

Légúti biomarkerek vizsgálata tüdőbetegségek diagnosztikájában és kezelésében

Doktori értekezés

Dr. Sótér Szabolcs

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Konzulens: Dr. Antus Balázs Ph.D., osztályvezető főorvos

Hivatalos bírálók: Dr. Horváth Gábor Ph.D., egyetemi docens
Dr. Bálint Beatrix Ph.D., főigazgató főorvos

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Müller Veronika Ph.D., egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Bohács Anikó Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Böszörményi Nagy György Ph.D., ny. egyetemi tanár

Budapest
2015

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	4
2. Bevezetés - Irodalmi háttér	7
2.1. Légúti <i>invazív</i> mintavételi módszerek	9
2.2. Légúti <i>non-invazív</i> mintavételi módszerek	10
2.2.1. Kilégzett gázok	10
2.2.1.1. Frakcionált kilégzett nitrogén-monoxid	10
2.2.1.2. Szén-monoxid	15
2.2.1.3. Szénhidrogének	15
2.2.2. Kilégzett levegő kondenzátum	16
2.2.3. Köpet	17
2.2.3.1. Köpet gyűjtése	17
2.2.3.2. Köpet cytológia	19
2.2.3.3. Asthma	19
2.2.3.4. Stabil COPD	20
2.2.3.5. COPD exacerbáció	21
2.2.4. Légúti biomarkerek	24
2.2.4.1. Citokinek	24
2.2.4.2. Eikozanoidok	25
2.2.4.3. 8-izoprosztán	27
2.2.4.4. Aldehyde	28
2.2.4.5. Nitrit és nitrát	29
2.2.4.6. Hidrogén-peroxid	30
2.2.4.7. EBC pH	30
2.2.4.8. EBC pH a tüdőtranszplantált betegeken	33
3. Célkitűzések	37
4. Módszerek	38
4.1. Első altéma	38
4.1.1. Betegek és vizsgálati protokoll	38
4.1.2. EBC gyűjtése és pH-jának mérése	40
4.1.3. Légzésfunkciós vizsgálatok	40

4.1.4. Statisztikai analízis	40
4.2. Második altéma	41
4.2.1. Betegek	41
4.2.2. Vizsgálati protokoll	42
4.2.3. Légzésfunkciós vizsgálatok	42
4.2.4. FENO-mérés	43
4.2.5. Köpetgyűjtés és feldolgozás	43
4.2.6. Statisztikai analízis	43
5. Eredmények	45
5.1. Első altéma	45
5.2. Második altéma	47
6. Megbeszélés	54
6.1. Első altéma	54
6.2. Második altéma	57
7. Következtetések	61
8. Összefoglalás	62
9. Summary	63
10. Irodalomjegyzék	64
11. Saját publikációk bibliográfiai adatai	81
11.1. Az értekezés tárgykörében megjelent közlemények jegyzéke	81
11.2. Az értekezés tárgykörébe nem tartozó közlemények jegyzéke	82
12. Köszönetnyilvánítás	83

1. Rövidítések jegyzéke

ATS	American Thoracic Society
BAL	bronchoalveolaris lavage
BO	bronchiolitis obliterans
BOS	bronchiolitis obliterans szindróma
CF	cisztás fibrózis
cisz-LT	ciszteinil-leukotrién
CMV	cytomegalovírus
CO	szén-monoxid
CO ₂	szén-dioxid
COPD	krónikus obstruktív tüdőbetegség
COX	ciklooxigenáz
CRP	C-reaktív protein
EBC	kilégzett levegő kondenzátum
ECP	eosinophil kationos protein
EIA	enzim immunoassay
ELISA	enzimmel kapcsolt immunoszorbens assay
ERS	European Respiratory Society
FEF _{25-50%}	forszírozott expirációs áramlás a vitálkapacitás 25-70%-a között
FENO	frakcionált kilégzett nitrogén-monoxid
FEV ₁	forszírozott kilégzési térfogat 1 másodperc alatt
FVC	forszírozott vitálkapacitás
GC/MS	gázkromatográfia/tömegspektroszkópia
GINA	Global Strategy for Asthma Management and Prevention
GOLD	Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease
GRO- α	növekedést szabályozó onkogén- α
HLA	humán leukocytá antigén
HPLC	nagy teljesítményű folyadékkromatográfia
ICAM-1	intracellularis adhézios molekula-1
ICS	inhalációs kortikoszteroid
IL	interleukin

INF- γ	interferon- γ
IPF	idiopathias pulmonalis fibrózis
LABA	hosszú hatású β_2 -agonista
LAMA	hosszú hatású muszkarin agonista
LOX	lipoxigenáz
LT	leukotrién
MCP-1	monocyta kemotaktikus protein-1
MDA	malondialdehyd
MHC	fő hisztokompatibilitási komplex
MMP	mátrix metalloproteináz
MPO	myeloperoxidáz
NADPH	nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
NO	nitrogén-monoxid
NO_2^-	nitrit
NO_3^-	nitrát
NOS	nitrogén-monoxid szintáz
PaCO_2	parciális artériás szén-dioxid nyomás
PaO_2	parciális artériás oxigén nyomás
PBS	foszfát-puffer
PCR	polimeráz láncreakció
PDGF	thrombocyta eredetű növekedési faktor
PG	prostaglandin
PLA_2	foszfolipáz A_2
ppb	részecske <i>per</i> milliárd
PPH	primer pulmonalis hipertonia
RANTES	T-sejt által expresszált és szekretált faktor
RIA	radioimmunassay
ROC	receiver operating characteristic
ROS	reaktív oxigén szabadgyök
SEM	átlag szórása
TBB	transbronchialis biopszia
$\text{TGF-}\beta_1$	transzformáló növekedési faktor- β_1

TLR-2	Toll-like receptor-2
TNF- α	tumor necrosis factor- α
TX	thromboxán
WBC	fehérvérsejtszám

2. Bevezetés - Irodalmi háttér

Az idült légúti gyulladás számos, különböző etiológiájú tüdőbetegség alapvető patofiziológiai jellegzetessége. A légúti gyulladás szabályozásában a sejtekben termelődő citokinek, kemokinek, oxidánsok, vazóaktív anyagok és egyéb gyulladásos mediátorok vesznek részt. A klinikai gyakorlatban széles körben alkalmazott hörgőtágítók és kortikoszteroidok főként e gyulladásos folyamatokra fejtik ki hatásaikat, és ezen keresztül befolyásolják a légúti betegségek kórlefolyását.

Közismert nehézség ugyanakkor, hogy a rutin klinikai gyakorlatban alkalmazott vizsgálómódszerek, így például a spirometria vagy a laboratóriumi vérvizsgálatok nem adnak megfelelő információt a légúti gyulladás mértékéről, típusáról. Ezt az alapvető problémát próbálják kiküszöbölni a légúti *biomarkerek*. A feltételezések szerint a biomarkerek alkalmazásával a légutakban zajló kórfolyamatok pontosabban megítélhetők, ami hozzájárulhat a kórképek kifinomultabb diagnosztikájához és fenotipizálásához, valamint a célzott farmakoterápiához.

Az utóbbi években számos gyulladásos mediátor vonatkozásában merült fel, hogy légúti biomarkerként is felhasználható. A frakcionált kilégzett nitrogén-monoxid (FENO) koncentráció mérése az eosinophilsejtes (asthmás-típusú) légúti gyulladás egyszerű, *non-invazív* markere, amit – egyes megfigyelések szerint – a kilégzett levegő kondenzátumának (EBC) savasodása is kísér. Az EBC pH-csökkenésének kimutatása más kórképek diagnosztikájában is hasznos lehet, különösen, ha annak kialakulása lappangva, markáns klinikai tünetek nélkül zajlik. Ilyen például a tüdőtranszplantált betegek egyik legfontosabb pulmonalis szövődménye, a bronchiolitis obliterans szindróma (BOS). A BOS általában egy lassan progrediáló kórkép, amely a tüdő allograftok jelentős részében megfigyelhető a tüdőátültetés késői időszakában, és amelynek mind a diagnosztikája, mind pedig a kezelése igen problematikus.

A légúti gyulladás megítélésének egy másik, széles körben alkalmazott vizsgálómódszere az indukált köpet sejtprofiljának vizsgálata. Az indukált köpet helyett sok esetben a spontán köpet vizsgálata is megfelelő. A köpetben lévő neutrophil granulocyták és lymphocyták számából a légúti gyulladás intenzitására lehet következtetni. Úgy tűnik továbbá, hogy a köpet eosinophilia kimutatásának nem csak az

asthmában, hanem a krónikus obstruktív tüdőbetegségben (COPD) is jelentősége van, bár ennek részletei ma még kevésbé tisztázottak.

A légúti gyulladás vizsgálata céljából köpetvizsgálatokat a korábbiakban főleg stabil állapotú COPD-s betegekben végeztek. A betegség akut exacerbációjában a légúti gyulladás változása kevésbé ismert és tanulmányozott, jóllehet az akut exacerbációk klinikai jelentőségét egyre több tanulmány támasztja alá. Különösen a súlyos, hospitalizációt igénylő exacerbációk játszanak nagy szerepet a COPD-vel összefüggő egészségügyi kiadásokban, illetve jelentenek kedvezőtlen prognózist a betegség hosszútávú kórlefolyása szempontjából.

A disszertációmban ismertetett kutatómunkában a fenti megfigyelésekből és feltételezésekből kiindulva a légúti biomarkerek egy csoportjának klinikai felhasználhatóságát vizsgáltuk különböző pulmonológiai kórképekben. Egyrészt arra kerestünk választ, hogy a BOS szövődményének kialakulása befolyásolja-e az EBC kémhatását, és ez felhasználható-e diagnosztikai célokra tüdőtranszplantált betegekben. Másrészt, a FENO-mérés és a köpet eosinophilia kapcsolatát, illetve e mérők lehetséges alkalmazását kívántuk jobban megismerni akut exacerbáció miatt hospitalizált COPD-s betegekben.

2.1. Légúti *invazív* mintavételi módszerek

A légúti betegségek vizsgálatában elsődleges jelentőségű a hörgőrendszerben és az alveolusokban zajló patológiai folyamatok megértése és elemzése, melyekről legpontosabb információt mind a mai napig *invazív* mintavételi módszerekkel nyerhetünk [1].

E vizsgálómódszerek „arany standard”-ja a bronchosopia során végzett transbronchialis biopszia (TBB). A szövettani vizsgálat pontos és definitív választ ad a hámiban zajló strukturális változásokról, a gyulladás sejtes összetevőiről. Immunhisztokémiai vizsgálatok segítségével a sejteken expresszálódó különböző glikoproteinekről és gyulladásos markerekről további értékes információhoz juthatunk. Külön vizsgálhatók a kötőszövetes elemek, a mirigyek szerkezete, a basalmembrán, a submucosalis területek kapcsolatai, a hám autonóm ér- és idegrendszere. Elkülöníthetők az immunológiai folyamatokban szerepet játszó sejtpopulációk, vizsgálhatók azok kapcsolatai a légzőrendszer reziduális sejtjeivel.

A módszer hátránya, hogy a folyamatok heterogenitása miatt sokszor csak több helyről vett minta mutatja ki egy-egy betegség megjelenését és/vagy kiterjedését, mivel a proximalis és a distalis légutak, valamint a parenchyma érintettsége betegségenként eltérő lehet. További nehézség, hogy a mintavétel, mint *invazív* beavatkozás számos kockázatot rejt magában a légúti infekciókon és a pneumothoraxon át a ritka, akár halálos kimenetelű szövődményekig. E veszélyek miatt a TBB nem használható monitorozás céljából a légúti gyulladás vizsgálatára vagy egy terápia hatékonyságának megítélésére.

A bronchosopia során egy másik mintavételi eljárás, a bronchoalveolaris lavage (BAL) is végezhető. A BAL a TBB-hoz képest kevésbé kockázatos, de szintén *invazív* beavatkozás. Néhány vizsgálatban nemcsak kórállapotok meghatározásához, hanem a terápia eredményességének megítéléséhez, illetve a dohányfüst hatásainak elemzéséhez is használták. Több információval szolgál a perifériáról, mint a TBB, de gyakran (például súlyos emphysemában) a beadott mosófolyadék nem nyerhető vissza teljes egészében, így a minta hígítási paraméterei nem határozhatók meg pontosan.

Ugyanakkor, itt is számos kockázati tényező merül fel a bronchosopia elvégzése során: a szájlóra alsó légutakba juttatásától az akut légzési elégtelenségig. Összességében, e vizsgálatok veszélyei, az eltérő eredmények, illetve a standardizálás nehézségei szükségessé teszik megbízható, veszélytelen, jól reprodukálható és az alsó légutak patológiai folyamatiról pontos információt adó *non-invazív* vizsgálómódszerek alkalmazását.

2.2. Légúti *non-invazív* mintavételi módszerek

Az utóbbi években egyre intenzívebb kutatás folyik új, *non-invazív* vizsgálómódszerek kifejlesztésére, illetve a már meglévő technikák hatékonyságának növelésére [2,3]. A módszerekkel szemben követelmény, hogy könnyen elvégezhetőek és ismételhetőek legyenek, a beteg számára csak minimális megterhelést okozzanak, legyen jó a reprodukálhatóságuk és nem utolsó sorban anyagilag se jelentsenek különösen nagy terhet az egészségügyi intézményeknek.

A következőkben rövid áttekintést adok a jelenleg aktívan tanulmányozott *non-invazív* vizsgálómódszerekről, részletesebben kiemelve azokat a markereket, amelyeket a későbbiekben, a saját kutatómunkámban is felhasználtam.

2.2.1. Kilégzett gázok

2.2.1.1. Frakcionált kilégzett nitrogén-monoxid

Az utóbbi két évtizedben a legnagyobb „karriert” befutott légúti molekula a nitrogén-monoxid (NO), melynek mérése néhány helyen a rutin diagnosztikai algoritmusba is beépült.

Az NO színtelen, szagtalan gáz, amelyről a 90-es évek elején derült ki, hogy szervezetünk sejtjeink legnagyobb része képes termelni és a légutakban is kimutatható [4]. A molekulát az ún. nitrogén-monoxid szintáz (NOS) enzim termeli, melynek több izoformája is előfordul a szervezetben. A három legfontosabb (i) a konstansan működő (cNOS), (ii) a neurális (nNOS) és (iii) az indukálható (iNOS) forma. A cNOS főként az orrüregben és a paranasalis sinusokban fordul elő, ahol fiziológiás körülmények között is jelentősen emelkedett az NO termelés. Az nNOS a légutakban elsősorban a

postganglionalis paraszimpatikus neuronokon található, míg az iNOS expressziója a különféle légúti gyulladásos sejtekben, valamint az eosinophil- és az epithelsejtekben számottevő [5].

Az NO bioszintéziséért felelős enzim L-argininből – oxigén és nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (NADPH) felhasználásával – L-citrullint és NO-t szintetizál. Az NO féléletideje nagyon rövid (kb. 5 másodperc) és a szervezetben hamar átalakul egyéb, még reakcióképesebb nitrogén-oxidokká, így például nitritté (NO_2^-), nitráttá (NO_3^-) vagy peroxinitritté (ONOO^-). Az NO molekula egy elektron leadásával könnyen képez nitrozil- (NO^+) kationt is, amely elektrondonor fémekkel komplexet alkothat [6].

Az NO-nak fontos szerepe van számos élettani folyamat szabályozásában. Az izoenzimok eloszlása evolúciós előnyt jelentő funkcionális szempontokra vezethető vissza. A fentebb említett cNOS például az Orrüregben magas basalis aktivitású, amely az NO-ból képződő szabadgyökök által antibakteriális hatást biztosít [7]. Az alsóbb légutakban – főleg az eosinophil- és az epithelsejtekben – előforduló iNOS bakteriális toxinok, lipopoliszacharidok vagy gyulladásos citokinek (interleukin-1 [IL-1], interferon- γ [IFN- γ], tumor nekrosis faktor- α [TNF- α]) hatására termelődik, és gyulladást-indukáló hatása van [8,9]. A kortikoszteroid csökkentik az iNOS termelődését, ami fontos része gyulladáscsökkentő hatásuknak. Az NO a tüdőben növeli az erek permeabilitását, vazodilatáció és bronchidilatációt okoz, szabályozza a csillók működését, illetve neurotranszmitterként részt vesz a légutak non-adrenerg, non-kolinerg beidegzésében is [10]. Az NO élettani hatásait a hazai szakirodalomban *Antus és Horváth* foglalták össze részletesen a korábbi években [11].

Az NO mérése ma már standardizált formában történik, számos mérőeszköz elérhető a kereskedelmi forgalomban, sőt hordozható, akár otthoni használatra is alkalmas mérőkészüléket is gyártanak (pl. NObreath[®] [Bedfont], NIOX Mino[®] [Aerocrine]). *Antus és mtsai.* igazolták, hogy a kis kézi mérők hatékonysága a nagyméretűekkel megegyezik [12]. A European Respiratory Society (ERS) és az American Thoracic Society (ATS) legutóbb 2011-ben jelentetett meg szakmai ajánlást a mérés metodikájáról és az mérési eredmények interpretálásáról [13].

A mérés egy kilégzési manőver során történik, ahol a páciens a lehető legmélyebb belégzést követően állandó áramlási sebességgel (jelenlegi ajánlás szerint: 50 ml/s) fújja meg az eszközt egy adott ellenállással szemben (8-10 H₂Ocm). Ez utóbbi

ellenállás biztosítja a lágy szájpad záródását és akadályozza meg a felső és az alsó légutakból származó NO keveredését. A legpontosabb mérőműszerek (pl: Logan LR2500) a kemilumineszcencia elvén mérnek, a mérési eredményt részecske *per* milliárd (ppb) mértékegységben kapjuk meg. A mérés általában jól reprodukálható [14], egészséges felnőtt embereknél a frakcionált kilégzett nitrogén-monoxid (FENO) szint 20-25 ppb alatt van. A dohányosokban a FENO koncentráció alacsonyabb [15].

Közismert, hogy a kortikoszteroidok csökkentik a FENO szintet, ami része gyulladáscsökkentő hatásuknak [16]. A leukotrién antagonisták enyhébb gyulladáscsökkentő hatásuknak megfelelően csak kisebb mértékben csökkentik a FENO koncentrációt [17]. Az obstruktív kórképekben gyakran alkalmazott β_2 -agonisták és teofillin származékok nem befolyásolják a FENO szintet.

A pulmonológiai kórképek közül a FENO-mérés szerepét leginkább az asztma bronchiale vonatkozásában tanulmányozták. Általánosan elfogadott, hogy az asthma exacerbációt jelentős FENO-emelkedés kíséri [18,19]. Egyes megfigyelések szerint az asthma diagnosztikájában a FENO mérés diagnosztikai értéke nagyobb, mint a légzésfunkciós vagy a reverzibilitási teszté [20,21]. A FENO mérése segítséget nyújthat az asthma differenciáldiagnózisában is. Különösen az atípusos tünetekkel, például időszakos száraz köhögéssel jelentkező betegeknél lehet a FENO szintjének meghatározása szenzitív és specifikus módszer annak kimutatására, hogy a köhögést valóban asthma okozza-e [22]. A reflux okozta krónikus köhögésben FENO-emelkedés nincs, ami szintén a differenciáldiagnózist segíti.

Más adatok szerint a FENO szint emelkedése 80-90%-os pozitív prediktív értékkel előre jelezheti az asthmás állapot romlását, még a klinikai tünetek megjelenése előtt [23]. A FENO-mérés segítheti az asthmás beteg monitorozását is. *Green és mtsai.* kimutatták, hogy a FENO alapján történő kezelés mellett az egy év alatt jelentkező exacerbációk száma egyharmadára csökkent a hagyományosan beállított betegeknél megfigyeltekhez képest, amellet, hogy a gyulladáscsökkentő szerek összmenységében nem volt különbség a két csoport között [24]. Ennek ellenére a Global Strategy for Asthma Management and Prevention (GINA) jelenlegi ajánlása továbbra sem javasolja az asthmás betegek FENO alapján való hosszú-távú követését vagy kezelését [25].

Végül, egyes szakértők véleménye szerint a FENO-mérés az asthmás beteg *compliance* monitorozásának eszköze is lehet, mivel a magas FENO érték a gyógyszer önkényes elhagyását vagy az inhalátor nem megfelelő használatát jelzi inhalációs kortioszteroid (ICS) terápiára beállított betegekben.

Az asthmához képest jelentősen kevesebb információval rendelkezünk a FENO-mérésnek a COPD-ben betöltött szerepéről, különösen az exacerbációk vonatkozásában. A méréseket nehezíti, hogy a COPD-s betegek többsége dohányos, és mivel a dohányzás csökkenti a FENO szintet, a betegek és az egészségesek között mért kis különbségek sokszor összemosódnak. A COPD-s betegcsoporton belül a magasabb FENO szinttel rendelkező betegek gyakran hordoznak egyéb asthmás karaktereket is, így ezeket a betegeket sok szerző nem COPD-s betegnek, hanem ún. overlap szindrómásnak tartja.

COPD-ben a FENO szint általában normális vagy csak enyhén emelkedett [26,27], és csak a betegség akut exacerbációjában emelkedik meg számottevően [28]. Ennek oka, hogy a COPD-t sokkal inkább neutrophil, mint sem eosinophil légúti gyulladás jellemzi. Egyes szerzők különbséget tesznek a tüdő különböző részeiből (nagy légutak vs. kis légutak/alveolusok) származó FENO-nak is, amelyet a mérés során – meghatározott számítások alapján – el is tudnak különíteni (kompartmentalizáció). Úgy tűnik, hogy valóban különbség van a centrális és a perifériás területekről származó minta között: míg a nagy légutakban normál vagy alacsony FENO szint mérhető, addig a kis légutakban általában emelkedett értékek mutatkoznak, melyek jól korrelálnak a betegség súlyosságával és a gyulladás mértékével [29]. Figyelemreméltó, hogy a FENO ezen frakcióját sem a dohányzás, sem az ICS kezelés nem befolyásolja.

A legtöbb vizsgálat és összefoglaló közlemény kiemeli, hogy a magasabb FENO szint általában légúti eosinophiliával és nagyobb szteroidérzékenységgel társul a COPD-s betegekben, bár az világos, hogy ezt a COPD-hez társuló asthmának vagy önálló kórképnek kell tartani [30,31]. A FENO szint COPD exacerbációban általában szignifikánsan megemelkedik, bár itt is elmondható, hogy kifejezetten magas értékek esetén inkább társuló asthmáról beszélhetünk. Ilyen szempontból a FENO-mérés a differenciáldiagnózist is segítheti az exacerbációban lévő betegekben.

Brightling és mtsai. 2011-ben közöltek egy nagy betegszámon (145 páciens, 182 exacerbáció) végzett tanulmányt, melyben az exacerbációk biológiai jellemzői alapján

négy fenotípust (alcsoportot) tudtak elkülöníteni *cluster* analízis segítségével [32]. A szerzők egy (i) bakteriális, (ii) virális, (iii) köpet eosinophiliával társuló, valamint (iv) egy ún. „gyulladástól-mentes” exacerbációs fenotípust írtak le. Úgy tűnik tehát, hogy a köpet eosinophiliával járó betegek külön exacerbációs fenotípust jelentenek, bár az továbbra is nyitott kérdés, hogy e betegek kórlefolyása vagy későbbi exacerbációs gyakorisága eltér-e a másik három alcsoportba tartozó betegektől. Az sem világos, hogy ugyanaz a beteg egy következő exacerbáció alkalmával ugyanabba a fenotípusba vagy egy másikba fog nagyobb valószínűséggel tartozni. Végül, mivel a fent említett vizsgálatban FENO-mérés nem történt, a köpet eosinophilia és FENO szint kapcsolata bizonytalan maradt.

Egyes adatok szerint a FENO szint már a COPD exacerbáció klinikai tüneteinek megjelenése előtt megemelkedik, mintegy előre jelezve a közelgő állapotrosszabbodást [33]. Az exacerbáció kezelése során a FENO szint fokozatosan csökken. Kórházi körülmények között az exacerbációk átlagos kezelési időtartama 1-2 hét. A kezelés hosszát általában a klinikai tünetek alakulása határozza meg. A FENO-méréssel a klinikus némi támpontot kaphatna a légúti gyulladás mértékének alakulásáról, és ez alapján a kezelés időtartamát valamelyest optimalizálni lehetne, elsősorban a kortikoszteroidok vonatkozásában [34].

A FENO-mérés egy másik alkalmazási terület lehetne a kislégutak gyulladásának monitorozása. Ígéretes terület lehet továbbá a COPD-hez társuló cor pulmonale kimutatása FENO-méréssel, ugyanis – egyes megfigyelések szerint – szignifikánsan alacsonyabb FENO szintet mérhető akkor, ha a pulmonális nyomás 35 Hgmm-t meghaladja COPD-s betegeknél [35]. Feltételezhető, hogy az alacsony NO termelés a cor pulmonale kialakulásában is kóroki szerepet játszik. További vizsgálatokkal kiválaszthatók lehetnek azok a betegek is, akik a legtöbbet profitálnak hosszú-távú oxigén kezeléssel [36].

A stabil COPD-s betegekben a rövid ideig tartó szisztémás vagy inhalációs szteroid kezelés a légzésfunkciós paraméterek (forszírozott kilégzési térfogat 1 másodperc alatt [FEV₁]) kismértékű javulását eredményezi. A FENO-méréssel a *responder* és a *non-responder* betegek viszonylag jó szenzitivitással és specificitással elkülöníthetők. Az adatok elemzése alapján a magas FENO érték (>50ppb) pozitív prediktív értéke ugyan csak 67%, de az alacsony FENO szint (<27ppb) magas negatív

prediktív értékkel társul (87%) [37,38]. Hasonló eredményre jutott munkacsoportunk egy korábbi munkájában kórházi felvételt igénylő exacerbációkat vizsgálva. A felvételtkor mért magas FENO érték (>27 ppb) jó prediktív értékkel vetítettel előre a szignifikáns FEV_1 -javulást a kezelés után, míg a 27 ppb alatti FENO szint esetén funkcionális javulás nem volt várható (negatív prediktív érték: 85%) [39].

2.2.1.2. Szén-monoxid

A FENO mellett a másik széles körben vizsgált kilégzett gáz a szén-monoxid (CO). A CO az NO-hoz hasonlóan szintén egy színtelen és szagtalan gáz, amely endogén úton részben a haem molekula haem-oxigenáz enzim katalizálta metabolizmusából, részben a lipidmembrán peroxidatív degradációjából keletkezik a szervezetben [40].

Az elmúlt években több kutatócsoport közölt adatokat a CO szint emelkedéséről gyulladásos tüdőbetegségekből, úgymint asthmában [41], bronchiectasiában [42] és cisztás fibrózisban (CF) [43]. Bár a CO mérése egyszerű, teljesen *non-invazív* módon történik, kilégzett koncentrációját a dohány jelentősen befolyásolja, sőt a dohányzás okozta CO-emelkedés általában jóval nagyobb, mint a tüdőbetegségek fennállásával összefüggő növekedés. Ez a körülmény a CO-mérés klinikai alkalmazását nagyban korlátozza. A mérés napjainkban leginkább a dohányzási státusz megítélésére (aktív dohányos vs. nem dohányos) vagy a dohányzásról való leszokás objektív monitorozására használható [44].

2.2.1.3. Szénhidrogének

A szénhidrogének közül az etán és pentán vonatkozásában történtek vizsgálatok. Mindkettő az oxidatív stressz okozta lipidperoxidáció mellékterméke. Mérésük gázkromatográfiával történik, ami bonyolult és nehézkes technika, bár egyszerűbb mérőeszközök kifejlesztése jelenleg is zajlik.

Több vizsgálatban közöltek emelkedett etán és/vagy pentán értékeket asthmában, egyes munkacsoportok csak exacerbációban, még mások stabil klinikai állapotban is [45,46]. Emelkedett etán szintet mutattak ki COPD-ben is, és úgy tűnik, hogy az emelkedés mértéke a COPD súlyosságával, illetve a FEV_1 értékkel is összefüggést mutat [47]. A mérések elterjedése a klinikai gyakorlatban nem várható.

2.2.2. *Kilégzett levegő kondenzátum*

Az EBC gyűjtése egyszerű, biztonságos és teljesen *non-invazív* módszer [48,49]. Az eredetileg orosz kutatók által kidolgozott technika az ezredforduló után vált egyre szélesebb körben tesztelt vizsgálómódszerré a pulmonológiai kutatásban. Az eljárás lényege, hogy a tüdőből kilégzett levegőt hideg felszínen lecsapatják, majd az így keletkező folyadékot valami módon összegyűjtik. Az EBC több mint 99%-át víz alkotja. Emellett számos citokint, növekedési faktort, gyulladásos mediátort és metabolitot is tartalmaz, igen kis koncentrációban. Ezek az anyagok legvalószínűbben a hörgőrendszer felszínét borító vékony folyadékfilmből származnak, amelyek – mint kis cseppecskék – a kilégzés közben fellépő turbulencia hatására a kilégzett levegőbe kerülnek. Mivel a tüdőbetegségekben az egyes alkotóelemek koncentrációja megváltozhat, az EBC komponensei biomarker szerepet játszhatnak a légúti kórállapotok felismerésében vagy monitorozásában [50].

A EBC alkotórészeinek eredete nem teljesen tisztázott, az alsó légutakon kívül a felső légutak és a táplálkozás is befolyásolhatja az EBC összetételét. Ugyanakkor, az összehasonlító elemzések alapján a molekulák nagy része az alsó légutakból származik, ha nem is egyezik meg pontosan a BAL során nyert minták összetételével [51]. A kezdeti technikai nehézségek után a mintagyűjtés ma már nagyrészt standardizált formában történik. Az ERS munkacsoportja – *Horváth Ildikó* professzorasszony vezetésével – 2005-ben közölt ajánlást az EBC gyűjtésének, illetve a markerek mérésének metodikájáról [52]. A módszer a hazai szakirodalomban szintén bemutatásra került [53], kihangsúlyozva az egyes kórképekben, így például a COPD-ben való alkalmazásának lehetőségeit [54]. Ennek ellenére a technika a gyakorlatban egyelőre nem terjedt el a mérések nagy variabilitása és gyenge reprodukálhatósága miatt.

A mintagyűjtés során a betegek csutorán keresztül lélegeznek, egy szeleppel elválasztva a be- és a kilégzés fázisait [55]. A kondenzátum gyűjtésére számos eszköz a kereskedelmi forgalomban is kapható. A gyűjtőberendezések méretben és árban is nagyon különbözőek, vannak saját hűtőberendezéssel rendelkező típusok (Ecoscreen®, [Jaeger]) és vannak egyszer használatos gyűjtőcsövek is (RTube®, [Respiratory Research]). 10-15 perces normál légzés mellett 1-3 ml kondenzátum gyűjthető. Ugyanakkor a légzési technika nem teljesen standardizált, a széles körben elfogadott a

nyugalmi légzés alkalmazása. Az orrcsipesz használata befolyásolja a gyűjtött kondenzátum mennyiségét, használata a gyűjtés során általában ajánlott [56].

A kapott mintát számos módszerrel lehet elemezni. A leggyakrabban alkalmazott technikák az enzim immunoassay (EIA), az enzimmel kapcsolt immunoszorbens assay (ELISA), a radioimmunassay (RIA), az antitest microarray, a nagy teljesítményű folyadékkromatográfia (HPLC) és a különböző kolorimetriás, spektrofotometriás és luminometriás mérés technikák. Bár e módszerek igen pontosak és megbízhatóak, a vizsgált molekulák alacsony koncentrációja miatt sok esetben komoly detektálási nehézségek merülnek fel. Előfordul, hogy a vizsgált marker szintje az assay detektálási limitjét sem éri el, vagy ha el is éri, az értékekben jelentős variabilitás látszik. A minták eltérő hígulásából eredő bizonytalanságok is bonyolítják az eredmények kiértékelését. Éppen munkacsoportunk korábbi mérései bizonyítják, hogy a kondenzáló berendezés mintagyűjtő felületének anyaga (műanyag vagy üveg), az EBC gyűjtés hőmérséklete is befolyásolhatja a kapott mérési eredményeket [57]. Sőt, akár a többször használatos alkatrészek fertőtlenítése használt oldatok is okozhatnak komplikációkat a mérések során (kutatócsoportunk nem publikált eredménye).

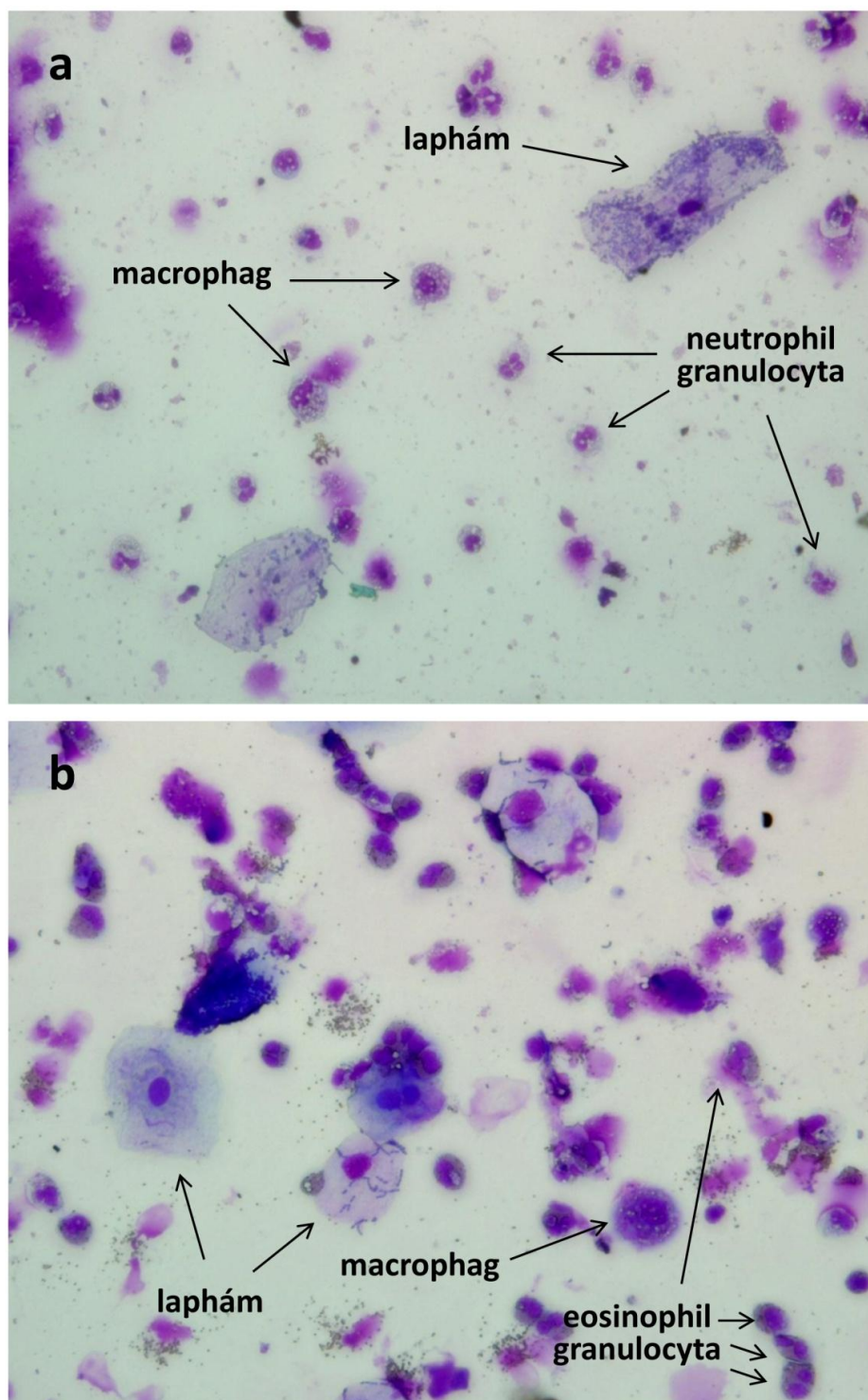
2.2.3. Köpet

2.2.3.1. Köpet gyűjtése

A légúti minták egy másik típusa a köpet, amely egyes tüdőbetegségekben spontán módon, más esetekben hipertóniás (3-5%-os) sóoldat inhalálásával indukálva nyerhető. Az indukció általában 5-10 percig tart. A sóoldat belégzése után a vizsgált személynek az alsó légúti váladékát egy steril tartályba kell felköhögnie. A mintavétel akkor számít megfelelőnek, ha szájüregi kontaminációt jelző laphámsejtek aránya 20%-nál kisebb. Hasonlóan a FENO-méréshez, az indukció technikája és a köpet minta feldolgozása ma már standardizált módszer szerint történik, az ERS ajánlása szerint [58]. A köpet indukció *szemi-invazív* módszer, kevés veszéllyel jár, a beteg számára általában nem megterhelő, a feldolgozás szempontjából viszont munkaigényes folyamat.

Feldolgozás után a köpetet két részre lehet elkülöníteni: a sejtes elemeket tartalmazó frakcióra (*sejtes fázis*) és a köpet felülúszóra (*folyékony fázis*). A vizsgálatok szempontjából igen eltérő háttérrel feltételez a két frakció elemzése: míg a felülúszó

vizsgálata klinikai laboratóriumi és molekuláris módszerekkel történik, addig a sejtek vizsgálatához cytológiai módszerek szükségesek (1. ábra).



1. ábra. A köpet cytológiai képe COPD-s betegben

COPD-s betegek köpetében leggyakrabban neutrophilsejtek fordulnak elő („a” panel), bár néhány beteg köpetében eosinophilsejtek is megjelenhetnek („b” panel). May-Grünwald-Giemsa festés, ×40

Számos, a szérumban széles körben vizsgált fehérje/polipeptid természetű anyag, például az albumin vagy fibrinogén jelenik meg a légúti betegek köpetében. A másik, gyakran vizsgált csoportot a gyulladásos folyamatokban szerepet játszó sejtek által termelt proteinek, enzimek képezik, ilyen például az eosinophil kationos protein (ECP) vagy a myeloperoxidáz (MPO). Nagy jelentőségűek még a proteázok és az antiproteázok is, amelyek szerepét először az emphysema patomechanizmusában vizsgálták a proteáz-antiproteáz egyensúly felborulásának hipotézise alapján.

2.2.3.2. Köpet cytológia

A köpet cytológiai vizsgálata a minta *quantitatív* (tömeg, szín, összesejtszám) és *qualitatív* (sejtes elemek megoszlása) vizsgálatát foglalja magában. A cytológiai vizsgálatra a köpet sejtes fázisának kinyerése, majd festése után kerül sor. Leggyakrabban Hematoxilin-eozin vagy Giemsa festési eljárást alkalmaznak (*1. ábra*). Az egészséges személyek köpetében legnagyobb százalékban (40-60%) macrophagok fordulnak elő, melyeket gyakoriság sorrendjében a neutrophil granulocyták (25-45%) követnek [59]. A lymphocyták (1-2%) és az eosinophil granulocyták (0.3-0.6%) csak nagyon alacsony százalékban fordulnak elő az egészséges ember köpetében. A jelenlegi klinikai gyakorlatban a köpet cytológiai vizsgálatát leginkább a tüdődaganatos betegek kivizsgálása során alkalmazzák a daganat verifikációja céljából. Más betegeknél nagyon ritkán történnek ilyen vizsgálatok.

Az egyes légúti betegségekre más-más sejttösszetétel (sejtprofil) jellemző, és általánosságban elmondható, hogy a betegségekre jellemző cytológiai kép a patofiziológiai alapokat is jól tükrözi. Így például megkülönböztetünk neutrophil-, illetve eosinophilejt dominanciával járó, valamint lymphocytás légúti gyulladást. Az obstruktív tüdőbetegségek közül a COPD-t típusosan neutrophilsejtes jellegű, míg az asthmát eosinophilejtes légúti gyulladás jellemzi. A tüdőtranszplantált betegekben leginkább a lymphocyták dominanciája figyelhető meg a köpetben. A továbbiakban köpet sejtprofilját az asthma és a COPD vonatkozásában mutatom be röviden.

2.2.3.3. Asthma

Az asthma bronchialét általában köpet eosinophilia jellemzi, ami egyben a szteroidokra való érzékenységet is valószínűsíti. Ezzel ellentétben a légúti (köpet) eosinophilejtek

alacsony száma a kortikoszteroidokkal szembeni gyengébb válaszkészséget vetíti előre [60]. Az eosinophilsejtek szerepe kulcsfontosságú az asthmás gyulladás fenntartása szempontjából. A sejtek által termelt peroxidázok, leukotriének (LT), reaktív oxigén és nitrogén szabadgyökök okozzák az epithelium sérülését, a simaizom kontrakcióját és a nyák hiperszekrécióját, melyek meghatározó elemei az asthma patofiziológiájának. Az eosinophilsejtek kulcs szerepére utal az is, hogy egérekísérletekben az eosinophilsejt irányú differenciálódás gátlása vagy az eosinophilsejtek célzott pusztítása esetén sem a bronchialis hiperreaktivitás, sem a nyák hiperszekréció nem jelenik meg [61]. Néhány klinikai vizsgálat eredménye alapján úgy tűnik, hogy az asthma kontroll növelhető, illetve az akut exacerbációk száma visszaszorítható, ha a betegek farmakológiai kezelése során a légúti eosinophilia fennállását is figyelembe veszik, és azt terápiásan csökkenteni próbálják [62,63].

Az asthma kialakulásában kulcsszerepe van a Th1/Th2 lymphocytá egyensúly Th2-es irányba való eltolódásának is. Az utóbbi évtizedek kutatásai azonban azt is bebizonyították, hogy ez a teória önmagában nem magyarázza az asthmás gyulladás kialakulását, és ebben szerepe van két másik T-sejt populációnak is: a Th17 sejteknek és a regulatorikus T-sejteknek. Végül, meg kell megemlíteni, hogy az asthmások egy kisebb csoportjában a köpetben nem eosinophilsejtes, hanem neutrophilsejtes gyulladás mutatható ki [64]. E betegek csökkent szteroid érzékenységgel jellemezhetőek.

2.2.3.4. *Stabil COPD*

A COPD-ben kialakuló légúti gyulladásra a neutrophilsejtek, a macrophagok és a CD8⁺ T-lymphocyták felszaporodása jellemző [65]. A COPD súlyosbodásával a macrophagok számának növekedése mellett a B-sejtek megjelenése is várható.

A jelenlegi ismeretink szerint a gyulladásos sejtek közül a neutrophilsejtek szerepe talán a legmeghatározóbb a betegség kialakulásában. Tünetmentes dohányosokkal összehasonlítva a neutrophilsejtek száma emelkedett a COPD-s betegekben, és a légúti áramláskorlátozottság mértéke (FEV₁) is általában negatív összefüggést mutat a köpet neutrophilsejtszámával [66]. A dohányfüst az epithelsejtek és a macrophagok aktivációját okozza, ami kemokinek és TNF- α felszabadulásával jár, ami a neutrophilsejtek lokális akkumulációját váltja ki. További neutrophilsejt felszaporodást és aktivációt eredményez a cigarettafüst oxidáns tartalma által kiváltott

gyulladás és a bronchialis hámban fellépő programozott sejthalál is. A neutrophil granulumokban termelődő proteázok és elasztázok a proteáz-antiproteáz egyensúly felborulását okozzák a hörgők falában, a felhalmozódó extracelluláris mátrix fragmentumok (kollagén, laminin) pedig további kemotaktikus ingereket jelentenek a neutrophilsejtek számára [65]. Ezen hatások együttesen vezetnek a légutak irreverzibilis átépüléséhez, és a COPD-re jellemző neutrophilsejtes gyulladás kialakuláshoz.

A fenti folyamatokat súlyosbítja a macrophagok akkumulációja, e sejtek proteáz és neutrophil kemokin termelésükkel további erősítik a gyulladásos folyamatot. A macrophagok számának növekedését a klinikai tünetek súlyosbodása is követi.

A COPD-re jellemző légúti gyulladás kialakulásában a T- és a B-lymphocyták szerepe sem elhanyagolható. Egyes tanulmányokban azt mutatták ki, hogy a köpetben kimutatható CD8⁺ T-sejtek közül a vírusinfekciókra reagáló ún. 1-es típusú T-sejtek fordulnak elő legnagyobb számban [67]. Célpontjaik a vírusfertőzött epithelialis sejtek, amelyekben programozott sejthalált indukálnak.

Régóta ismert a COPD-s betegek egy kisebb csoportjának köpetében eosinophilia mutatkozik. E megfigyelés klinikai jelentősége az, hogy e betegek szteroidokkal szemben jobb terápiás válaszkészséggel rendelkeznek, szemben COPD-s betegek szteroidrezisztenciájával. Egyes szakember szerint e betegek valójában asztmások, akiket újabban overlap szindrómásoknak is neveznek. A légúti eosinophilia ugyanakkor vírusfertőzés következménye is lehet. Nem tisztázott, hogy a stabil állapotban légúti eosinophiliát mutató betegekben az akut exacerbáció során is kimutatható-e az eosinophilia.

2.2.3.5. COPD exacerbáció

COPD akut exacerbációban a légúti gyulladás fokozódása figyelhető meg, ami a köpet összsejtszámának és neutrophilsejtszámának növekedésében is látszik. Az exacerbációkat többféle szempont szerint lehet osztályozni. Klasszikusnak számít *Anthonisen és mtsai*-nak a klinikai tüneteken alapuló beosztása [68]. A definíció szerint az 1. csoportba azok a betegek sorolhatók, akiknek légszomja, purulens köpete és fokozott köpetürítése van; a 2. csoportba azok a betegek tartoznak, akiknél a fenti három tünetből csak kettő van jelen, míg a 3. csoportba sorolt páciensekben a fenti tünetek közül csak egy van jelen, de ehhez az alábbiak tünetek társulnak: az elmúlt 5

napban lezajlott felső légúti infekció, más okkal nem magyarázható láz, fokozódó sípólás vagy köhögés, vagy a pulzus és légzésszám 20%-ot meghaladó növekedése a klinikailag stabil állapothoz képest.

Az exacerbációk az etiológia szerint is osztályozhatók: (i) virális, (ii) bakteriális, és (iii) kevert vagy nem tisztázott etiológiájú. A korábbiakban már említett vizsgálatban *Bafadhel és mtsai.* négy exacerbációs alcsoportot (fenotípust) tudtak elkülöníteni cluster analízis segítségével: (i) a baktérium, (ii) és a vírus okozta exacerbációk mellett egy (iii) köpet eosinophiliával jellemezett és egy (iv) „gyulladástól-mentes” csoportot is azonosítottak [32].

A különböző kutatások változó mértékben, 27-48%-ban teszik felelőssé a vírusokat a COPD exacerbáció kialakulásában. A fenti vizsgálatban az exacerbációk 29%-ában igazoltak vírusos eredetet, legtöbb esetben rhinovírust. A legjobb vírusra utaló köpet és szérum markernek a CXCL10 molekula (IP10) bizonyult. A vizsgálatok idejétől és helyétől függően a vírusfajok nagy változékonyságot mutatnak az RS vírusoktól egészen az influenza-, metapneumonia-, picorna- és rhinovírusokig [69,70]. Az utóbbiak több szempontból is érdekes csoportnak számítanak. A légúti epithelsejtek felszínén ugyanis az intracellularis adhéziós molekula-1 (ICAM-1) fokozott jelenléte a rhinovírusok fokozott kötődési képességével párosul. *Mallia és mtsai.* által elvégzett kísérlet alapján stabil COPD-s betegekbe juttatott kisszámú rhinovírus minden betegben előbb felső légúti, majd pár nap késéssel alsó légúti tüneteket, végül pedig akut exacerbációt provokált [71,72]. Sokat kutatott a vírusfertőzések utáni folyamatok patológiája is. A vírusok perzisztálása neutrophil sejtadhéziós molekulák és pro-inflammatorikus citokinek termelődésén keresztül során a légúti obstrukció súlyosbodását és az alapbetegség romlását is okozhatja [73].

A stabil COPD-s betegek 25-50%-a kolonizálódik valamilyen baktériummal az alsó légutakban is, ami megnehezíti annak megítélését, hogy bizonyos baktériumok milyen szerepet játszanak az exacerbációk kiváltásában. Tovább bonyolítja a folyamatot, hogy a kolonizáció mértéke és a patogén baktérium típusa is változó lehet az eltérő időpontokban vett mintákban. Leginkább a *Haemophilus influenzae*, a *Streptococcus pneumoniae* és a *Moraxella catarrhalis* kóroki szerepe bizonyított. E baktériumok jelenléte összefüggést mutat a COPD súlyosságával és a dohányzással is. Eltérőek az eredmények a mintavétel jellegétől függően is. Spontán köpet tenyésztése és

PCR vizsgálata vagy a bronchoscopos mintavétel során más és más eredményre juthatunk, sőt az egyre kifinomultabb módszerekkel még több baktérium mutatható ki (PCR, bakteriális antigén kimutatása), amelyek szerepe még inkább kérdéses [74]. A korábban már említett angliai vizsgálatban az exacerbációk 59%-át tartották bakteriális eredetűnek, és ezek legjobb markerének a köpet IL-1 β és a szérum CRP szint meghatározása bizonyult [32].

Számos vizsgálatban elemezték az egyes bakteriális sejtalkotók immunrendszerre kifejtett hatására. Bronchoscopos mintákban igazolták, hogy bakteriális kolonizáció hatására emelkedik a köpet IL-8 és mátrix metalloproteináz (MMP) szintje, valamint a neutrophilsejtek száma a légutakban a nem kolonizált COPD-s betegekhez képest [75]. A *Haemophilus influenzae* baktérium P6 külső membránfehérjéje az IL-8 citokin termelésén és a Toll-like receptor-2 (TLR-2) szignálút vonal indukcióján keresztül aktiválja az immunrendszert.

Az exacerbáció kialakulásában szerepet játszó baktériumok egy másik, még nehezebben vizsgálható csoportját jelentik az atípusos baktériumok, úgymint például a *Chlamydia pneumoniae*. Egyes adatok szerint az exacerbáció kialakulásában az IgG és IgM típusú antitest meghatározások alapján 4 és 34% között változhat az etiológiai szerepe [76]. A *Mycoplasma* előfordulása ennél is kisebb (<1-14%).

Mint már említettem, *Bafadhel és mtsai.* által elvégzett vizsgálatban a köpet eosinophiliával jellemezett és a „gyulladás-tól-mentes” csoport külön exacerbációs fenotípust jelentett [32]. Köpet eosinophilia az exacerbációk 28%-ában mutatkozott, azonban ezen eseteknek csak kis hányadában sikerült vírust, baktériumot vagy ezek kombinációját etiológiai faktorként igazolni (3, 6, illetve 1%). A „gyulladás-tól-mentes” csoportban nem tudtak kórokozókat kimutatni, és nem találtak olyan markereket sem a vizsgált betegekben, amelyek kórokozó eredetére utaltak volna. Gyulladásos jelek sem voltak, és eosinophilia sem társult ezekhez az exacerbációkhoz, ugyanakkor a klinikai tünetek alapján az exacerbáció fennállt. Régóta ismert, hogy a levegő összetételének és az időjárás változásának hatására növekszik az exacerbációk száma, és az ilyen eredetű exacerbációk az ellátást igénylő exacerbációk akár 9%-át is kiteheti [77]. Az ilyen exacerbációk hátterében a szmogot alkotó részecskék állhatnak, főleg a levegőben lévő kén-dioxid, ózon vagy nitrogén-dioxid szerepe lehet jelentős.

2.2.4. Légúti biomarkerek

2.2.4.1. Citokinek

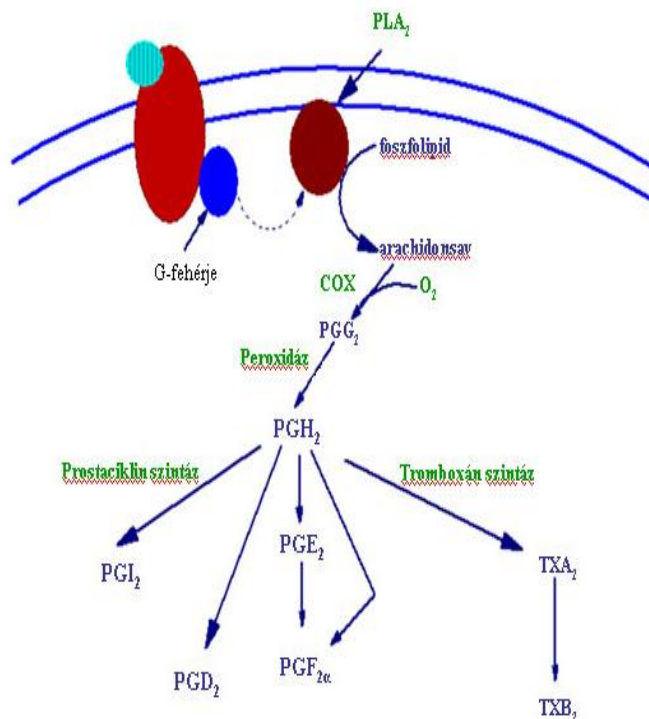
Az EBC-ban és/vagy a köpet felülúszóban detektálható mediátorok közül legszélesebb körben a citokineket vizsgálták. A citokinek viszonylag nagyobb méretű, peptid természetű molekulák, melyek központi szerepet játszanak a gyulladásos folyamatok szabályozásában és a hörgőrendszert érintő kórképek patomechanizmusának szinte minden lépésénél érintettek. Kimutatásuk leggyakrabban EIA/ELISA vagy RIA módszerrel történik. Ritkábban a nagyobb költségigényű, de szenzitívebb és akár 100-120 citokin egyidejű vizsgálatára is alkalmas antitest microarray-t használják.

Általánosságban elmondható, hogy míg asthmában a Th2-es citokin túlsúlynak megfelelően magasabb IL-4, IL-13 és alacsonyabb IFN- γ szint mutatható ki [78,79], addig COPD-ben és CF-ben, a kórképeket jellemző neutrophilsejtes légúti gyulladás hátterében emelkedett IL-6, IL-8 és TNF- α koncentráció igazolható [80,81]. Az IL-10 szintje mint az asthmában, mind pedig a COPD-ben csökkenést mutat [82]. COPD exacerbációban az IL-6, az IL-8 vagy a TNF- α koncentrációja tovább emelkedik, sőt, egyes adatok szerint, a citokinek koncentrációja az exacerbáció súlyosságával is összefüggést mutat [83]. Asthma exacerbációban mind az eosinophilsejt-, mind pedig a neutrophilsejt-aktivációt jelző markerek, úgymint az ECP, az MPO, az IL-8 és IL-5 szintje is megemelkedik, majd az exacerbáció kezelése során e mediátorok szintje csökken [84].

Az antitest microarray asztmásokban való alkalmazásáról először *Matsunaga és mtsai.* közöltek adatokat. Tanulmányukban kimutatták, hogy egyes gyulladásos citokinek szintje (TNF- α , T-sejt által expresszált és szekretált faktor [RANTES], IL-4, IL-8, IL-1 és transzformáló növekedési faktor- β_1 [TGF- β_1]) 1.5-2.7-szeres növekedést mutat asthmás betegek EBC mintáiban az egészségesekhez képest [85]. A módszer COPD-s betegeken való alkalmazásáról egy német munkacsoport számolt be a közelmúltban. Kimutatták, hogy COPD exacerbációban számos citokin és kemokin (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, TNF- α) expressziója szignifikánsan megemelkedik a stabil állapothoz képest [86]. A stabil COPD-s betegek és az egészségesek között ugyanakkor csak néhány citokin (IL-1 β és IL-12) szintjében volt nagyobb eltérés. A vizsgálatban az ICS kezelés több citokin szintjét (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12) is

csökkentette. Saját munkacsoportunk korábbi adatai szerint az antitest microarray csak töményített EBC mintákon ad megfelelő eredményt [87,88], míg a köpet felülúszóban a technika közvetlenül is alkalmazható a citokin profil meghatározására [89,90].

2.2.4.2. Eikozanoidok



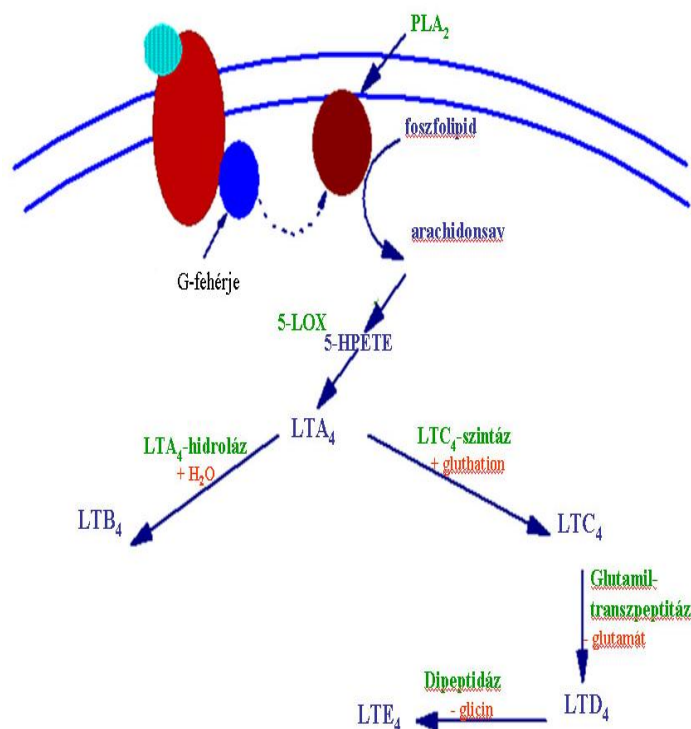
2. ábra. A prosztaglandinok keletkezésének útja

A prosztaglandinok a sejtmembránok foszfolipidjeit felépítő arachidonsav származékai. A folyamat első lépéseként a foszfolipáz A₂ (PLA₂) enzim hatására arachidonsav szabadul fel, majd a prosztaglandin G₂ (PGG₂) mint köztes terméken keresztül prosztaglandin H₂ (PGH₂) keletkezik. A PGH₂ kiinduló molekulája a prosztaciklineknek (PGI₂), valamint a prosztaglandin D₂ (PGD₂) és prosztaglandin E₂ (PGE₂) termékeknek. A thromboxánok (TXA₂ és TXB₂) szintén a PGH₂-ből keletkeznek a sejtekben.

A sejtmembránokat felépítő arachidonsavból különböző utakon sokféle, biológiailag aktív termék képződhet, többek között az eikozanoidok. Az eikozanoidok mind a légutakat, mind a tüdőparenchymát érintő kórképek kialakulásában fontos szabályozó szerepet töltenek be. Viszonylag egyszerűen detektálhatók a különböző légúti mintákban (BAL, EBC, köpet). Kimutatásuk leggyakrabban EIA/ELISA, RIA, HPLC vagy gázkromatográfia/tömegspektroszkópia (GC/MS) módszerrel történik.

Keletkezésüknek két klasszikus útvonala van: a ciklooxygenáz (COX) enzim által katalizált úton a prosztaglandinok (PG) és a thromboxánok (TX) (2. ábra), míg a

lipoxigenáz (LOX) enzim által katalizált úton a leukotrién B₄ (LTB₄), valamint az ciszteinil-leukotriének (cisz-LT), úgymint a LTC₄, LTD₄ és LTE₄ keletkeznek (3. ábra). Az LTB₄ pro-inflammatorikus szerepét erős kemoattraktáns hatásának köszönheti, amelyet elsősorban a neutrophilsejtekre fejt ki. Emelkedett szintjét a köpet felülúszóban és a szérumban is kimutatták stabil COPD-s betegekben [91,92]. A mediátor szintje COPD exacerbációban tovább emelkedik, majd az exacerbáció antibiotikumokkal és szteroiddal való kezelés után csökken [93]. A LTB₄ kimutatható asthmás és CF-es betegek köpetében vagy kondenzátumában is.



3. ábra. A leukotriének keletkezésének útja

A leukotriének szintén a sejtmembránok foszfolipidjeit felépítő arachidonsav származékai. A folyamat első lépéseként a foszfolipáz A₂ (PLA₂) enzim hatására arachidonsav szabadul fel, majd a leukotrién A₂ (LTA₂) mint köztes terméken keresztül leukotrién B₄ (LTB₄), illetve leukotrién C₄ (LTC₄) keletkezik. A LTC₄ ezt követően leukotrién D₄ (LTD₄), majd leukotrién E₄ (LTE₄) termékekké alakul tovább a sejtekben.

A cisz-LT-eknek erős bronchokonstriktor hatásuk van, az asthmás légúti gyulladás kialakulásában betöltött szerepük közismert [94]. Széles körben kimutathatóak mind az EBC-ben, mind pedig a köpetben. Emellett elősegítik a szöveti ödéma kialakulását, fokozzák a nyákképződést és az érpermeabilitást és serkentik a légúti nyálkahártya eosinophilsejtes infiltrációját. Termelődésük főleg a hízósejtekhez, az eosinophilsejtekhez és a macrophagokhoz köthető. A COPD-ben betöltött szerepük

sokkal kevésbé ismert, egyes adatok szerint e betegek légúti mintáiban is kimutathatók és szintjük emelkedett az egészséges kontroll csoporthoz képest [95,96].

A PG-oknak pro- és anti-inflammatorikus hatásuk egyaránt lehet. A PGD_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ és TXB_2 a simaizmok növekedésében, konstrikiójában játszik szerepet, míg a PGE_2 bronchodilátor hatásainak felhasználása új gyógyszerek kifejlesztésének kiindulópontja lehet [97].

2.2.4.3. 8-izoprosztán

Fontos arachidonsav metabolitok az izoprosztánok, amelyek azonban nem enzimatisz uton keletkeznek, és – mint a lipidperoxidáció melléktermékei – a tüdőben zajló oxidatív stressz legfontosabb markerei [98]. Az izoprosztánok között a legtöbbet vizsgált molekula a 8-epi- $\text{PGF}_{2\alpha}$, azaz a 8-izoprosztán. A 8-izoprosztán a vascularis és a bronchialis simaizomsejteken kontrakciót idéz elő [99]. Hasonlóan más arachidonsav származékokhoz, a 8-izoprosztán is viszonylag egyszerűen mérhető mind a köpetben, mind az EBC-ben EIA/ELISA vagy RIA segítségével. Más munkacsoportok ezeknél a technikáknál pontosabb, ugyanakkor a nagyobb költségigényű és bonyolultabb GC/MS-t használják fel kimutatásukra.

Számos vizsgálatban mutattak ki emelkedett 8-izoprosztán szintet COPD-ben vagy asthmában [100], és úgy tűnik, hogy e kórképek akut exacerbációiban a marker szintje tovább emelkedik [93,95,101]. Akut exacerbációban lévő CF-es betegek köpetének felülszójában szintén emelkedett 8-izoprosztán szint mérhető a stabil állapotú betegekhez képest [102]. Végül meg kell jegyezni, hogy a légúti 8-izoprosztán koncentráció dohányfüst expozíció hatására is megemelkedik, ami egyrésztől érthető a dohányzás oxidatív stresszt indukáló hatása miatt, ugyanakkor nehezíti is az egészséges dohányzók és a COPD-s betegek egymástól való elkülönítését [103].

A közelmúltban saját munkacsoportunk szintén behatóan vizsgálta az eikozanoidokat stabil állapotú és exacerbációban lévő COPD-s betegek köpetében [104]. Mérések történtek az exacerbáció kezelése után is. Kimutattuk, hogy a LTB_4 , és a 8-izoprosztán koncentrációja szignifikánsan emelkedik akut exacerbáció miatt kórházi felvételre kerülő betegek köpetében, azonban kezelés után e markerek szintje tartósan emelkedett marad. A PGE_2 szintje stabil állapotban nagyon alacsony volt, több betegben a méréshatár alatt maradt. Exacerbációban azonban jelentős növekedést, míg kezelés

hatására jelentős csökkenést tapasztaltunk, ami felveti e mediátor biomarkerként való alkalmazását. A cisz-LT-ek szintén kimutathatóak voltak a köpetben, azonban szintjük változást nem mutatott, ami arra utal, hogy e mediátorok a COPD-s betegekben nem játszanak meghatározó szerepet az exacerbációval összefüggő légúti áramláskorlátozottság súlyosbodásában.

2.2.4.4. Aldehidek

Fiziológiás körülmények között a szervezetben egyensúlyi állapot van a sejtek anyagcseréje során keletkező ún. oxigén szabadgyökök (ROS) és az ezek hatását ellensúlyozó antioxidánsok között. Ha a folyamat a ROS képződés irányába tolódik el, *oxidatív stresszről* beszélünk. Ilyenkor a sejtekben a sejtmembránokat, a DNS-t és az enzimeket súlyosan károsító folyamatok indulnak el, amelyek hosszabb távon a szervezet egészére káros hatással lesznek, és a legkülönbözőbb kórképeket okozzák.

A legismertebb szabadgyökök a szuperoxid gyökanion ($\bullet\text{O}_2^-$) és a hidroxilgyök ($\bullet\text{OH}$), amelyek elsősorban az aktiválódó gyulladásos sejtekből (granulocyták, macrophagok és monocyták) szabadulnak fel. A sejtkárosító folyamatokban a fenti molekulák mellett ún. reaktív nitrogén intermedierek, például az NO^- vagy a peroxinitrit (ONOO^-) is fontos szerepet játszanak (nitrozatív stressz).

Az oxidatív stressznek a légúti betegségek kialakulásában központi patofiziológiai szerepe van. A folyamatokat munkacsoportunk a közelmúltban a COPD kialakulása szempontjából tárgyalta részletesen a hazai és a nemzetközi irodalomban [105,106]. Oxidatív stressz hatására a sejtmembrán foszfolipidjeit felépítő többszörösen telítetlen zsírsavak bonyolult kémiai reakciók során oxidálódnak, melynek során számos aldehyd keletkezik, így például malondialdehyd (MDA), akrolein, n-hexanal, n-heptanal, n-nonanal. E molekulák mennyiségi meghatározásából az oxidatív stressz mértékére lehet következtetni a légutakban.

A leggyakrabban vizsgált aldehyd az MDA, mérése többféle módszerrel is történhet. A tiobarbiturátsavval történő kimutatást sokan nem tartják elég szenzitívnek, helyette a HPLC-vel való meghatározás sokkal pontosabb és megbízhatóbb [107]. A korábbi években két olasz munkacsoportnak sikerült kimutatni, hogy a COPD-s betegek légúti mintáiban az MDA koncentrációja magasabb, mint az egészséges kontroll csoportban [108,109].

Munkacsoportunk korábbi vizsgálatában ezt a megfigyelést csak a köpetben tudtuk reprodukálni, mivel az EBC-ben az MDA szintje hasonló volt a stabil COPD-s betegekben és az egészségesekben [110]. Igazoltuk ugyanakkor, hogy a köpetben való mérések monitorozási célokra is felhasználhatók: akut exacerbációban ugyanis további emelkedés, míg az exacerbáció kortikoszteroidokkal és hörgőtágítókkal való kezelése során szignifikáns csökkenés tapasztalható. Az MDA szintjének csökkenése főleg azokban a betegekben volt kimutatható, akiknek a légúti áramláskorlátozottsága (ΔFEV_1) is jelentősen javult a kezelés során.

2.2.4.5. Nitrit és nitrát

A nitrogén oxidok szintén az oxidatív/nitrozatív stressz hatására keletkeznek a szervezetben, a vegyületek közül leggyakrabban a nitritet (NO_2^-) vagy a nitrátot (NO_3^-) mérik. A mérések általában spektrofotometriás, kolorimetriás, kemilumineszcenciás vagy ritkábban kromatográfiás módszerrel történnek.

Egyes szerzők a kilégzett nitrogén oxidok közül az NO_2 -t szenzitív és jól hasznosítható markereknek tartják az asthmában, a COPD-ben vagy a tüdőfibrózisban szenvedő betegek és az egészségesek elkülönítésére [111]. Ezzel ellentétben, más munkacsoportok nem találtak különbséget a köpet és/vagy a kondenzátum NO_2/NO_3 szintjében a COPD-s betegek és egészségesek között [112,113]. Megint mások, így például *Corradi és mtsai.* csak a dohányzókban, az asthmásokban és a tüdőgyulladásos betegekben detektáltak magasabb NO_3 koncentrációt az EBC-ben, a COPD-s betegekben mért értékek a normális tartományban maradtak [114].

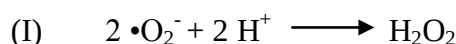
A közelmúltban, egy nagy betegszámon elvégzett klinikai vizsgálatban azt találták, hogy az EBC NO_2/NO_3 szintje összefüggést mutat az allergiás szenzitizáció mértékével asthmás és rhinitises betegekben [115]. Az NO_2/NO_3 szint ugyanakkor az asthma fenotípusokkal nem mutatott kapcsolatot. Végül megemlíthető, hogy a dohányzás is növeli a kondenzátum nitrát szintjét, anélkül, hogy a nitrit szintben változás lenne [116]. A hatás azonban csak átmeneti.

A fenti említett nitrogén oxidok mellett a nitrozotiolok és a nitrotirozin koncentrációja is mérhető a köpetben vagy az EBC-ben, amelyek szintén fontos markerei lehetnek a nitrozatív stressznek a légutakban. A kimutatás kolorimetrikus módszerekkel vagy EIA-val történik. A krónikus légúti gyulladásos betegségek közül

például a CF-ben igazoltak emelkedett nitro tirozin koncentrációt az EBC-ben, sőt a nitro tirozin szint szignifikáns negatív korrelációt mutatott a betegség súlyosságával is [117].

2.2.4.6. Hidrogén-peroxid

A hidrogén-peroxid (H_2O_2) az oxidatív stressz során a képződik a szuperoxid gyökanionokból ($\bullet\text{O}_2^-$) az alábbi reakcióúton (I):



Kimutatása az EBC-ben leggyakrabban spektrofotometriával történik. Emelkedett kilégzett H_2O_2 szint mérhető a COPD-s betegekben, COPD exacerbációban pedig további emelkedés mutatható ki [118,119]. A közelmúltban hasonló összefüggést igazoltak asthmás betegekben is, bár az emelkedés mértéke sem a légzésfunkciós paraméterekkel, sem az asthma kontroll fokával nem korrelált [120]. Az antioxidáns hatású n-acetil-ciszteinnel való tartós kezelés mellett a kilégzett H_2O_2 szint csökkenése figyelhető meg COPD-s betegekben [121]. A mérések variabilitása azonban nagy, ami erősen korlátozza a H_2O_2 meghatározás esetleges klinikai felhasználását.

Az asthmás és a COPD-s betegekben leggyakrabban mérhető gyulladásos mediátorokat/markereket, valamint e kórképekre jellemző köpet sejtes elemeket az 1. táblázatban mutatom be összefoglaló formában.

2.2.4.7. EBC pH

A markervizsgálatok között különleges helyet foglal el a pH mérése az EBC mintákban, tekintettel arra, hogy ez nem egy mediátor koncentrációjának számszerű meghatározását jelenti, hanem az EBC egy kémiai tulajdonságát használjuk fel biomarkerként.

Az EBC pH-ját a folyadékban lévő savak és a lúgok kölcsönhatása határozza meg. Közismert, hogy a szervezet folyadéktereiben a pH az egyik legpontosabban szabályozott tényező. A pH mérése az EBC-ben egyszerű, olcsó, nem igényel speciális laboratóriumi felszerelést, ami nagy előny lehet a klinikai gyakorlatban. A mérés pontos és azonnali eredményt ad, ami szintén fontos szempont a klinikusoknak.

1. táblázat

Asthmás és COPD-s betegek köpetének sejtprofilja és a leggyakrabban vizsgált biomarkerek a köpet felülúszóban

Köpet	asthma	COPD
Sejtprofil	- eosinophilsejtek ↑↑	- neutrophilsejtek ↑↑
(sejtes fázis)	- hízósejtsejtek ↑	- macrophagok ↑↑
	- CD4 ⁺ T-sejtek ↑↑ (Th2)	- CD8 ⁺ T-sejtek ↑
	- B-sejtek ↑	- eosinophilsejtek ↑ (ritkán)
	- neutrophilsejtek ↑ (nem eosinophil asthmában)	
	- dendritikus sejtek ↑	
Felülúszó	- ECP, MPO	- TNF-α
(folyékony fázis)	- eotaxin	- IL-6, IL-8
	- adenozin	- MCP-1, MPO, GRO-α
	- albumin, fibrinogén	- leptin
	- neurokinin A, hisztamin	- LTB ₄ , 8-izoprosztán, MDA
	- cisz-LT, PGD ₂	- neutrophil elasztáz
	- IL-4, IL-5, IL-13 (IL-8)	- MMP-1,-8,-9 és -12

ECP: eosinophil kationos protein, MPO: myeloperoxidáz, MCP-1: monocyta kemotaktikus protein-1, GRO-α: növekedést szabályozó onkogén-α, IL: interleukin, LTB₄: leukotrién B₄, cisz-LT: ciszteinil-leukotrién, PGD₂: prosztaglandin D₂, MMP: mátrix metalloproteináz, MDA: malondialdehid

Ugyanakkor komoly probléma, hogy az EBC-ban való pH-mérés nincs standardizálva. Az egyik legnagyobb problémát a minták szén-dioxid (CO₂) tartalma jelenti, ami az EBC kis pufferekapacitása miatt jelentősen befolyásolja a pH-t. A különböző kutatócsoportok ezt a problémát eltérő módon kezelik: vagy figyelembe sem veszik a CO₂ zavaró hatását, és a pH-méréseket natív („nyers”) mintákon végzik, vagy a minták inert gázzal (pl. argon, hélium) 5-10 percig tartó való átáramoltatásával (350 mL/min) próbálják a CO₂ nagy részét eltávolítani („kiűzni”) a mintákból, és a pH-t ezt követően meghatározzák meg. Az argonnal-való átbuborékolatással a minták CO₂ tartalma ugyan csökkenthető, azonban a CO₂-t teljes mértékben eltávolítani vagy egy állandó szintre csökkenteni nem lehet, azaz a minták CO₂ tartalma a későbbiekben is esetleges, ami a mérések gyenge reprodukálhatóságához vezet.

Saját munkacsoportunk a közelmúltban egy új protokollt fejlesztett ki, melynek segítségével a minták különböző CO_2 tartalmából adódó hatások kiküszöbölhetőek és így a mérések reprodukálhatósága jelentősen növelhető [122]. Az ún. CO_2 standardizációs módszer lényege, hogy a mintákat rövid ideig (kb. 1 másodperc) CO_2 gázzal áramoltatjuk át, miközben meghatározott időközönként 4 alkalommal mintavételek történnek a pH és a CO_2 parciális nyomás (pCO_2) párhuzamos meghatározása céljából. A méréseket a kórházi gyakorlatban széles körben hozzáférhető vérgázanalizátorral végezzük. Az eredménypárokból készített görbén a pH-t adott pCO_2 értéknél (5.33 kPa) határozzuk meg felhasználva a két paraméter közötti logaritmikus összefüggést (5.33 kPa a fiziológiás alveoláris nyomásnak felel meg [40Hgmm], de a pH bármely más nyomásérték mellett is kiszámítható). E módszer segítségével kiküszöbölhető a CO_2 zavaró hatása, a mérések reprodukálhatósága pedig kb. 6-szor jobb [122]. A módszerrel a mérések egy másik problematikája is kiküszöbölődik, nevezetesen a mintatárolás hatása, ugyanis az általánosan alkalmazott fagyasztás során a CO_2 szint csökken, amelynek következtében a minták pH-ja kismértékben, de növekszik.

A légutak pH-jának savas irányba való eltolódása számos patofiziológiai folyamat kiindulója lehet: bronchokonstrikció, a nyák viszkozitásának változása, a ciliáris transzport csökkentése és az epithelium károsodása [123,124].

Mindazonáltal az azért továbbra is kérdéses, hogy az EBC pH-ja mennyire pontosan jelzi a légutakat borító folyadékfilm pH-ját. Számos körülmény és technikai faktor van hatással az EBC mintákban mérhető pH-ra. Ezek közül talán a legfontosabb tényező a minták kontaminációja, ami a kilégzett levegőnek a szájüreggel, az orrüreggel, esetlegesen a gyomor savtartalmával való érintkezéséből fakad [125]. A vizsgálatok alapján a mintagyűjtés ideje, a légzés technikája vagy az orrcsipesz használata a mintavétel közben nem befolyásolja az EBC pH-ját [126]. Ezzel szemben a CO_2 standardizációs módszer használatával munkacsoportunk a közelmúltban kimutatta, hogy a folyadékbevitel [127], a kondenzátor típusa [57], a kondenzálóberendezés hőmérséklete [57], a külső környezet páratartalma [128] és a dohányzás [129] egyaránt befolyásolják az EBC kémhatását, és ezeket a faktorokat figyelembe kell venni a méréseknél. Ugyancsak a saját munkacsoportunk igazolta, hogy

a szájüregi kontamináció mértéke a minták α -amiláz koncentrációjának meghatározás alapján minimálisra tehető [129,130].

Az elmúlt években több kutatócsoport közölt olyan adatokat, amelyek szerint astmában [131,132], COPD-ben [133,134] és CF-ben [135,136] szenvedő betegekben az EBC savasabb az egészségesekhez képest. Egyes kutatók azt is megfigyelték, hogy e kórképek akut exacerbációban a pH tovább savasodik, majd az exacerbáció szteroidokkal és bronchodilátorokkal való kezelése hatására a pH értékek normalizálódik vagy az eltolódás mértéke csökken [131,135,137], ami felveti, hogy a pH-méréseknek akár a betegmonitorozásban is szerepe lehet.

Más munkacsoportok ilyen összefüggést nem találtak [138,139,140] vagy csak tendenciákat tudtak kimutatni savasabb pH értékek irányába a tüdőbetegeknél [141]. Az eredmények ellentmondásossága több tényezőnek is tulajdonítható. Egyrészt, az EBC kémhatását több olyan tényező (kondenzátor típusa, dohányzás, stb.) is befolyásolja, amelyek nem voltak megfelelően figyelembe véve és standardizálva a korábbi vizsgálatokban. Így például a vizsgált betegcsoport aktív dohányos és ex-dohányos betegeket egyaránt tartalmazott. Másrészt, a korábbi munkákban a pH meghatározása nem kellő precizitással történt és a CO_2 zavaró hatását nem vették figyelembe.

2.2.4.8. EBC pH a tüdőtranszplantált betegekben

A disszertációm szempontjából különleges betegcsoportot képviselnek a tüdőtranszplantált betegek. E betegekben számos pulmonalis szövődmény alakulhat ki, amelyek felismerésében a non-invazív vizsgálmódszereknek, így például az EBC pH-mérésnek is nagy szerepe lehet.

Bár az első sikeres tüdőtranszplantáció 1963-ban volt, tartósan jó eredményeket csak két évtizeddel később, a modern immunszuppresszív gyógyszerek, leginkább a cyclosporin bevezetésével sikerült elérni. Azóta a választható immunszuppresszív gyógyszerek palettája tovább szélesedett, és a szakszerű betegkövetésnek, a standardizált protokolloknak, valamint a szervkonzerváló oldatok fejlődésének köszönhetően a transzplantált betegek életkilátásai tovább javultak. Napjainkban világszerte nő a tüdőtranszplantációk száma, eddig közel 28 000 tüdőtranszplantáció történt, és jelenleg évente közel 2500 ilyen beavatkozást végeznek. Ilyen számok mellett ugyanakkor a szövődmények gyakorisága is egyre nagyobb. A leggyakoribb

szövődmények közé az immunszuppresszív szerek következtében fellépő infektív kórképek, illetve a másodlagos daganatok tartoznak. Emellett az akut vagy a krónikus kilökődési reakciók megjelenésével kell még gyakran számolni.

A tüdőtranszplantáció mind a parenchymás, mind a vascularis eredetű tüdőbetegségek végstádiumában egyaránt szóba jön. Kezdetben a primer pulmonalis hipertonia (PPH) és Eisenmenger-szindróma volt a transzplantációhoz vezető leggyakoribb diagnózis. Napjainkban a COPD, az interstitialis tüdőbetegségek, a CF és egyéb, még ritkább kórformák váltak meghatározóvá.

Az alapbetegségtől függetlenül a pulmonalis szövődmények általában hasonlóak. Kutatási szempontból a korai, poszt-operatív infektív szövődmények mellett az akut és a krónikus kilökődési reakciók jelentik a legnagyobb kihívást, melynek során célszerűnek látszik olyan biomarkerek keresése, melyek segítségével non-invazív módon megjósolható a rejekció kialakulása vagy követhető annak lefolyása.

Az akut rejekció humorális és celluláris immunválasz által indított folyamat. A humorális immunválasz előidézhethet hiperakut kilökődési reakciót is. A kilökődés során a humán leukocyta antigének (HLA) vagy egyéb sejtfelszíni alkotó által mediált folyamat indul be, amely a komplement rendszert aktiválja és a folyamat végül kapilláris nekrozison, fibrin lerakódáson keresztül a beültetett szerv elhalásához vezet. A celluláris mechanizmus alapja a donorszerv fő hisztokompatibilitási komplex (MHC) molekuláit felismerő T-helper sejtek aktiválódása. A sejtek kemokinek termelésükkel elősegítik a donorszerv lymphocytás infiltrációját, amely további szervkárosodásokat okoz.

A pulmonalis szövődmények között kiemelt jelentőségű a BOS. A BOS gyakori szövődmény tüdőtranszplantált betegekben, melynek alapvető jellegzetessége a bronchiolusok falának fibroproliferatív átépülése, ami légzésfunkciós romláshoz, életminőség csökkenéshez és végül allograft elégtelenséghez, illetve halálhoz vezet [142]. A bronchiolitis obliterans (BO) alatt a bronchiolusokban megjelenő patológiai elváltozást értjük, míg a betegekben kialakuló kórképet BOS-nak nevezik.

A hazai szakirodalomban *Antus és mtsai.* számoltak be először a BOS kialakulásáról és kórlefolyásáról [143]. A BOS valójában a krónikus szervkilökődésnek a tüdő allograftokban megjelenő formája. Kialakulásának rizikófaktorait hagyományosan alloantigén-dependens és -independes faktorokra osztják. A két

legfontosabb alloantigén-dependens rizikófaktor az akut kilökődés és a HLA mismatch. Az alloantigén-independens mechanizmusok közé az ischaemiás-reperfúziós károsodás, a cytomegalovírus (CMV) és egyéb légúti infekciók, és a gastrooesophagealis reflux betegség tartoznak. A BOS kialakulása során az átültetett tüdő szövetét alloreaktív T-sejtek infiltrálják, amelyek számos pro-inflammatorikus citokint (IL-2, IL-8, INF- γ) és kemokint (monocita kemotaktikus protein-1 [MCP-1], RANTES) termelnek [144]. Károsodik a légúti epithelium is, melynek során az epithelsejtekben pro-fibrotikus citokinek és növekedési faktorok (pl. TGF- β 1, thrombocita eredetű növekedési faktor [PDGF]) szabadulnak fel. Végül a folyamat a hegszövet képződés irányába tolódik el, a bronchiolusok fala megvastagodik, majd a felhalmozódó mátrix elemek a lument egyre jobban beszűkítik és kialakul a BO. A légúti gyulladás kialakulásában a T-sejtek mellett a neutrophilsejtek és a macrophagok citokin és kemokin termelése is jelentős.

Klinikailag a BOS-ra a légzésfunkció paraméterek fokozatos romlása jellemző és a BOS stádiumbeosztása is a megfelelő funkcionális mérők (FEV₁ és forszírozott expirációs áramlás a vitálkapacitás 25-70%-a között [FEF_{25-50%}]) aktuális értéke alapján történik (2. táblázat) [145]. További kritérium, hogy minden egyéb ok, ami potenciónalisán a graft funkcióromlásához vezethet, kizárásra kerüljön. A spirometriás értékek variabilitása miatt azonban diagnosztika sokszor igen problematikus, és a diagnózis felállítása csak előrehaladottabb stádiumban történik, amikor a farmakoterápiás lehetőségek már igen korlátozottak. Mivel a BO kiterjedése a bronchiolusokban nagyon változó, a bronchoscopos úton vett TBB ritkán vezet definitív diagnózishoz. A BOS hatékony kezelése nem megoldott, általában az immunszuppresszív gyógyszerek dózisának emelése javasolt, ami azonban a fertőzőes szövődmények gyakoriságát növeli.

Tüdőtranszplantáltak körében korábban csupán egyetlen vizsgálat zajlott, amelyben az EBC pH-ját mérték a BOS kialakulása előtt és után. E tanulmányban *Dupont és mtsai.* azt mutatták ki, hogy a BOS szövődményét mutató tüdőtranszplantált betegekben az EBC savasabb, mint a stabil klinikai állapotú, BOS-mentes betegekben [146]. A vizsgálatban összefüggést találtak a pH-csökkenés mértéke és a BOS súlyossági stádiumai között is. Az szerzők összességében azt véleményezték, hogy az EBC pH mérése új és ígéretes vizsgálómódszer lehet a BOS szövődményének felismerésében. Meg kell azonban jegyezni, hogy ebben a vizsgálatban a pH mérése

nem a CO₂ standardizációs módszerrel történt, hanem „nyers” mintákban mértek, amit figyelembe kell venni az adatok értékelésénél. A tüdőtranszplantált betegeken végzett saját méréseinket dolgozatom 6. fejezetében mutatom be részletesen.

2. táblázat
BOS stádiumbeosztása (staging) a nemzetközi klasszifikáció alapján

Stádium	Meghatározás
BOS 0	$FEV_1 > 90\%$ és $FEF_{25-75\%} > 75\%$
BOS 0-p	$81\% < FEV_1 < 90\%$ és/vagy $FEF_{25-75\%} < 75\%$
BOS 1	$66\% < FEV_1 < 80\%$
BOS 2	$51\% < FEV_1 < 65\%$
BOS 3	$FEV_1 < 50\%$

BOS: bronchiolitis obliterans szindróma, $FEF_{25-70\%}$: forszírozott expirációs áramlás a vitálkapacitás 25-75%-a között, FEV_1 : forszírozott kilégzési térfogat 1 másodperc alatt

3. Célkitűzések

Az értekezésemben bemutatott tudományos kutatómunka fő célkitűzése az alábbi kérdések vizsgálata volt:

- 1. Változik-e az EBC pH-ja a BOS szövődményének kialakulása során tüdőtranszplantált betegekben, és felhasználható-e ez a vizsgálómódszer a BOS korai diagnosztikájában?**
- 2. Különbözik-e az EBC pH-jának vizitek-közötti variabilitása a BOS szövődményében szenvedő és a BOS-mentes tüdőtranszplantált betegekben?**
- 3. Van-e összefüggés a FENO szint és a köpet eosinophilsejtszáma között COPD akut exacerbációban?**
- 4. Milyen a FENO-mérés prediktív értéke a köpet eosinophila megjósolása szempontjából az akut exacerbációban lévő COPD-s betegekben?**
- 5. Van-e klinikai jelentősége a köpet eosinophilia kimutatásának COPD akut exacerbációban?**

4. Módszerek

4.1. Első altéma

4.1.1. Betegek és vizsgálati protokoll

A vizsgálatba az Intézetünk ambulanciáján 2006 januárja és 2010 júniusa között gondozott és legalább 6 hónapon keresztül túlélő tüdőtranszplantált betegek kerültek bevonásra. Kizárási kritériumként szerepelt (i) súlyos társbetegség (veseelégtelenség, májelégtelenség, stb.) fennállása, (ii) az anamnézisben szereplő malignitás, illetve (iii) kizárásra kerültek azok a betegek is, akiknek a súlyos klinikai állapota nem tette lehetővé az EBC gyűjtését. Összesen 31 transzplantált beteg (14 férfi, 17 nő, átlagos életkor: 39.5 ± 1.8 év, tüdőátültetés után eltelt átlagos idő: 44.7 ± 3.8 hónap) került bevonásra. Az EBC gyűjtésére az ambuláns kontrollvizsgálatok során került sor, feltéve, ha a betegek klinikailag stabil állapotban voltak és nem merült fel akut pulmonalis komplikáció (akut infekció vagy akut rejekció) lehetősége a vizit időpontjában, illetve az azt megelőző 4 héten. A vizsgálat során az átlagos követési idő 22.3 ± 4.1 hónap volt. Betegenként átlagosan négy mintát nyertünk (tartomány: 2-9), összesen 118 EBC mintát gyűjtöttünk.

Ezenfelül, EBC gyűjtés történt 20 egészséges önkéntestől is, akiket a kórház dolgozói közül választottunk ki. A kontroll személyek (i) fiziológiás légzésfunkciós paraméterekkel rendelkeztek, (ii) az anamnézisükben atópia, akut vagy krónikus légúti megbetegedés nem szerepelt, (iii) nem volt felső vagy alsó légúti infekciójuk az elmúlt 4 hétben és (iv) gyógyszeres kezelésben sem részesültek. Az egészségeseknél a mintagyűjtést 1 és 2 hónap után megismételtük, összesen 60 mintát gyűjtöttünk. A tüdőtranszplantált betegek és a kontroll személyek nem dohányoztak. A vizsgálatot a vonatkozó etikai törvények és az *Országos Korányi Tbc és Pulmonológiai Intézet Etikai Bizottságának* engedélyével végeztük. A résztvevők minden esetben írásos beleegyező nyilatkozatot adtak.

Bevonáskor a 31 transzplantált beteg közül 16 volt BOS 0 stádiumban és maradt is ebben a stádiumban, azaz funkcionálisan stabil a követés során (*BOS-mentes csoport*). Hat beteg már a BOS szövődményét mutatta bevonáskor (BOS 1 stádium: 4 beteg, BOS 2 stádium: 1 beteg, BOS 3 stádium: 1 beteg). Ezekben a betegekben a BOS

stádiuma a követés során nem változott. Három, kezdetben BOS 0 stádiumban lévő betegnél alakult ki BOS 0-p, míg 6 betegnél BOS ≥ 1 stádium (BOS 1 stádium: 4 beteg, BOS 3 stádium: 2 beteg) a követés alatt, így a vizsgálat végére a BOS miatt kezelt betegek száma 15-re emelkedett (*BOS csoport*). A BOS csoportban legalább két mintagyűjtés történt mind a BOS kialakulása előtt, mind a BOS kialakulása után. A BOS diagnosztikája és stádiumbeosztása a hatályos nemzetközi irányelvek szerint történt [147].

A tüdőtranszplantált betegek alapbetegségének megoszlása a következőképpen alakult: CF (14 beteg), IPF (5 beteg), COPD (4 beteg), PPH (4 beteg), lymphangiomyomatosis (1 beteg), pneumoconiosis (1 beteg) és histiocytosis (1 beteg). 30 bilaterális tüdőtranszplantáció történt, egy esetben szívtranszplantációval kombinálva. A betegek fenntartó immunszuppresszív kezelése prednizolont, mycophenolate mofetilt és vagy tacrolimust (26 beteg) vagy cyclosporint (5 beteg) tartalmazott. Kiegészítésként 5 beteg részesült everolimus terápiában. Minden transzplantált beteg folyamatos cotrimoxazol kezelésben részesült, illetve a transzplantációt követő 3 hónapban profilaktikusan ganciclovirt vagy valganciclovirt kapott. H₂-receptor antagonistát 21, proton-pumpa gátlót 10 betegnél alkalmaztunk. Öt beteg kapott tartósan azithromycint BOS megjelenése miatt.

2. táblázat

A tüdőtranszplantált betegek és a kontroll személyek demográfiai és klinikai adatai

	Kontroll	BOS-mentes	BOS
n	20	16	15
Életkor (év)	40.1 $\pm$ 2.5	38.3 $\pm$ 2.2	41.1 $\pm$ 3.0
Nem (férfi/nő, n)	10 / 10	10 / 9	4 / 8
Transzplantáció után eltelt idő (hó)[#]	-	41.5 $\pm$ 4.7	49.9 $\pm$ 6.3
FEV₁ (%)			
- a vizsgálat indulásakor	97.1 $\pm$ 5.5	88.3 $\pm$ 5.3	69.1 $\pm$ 5.5*
- a vizsgálat végén		82.4 $\pm$ 6.4	57.2 $\pm$ 6.9*

Az adatok átlag $\pm$ SEM formában szerepelnek, kivéve, ha ezt másként jelöltük. BOS: bronchiolitis obliteráns szindróma, FEV₁: forszírozott kilégzési térfogat 1 másodperc alatt.

[#]vizsgálat kezdetén, *p<0.05 vs. BOS-mentes betegek

Az ambuláns vizitek alkalmával a betegeken fizikális vizsgálat, rutin vérvizsgálat, vérgáz és légzésfunkciós mérés, immunszuppresszív (tacrolimus vagy cyclosporin) gyógyszerek vérszintjének meghatározása és mellkas röntgen történt. A követés során a surveillance bronchoscopiákat, a BAL-t és a TBB-t a korábbiakban leírt protokoll alapján végeztük [148].

A transzplantált betegek és az egészséges kontroll személyek demográfiai és klinikai adatait a 2. táblázat foglalja össze. A BOS szövődményét mutató és a BOS-mentes csoportot összehasonlítva a transzplantáció után eltelt idő az előbbi csoportban hosszabb volt, de a különbség nem volt statisztikailag szignifikáns ($p > 0.05$). A FEV₁ értéke kisebb volt a BOS csoportban a BOS-mentes csoporthoz képest, mind a vizsgálat kezdetén, mind pedig a végén ($p < 0.05$).

A CF-es betegek között 8 betegnek volt krónikus bakteriális kolonizációja (*P. aeruginosa*: 6 beteg, *S. aureus*: 2 beteg). Krónikus kolonizációt akkor véleményeztünk, ha ugyanannak a betegnek 6 hónapon belül legalább 3 pozitív tenyésztési eredménye volt különböző légúti mintákban. A nem CF-es betegnek kolonizációja nem volt.

4.1.2. EBC gyűjtése és pH-jának mérése

Az EBC gyűjtése EcoScreen kondenzátorral (Jaeger, Hoechberg, Németország) történt, a korábbi vizsgálatainkban leírt módon [149]. A mintavétel során a betegek és az egészséges személyek nyugalmi frekvenciával és légzési térfogattal lélegeztek 10 percig orrcsipesz viselése nélkül. A mintákat a mérések előtt – 80°C-on tároltuk. A pH mérése a CO₂ standardizációs módszerrel történt az irodalmi összefoglalóban (3.2.4.7. fejezet) leírt módon.

4.1.3. Légzésfunkciós vizsgálatok

A légzésfunkciós vizsgálatokat spirométerrel végeztük (Medicor, MS-11, Piston Ltd., Budapest, Magyarország) az ATS/ERS hatályos útmutatása [150] alapján.

4.1.4. Statisztikai analízis

Az adatok átlag±SEM formában szerepelnek. A pH értékek normál eloszlásúak (Kolmogorov–Smirnov teszt) voltak, az adatokat egyutas ANOVA-t követő Newman–Keuls teszttel analizáltuk. A BOS valamely stádiumában lévő és a BOS-mentes betegek

adatait párosítatlan *Student*-féle *t*-teszttel vizsgáltuk. A korrelációs koefficienseket a *Pearson*-módszer szerint számoltuk. A pH értékek vizitek közötti variabilitást a variációs koefficienssel és a *Bland–Altman* teszttel jellemeztük. A *Bland–Altman* tesztnél az egyezési tartományok kiszámításánál az adott betegnél, a vizitek során mért legnagyobb és legkisebb pH értékeket (pH_1 és pH_2) vettük alapul, hasonlóan korábbi munkáinkhoz [149]. A power-analízis során $\alpha=0.05$ és hatásnagyság=0.47 értékekkel számoltunk. A számításokat a GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.) és a G*Power (G*Power Software Inc.) statisztikai programokkal végeztük. A különbségeket $p<0.05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.

4.2. Második altéma

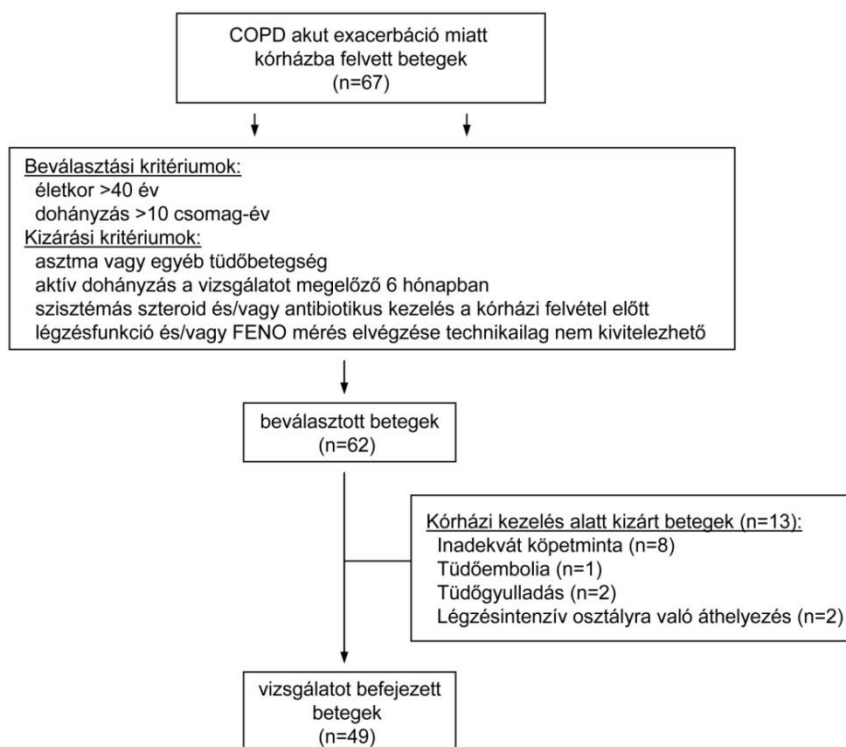
4.2.1. Betegek

A vizsgálatban az *Országos Korányi Tbc és Pulmonológiai Intézet* tüdőosztályaira akut exacerbáció miatt beutalt COPD-s betegek vettek részt. A bevonási kritériumok között (i) COPD akut exacerbáció, (ii) 40 év feletti életkor, valamint (iii) 10 csomagév feletti dohányzás szerepeltek (4. ábra). Kizárási kritériumot jelentett az anamnézisben szereplő (i) asthma bronchiale vagy egyéb fennálló tüdőbetegség (pneumonia, interstitialis tüdőbetegség, tüdődaganat stb.), (ii) aktív dohányzás a vizsgálatot megelőző 6 hónapban, (iii) szisztémás kortikoszteroid vagy antibiotikus kezelés a kórházi felvétel előtt, valamint (iv) gyenge klinikai állapot és/vagy súlyos nehézlégzés, amely nem tette lehetővé a FENO vagy a légzésfunkciós mérések elvégzését (7. ábra).

A COPD-t a nemzetközi irányelveknek megfelelően [151], mint progresszív, leginkább irreverzibilis légúti obstrukcióval járó kórképet definiáltuk, amely légúti gyulladással társul és elsősorban a dohányzás következménye. Exacerbációként a nehézlégzés, a köhögés vagy a köpet mennyiségi és/vagy minőségi változását (súlyosbodását) értékeltük, amely a beteg gyógyszerelésének megváltoztatását tette szükségessé, és amelyet a kórházi ellátásban megjelenő pulmonológus, mint független értékelő is megerősített [152]. A vizsgálatot a vonatkozó etikai törvények és az *Országos Korányi Tbc és Pulmonológiai Intézet Etikai Bizottságának* engedélyével végeztük. A résztvevők minden esetben írásos beleegyező nyilatkozatot adtak.

4.2.2. Vizsgálati protokoll

A vizsgálat során két alkalommal történt köpetgyűjtés, valamint FENO, légzésfunkció és vérgáz mérés: (i) először az exacerbáció kezdetén (a kórházi felvételnél), illetve (ii) másodszor a beteg kórházi távozásakor. Az első alkalommal a mintagyűjtésekkel és mérésekkel párhuzamosan a vénás vérből fehérvérsejtszám (WBC) és C-reaktív protein (CRP) szint meghatározás is történt. A vérgáz értékeket fülből vett arterializált kapilláris vérből határoztuk meg vérgázanalizátor segítségével (ABL 520, Radiometer, Kopenhagen, Dánia).



4. ábra. A vizsgálat folyamatábrája

A vizsgálat során az alkalmazott terápiát a betegek mindenkor kezelőorvosa határozta meg. A kezelőorvosok a vizsgálatba közvetlenül nem voltak bevonva, és sem a FENO mérés, sem a köpet sejtprofil meghatározás eredményét nem ismerték.

5.2.3. Légzésfunkciós vizsgálatok

A légzésfunkciós vizsgálatokat spirométerrel végeztük (Medicor, MS-11, Piston Ltd., Budapest, Magyarország) az ATS/ERS ajánlása [150] alapján.

5.2.4. FENO-mérés

A FENO mérése 50 mL/s kilégzési áramlási sebesség mellett, orrcsipesz használata nélkül kemilumineszcens analizátorral történt (Model LR2500, Logan Research, Rochester, UK) az ATS/ERS 2005 évi ajánlása alapján [153].

4.2.5. Köpetgyűjtés és feldolgozás

A betegektől spontán reggeli köpetet gyűjtöttünk, melyet 120 percen belül dolgoztunk fel az általunk korábbiakban leírt protokoll alapján [154]. Röviden, a köpetmintákat először dithiothreitol tartalmazó (0.1%) foszfát-puffer (PBS) hozzáadásával homogenizáltuk, majd egy 40 µm-es szűrőn szűrtük át és centrifugáltuk. A mintát akkor tartottuk megfelelőnek, ha a szájüregi kontaminációt jelző laphámsejtek aránya 20%-nál kisebb volt. A *May-Grünwald-Giemsa* oldattal megfestett citospineken differenciált sejtszámlálást végeztünk. Citospinenként legalább 400 gyulladósos sejtet számoltunk meg. Vizsgálati eredményként a különböző sejtípusokat (neutrophil granulocytá, macrophag, lymphocytá és eosinophil granulocytá) százalékos arányban adtuk meg az összes (nem laphám eredetű) gyulladósos sejt számához viszonyítva.

4.2.6. Statisztikai analízis

Az adatok átlag $\pm$ SEM vagy medián (interkvartilis tartomány) formában szerepelnek. Az adatok eloszlását a *Kolmogorov-Smirnov* teszttel vizsgáltuk. A kórházi felvételnél és a távozáskor mért adatokat párosított *Student-féle t*-próbával (parametrikus adatok) vagy *Wilcoxon* előjeles *rang*-próbával (nem parametrikus adatok) hasonlítottuk össze. A korrelációs koefficienseket a *Spearman*-módszer szerint számoltuk. Az exacerbáció idején, a köpet eosinophiliát (>3% köpet eosinophilsejtszám) megjósoló optimális FENO és perifériás vér eosinophilsejtszám vágó pontokat az ún. *Receiver Operating Characteristic* (ROC) görbe alapján határoztuk meg. A köpet eosinophiliának a kezelés során elért szignifikáns FEV₁-növekedésre (>12% és >200mL) vonatkozó prediktív értékét szintén a ROC görbe alapján határoztuk meg. Ha a ROC görbe alatti terület értéke 0.8 felett volt, a tesztet jó prediktív értékűnek tartottuk az irodalmi konszenzus alapján [155,156]. A power-analízis során $\alpha=0.05$ és hatásnagyság (*effect size*)=0.91 értékekkel számoltunk. A számításokat a GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.) és

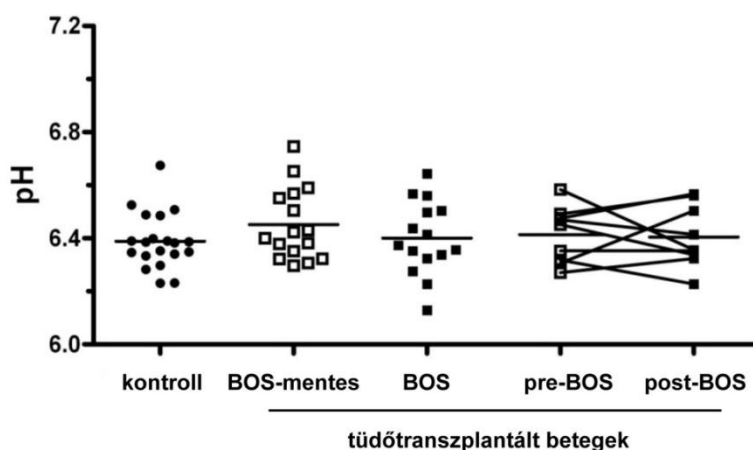
a G*Power 3.1.1 (G*Power Software Inc., Kiel, Németország) statisztikai programokkal végeztük. A különbségeket $p < 0.05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.

5. Eredmények

5.1. Első altéma

EBC pH-jának vizsgálata a tüdőtranszplantált betegekben és a kontrollokban

Az összes BOS-ban lévő beteget egy csoportként kezelve, az EBC pH-jában nem találtunk különbséget a kontroll csoport, a BOS-ban szenvedő és BOS-mentes tüdőtranszplantált betegek között (kontroll: 6.39 ± 0.02 , BOS: 6.40 ± 0.04 és BOS-mentes: 6.45 ± 0.03 , $p > 0.05$; 5. ábra). Abban a 9 betegben, akikben a követési idő alatt alakult ki a BOS, a BOS kialakulása előtt és utána az EBC kémhatása szintén megegyezett (pre-BOS: 6.41 ± 0.04 vs. post-BOS: 6.41 ± 0.04 , $p > 0.05$; 5. ábra). Ha a különböző BOS stádiumban lévő betegek pH adatait hasonlítottuk össze, szignifikáns eltérés itt sem mutatkozott ($p > 0.05$) (6. ábra).



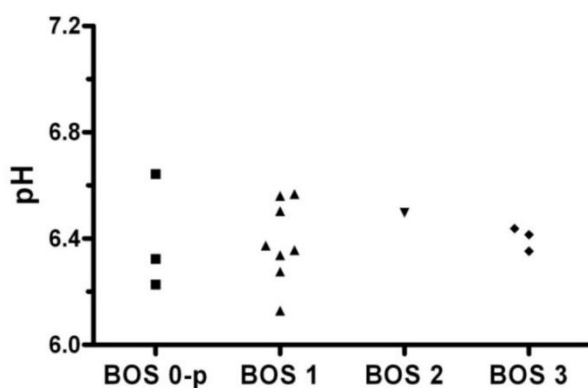
5. ábra. Az EBC pH-ja az egészségesekben és a tüdőtranszplantált betegekben

Az EBC pH-ja az egészségesekben ($n=20$), a BOS-mentes ($n=16$) és a BOS szövődményt mutató ($n=15$) tüdőtranszplantált betegekben. Az egészségesekben minden pont három mérés átlagának felel meg, míg a transzplantált betegekben a pontok a követési idő alatt regisztrált összes pH érték átlagának felelnek meg. A pre- és post-BOS alcsoportokban ($n=9$) a pontok a BOS előtt és a BOS után mért pH értékek átlagát mutatják betegenként. A vízszintes vonal az átlagértéket jelzi.

EBC pH-mérések variabilitása

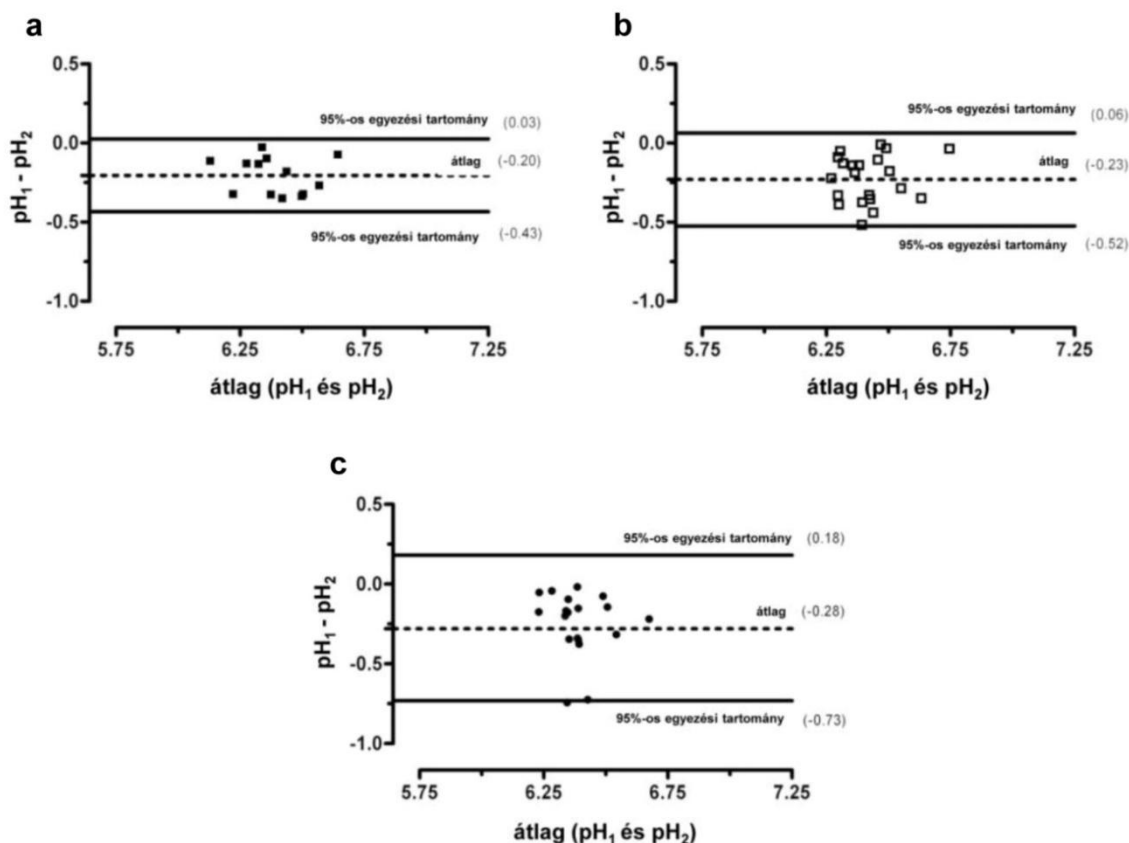
A pH-mérések vizitek-közötti variabilitását tekintve a variációs koefficiens értéke a kontroll személyekben, a BOS-ban szenvedő és a BOS-mentes betegekben nem különbözött szignifikánsan (kontroll: $2.3\% \pm 0.3\%$, BOS: $2.0\% \pm 0.3\%$ és BOS-mentes: $1.7\% \pm 0.2\%$; $p > 0.05$). A Bland–Altman tesztből számolt egyezési tartomány a három

csoport között szintén hasonló volt (kontroll: -0.73 és 0.18, BOS: -0.43 és 0.03 és BOS-mentes: -0.52 és 0.06; 7. ábra). A BOS szövődményét mutató és a BOS-mentes betegek között standardizált pH különbség kimutatására a vizsgálat ereje 84%-os volt.



6. ábra. Az EBC pH-ja a különböző BOS stádiumokban

Az EBC pH-ja a BOS 0-p, 1, 2 és 3 stádiumban. Az ábrán minden pont az adott BOS stádiumban mért pH értékek átlagának felel meg betegenként.



7. ábra. Az EBC pH-jának variabilitása a tüdőtranszplantált betegekben

Az EBC pH-jának variabilitása a Bland–Altman teszt alapján a BOS szövődményét mutató transzplantáltakban („a” panel), a BOS-mentes transzplantáltakban („b” panel) és a nem transzplantált kontroll személyekben („c” panel). Az ábrákon a pH₁ és a pH₂ értékek átlagát hasonlítottuk össze ugyanezen adatok különbségével.

EBC pH-ja a CF-es és a nem CF-es tüdőtranszplantált betegekben

A továbbiakban a transzplantált betegeket két alcsoportra (CF [n=14] és nem CF [n=17]) bontva azt vizsgáltuk, hogy a CF-es alapbetegség befolyásolja-e a pH-t és annak variabilitását. Mind a pH értéke (CF: 6.43 ± 0.02 vs. nem CF: 6.42 ± 0.03 , $p > 0.05$), mind annak variabilitása (variációs koefficiens: CF: 2.2 ± 0.2 vs. nem CF: 1.7 ± 0.3 ; egyezési tartomány: CF: -0.55 és 0.09 és nem CF: -0.51 vs. 0.1) a CF-es és a nem CF-es alcsoportban hasonló volt ($p > 0.05$).

Ezt követően a transzplantált CF-es betegeket kolonizált (n=8) és nem kolonizált (n=6) csoportokra osztottuk és a bakteriális kolonizáció hatását vizsgáltuk. Mind a pH értéke, mind annak variabilitása a két alcsoportban hasonló volt (adatokat nem mutatjuk).

Végül elmondható, hogy az EBC pH-ja, valamint a légzésfunkciós és a vérgáz értékek között szignifikáns korrelációt egyik csoportban sem találtunk (adatokat nem mutatjuk).

5.2. Második altéma

A vizsgálat során 67 akut exacerbáció miatt kórházba került COPD-s beteg került szűrésre, e betegek közül 62 személynél teljesültek a beválasztási kritériumok. A kórházi kezelés során 13 beteg került kivonásra (4. ábra), így a vizsgálat végén összesen 49 beteg adatait tudtuk feldolgozni. E betegek demográfiai és klinikai adatai az 3. táblázatban szerepelnek.

Légzésfunkciós és vérgáz paraméterek, FENO, valamint a köpet sejtprofiljának változása a kezelés során

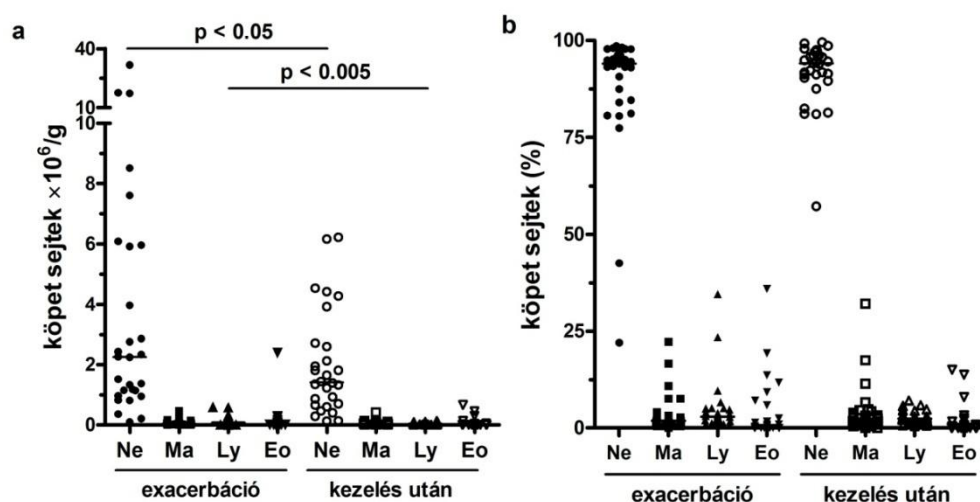
Felvételkor a betegeket nehézlégzés, kifejezett légúti obstrukció, emelkedett CRP szint és mérsékelt fokú hypoxaemia jellemezte (3. és 4. táblázat). A vérgáz leletek acidózist nem mutattak. Terápiaként minden esetben i.v. vagy p.o. glükokortikoid terápiát (átlagos metilprednizolon dózis: 26.1 ± 4.8 mg/nap) és kombinált hörgőtágító kezelést (teofillin, inhalatív β_2 -agonista és/vagy antikolinerg készítmények) alkalmaztunk. A betegek 88%-a kapott oxigént, 57%-a pedig antibiotikus kezelésben is részesült. Az átlagos ápolási idő 11.2 ± 0.8 nap volt.

3. táblázat

A vizsgálatot befejezett betegek demográfiai és klinikai adatai

Betegek (n)	49
Nem (férfi/nő, n)	29 / 20
Kor (év)	68.8 ± 1.3
Dohányzás (csomagév)	36.8 ± 5.3
GOLD stádium (n, %)	
I.	3 (6)
II.	15 (31)
III.	19 (39)
IV.	12 (24)
Pulmonológiai gyógyszerelés az exacerbáció előtt (n, %)	
ICS	37 (76)
LABA	41 (84)
LAMA	29 (59)
Laboratóriumi eredmények kórházi felvételtkor	
WBC ($\times 10^9/L$)	11.0 ± 0.7
CRP (mg/L)	56.4 ± 10.3

Az adatok átlag $\pm$ SEM formában szerepelnek, kivéve, ha ezt másként jelöltük. WBC: fehérvérsejtszám, CRP: C-reaktív protein, ICS: inhalációs kortikoszteroid, LABA: hosszú hatású β_2 -agonista, LAMA: hosszú hatású muszkarin agonista, GOLD: Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease



8. ábra. Köpet sejtprofil változása COPD exacerbáció kezelése során

A köpetben lévő gyulladásos sejtek száma („a” panel) és százalékos aránya („b” panel) COPD-s betegekben (n=49) akut exacerbáció idején, valamint kezelés után. A vízszintes vonal a medián értéket jelzi. Ne: neutrophil granulocyt, Ma: macrophag, Ly: lymphocyt, Eo: eosinophil granulocyt

4. táblázat

A vizsgálatot befejezett betegek légzésfunkciós, vérgáz és köpet sejtprofil adatai akut exacerbációban, valamint kezelés után

	exacerbáció	kezelés után	p érték
FVC (L)	1.96 ± 0.11	2.16 ± 0.13	0.013
FVC (%)	72.1 ± 3.3	79.9 ± 3.4	0.002
FEV₁ (L)	0.94 ± 0.07	1.12 ± 0.09	<0.001
FEV₁ (%)	43.6 ± 3.1	51.9 ± 3.3	<0.001
FEV₁/FVC (%)	48.2 ± 2.4	51.7 ± 2.0	0.048
FENO (ppb)[†]	11.1 (6.2-20.8)	9.5 (6.3-15.8)	0.012
ICS+	10.0 (4.4-19.2)	9.2 (5.8-17.1)	0.024
ICS-	15.5 (8.3-29.9)	10.3 (5.9-14.8)	0.031
Vérgáz			
pH	7.40 ± 0.01	7.39 ± 0.01	0.515
PaCO₂ (kPa)	5.40 ± 0.24	5.92 ± 0.23	0.061
PaO₂ (kPa)	6.98 ± 0.23	7.57 ± 0.19	0.036
Köpet[†]			
Összsejtszám (×10⁶/g)	2.33 (1.15-4.33)	1.38 (0.63-2.32)	<0.005
Neutrophilsejt (×10⁶/g)	2.45 (1.05-5.94)	1.41 (0.68-2.65)	0.023
Macrophag (×10⁵/g)	0.49 (0.24-1.04)	0.44 (0.11-0.91)	0.498
Lymphocyt (×10⁵/g)	0.84 (0.36-1.34)	0.39 (0.21-0.58)	<0.005
Eosinophilsejt (×10⁴/g)	0.56 (0-6.2)	0.21 (0-2.7)	0.202

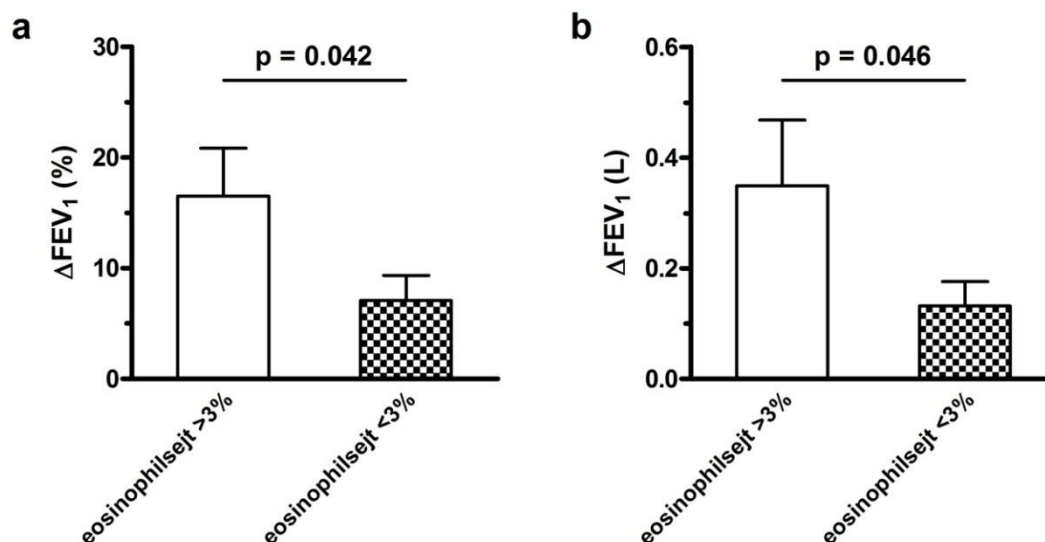
Az adatokat átlag±SEM formában szerepelnek, kivéve, ha ezt másképp jelöltük. FVC: forszírozott vitálkapacitás, FEV₁: forszírozott kilégzési térfogat az első másodpercben, FENO: frakcionált kilégzett nitrogén-monoxid, ppb: részecske *per* milliárd, PaCO₂: parciális artériás szén-dioxid nyomás, PaO₂: parciális artériás oxigén nyomás, ICS: inhalációs kortikoszteroidok.

[†]medián (interquartilis tartomány)

A kórházi kezelés hatására a légzésfunkciós paraméterek és a betegek oxigenizációja (PaO₂) jelentősen javult (4. táblázat). A FENO szint kisfokú, de szignifikáns csökkenést mutatott a felvételi és távozási értékeket összehasonlítva.

A kezelés hatására a köpetben lévő neutrophil granulocyták és a lymphocyták száma csökkent (5. táblázat, 8. ábra). A kezeléssel összefüggésben a köpet összsejtszáma szintén csökkent, míg a köpetsejtek százalékos aránya nem változott (8. ábra).

Akut exacerbációban köpet eosinophiliát ($>3\%$) 10 betegnél (20%) detektáltunk. E betegekben a köpet eosinophilsejtszáma $[10.4 (6.2-24.6) \text{ vs. } 0.21 (0-8.5) \times 10^4/\text{g}, p=0.014]$, valamint az eosinophilsejtek százalékos aránya $[8.2 (3.4-16.4) \text{ vs. } 0.9 (0.5-10.9)\%, p=0.037]$ szignifikánsan csökkent a kezelés során. A köpet eosinophiliával nem rendelkező betegekben ($n=39$) a kezelés során az eosinophilsejtszám változást nem mutatott.



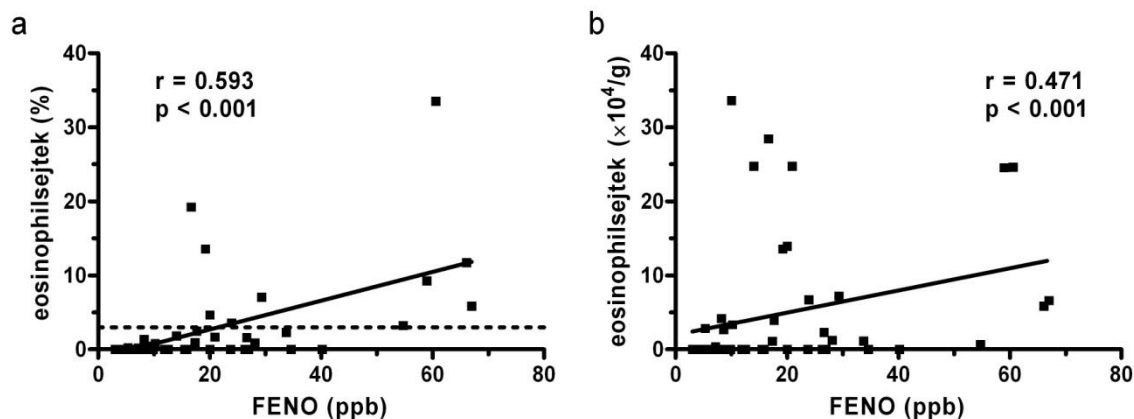
9. ábra. FEV₁-változás mértéke COPD exacerbáció kezelése során

A FEV₁-változás (ΔFEV₁) mértéke literben („a” panel) és százalékban („b” panel) mérve a köpet eosinophiliával ($>3\%$) rendelkező és nem rendelkező ($<3\%$) COPD-s betegek exacerbációjának kezelése során

FEV₁-változás mértéke a kezelés után a köpet eosinophiliával rendelkező és nem rendelkező betegekben

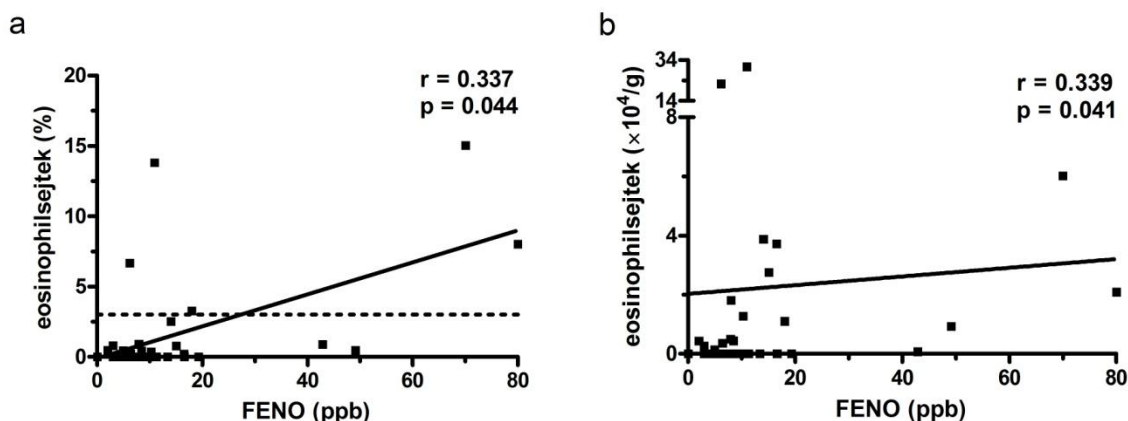
Mind a köpet eosinophiliával rendelkező (FEV₁: 1.0 ± 0.17 vs. 1.3 ± 0.2 L, $p=0.036$; FEV₁ %: 42.9 ± 5.0 vs. $57.1 \pm 6.8\%$, $p=0.027$), mind pedig a köpet eosinophiliával nem rendelkező betegcsoportban (FEV₁: 0.8 ± 0.02 vs. 0.95 ± 0.06 L, $p=0.007$; FEV₁ %: 42.5 ± 2.9 vs. $44.6 \pm 2.9\%$, $p=0.005$) a FEV₁ értéke szignifikánsan nőtt a kórházi kezelés során. Kiemelendő ugyanakkor, hogy a FEV₁-növekedés mértéke szignifikánsan nagyobb volt a köpet eosinophiliát mutató alcsoportban (ΔFEV₁: 0.35 ± 0.12 vs. 0.13 ± 0.04 L, $p=0.046$; ΔFEV₁ %: 16.5 ± 4.3 vs. $7.1 \pm 2.3\%$, $p=0.042$; 9. ábra). A köpet eosinophiliát mutató és nem mutató betegek között standardizált FEV₁-különbség (literben és százalékban mérve) kimutatására a vizsgálat ereje 81 és 83% volt.

Betegeink funkcionális válaszkészségét a korábbi vizsgálatunkban meghatározott FENO határérték (26.8 ppb) alapján is összehasonlítottuk [39]. A fenti eredményekkel összhangban a FEV₁-növekedés mértéke nagyobb volt a felvételnél 26.8 ppb-nél nagyobb FENO szinttel rendelkező betegekben, mint a 26.8 ppb alatti FENO szinttel jellemzett betegekben (Δ FEV₁: 0.32 ± 0.13 vs. 0.11 ± 0.04 L, $p=0.04$; Δ FEV₁ %: 15.4 ± 4.1 vs. $5.5 \pm 1.9\%$, $p=0.023$).



10. ábra. A FENO koncentrációjának és a köpet eosinophilsejtszámának összefüggése COPD exacerbációban

A FENO koncentráció és a köpet százalékos („a” panel), valamint abszolút („b” panel) eosinophil sejtszáma közötti kapcsolat COPD akut exacerbáció miatt hospitalizált betegekben a kórházi felvételnél. A szaggatott vonal az „a” panelen a 3%-os köpet eosinophiliát jelzi. ppb: részecske per milliárd

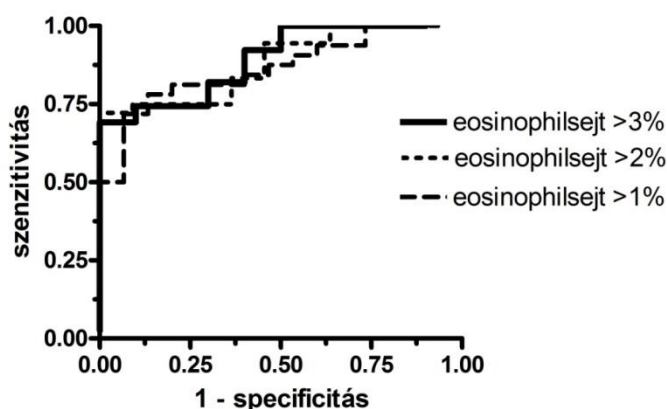


11. ábra. A FENO koncentrációjának és a köpet eosinophilsejtszámának összefüggése COPD exacerbáció kezelése után

A FENO koncentráció és a köpet százalékos („a” panel), valamint abszolút („b” panel) eosinophil sejtszáma közötti kapcsolat COPD akut exacerbáció miatt hospitalizált betegekben a kezelés után. A szaggatott vonal az „a” panelen a 3%-os köpet eosinophiliát jelzi. ppb: részecske per milliárd

Köpet eosinophilsejtszám és FENO szint közötti összefüggés vizsgálata

A vizsgálat során szoros pozitív korrelációt találtunk a FENO koncentráció és a köpet eosinophilejt százalékos aránya között mind az exacerbáció kezdetén ($r=0.593$, $p<0.001$; 10. ábra), mind a kórházi távozáskor ($r=0.337$, $p=0.044$; 11. ábra). A korreláció szintén fennállt, ha a két vizsgálati időpontban az eosinophilejtek abszolút számát hasonlítottuk össze a FENO szinttel (exacerbáció: $r=0.471$, $p<0.001$, 10. ábra; kezelés után: $r=0.339$, $p=0.041$; 11. ábra). Az összefüggés attól függetlenül is kimutatható volt, hogy a beteg a felvétel idején részesült-e ICS kezelésben ($r=0.551$, $p<0.001$, köpet eosinophilejt százalékos arányra vonatkoztatva) vagy sem ($r=0.611$, $p<0.001$, köpet eosinophilejt százalékos arányra vonatkoztatva). A köpet neutrophil granulocytá-, macrophag- és lymphocytasejtszáma nem korrelált a FENO szintekkel (adatokat nem mutatjuk).



12. ábra. FENO-mérés prediktív értékének vizsgálata

FENO-mérés prediktív értéke a köpet eosinophilia (1, 2 vagy 3%) kimutatására COPD exacerbációban a Receiver Operating Characteristic (ROC) görbe analízis alapján

5. táblázat

A FENO mérés szenzitivitása és specificitása a köpet eosinophilia kimutathatósága szempontjából COPD akut exacerbációban

Köpet eosinophilia	ROC AUC	FENO határérték (ppb)	Szenzitivitás (%)	Specificitás (%)
>3%	0.89	19.0	90	74
>2%	0.88	17.5	90	75
>1%	0.86	16.3	87	78

FENO: frakcionált kilégzett nitrogén-monoxid, ppb: részecske *per* milliárd, ROC AUC: a Receiver Operating Characteristic (ROC) görbe alatti terület

A ROC görbe analízis alapján a FENO jó prediktív értékű markere a köpet eosinophiliának akut exacerbációban lévő COPD-s betegekben (12. ábra, 5. táblázat). Az analízist 1, illetve 2%-os köpet eosinophiliára is elvégezve a FENO határértékek (vágópontok) kissé alacsonyabbnak bizonyultak, de a szenzitivitás és a specificitás értékei hasonlók maradtak. Munkánk során meghatároztuk a köpet eosinophilia (>3%) prediktív értékét is a kezelés utáni FEV₁-növekedés előrejelzése szempontjából: a vonatkozó ROC görbe alatti terület 0.72 volt.

Perifériás vér százalékos eosinophilsejtszámának prediktív értéke a köpet eosinophilia megjósolása szempontjából

Bár a vér százalékos eosinophilsejtszáma emelkedett volt a köpet eosinophiliával rendelkező betegekben az eosinophiliával nem rendelkező betegekhez képest (3.0 ± 1.3 vs. $0.8 \pm 0.03\%$, $p=0.016$), a mérő prediktív értékét viszonylag gyengének találtuk a köpet eosinophilia (>3%) megjósolása szempontjából (ROC görbe alatti terület: 0.65). Az optimális határérték mellett (3.5%) a teszt szenzitivitása és specificitása 44, illetve 94%-os volt.

6. Megbeszélés

6.1. Első altéma

Követéses vizsgálatunkban azt elemeztük, hogy BOS kialakulása tüdőtranszplantált betegekben együtt jár-e a légutak savasodásával. A bevont betegek többsége BOS 1 stádiumban volt. Eredményeink azt mutatták, hogy nincs szignifikáns különbség a BOS-ban lévő és a BOS-mentes transzplantáltak kondenzátumának pH-ja között, így a kondenzátum savasságának meghatározása nem segíti a BOS korai diagnózisának felállítását vagy a BOS monitorozását e betegekben.

Közismert, hogy mivel az EBC pufferkapacitása nagyon alacsony, az EBC-ben lévő CO₂-nak jelentős hatása van az EBC pH-jára, és ez nagyban zavarja a pH pontos meghatározását. A korábban javasolt módszerekkel (argonnal való átbuborékolatás vagy „nyers” mintafeldolgozás) a mintákban lévő CO₂-ot sem kivonni, sem standard szintre hozni nem lehet. Részben a CO₂ zavaró hatásával magyarázható, hogy egyesek a korábbiakban igen alacsony (7.57) [133], még mások igen magas (8.26) [132] pH-t mértek egészséges önkéntesekben. Munkacsoportunk korábban kidolgozott egy módszert, amellyel a CO₂ zavaró hatása kiküszöbölhető [122]. A CO₂ standardizációs módszer lényege, hogy a minták CO₂-vel való ismételt átáramoltatása során a mintákban párhuzamosan pH-t és pCO₂-t mérünk, majd a két paraméter közötti logaritmikus összefüggés felhasználásával adott pCO₂ tenziónál (5.33 kPa) határozzuk meg a mintára jellemző pH-t. A CO₂ standardizációs módszerrel korábban több obstruktív kórképet (asthma, COPD, CF) is vizsgáltunk, de savasodást csak asthma exacerbációban tudtunk kimutatni [129]. Ugyanakkor szintén savasabb pH értékek mutatkoztak dohányosokban, a nem dohányosokból gyűjtött mintákhoz képest.

Jelen vizsgálatunkban először alkalmaztuk a CO₂ standardizációs módszerrel való pH-mérést tüdőtranszplantált betegeken. Sem azokban a betegekben, akik bevonáskor már BOS-ban voltak, sem azokban, akiknél később alakult ki a BOS szövődménye, nem igazoltunk légúti savasodást. Eredményünk arra utal, hogy a BOS korai diagnózisának felállításában az EBC pH-mérésnek nincs létjogosultsága. Vizsgálatunkban a stabil, BOS-mentes transzplantáltak és az egészségesek, nem

transzplantált személyek EBC pH-ja is hasonló volt, ami megegyezik egy korábbi vizsgálatunk eredményeivel [149].

Elképzelhető, hogy a transzplantáció hátterében álló alapbetegség is befolyásolja a légúti markerek szintjét és ezen keresztül a légutak kémhatását, különösen olyan kórképekben, mint a CF, amely a szervezet egyéb szerveiben is különféle metabolikus változásokat okoz. Ennek tisztázása céljából összehasonlítottuk a CF-es és a nem CF-es transzplantáltak EBC pH-ját, de szignifikáns különbséget a két csoport között nem találtunk.

Egyes megfigyelések szerint a légutak krónikus bakteriális kolonizációja gyulladást és savasodást idéz elő az EBC-ben [133]. Vizsgálatunkban a kolonizált és a nem kolonizált CF-es betegek mintáit hasonlítottuk össze, de különbséget a két csoport között nem találtunk, így úgy tűnik, hogy a bakteriális kolonizáció önmagában nem befolyásolja a légúti pH-t tüdőbetegekben.

A gastroesophagealis reflux betegség szintén hatással lehet az EBC pH-jára [157], bár ezt az összefüggést nem minden vizsgálatban igazolták [158]. A vizsgálatunkban részt vevő összes beteg – a protokoll részeként – H_2 -receptor blokkolót vagy proton-pumpa gátlót kapott, így a reflux-ellenes kezelésnek az EBC pH-ra gyakorolt hatását célzottan vizsgálni nem tudtuk. A mintavételek időpontjában egyik betegnél sem történtek specifikus vizsgálatok a reflux betegség igazolására vagy kizárására, így a reflux fennállása és annak súlyossága betegeinknél bizonytalan maradt.

Tüdőtranszplantált betegek EBC pH-ját a korábbiakban kevés kutatócsoport vizsgálta. Az egyetlen publikált, keresztmetszeti vizsgálatban csökkent pH-t, azaz légúti savasodást írtak le a BOS-ban a BOS-mentes betegekkel összehasonlítva [146], amely különbözik a jelen vizsgálat eredményeitől. A két vizsgálat betegpopulációját összehasonlítva az előrehaladottabb BOS stádiumban (≥ 2 stádium) lévő betegek aránya hasonló volt a két vizsgálatban (23% vs. 27%), így ez nem magyarázza a különböző eredményeket. Feltételezésünk szerint az eltérő eredmények leginkább a pH-mérés metodikai különbségeivel magyarázhatók. *Dupont és mtsai.* az EBC pH-ját „nyers” mintákban határozták meg, és nem küszöbölték ki a CO_2 zavaró hatását. A CO_2 standardizációs módszer ezt a hatást kiküszöböli, ezért ez – metodikai szempontból – megbízhatóbb mérés technikának tekinthető. Megjegyzendő, hogy – a korábbi feltételezésekkel szemben – a légutak savasodásának hiánya nem is annyira meglepő

eredmény a korai BOS stádiumban, mivel e betegeknél markáns neutrophilsejtes gyulladás sokszor még nem mutatható ki a BAL-ban vagy a légutakban. Végül az is elképzelhető, hogy vizsgálatunkban az öt betegnél alkalmazott azithromycin terápia befolyásolta a légutakban zajló gyulladásos folyamatokat és akár a légutak savasságát is. Tekintettel azonban az alacsony esetszámba, ezt a kérdést munkánk során célzottan nem vizsgáltuk.

Vizsgálatunkban elemeztük az EBC pH értékének vizitek-közötti variabilitását is a BOS szövödményében szenvedő, illetve a BOS-mentes betegekben. A variabilitásra a variációs koefficiensből és a Bland-Altman teszt segítségével számolt egyezési tartományokból következtettünk. Eredményeink szerint sem a variációs koefficiensben, sem az egyezési tartományokban nem mutatkozott számottevő különbség a BOS-ban lévő és a BOS-mentes betegek között. A vizitek-közötti pH értékekben észlelt kisfokú fluktuációk mind a stabil transzplantáltakban, mint az egészséges, nem transzplantált személyekben azonosak voltak.

Ki kell hangsúlyozni, hogy a betegeink több mint a fele (53%) BOS 1 stádiumban volt, és csak négy beteg (27%) volt ennél súlyosabb (2 vagy 3) BOS stádiumban vizsgálatunkban. A kilenc betegből, akiknél a követés során alakult ki a BOS, heten (78%) kerültek BOS 0-p vagy 1 stádiumba és csak két betegnél (22%) alakult ki súlyosabb BOS. Így, összességében a gyűjtött mintáink nagy része korai BOS stádiumban lévő betegekből származott. Bár nem zárható ki, hogy előrehaladottabb BOS stádiumokban valóban savasabb pH-t lehet detektálni, ennek klinikai jelentősége kisebb, mivel a BOS diagnosztikája főleg a korai időszakban jelent problémát és kihívást a klinikusok számára.

Korábbi vizsgálataink során azt figyeltük meg, hogy egészséges személyekben a légúti pH értéke még rövid időn belül is jelentős variabilitást mutat [127]. E variabilitás élettani és klinikai jelentősége nem ismert. Ahhoz, hogy e variabilitásból adódó hibákat csökkentsük, és megbízhatóbb eredményekhez jussunk, minden olyan betegnél, akiknél a követési idő alatt alakult ki a BOS, legalább két mintagyűjtés történt a BOS kialakulása előtt és után.

Megjegyzendő, hogy beteganyagunkban sokkal kisebb volt a COPD-s betegek aránya, mint az a nemzetközi gyakorlat alapján várható lett volna. Ez abból a körülményből adódott, hogy hazánkban, az egészségügyi vezetés által erősen

korlátozott az egy évben elvégezhető tüdőátültetések száma, így a transzplantációs várólistára elsősorban a jobb életkilátásokkal rendelkező, fiatalabb betegek kerülnek, akik körében COPD helyett CF, PPH vagy egyéb ritka tüdőbetegségek jelentik az átültetés primer okát.

Még kell említeni, hogy mintáinkat a mérések előtt, viszonylag hosszú ideig - 80°C-on tároltuk, és elképzelhető, hogy e tárolásnak szintén hatása volt a pH értékekre. Ugyanakkor, munkacsoportunk egy korábbi vizsgálatában azt igazolta, hogy még az 1 évet meghaladó idejű mintatárolásnak sincs számottevő hatása az EBC pH-jára, amennyiben ugyanazt a mérés technikát alkalmazzák [159]. Így, a mintatárolásból adódó hatások kizárhatók. A mintatárolást más munkacsoportok sem tekintik problémásnak az EBC pH-mérések szempontjából [126].

Összefoglalva, követéses vizsgálatunkban azt igazoltuk, hogy a BOS kialakulása tüdőtranszplantált betegekben nem jár együtt az EBC savasodásával. A pH mérése az általunk korábban kidolgozott és a jelenleg legmegbízhatóbbnak tekinthető CO₂ standardizációs módszerrel történt. Eredményeink szerint az EBC pH-mérése, mint non-invazív diagnosztikai módszer nem segíti a BOS korai diagnózisának felállítását, és e célból való klinikai alkalmazása nem tűnik megalapozottnak.

6.2. Második altéma

Vizsgálatunkban a FENO és a köpet eosinophilia kapcsolatát elemeztük akut exacerbáció miatt hospitalizált COPD-s betegekben. Eredményeink azt mutatják, hogy az exacerbáció során mért FENO szint szoros, pozitív korrelációt mutat a köpet eosinophilsejtszámával, és mint non-invazív marker magas prediktív értékkel vetíti előre a köpet eosinophilia fennállását ugyanezen betegekben. Vizsgálatunkban azt is igazoltuk, hogy az exacerbáció kezelése során a köpet eosinophiliával rendelkező betegekben nagyobb mértékű légzésfunkciós javulás (ΔFEV_1) várható, mint a neutrophil (nem eosinophil) légúti gyulladással jellemzett betegekben.

Jól ismert, hogy a COPD exacerbáció kiváltásában számos tényező játszik szerepet, és ennek megfelelően a légúti gyulladás jellege és a terápiára adott válasz is igen különböző. Korábbi vizsgálatainkban azt igazoltuk, hogy az exacerbáció

kialakulásakor észlelt magasabb FENO szint (>26.8 ppb) jobb terápiás válaszkészséggel társul. Milyen patológiai folyamat állhat ennek háttérében? Vizsgálatban azt találtuk, hogy a magasabb FENO szint háttérében légúti eosinophilia áll, amelyre a köpet eosinophilsejtszámának (abszolút és százalékos) növekedéséből következtettünk. Eredményeink szerint a FENO-mérés jó prediktív értékkel vetítette előre a köpet eosinophilia fennállását, és így a FENO az eosinophilsejt-dominanciával járó légúti gyulladás egyik indirekt markere COPD exacerbációban. Az optimális vágópont (határérték) 19 ppb-nél volt, ami érdekes módon alacsonyabb az irodalomban korábban az asztmásokon közölt eredményekhez képest [160]. Ennek oka leginkább a betegek gyakori ($>75\%$) ICS használata lehet, amely a FENO szintet közismerten csökkenti [161].

Vizsgálatunk másik fontos eredménye, hogy a kezelés után mért légzésfunkciós mérésekkel igazolni tudtuk, hogy az eosinophil légúti gyulladással járó exacerbációkban nagyobb mértékű javulás észlelhető, mint a neutrophil túlsúlyú (nem eosinophil) gyulladást mutató esetekben. A köpet eosinophiliát mutató betegekben a kezeléssel párhuzamosan az eosinophilsejtszám is csökkent. Megjegyzendő, hogy a funkcionális válaszkészség megjósolása szempontjából a köpet eosinophilia prediktív értéke kissé elmaradt a FENO mérés korábban tapasztalt prediktív értékhez képest ($\text{ROC AUC}_{\text{FENO}}: 0.82$) [39]. Ennek magyarázata a köpetben előforduló eosinophilsejtek számának nagyfokú variabilitása (tartomány: 0-30) lehet.

Bár vizsgálatunkban a betegek többféle kezelést is kapta, a terápia hatására bekövetkezett nagyobb mértékű funkcionális javulás és csökkent eosinophilsejtszám legvalószínűbben a kortikoszteroidok hatásának tulajdonítható. A stabil betegekben leírtakhoz hasonlóan [162,163,164] feltételezhető ugyanis, hogy az exacerbációban lévő COPD-s betegek is jobban reagálnak a szteroid terápiára, ha a köpetükben több az eosinophilsejt.

A köpet eosinophilia – amellet, hogy a szteroidérzékenység egyik indikátora – más szempontból is érdekes lehet COPD exacerbációban. Egyes megfigyelések szerint ugyanis a köpet eosinophiliával járó exacerbációkat elsősorban vírusinfekciók okozzák, ami szintén befolyásolhatja a kezelésre adott választ [165]. Mindazonáltal, a vírusok jelenlétét/szerepét a jelen munkában nem vizsgálatuk.

A közelmúltban *Bafadhel és mtsai.* azt mutatták ki, hogy a perifériás vér százalékos eosinophilsejtszáma szenzitív indikátora a köpet eosinophiliának exacerbációban lévő COPD-s betegekben [32]. A vér százalékos eosinophilsejtszámát a jelen vizsgálatban is mértük, azonban ennek prediktív értékét az előbbi munkacsoporthoz képest jóval szerényebbnek találtuk a köpet eosinophilia megjósolása szempontjából (0.65 vs. 0.85). Az eltérő eredmények oka nem ismert, talán a vizsgált betegpopulációk közötti különbségeknek tulajdoníthatók.

Az ICS terápiának a FENO szintre gyakorolt hatása ellentmondásos, tekintve, hogy egyes vizsgálatok csökkent [166,167], még mások változatlan [168,169] FENO szintet dokumentáltak tartós ICS kezelés mellett. Ebben a vizsgálatban a felvételnél valamelyest alacsonyabb FENO szintet mértünk a rendszeresen ICS terápiában részesült betegcsoportban. A kórházi kezelés során azonban az értékek mindkét alcsoportban (ICS+ és ICS-) szignifikánsan csökkentek. Fontos kiemelni, hogy a köpet eosinophilia és FENO szint között kimutatott összefüggést nem befolyásolta az ICS alkalmazása.

A köpet többi sejttypusát vizsgálva megjegyzendő, hogy a neutrophilsejtek abszolút száma is csökkent a kórházi kezelés hatására a betegek klinikai és funkcionális javulásával párhuzamosan, ami jó egyezést mutat korábbi irodalmi adatokkal [170]. A kezelés hatására a lymphocyták száma is csökkent, valószínűleg azért, mert e sejtek fontos szerepet játszanak a vírus clearance és egyéb gyulladásos folyamatok szabályozásában. A korábbi vizsgálatoknak megfelelően a sejtek százalékos megoszlása a köpetben nem változott a kezelés során [171]. Végül érdekességképpen megjegyezhető, hogy két betegben észleltük a neutrophilsejtszám emelkedését emissziókor, melynek hátterében később re-hospitalizációt igénylő nosocomiális infekció igazolódott.

Jóllehet a sóoldattal történő köpetindukciónak vannak előnyei a spontán úton való köpetgyűjtéshez képest, azonban COPD exacerbációban biztonságosan csak az enyhe és/vagy a középsúlyos betegekben alkalmazható [172]. A bevont betegeink nagyobb része azonban súlyos (III.) vagy nagyon súlyos (IV.) stádiumú volt (39 és 24%) és mindegyike akut kórházi felvételt igényelt. Így vizsgálatunkban – biztonsági szempont miatt – indukált helyett spontán köpetet gyűjtöttünk, ami irodalmi adatok alapján ugyanolyan jól alkalmazható a légúti gyulladás megítélésére [173].

A közelmúltban *Siva és mtsai.* azt igazolták, hogy az olyan COPD kezelési stratégia, amely egyben az eosinophil légúti gyulladás megfelelő csökkentését is célozza, a súlyos (kórházi felvételt igénylő) akut exacerbációk számát jobban csökkenti [174]. Eredményeink alapján felmerült, hogy a légúti eosinophilia kimutatására a FENO-mérés is használható lenne, ami olcsóbb és egyszerűbb módszer, mint a köpetgyűjtés.

Közismert, hogy az aktív dohányzás csökkenti a FENO szintet COPD-s betegekben, így az zavarja FENO szint pontos meghatározását [175,176]. Mivel vizsgálatunkban kizárólag ex-dohányos betegek kerültek bevonásra, a dohányzás, mint zavaró faktor vizsgálatunkban kiküszöbölhető volt.

A köpet eosinophilia pontos definíciója az irodalomban némiképp különböző, a legtöbb vizsgálatban a 3%-os értéket veszik alapul. Ahhoz, hogy eredményeink több más vizsgálattal is összehasonlíthatók legyenek, a ROC analízist elvégeztünk 1 és 2%-os eosinophilsejtszám mellett is. Sem a teszt specificitásában, sem a szenzitivitásában nem találtunk lényegi változást.

Végül, meg kell említeni vizsgálatunk néhány korlátját is. Ezek közé tartozik, hogy a kórházi kezelés nem volt standardizálva, valamint, hogy a második mintavétel (köpet és FENO) időpontja változott aszerint, hogy a beteg mikor került emisszióra a kórházból. Közismert, hogy a beteg távozásának időpontját olykor a betegségen vagy a kezelőorvoson kívüli tényezők/szemponatok is befolyásolják. Mivel méréseink kizárólag ex-dohányos betegeken történtek, eredményeink nem vonatkoztathatók automatikusan, a gyakrabban előforduló dohányos COPD-s betegpopulációra. Végül – bár az asthmás alapbetegséggel rendelkezők kizárásra kerültek – meg kell említeni, hogy egyes betegekben asthmás karakterjegyek fellelhetők voltak, amelyek egyrészt befolyásolhatták az eredményeket, másrészt jól tükrözik bármely COPD-s betegcsoport nagyfokú heterogenitását is.

Összefoglalva, vizsgálatunkban kimutattuk, hogy a kórházi felvételt igénylő, súlyos COPD exacerbációban a köpet (légúti) eosinophiliával rendelkező betegek funkcionális válaszkészsége nagyobb azokhoz a betegekhez képest, akiknek a köpetében kizárólag neutrophilsejtes gyulladás mutatható ki. A köpet eosinophilia kimutatására a FENO-mérés mint egyszerű, non-invazív vizsgálómódszer jó szenzitivitású és specificitású. A jövőben a légúti eosinophiliával járó COPD exacerbáció, mint különálló fenotípus további vizsgálata szükséges.

7. Következtetések

Az értekezésben részletezett vizsgálatokból az alábbi következtetések vonhatók le:

- 1. Az EBC pH-ja a BOS szövődményében szenvedő tüdőtranszplantált betegekben nem tér el az egészségesekben mért értékektől, és a BOS 1. stádiumának kialakulása előtt és után az EBC savassága nem változik.**
- 2. Az EBC pH-jának variabilitása a BOS szövődményében szenvedő és a BOS-mentes tüdőtranszplantáltakban, valamint az egészséges, nem transzplantált személyekben hasonló.**
- 3. Akut exacerbáció miatt kórházi felvételre került COPD-s betegekben a FENO szint szoros, pozitív korrelációt mutat a köpet eosinophilsejtszámával mind a beteg felvételekor, mind távozásakor.**
- 4. A FENO jó prediktív értékű biomarkere a köpet eosinophilia fennállásának COPD akut exacerbációjában.**
- 5. Akut exacerbáció miatt kórházi felvételre került COPD-s betegek között a köpet (légúti) eosinophiliával rendelkező betegek funkcionális válaszkészsége nagyobb a köpet eosinophiliát nem mutató betegekhez képest.**

8. Összefoglalás

Az utóbbi években egyre nagyobb érdeklődés kíséri a pulmonalis biomarkereknek a légúti gyulladás vizsgálatára és monitorozására való alkalmazását tüdőbetegekben. Különösen a non-invazív vagy szemi-invazív módon, azaz a kilégzett levegő kondenzátumban (EBC) vagy a köpetben gyűjthető biomarkerek tűnnek ígéretesnek, bár a legtöbb esetben e mérésének klinikai felhasználhatósága még bizonytalan.

A légutak savasodása a légúti gyulladás egyik kísérője lehet. A disszertációban leírt első vizsgálatban az EBC pH-ját vizsgáltuk a tüdőtranszplantált betegekben kialakuló bronchiolitis obliterans szindrómában (BOS), amely a hosszú-távú allograft túlélés egyik legfontosabb pulmonalis korlátozója. A pH mérése a jelenleg legpontosabb méréstechnika, a szén-dioxid standardizációs módszer szerint történt. Vizsgálatunkban kimutattuk, hogy a pH és ennek variabilitása nem különbözik a BOS szövődményét mutató, a BOS-mentes és az egészséges, nem transzplantált személyek között. Az EBC pH-ja azokban a betegekben sem változott, akikben a követés alatt alakult ki a BOS, ami arra utal, hogy az EBC pH mérése, mint non-invazív módszer nem alkalmazható a BOS korai klinikai diagnosztikájában.

A második vizsgálatban a frakcionált kilégzett nitrogén-monoxid (FENO) koncentrációnak és a köpet sejtprofiljának, különös tekintettel a köpet eosinophil-sejtszámának kapcsolatát elemeztük ex-dohányos, krónikus obstruktív tüdőbetegség (COPD) súlyos exacerbációjában szenvedő betegekben. A FENO és a légzésfunkciós mérések, valamint a köpetgyűjtés először az exacerbáció során, majd másodszor a beteg kortikoszteroiddal és bronchodilatátorokkal való kórházi kezelés után történt. Köpet eosinophilia a betegek 20%-ban volt kimutatható. Szignifikáns, pozitív korrelációt találtunk a köpetben lévő eosinophilsejtek százalékos aránya és a FENO szint között, a FENO-mérés erős prediktív értékkel jósolta meg a köpet eosinophilia fennállását. Azt is kimutattuk, hogy a forszírozott kilégzési térfogat az első másodpercében (FEV_1) mért változás nagyobb mértékű a köpet eosinophiliával rendelkező betegekben, mint a csak neutrophil légúti gyulladást mutató betegekben. Ezen eredmények arra utalnak, hogy a FENO jó markere az eosinophil légúti gyulladásnak COPD exacerbációban, és hogy a köpet eosinophiliával rendelkező betegek a kezelésre jobban válaszolnak.

9. Summary

In recent years there has been increasing interest in using pulmonary biomarkers to investigate and monitor inflammatory processes in the respiratory tract of patients with pulmonary diseases. Particularly, biomarkers obtained by non-invasive or semi-invasive procedures such as exhaled breath condensate (EBC) and sputum collection appear to be promising, although in most cases the clinical usefulness of these measurements is still uncertain.

Airway acidification may be an associated phenomenon of airway inflammation. In the first study of the dissertation the pH of EBC was assessed in the course of development of bronchiolitis obliterans syndrome (BOS), as one of the major pulmonary complications which worsens long-term allograft outcome in lung transplant recipients. The pH was measured by the carbon dioxide gas standardization method, which is the most reliable technique at present. We demonstrated that the pH and its variability are similar in patients with and without BOS and in healthy, non-transplant controls. In patients, who developed BOS during the follow-up, the pH before and after the onset of BOS was also comparable indicating that assessment of EBC pH, as a non-invasive method has limited value in the early clinical diagnosis of BOS.

In the second study the relationship between fractional exhaled nitric oxide (FENO) and sputum cell profile, particularly sputum eosinophils was studied in ex-smoker patients with severe exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). FENO and lung function were measured and sputum was collected, first, at the time of hospital admission, and second, at discharge following treatment with corticosteroids and bronchodilators. Sputum eosinophilia was detected in 20% of the patients. There was a significant positive correlation between the percentage of sputum eosinophils and FENO, and FENO was a strong predictor of sputum eosinophilia. Moreover, we found that the increase in forced expiratory volume in one second (FEV₁) after treatment was greater in patients with sputum eosinophilia compared to those exhibiting only neutrophilic airway inflammation. These results suggest that FENO is a good surrogate marker of eosinophilic airway inflammation in COPD exacerbations, and that patients with sputum eosinophilia respond better to treatment.

10. Irodalomjegyzék

-
- ¹ Barnes PJ, Chowdhury B, Kharitonov SA, Magnussen H, Page CP, Postma D, Saetta M. (2006) Pulmonary biomarkers in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Med Crit Care*, 174: 6-14.
 - ² Borrill ZL, Roy K, Singh D. (2008) Exhaled breath condensate biomarkers in COPD. *Eur Respir J*, 32: 472-486.
 - ³ Louhelainen N, Myllärniemi M, Rahman I, Kinnula VL. (2008) Airway biomarkers of the oxidant burden in asthma and chronic obstructive pulmonary disease: current and future perspectives. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 3: 585-603.
 - ⁴ Gustafsson LE, Leone AM, Persson MG, Wiklund NP, Moncada S. (1991) Endogenous nitric oxide is present in the exhaled air of rabbits, guinea pigs and humans. *Biochem Biophys Res Commun*, 181: 852-857.
 - ⁵ Stuehr D J, Griffith O W. (1992) Mammalian nitric oxide synthases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 65: 287-346.
 - ⁶ Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev*, 43: 109-142.
 - ⁷ Lundberg JO, Farkas-Szallasi T, Weitzberg E, Rinder J, Lidholm J, Anggård A, Hökfelt T, Lundberg JM, Alving K. (1995) High nitric oxide production in human paranasal sinuses. *Nat Med*, 1: 370-373.
 - ⁸ Guo FH, Comhair SA, Zheng S, Dweik RA, Eissa NT, Thomassen MJ, Calhoun W, Erzurum SC. (2000) Molecular mechanism of increased nitric oxide (NO) in asthma: evidence for transcriptional and posttranslational regulation of NO synthesis. *J Immunol*, 164: 5970-5980.
 - ⁹ Horváth I, Donnelly LE, Kiss A, Kharitonov SA, Lim S, Chung KF, Barnes PJ. (1998) Combined use of exhaled hydrogen peroxide and nitric oxide in monitoring asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 158: 1042-1046.
 - ¹⁰ Belvisi MG, Stretton CD, Yacoub M, Barnes PJ. (1992) Nitric oxide is the endogenous neurotransmitter of bronchodilator nerves in humans. *Eur J Pharmacol*, 1992, 210: 221-222.
 - ¹¹ Antus B, Horváth I. (1996) A nitrogén-monoxid szerepe a pulmonalis rendszerben. *Med Thorac*, 48: 162-166.

-
- ¹² Antus B, Horvath I, Barta I. (2010) Assessment of exhaled nitric oxide by a new hand-held device. *Respir Med*, 104: 1377-1380.
- ¹³ American Thoracic Society; European Respiratory Society. (2005) ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide, 2005. *Am J Respir Crit Care Med*, 171: 912-930.
- ¹⁴ Kharitonov S A, Gonio F, Kelly C, Meah S, Barnes PJ. (2003) Reproducibility of exhaled nitric oxide measurements in healthy and asthmatic adults and children. *Eur Respir J*, 21: 43-438.
- ¹⁵ Persson M G, Zetterstrom O, Agrenius V, Ihre E, Gustafsson LE. (1994) Single breath nitric oxide measurements in asthmatic patients and smokers. *Lancet*, 343: 146-147.
- ¹⁶ Price D, Ryan D, Burden A, Von Ziegenweidt J, Gould S, Freeman D, Gruffydd-Jones K, Copland A, Godley C, Chisholm A, Thomas M. (2013) Using fractional exhaled nitric oxide (FeNO) to diagnose steroid-responsive disease and guide asthma management in routine care. *Clin Transl Allergy*, 3: 37.
- ¹⁷ Moeller A, Lehmann A, Knauer N, Albisetti M, Rochat M, Johannes W. (2008) Effects of montelukast on subjective and objective outcome measures in preschool asthmatic children. *Pediatr Pulmonol*, 43: 179-186.
- ¹⁸ Alving K, Weitzberg E, Lundberg J M. (1993) Increased amount of nitric oxide in exhaled air of asthmatics. *Eur Respir J*, 6: 1368-1370.
- ¹⁹ Kharitonov S A, Yates D, Robbins R A, Logan-Sinclair R, Shinebourne EA, Barnes PJ. (1994) Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet*, 343: 133-135.
- ²⁰ Malmberg L P, Pelkonen A S, Haahtela T, Turpeinen M. (2003) Exhaled nitric oxide rather than lung function distinguishes preschool children with probable asthma. *Thorax*, 58: 494-499.
- ²¹ Smith A D, Cowan J O, Filsell S, McLachlan C, Monti-Sheehan G, Jackson P, Taylor DR. (2004) Diagnosing asthma: comparisons between exhaled nitric oxide measurements and conventional tests. *Am J Respir Crit Care Med*, 169: 473-478.

-
- ²² Nogami H, Shoji S, Nishima S. (2003) Exhaled nitric oxide as a simple assessment of airway hyperresponsiveness in bronchial asthma and chronic cough patients. *J Asthma*, 40: 653-659.
- ²³ Pijnenburg M W, Hofhuis W, Hop W C, De Jongste JC. (2005) Exhaled nitric oxide predicts asthma relapse in children with clinical asthma remission. *Thorax*, 60: 215-218.
- ²⁴ Green R H, Brightling C E, McKenna S, Hargadon B, Neale N, Parker D, Ruse C, Hall IP, Pavord ID. (2006) Comparison of asthma treatment given in addition to inhaled corticosteroids on airway inflammation and responsiveness. *Eur Respir J*, 27: 1144-1151.
- ²⁵ www.ginasthma.org
- ²⁶ Kharitonov SA, Barnes PJ. (2001) Exhaled markers of pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 163:1693-1722
- ²⁷ Rutgers SR, Van der Mark TW, Coers W, Moshage H, Timens W, Kauffman HF, Koeter GH, Postma DS. (1999) Markers of nitric oxide metabolism in sputum and exhaled air are not increased in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*, 54: 576-580.
- ²⁸ Maziak W, Loukides S, Culpitt S, Sullivan P, Kharitonov SA, BarnesPJ. (1998) Exhaled nitric oxide in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 157: 998-1002.
- ²⁹ Brindicci C, Ito K, Resta O, Pride NB, Barnes PJ, Kharitonov SA. (2005) Exhaled nitric oxide from lung periphery is increased in COPD. *Eur Respir J*, 26: 52-59.
- ³⁰ Brightling CE, Monteiro W, Ward R, Parker D, Morgan MD, Wardlaw AJ, Pavord ID. (2000) Sputum eosinophilia and short-term response to prednisolone in chronic obstructive pulmonary disease: a randomised controlled trial. *Lancet*, 356: 1480-1485.
- ³¹ Chanez P, Vignola AM, O'Shaugnessy T, Enander I, Li D, Jeffery PK, Bousquet J. (1997) Corticosteroid reversibility in COPD is related to features of asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 155: 1529-1534.
- ³² Bafadhel M, McKenna S, Terry S, Mistry V, Reid C, Haldar P, McCormick M, Haldar K, Keadze T, Duvoix A, Lindblad K, Patel H, Rugman P, Dodson P, Jenkins M, Saunders M, Newbold P, Green RH, Venge P, Lomas DA, Barer MR, Johnston SL, Pavord ID, Brightling CE. (2011) Acute exacerbations of chronic obstructive

pulmonary disease: identification of biologic clusters and their biomarkers. *Am J Respir Crit Care Med*, 184: 662-671.

³³ Kharitonov SA, Barnes PJ. (2003) Nitric oxide, nitrotyrosine, and nitric oxide modulators in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Allergy Asthma Rep*, 3: 121-129.

³⁴ Kharitonov SA, Barnes PJ. (2006) Exhaled biomarkers. *Chest*, 130: 1541-1546.

³⁵ Clini E, Cremona G, Campana M, Scotti C, Pagani M, Bianchi L, Giordano A, Ambrosino N. (2000) Production of endogenous nitric oxide in chronic obstructive pulmonary disease and patients with cor pulmonale. Correlates with echo-Doppler assessment. *Am J Respir Crit Care Med*, 162: 446-450.

³⁶ Croxton TL, Bailey WC. (2006) Long-term oxygen treatment in chronic obstructive pulmonary disease: recommendations for future research: an NHLBI workshop report. *Am J Respir Crit Care Med*, 174: 373-378.

³⁷ Dummer JF, Epton MJ, Cowan JO, Cook JM, Condliffe R, Landhuis CE, Smith AD, Taylor DR. (2009) Predicting corticosteroid response in chronic obstructive pulmonary disease using exhaled nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med*, 180: 846-852.

³⁸ Kunisaki KM, Rice KL, Janoff EN, Rector TS, Niewoehner DE. (2008) Exhaled nitric oxide, systemic inflammation, and the spirometric response to inhaled fluticasone propionate in severe chronic obstructive pulmonary disease: a prospective study. *Thorax*, 2: 55-64.

³⁹ Antus B, Barta I, Horvath I., Csiszer E. (2010) Relationship between exhaled nitric oxide and treatment response in COPD patients with exacerbation. *Respirology*, 15: 472-477.

⁴⁰ Ryter SW, Choi AM. (2013) Carbon monoxide in exhaled breath testing and therapeutics. *J Breath Res*, 7: 017111.

⁴¹ Horvath I, Donnelly LE, Kiss A, Paredi P, Kharitonov SA, Barnes PJ. (1998) Raised levels of eCO are associated with an increased expression of heme-oxygenase-1 in airway macrophages of asthma: a new marker of oxidative stress. *Thorax*, 53: 668-672.

⁴² Horvath I, Loukides S, Wodehouse T, Kharitonov SA, Cole PJ, Barnes PJ. (1998) Increased levels of carbon monoxide in bronchiectasis: a new marker of oxidative stress. *Thorax*, 53: 867-870.

-
- ⁴³ Paredi P, Shah PL, Montuschi P, Sullivan P, Hodson ME, Kharitonov SA, Barnes PJ. (1999) Increased carbon monoxide in exhaled air of patients with cystic fibrosis. *Thorax*, 54: 917-920.
- ⁴⁴ Gajdócsy R, Horváth I. (2010) Exhaled carbon monoxide in airway diseases: from research findings to clinical relevance. *J Breath Res*, 4: 047102.
- ⁴⁵ Paredi P, Kharitonov SA, Barnes PJ. (2000) Elevation of exhaled ethane concentration in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 162: 1450-1454.
- ⁴⁶ Olopade CO, Zakkar M, Swedler WI, Rubinstein I. (1997) Exhaled pentane levels in acute asthma. *Chest*, 111: 862-865.
- ⁴⁷ Paredi P, Kharitonov SA, Leak D, Ward S, Cramer D, Barnes PJ. Exhaled ethane, a marker of lipid peroxidation, is elevated in chronic obstructive pulmonary disease. (2000) *Am J Respir Crit Care Med*, 162: 369-373.
- ⁴⁸ Kubáň P, Foret F. (2013) Exhaled breath condensate: determination of non-volatile compounds and their potential for clinical diagnosis and monitoring. A review. *Anal Chim Acta*, 805: 1-18.
- ⁴⁹ Ahmadzai H, Huang S, Hettiarachchi R, Lin JL, Thomas PS, Zhang Q. (2013) Exhaled breath condensate: a comprehensive update. *Clin Chem Lab Med*, 51: 1343-1361.
- ⁵⁰ Davis MD, Montpetit A, Hunt J. (2012) Exhaled breath condensate: an overview. *Immunol Allergy Clin North Am*, 32: 363-375.
- ⁵¹ Jackson AS, Sandrini A, Campbell C, Chow S, Thomas PS, Yates DH. (2007) Comparison of biomarkers in exhaled breath condensate and bronchoalveolar lavage. *Am J Respir Crit Care Med*, 175, 222-227.
- ⁵² Horváth I, Hunt J, Barnes PJ, Alving K, Antczak A, Baraldi E, Becher G, van Beurden WJ, Corradi M, Dekhuijzen R, Dweik RA, Dwyer T, Effros R, Erzurum S, Gaston B, Gessner C, Greening A, Ho LP, Hohlfeld J, Jöbsis Q, Laskowski D, Loukides S, Marlin D, Montuschi P, Olin AC, Redington AE, Reinhold P, van Rensen EL, Rubinstein I, Silkoff P, Toren K, Vass G, Vogelberg C, Wirtz H; ATS/ERS Task Force on Exhaled Breath Condensate. (2005) Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J*, 26: 523-548.

-
- ⁵³ Vass G, Huszár É, Barát E, Horváth I. (2003) A kilégzett levegő kondenzálása és a kondenzátum elemző vizsgálata. Új módszer a tüdőgyógyászatban. *Orv Hetil*, 144: 2517-2524.
- ⁵⁴ Antus B. (2012) Légúti gyulladás vizsgálata krónikus obstruktív tüdőbetegségben: biomarkerek a kilégzett levegő kondenzátumban. *Orv Hetil*, 153: 843-851.
- ⁵⁵ Rosias P. (2012) Methodological aspects of exhaled breath condensate collection and analysis. *J Breath Res*, 6: 027102.
- ⁵⁶ Vass G, Huszár E, Barát E, Valyon M, Kiss D, Péntes I, Augusztinovicz M, Horváth I. (2003) Comparison of nasal and oral inhalation during exhaled breath condensate collection. *Am J Respir Crit Care Med*, 167: 850-855.
- ⁵⁷ Czebe K, Barta I, Antus B, Valyon M, Horváth I, Kullmann T. (2008) Influence of condensing equipment and temperature on exhaled breath condensate pH, total protein and leukotriene concentrations. *Respir Med*, 102: 720-725.
- ⁵⁸ Djukanović R, Sterk PJ, Fahy JV, Hargreave FE. (2002) Standardised methodology of sputum induction and processing. *Eur Respir J*, 37: S1-S2.
- ⁵⁹ Balbi B, Pignatti P, Corradi M, Baiardi P, Bianchi L, Brunetti G, Radaeli A, Moscato G, Mutti A, Spanevello A, Malerba M. (2007) Bronchoalveolar lavage, sputum and exhaled clinically relevant inflammatory markers: values in healthy adults. *Eur Respir J*, 30: 769-781.
- ⁶⁰ Bacci E, Cianchetti S, Bartoli M, Dente FL, Di Franco A, Vagaggini B, Paggiaro P. (2006) Low sputum eosinophils predict the lack of response to beclomethasone in symptomatic asthmatic patients. *Chest*, 129: 565-572.
- ⁶¹ Lee JJ, Dimina D, Macias MP, Ochkur SI, McGarry MP, O'Neill KR, Protheroe C, Pero R, Nguyen T, Cormier SA, Lenkiewicz E, Colbert D, Rinaldi L, Ackerman SJ, Irvin CG, Lee NA. (2004) Defining a link with asthma in mice congenitally deficient in eosinophils. *Science*, 305: 1773-1776.
- ⁶² Green RH, Brightling CE, McKenna S, Hargadon B, Parker D, Bradding P, Wardlaw AJ, Pavord ID. (2002) Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: a randomised controlled trial. *Lancet*, 360: 1715-1721.
- ⁶³ Jatakanon A, Lim S, Barnes PJ. (2000) Changes in sputum eosinophils predict loss of asthma control. *Am J Respir Crit Care Med*, 161: 64-72.

-
- ⁶⁴ Pavord ID, Brightling CE, Woltmann G, Wardlaw AJ. (1999) Non-eosinophilic corticosteroid unresponsive asthma. *Lancet*, 353: 2213-2214.
- ⁶⁵ Barnes PJ. (2008) The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest*, 118: 3546-3556.
- ⁶⁶ Stănescu D, Sanna A, Veriter C, Kostianev S, Calcagni PG, Fabbri LM, Maestrelli P. Airways obstruction, chronic expectoration, and rapid decline of FEV1 in smokers are associated with increased levels of sputum neutrophils. *Thorax*. 1996 Mar;51(3):267-71.
- ⁶⁷ Tsoumakidou M, Tzanakis N, Kyriakou D, Chrysosfakis G, Siafakas NM. (2004) Inflammatory cell profiles and T-lymphocyte subsets in chronic obstructive pulmonary disease and severe persistent asthma. *Clin Exp Allergy*, 34: 234-240
- ⁶⁸ Anthonisen NR, Manfreda J, Warren CP, Hershfield ES, Harding GK, Nelson NA. (1987) Antibiotic therapy in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Ann Intern Med*, 106: 196-204.
- ⁶⁹ Greenberg S. (2002) Viral respiratory infections in elderly patients and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Med*, 112: S28-S32.
- ⁷⁰ Rhode G, Wiethage A, Borg I, Kauth M, Bauer T, Gillissen A, Bufe A, Schultze-Werninghaus G. (2003) Respiratory viruses in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease requiring hospitalisation: a case-control study. *Thorax*, 58: 37-42.
- ⁷¹ Mallia P, Message SD, Gielen V, Contoli M, Gray K, Keadze T, Aniscenko J, Laza-Stanca V, Edwards MR, Slater L, Papi A, Stanciu LA, Kon OM, Johnson M, Johnston SL. (2011) Experimental rhinovirus infection as a human model of chronic obstructive pulmonary disease exacerbation. *Am J Respir Crit Care Med*, 183: 734-742.
- ⁷² Mallia P, Contoli M, Caramori G, Pandit A, Johnston SL, Papi A. Exacerbations of asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD): focus on virus induced exacerbations. *Curr Pharm Des*, 13: 73-97.
- ⁷³ Wilkinson T, Donaldson G, Johnston S, Openshaw P, Wedzicha J. (2006) Respiratory syncytial virus, airway inflammation, and FEV1 decline in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 173: 871-876.
- ⁷⁴ Murphy TF. (2006) The role of bacteria in airway inflammation in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Infect Dis*, 19: 225-230.

-
- ⁷⁵ Sethi S, Maloney J, Grove L, Wrona C, Berenson C. (2006) Airway inflammation and bronchial bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 173: 991-998.
- ⁷⁶ Beaty C, Grayston J, Wang S, Kuo C, Reto C, Martin T. (1991) Chlamydia pneumoniae, strain Twar, infection in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis*, 144: 1408-1410.
- ⁷⁷ Sunyer J, Saez M, Murillo C, Castellsague J, Martínez F, Antó JM. (1993) Air pollution and emergency room admission for chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Epidemiol*, 137: 701-705.
- ⁷⁸ Shahid SK, Kharitonov SA, Wilson NM, Bush A, Barnes PJ. (2002) Increased interleukin-4 and decreased interferon-gamma in exhaled breath condensate of children with asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 165: 1290-1293.
- ⁷⁹ Leung TF, Ko FW, Wong GW. (2013) Recent advances in asthma biomarker research. *Ther Adv Respir Dis*, 7: 297-308.
- ⁸⁰ Chung KF. (2005) Inflammatory mediators in chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 4: 619-625.
- ⁸¹ Larsson K. (2008) Inflammatory markers in COPD. *Clin Respir J*, 2: S84-S87.
- ⁸² Takanashi S, Hasegawa Y, Kanehira Y, Yamamoto K, Fujimoto K, Satoh K, Okamura K. (1999) Interleukin-10 level in sputum is reduced in bronchial asthma, COPD and in smokers. *Eur Respir J*, 14: 309-314.
- ⁸³ Hacievliyagil SS, Gunen H, Mutlu LC, Karabulut AB, Temel I. (2006) Association between cytokines in induced sputum and severity of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med*, 100: 846-854.
- ⁸⁴ Norzila MZ, Fakes K, Henry RL, Simpson J, Gibson PG. (2000) Interleukin-8 secretion and neutrophil recruitment accompanies induced sputum eosinophil activation in children with acute asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 161: 769-774.
- ⁸⁵ Matsunaga K, Yanagisawa S, Ichikawa T, Ueshima K, Akamatsu K, Hirano T, Nakanishi M, Yamagata T, Minakata Y, Ichinose M. (2006) Airway cytokine expression measured by means of protein array in exhaled breath condensate: correlation with physiologic properties in asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol*, 118: 84-90.

-
- ⁸⁶ Gessner C, Scheibe R, Wötzel M, Hammerschmidt S, Kuhn H, Engelmann L, Hoheisel G, Gillissen A, Sack U, Wirtz H. (2005) Exhaled breath condensate cytokine patterns in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med*, 99: 1229-1240.
- ⁸⁷ Antus B, Barta I, Czebe K, Horvath I, Csiszer E. (2010) Analysis of cytokine pattern in exhaled breath condensate of lung transplant recipients with bronchiolitis obliterans syndrome. *Inflamm Res*, 59: 83-86.
- ⁸⁸ Kullmann T, Barta I, Csiszér E, Antus B, Horváth I. (2008) Differential cytokine pattern in the exhaled breath of patients with lung cancer. *Pathol Oncol Res*, 14: 481-483.
- ⁸⁹ Barta I, Antus B. (2011) Sputum biomarkers in stable COPD. *Eur Respir J*, 38: S114.
- ⁹⁰ Barta I, Antus B. (2012) Biomarker profile in sputum of patients with stable COPD. *Am J Respir Crit Care Med*, 185: A1298.
- ⁹¹ Montuschi P, Kharitonov SA, Ciabattoni G, Barnes PJ. (2003) Exhaled leukotrienes and prostaglandins in COPD. *Thorax*, 58: 585-588.
- ⁹² Seggev JS, Thornton WH Jr, Edes TE. (1991) Serum leukotriene B4 levels in patients with obstructive pulmonary disease. *Chest*, 99: 289-291.
- ⁹³ Biernacki WA, Kharitonov SA, Barnes PJ. (2003) Increased leukotriene B4 and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of patients with exacerbations of COPD. *Thorax*, 58: 294-298.
- ⁹⁴ Kanaoka Y, Boyce JA. (2014) Cysteinyl leukotrienes and their receptors; emerging concepts. *Allergy Asthma Immunol Res*, 6: 288-295.
- ⁹⁵ Antczak A, Ciebiada M, Pietras T, Piotrowski WJ, Kurmanowska Z, Górski P. (2012) Exhaled eicosanoids and biomarkers of oxidative stress in exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Arch Med Sci*, 8: 277-285.
- ⁹⁶ Antczak A, Piotrowski W, Marczak J, Ciebiada M, Gorski P, Barnes PJ. (2011) Correlation between eicosanoids in bronchoalveolar lavage fluid and in exhaled breath condensate. *Dis Markers*, 30: 213-220.
- ⁹⁷ Benyahia C, Gomez I, Kanyinda L, Boukais K, Danel C, Leséche G, Longrois D, Norel X. (2012) PGE(2) receptor (EP(4)) agonists: potent dilators of human bronchi and future asthma therapy? *Pulm Pharmacol Ther*, 25: 115-118.
- ⁹⁸ Montuschi P, Barnes P, Roberts LJ 2nd. (2007) Insights into oxidative stress: the isoprostanes. *Curr Med Chem*, 14: 703-717.

-
- ⁹⁹ Kang KH, Morrow JD, Roberts LJ 2nd, Newman JH, Banerjee M. (1993) Airway and vascular effects of 8-epi-prostaglandin F₂ alpha in isolated perfused rat lung. *J Appl Physiol*, 74: 460-465.
- ¹⁰⁰ Montuschi P, Barnes PJ, Ciabattoni G. (2010) Measurement of 8-isoprostane in exhaled breath condensate. *Methods Mol Biol*, 94: 73-84.
- ¹⁰¹ Wood LG, Garg ML, Simpson JL, Mori TA, Croft KD, Wark PA, Gibson PG. (2005) Induced sputum 8-isoprostane concentrations in inflammatory airway diseases. *Am J Respir Crit Care Med*, 171: 426-430.
- ¹⁰² Reid DW, Misso N, Aggarwal S, Thompson PJ, Walters EH. (2007) Oxidative stress and lipid-derived inflammatory mediators during acute exacerbations of cystic fibrosis. *Respirology*, 12: 63-69.
- ¹⁰³ Montuschi P, Collins JV, Ciabattoni G, Lazzeri N, Corradi M, Kharitonov SA, Barnes PJ. (2000) Exhaled 8-isoprostane as an in vivo biomarker of lung oxidative stress in patients with COPD and healthy smokers. *Am J Respir Crit Care Med*, 162: 1175-1177.
- ¹⁰⁴ Drozdovszky O, Barta I, Antus B. (2014) Sputum eicosanoid profiling in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Respiration*, 87: 408-415.
- ¹⁰⁵ Antus B, Kardos Z. (2015) Oxidative stress in COPD: molecular background and clinical monitoring. *Curr Med Chem*, 22: 627-650.
- ¹⁰⁶ Antus B. (2013) Oxidatív stressz monitorozása COPD-ben: malondialdehid mérés. *Med Thor*, 66: 246-233.
- ¹⁰⁷ Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med*, 11: 81-128.
- ¹⁰⁸ Corradi M, Pignatti P, Manini P, Andreoli R, Goldoni M, Poppa M, Moscato G, Balbi B, Mutti A. (2004) Comparison between exhaled and sputum oxidative stress biomarkers in chronic airway inflammation. *Eur Respir J*, 24: 1011-1017.
- ¹⁰⁹ Bartoli ML, Novelli F, Costa F, Malagrino L, Melosini L, Bacci E, Cianchetti S, Dente FL, Di Franco A, Vagaggini B, Paggiaro PL. (2011) Malondialdehyde in exhaled breath condensate as a marker of oxidative stress in different pulmonary diseases. *Mediators Inflamm*, 2011: 891752.

-
- ¹¹⁰ Antus B, Harnasi G, Drozdovszky O, Barta I. (2014) Monitoring oxidative stress during chronic obstructive pulmonary disease exacerbations using malondialdehyde. *Respirology*, 19: 74-79.
- ¹¹¹ Rihák V, Zatloukal P, Chládková J, Zimulová A, Havlínová Z, Chládek J. (2010) Nitrite in exhaled breath condensate as a marker of nitrossative stress in the airways of patients with asthma, COPD, and idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Lab Anal*, 24: 317-322.
- ¹¹² Rutgers SR, van der Mark TW, Coers W, Moshage H, Timens W, Kauffman HF, Koëter GH, Postma DS. (1999) Markers of nitric oxide metabolism in sputum and exhaled air are not increased in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*, 54: 576-580.
- ¹¹³ Liu J, Sandrini A, Thurston MC, Yates DH, Thomas PS. (2007) Nitric oxide and exhaled breath nitrite/nitrates in chronic obstructive pulmonary disease patients. *Respiration*, 74: 617-623.
- ¹¹⁴ Corradi M, Pesci A, Casana R, Alinovi R, Goldoni M, Vettori MV, Cuomo A. (2003) Nitrate in exhaled breath condensate of patients with different airway diseases. *Nitric Oxide*, 8: 26-30.
- ¹¹⁵ Nadif R, Rava M, Decoster B, Huyvaert H, Le Moual N, Bousquet J, Siroux V, Varraso R, Pin I, Zerimech F, Matran R. (2014) Exhaled nitric oxide, nitrite/nitrate levels, allergy, rhinitis and asthma in the EGEA study. *Eur Respir J*, 44: 351-360.
- ¹¹⁶ Balint B, Donnelly LE, Hanazawa T, Kharitonov SA, Barnes PJ. (2001) Increased nitric oxide metabolites in exhaled breath condensate after exposure to tobacco smoke. *Thorax*, 56: 456-461.
- ¹¹⁷ Balint B, Kharitonov SA, Hanazawa T, Donnelly LE, Shah PL, Hodson ME, Barnes PJ. (2001) Increased nitrotyrosine in exhaled breath condensate in cystic fibrosis. *Eur Respir J*, 17: 1201-1207.
- ¹¹⁸ Kostikas K, Papatheodorou G, Psathakis K, Panagou P, Loukides S. (2003) Oxidative stress in expired breath condensate of patients with COPD. *Chest*, 124: 1373-1380.
- ¹¹⁹ Dekhuijzen PN, Aben KK, Dekker I, Aarts LP, Wielders PL, van Herwaarden CL, Bast A. (1996) Increased exhalation of hydrogen peroxide in patients with stable and

unstable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 154: 813-816.

¹²⁰ Murata K, Fujimoto K, Kitaguchi Y, Horiuchi T, Kubo K, Honda T. (2014) Hydrogen peroxide content and pH of expired breath condensate from patients with asthma and COPD. *COPD*, 11: 81-87.

¹²¹ Kasielski M, Nowak D. (2001) Long-term administration of N-acetyl-cysteine decreases hydrogen peroxide exhalation in subjects with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med*, 95, 448-456.

¹²² Kullmann T, Barta I, Lázár Z, Szili B, Barát E, Valyon M, Kollai M, Horváth I. (2007) Exhaled breath condensate pH standardised for CO₂ partial pressure. *Eur Respir J*, 29: 496-501.

¹²³ Ricciardolo FL, Rado V, Fabbri LM, Sterk PJ, Di Maria GU, Geppetti P. (1999) Bronchoconstriction induced by citric acid inhalation in guinea pigs: role of tachykinins, bradykinin, and nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med*, 159: 557-562.

¹²⁴ Holma B, Lindegren M, Andersen JM. (1977) pH effects on ciliomotility and morphology of respiratory mucosa. *Arch Environ Health*, 32: 216-226.

¹²⁵ Ahmadzai H, Huang S, Hettiarachchi R, Lin JL, Thomas PS, Zhang Q. (2013) Exhaled breath condensate: a comprehensive update. *Clin Chem Lab Med*, 51: 1343-1361.

¹²⁶ Vaughan J, Ngamtrakulpanit L, Pajewski TN, Turner R, Nguyen TA, Smith A, Urban P, Hom S, Gaston B, Hunt J. (2003) Exhaled breath condensate pH is a robust and reproducible assay of airway acidity. *Eur Respir J*, 22: 889-894.

¹²⁷ Kullmann T, Barta I, Antus B, Horváth I. (2008) Drinking influences exhaled breath condensate acidity. *Lung*, 186: 263-268.

¹²⁸ Kullmann T, Barta I, Antus B, Valyon M, Horváth I. (2008) Environmental temperature and relative humidity influence exhaled breath condensate pH. *Eur Respir J*, 31: 474-475

¹²⁹ Antus B, Barta I, Kullmann T, Lazar Z, Valyon M, Horvath I, Csiszer E. (2010) Assessment of exhaled breath condensate pH in exacerbations of asthma and chronic obstructive pulmonary disease: A longitudinal study. *Am J Respir Crit Care Med*, 182: 1492-1497.

-
- ¹³⁰ Lázár Z, Huszár E, Kullmann T, Barta I, Antus B, Bikov A, Kollai M, Horváth I. (2008) Adenosine triphosphate in exhaled breath condensate of healthy subjects and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Inflamm Res*, 57: 367-373.
- ¹³¹ Hunt JF, Fang K, Malik R, Snyder A, Malbotra N, Platta-Mills TA, Gaston B. (2000) Endogenous airway acidification. Implications for asthma pathophysiology. *Am J Respir Crit Care Med*, 161: 694-699.
- ¹³² Niimi A, Nguyen LT, Usmani O, Mann B, Chung KF. (2004) Reduced pH and chloride levels in exhaled breath condensate of patients with chronic cough. *Thorax*, 59: 608-612.
- ¹³³ Kostikas K, Papatheodorou G, Ganas K, Psathakis K, Panagou P, Loukides S. (2002) pH in expired breath condensate of patients with inflammatory airway diseases. *Am J Respir Crit Care Med*, 165: 1364-1370.
- ¹³⁴ Borrill Z, Starkey C, Vestbo J, Singh D. (2005) Reproducibility of exhaled breath condensate pH in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*, 25: 269-274.
- ¹³⁵ Tate S, MacGregor G, Davis M, Innes JA, Greening AP. (2002) Airways in cystic fibrosis are acidified: detection by exhaled breath condensate. *Thorax*, 57: 926-929.
- ¹³⁶ Carpagnano GE, Barnes PJ, Francis J, Wilson N, Bush A, Kharitonov SA. (2004) Breath condensate pH in children with cystic fibrosis and asthma: a new noninvasive marker of airway inflammation? *Chest*, 125: 2005-2010.
- ¹³⁷ Bodini A, D'Orazio C, Peroni DG, Corradi M, Zerman L, Folesani G, Assael BM, Boner AL, Piacentini GL. (2007) IL-8 and pH values in exhaled condensate after antibiotics in cystic fibrosis children. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 20: 467-472.
- ¹³⁸ MacGregor G, Ellis S, Andrews J, Imrie M, Innes A, Greening AP, Cunningham S. (2005) Breath condensate ammonium is lower in children with chronic asthma. *Eur Respir J*, 26: 271-276.
- ¹³⁹ Koczulla R, Dragonieri S, Schot R, Bals R, Gauw SA, Vogelmeier C, Rabe KF, Sterk PJ, Hiemstra PS. (2009) Comparison of exhaled breath condensate pH using two commercially available devices in healthy controls, asthma and COPD patients. *Respir Res*, 10: 78.
- ¹⁴⁰ Robroeks CM, Rosias PP, van Vliet D, Jöbsis Q, Yntema JB, Brackel HJ, Damoiseaux JG, den Hartog GM, Wodzig WK, Dompeling E. (2008) Biomarkers in

exhaled breath condensate indicate presence and severity of cystic fibrosis in children. *Pediatr Allergy Immunol*, 19: 652-659.

¹⁴¹ Effros RM, Casaburi R, Su J, Dunning M, Torday J, Biller J, Shaker R. (2006) The effects of volatile salivary acids and bases on exhaled breath condensate pH. *Am J Respir Crit Care Med*, 173: 386-392.

¹⁴² Weigt SS, DerHovanesian A, Wallace WD, Lynch JP 3rd, Belperio JA. (2013) Bronchiolitis obliterans syndrome: the Achilles' heel of lung transplantation. *Semin Respir Crit Care Med*, 34: 336-351.

¹⁴³ Antus B, Fillinger J, Csiszér E, Czebe K, Horváth I. (2005) Bronchiolitis obliterans syndrome in lung transplant recipients. *Orv Hetil*, 146: 953-958.

¹⁴⁴ Kennedy VE, Todd JL, Palmer SM. (2013) Bronchoalveolar lavage as a tool to predict, diagnose and understand bronchiolitis obliterans syndrome. *Am J Transplant*, 13: 552-561.

¹⁴⁵ Cooper JD, Billingham M, Egan T, Hertz MI, Higenbottam T, Lynch J, Mauer J, Paradis I, Patterson GA, Smith C, et al. (1993) A working formulation for the standardization of nomenclature and for clinical staging of chronic dysfunction in lung allografts. International Society for Heart and Lung Transplantation. *J Heart Lung Transplant*, 12: 713-716.

¹⁴⁶ Dupont LJ, Dewandeleer Y, Vanaudenaerde BM, Van Raemdonck DE, Verleden GM. (2006) The pH of exhaled breath condensate of patients with allograft rejection after lung transplantation. *Am J Transplant*, 6: 1486-1492.

¹⁴⁷ Estenne M, Maurer JR, Boehler A, Egan JJ, Frost A, Hertz M, Mallory GB, Snell GI, Yousem S. (2002) Bronchiolitis obliterans syndrome 2001: an update of the diagnostic criteria. *J Heart Lung Transplant*, 21: 297-310.

¹⁴⁸ Antus B, Csiszér E, Czebe K, Horváth I. (2005) Pulmonary infections increase exhaled nitric oxide in lung transplant recipients: a longitudinal study. *Clin Transplant*, 19: 377-382.

¹⁴⁹ Czebe K, Kullmann T, Csiszér E, Barat E, Horváth I, Antus B. (2008) Variability of exhaled breath condensate pH in lung transplant recipients. *Respiration*, 75: 322-327.

¹⁵⁰ Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Coates A, Crapo R, Enright P, van der Grinten CP, Gustafsson P, Jensen R, Johnson DC, MacIntyre N,

McKay R, Navajas D, Pedersen OF, Pellegrino R, Viegi G, Wanger J; ATS/ERS Task Force. (2005) Standardisation of spirometry. *Eur Respir J*, 26: 319-338.

¹⁵¹ www.goldcopd.com

¹⁵² Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, Barnes PJ, Buist SA, Calverley P, Fukuchi Y, Jenkins C, Rodriguez-Roisin R, van Weel C, Zielinski J; Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. (2007) Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med*, 176: 532-555.

¹⁵³ American Thoracic Society; European Respiratory Society. (2005) ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide, 2005. *Am J Respir Crit Care Med*, 171: 912-930.

¹⁵⁴ Antus B, Barta I, Csiszer E, Kelemen K. (2012) Exhaled breath condensate pH in patients with cystic fibrosis. *Inflamm Res*, 61: 1141-1147.

¹⁵⁵ Hanley JA, McNeil BJ. (1982) The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology*, 143: 29-36.

¹⁵⁶ Fabbri LM, Romagnoli M, Corbetta L, Casoni G, Busljetic K, Turato G, Ligabue G, Ciaccia A, Saetta M, Papi A. (2003) Differences in airway inflammation in patients with fixed airflow obstruction due to asthma or chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 167: 418-424.

¹⁵⁷ Shimizu Y, Dobashi K, Zhao JJ, Kawata T, Ono A, Yanagitani N, Kaira K, Utsugi M, Hisada T, Ishizuka T, Mori M. (2007) Proton pump inhibitor improves breath marker in moderate asthma with gastroesophageal reflux disease. *Respiration*, 74: 558-564.

¹⁵⁸ Torrego A, Cimbollek S, Hew M, Chung KF. (2005) No effect of omeprazole on pH of exhaled breath condensate in cough associated with gastro-oesophageal reflux. *Cough*, 1:10.

¹⁵⁹ Kullmann T, Barta I, Horváth I. (2007) Effect of freezing on exhaled breath condensate pH. *Respir Med*, 101: 2566.

¹⁶⁰ Oh MJ, Lee JY, Lee BJ, Choi DC. (2008) Exhaled nitric oxide measurement is useful for the exclusion of nonasthmatic eosinophilic bronchitis in patients with chronic cough. *Chest*, 134: 990-995.

-
- ¹⁶¹ Silkoff PE, McClean P, Spino M, Erlich L, Slutsky AS, Zamel N. (2001) Dose-response relationship and reproducibility of the fall in exhaled nitric oxide after inhaled beclomethasone dipropionate therapy in asthma patients. *Chest*, 119: 1322-1328.
- ¹⁶² Fujimoto K, Kubo K, Yamamoto H, Yamaguchi S, Matsuzawa Y. (1999) Eosinophilic inflammation in the airway is related to glucocorticoid reversibility in patients with pulmonary emphysema. *Chest*, 115: 697-702.
- ¹⁶³ Pizzichini E, Pizzichini MM, Gibson P, Parameswaran K, Gleich GJ, Berman L, Dolovich J, Hargreave FE. (1998) Sputum eosinophilia predicts benefit from prednisone in smokers with chronic obstructive bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med*, 158: 1511-1517.
- ¹⁶⁴ Brightling CE, Monteiro W, Ward R, Parker D, Morgan MD, Wardlaw AJ, Pavord ID. (2000) Sputum eosinophilia and short-term response to prednisolone in chronic obstructive pulmonary disease: a randomised controlled trial. *Lancet*, 356: 1480-1485.
- ¹⁶⁵ Papi A, Bellettato CM, Braccioni F, Romagnoli M, Casolari P, Caramori G, Fabbri LM, Johnston SL. (2006) Infections and airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease severe exacerbations. *Am J Respir Crit Care Med*, 173: 1114-1121.
- ¹⁶⁶ Ferreira IM, Hazari MS, Gutierrez C, Mistry V, Reid C, Haldar P. (2001) Exhaled nitric oxide and hydrogen peroxide in patients with chronic obstructive pulmonary disease: Effects of inhaled beclomethasone. *Am J Respir Crit Care Med*, 164: 1012-1015.
- ¹⁶⁷ Zietkowski Z, Kucharewicz I, Bodzenta-Lukaszyk A. (2005) The influence of inhaled corticosteroids on exhaled nitric oxide in stable chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med*, 99: 816-824.
- ¹⁶⁸ Shim C, Stover DE, Williams MH Jr. (1978) Response to corticosteroids in chronic bronchitis. *J Allergy Clin Immunol*, 62: 363-367.
- ¹⁶⁹ Liu J, Sandrini A, Thurston MC, Yates DH, Thomas PS. (2007) Nitric oxide and exhaled breath nitrite/nitrates in chronic obstructive pulmonary disease patients. *Respiration*, 74: 617-623.
- ¹⁷⁰ Bathoorn E, Kerstjens H, Postma D, Timens W, MacNee W. (2008) Airways inflammation and treatment during acute exacerbations of COPD. *Int J Chron Obstruct Pulm Dis*, 3: 217-229.

-
- ¹⁷¹ Bathoorn E, Liesker JJ, Postma DS, Koëter DH, van der Toorn M, van der Heide S. (2009) Change in inflammation in outpatient COPD patients from stable phase to a subsequent exacerbation. *Int J Chron Obstruct Pulm Dis*, 4: 101-109.
- ¹⁷² Bathoorn E, Liesker J, Postma D, Koëter G, van Oosterhout AJ, Kerstjens HA. (2007) Safety of sputum induction during exacerbations of COPD. *Chest*, 131: 432-438.
- ¹⁷³ Holz O, Seiler T, Karmeier A, Fraedrich J, Leiner H, Magnussen H. (2008) Assessing airway inflammation in clinical practice. Experience with spontaneous sputum analysis. *BMC Pulm Med*, 8: 5.
- ¹⁷⁴ Siva R, Green RH, Brightling CE, Shelley M, Hargadon B, McKenna S. (2007) Eosinophilic airway inflammation and exacerbations of COPD: A randomised controlled trial. *Eur Respir J*, 29: 906-913.
- ¹⁷⁵ Hoyt JC, Robbins RA, Habib M, Springall DR, Buttery LD, Polak JM, Barnes PJ. (2003) Cigarette smoke decreases inducible nitric oxide synthase in lung epithelial cells. *Exp Lung Res*, 29: 17-28.
- ¹⁷⁶ Kharitonov SA, Robbins RA, Yates D, Keatings V, Barnes PJ. (1995) Acute and chronic effects of cigarette smoking on exhaled nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med*, 152: 609-612.

11. Saját publikációk jegyzéke

11.1. Az értekezés tárgykörében megjelent közlemények jegyzéke

1. **Soter S**, Kelemen K, Barta I, Valyon M, Csiszer E, Antus B. (2011) Exhaled breath condensate pH in lung transplant recipients with bronchiolitis obliterans syndrome. Transplantation, 91: 793-797.

IF: 4.003

2. **Soter S**, Barta I, Antus B. (2013) Predicting sputum eosinophilia in exacerbations of COPD using exhaled nitric oxide. Inflammation, 36: 1178-1185.

IF: 2.457

11.2. Az értekezés tárgykörébe nem tartozó közlemények jegyzéke

1. Juhász E, **Sótér S**. (2014) Gefinitib-kezeléssel elért remisszió primer pulmonalis adenocarcinoma esetében. Med Thor, 68: 83-84.

12. Köszönetnyilvánítás

Az értekezés alapját képző tudományos munkák a Magyar Pulmonológiai Alapítvány és az OTKA 83338. számú pályázatának támogatásával készültek.

Doktori munkámhoz kapcsolódóan mindenekelőtt köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek, *dr. Antus Balázsnak*, aki munkacsoportjába meghívott és lehetőséget biztosított arra, hogy gyakorló klinikusként az *Országos Korányi Tbc és Pulmonológiai Intézet* Kóréletteni Osztályán folyó tudományos kutatómunkába bekapcsolódhassam. Hálás vagyok szakmai irányításáért, útmutatásáért, a vizsgálataim megszervezéséért és a disszertációm megírása során nyújtott sokoldalú segítségéért. Nagyon köszönöm a klinikai elfoglaltságomból adódó mulasztásaimmal szembeni türelmét és toleranciáját is. Köszönöm *dr. Barta Imre* biológus segítségét is, aki szintén tevékeny résztvevője volt a mérések elvégzésének, az eredmények kiértékelésének és a közlemények megírásának. A Kóréletteni Osztályon folyó mintagyűjtéseket *Mikoss Mária* és *Hernádi Jánosné* asszisztensek végezték. A tüdőtranszplantált betegeket *dr. Csiszér Eszter* és *dr. Czebe Krisztina* gondozták.

Köszönöm Intézetünk korábbi igazgatójának, *prof. dr. Strausz Jánosnak*, hogy lehetőséget biztosított a tudományos kutatómunkába való bekapcsolódásra. Az Intézet jelenlegi vezetője, *dr. Kovács Gábor* támogatása ezen a téren szintén töretlen volt.

Hálával tartozom *dr. Juhász Erzsébet* osztályvezető főorvosasszonynak is, aki hozzájárult ahhoz, hogy a kutatómunka elvégzése céljából az osztályáról időről-időre eltávozhassam. Végül, köszönöm a XIV-es Tüdőbelosztályon dolgozó valamennyi klinikus kollégáimnak is, hogy távollétemben időszakosan helyettesítettek.