben a legna-

gyobb: a kórkép 5 évvel a műtét után a máj esetében 5%, a szívnél 20%, a vesénél 30%, míg a tüdő esetében 50-60%-ban fordul elő (1). A tüdő esetében a krónikus allograft diszfunkció háttérében szövettanilag BO (klinikai BOS) áll, így a BO a krónikus allograft diszfunkció egyik formája (4. ábra).



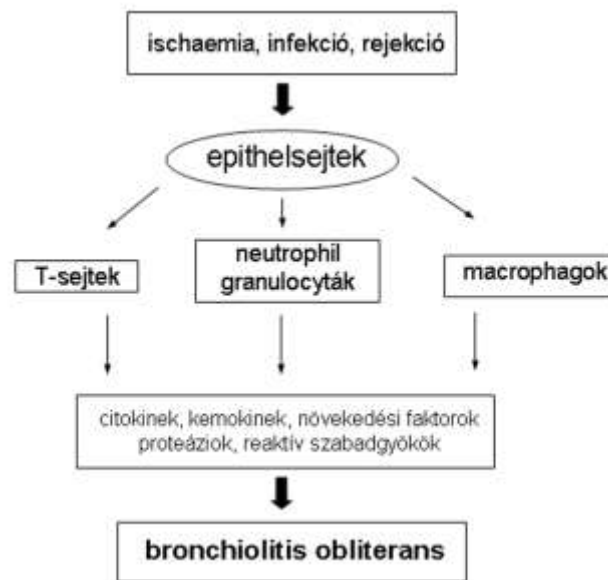
4. ábra. A bronchiolitis obliterans szindróma (BOS) kialakulásától mentes tüdőtranszplantált betegek arányának alakulása a transzplantáció utáni években az ISHLT adatbázisa alapján (22).

Az utóbbi években klinikai vizsgálatok sora foglalkozott a kórkép kialakulásához vezető kórfolyamatokkal, azonban ezek részletei még mai is bizonytalanok. Kór-életteni szempontból a BO egy hegesedéssel járó kórkép, ami a porcszövetet már nem tartalmazó terminális kislégutakban, a bronchiolusokban alakul ki a transzplantált tüdőben. Kialakulásának kezdeti szakaszában leukocyták infiltrálják a szubmukózát (akut bronchiolitis), majd fibroblastok és myofibroblastok szaporodnak fel a bronchiolusok falában, amelyek eredményeként koncentrikus módon szűkülni kezd a bronchiolusok lumene. A kötőszövet mennyiségének növekedésével párhuzamosan a bronchialis epithelium fokozatosan eltűnik, nekrotizál. A folyamat progresszív jellegű, amely végül hónapok vagy évek alatt a bronchialis lumen teljes elzáródásához vezet.

Napjainkban a legtöbb szerző a BO pathofiziológiájának kezdeti lépését a bronchialis epithelium, illetve a kiserek endotheljének sérülésében látja (1,2). Az ún. "response to injury" hipotézis szerint az ischaemiás-reperfúziós károsodás, az infekciók,

az ismétlődő akut rejekciók, a mikroaspiráció egyaránt az epithelsejtek/endothel sejtek károsodását okozzák, amelyet szöveti regeneráció követ. Ez azonban a gátló tényezők hiánya és/vagy a pro-fibrotikus tényezők túlsúlya miatt korlátlanul tovább folytatódik és végül kiterjedt hegszövet képződéshez vezet. Így a BO-t egy olyan végső, közös kör-állapotnak tekinthetjük, amely lényegében független a kiváltó noxától (5. ábra).

Az epithelsejtek károsodásának központi szerepét számos megfigyelés támasztja alá. Kísérletes körülmények között a trachea isograftokban az epithelium elpusztítása (pl. proteolitikus emésztéssel) olyan mértékű luminalis obliterációt indukál, amelyet különben csak az allograftokban látunk (27). Kimutatták továbbá, hogy bizonyos non-HLA antitestek hatására az epithelsejtekből olyan pro-fibrotikus növekedési faktorok szabadulnak fel, mint pl. a transforming growth factor (TGF)- β_1 , amely közismerten az extracelluláris mátrix szintézis egyik legfontosabb induktora (28).



5. ábra. A bronchiolitis obliterans kialakulásában szerepet játszó mechanizmusok vázlatosan

A sérült epithelsejtekből további citokinek (pl. interleukin-2 [IL-2], interleukin-8 [IL-8], interferon- γ [INF- γ]) és kemokinek (pl. monocyta chemotactic protein-1 [MCP-1], regulated on activation, normal T-cell-expressed and -secreted [RANTES]) szabadulnak fel, melyek hatására T-sejtek, neutrophil granulocyták és macrophagok infiltrálják a graft szövetét. Ezek a citokinek és kemokinek nagy mennyiségben kimutathatóak állatokban a krónikusan kilökődő trachea allograftokban (29), illetve a BOS-

ban szenvedő betegek bronchoalveolaris lavage (BAL) folyadékában (30). Az aktivált neutrophil granulocyták toxikus proteázokat, reaktív szabadgyököket termelnek, és az általuk okozott oxidatív stressz jelentős mértékben hozzájárul az epithelsejtek pusztulásához és a légúti gyulladás fenntartásához (31). A macrophagok ezzel szemben típusosan pro-fibrotikus citokineket (pl. TGF- β_1 , platelet-derived growth factor [PDGF], insulin-like growth factor-1 [IGF-1]) termelnek, melyek a fibroblastok és a simaizomsejtek proliferációját és mátrixfehérje szintézisét indukálják, ami a légutak hegszövetes átépüléséhez vezet (32,33). Ezek a növekedési faktorok elsősorban a BO késői fázisában termelődnek.

A kórkép kialakulásában rizikófaktorok állapíthatók meg, amelyeket alloantigén-dependens és alloantigén-independens kategóriákba szoktak sorolni (2. táblázat). Az a tény, hogy az egészséges, nem transzplantált emberekben BO ritkán alakul ki; valamint, hogy a transzplantációt követően a korán megjelenő BOS szoros kapcsolatot mutat a gyakori és súlyos kilökődési reakciókkal arra utal (34), hogy alloimmun-dependens folyamatoknak esszenciális szerepe van a BOS kialakulásában (35,36).

Az egyre nagyobb számban publikált állatkísérleti eredmények e megfigyeléseket támogatják. Ugyanakkor, ezek alapján a háttérben meghúzódó immunológiai folyamatok szerteágazó részletei is felderítésre kerülnek. Egyre inkább nyilvánvalóvá válik, hogy a rizikófaktoroknak tekintett tényezők olyan antigén-dependens vagy antigén-independens folyamatokat indítanak el, amelyek a bronchialis epithelium és a bronchialis vasculatura átalakulásához, károsodásához vezetnek. Így például *Andersson-Sjöland és mtsai.* kimutatták, hogy BOS-ban szenvedő transzplantált betegekben, a parenchymában szövetileg kimutatható fibrocyták fontos szerepet játszanak a vascularis és parenchymalis szöveti átrendeződésben (remodelling) (37). E sejtek kimutatása korai stádiumban felismerhetővé teheti a BOS-t (38).

Saini és mtsai. HLA-ellenes antitestek és defensinek szinergista szerepét figyelték meg a BOS kialakulásában. A transzplantációt követő időszakban az anti-HLA antitestek és az α -defensin hatására az epithelialis sejtekben termelődő β -defensin megjelenése gyulladást okoz. A folyamat növekedési faktorok termelését indukálja, amelyek az epithelium proliferációja révén hozzájárulhatnak a krónikus kilökődési reakció kialakulásához (39). Az α -defensin neutrophil granulocyták terméke, amely a

BAL-ból kimutatható ELISA módszerrel és szintén biomarkere lehet a BOS korai stádiumának (40).

2. táblázat.

A BOS kialakulásában részt vevő rizikófaktorok

Rizikófaktorok	
alloantigén-dependens	alloantigén-independens
HLA-mismatch	ischaemiás-reperfúziós károsodás
akut kilökődések száma és súlyossága	CMV infekció / pneumonitis
lymphocytás bronchiolitis	egyéb (bakterális, virális) légúti infekciók
anti-HLA antitestek	GERD donor szerv minősége életkor BOOP elégtelen beteg compliance

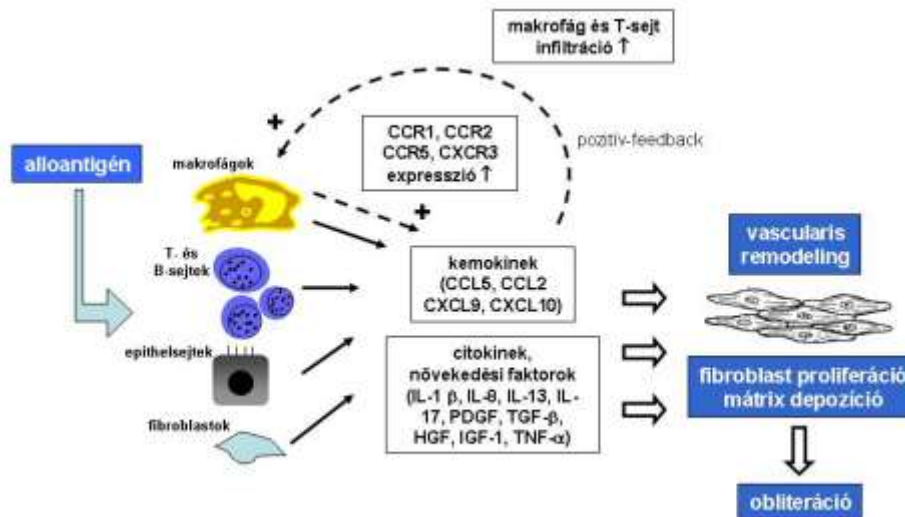
Újabban számos tanulmány foglalkozik a folyamatos immunválaszt fenntartó autoimmun folyamatok jelentőségével a BOS pathogenesisében. A kollagén(V) az interstitiumban található és a légutak epithelialis sejtjei termelik (41). Mennyisége emelkedik ischaemia-reperfúziós károsodásban.

Burlingham és mtsai. szerint a BOS kialakulásában 10-szer nagyobb rizikót jelent a kollagén(V) reaktív CD4+ T-sejtek megjelenése, mint az akut rejekeciós epizódok vagy a hisztokompatibilitás (42). Az adatok arra engednek következtetni, hogy a kollagén(V) reaktív CD4+ T-sejtek a monocyta/macrophag rendszerrel együttműködve (43,44) progresszív légúti elzáródáshoz vezetnek. Klinikailag az autoimmun és alloimmun folyamatokat nehéz együttesen befolyásolni. Ennek hátterében a regulációs T sejtek hiánya vagy diszfunkciója állhat. Több tanulmány számol be a BOS magasabb előfordulási gyakoriságáról a regulációs T-sejt szám szignifikáns csökkenése mellett (45).

Bharat és mtsai. transzplantált betegekből kollagén(V) elleni reaktív regulációs T sejteket izoláltak, amelyek megfigyeléseik szerint IL-10-et szekretáltak (46). Ezek a

sejtek képesek voltak gátolni az autoreaktív T-sejteket és az INF- γ termelést. BOS-ban szenvedő tüdőtranszplantáltakban gyakran észlelhető az IL-10 termelő T-sejtek számának csökkenése (47).

A kísérletes eredmények a betegekben megfigyelhető kórfolyamatok hátterének egy-egy „mozaikkockáját” világítják meg. Nem adnak ugyanakkor olyan, a klinikai gyakorlatban felhasználható, általános érvényű ismereteket vagy adatokat, amelyek alapján monitorozni vagy hatásosan kezelni lehetne a BOS-ban szenvedő betegeket. Több szakember véleménye alapján úgy tűnik, hogy a BOS kialakulásának visszaszorításában ma még a rizikófaktorok elkerülése a legcélravezetőbb kezelési stratégia (48-50). A BOS kialakulásában szerepet játszó citokinek és kemokinek kapcsolatát a 6. ábra mutatja be.



6. ábra. A BOS pathogenesisise. A folyamat első lépésében az alloantigének hatására citokinek, növekedési faktorok és kemokinek termelődnek az allograft bronchiolusainak falában. A citokinek és növekedési faktorok egy része közvetlenül pro-fibrotikus hatással rendelkezik, így a fibroblastok proliferációját és különböző mátrix fehérjék felhalmozódását indukálják. A kemokinek kemotaktikus hatásuk miatt a graft szövetét egyre nagyobb számban infiltrálják alloreaktív makrofágok és T-sejtek, melyek kemokin receptorok expressziójának fokozódásán keresztül pozitív-feedback mechanizmussal további immunsejteket vonzanak a graft szövetébe. A folyamat végül a bronchiolusuk falának kötőszövetes átépüléséhez és elzáródásához vezet.

3.6. Rizikófaktorok

3.6.1. Hisztokompatibilitás

A szervtranszplantációt követő immunválasz elsődlegesen T-sejt által közvetített folyamat, az antitest termelődésért felelős B-sejtes válasz csak később jelenik meg. Az immunválasz során az alloantigének felismerése döntően a nyirokcsomókban történik. Az antigének felismerésének alapvetően három formája lehetséges: az ún. "direkt", az "indirekt" és az újabban felismert „szemi-direkt” antigén felismerési mód (51,52).

A direkt alloantigén felismerés során, a recipiens T-sejtek, a nyirokcsomókban közvetlenül a donor fő hisztokompatibilitási komplex (Major Histocompatibility Complex, MHC) génjei által kódolt membrán molekulákat ismerik fel a donor dendritikus sejtjeinek (antigénprezentáló sejtek, APC) felszínén. Az indirekt alloantigén felismerés során a nominális (pl.: virális) antigén felismerés mechanizmusához hasonlóan a recipiens T-sejtek a saját APC-k által a saját MHC molekulákon bemutatott antigén tulajdonságú glikopeptideket ismerik fel. Ezek az antigének mindenekeelőtt a donor MHC molekuláinak endogén katabolizmusából származnak. A szemi-direkt alloantigén felismerés során az intakt donor MHC molekulák átkerülnek a donor APC-kről a recipiens APC-kre és ezt követően kerülnek bemutatásra a T-sejteknek (53,54).

Széles körben elfogadott, hogy a direkt alloantigén felismerés az akut kilökődés során, míg az indirekt út a krónikus kilökődés, így a BOS folyamatában játszik elsődleges szerepet (55,56). Közvetlenül a transzplantáció után a graft nagyszámú, ún. "passenger" APC-t (főleg dendritikus sejtek) tartalmaz, amelyek az elvezető nyirokcsomókba kerülnek. Ezek a sejtek nagy mennyiségben expresszálnak allo-MHC molekulákat és egyéb, a T-sejtek teljes aktivációjához szükséges ko-stimulatorikus molekulákat. A direkt úton aktiválódott CD8⁺ és CD4⁺ T-sejtek proliferálnak, és létrehozzák az akut kilökődésre jellemző szöveti károsodásokat.

Az idő előrehaladtával a graftban fokozatosan csökken a passenger APC-k száma. Az alloantigének, elsősorban az allo-MHC peptidok a recipiens APC-k endoszómáiba kerülnek és a lizoszomális enzimek hatására nagyrészt lebomlanak. Kis hányaduk azonban peptidok formájában megmarad, amelyek az MHC II molekulákkal komplexet alkotva, végül az APC-k plazmamembránjára kerülnek. Az antigéneket indirekt úton felismerő CD4⁺ T-sejtek aktiválódnak és különböző citokinek termelésén ke-

resztül szabályozzák a CD8+ T-sejtek, továbbá a B-sejtek és a macrophagok működését, amely folyamatok a graftsejtek líziséhez, antitesttermeléshez, az endothelsejtek aktivációjához, valamint az ún. késői típusú hiperszenzitivitási reakcióhoz (késői-típusú túlérzékenységi reakció, DTH) vezetnek (57-59). A graft működése fokozatosan beszűkül és kialakulnak a krónikus kilökődésre, illetve a BO-ra jellemző szöveti elváltozások.

Jóllehet az indirekt alloantigén felismerés dominál a krónikus szervkilökődés kórfolyamatában, számos tény mutat arra, hogy a direkt T-sejtes alloantigén felismerés, a donor APC csökkenése után is szerepet játszik (60). A CD8+ T-sejtek MHC I peptideket prezentáló sejtek. Az MHC I osztályú molekulák minden sejt felszínén jelen vannak, ami folyamatos, direkt alloantigén felismerést jelent. Ugyanakkor állatkísérletes modellekben kimutatták, hogy MHC II molekulák túlzott expressziója észlelhető az endothelium és epithelium felszínén (61). A folyamatosan fennmaradó direkt alloantigén felismerés lehetősége alapján merült fel a szemi-direkt alloantigén felismerés gondolata. A feltevések szerint a recipiens APC-k intakt donor MHC-peptid komplex molekulákat kötnek meg sejt-sejt közötti kontaktus révén, vagy exoszómákon keresztül. A felszínre kikerülő molekula-komplexek képesek reagálni CD4+ és CD8+ T-sejtekkel, fenntartva egy folyamatos direkt alloantigén felismerést (62,63). Lehetséges, hogy a gyakran ismétlődő akut kilökődési reakciók az epithelium és endothelium sérülések révén ilyen módon vezetnek krónikus kilökődési reakcióhoz.

3.6.2. Akut kilökődés

Számos klinikai tanulmány beszámol arról, hogy az akut kilökődések száma, intenzitása és klinikai lefolyása szorosan korrelál a transzplantáció késői kimenetelével (64). A súlyos funkcionális és szövettani eltérésekkel járó, ismétlődő, valamint az anti-rejekciós protokollokra nem reagáló akut kilökődések után a késői eredmények általában még rosszabbak.

Az endothelium és epithelium sérülései donor MHC fragmentumok felszabadulásával járnak, amelyek a recipiens APC-k felszínére kerülhetnek. A prezentált molekula-komplexek CD4+ és CD8+ T-sejteket aktiválnak (65).

Említést érdemel azonban, hogy nem minden akut kilökődés vezet BO kialakulásához. Az enyhe, mérsékelt perivascularis kereksejtes beszűrődéssel járó, viszonylag

későn jelentkező akut rejekeciós epizódok, - mivel kisebb sérülést okoznak az epitheliumban és endotheliumban, - általában nem befolyásolják a késői graft túlélési arányokat.

3.6.3. *Ischaemiás-reperfúziós károsodás*

Az ischaemiás-reperfúziós károsodás az alloantigén-independens faktorok között az egyik legvitatottabb és legtöbbet vizsgált kockázati tényező. Minden szervnek a donorból történő eltávolítása, konzerválása, majd egy bizonyos idő elteltével a recipiensbe való beültetése – értelemszerűen – ischaemiás-reperfúziós károsodással jár a transzplantált szervben.

Az ischaemia szerepét számos állatkísérleti modellben vizsgálták (66). *Yilmaz és mtsai.* egyértelműen kimutatták, hogy a hosszú hideg ischaemiás idő növeli a krónikus allograft nephropathia progresszióját patkányvesében (67). A hosszabb ischaemiás idő káros hatásait szívtranszplantátumokban is megfigyelték (68).

A tüdőben *de Perrot és mtsai.* kimutatták, hogy a beültetett graftot a hideg ischaemiás periódus után recipiens T-sejtek infiltrálják, amelyek egy alloantigén-independens direkt T-sejtes reakciót okoznak a donor szervben (69). A T-sejtek a beültetett szervet körülvevő nyirokcsomókból származnak és rövid időn belül nagy mennyiségű MHC II molekulát kötnek meg és vonnak ki a keringésből. A viszonylag hirtelen megjelenő T-sejtek tüdőkárosodást közvetítenek a reperfúzió későbbi szakaszában. Ezt támasztja alá az a megfigyelés, hogy a primer graft elégtelenségen átesett betegek szérumban emelkedett citokin (INF- γ , IL-12, IL-2 és IL-1 β) és kemokin (MCP-1, IP-10) szinteket mértek. Ezekben a betegekben ugyanakkor magas volt az alloreaktív T-sejtek száma és az alloantitestek mennyisége is.

Mizutani és mtsai. egy tüdőtranszplantációs állatmodellben a reperfúziót követően fokozott ET-1 felszabadulást észleltek, amely az ET vazokonstriktiót indukáló hatásán keresztül egyre növekvő pulmonalis vascularis rezisztenciát okozott (70).

3.6.4. *Életkor*

A felhasználható donorok száma és a szervátültetésre váró betegek száma közti aránytalanság világszerte folyamatosan növekszik. Ennek következtében a legtöbb transzplan-

tációs centrumban nagyon fiatal (<5 éves) és nagyon idős (>50 éves) szervezetekből is felhasználnak szerveket átültetés céljából.

A tüdőtranszplantáció bevezetésének kezdeti időszakában (1985-1995) a donorok főleg a 30 éves korosztályból kerültek ki. Az utóbbi 10 évben az idősebb korosztályok (45-65 év) részvételi aránya megnőtt. Ugyanakkor, az utóbbi 10 évben az 50 év feletti tüdőtranszplantáltak aránya 20% fölé emelkedett. Ennek az az oka, hogy olyan betegcsoportok is felkerültek az indikációs listára, mint a COPD vagy a Boeck sarcoidosis, melyek az idősebb korosztályt érintik nagyobb számban. Mindezek alapján nem meglepő, hogy a donor és a recipiens életkorának a transzplantáció késői kimenetelére gyakorolt hatásait számos klinikai tanulmány vizsgálta.

A klinikai tanulmányok egy része a nagyon fiatal és a nagyon idős donorokból származó graftok hosszú távú prognózisát kedvezőtlenebbnek ítéli meg (71,72). Az életkor előrehaladtával az immunrendszer működése általában gyengül, ami hatással lehet a kilökődés folyamatára is. Ugyanakkor, a nagy centrumok adatai szerint, 45 éves kor felett az 1 éves túlélés romlik. Az adatok szerint a magasabb mortalitás nem feltétlenül jár allograft diszfunkció kialakulásával. Ugyanakkor, a megfelelően kiválasztott betegek esetében, nem tudtak kimutatni eltérést a rövid és hosszú távú graft túlélésben (73,74).

A növekvő igények nem csak a recipiens oldaláról emelték meg az életkort, hanem egyre több 60 éves vagy annál is idősebb donor kerül beválogatásra átültetés céljából. *De Perrot és mtsai.* 11 évet átfogó vizsgálatukban azt találták, hogy az idős donorokból származó tüdőgraftok túlélése, függetlenül a recipiens életkorától, kedvezőtlenebb (75).

3.6.5. CMV infekció

Az immunszuppresszív terápia mellett megnő a különböző infekciók kialakulásának veszélye. Az infekciók az immunsejtek aktiválódásához, citokinek szintéziséhez, a vascularis permeabilitás megváltozásához, kemotaktikus anyagok felszabadulásához és az endothelium károsodásához vezetnek.

A vírusinfekciók általában lymphocytas bronchiolitis okoznak, amely később az átültetett tüdő diszfunkciójához vezethet. A virális ágensek közül legismertebb és a leg-

többet vizsgált a cytomegalovírus (CMV). A humán CMV által okozott megbetegedést 1905-ben *Jesionek* írta le először és ún. cytomegaliás zárványtestbetegségnek nevezte el. Igazi kórokozóját az ötvenes években *Rowe* és *Weller* azonosította. A jelenlegi, humán CMV elnevezést 1960 óta használják (76).

Az első találkozás a CMV-vel általában már gyermekkorban lezajlik, a fertőzés következményei klinikailag igen változatos formában jelentkeznek. Az egészséges immunrendszerű egyéneknél a primer fertőzés legtöbb esetben tünetmentes vagy *mononucleosis infectiosa*-szerű kórkép formájában zajlik le, de a fertőzés után egy életre szóló latencia alakul ki. A későbbiekben rekurrens fertőzés előfordulhat. Ha az immunstátuszban változás áll be (pl. immundeficientia alakul ki), a vírus reaktiválódhat vagy re-infekció jöhet létre (77).

A többi herpesvírushoz hasonlóan (humán herpesvírus [HHV]-6, HHV-7, *Epstein-Barr* vírus [EBV]) a primer infekció után a vírus latens formában egész életen át a szervezetben marad ("once infected, always infected" hipotézis), függetlenül attól, hogy a fertőzés tünetmentesen zajlott vagy betegséget okozott. Feltételezhetően a vírus a mononukleáris sejtekben és a leukocytákban rejtőzködik, de jelen lehet az epithelialis sejtekben, a kapillárisok és venulák endothelsejtjeiben is. Feltételezhetően ezek a sejtek szerepet játszanak a vírus disszeminációjában is. Latens állapotban a CMV leggyakrabban a monocytákban perzisztál, már a CD34+ progenitor T-sejtekben is jelen lehet. A terminálisan differenciálódott macrophagok viszont már fertőző vírust hordoznak. A szervezet a CMV fertőzésre ellenanyag képződéssel, valamint citotoxikus T-lymphocyták proliferációjával válaszol.

Szívtranszplantáltakban a CMV fertőzés hatására tipikus szubendothelialis gyulladás alakul ki, amely graft arteriosclerosisra hajlamosít (78). A károsodás kialakulásában szerepe van egy, a vírus által kódolt fehérjének, amely a HLA-DR β -láncával képes kereszt-reakcióba lépni (79), valamint egy másik, virális glikoproteinnek, amely homológ az MHC I antigén nehézláncával és a molekula könnyűláncához képes kötődni (80). A CMV infekciók sejtadhéziós molekulák (pl. vascularis sejtadhéziós molekula [VCAM]-1) expresszióját is indukálják endothelsejtek felszínén, amely elősegíti a gyulladásos sejtek vándorlását a graft szövetébe (81).

A tüdőtranszplantált betegek között számos tanulmány kimutatta, hogy a CMV infekciók növelik a BOS kialakulásának kockázatát, különösen, ha azok CMV-

pneumonitis formájában jelentkeznek (82). Az ISHLT adatai szerint is a donor és a recipiens közötti „CMV-mismatch” magasabb 1 és 5 éves mortalitással jár (83). A legkedvezőtlenebbnek az számít, ha szeronegatív recipiensbe szeropozitív donor kerül. A CMV infekció a trachea transzplantációs állatmodellben is növeli az OAD kialakulását az allograftokban (84). Végül, a CMV infekciók etiológiai szerepére utal az a megfigyelés is, hogy a ma már sok centrumban rutinszerűen alkalmazott CMV profilaxis csökkenti a BOS előfordulását (85).

3.7. Állatmodellek a bronchiolitis obliterans vizsgálatára

Az elmúlt évtizedekben számos állatmodellt fejlesztettek ki a BO kórfolyamatának vizsgálatára. E modellek tették lehetővé, hogy a BO immunológiai és patológiai mechanizmusát jobban megértsük, illetve lehetőséget teremtettek újabb kezelési lehetőségek felderítésére. Kísérleteinkhez mérlegeltük az egyes modellek alább részletezett előnyeit, korlátait, illetve lehetőségeinket, s ennek megfelelően választottuk ki a legmegfelelőbbet. A választásnál az alacsony költségek mellett a minimális eszközigény, a jó reprodukálhatóság és a kísérleti körülmények megbízható tervezhetősége volt a vezető szempont.

3.7.1. Teljes tüdő transzplantáció

Marck és mtsai., valamint *Prop és mtsai.* 1979-ben megbízható módszert dolgoztak ki ortotop bal tüdő átültetésre patkányban (86,87). A beültetett tüdő viselkedése hasonlított az emberi transzplantált tüdő klinikai tulajdonságaihoz és a modell segítségével tanulmányozható volt a BAL összetételének változása, valamint légzésfunkciós és haemodinamikai paraméterek. A szerzők arra a következtetésre jutottak, hogy Brown-Norway patkánydonorok tüdeje Lewis patkány recipiensekben reprodukálható módon súlyos akut rejekciót indukál (88).

A krónikus kilökődés vizsgálatok azonban számos akadályra derült fény. A kilökődés hátterében meghúzódó kislégúti elzáródások kialakulásának idejét többnyire nem érte el a graft élettartama. A kísérleti körülményektől és műtéti technikától függően különböző megfigyelések születtek az elváltozás kialakulásának gyakoriságáról és mód-

járól. Ugyanakkor a beültetéshez magas szintű mikro-sebészeti technikai háttérrel kell biztosítani és a transzplantáció rendkívül költséges és időigényes volt.

A teljes tüdő transzplantációs állatkísérletekben a 80-as évek végén bevezetett cyclosporin kezeléssel sikerült csak hosszú távú graft túlélést biztosítani (89). Ezáltal a modell - a korlátai ellenére - fontos szerepet játszott a kilökődés során lejátszódó immunreakciók, vírusinfekciók, valamint a tolerancia indukció leírásában, tanulmányozásában (90,91).

3.7.2. Heterotrop trachea transzplantáció

Hertz és mtsai. 1993-ban publikálták az obliteratív bronchiolitis kórfolyamatainak vizsgálatára kifejlesztett heterotrop patkánytrachea transzplantációs modellt. A subcutan fascia zsebbe vagy csepleszbe ültetett tracheagraftokban a BO-ra jellegzetes szöveti elváltozások fejlődtek ki a beültetést követő 7-21 nap alatt. A graftokban szövetszinten epithelium elváltozásokat, obstruktív fibroproliferatív folyamatokat észleltek (92).

A kísérletek során kiderült, hogy az allograftokban a BO-nak megfeleltethető OAD kialakulásában három, egymástól jól elkülöníthető és reprodukálható fázis figyelhető meg (93,94). A graftok a 2.-3. napon az ún. ischaemias fázison mennek keresztül, amely részleges epitheliumvesztést okoz. Az isograftokban ez a 7. napon teljesen regenerálódik. Az allograftokban a 7. napon kifejlődik a második fázis, melyet a submucosalis régió erőteljes lymphocytas infiltrációja jellemez. Ezt követi a 21. napon kifejlődő harmadik fázis, melyben az epithelium teljes degradációja és a lumen szinte teljes fibrotikus elzáródása észlelhető.

E három fázis viselkedésében jelölhető meg a modell jó használhatósága. További előnyei közt említhető az egyszerű operációs technika és a minimális eszköz-igény. A tracheagraftok *ex vivo* egyszerűen manipulálhatók immunológiailag és farmakológiailag. Könnyen hozzáférhetőek azok a genetikailag módosított állattörzsek, melyekben körülhatárolt körülmények között vizsgálhatók az OAD-t kialakító immunfolyamatok.

A modell hátránya, hogy a vizsgált folyamatok a tracheában zajlanak és nem a terminális bronchiolusban, mint az embereknél. További fontos különbség, hogy a graftok nem a természetes környezetükben vannak és nem elsődlegesen vascularizáltak.

Korlátai ellenére a modell igen elterjedtté vált és ennek köszönhetően került felismerésre az epithelium központi szerepe a BO kialakulásában. A modell segítségével számos kutatás irányult a BOS kezelésére hatékony farmakonok vizsgálatára is (95-98)

3.7.3. *Ortotrop trachea transzplantáció*

A heterotrop trachea transzplantációs modell korlátainak kivédésére kezdték el alkalmazni az BO kutatásában a trachea elégtelenség kezelésének vizsgálatára kifejlesztett ortotrop trachea transzplantációs modellt (99,100). A beültetés során 6 gyűrűnyi trachea darabot illesztettek be recipiens állatba. A beültetést követő 30. napon a trachea graftban - szemben az heterotrop modellben észleltekkel – sem epithelium károsodás, lymphocytas infiltráció és lumen elzáródás nem mutatható ki.

Ikonen és mtsai. igazolták, hogy mindkét modellben, a korai fázisban epithelialis károsodás megy végbe. Ugyanakkor az ortotrop modellben a 7. napon a felszíni hám teljes regenerációja látható, melyet a károsodott sejtek helyére bevándorolt recipiens sejtek proliferációja hoz létre (101). A modell tehát igazolta az epithelium épségének fontosságát a BO kialakulásában, melyet a heterotrop trachea transzplantációs modellben is megfigyeltek. Az ortotrop módon beültetett graftokban azonban hosszú megfigyelési idő után sem alakult ki az BO-ra jellemző lumenobliteráció.

3.7.4. *Nagy állatmodellek*

A nagy állatokkal végzett transzplantációs kísérletekben számos modellt alkalmaztak (heterotrop teljes tüdőátültetés, heterotrop bronchialis transzplantáció). A nagyobb állatok mind fiziológiai, mind anatómiai jellegükben jobban hasonlítanak az emberre, ezért a modelleket széles körben alkalmazzák a tüdő transzplantáció korai komplikációinak (reperfúziós károsodás, akut kilökődések) vizsgálatára.

A nagy állatokkal (kutya, sertés) való kísérletek azonban igen költségesek (állattartás, műtéttechnika, stb.), ami jelentősen korlátozza alkalmazhatóságukat. Ezért *Allan és mtsai.* reprodukálható és a krónikus kilökődés vizsgálatára alkalmas ortotrop tüdőtranszplantációs modellt fejlesztett ki MHC locusra homozigóta beltenyésztett kis-méretű ún. törpe sertésben. A beültetést követő 12. napon a graftban, a kislégutak körül

kollagén felszaporodás, fibrózis és lymphocyta infiltráció észlelhető, amely elváltozások megfelelnek az emberben lezajló folyamatoknak. A viszonylag jó reprodukálhatóság révén jelenleg ez tűnik a legígéretesebb nagy állatmodellnek a BOS tanulmányozására (102).

4. Célkitűzések

Tudományos kutatómunkánk célkitűzése annak a vizsgálata volt, hogy a donor és a recipiens neme miként befolyásolja az OAD kialakulását patkány trachea allograftokban, és hogy az angiotenzin-konvertáló enzim (ACE)-inhibitorok, az ET receptor gátlók, illetve a LMWH származékok adásával csökkenthető-e az OAD progressziója ebben az állatmodellben. Az értekezésben bemutatásra kerülő három kísérletsorozat kapcsán az alábbi hipotéziseket kívántuk megvizsgálni:

1. A donor és a recipiens neme befolyásolja az OAD kialakulását patkány trachea allograftokban.
2. Az ACE-inhibitorok és az ET-1 receptor blokkolók együttes adásával a graftok elzáródásának mértéke jobban visszaszorítható, mint a RAS és az ET rendszer külön-külön való farmakológiai gátlásakor.
3. Az LMWH kezelés csökkenti az OAD kialakulását patkány trachea allograftokban, amely a graftok körüli leukocytas infiltráció, illetve a graftok elzáródásához vezető fibroproliferatív folyamat visszaszorulásában nyilvánul meg.

5. Módszerek

5.1. Első kísérletsorozat

5.1.1. Állatok

Kísérleteink során beltenyésztett, 250-300g súlyú, hím és nőstény Lewis (Lew, RT1; WOBE Kft., Budapest, Magyarország), illetve hím és nőstény Brown-Norway (BN, RT1; WOBE Kft.) patkányokat használtunk. A Lew patkányok szerepeltek recipiensként, a BN patkányok voltak a donorok. Az állatokat standard körülmények között és normál diétán tartottuk. Az állatok ivóvizet szabadon fogyaszthattak. A kísérleteket a megfelelő állatvédelmi törvények betartásával és az etikai bizottság engedélyével végeztük.

5.1.2. Transzplantáció

Kísérleteinkben a BN patkányok tracheáját heterotrop módon a Lew patkányokba transzplantáltuk az általunk korábban részletesen a hazai szakirodalomban is leírt módon (3). Röviden, a donor állatokat pentobarbitállal (Nembutal; 80 mg/kg ip., Egis, Budapest, Magyarország) elaltattuk, majd az állatokból a tracheát kipreparáltuk. Mind-egyik trachea darabot két egyenlő részre osztottuk és 4°C-os Ringer-laktát oldatot tartalmazó edénybe helyeztük a beültetésig. A recipiensek (Lew patkányok) nyakán, altatásban, két különálló hosszanti metszést ejtettünk. A bőr alatt a subcutan szöveteket szétválasztottuk, és az izomfascia felett egy subcutan „zsebet” képeztünk, majd a trachea graftokat ebbe a zsebbe helyeztük, és felette a bőrt 2-0-s Vicryl fonállal összevarrtuk. A hideg (*ex situ*) ischaemiás idő 3-5 perc volt. A perioperatív infekciók megelőzésére az állatok ceftriaxont (Rocephin; 20 mg/kg i.m., Roche Magyarország, Budapest, Magyarország) kaptak. Az állatok immunszuppresszív kezelésben nem részesültek.

5.1.3. Kísérleti protokoll

A vizsgálatban részvevő 96 állatot random módon 4 csoportba osztottuk a donor és a recipiens neme szerint: hím donor/hím recipiens (M/M), hím donor/nőstény recipiens (M/F), nőstény donor/hím recipiens (F/M) és nőstény donor/nőstény recipiens (F/F). A beültetés után az állatokat a 7., 14. és 21. napon öltük le. Leöléskor az állatokat pentobarbitállal elaltattuk, majd a trachea transzplantátumokat (n=8/időpont) szövettani és molekuláris analízis céljából eltávolítottuk.

5.1.4. Szövettan

Hisztológiai és morfometriai vizsgálatokra a trachea darabokat 4%-s pufferelt formalinban fixáltuk. A paraffinba ágyazott, fixált darabokból 4 µm-es metszeteket készítettünk, melyeket haematoxylin-eosinnal (HE) festettük meg.

A metszeten számítógép vezérelte morfometriás méréseket végeztünk *Reichenspurner és mtsai.* által közölt módon (103). A metszetről először mikroszkópra (Olympus BH2 mikroszkóp, Olympus Hungary, Budapest, Magyarország) adaptált, nagy felbontású digitális kamerával (Olympus DP-10 High-Resolution Color Camera) felvételek készültek, amelyeket ezután az erre a célra kifejlesztett morfometriás szoftver (Olympus DP-Soft) segítségével analizáltunk.

Az analízis során a luminalis obliterációt és az epithelialis nekrozist kvantitatív formában határoztuk meg az alábbi mérés technikával: (1) meghatároztuk a trachea C-porcainak külső széle és a porcok között a *pars membranacea*-ra fektetett egyenes által határolt terület nagyságát (külső terület); (2) megmértük a tracheán belüli légúti lumen területét (belső terület); (3) megmértük a tracheán belüli lumennek az intakt epithelsejtekkel borított hosszát (epithelium borítás). A luminalis obliterációt az $(1 - \text{külső terület/belső terület}) \cdot 100\%$, az epithelialis nekrozist az $(1 - \text{epithelium borítás/belső terület kerülete}) \cdot 100\%$ képletek alapján határoztuk meg. A méréseket és számításokat minden alkalommal két egymástól független vizsgáló végezte.

5.1.5. RNS izoláció és reverz-transzkripció

A trachea graftokból a TRI-Reagens segítségével (Sigma-Aldrich Kft, Magyarország) teljes RNS-t izoláltunk, hasonlóan a korábbi munkáinkhoz (104). A cDNS szintézisét a

TaqMan Reverz Transzkripció Kit (Applied Biosystems, Applera Kft., Budapest, Magyarország) segítségével végeztük a cég ajánlásának figyelembevételével. A 10 µl-es reakció elegy a következőket tartalmazta: 1xTaqMan RT Puffer; magnézium klorid (5.5mmol/l); adenzin-, timidin-, guanozin- és citozin-trifoszfát (500µmol/l); oligo(dT)₁₂₋₁₈ primer (2.5µmol/l); RNase inhibitor (0.4U/µl); Multiscribe reverz transzkriptáz (1.25U/µl) és 3.85 µl RNS minta. A transzkripció (inkubáció: 25°C 10 perc, RT: 48°C 30 perc; Model 9600 Thermal Cycler, Perkin-Elmer) után a reakciót a minták 5 percig 95°C-ra való felmelegítésével állítottuk le, majd a mintákat átmenetileg 4°C-on tároltuk.

5.1.6. Real-time PCR

Az IL-2, INF- γ , TGF- β_1 és PDGF-A citokineknek megfelelő specifikus cDNS-t real-time PCR során a TaqMan Universal PCR Master Mix Kit segítségével (Applied Biosystems) amplifikáltuk a cég ajánlása alapján. A PCR reakciókhoz minden esetben 2 µl cDNS-t használtunk. Az amplifikációkat a következő szekvencia profillal végeztük: AmpliTaq Gold aktiváció 95°C-on 10 perc, 40 ciklus (denaturáció: 95°C-on 15 percig, polimerizáció: 60°C-on 1 perc). A vizsgált citokineknek megfelelő relatív mRNS expressziót a $\Delta\Delta CT$ módszer alapján egy szoftver (Gene Expression Analysis for Real-time PCR Detection System; BioRad, Magyarország) segítségével határoztuk meg. Az expressziót a gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH), mint belső kontroll mRNS expressziójára normalizálva adtuk meg.

5.1.7. Statisztikai analízis

Az adatok átlag \pm átlag szórása (standard error of the mean, SEM) formában szerepelnek. Az adatok összehasonlítása varianciaanalízissel (ANOVA), majd a Bonferroni *post hoc* teszttel történt (GraphPad Prism 4.0, GraphPad Software Inc., San Diego, USA). $p < 0.05$ esetén tekintettük a különbségeket szignifikánsnak.

5.2. Második kísérletsorozat

5.2.1. Állatok

Kísérleteink során beltenyésztett, 250–300g súlyú, hím Lew és BN (WOBE Kft.) patkányokat használtunk. Az állatokat a 5.1.1. pontban leírtak szerint tartottuk. A kísérleteket az állatvédelmi törvények betartásával és az etikai bizottság engedélyével végeztük.

5.2.2. Transzplantáció

Kísérleteinkben BN patkányok tracheáját heterotop módon Lew patkányokba transzplantáltuk. A műtétet a 5.1.2. pontban leírtak szerint végeztük el.

5.2.3. Kísérleti protokoll

A 64 Lew recipienst random módon négy kísérleti csoportba osztottuk (n=16 állat/csoport) és a kettős ET receptor (ET_A és ET_B) antagonistá bosenntannal (B; 100mg/kg; Tracleer®, Actelion Ltd., Allschwil, Svájc) vagy az ACE-gátló ramiprillal (R; 5 mg/kg; Tritace®, Sanofi Aventis, Budapest, Magyarország) vagy e két gyógyszer kombinációjával (B+R; dózisok lásd előbb) vagy vehiculummal (V) kezeltük a 0. naptól az állatok leöléséig. A bosentan és a ramipril dózisát irodalmi adatok alapján állapítottuk meg (10,105). A gyógyszereket naponta gyomorszondán keresztül *per os* jutattuk az állatokba (1ml oldat/állat). Mindegyik csoportból 8 állatot a 7., míg a maradék 8 állatot a 21. napon öltük le. Leöléskor az állatokat pentobarbitállal altattuk, majd a transzplantátumokat szövettani és molekuláris analízis céljából eltávolítottuk. Egy bosentanral kezelt állat infekció miatt nem került feldolgozásra.

5.2.4. Szövettan

Hisztológiai és morfometriai vizsgálatokra a trachea darabokat 4%-s pufferelt formalinban fixáltuk. A paraffinba ágyazott, fixált darabokból 4 µm-es metszeteket készítettünk, melyeket HE-vel festettünk meg. A metszeteken számítógép vezérelte morfometriás

vizsgálatokat végeztünk a 5.1.4. pontban leírtaknak megfelelően. A méréseket és számításokat két, egymástól független vizsgáló végezte.

5.2.5. Molekuláris analízis

A szövetmintákból kivont RNS-t először cDNS molekulává írtuk át (lásd. 5.1.5. pont). Az elkészült cDNS-t specifikus primerek segítségével (IL-2, INF- γ , TGF- β_1 és PDGF-A) real-time PCR során amplifikáltuk. A real-time PCR-t a 5.1.6. pontban leírtak szerint végeztük el. A vizsgált citokineknek megfelelő relatív mRNS expressziót a $\Delta\Delta CT$ módszer alapján egy szoftver (BioRad) segítségével határoztuk meg. Az expressziót a GAPDH, mint belső kontroll mRNS expressziójára normalizálva adtuk meg.

5.2.6. Statisztikai analízis

Az adatok átlag \pm átlag szórása (standard error of the mean, SEM) formában szerepelnek. Az adatok összehasonlítása varianciaanalízissel (ANOVA), majd a Newman-Keuls *post hoc* teszttel történt (GraphPad Prism 4.0, GraphPad Software Inc., San Diego, USA). $p < 0,05$ esetén tekintettük a különbségeket szignifikánsnak.

5.3. Harmadik kísérletsorozat

5.3.1. Állatok

Kísérleteink során beltenyésztett, 250–300g súlyú, hím Lew és BN (WOBE Kft.) patkányokat használtunk. A Lew patkányok szerepeltek recipiensként, a BN patkányok voltak a donorok. Az állatokat a 5.1.1. pontban leírtak szerint tartottuk. A kísérleteket az állatvédelmi törvények betartásával és az etikai bizottság engedélyével végeztük.

5.3.2. Transzplantáció

Kísérleteink során BN patkányok tracheáját heterotop módon Lew patkányokba transzplantáltuk. A műtéteket a 5.1.2. pontban leírtak szerint végeztük el.

5.3.3. Kísérleti protokoll

A vizsgálat első részében részvevő 64 állatot véletlenszerűen 4 csoportba osztottuk (n=16/csoport). Az állatok első csoportját nadroparinnal (N, 57 anti-Xa IU/kg; Fraxiparine®, GlaxoSmithKline, Budapest, Magyarország), a másodikat enoxaparinnal (E, 100 anti-Xa IU/kg; Clexane®, Sanofi Aventis, Budapest, Magyarország), a harmadikat parnaparinnal (P, 91 anti-Xa IU/kg; Fluxum®, Alpha Wassermann, Budapest, Magyarország), a negyediket vechiculummal (V) kezeltük. A dózisokat irodalmi adatok alapján választottuk (106,107,108). A nadroparint naponta egyszer, míg az enoxaparint és parnaparint naponta kétszer adtuk *subcutan* injekció formájában. A vechiculummal kezelt állatok 0,9%-os sóoldatot kaptak. Minden csoportból 8 állatot a 7. napon, míg a többi 8 állatot a 21. napon öltük le. Leöléskor az állatokat pentobarbitállal elaltattuk, majd a transzplantátumokat szövettani és molekuláris analízis céljából eltávolítottuk. Egy nadroparinnal kezelt állatot a vizsgálatból ki kellett zárni infekció okozta komplikáció miatt.

A kísérletsorozat második részében 16 recipiens állatot random módon 2 csoportba osztottunk (n=8/csoport) és cyclosporinnal (C, 1mg/kg/d *subcutan*; Sandimmune®, Novartis, Budapest, Magyarország) vagy cyclosporin + nadroparinnal (C+N, dózisok lásd előbb) kezeltük őket a 0. naptól az állatok leöléséig (21. nap).

5.3.4. Szövettan

Hisztológiai és morfometriai vizsgálatokra a trachea darabokat 4%-s pufferelt formalinban fixáltuk. A paraffinba ágyazott, fixált darabokból 4 µm-es metszeteket készítettünk, melyeket HE-nal festettük meg. A metszeteken a számítógép vezérelte morfometriás vizsgálatokat a 5.1.4. pontban leírtak szerint végeztük el. A gyulladással szembejuttatott sejtinfiltráció mértékét King és mtsai-hoz hasonlóan (109) szemi-quantitatív formában határoztuk meg: score 1: enyhe gyulladással szembejuttatott sejtinfiltráció (<50 sejt/látótér); score 2: közepes fokú sejtinfiltráció perivascularisan és/vagy a C-porcokat körülvevő kötőszövetben, enyhe vagy közepes fokú subepithelialis beszűrődéssel (50-100 sejt/látótér); score 3: nagyfokú, diffúz transmuralis gyulladással szembejuttatott sejtinfiltráció jelentős sub- és intraepithelialis kom-

ponenssel (>100 sejt/látótér). A gyulladásoos sejteket fénymikroszkóppal $\times 400$ nagyítás mellett vizsgáltuk, legalább 20 látóteret átvizsgálva. A méréseket és számításokat, két egymástól független vizsgáló végezte.

5.3.5. Molekuláris analízis

A szövetmintákból kivont RNS-t először cDNS molekulává írtuk át (lásd 5.1.5. pont). Az elkészült cDNS-t specifikus primerek segítségével (IL-2, INF- γ , TGF- β_1 , PDGF-A és MCP-1) real-time PCR során amplifikáltuk. A real-time PCR-t a 6.1.6. pontban leírtak szerint végeztük el. A vizsgált citokineknek megfelelő relatív expressziót a $\Delta\Delta CT$ módszer alapján egy szoftver (BioRad) segítségével határoztuk meg. Az expressziót a GAPDH, mint belső kontroll mRNS szintjére normalizálva adtuk meg.

5.3.6. Statisztikai analízis

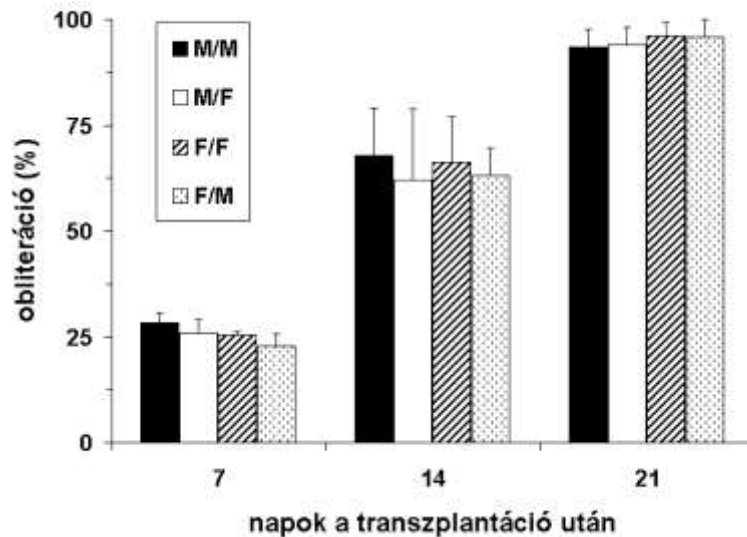
Az adatok átlag \pm átlag szórása (standard error of the mean, SEM) formában szerepelnek. A parametrikus adatok összehasonlítása varianciaanalízissel (ANOVA), majd a Newman-Keuls *post hoc* teszttel történt, a nem parametrikus adatokat a Kruskal-Wallis teszttel értékeltük ki (GraphPad Prism 4.0, GraphPad Software Inc., San Diego, USA; G*Power 3.1.1., G*Power Software Inc., Kiel, Németország). $p < 0,05$ esetén tekintettük a különbségeket szignifikánsnak.

6. Eredmények

6.1. Első kísérletsorozat

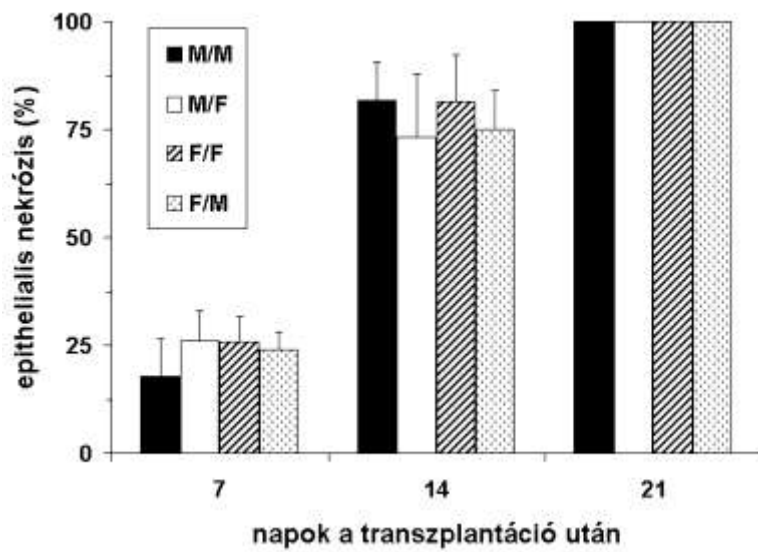
6.1.1. Szövettan

A 21. napon eltávolított trachea allograftok lumene hegszövettel majdnem teljesen elzáródott, függetlenül a donor vagy recipiens nemétől (M/M: 93.6 ± 3.9 , M/F: 94.1 ± 4.1 , F/F: 96.2 ± 3.1 és F/M: $95.9 \pm 4.1\%$, $p > 0.05$; 7. ábra).



7. ábra. Luminalis obliteráció allograft tracheákban a 7., 14. és 21. napon leölt állatokban.

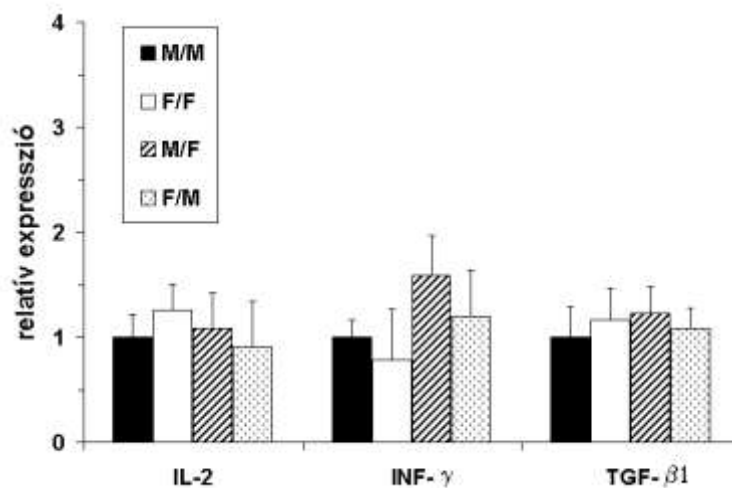
A luminalis elzáródás az epithelium teljes pusztulásával járt. Jóllehet az elzáródás mértéke a 7. és 14. napon kisebb volt a 21. napon mérthez értékekhez képest, itt sem mutatkozott különbség a nemek között (7. nap: M/M: 28.2 ± 2.4 , M/F: 26.0 ± 3.1 , F/F: 25.4 ± 0.7 , F/M: $22.9 \pm 2.8\%$, $p > 0.05$; 14. nap: M/M: 67.9 ± 11.2 , M/F: 61.9 ± 16.8 , F/F: 66.2 ± 10.9 , F/M: $63.1 \pm 6.6\%$, $p > 0.05$). Hasonlóan, az epithelium károsodásának mértéke (epithelialis nekrozis) sem különbözött az állatcsoportok között a fenti időpontokban eltávolított trachea allograftokban (8. ábra).



8. ábra. Epithelialis nekrosis allograft tracheákban a 7., 14. és 21. napon leölt állatokban.

6.1.2. Real-time PCR

Az IL-2, INF- γ és TGF- β_1 citokinek expresszióját a 21. napon eltávolított allograftokban vizsgáltuk real-time PCR technika segítségével. A szövettani eredményekkel összhangban a vizsgált faktorok mRNS szintjében nem mutatkozott szignifikáns különbség a csoportok között (9. ábra).



9. ábra. Citokinek és növekedési faktorok expressziója trachea allograftokban 21 nappal a transzplantáció után.

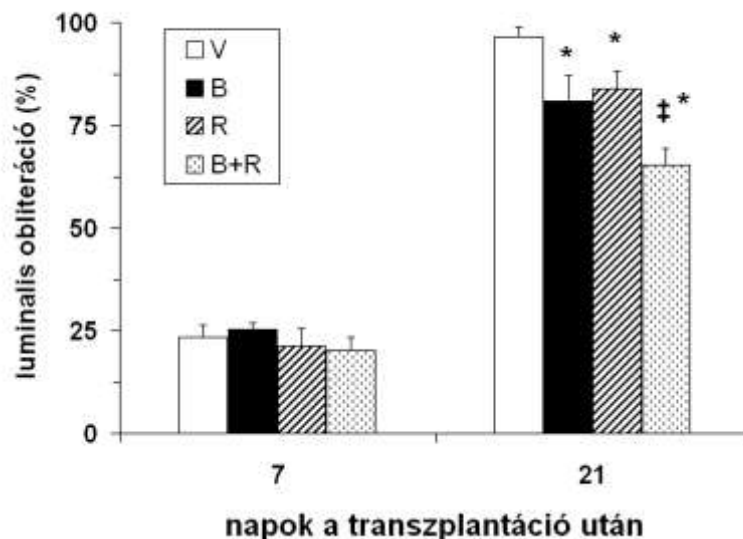
6.2. Második kísérletsorozat

6.2.1. Állatok

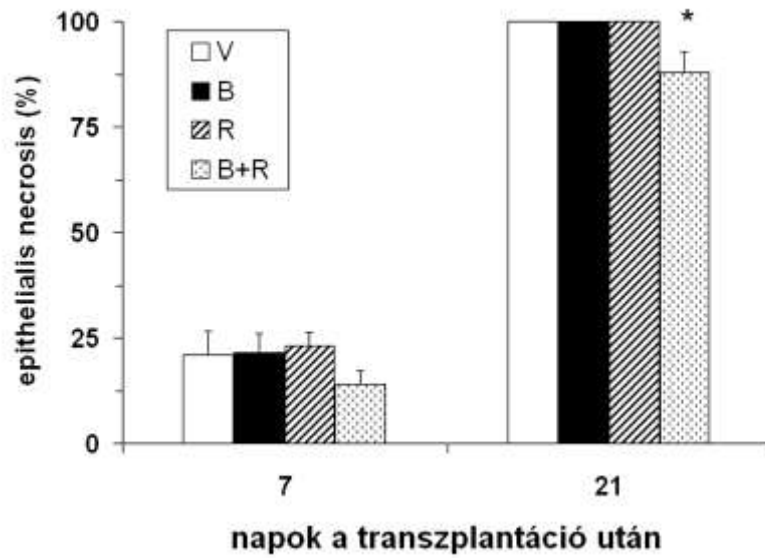
A recipiensek testsúlya a transzplantáció idején megegyezett egymással, és az állatok súlynövekedése is azonos mértékű volt a kísérlet ideje alatt (adatokat nem mutatjuk). Az állatok a gyógyszereket jól tolerálták.

6.2.2. Szövettan

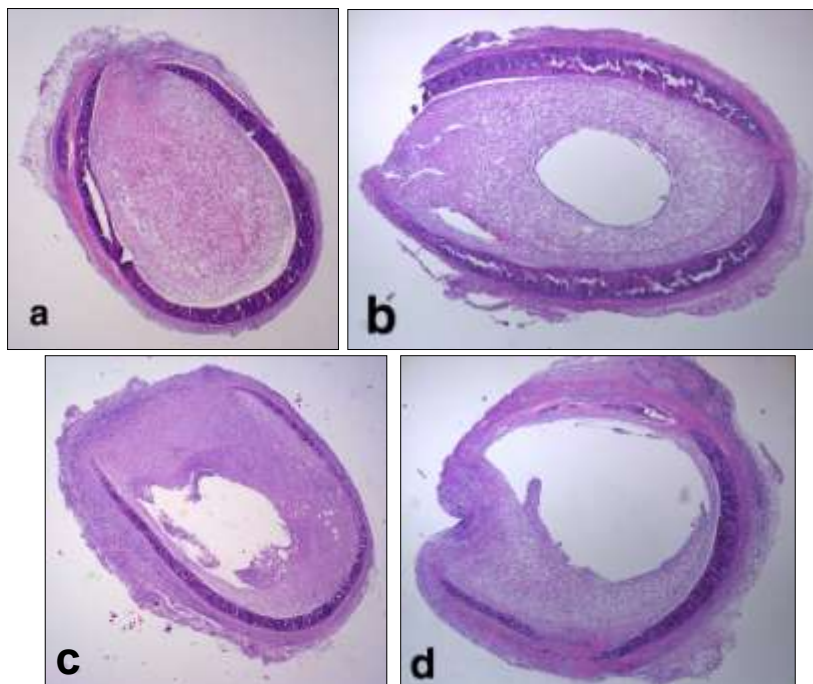
A 7. napon eltávolított trachea graftokban az obliteratív folyamat már megkezdődött, az állatcsoportok között különbséget nem tapasztaltunk (10. *ábra*). A 21. napra a vehiculummal kezelt állatokban a graftok lumenét gyakorlatilag teljes egészében heg-szövet töltötte ki. A bosentannal kezelt (B) állatokban a luminalis obliteráció szignifikánsan csökkent a vehiculummal kezelt (V) állatokhoz képest (B: 81.0 ± 6.1 vs. V: $96.6 \pm 2.4\%$; $p < 0.05$). Közel hasonló mértékben a ramipril kezelés (R) is csökkentette a luminalis obliterációt (R: $83.9 \pm 4.3\%$; $p < 0.05$). A kombinált kezelést kapott állatokban (B+R) az obliteráció mértéke még kisebb volt az kizárólag bosentannal vagy ramiprillal kezelt állatokhoz képest (B+R: $65.3 \pm 4.1\%$; $p < 0.01$).



10. ábra. Luminalis obliteráció allograft tracheákban a 7. és 21. napon leölt állatokban. * $p < 0.05$ vs. vehiculummal (V) kezelt állatok; ‡ $p < 0.05$ vs. bosentannal (B) vagy ramiprillal (R) kezelt állatok



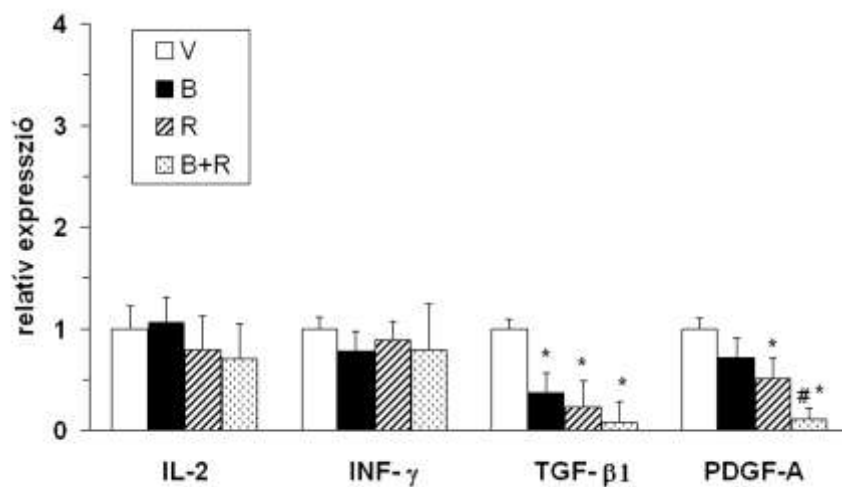
11. ábra. Epithelialis nekrozis allograft tracheákban a 7. és 21. napon leölt állatokban. * $p < 0.05$ vs. vehiculummal kezelt állatok



12. ábra. Vehiculummal (a), bosentannal (b), ramiprillal (c) és bosentan + ramiprillal (d) kezelt patkánytrachea allograftok keresztmetszeti képe a 21. napon (HE festés, nagyítás: $\times 4$).

A 7. napon eltávolított trachea graftokban a légúti epithelium kb. 20%-a pusztult el (10. ábra). A megmaradt sejtek nagy része csillóját elvesztette, ellaposodott. A graftok nyálkahártyája megduzzadt és kifejezett gyulladósos sejtinfiltráció jelentkezett

intra- és subepithelialisan, valamint a gyűrűporcokat körülvevő kötőszövetben. A bosentannal és ramiprillal kezelt (B+R) állatokban az epithelialis necrosis mértéke csökkent, de a különbség nem volt statisztikailag szignifikáns ($p > 0.05$). A 21. napon eltávolított, vehiculummal kezelt graftokban az epithelium teljes mértékben necrotizált, és csak a lument kitöltő hegszövetben fordult elő néhány lobsejt. Az önmagában bosentannal vagy ramiprillal kezelt állatokban az epithelium károsodása hasonló mértékű volt. Ezzel szemben a kombinált kezelést kapott állatokban (B+R) az epithelialis necrosis kismértékben, de szignifikánsan csökkent (B+R: 87.9 ± 4.9 vs. V: 100%; $p < 0.01$; 12. ábra).



13. ábra. Citokinek és növekedési faktorok expressziója trachea allograftokban 21 nappal a transzplantáció után. * $p < 0.05$ vs. vehiculummal (V) kezelt állatok; # $p < 0.05$ vs. bosentannal (B) vagy ramiprillal (R) kezelt állatok

6.2.3. Molekuláris analízis

A 21. napon a TGF- β ₁ és a PDGF-A intragraft expressziója (real-time PCR) a luminalis obliteráció mértékével volt arányos az egyes állatsoportokban. Mind a bosentan (B), mind a ramipril kezelés (R) csökkentette a TGF- β ₁ és a PDGF-A expresszióját a vehiculum kezeléshez (V) képest ($p < 0.05$) (13. ábra). A kombinált kezelés (B+R) mellett a PDGF-A növekedési faktor mRNS expressziója tovább csökkent ($p < 0.05$), míg a TGF- β ₁ szintje nem különbözött szignifikánsan a bosentan vagy ramipril

monoterápiával kezelt állatokhoz képest. A IL-2 és az INF- γ mRNS szintjében nem mértünk szignifikáns különbséget az állatcsoportok között.

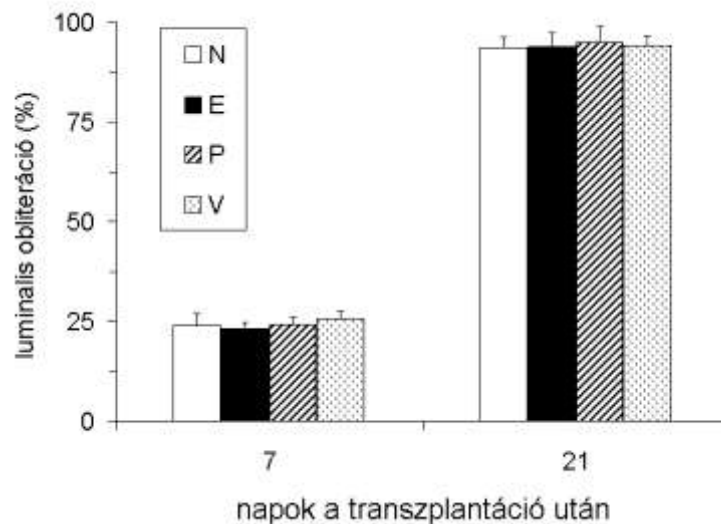
6.3. Harmadik kísérletsorozat

6.3.1. Állatok

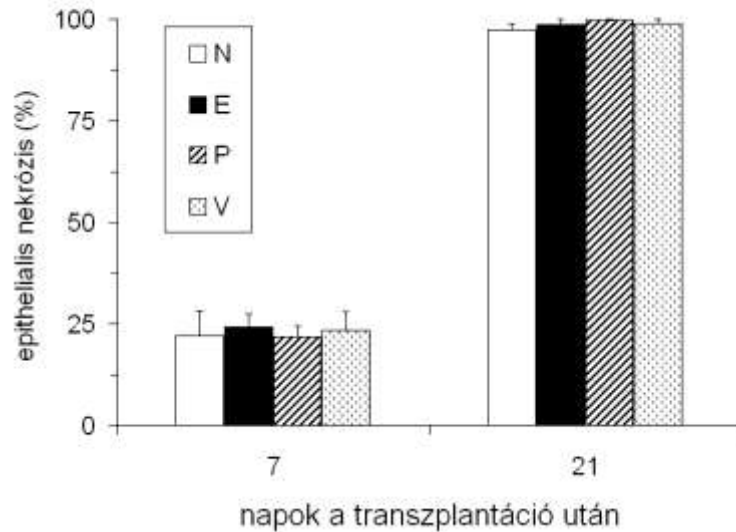
A recipiensek testsúlya a transzplantáció idején megegyezett egymással, és az állatok súlynövekedése is azonos mértékű volt a kísérlet ideje alatt (adatokat nem mutatjuk). Az állatok a gyógyszereket jól tolerálták, vérzéses szövődmenyt nem észleltünk.

6.3.2. Szövettan

A kísérletsorozat első részében a transzplantációt követő 7. napon az allograftok lumenének elzáródási folyamata már elkezdődött, hasonlóan a korábbi kísérleteinkben látottakhoz (5). Az elzáródás mértéke nem különbözött szignifikánsan a csoportok között (N: 24.0 ± 2.8 , E: 23.0 ± 1.6 , P: 24.2 ± 1.7 és V: $25.6 \pm 1.7\%$, $p > 0.05$, 14. ábra). A 21. napra az allograftok mindegyikében az elzáródás majdnem teljes mértékű lett a kezeléstől függetlenül (N: 93.5 ± 2.9 , E: 93.8 ± 3.5 , P: 95.0 ± 3.9 , V: $94.2 \pm 2.3\%$, $p > 0.05$; 10. és 14. ábra).



14. ábra. Luminalis obliteráció allograft tracheákban a 7. és 21. napon leölt, nadroparinnal (N), enoxaparinnal (E), parnaparinnal (P) vagy vehiculummal (V) kezelt állatokban.



15. ábra. Epithelialis nekrozis allograft tracheákban a 7. és 21. napon leölt, nadroparinnal (N), enoxaparinnal (E), parnaparinnal (P) vagy vehiculummal (V) kezelt állatokban.

A 7. napon eltávolított transzplantátumokban az epithelialis felszín közel 20%-a károsodott. A felszín alatt és a graft falában bőséges lymphocytá és macrophag szaporulat látszott. Az epithelium károsodás mértékét az LMWH kezelés nem befolyásolta (N: 22.1 ± 6.2 , E: 24.2 ± 3.4 , P: 21.7 ± 2.9 , V: $23.5 \pm 4.6\%$). A 21. napon az allografokban a felszíni epithelium teljes károsodása, nekrozisa volt észlelhető. A lobsejtes beszűrődés kisebb intenzitású volt, mint a 7. napon. A lumen elzáródáshoz hasonlóan a kezelés nem befolyásolta az epithelium károsodásának folyamatát sem (15 és 16. ábra). A luminalis obliteráció és az epithelialis nekrozis tekintetében standardizált különbség kimutatására ($\alpha=0.05$) a vizsgálat ereje 85, illetve 99%-os volt.

A kísérletsorozat második részében a cyclosporinnal (C: $58 \pm 6.9\%$), és cyclosporin plusz nadroparinnal (C+N: $55 \pm 7.8\%$) kezelt állatokban a luminalis obliteráció mértéke között szignifikáns különbség nem mutatkozott ($p > 0.05$). Ezekben az állatokban (C, C+N) az obliteráció mértéke azonban szignifikánsan kisebb volt a vehiculummal (V) és LMWH készítményekkel (N, E és P) kezelt állatokhoz képest ($p < 0.05$). Az epithelialis nekrozis és gyulladós sejtinfiltráció is visszaszorult a cyclosporinnal kezelt állatokban ($p < 0.05$). A cyclosporinnal kezelt állatok (C, és C+N) között a luminalis obliterációban mértékében különbség nem volt abban a tekintetben, hogy a cyclosporin mellett az állatok nadroparin kezelést is kaptak ($p > 0.05$).

3. táblázat.

Gyulladásos sejtinfiltráció allograft tracheákban a 7. és a 21. napon leölt, nadroparinnal (N), enoxaparinnal (E), parnaparinnal (P) vagy vehiculummal (V) kezelt állatokban.

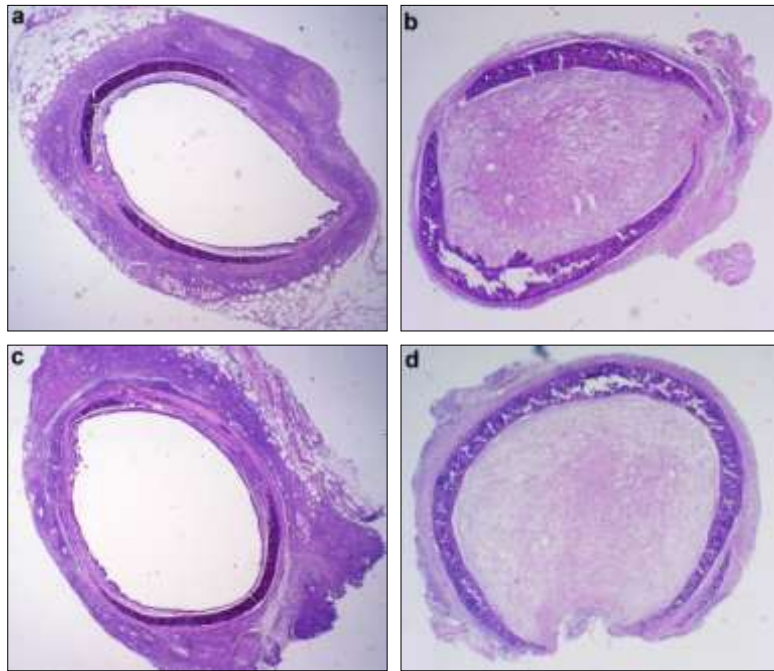
	súlyossági besorolás	állatcsoportok			
		N	E	P	V
7. nap	score 1	0	0	0	0
	score 2	3	3	1	3
	score 3	4	5	7	5
	<i>medián</i>	3	3	3	3
21. nap	score 1	6	5	7	6
	score 2	2	3	1	2
	score 3	0	0	0	0
	<i>medián</i>	1	1	1	1

A 7. napon a trachea graftokban kifejezett lobsejtes beszűrődést láttunk a submucosában (3. táblázat): az allograftok nyálkahártyája megduzzadt és kifejezett gyulladásos sejtinfiltráció jelentkezett intra- és subepithelialisán, valamint a C-porcokat körülvevő kötőszövetben. A sejtek legnagyobb része lymphocyta volt.

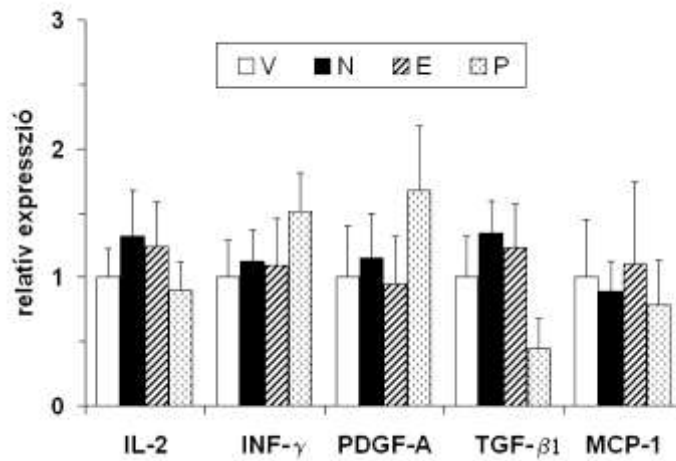
A sejtinfiltráció mértéke a 21. napra csökkent és erre az időpontra csak a lument kitöltő hegszövetben fordult elő néhány lobsejt, leginkább a *pars membranacea*-val szomszédos területeken. A gyulladásos sejtinfiltráció tekintetében az LMWH és vehiculum kezelést kapott állatok között szignifikáns különbség nem volt (2. táblázat).

6.3.3. Molekuláris analízis

A 21. napon a vizsgált citokinek (IL-2, INF- γ), növekedési faktorok (TGF- β_1 és PDGF-A) és kemokinek (MCP-1) intragraft expressziója mindegyik csoportban közel azonos mértékű volt a kezelésektől függetlenül (17. ábra).



16. ábra. Vehiculummal (V) kezelt patkánytrachea allograftok keresztmetszeti képe a 7. (a) és a 21. (b) napon, valamint enoxaparinnal (E) kezelt allograftok képe a 7. (c) és a 21. (d) napon (HE festés, nagyítás: $\times 4$).



17. ábra. Citokinek és növekedési faktorok expressziója a trachea allograftokban 21 nappal a transzplantáció után.

7. Megbeszélés

Az első kísérletsorozatban a donor és a recipiens nemének hatásait vizsgáltuk az OAD kialakulására a patkány trachea allograft modellben. Kimutattuk, hogy sem a donor, sem a recipiens neme nem befolyásolja a beültetett trachea graftok lumenének hegszövettel való elzáródását, illetve az epithelium nekrozisát.

Ezzel szemben számos érv szól amellett, hogy a transzplantált szervek működése a donor és a recipiens nemétől is függ. Nemhez kötött különbségek figyelhetők meg az átültetett szervek méretében, finomszerkezetében, antigenitásában, metabolikus igényében és nemi hormonreceptor mintázatában. Hasonló nemi különbségek vannak az immunválaszban és az immunglobulinok termelésében is. Elméletileg e tényezők külön-külön vagy akár együttesen is hatással lehetnek a kilökődés folyamatára, illetve a beültetett szerv rövid vagy hosszú távú túlélésre.

Jelenleg vita tárgya, hogy a donor vagy a recipiens neme szerepet játszik-e a BOS kialakulásában és/vagy a tüdőtranszplantált betegek túlélésében. Az ISHLT 2002-ben publikált évi hivatalos jelentésében még úgy találták, hogy a donor és recipiens neme közötti eltérés rizikófaktort jelent az 1 éven belüli halálozás szempontjából; illetve, hogy a recipiens női neme szintén rizikótényező az 5 éves túlélés tekintetében (83). Érdekes módon a következő évi jelentésekben ezek a megállapítások már nem kerültek megerősítésre (110).

A BOS megjelenésének tekintetében számos tanulmány arra a következtetésre jutott, hogy a nemnek nincs szignifikáns hatása a betegség kialakulására (111,112). Ezzel ellentétben *Christie és mtsai.* a graft elégtelenség magasabb rizikóját figyelték meg női donorszerveknél (113). *Roberts és mtsai.* egy relatíve kis transzplantációs centrum anyagán végzett vizsgálataikkal arra a megállapításra jutottak, hogy a donor és recipiens neme közötti különbség csökkenti a BOS kialakulásának valószínűségét (114). Ezek az adatok bizonyos mértékig megkérdőjelezzik azt a jelenlegi klinikai gyakorlatot, hogy beültetés előtt a donor és recipiens nemét nem veszik figyelembe.

A Fisher-Lew patkánymodell használata során *Antus és mtsai.*, valamint *Müller és mtsai.* korábban kimutatták, hogy a krónikus allograft nephropathia kialakulása során a tesztoszteron fokozza, míg az ösztrogének lassítják a kilökődési folyamat progresszióját (115,116). Az eredmények alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a vese

allograftokat „körülvevő” hormonális környezet felelős, legalábbis részben, a vesetranszplantátumok viselkedésében észlelt nemi különbségekért.

Jelen vizsgálatunkban hím és nőstény patkányokat használtunk recipiensként. A recipiens neme nem volt hatással az OAD kifejlődésére a trachea allograftokban, annak ellenére, hogy nyilvánvaló különbségek vannak az immunválasz szabályozásában és a nemi hormonok szintjében a két nem között.

A kísérletes eredmények közötti ellentmondások részben a nemi hormonok szerv-specifikus hatásaival magyarázhatók. Így például a vesében a nemi hormonok részben a vese haemodinamikára kifejtett hatásukkal befolyásolják a vese allograftok működését. A fentiek mellett jelentősége lehet az állatkísérletes modellek közötti immunológiai különbségeknek is. Az általunk használt patkány trachea transzplantációs modellben a donor és a recipiens között erős kilökődési reakció alakul ki. Az erős immunreakció alapja az, hogy a két állattörzs között az MHC II osztályú antigénekben teljes eltérés („mismatch”) van, és lehetséges, hogy ez elfedi a gyengébb hormonális hatásokat. Olyan törzskombináció esetén, ahol csak a minor antigénekben van különbség (pl. a Fisher-Lew patkánymodell) a kilökődési reakció sokkal enyhébb, ezért az esetleges hormonális hatások jobban kimutathatóak.

Kísérletünkben a beültetett trachea graftokat három különböző időpontban távolítottuk el. Ebben a modellben a lobsejtes infiltráció a 7. napon éri el a maximumát, ezért az első időpontot ennek megfelelően választottuk ki (117). A 14. napon a graftok részleges elzáródása jelenik meg az epithelium szinte teljes elvesztésével. A 14. nap olyan időpillanatot reprezentál, amelynél az észlelt szöveti elváltozások átmenetet képeznek a 21. napon látott, teljes graftelzáródást okozó, sejtiszegény fibrózis kialakulása felé. Mindazonáltal, vizsgálatunkban a nemnek semmilyen hatása nem volt a luminalis obliteráció időbeni kifejlődésére vagy kinetikájára.

A trachea transzplantációs modellben a légutak fibrotikus elzáródása nagyszámú növekedési faktor, többek között a TGF- β_1 közvetítésével történik (1,2,32). A TGF- β_1 , mint a szöveti fibrózis egyik központi mediátora elősegíti a lobsejtek grafthoz való vándorlását, a sejtek proliferációját és a szöveti fibrózis kialakulását. Experimentális megfigyelések alapján a modellben Th1-típusú citokinek (IL-2, INF- γ) is szerepet játszanak a graftelzáródás folyamatában (29,32). Kísérletünkben sem a donor, sem a recipiens neme

önmagában nem befolyásolta e molekulák expresszióját, amely jó egyezést mutat a vizsgálat során észleltekkkel.

Jelenleg a beültetésre váró tüdő neme az allokációt nem befolyásolja. Kísérleti adataink nem támogatják azt a feltevést, hogy e gyakorlatot meg kellene változtatni.

A minor hisztokompatibilitási antigének az MHC molekulákhoz kapcsolt peptidek olyan csoportját képezik, amelyek alloantigénként viselkedhetnek és képesek bizonyos körülmények között szöveti kilökődést indukálni. Ismert, hogy a hím nemre specifikus H-Y minor antigén fontos tényező a különböző szövetekben mind a graft rejekcióban, mind az ún. *graft versus host* reakciókban (118,119). A H-Y antigén szerepe a BOS kialakulásában nem ismert. Kísérleti adataink alapján a H-Y antigéneknek nincs szignifikáns szerepe a trachea transzplantációs modellben az OAD kialakulása szempontjából.

Összefoglalva, az első kísérletsorozat során kapott adataink azt mutatták, hogy nincs összefüggés a donor vagy a recipiens neme és az átültetett allograftokban kifejlődő obliteratív kórkép (OAD) között.

Második kísérletsorozatunkban kimutattuk, hogy (1) az ET receptor antagonistá bosentan és az ACE-gátló ramipril azonos mértékben csökkentik az OAD progresszióját patkány trachea allograftokban; (2) a bosentan és a ramipril együttes alkalmazása során az obliteratív folyamat még jobban visszaszorul; és (3) az obliteráció csökkenését a TGF- β 1 és a PDGF-A növekedési faktorok alacsonyabb intragraft expressziója kíséri.

Közismert, hogy az angiotenzin II és az ET-1 vazokonstriktor tulajdonságaik mellett növekedési faktor-szerű hatásokkal is rendelkeznek, és fontos mediátorai a szöveti fibrózisnak a legkülönbözőbb parenchymás szövetekben (120,121). A RAS tagjai mind a plazmában, mind a szövetekben kimutathatók. A vese juxtaglomerularis aparátusában, valamint számos más szervben jelenlévő renin a máj által termelt plazminogénre fejt ki hatását. Az enzimátikus hasítás során előbb angiotenzin-I keletkezik, amelyet az ACE alakít át biológiailag hatásos angiotenzin-II-vé. Az ACE a vese erekben, a vesetubulusok kefeszegélysejtjeiben és számos más szervben is előfordul. Az egyes szövetekben található enzim specifikus az adott szervre. Az ACE hatása ugyanakkor nem specifikus és más peptideket (pl. enkefalinok, bradykinin, substance-P) is bont. Az angiotenzin-II specifikus angiotenzin receptorokon fejt ki hatását. Az angiotenzin

receptorok aktivációja következtében a rezisztencia erek simaizomsejtsei összehúzódnak, hipertrófiáznak, a fibroblastokban sejtproliferáció indul be (122).

Az ET a szervezetünkben található egyik legismertebb érszűkítő molekula (123). Három formája ismeretes: az ET-1, ET-2 és ET-3, amelyek három különböző gén termékei. A biológiailag hatásos vegyület, a 21 aminosavból álló polipeptid molekula kialakításában az utolsó lépést az ún. endothelin-konvertáz enzim (ECE) végzi. Az ET-k hatásaikat az ET-A és ET-B receptorokon fejtik ki. Mind az ET, mind az ET-receptor szintézis az emberi szervezet majd minden szövetében kimutatható. Az ET hatásai között értónus szabályozása, simaizomsejt proliferáció fokozása, prosztaglandin (PG) I₂ és nitrogén monoxid (NO) termelés indukálása szerepelnek.

Számos megfigyelés támasztja alá az angiotenzin-II és az ET molekulák központi pathofiziológiai szerepét szív- és vesetranszplantátumok krónikus kilökődésében (8,9). A RAS és az ET rendszer farmakológiai gátlása terápiás hatású, amely a vesében a krónikus allograft nephropathia, míg a szívben a graft vasculopathia progressziójának csökkenésében nyilvánul meg (124,125).

A RAS és az ET rendszer szerepe a tüdőtranszplantáció után megjelenő BOS kialakulásában sokkal kevésbé tisztázott. Úgy tűnik, hogy az ET-1 szintje önmagában is magasabb tüdőtranszplantált betegek bronchoalveolaris lavage folyadékában (126). Mind az akut kilökődés, mind az allograft ischaemia az ET-1 szintézis fokozódásához vezethet (127,128). Kísérletes körülmények között az ET-1 géntranszfer BO-t indukál (129). Az általunk is használt transzplantációs modellben a közelmúltban mutatták ki, hogy az ET receptorok (ET-A és -B receptor) fokozott mértékben expresszálódnak, és e receptorok gátlása a graftok obliterációjának csökkenéséhez vezet (10). Hasonlóan, a RAS-nak is szerepe lehet az OAD kialakulásában ebben a modellben. *Maclean és mtsai.* igazolták, hogy az elzáródott trachea graftok jelentős ACE immunhisztokémiai pozitívítást mutatnak, és a RAS gátlása ACE-inhibitorokkal csökkenti az obliteráció kialakulását (11). Adataink egyrészt megerősítik a fenti eredményeket, másrészt kiegészítik ezeket azzal a megfigyeléssel, hogy e farmakológiai beavatkozások terápiás hatása egyenértékű.

Munkánk során első alkalommal igazoltuk, hogy az ACE-gátlók és ET-1 receptor blokkolók kombinált alkalmazása az obliteráció kialakulását hatékonyabban szorítja vissza, mint e gyógyszerek külön-külön való alkalmazása. A kombinált kezelés az

epithelialis necrosis mértékét is csökkentette. Az angiotenzin II- és az ET-1-függő jelátviteli rendszerek párhuzamos blokkolása különböző kísérletes körülmények között más és más eredményt ad. Így pl. a membranosis nephropathia (130) vagy a progresszív glomerulosclerosis állatmodelljében (131) az ACE-gátlók és az ET-1 receptor antagonisták protektív hatása additív, míg pl. a „Fisher-Lewis” vesetranszplantációs patkánymodellben a kombinált kezeléssel nem sikerült bizonyítani, hogy kedvezőbb hatású lenne a RAS vagy az ET rendszer külön-külön történő gátlásához képest (124).

Az angiotenzin II-nek és az ET-1-nek az obliterációra gyakorolt hatásmechanizmusa nem tisztázott. Hasonlóan az additív hatás oka sem világos. Eredményeink alapján e molekulák részben különböző pathogenetikai utakon keresztül fejtik ki hatásukat. Egyrészt elképzelhető, hogy az angiotenzin II és az ET-1 közvetlenül hatnak a fibroproliferatív folyamat kialakulásában szerepet játszó sejtekre. Ezt támasztja alá az a megfigyelés, hogy az ET-1 erős mitotikus hatású légúti simaizomsejtekben (132), és fibronectin termelést indukál bronchialis epithelsejtekben (133). Az ET-1 elősegíti továbbá fibroblastoknak kontraktilis myofibroblastokká való differenciálódását is (134).

Másrészt, az angiotenzin II-nek és az ET-1-nek a légutakban szerepe lehet különböző pro-fibrotikus citokinek és növekedési faktorok bioszintézisének és/vagy szekréciójának szabályozásában is. E mediátorok közül a TGF- β_1 és a PDGF tűnik a legfontosabbnak. A TGF- β_1 , mint a szöveti fibrózis egyik központi mediátora elősegíti az extracelluláris mátrix szintézisét és gátolja annak lebontását. A TGF- β_1 expressziója emelkedett az obliterációt mutató trachea allograftokban (32) és azokban a betegekben, akik BOS-ban szenvednek (135). A PDGF molekuláját két, diszulfid híddal összekötött polipeptid lánc - a PDGF-A lánc és -B lánc - alkotja. A PDGF jelentősen fokozza a simaizomsejtek proliferációját és migrációját a neointima képződés helyén a vascularis kilökődés során (136), és BOS esetén a BAL-ban szintje emelkedett (137). Újabban bizonyítékok vannak arra is, hogy az ET-1 a PDGF szintézisének keresztül fokozza a szöveti remodellinget a légutakban (138), míg az angiotenzin II-indukálta kollagén szintézis autokrin mediátora a TGF- β_1 a légúti simaizomsejtekben (139) és fibroblastokban (140). Ezen adatok ismeretében kézenfekvő az a feltételezés, hogy a légúti obliteráció kialakulása során az angiotenzin II és az ET-1 részben e növekedési faktorokon keresztül fejtik ki hatásukat. Kísérleteinkben a bosentannal és ramiprillal kezelt állatokban a TGF- β_1 és a PDGF növekedési faktorok intragraft mRNS szintje csökkent, és ez hozzá-

járolhatott e graftokban az obliteráció mértékének csökkenéséhez. Hasonló változásokat az IL-2 és a INF- γ expressziójában nem tapasztaltunk.

Jelenleg nem ismert, hogy akár az ET receptor blokkolók, akár az ACE-gátlók kedvezően befolyásolnák a BOS kialakulását tüdőtranszplantált betegekben. A jövőben e gyógyszerek, mint az immunszuppresszív kezelés kiegészítői jöhetnek szóba e pulmonalis komplikáció megelőzése során. Megjegyezhető, hogy a bosentan hatása sokkal szignifikánsabb lehetne calcineurin inhibitorral együtt adva, mivel az ET-1 plazma szintje emelkedett a cyclosporinnal kezelt transzplantáltaknak (141,142).

Végül megjegyzendő, hogy egy másik, a jelen disszertációban részleteiben nem ismertetett kísérletsorozatban azt is kimutattuk, hogy az ET receptor blokkolók és az ACE-gátlók kombinált alkalmazásával az OAD progressziója még akkor is visszaszorítható, ha a kezelést a 10. napon kezdjük el és a 24. napig folytatjuk (ún. késői kezelési protokoll) (143). Ebben az állatmodellben a 10. napon már részleges luminalis obliteráció alakul ki. A késői kezelési protokollt használva az ET receptor blokkolók és ACE-inhibitorok monoterápiában már nem hatékonyak. Ez a megfigyelés klinikai szempontból azért fontos, mert a betegek egy részében a kezelés megindításakor a BOS már részlegesen kialakult, azaz nem megelőző kezeléssel van szó. Ezekben a betegekben csak a kombinált kezelési stratégiával várható a BOS progressziójának visszaszorítása.

Összefoglalva, kísérleteink során kimutattuk, hogy mind a RAS, mind az ET rendszer gátlása csökkenti a trachea graftokban kialakuló fibrotikus folyamatot és e két rendszer egyidejű gátlása még hatékonyabb. Jóllehet tisztában kell lenni e patkánymodell korlátaival, az eredményeink alapján e gyógyszerek hatása a BOS-ban szenvedő tüdőtranszplantált betegekben is vizsgálatot igényel.

A harmadik kísérletsorozatban, a klinikai gyakorlatban használatos LMWH készítményeknek a trachea allograftok kilökődésére gyakorolt hatását vizsgáltuk. Három, a kereskedelmi forgalomban is kapható LMWH készítményt: a nadroparint, az enoxaparint és a parnaparint vizsgáltunk. Eredményeink alapján az OAD kialakulását egyik készítmény sem befolyásolta detektálható mértékben.

A különböző LMWH készítmények heterogén keverékei 4-7000 Da súlyú, szulfatált mucopoliszacharidoknak, melyeket kémiai és enzimatisz eljárásokkal nyer-

nek a standard heparinból. A LMWH készítmények hosszabb felezési idővel, jobb biohasznosulással és kedvezőbb mellékhatás profillal rendelkeznek, mint a standard heparin és ezért széles körben elterjedtek thromboemboliás kórképek profilaxisában és kezelésében.

Számos tanulmányban került igazolásra, hogy az LMWH készítmények - antikoaguláns aktivitásuktól függetlenül - antiproliferatív és immunszuppresszív hatással is rendelkeznek. Így például kimutatták, hogy LMWH adásával experimentális körülmények között a szívtranszplantátumok élettartama meghosszabbítható (144). Az LMWH vegyületek csökkentik a szív allograftok krónikus kilökődésének progresszióját is a patkány szívtranszplantációs állatmodellben (145,146). Az LMWH kezelés a klaszikus immunszuppresszív gyógyszerekkel is kombinálható, amely kombinációs kezelés tovább csökkenti a graft coronariasclerosis kialakulásának mértékét (147).

A Fisher-Lew vesetranszplantációs patkánymodell használatával *Braun és mtsai.* mutatták ki elsőként, hogy a reviparin, egy LMWH készítmény, csökkenti a krónikus allograft nephropatia kialakulását (148). Úgy tűnik, hogy a reviparin akkor is visszaszorítja a folyamat kialakulását, ha a kezelést késői formában, azaz már kialakult graftkárosodás és glomerulosclerosis után kezdik el (149).

A fenti pozitív eredményű vizsgálatokkal ellentétben *Byrne és mtsai.* egy szív xenotranszplantációs állatmodellel dolgozva az LMWH kezelésnek semmilyen jótékony hatását nem észlelték a szervátültetésre (150). Mindez azt mutatja, hogy különböző experimentális körülmények között az LMWH kezelés változatos, olykor egymással is ellentétes hatásokat fejthet ki a kilökődés folyamatára.

Kísérletünkben a patkány trachea transzplantációs modellt használva az LMWH-t különböző dózisokban adagolva a kezelés semmilyen hatással nem volt az OAD kifejlődésére.

Munkánk során azt is megvizsgáltuk, hogy a LMWH készítményeket (ebben az esetben nadroparint) egy ismert immunszuppresszív gyógyszerrel, a cyclosporinnal együtt adva kimutatható-e valamilyen kedvező, additív hatás. Eredményeink és megfigyeléseink azonban ezt a lehetőséget is kizárták.

A más kísérleti eredményektől eltérő adataink mögött a különböző modellekben zajló immunológiai folyamatok közötti különbségek húzódnak meg. Az általunk használt patkány trachea transzplantációs modellben igen erős kilökődési reakció alakul

ki, mivel az állattörzsek MHC II antigénjei között teljes eltérés („mismatch”) van, és lehetséges, hogy ez elfedi az LMWH-k jótékony hatásait. Immunológiai szempontból kevésbé összeférhetetlen állattörzsek között (pl. a Fisher-Lew modell) az alloantigén-indukálta kilökődés formája enyhébb, ezért az esetleges LMWH hatások jobban kimutathatók.

Közismert, hogy a korai ischaemias-reperfüziós károsodás nemcsak kezdeti graftkárosodást okoz, hanem az első lépést jelenti egy eseménysorozatban, amely végül krónikus kilökődésben végződik. Az LMWH kezelés egyik bizonyítottan kedvező tulajdonsága éppen a korai ischaemias-reperfüziós károsodással szembeni védelem (150). A heterotrop trachea allograftok azonban nem elsődlegesen vaszkularizáltak és vérellátásuk érújdonképződéssel biztosított, így klasszikus reperfüzió sem alakul ki. Ez is oka lehet annak, hogy kísérleteinkben az LMWH kezelést hatástalannak észleltük.

Egyes megfigyelések szerint az LMWH-k immunszuppresszív hatása az aktivált T-sejtek heparináz enzimjének és a tumor nekrozis faktor (TNF)- α szekréciójának gátlása következtében alakul ki (144). A heparináz specifikusan a subendothelialis mátrix glükóz-aminoglikán hálózatának kötéseit bontja. Gátlásával a T-sejtek nem képesek áthatolni a mátrixon és így elérni a célszervet, ami enyhébb kilökődési reakciót eredményezhet. Másrészt, a TNF- α egy multifunkcionális citokin, amely számos transzplantációs kísérleti állatmodellben, így a trachea transzplantációs modellben is fokozott termelődést mutat (151). Munkánk során sem a heparináz, sem a TNF- α szerepét nem vizsgáltuk, így a fenti megfigyeléseket sem cáfolni, sem megerősíteni nem tudjuk.

Az általunk használt állatmodellben az intraluminalis obliteráció kialakulása számos citokin és növekedési faktor, így például a TGF- β_1 és a PDGF és kemokin, többek között az MCP-1 túltermelődésével jár. A PDGF a simaizomsejtekre és fibroblasztokra erős mitogén hatást gyakorol, míg a TGF- β_1 -t a beültetett szervek kilökődésében szerepet játszó fibroproliferatív folyamatok központi mediátoraként tartják számon. Az LMWH kezelés ezen molekulák expresszióját nem befolyásolta, ami egybevág szövettani kiértékelés során látottakkal.

Jól ismert, hogy az LMWH készítmények kémiaiilag különböző szerkezetűek és bizonyos mértékig különböző farmakológiai tulajdonságokkal és hatékonysággal rendelkeznek (152). Ezért nem zárható ki annak a lehetősége, hogy más, a jelen kísérletben

nem vizsgált készítményeknek eltérő, esetleg kedvező hatása lenne a trachea allograftok kilökődésére.

Összefoglalva, a harmadik kísérletsorozatunkban az LMWH készítmények hatását vizsgáltuk a trachea allograftok kilökődésére. Eredményeink azt mutatták, hogy az LMWH kezelés nem alkalmas az OAD kialakulásának lassítására. A kapott eredmények alapján az LMWH terápia nem befolyásolja a trachea allograftok hosszú távú túlélését és a transzplantáció késői kimenetelét.

8. Következtetések

Patkánykísérleteink eredményeiből az alábbi következtetések vonhatók le:

1. Sem a donor, sem a recipiens neme nem befolyásolja az OAD kialakulását patkány trachea allograftokban. Eredményeink nem támogatják azt a feltevést, hogy a donor tüdők allokációja során a nemi különbözőséget figyelembe kellene venni a klinikai gyakorlatban.
2. Az ET-receptor blokkolók és az ACE-gátlók azonos mértékben csökkentik az OAD kialakulását trachea allograftokban. A két gyógyszer együttes alkalmazása még kedvezőbb terápiás hatású. A kedvező hatás valószínűleg közvetett módon, a TGF- β_1 és a PDGF-A növekedési faktorok csökkent intragraft expresszióján keresztül nyilvánul meg. A jövőben e gyógyszerek, mint az immunszuppresszív kezelés kiegészítői jöhetnek szóba a BOS megelőzése során tüdőtranszplantált betegekben.
3. A trachea allograftok kilökődésére az LMWH kezelésnek szignifikáns hatása nincs. Az LMWH kezelés a TGF- β_1 és a PDGF-A növekedési faktorok, valamint a Th1-es típusú citokinek és más kemokinek intragraft expresszióját sem befolyásolja.

9. Összefoglalás

Napjainkban a transzplantált tüdő elvesztésének leggyakoribb oka az ún. bronchiolitis obliterans szindróma (BOS). Pathologikailag a kórképet mononuclearis sejtinfiltráció, az epithelium károsodása és a bronchiolusok falának progresszív, fibroproliferatív átépülése jellemzi.

A patkány trachea heterotrop transzplantációs modell a BOS nemzetközileg elfogadott állatmodellje. E patkánymodellben az átültetett trachea falában a humán bronchiolitis obliteranshoz (BO) hasonló hegesedési folyamat indul el (obliteratív légúti betegség, OAD) és a graftok lumene relatíve rövid idő alatt elzáródik.

A BOS kialakulásában mind alloantigén-dependens, mind alloantigén-independens faktoroknak szerepe van. Így a donor és a recipiens neme is befolyásolhatja a BOS kialakulását. Állatkísérletekben igazolták, hogy a renin-angiotenzin rendszer (RAS) és az endothelin (ET) rendszer részt vesz az OAD kialakulásában. Elképzelhető továbbá, hogy az OAD progressziója kis molekulású heparin (LMWH) készítmények adásával is visszaszorítható, mivel a heparin, antikoaguláns hatásai mellett, immunszuppresszív és antiproliferatív hatással is rendelkezik.

A trachea transzplantációs állatmodellen végzett kísérletsorozatainkban a donor és a recipiens nemének szerepét vizsgáltuk, összehasonlítottuk az ET receptor blokádot és az angiotenzin-konvertáló enzim (ACE)-gátlás terápiás hatékonyságát és megvizsgáltuk, hogy a két rendszer egyidejű gátlásának van-e további terápiás haszna. Végül arra kerestünk választ, hogy különböző LMWH készítmények adásával az OAD progressziója csökkenthető-e.

Vizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy sem a donor, sem a recipiens neme nem befolyásolja a trachea allograftok kilökődését ebben az állatmodellben. Az ET receptor blokkoló és az ACE-gátló azonos mértékben csökkentik az OAD kialakulását és a két gyógyszer együttes alkalmazása még kedvezőbb terápiás hatású. Az LMWH származékok adásával a luminalis elzáródás folyamata nem volt befolyásolható. Az ET receptor blokkolóval és az ACE-gátlóval kezelt allograftokban a transforming growth factor (TGF)- β_1 és a platelet-derived growth factor (PDGF)-A növekedési faktorok expressziója csökkent, míg a nemkülönbözőség vagy a LMWH kezelés nem befolyásolta a citokinek szintjét.

10. Summary

Bronchiolitis obliterans syndrome (BOS) is the most important cause of late graft loss after lung transplantation. Pathologically, the process is characterized by mononuclear cell infiltration, followed by the disturbance of the respiratory epithelium and progressive accumulation of fibroblasts and fibrous tissue in the airways.

The heterotropic tracheal transplant model in rats is an established animal model for the study of bronchiolitis obliterans (BO). In this model, in a relatively short period of time, tracheal allografts develop fibrous obliteration, also known as obliterative airway disease (OAD), which is histologically similar to BO found in humans.

Apart from alloantigen-dependent mechanisms, alloantigen-independent factors may be involved in the development of BOS. Consistent with this concept, donor and recipient gender may influence lung transplantation. Moreover, experimental findings indicate that both the renin-angiotensin system (RAS) and the endothelin (ET) system may play important roles in the development of OAD. Low-molecular-weight heparin (LMWH) treatment could also slow the progression of OAD, since heparin, besides its anticoagulant activity, exerts antiproliferative and immunosuppressive effects as well.

In the present experiments, conducted in the rat tracheal allograft model, first, we investigated whether donor and recipient gender influence allograft rejection; second, we assessed the relative efficiency of ET receptor antagonists compared with angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors; and third, we tested whether interruption of both the RAS and ET system has any advantages over single-system blockage on the development of OAD. Finally, the effects of LMWH agents on the process were examined.

Our results indicated that gender had no impact on the development of OAD. ET receptor blockage prevented fibrous airway obliteration to a similar extent as ACE inhibitors, and interruption of both pathways provided superior graft protection as compared with single-system blockage. Finally, LMWH preparations did not modify the progression of OAD. Beneficial effects of ACE inhibitors and ET receptor blockers were associated with reduced mRNA expression of transforming growth factor (TGF)- β_1 and platelet-derived growth factor (PDGF)-A, whereas neither the gender nor LMWH agents influenced intragraft mRNA level of these cytokines.

11. Irodalomjegyzék

1. Boehler A, Estenne M. (2003) Post-transplant bronchiolitis obliterans. *Eur Respir J*, 22: 1007-1018.
2. Verleden GM, Vos R, De Vleeschauwer SI, Willems-Widyastuti A, Verleden SE, Dupont LJ, Van Raemdonck DE, Vanaudenaerde BM. (2009) Obliterative bronchiolitis following lung transplantation: from old to new concepts? *Transpl Int*, 22: 771-779.
3. Sato M, Keshavjee S, Liu M. (2009) Translational research: animal models of obliterative bronchiolitis after lung transplantation. *Am J Transplant*, 9: 1981-1987.
4. McDyer JF. (2007) Human and murine obliterative bronchiolitis in transplant. *Proc Am Thorac Soc*, 4: 37-43.
5. Antus B, Fillinger J, Soltész I, Horváth I. (2005) A bronchiolitis obliterans modellezése patkányokban *Med Thor*, 58: 8-13.
6. Neugarten J, Silbiger SR. (1994) The impact of gender on renal transplantation. *Transplantation* 58, 1145-1152.
7. Marino IR, Doyle HR, Aldrighetti L, Doria C, McMichael J, Gayowski T, Fung JJ, Tzakis AG, Starzl TE. (1995) Effect of donor age and sex on the outcome of liver transplantation. *Hepatology*, 22: 1754-1762.
8. Orbaek AH. (1999) Heart allograft vascular disease: an obliterative vascular disease in transplanted hearts. *Atherosclerosis*, 142: 243-263.
9. Ruggenti P. (2005) Chronic allograft nephropathy. A multiple approach to target nonimmunological factors. *Contrib Nephrol*, 146: 87-94.

10. Tikkanen JM, Koskinene PK, Lemstrom KB. (2004) Role of endogenous endothelin-1 in transplant obliterative airway disease in the rat. *Am J Transplant*, 4: 713-720.
11. Maclean AA, Liu M, Fischer S, Suga M, Keshavjee S. (2000) Targeting the angiotensin system in posttransplant airway obliteration: the antifibrotic effect of angiotensin converting enzyme inhibition. *Am J Respir Crit Care Med*, 162: 310-315.
12. Hochart H, Jenkins PV, Smith OP, White B. (2006) Low-molecular weight and unfractionated heparins induce a downregulation of inflammation: decreased levels of proinflammatory cytokines and nuclear factor-kappaB in LPS-stimulated human monocytes. *Br J Haematol*, 133: 62-67.
13. Kanabar V, Hirst SJ, O'Connor BJ, Page CP. (2005) Some structural determinants of the antiproliferative effect of heparin-like molecules on human airway smooth muscle. *Br J Pharmacol*, 146: 370-377.
14. Lider O, Baharav E, Mekori YA, Miller T, Naparstek Y, Vlodavsky I, Cohen IR. (1989) Suppression of experimental autoimmune diseases and prolongation of allograft survival by treatment of animals with low doses of heparins. *J Clin Invest*, 83: 752-756.
15. Hardy JD. (1999) The first lung transplant in man (1963) and the first heart transplant in man (1964). *Transplant Proc*, 31: 25-29.
16. Orens JB, Garrity ER Jr. (2009) General overview of lung transplantation and review of organ allocation. *Proc Am Thorac Soc*, 6: 13-19.
17. Kreider M, Kotloff RM. (2009) Selection of candidates for lung transplantation. *Proc Am Thorac Soc*, 6: 20-27.

18. Lynch JP 3rd, Saggarr R, Weigt SS, Ross DJ, Belperio JA. (2006) Overview of lung transplantation and criteria for selection of candidates. *Semin Respir Crit Care Med*, 27: 441-469.
19. Orens JB, Estenne M, Arcasoy S, Conte JV, Corris P, Egan JJ, Egan T, Keshavjee S, Knoop C, Kotloff R, Martinez FJ, Nathan S, Palmer S, Patterson A, Singer L, Snell G, Studer S, Vachiery JL, Glanville AR; Pulmonary Scientific Council of the International Society for Heart and Lung Transplantation. (2006) International guidelines for the selection of lung transplant candidates: 2006 update--a consensus report from the Pulmonary Scientific Council of the International Society for Heart and Lung Transplantation. *J Heart Lung Transplant*, 25: 745-755.
20. Burton CM, Andersen CB, Jensen AS, Iversen M, Milman N, Boesgaard S, Arendrup H, Eliassen K, Carlsen J. (2006) The incidence of acute cellular rejection after lung transplantation: a comparative study of anti-thymocyte globulin and daclizumab. *J Heart Lung Transplant*, 25: 638-647.
21. Knoop C, Haverich A, Fischer S. (2004) Immunosuppressive therapy after human lung transplantation. *Eur Respir J*, 23: 159-171.
22. Christie JD, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Aurora P, Dobbels F, Kirk R, Rahmel AO, Stehlik J, Hertz MI. (2010) The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-seventh official adult lung and heart-lung transplant report--2010. *J Heart Lung Transplant*, 29: 1104-1118.
23. Antus B, Fillinger J, Csiszér E, Czebe K, Horváth I. (2005) Bronchiolitis obliterans szindróma a tüdőtranszplantáción átesett betegekben. *Orv Hetil*, 146: 953-958.

24. Al-Githmi I, Batawil N, Shigemura N, Hsin M, Lee TW, He GW, Yim A. (2006) Bronchiolitis obliterans following lung transplantation. *Eur J Cardiothorac Surg*, 30: 846-851.
25. Tomaszefski JF. *Dail Dail and Hammar's Pulmonary Pathology. Non-neoplastic Lung Disease*. Springer-Verlag, New York, 2008, 2170-2167.
26. Stewart S, Cary RBN, Goddard MJ, Billingham ME. *Atlas of Biopsy Pathology for Heart and Lung Transplantation*. Hodder Arnold Publication, USA, 2001.
27. Adams BF, Brazelton T, Berry GJ, Morris RE. (2000) The role of the respiratory epithelium in a rat model of obliterative airway disease. *Transplantation*, 69, 661-693.
28. Jaramillo A., Naziruddin B., Zhang L. Reznik SI, Smith MA, Aloush AA, Trulock EP, Patterson GA, Mohanakumar T. (2001) Activation of human airway epithelial cells by non-HLA antibodies developed after lung transplantation: a potential etiologic factor for bronchiolitis obliterans syndrome. *Transplantation*, 71, 966-976.
29. Boehler A, Bai XH, Liu M, Cassivi S, Chamberlain D, Slutsky AS, Keshavjee S. (1999) Upregulation of T-helper 1 cytokines and chemokines expression in post-transplant airway obliteration. *Am J Respir Crit Care Med*, 159, 1910-1917.
30. Tiroke AH, Bewig B, Haverich A. (1999) Bronchoalveolar lavage in lung transplantation. State of the art. *Clin Transplant*, 13, 131-157.
31. Elssner A, Vogelmeier C. (2001) The role of neutrophils in the pathogenesis of obliterative bronchiolitis after lung transplantation. *Transpl Infect Dis*, 3, 168-176.

32. Aris RM, Walsh S, Chalermkulrat W, Hathwar V, Neuringer IP. (2002) Growth factor upregulation during obliterative bronchiolitis in the mouse model. *Am J Respir Crit Care Med*, 166, 417-422.
33. Charpin JM, Stern M, Grenet D, Israel-Biet D. (2000) Insulin-like growth factor-1 in lung transplant with obliterative bronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med*, 161, 1991-1998.
34. Bharat A, Narayanan K, Street T, Fields RC, Steward N, Aloush A, Meyers B, Schuessler R, Trulock EP, Patterson GA, Mohanakumar T. (2007) Early posttransplant inflammation promotes the development of alloimmunity and chronic human lung allograft rejection. *Transplantation*, 83: 150-158.
35. Bharat A, Kuo E, Steward N, Aloush A, Hachem R, Trulock EP, Patterson GA, Meyers BF, Mohanakumar T. (2008) Immunological link between primary graft dysfunction and chronic lung allograft rejection. *Ann Thorac Surg*, 86: 189-195.
36. Jaramillo A, Fernández FG, Kuo EY, Trulock EP, Patterson GA, Mohanakumar T. (2005) Immune mechanisms in the pathogenesis of bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *Pediatr Transplant*, 9: 84-93.
37. Andersson-Sjöland A, Erjefält JS, Bjermer L, Eriksson L, Westergren-Thorsson G. (2009) Fibrocytes are associated with vascular and parenchymal remodelling in patients with obliterative bronchiolitis. *Respir Res*, 10: 103.
38. Westergren-Thorsson G, Larsen K, Nihlberg K, Andersson-Sjöland A, Hallgren O, Marko-Varga G, Bjermer L. (2010) Pathological airway remodelling in inflammation. *Clin Respir J* 4: S1-S8.
39. Saini D, Angaswamy N, Tiriveedhi V, Fukami N, Ramachandran S, Hachem R, Trulock E, Meyers B, Patterson A, Mohanakumar T. (2010) Synergistic effect of antibodies to human leukocyte antigens and defensins in pathogenesis of

- bronchiolitis obliterans syndrome after human lung transplantation. *J Heart Lung Transplant*, 29: 1330-1336.
40. Nelsestuen GL, Martinez MB, Hertz MI, Savik K, Wendt CH. (2005) Proteomic identification of human neutrophil alpha-defensins in chronic lung allograft rejection. *Proteomics*, 5: 1705-1713.
 41. Sumpter TL, Wilkes DS. (2004) Role of autoimmunity in organ allograft rejection: a focus on immunity to type V collagen in the pathogenesis of lung transplant rejection. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 286: L1129-1139.
 42. Burlingham WJ, Love RB, Jankowska-Gan E, Haynes LD, Xu Q, Bobadilla JL, Meyer KC, Hayney MS, Braun RK, Greenspan DS, Gopalakrishnan B, Cai J, Brand DD, Yoshida S, Cummings OW, Wilkes DS. (2007) IL-17-dependent cellular immunity to collagen type V predisposes to obliterative bronchiolitis in human lung transplants. *J Clin Invest*, 117: 3498-3506.
 43. Iwata T, Philipovskiy A, Fisher AJ, Presson RG Jr, Chiyo M, Lee J, Mickler E, Smith GN, Petrache I, Brand DB, Burlingham WJ, Gopalakrishnan B, Greenspan DS, Christie JD, Wilkes DS. (2008) Anti-type V collagen humoral immunity in lung transplant primary graft dysfunction. *J Immunol*, 181: 5738-5747.
 44. Haque MA, Mizobuchi T, Yasufuku K, Fujisawa T, Brutkiewicz RR, Zheng Y, Woods K, Smith GN, Cummings OW, Heidler KM, Blum JS, Wilkes DS. (2002) Evidence for immune responses to a self-antigen in lung transplantation: role of type V collagen-specific T cells in the pathogenesis of lung allograft rejection. *J Immunol*, 169: 1542-1549.
 45. Mamessier E, Lorec AM, Thomas P, Badier M, Magnan A, Reynaud-Gaubert M. (2007) T regulatory cells in stable posttransplant bronchiolitis obliterans syndrome. *Transplantation*, 84: 908-916.

46. Bharat A, Fields RC, Trulock EP, Patterson GA, Mohanakumar T. (2006) Induction of IL-10 suppressors in lung transplant patients by CD4+25+ regulatory T cells through CTLA-4 signaling. *J Immunol*, 177: 5631-5638.
47. Bharat A, Fields RC, Steward N, Trulock EP, Patterson GA, Mohanakumar T. (2006) CD4+25+ regulatory T cells limit Th1-autoimmunity by inducing IL-10 producing T cells following human lung transplantation. *Am J Transplant*, 6: 1799-1808.
48. Paradis I. (1998) Bronchiolitis obliterans: pathogenesis, prevention, and management. *Am J Med Sci*, 315: 161-178.
49. Robertson AG, Griffin SM, Murphy DM, Pearson JP, Forrest IA, Dark JH, Corris PA, Ward C. (2009) Targeting allograft injury and inflammation in the management of post-lung transplant bronchiolitis obliterans syndrome. *Am J Transplant*, 9: 1272-1278.
50. Belperio JA, Weigt SS, Fishbein MC, Lynch JP 3rd. Chronic lung allograft rejection: mechanisms and therapy. *Proc Am Thorac Soc*, 6: 108-121.
51. Shoskes DA, Wood KJ. (1994) Indirect presentation of MHC antigens in transplantation. *Immunol Today* 15: 32-38.
52. Kapessidou Y, Habran C, Buonocore S, Flamand V, Barvais L, Goldman M, Braun MY. (2006) The replacement of graft endothelium by recipient-type cells conditions allograft rejection mediated by indirect pathway CD4+ T cells. *Transplantation*, 82: 582-591.
53. Smyth LA, Herrera OB, Golshayan D, Lombardi G, Lechler RI. (2006) A novel pathway of antigen presentation by dendritic and endothelial cells: Implications for allorecognition and infectious diseases. *Transplantation*, 82: S15-S18.

54. Smyth LA, Harker N, Turnbull W, El-Doueik H, Klavinskis L, Kioussis D, Lombardi G, Lechler R. (2008) The relative efficiency of acquisition of MHC:peptide complexes and cross-presentation depends on dendritic cell type. *J Immunol*, 181: 3212-3220.
55. Stanford RE, Ahmed S, Hodson M, Banner NR, Rose ML. (2003) A role for indirect allorecognition in lung transplant recipients with obliterative bronchiolitis. *Am J Transplant*, 3: 736-742.
56. Gökmen MR, Lombardi G, Lechler RI. (2008) The importance of the indirect pathway of allorecognition in clinical transplantation. *Curr Opin Immunol*, 20: 568-574.
57. Illigens BM, Yamada A, Anosova N, Dong VM, Sayegh MH, Benichou G. (2009) Dual effects of the alloresponse by Th1 and Th2 cells on acute and chronic rejection of allotransplants. *Eur J Immunol*, 39: 3000-3009.
58. Benichou G, Kant CD, Madsen J, Tocco G. (2007) Modulation of alloreactivity to MHC-derived peptides and transplantation tolerance. *Front Biosci*, 12: 4239-4247.
59. Boisgérault F, Liu Y, Anosova N, Ehrlich E, Dana MR, Benichou G. (2001) Role of CD4+ and CD8+ T cells in allorecognition: lessons from corneal transplantation. *J Immunol*, 167: 1891-1899.
60. Smyth LA, Afzali B, Tsang J, Lombardi G, Lechler RI. (2007) Intercellular transfer of MHC and immunological molecules: molecular mechanisms and biological significance. *Am J Transplant*, 7: 1442-1449.

61. Richards DM, Dalheimer SL, Hertz MI, Mueller DL. (2003) Trachea allograft class I molecules directly activate and retain CD8+ T cells that cause obliterative airways disease. *J Immunol*, 171: 6919-6928.
62. Richards DM, Dalheimer SL, Ehst BD, Vanasek TL, Jenkins MK, Hertz MI, Mueller DL. (2004) Indirect minor histocompatibility antigen presentation by allograft recipient cells in the draining lymph node leads to the activation and clonal expansion of CD4+ T cells that cause obliterative airways disease. *J Immunol*, 172: 3469-3479.
63. Obregon C, Rothen-Rutishauser B, Gitahi SK, Gehr P, Nicod LP. (2006) Exovesicles from human activated dendritic cells fuse with resting dendritic cells, allowing them to present alloantigens. *Am J Pathol*, 169: 2127-2136.
64. Martinu T, Howell DN, Palmer SM. (2010) Acute cellular rejection and humoral sensitization in lung transplant recipients. *Semin Respir Crit Care Med*, 31: 179-188.
65. Jungraithmayr W, Vogt P, Inci I, Hillinger S, Arni S, Korom S, Weder W. (2010) A model of chronic lung allograft rejection in the rat. *Eur Respir J*, 35: 1354-1363.
66. den Hengst WA, Gielis JF, Lin JY, Van Schil PE, De Windt LJ, Moens AL. (2010) Lung ischemia-reperfusion injury: a molecular and clinical view on a complex pathophysiological process. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 299: H1283-H1299.
67. Yilmaz S, Paavonen T, Hayry P. (1992) Chronic rejection of rat renal allografts. II. The impact of prolonged ischemia time on transplant histology. *Transplantation*, 53: 823-827.

68. Schmid C, Heemann U, Azuma H, Tilney NL. (1995) Transplant vasculopathy in rat heart transplantation: a morphologic chameleon determined by antigen-dependent and -independent factors. *Transplant Proc*, 27: 2077-2079.
69. de Perrot M, Young K, Imai Y, Liu M, Waddell TK, Fischer S, Zhang L, Keshavjee S. (2003) Recipient T cells mediate reperfusion injury after lung transplantation in the rat. *J Immunol*, 171: 4995-5002.
70. Mizutani H, Minamoto K, Aoe M, Yamashita M, Date H, Andou A, Shimizu N. (1998) Expression of endothelin-1 and effects of an endothelin receptor antagonist, TAK-044, at reperfusion after cold preservation in a canine lung transplantation model. *J Heart Lung Transplant*, 17: 835-845.
71. Waiser J, Budde K, Bohler T, Neumayer HH. (1997) The influence of age on outcome after renal transplantation. *Geriatr Nephrol Urol*, 7: 137-146.
72. Alexander JW, Bennett LE, Breen TJ. (1994) Effect of donor age on outcome of kidney transplantation. A two-year analysis of transplants reported to the United Network for Organ Sharing Registry. *Transplantation* 57: 871-876.
73. Tomaszek SC, Fibla JJ, Dierkhising RA, Scott JP, Shen KH, Wigle DA, Cassivi SD. Outcome of lung transplantation in elderly recipients. *Eur J Cardiothorac Surg* (in press)
74. Nwakanma LU, Simpkins CE, Williams JA, Chang DC, Borja MC, Conte JV, Shah AS. (2007) Impact of bilateral versus single lung transplantation on survival in recipients 60 years of age and older: analysis of United Network for Organ Sharing database. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 133: 541-7.
75. De Perrot M, Waddell TK, Shargall Y, Pierre AF, Fadel E, Uy K, Chaparro C, Hutcheon M, Singer LG, Keshavjee S. (2007) Impact of donors aged 60 years or

more on outcome after lung transplantation: results of an 11-year single-center experience. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 133: 525-531.

76. Ho M. (2008) The history of cytomegalovirus and its diseases. *Med Microbiol Immunol*, 197: 65-73.
77. Motta VN, Martins SL. (2008) Impairment of cytomegalovirus-specific cellular immune response as a risk factor for cytomegalovirus disease in transplant recipients. *Braz J Med Biol Res*, 41: 5-11.
78. Koskinen PK, Krogerus LA, Nieminen MS, Mattila SP, Hayry PJ, Lautenschlager IT. (1994) Cytomegalovirus infection-associated generalized immune activation in heart allograft recipients: a study of cellular events in peripheral blood and endomyocardial biopsy specimens. *Transpl Int*, 7: 163-171.
79. Fujinami RS, Nelson JA, Walker L, Oldstone MB. (1988) Sequence homology and immunologic cross-reactivity of human cytomegalovirus with HLA-DR beta chain: a means for graft rejection and immunosuppression. *J Virol*, 62: 100-105.
80. Beck S, Barrell BG. (1988) Human cytomegalovirus encodes a glycoprotein homologous to MHC class-I antigens. *Nature*, 331: 269-272.
81. Koskinen PK. (1993) The association of the induction of vascular cell adhesion molecule-1 with cytomegalovirus antigenemia in human heart allografts. *Transplantation*, 56: 1103-1108.
82. Westall GP, Michaelides A, Williams TJ, Snell GI, Kotsimbos TC. (2003) Bronchiolitis obliterans syndrome and early human cytomegalovirus DNAemia dynamics after lung transplantation. *Transplantation*, 75: 2064-2068.

83. Hertz MI, Taylor DO, Trulock EP. (2002) The registry of the international society for heart and lung transplantation: nineteenth official report-2002. *J Heart Lung Transplant*, 21: 950-970.
84. Tikkanen JM, Kallio EA, Bruggeman CA, Koskinen PK, Lemström KB. (2001) Prevention of cytomegalovirus infection-enhanced experimental obliterative bronchiolitis by antiviral prophylaxis or immunosuppression in rat tracheal allografts. *Am J Respir Crit Care Med*, 164: 672-679.
85. Speich R, Thurnheer R, Gaspert A, Weder W, Boehler A. (1999) Efficiency and cost effectiveness of oral ganciclovir in the prevention of cytomegalovirus disease after lung transplantation. *Transplantation*, 67: 315-320.
86. Marck KW, Wildevuur CR. (1982) Lung transplantation in the rat: I. Technique and survival. *Ann Thorac Surg*, 34: 74-80.
87. Prop Jm, Nieuwenhuis P, Wildevuur CRH. (1980) Technique of orthotopic unilateral lung transplantation in the rat. *Eur Surg Res*, 12: 80
88. Prop J, Wildevuur CR, Nieuwenhuis P. (1985) Lung allograft rejection in the rat. III. Corresponding morphological rejection phases in various rat strain combinations. *Transplantation*, 40: 132-136.
89. Romaniuk A, Prop J, Petersen AH, Wildevuur CR, Nieuwenhuis P. (1987) Expression of class II major histocompatibility complex antigens by bronchial epithelium in rat lung allografts. *Transplantation*, 44: 209-214.
90. Uyama T, Sakiyama S, Monden Y, Winter JB, Prop J (1993) Late airway changes in rat lung allografts: chronic rejection is a causative factor. *Transplant Proc*, 25: 1169-11671.

91. Yagyu K, van Breda Vriesman PJ, Duijvestijn AM, Bruggeman CA, Steinhoff G. (1993) Reactivation of cytomegalovirus with acute rejection and cytomegalovirus infection with obliterative bronchiolitis in rat lung allografts. *Transplant Proc*, 25: 1152-1154.
92. Hertz MI, Jessurun J, King MB, Savik SK, Murray JJ. (1993) Reproduction of the obliterative bronchiolitis lesion after heterotopic transplantation of mouse airways. *Am J Pathol*, 142: 1945-1951.
93. Boehler A, Chamberlain D, Kesten S, Slutsky AS, Liu M, Keshavjee S. (1997) Lymphocytic airway infiltration as a precursor to fibrous obliteration in a rat model of bronchiolitis obliterans. *Transplantation*, 64: 311-317.
94. Huang X, Reichenspruner H, Shoerthouse R. (1995) Heterotopic tracheal allograft transplantation: a new model to study the cellular and molecular events causing obliterative airway disease (OAD) in rats. *J Heart Lung Transplant*, 14: S49.
95. Fahrni JA, Berry GJ, Morris RE, Rosen GD. (1997) Rapamycin inhibits development of obliterative airway disease in a murine heterotopic airway transplant model. *Transplantation*, 63: 533-537.
96. Neuringer IP, Aris RM, Burns KA, Bartolotta TL, Chalermkulrat W, Randell SH (2002) Epithelial kinetics in mouse heterotopic tracheal allografts. *Am J Transplant*, 2: 410-419.
97. Qu N, de Vos P, Schelfhorst M, de Haan A, Timens W, Prop J. (2005) Integrity of airway epithelium is essential against obliterative airway disease in transplanted rat tracheas. *J Heart Lung Transplant*, 24: 882-890.
98. Qu N, de Haan A, Harmsen MC, Kroese FG, de Leij LF, Prop J. (2003) Specific immune responses against airway epithelial cells in a transgenic mouse-trachea

- transplantation model for obliterative airway disease. *Transplantation*, 76: 1022-1028.
99. Genden EM, Boros P, Liu J, Bromberg JS, Mayer L. (2002) Orthotopic tracheal transplantation in the murine model. *Transplantation*, 73: 1420-1425.
 100. Genden EM, Iskander AJ, Bromberg JS, Mayer L. (2003) Orthotopic tracheal allografts undergo reepithelialization with recipient-derived epithelium. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 129: 118-123.
 101. Ikonen TS, Brazelton TR, Berry GJ, Shorthouse RS, Morris RE. (2000) Epithelial re-growth is associated with inhibition of obliterative airway disease in orthotopic tracheal allografts in non-immunosuppressed rats. *Transplantation*, 70: 857-863.
 102. Allan JS, Wain JC, Schwarze ML, Houser SL, Madsen JC, Sachs DH. (2001) Obliterative bronchiolitis develops in miniature swine transplanted across a minor histocompatibility barrier. *Transplant Proc*, 33: 358-359.
 103. Reichenspurner H, Soni V, Nitschke M, Berry GJ, Brazelton TR, Shorthouse R, Huang X, Reitz BA, Morris RE. (1997) Obliterative airway disease after heterotopic tracheal xenotransplantation: pathogenesis and prevention using new immunosuppressive agents. *Transplantation*, 64: 373-383.
 104. Antus B, Hamar P, Kokeny G, Szollosi Z, Mucsi I, Nemes Z, Rosivall L. (2003) Estradiol is nephroprotective in the rat remnant kidney. *Nephrol Dial Transplant*, 18: 54-61.
 105. Farhy RD, Peterson E, Scicli AG. (1997) Kinins and the events influenced by an angiotensin-converting enzyme inhibitor during neointima formation in the rat carotid artery. *J Hypertens*, 15: 421-429.

106. Szende B, Paku S, Rácz G, Kopper L. (2005) Effect of Fraxiparine and heparin on experimental tumor metastasis in mice. *Anticancer Res*, 25: 2869-2872.
107. Bergamaschini L, Rossi E, Storini C, Pizzimenti S, Distaso M, Perego C, De Luigi A, Vergani C, De Simoni MG. (2004) Peripheral treatment with enoxaparin, a low molecular weight heparin, reduces plaques and beta-amyloid accumulation in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 24: 4181-4186.
108. Kim SK, Lee DY, Kim CY, Moon HT, Byun Y. (2006) Prevention effect of orally active heparin derivative on deep vein thrombosis. *Thromb Haemost*, 96: 149-153.
109. King MB, Pedtke AC, Levrey-Hadden HL, Hertz MI. (2002) Obliterative airway disease progresses in heterotopic airway allografts without persistent alloimmune stimulus. *Transplantation*, 74: 557-562.
110. Trulock EP, Edwards LB, Taylor DO, Boucek MM, Mohacsi PJ, Keck BM, Hertz MI. (2003) The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Twentieth Official adult lung and heart-lung transplant report-2003. *J Heart Lung Transplant*, 22: 625-635.
111. Heng D, Sharples LD, McNeil K, Stewart S, Wreghitt T, Wallwork J. (1998) Bronchiolitis obliterans syndrome: incidence, natural history, prognosis, and risk factors. *J Heart Lung Transplant*, 17: 1255-1263.
112. Husain AN, Siddiqui MT, Holmes EW, Chandrasekhar AJ, McCabe M, Radvany R, Garrity ER. (1999) Analysis of risk factors for the development of bronchiolitis obliterans syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*, 159: 829-833.
113. Christie JD, Kotloff RM, Pochettino A, Arcasoy SM, Rosengard BR, Landis JR, Kimmel SE. (2003) Clinical risk factors for primary graft failure following lung transplantation. *Chest*, 124: 1232-1241.

114. Roberts DH, Wain JC, Chang Y, Ginns LC. (2004) Donor-recipient gender mismatch in lung transplantation: impact on obliterative bronchiolitis and survival. *J Heart Lung Transplant*, 23: 1252-1259.
115. Antus B, Yao Y, Song E, Liu S, Lutz J, Heemann U. (2002) Opposite effects of testosterone and estrogens on chronic allograft nephropathy. *Transpl Int*, 15: 494-501.
116. Muller V, Szabo A, Viklicky O, Gaul I, Portl S, Philipp T, Heemann U. (1999) Sex hormones and gender-related differences: their influence on chronic renal allograft rejection. *Kidney Int*, 55: 2011-2020.
117. Boehler, A., Chamberlain, D., Kesten, S., Slutsky, A.S., Liu, M., Keshavjee, S. (1997) Lymphocytic airway infiltration as a precursor to fibrous obliteration in a rat model of bronchiolitis obliterans. *Transplantation*. 64, 311-317.
118. Gratwohl A, Döhler B, Stern M, Opelz G. (2008) H-Y as a minor histocompatibility antigen in kidney transplantation: a retrospective cohort study. *Lancet*, 372: 49-53.
119. Simpson E, Scott D, Chandler P. (1997) The male-specific histocompatibility antigen, H-Y: a history of transplantation, immune response genes, sex determination and expression cloning. *Annu Rev Immunol*, 15: 39-61.
120. Serpi R, Tolonen AM, Tenhunen O, Pieviläinen O, Kubin AM, Vaskivuo T, Soini Y, Kerkelä R, Leskinen H, Ruskoaho H. (2009) Divergent effects of losartan and metoprolol on cardiac remodeling, c-kit⁺ cells, proliferation and apoptosis in the left ventricle after myocardial infarction. *Clin Transl Sci*, 2: 422-430.

121. Garcia P, Schwenzer S, Slotta JE, Scheuer C, Tami AE, Holstein JH, Histing T, Burkhardt M, Pohlemann T, Menger MD. (2010) Inhibition of angiotensin-converting enzyme stimulates fracture healing and periosteal callus formation - role of a local renin-angiotensin system. *Br J Pharmacol*, 159: 1672-1680.
122. Egger M, Domenighetti AA. (2010) Adaptive and maladaptive remodeling of cardiomyocyte excitation-contraction coupling by angiotensin II. *Trends Cardiovasc Med*, 20: 78-85.
123. Fagan KA, McMurtry IF, Rodman DM. (2001) Role of endothelin-1 in lung disease. *Respir Res*, 2: 90-101.
124. Adams J, Odoni G, Ogata H, Viedt C, Amann K, Ritz E, Orth SR. Combination treatment with an ET(A)-receptor blocker and an ACE inhibitor is not superior to the respective monotherapies in attenuating chronic transplant nephropathy in a 'Fisher-to-Lewis' rat model. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17: 780-787.
125. Kobayashi J, Crawford SE, Backer CL, Zales VR, Takami H, Hsueh C, Huang L, Mavroudis C. (1993) Captopril reduces graft coronary artery disease in a rat heterotopic transplant model. *Circulation*, 88: S286-S290.
126. Schersten H, Hedner T, McGregor CG, Miller VM, Martensson G, Riise GC, Nilsson FN. (1996) Increased levels of endothelin-1 in bronchoalveolar lavage fluid of patients with lung allografts. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 111: 253-258.
127. Aarnio P, Tukiainen P, Taskinen E, Harjula A, Fyhrquist F. (1996) Endothelin in bronchoalveolar lavage fluid is increased in lungtransplanted patients. *Scand J Thorac Cardiovasc Surg*, 30: 113-116.
128. Shennib H, Serrick C, Saleh D, Adoumie R, Stewart DJ, Giaid A. (1995) Alterations in bronchoalveolar lavage and plasma endothelin-1 levels early after lung transplantation. *Transplantation*, 59:994-998.

129. Takeda S, Sawa Y, Minami M, Kaneda Y, Fujii Y, Shirakura R, Yanagisawa M, Matsuda H. (1997) Experimental bronchiolitis obliterans induced by in vivo HVJ-liposome-mediated endothelin-1 gene transfer. *Ann Thorac Surg*, 63:1562-1567.
130. Benigni A, Corna D, Maffi R, Benedetti G, Zoja C, Remuzzi G. (1998) Renoprotective effect of contemporary blocking of angiotensin II and endothelin-1 in rats with membranous nephropathy. *Kidney Int*, 54: 353-359.
131. Amann K, Simonaviciene A, Medwedewa T, Koch A, Orth S, Gross ML, Haas C, Kuhlmann A, Linz W, Scholkens B, Ritz E. (2001) Blood pressure independent additive effects of pharmacologic blockade of the renin-angiotensin and endothelin systems on progression in a low-renin model of renal damage. *J Am Soc Nephrol*, 12: 2572-25784.
132. Glassberg MK, Ergul A, Wanner A, Puett D. (1994) Endothelin-1 promotes mitogenesis in airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 10: 316-321.
133. Marini M, Carpi S, Bellini A, Patalano F, Mattoli S. (1996) Endothelin-1 induces increased fibronectin expression in human bronchial epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 220: 896-899.
134. Sun G, Stacey MA, Bellini A, Marini M, Mattoli S. (1997) Endothelin-1 induces bronchial myofibroblast differentiation. *Peptides*, 18: 1449-1451.
135. El-Gamel A, Sim E, Hasleton P, Hutchinson J, Yonan N, Egan J, Campbell C, Rahman A, Sheldon S, Deiraniya A, Hutchinson IV. (1999) Transforming growth factor beta (TGF-beta) and obliterative bronchiolitis following pulmonary transplantation. *J Heart Lung Transplant*, 18: 828-837.

136. Alpers CE, Davis CL, Barr D, Marsh CL, Hudkins KL. (1996) Identification of platelet-derived growth factor A and B chains in human renal vascular rejection. *Am J Pathol*, 148: 439-451.
137. Hertz MI, Henke CA, Nakhleh RE, Harmon KR, Marinelli WA, Fox JM, Kubo SH, Shumway SJ, Bolman RM 3rd, Bitterman PB. (1992) Obliterative bronchiolitis after lung transplantation: a fibroproliferative disorder associated with platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89: 10385-10389.
138. Sihvola RK, Pulkkinen VP, Koskinen PK, Lemstrom KB. (2002) Crosstalk of endothelin-1 and platelet-derived growth factor in cardiac allograft arteriosclerosis. *JAMA*, 39: 710-717.
139. McKay S, de Jongste JC, Saxena PR, Sharma HS. (1998) Angiotensin II induces hypertrophy of human airway smooth muscle cells: expression of transcription factors and transforming growth factor-beta1. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 18: 823-833.
140. Marshall RP, McAnulty RJ, Laurent GJ. (2000) Angiotensin II is mitogenic for human lung fibroblasts via activation of the type 1 receptor. *Am J Respir Crit Care Med*, 161: 1999-2004.
141. Ramzy D, Rao V, Tumiati LC, Xu N, Miriuka S, Delgado D, Ross HJ. (2006) Role of endothelin-1 and nitric oxide bioavailability in transplant-related vascular injury: comparative effects of rapamycin and cyclosporine. *Circulation*, 114: I214-I219.
142. Cauduro RL, Costa C, Lhulier F, Garcia RG, Cabral RD, Gonçalves LF, Manfro RC. (2005) Endothelin-1 plasma levels and hypertension in cyclosporine-treated renal transplant patients. *Clin Transplant*, 19: 470-474.

143. Antus B, Fillinger J, Sebe A, Jeney C, Horvath I. (2008) Late treatment with angiotensin-converting enzyme inhibitors plus endothelin receptor antagonists ameliorates rat tracheal allograft rejection. *Transpl Int*, 21: 801-807.
144. Shapira OM, Rene H, Lider O, Pfeffermann RA, Shemin RJ, Cohen IR. (1999) Prolongation of rat skin and cardiac allograft survival by low molecular weight heparin. *J Surg Res*, 85: 83-87.
145. Teranishi K, Poston RS, Reitz BA, Robbins RC. (1999) Effect of low molecular weight heparin on graft vascular disease in the rat cardiac allograft model. *Transplant Proc*, 31: 103-105.
146. Teranishi K, Poston RS, Reitz BA, Robbins RC. (1998) Oral delivery of low molecular weight heparin in rat cardiac allografts. *Transplant Proc*, 30: 996-997.
147. Aziz S, Tada Y, Gordon D, McDonald TO, Fareed J, Verrier ED. (1993) A reduction in accelerated graft coronary disease and an improvement in cardiac allograft survival using low molecular weight heparin in combination with cyclosporine. *J Heart Lung Transplant*, 12: 634-643.
148. Braun C, Schultz M, Fang L, Schaub M, Back WE, Herr D, Laux V, Rohmeiss P, Schnuelle P, van der Woude FJ. (2001) Treatment of chronic renal allograft rejection in rats with a low-molecular-weight heparin (reviparin). *Transplantation*, 72: 209-215.
149. Gottmann U, Mueller-Falcke A, Schnuelle P, Birck R, Nickleit V, van der Woude FJ, Yard BA, Braun C. (2007) Influence of hypersulfated and low molecular weight heparins on ischemia/reperfusion: injury and allograft rejection in rat kidneys. *Transpl Int*, 20: 542-549.
150. Byrne GW, Schirmer JM, Fass DN, Teotia SS, Kremers WK, Xu H, Naziruddin B, Tazelaar HD, Logan JS, McGregor CG. (2005) Warfarin or low-molecular-

weight heparin therapy does not prolong pig-to-primate cardiac xenograft function. *Am J Transplant*, 5: 1011-1020.

151. Farivar AS, Mackinnon-Patterson B, McCourtie AS, Namkung J, Ward PA, Mulligan MS. (2005) Obliterative airway disease in rat tracheal allografts requires tumor necrosis factor alpha. *Exp Mol Pathol*, 78: 190-197.
152. Maddineni J, Walenga JM, Jeske WP, Hoppensteadt DA, Fareed J, Wahi R, Bick RL. (2006) Product individuality of commercially available low-molecular-weight heparins and their generic versions: therapeutic implications. *Clin Appl Thromb Hemost*, 12: 267-276.

12. Saját közlemények bibliográfiai adatai

12.1. Közlemények az értekezés tárgykörében

1. Antus B, Fillinger J, Csiszér E, Czebe K, Horváth I. (2005) Bronchiolitis obliterans szindróma a tüdőtranszplantáción átesett betegekben. Orv Hetil, 146: 953-958.
2. Antus B, Fillinger J, Soltész I, Horváth I. (2005) A bronchiolitis obliterans modellezése patkányokban. Med Thor, 58: 8-13.
3. Antus B, Fillinger J, Sebe A, Jeney C, Soltesz I, Horvath I. (2006) No gender difference in development of obliterative airway disease in rat tracheal allografts. Exp Mol Pathol, 81: 235-238.
4. Antus B, Sebe A, Fillinger J, Jeney C, Horvath I. (2006) Effects of blockade of the renin-angiotensin and endothelin systems on experimental bronchiolitis obliterans. J Heart Lung Transplant, 25: 1324-1329.
5. Antus B, Fillinger J, Sebe A, Jeney C, Horvath I. (2008) Late treatment with angiotensin-converting enzyme inhibitors plus endothelin receptor antagonists ameliorates rat tracheal allograft rejection. Transpl Int, 21: 801-807.
6. Fillinger J, Antus B. (2010) Low-molecular-weight heparins do not modify obliterative airway disease in rat tracheal allografts. Exp Lung Res, 36: 625-631.

12.2. Közlemények az értekezés tárgykörén kívül

1. Renyi-Vamos F, Tovari J, Fillinger J, Timar J, Paku S, Kenessey I, Ostoros G, Agocs L, Soltesz I, Dome B. (2005) Lymphangiogenesis correlates with lymph node metastasis, prognosis, and angiogenic phenotype in human non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res, 11: 7344-7353.
2. Ostoros G, Pretz A, Fillinger J, Soltesz I, Dome B. (2006) Fatal pulmonary fibrosis induced by paclitaxel: a case report and review of the literature. Int J Gynecol Cancer, 16: S391-S393.
3. Csiszér E, Antus B, Himber G, Hertel K, Fillinger J. (2007) Új diagnosztikus módszer pulmonalis carcinoidban. Magy Onkol, 51: 225-228.
4. Csiszér E, Antus B, Himber G, Hertel K, Fillinger J, Rácz K. (2007) Tumormarker lehetőség pulmonalis carcinoidban. Med Thor, 60: 231-234.

13. Köszönetnyilvánítás

Az értekezés alapját képező tudományos munkákra az Országos Korányi TBC és Pulmonológiai Intézet Kóréletteni és Pathológiai osztályain került sor. A kísérletek megvalósulásához, illetve a munka elvégzéséhez az OTKA F046526, valamint az ETT 94/2003 sz. pályázatok nyújtottak támogatást.

Doktori munkámhoz kapcsolódóan mindenekelőtt köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek, dr. Antus Balázsnak, hogy az általa vezetett kutatómunkába bekapcsolódhattam, és résztvevője lehettem munkacsoportjának a Kóréletteni Osztályon. Hálás vagyok munkám szakmai irányításáért, a tudományos tevékenységem során felmerülő nehézségek megoldása terén nyújtott sokoldalú segítségéért, illetve a tudományos közlemények megírása során nyújtott kritikus szakmai észrevételeiért. Köszönöm a disszertációm megírása során nyújtott segítségét is.

Köszönettel tartozom a Pathológiai Osztály vezetőjének, dr. Soltész Ibolya főorvos asszonynak is, hogy a napi rutin munka mellett lehetővé tette számomra a kutatómunkában való részvételt. Köszönöm továbbá Intézetünk vezetőjének dr. Strausz János Professzor Úrnak is, hogy lehetőséget teremtett arra, hogy az Intézetben kutatómunkát végezzek.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni dr. Csiszér Eszter főorvos asszonynak, hogy figyelmemet a tüdőtranszplantáció felé irányította és szakmai példamutatásával az igényes munka megbecsülésére és szeretetére nevelt. Hálás vagyok emberi támogatásáért és szakmai iránymutatásáért, amit a munkám során tőle kaptam.

Köszönettel tartozom továbbá a Kóréletteni és Pathológiai Osztályok asszisztenseinek is, akik nélkül a munkámhoz és a kísérletek kiértékeléséhez szükséges metszetek nem készülhettek volna el.