

# Eikozanoidok és oxidatív stressz markerek vizsgálata krónikus obstruktív tüdőbetegségben

Doktori értekezés

**Drozdovszky Orsolya Tünde**

Semmelweis Egyetem  
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Antus Balázs, DSc., osztályvezető főorvos

Hivatalos bírálók: Dr. Komlósi Zsolt István, Ph.D., egyetemi adjunktus  
Dr. Balikó Zoltán, PhD., egyetemi magántanár

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Müller Veronika, Ph.D., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Bohács Anikó, Ph.D., egyetemi adjunktus  
Dr. Vizi Éva, Ph.D., osztályvezető főorvos

Budapest  
2016

## TARTALOMJEGYZÉK

<b>1. Rövidítések jegyzéke</b> .....	5
<b>2. Bevezetés</b> .....	8
2.1. A COPD klinikai jellemzői és diagnosztikája.....	9
2.1.1. A COPD definíciója.....	9
2.1.2. A COPD prevalenciája.....	9
2.1.3. A COPD etiológiája.....	10
2.1.4. A COPD genetikai háttere.....	10
2.1.5. A COPD diagnosztikája.....	11
2.2. A COPD patomechanizmusa.....	12
2.2.1. A krónikus gyulladás kialakulása COPD-ben.....	12
2.2.1.1. Neutrofilejtek.....	14
2.2.1.2. Makrofágok.....	15
2.2.1.3. T-limfociták.....	15
2.2.1.4. Természetes ölü sejtek.....	15
2.2.1.5. Eozinofilejtek, hízósejtek.....	16
2.2.2. Az oxidatív stressz szerepe COPD-ben.....	17
2.2.3. A lipidperoxidáció folyamata COPD-ben.....	18
2.2.4. Anti-oxidáns rendszerek COPD-ben.....	19
2.2.5. A COPD exacerbációja.....	20
2.3. Biomarkerek meghatározása különböző légúti mintákban.....	21
2.3.1. Szisztémás minták, mint a biomarkerek lehetséges forrásai.....	21
2.3.2. Légúti minták, mint a biomarkerek lehetséges forrásai.....	22
2.3.2.1. Bronchoalveoláris lavage.....	22
2.3.2.2. Kilégzett levegő kondenzátum.....	22
2.3.2.3. Köpet.....	24
2.4. Biomarkerek a COPD kutatásában és diagnosztikájában.....	26
2.4.1. Frakcionált kilégzett nitrogén-monoxid.....	27
2.4.2. Kilégzett levegő kondenzátum pH-ja.....	27
2.4.3. Arachidonsav-származékok.....	28
2.4.3.1. Leukotriének.....	29
2.4.3.2. Ciszteinil-leukotriének.....	30
2.4.3.3. Leukotrién B <sub>4</sub> .....	31
2.4.3.4. Prostaglandinok.....	33
2.4.3.5. Prostaglandin E <sub>2</sub> .....	34
2.4.3.6. Tromboxánok.....	36
2.4.3.7. Prostaglandinok.....	36
2.4.3.8. Prostaglandin D <sub>2</sub> .....	36
2.4.4. Oxidatív stressz markerek.....	37
2.4.4.1. Kilégzett szén-monoxid.....	37
2.4.4.2. 8-izoprosztán.....	37

2.4.4.3.	Malondialdehyd.....	39
<b>3.</b>	<b>Célkitűzések.....</b>	<b>42</b>
<b>4.</b>	<b>Módszerek.....</b>	<b>43</b>
4.1.	Invazív és non-invazív légúti mintavételi módszerek összehasonlítása különböző eikozanoidok kimutathatóságára vonatkozóan.....	43
4.1.1.	Betegek és vizsgálati protokoll.....	43
4.1.2.	Légzésfunkciós vizsgálatok.....	44
4.1.3.	FENO mérés.....	45
4.1.4.	Bronchoszkópia.....	45
4.1.5.	EBC gyűjtése.....	45
4.1.6.	Indukált köpet gyűjtése.....	45
4.1.7.	Köpet feldolgozása.....	45
4.1.8.	Citospin és sejtmegoszlás meghatározás.....	46
4.1.9.	Arachidonsav-származékok mérése.....	46
4.1.10.	Az EIA mérések reprodukálhatósága köpetben.....	47
4.1.11.	Statisztikai analízis.....	47
4.2.	Köpet LTB <sub>4</sub> , cisz-LT, PGE <sub>2</sub> és 8-izoprosztán szintjének vizsgálata COPD akut exacerbációjában és az exacerbáció kezelése után.....	48
4.2.1.	Betegek és vizsgálati protokoll.....	48
4.2.2.	Légzésfunkciós vizsgálatok, FENO-mérés, köpetgyűjtés és köpetfeldolgozás.....	49
4.2.3.	Eikozanoidok mérése.....	49
4.2.4.	A köpetindukció hatásának vizsgálata.....	49
4.2.5.	Statisztikai analízis.....	49
4.3.	Az oxidatív stressz vizsgálata COPD-ben a légúti MDA koncentráció mérésén keresztül.....	50
4.3.1.	Betegek és vizsgálati protokoll.....	50
4.3.2.	Légzésfunkciós vizsgálatok, FENO-mérés, EBC- és köpetgyűjtés, mintafeldolgozás.....	51
4.3.3.	MDA meghatározása .....	52
4.3.4.	A köpetindukció hatásának vizsgálata.....	53
4.3.5.	MDA-mérések intra-assay és inter-assay variabilitása.....	53
4.3.6.	MDA-mérések napok-közötti variabilitása.....	53
4.3.7.	Statisztikai analízis.....	53
<b>5.</b>	<b>Eredmények.....</b>	<b>54</b>
5.1.	Invazív és non-invazív légúti mintavételi módszerek összehasonlítása különböző eikozanoidok kimutathatóságára vonatkozóan.....	54
5.1.1.	A résztvevők demográfiai és klinikai adatai.....	54
5.1.2.	Eikozanoidok koncentrációjának összehasonlítása köpetben, BAL-ban, EBC-ben.....	54
5.1.3.	Az EIA mérések reprodukálhatósága köpetben.....	55
5.1.4.	Korrelációk a mediátorok, valamint a köpet sejtprofilja között.....	56
5.2.	Köpet LTB <sub>4</sub> , cisz-LT, PGE <sub>2</sub> és 8-izoprosztán szintjének vizsgálata COPD akut exacerbációjában és az exacerbáció kezelése után.....	59

5.2.1.	A klinikai paraméterek változása az exacerbáció során és a kezelést követően.....	59
5.2.2.	A spontán és indukált köpet eikozanoid koncentrációinak összehasonlítása.....	60
5.2.3.	Eikozanoidok koncentrációjának meghatározása.....	61
5.2.3.1.	8-izoprosztán.....	61
5.2.3.2.	Cisz-LT-ek.....	61
5.2.3.3.	PGE <sub>2</sub> .....	61
5.2.3.4.	LTB <sub>4</sub> .....	62
5.2.4.	Korrelációk.....	62
5.3.	Az oxidatív stressz vizsgálata COPD-ben a légúti MDA koncentráció mérésén keresztül.....	65
5.3.1.	A klinikai paraméterek változása az exacerbáció kezelés során.....	65
5.3.2.	A spontán és indukált köpet MDA szintjének összehasonlítása.....	66
5.3.3.	Az MDA koncentrációjának változása a köpetben.....	67
5.3.4.	A MDA koncentrációjának változása az EBC-ben.....	67
5.3.5.	MDA mérések intra-assay reprodukálhatósága.....	67
5.3.6.	MDA mérések inter-assay reprodukálhatósága.....	68
5.3.7.	MDA-mérések napok-közötti variabilitása.....	68
5.3.8.	Összefüggés a $\Delta$ FEV <sub>1</sub> és az MDA koncentráció között.....	69
5.3.9.	Korrelációk.....	70
<b>6.</b>	<b>Megbeszélés.....</b>	<b>71</b>
6.1.	Invazív és non-invazív légúti mintavételi módszerek összehasonlítása különböző eikozanoidok kimutathatóságára vonatkozóan.....	71
6.2.	Köpet LTB <sub>4</sub> , cisz-LT, PGE <sub>2</sub> és 8-izoprosztán szintjének vizsgálata COPD akut exacerbációjában és az exacerbáció kezelése után.....	73
6.3.	Az oxidatív stressz vizsgálata COPD-ben a légúti MDA koncentráció mérésén keresztül.....	76
<b>7.</b>	<b>Következtetések.....</b>	<b>79</b>
<b>8.</b>	<b>Összefoglalás.....</b>	<b>80</b>
<b>9.</b>	<b>Summary.....</b>	<b>81</b>
<b>10.</b>	<b>Irodalomjegyzék.....</b>	<b>82</b>
<b>11.</b>	<b>Saját publikációk jegyzéke.....</b>	<b>103</b>
<b>12.</b>	<b>Köszönetnyilvánítás.....</b>	<b>104</b>

## 1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

<b><math>\alpha_1</math>-AT:</b>	$\alpha_1$ -antitripszin
<b>4-HHE:</b>	4-hidroxi-2-hexenal
<b>4-HNE:</b>	4-hidroxi-2-nonenal
<b>5-HPETE:</b>	5-hidroperoxi-eikozatetraénsav
<b>5-LO:</b>	5-lipoxigenáz
<b>Ab:</b>	antitest (antibody)
<b>AChE:</b>	acetilkolin-észteráz
<b>AP-1:</b>	aktivátor protein-1
<b>ASL:</b>	légúti folyadékfilm (airway surface liquid)
<b>ATS:</b>	Amerikai Tüdőgyógyász Társaság (American Thoracic Society)
<b>BAL:</b>	bronchoalveoláris lavázs (bronchoalveolaris lavage)
<b>CAT:</b>	kataláz
<b>CAT:</b>	COPD Assasment Test
<b>CCL:</b>	kemokin ligand
<b>Cisz-LT:</b>	ciszteinil-leukotriének
<b>Cisz-LT<sub>1</sub>R:</b>	1-es típusú ciszteinil-leukotrién receptor
<b>CO:</b>	szén-monoxid (carbon-monoxide)
<b>COPD:</b>	krónikus obstruktív tüdőbetegség (chronic obstructive pulmonary disease)
<b>COX:</b>	ciklooxygenáz
<b>CRP:</b>	C-reaktív protein
<b>CV:</b>	variációs koefficiens
<b>CXCL:</b>	kemokin ligand
<b>DTT:</b>	dithiothreitol
<b>EBC:</b>	kilégzett levegő kondenzátum (exhaled breath condensate)
<b>ECM:</b>	extracelluláris mátrix
<b>ECP:</b>	eozinofil-kation-protein (eosinophil cationic protein)
<b>EGF:</b>	epidermális növekedési faktor (epidermal grow factor)
<b>EIA:</b>	enzim immunoassay
<b>ELAM-1:</b>	endoteliális leukocita adhéziós molekula-1
<b>ELISA:</b>	enzimmel kapcsolt immunoszorbens assay (enzim linked immunosorbens assay)
<b>ERS:</b>	Európai Tüdőgyógyász Társaság (European Respiratory Society)

<b>FENO:</b>	frakcionált kilégzett nitrogén-monoxid (fractional exhaled nitric oxide)
<b>FEV<sub>1</sub>:</b>	forszírozott expirációs volumen egy másodperc alatt (forced expiratory volume)
<b>FLAP:</b>	5-lipoxigenáz-aktiváló protein
<b>FVC:</b>	forszírozott vitálkapacitás
<b>GM-CSF:</b>	granulocita-makrofág kolónia stimuláló faktor
<b>GOLD:</b>	Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease
<b>GSH:</b>	glutation peroxidáz
<b>HDAC:</b>	hiszton-deacetiláz
<b>HPLC:</b>	nagy teljesítményű folyadékkromatográfia (high performance liquid chromatography)
<b>HRCT:</b>	nagy felbontóképességű számítógépes tomográf (High-resolution computed tomography)
<b>ICAM-1:</b>	intercelluláris adhézios molekula-1
<b>IFN-<math>\gamma</math>:</b>	interferon
<b>Ig:</b>	immunglobulin
<b>IL:</b>	interleukin
<b>IP-10:</b>	interferon (IFN)- $\gamma$ -indukálta protein-10
<b>LOOH:</b>	lipid hidroperoxid
<b>LT:</b>	leukotrién
<b>MCP:</b>	monocita kemotaktikus protein
<b>MDA:</b>	malondialdehid
<b>MHC:</b>	major hisztokompatibilitási komplex
<b>MMP:</b>	mátrix-metalloproteináz
<b>MmRC:</b>	Modified medical Research Council
<b>MPO:</b>	mieloperoxidáz
<b>NE:</b>	neutrofil-elasztáz
<b>NF-<math>\kappa</math>B:</b>	nukleáris faktor-kappa B
<b>NK:</b>	természetes ölüsejtek (natural killer cells)
<b>NO:</b>	nitrogén-monoxid
<b>OSAS:</b>	obstruktív alvási apnoe szindróma (obstructive sleeping apnoe syndrome)
<b>PBS:</b>	foszfát-puffer
<b>PCR:</b>	polimeráz lánreakció (polymerase chain reaction)
<b>PG:</b>	prostaglandin

<b>PLA<sub>2</sub>:</b>	foszfolipáz A <sub>2</sub>
<b>ppb:</b>	részecske per billió (pars per billion)
<b>ROS:</b>	reaktív oxidatív szabadgyök (reactive oxidative species)
<b>SOD:</b>	szuperoxid-dizmutáz
<b>TBA:</b>	tiobarbiturátsav
<b>TCR:</b>	T-sejt receptor (T-cell receptor)
<b>TGF- <math>\beta</math>:</b>	transzformáló növekedési faktor- $\alpha$ (transforming growth faktor- $\beta$ )
<b>Th:</b>	T-helper limfocita
<b>TNF- <math>\alpha</math>:</b>	tumor nekrosis faktor- $\alpha$
<b>TX:</b>	tromboxán
<b>VEGF:</b>	vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (vascular endothelial grow factor)
<b>WHO:</b>	Egészségügyi Világszervezet (World Health Organisation)

## 2. BEVEZETÉS

A krónikus obstruktív tüdőbetegség (COPD) nagyrészt irreverzibilis légúti szűkülettel és krónikus légúti gyulladással járó kórkép, amely komoly egészségügyi problémát jelent világszerte. Bár a COPD patomechanizmusa minden részletében jelenleg sem ismert, az elmúlt évtizedben a COPD kórfolyamatának felderítésében számos előrelépés történt. Ismertté vált, hogy a COPD legfőbb patológiai jellemzőjének tartott krónikus légúti gyulladást a különböző fenotípusokban eltérő sejtes és mediátor képzési arányok jellemzik, amelyek eltérő kórlefoyáshoz és különböző exacerbációs gyakorisághoz vezetnek. Napjainkban egyre többen feltételezik, hogy a krónikus gyulladás és a COPD-re jellemző strukturális változások kialakulásában számos lipid mediátornak, így például a 20 szénatomos arachidonsav-származékok közé tartozó prosztaglandinoknak (PG) és leukotriéneknek (LT) is szerepe van. A PG-ok és a LT-ek mintázata azonban a különböző légúti mintákban eltérő lehet.

A légúti mintavételi lehetőségek közül az *invazív* mintavételi eljárások, úgymint a tüdőbiopszia, valamint a bronchoalveolaris lavage (BAL) önmagukban is gyulladáskeltőek és megterhelést jelentenek a betegek számára, így alkalmazhatóságuk korlátozott. Az elmúlt években a pulmonológiai kutatások terén egyre nagyobb teret hódít a légutakból történő *non-invazív* mintavételi eljárások alkalmazása. A COPD kórfolyamatának megismerését célzó vizsgálatok jelentős részében a PG-ok és a LT-ek mérésére non-invazív úton nyert légúti mintákban, így a kilélegzett levegő kondenzátumban (EBC) és az indukált vagy spontán köpetben történt. Bár a legtöbb vizsgálatban e lipid mediátorok koncentrációjának emelkedését igazolták, számos ellentmondás is felmerült az arachidonsav-származékok COPD-ben betöltött szerepét, mennyiségi változását illetően.

A COPD kezelésének egyik nagy kihívása az akut exacerbációk kialakulásának megakadályozása a klinikailag stabil állapotú COPD-s betegekben. Az exacerbációban szerepet játszó faktorokról viszonylag keveset tudunk. Egyes irodalmi adatok arról számolnak be, hogy a PG-ok és LT-ek koncentrációja az exacerbáció során megemelkedik. A lipid mediátorokra vonatkozó vizsgálati eredmények lehetővé teszik az exacerbációban lévő COPD-s betegek fenotípus alapján való alcsoportokra bontását, amelynek a későbbiekben egyes gyógyszer és gyógyszer-kombinációk célzott beállításában vagy az oxidatív stresszel szembeni érzékenység kimutatásában, esetleg az exacerbációk etiológiájának felderítésében lehet klinikai haszna. Az exacerbáció patomechanizmusában az arachidonsav-származékoknak szerepe lehet a keringésben lévő gyulladással járó sejtek toborzásában, a



bronchokonstrikció fokozásában, a nyák szekréció, valamint a légutak és a tüdőparenchima strukturális és vaszkuláris elváltozásainak kialakításában. Az arachidonsav-származékok főbb reguláló folyamatainak megismerése, hatásmechanizmusuk tisztázása a rájuk irányuló célzott kezeléshez vezető utat nyithatja meg a jövőben.

## **2.1. A COPD klinikai jellemzői és diagnosztikája**

### **2.1.1. A COPD definíciója**

A COPD-t idült légúti gyulladás, nagyrészt irreverzibilis légúti áramláskorlátozottság és lassan progrediáló kórlefolyás jellemez (1, 2). A COPD patológiájának két fő összetevője a perifériás hörgőszűkület és a légutak támasztó szöveteinek pusztulása. Attól függően, hogy a betegség kialakulásában mely elemek dominálnak, a COPD-n belül két fő alcsoport különíthető el: a bronchitises és az emfizémás típus. A krónikus bronchitis vezető tünete a legalább két egymást követő évben, évente minimum három hónapon át fennálló produktív köhögés, amely nem szív- és érrendszeri eredetű, illetve nem más tüdőbetegség következménye. Míg a krónikus bronchitis kezdeti szakaszában a szubmukozális mirigyek hipertrófiája és a váladékpangás dominál, a késő szakaszban a gyulladás egyre inkább ráterjed a hörgőfalra, ami gyulladással ödémát, simaizomsejt hipertrófiát, fibrózist és hegesedést vált ki, és egyre súlyosbodó légúti obstrukciót okoz. Az emfizémát ugyanakkor a terminális bronchiolusoktól disztálisan elhelyezkedő légterek túltágulása és faluk primer pusztulása jellemzi, lényeges mértékű fibrózis kialakulása nélkül (2). Bár a két kórkép kórfejlődése eltérő, általában egyszerre vannak jelen, és az egyik vagy a másik dominanciája állapítható meg az egyes betegeknél. A krónikus bronchitist és az emfizémát először 1950-ben *Briscoe* említette összefoglalóan COPD név alatt (3).

### **2.1.2. A COPD prevalenciája**

A COPD prevalenciájának nagyfokú növekedése világméretű népegészségügyi probléma. A betegség az epidemiológiai adatok szerint a felnőtt lakosság 9-10 %-át érinti (4, 5). A COPD globális halálozása 1990-ben sorrendben a negyedik, míg 2010-ben a harmadik helyen állt (6, 7). A COPD jelenleg a krónikus morbiditás és mortalitás negyedik vezető oka az USA-ban (8). Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) tanulmánya szerint a COPD prevalenciája folyamatosan nő, és 2020-ra várhatóan a 3. vezető halálókká válik a világon (9). Jelenleg a 45 év feletti populáció 10%-a, a 45 év feletti dohányos populáció csaknem 50%-a érintett COPD kialakulás szempontjából (10). Az előrejelzések szerint 2030-ra a világ 40 év feletti

lakosainak közel 22%-ka szenvedhet COPD-ben (11). Magyarországon is nő a COPD prevalenciája. 2009. évi hazai adatok alapján a COPD ellátása a tüdőgyógyászati fekvőbeteg ellátásnak kb. 21%-át teszi ki (12). A nyilvántartott COPD-s betegszám 2014-ben 6034 esettel gyarapodott a 2013-as évhez viszonyítva (a nyilvántartott állomány 2013-ban 1747 %ooo, 2014-ben 1832 %ooo) (13). Amennyiben a Burden of Obstructive Lung Disease (BOLD) vizsgálat felnőtt lakosságra vonatkoztatott prevalencia értékét a magyar, 40 évesnél idősebb korosztályra vetítve a GOLD II/III-IV súlyosságú COPD-s betegek száma 5-600000 lehet, amely 2-3-szorosa a 2013-ban nyilvántartott 174949 betegnek (14). Az eltérő diagnosztikus kritériumok és módszerek megnehezítik a különböző országok által közölt epidemiológiai adatok értékelését és összehasonlítását (14). A becsült és nyilvántartott betegszám, mortalitási adatok közötti különbség hátterében több tényező állhat. Egyrészt a COPD gyakran csak második-harmadik kórházi diagnózis a COPD-mortalitást gyakran elfedik a társbetegségek okozta halálozások. További különbséget okozhat, hogy a kezdeti stádiumokban a tünetek nem elég specifikusak, a betegek sokszor csak súlyosabb stádiumokban fordulnak orvoshoz, így a nyilvántartásokban feltehetően csak a súlyosabb esetek szerepelnek (14).

### **2.1.3. A COPD etiológiája**

Széleskörű metaanalízisek alapján elmondható, hogy a COPD etiológiájában a legfőbb rizikófaktor a dohányzás, amely minden egyéb kockázati tényező hatását felülmúlja (15). Ismert ugyanakkor, hogy bár a COPD-s betegek 90%-ka dohányzik, a dohányosoknak csak egy kis hányadánál alakul ki klinikailag szignifikáns COPD, ami a genetikai prediszpozíció jelentőségére utal. A felmérések szerint a COPD kialakulásának kockázatát emeli a levegő szennyezettsége, a lakóterén belüli inhalációs ártalmak (pl. széntüzelés), valamint a betegek 10-20%-ában a foglalkozással összefüggő károsító anyagok (por- és gázexpozíció) belégzése is (16). Több szerző a kén-dioxid (17), nitrogén-dioxid (17, 18, 19), szén-monoxid (18, 19) és ózon (13, 14, 20) légköri koncentrációjának növekedését is felelőssé teszi az egyre növekvő COPD-s incidenciáért. Egyes tanulmányok szerint rizikó tényezőt jelenthet a COPD kialakulása szempontjából a prenatális dohányzás (21), valamint a rossz szociális helyzet is (22).

### **2.1.4. A COPD genetikai háttere**

A COPD kialakulásának hátterében poligénes öröklődés áll, a genom számos régiójában mutattak ki genetikai asszociációkat. A COPD genetikai hátterét feltáró vizsgálatok jelentős része az  $\alpha$ 1-antitripszin ( $\alpha$ 1-AT) hiánnyal foglalkozik. Az  $\alpha$ 1-AT enzim hiánya recesszíven

öröklődik, és súlyos veleszületett megbetegedéseket (májzsugor és emfizéma) okozhat (23). Az emfizéma patomechanizmusát leíró proteáz/ anti-proteáz elmélet szerint az  $\alpha_1$ -AT mennyiségének csökkenése vagy hiánya a neutrofilejtek migrációjakor felszabaduló proteolitikus enzimek (leginkább a neutrofil elasztáz) aktiválódását eredményezi, ami az elasztin nevű fehérje degradációján keresztül gyors progressziójú, rossz prognózisú panacinaris emfizémához vezet, általában már fiatal, azaz 30-40 éves korban. Az emfizémás esetek 1-5 %-ka vezethető vissza  $\alpha_1$ -AT hiányra.

### 2.1.5. A COPD diagnosztikája

A COPD diagnózisának felállítása a megfelelő tünetek (köhögés, rendszeres köpet ürítés, nehézlégzés) és a kockázati faktorok jelenlétén, valamint a légúti obstrukció objektív kimutatásán alapul, melyet a légzésfunkciós vizsgálattal igazolnak. A Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) nemzetközi dokumentumát, valamint a vonatkozó hazai ajánlásokat (24, 25) figyelembe véve a COPD stádiumbeosztását és az egyes stádiumokban javasolt farmakológiai és egyéb kezelési lehetőségeket az 1. táblázat mutatja be.

#### 1. táblázat. A COPD stádiumbeosztása és az egyes stádiumokban javasolt kezelési lehetőségek

FVC: forszírozott vitál kapacitás, FEV<sub>1</sub>: forszírozott kilégzési térfogat 1 másodperc alatt

I. Enyhe	II. Középsúlyos	III. Súlyos	IV. Nagyon súlyos
FEV <sub>1</sub> /FVC < 70%			
FEV <sub>1</sub> >80 %	50 % < FEV <sub>1</sub> < 80 %	30 % < FEV <sub>1</sub> < 50 %	FEV <sub>1</sub> < 30 %
Tünetekkel, vagy tünetek nélkül	Tünetekkel, vagy tünetek nélkül	Tünetekkel, vagy tünetek nélkül	Chr. resp. insuff., vagy jobb kamra elégtelenség
<b>Az egyes súlyossági lépcsőkhöz tartozó ajánlott kezelések</b>			
Dohányzásról történő leszokás			
Rizikó tényező kerülése, influenza vakcináció			
Szükség esetén rövid hatású béta agonista, anticholinerg szerek			
Egy vagy több hosszú hatású bronchodilatátor, hosszú hatású béta agonisták, hosszú hatású anticholinerg szer, theophyllin rehabilitáció			
		Inhalációs kortikoszteroid ismétlődő akut exacerbációkkal	
		Házi oxigénkezelés resp. insuff. esetén, vagy sebészi kezelés	

A GOLD fent bemutatott stádiumbeosztását 2011-ben átalakították, az állapotfelmérés szempontjai új elemekkel bővültek. Az újabb felosztás ugyan megtartotta a FEV<sub>1</sub> alapján való besorolást, de ezen kívül figyelembe veszi a leggyakoribb klinikai tüneteket (CAT kérdőív), a diszpnóe súlyosságát (mMRC kérdőív) és az akut exacerbáció kockázatát is (2. táblázat).

2. táblázat. Az új, kombinált GOLD állapotfelmérés COPD-ben  
mMRC: modified Medical R Council, CAT: COPD Assessment Test

Légúti áramláskorlátozottság	GOLD stádium FEV <sub>1</sub> alapján	4	<b>C</b>	<b>D</b>	Az akut exacerbációk kockázata	
		3				
		2	<b>A</b>	<b>B</b>		évi 1
		1				évi 0
		mMRC 0-1	mMRC ≥ 2			
		CAT < 10	CAT ≥ 10			

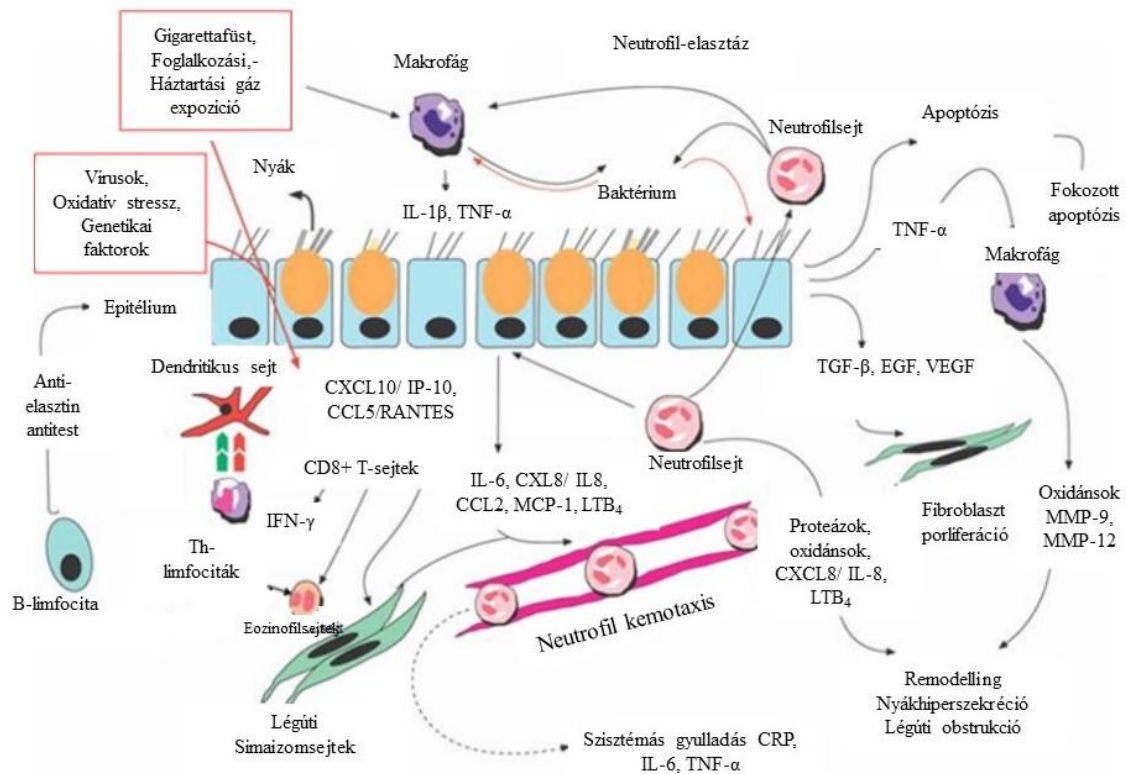
## 2.2. A COPD patomechanizmusa

Bár a COPD patomechanizmusában a celluláris és molekuláris folyamatok még napjainkban sem teljesen feltártak, az kétségtelen, hogy a kórkép kialakulásában három kórfolyamat, úgymint a krónikus légúti gyulladás, a proteáz/anti-proteáz egyensúly felbomlása, valamint az oxidatív stressz meghatározó szerepet játszanak.

### 2.2.1. A krónikus gyulladás kialakulása COPD-ben

A COPD patomechanizmusának fő eleme a komplex gyulladásos válaszreakció, amelyben számos sejt és mediátor vesz részt. A gyulladásos válaszreakció kóros fokozódásának felismerése *C. Fletcher* és *R. Peto* nevéhez fűződik, akik 1977-ben a kórosan reagáló személyeket „dohányfüstre érzékenyeknek” nevezték (26). E betegek közös jellemzője az volt, hogy a dohányzás és egyéb környezeti irritánsok belégzése következtében a légutakban és a tüdőparenchymában kialakuló gyulladásos folyamat a dohányzás abbahagyása után sem

szűnik meg. A proximális légutak gyulladása a krónikus bronchitis tüneteinek kialakulásához, míg a disztális légutak és parenchima gyulladása, illetve destrukciója emfizémához vezet.



**1. ábra. A dohányfüst inhalációhoz kötődő légúti gyulladási és sejtes mechanizmusok COPD-ben (Chung és Adcock [27] munkája alapján módosítva)**

Ab: antitest, Th: T-helper limfocita, MHC: major hisztokompatibilitási komplex, TCR: T-sejt receptor, CXCL: CXC kemokin ligand, IP-10: interferon (IFN)- $\gamma$ -indukálta protein-10, CCL: CC kemokin ligand, IL: interleukin, TNF- $\alpha$ : tumor nekrozis faktor- $\alpha$ , MCP: monocita kemotaktikus protein, LT: leukotrién, CRP: C-reaktív protein, TGF- $\beta$ : transzformáló növekedési faktor-  $\beta$ , EGF: epidermális növekedési faktor, VEGF: vaszkuláris endoteliális növekedési faktor, MMP: mátrix-metalloproteináz

A dohányfüst és más irritánsok a tracheobronchiális rendszer felszíni sejtjeit stimulálva neutrofilejtes dominanciával járó gyulladást hoznak létre a légutakban (1. ábra). Az epitelsejtek sejt felszíni molekulák expressziója útján irányítják a fehérvérsejtek migrációját, valamint citokinek által szabályozzák a gyulladási választ. A betegség progressziójával a neutrofilejtek mellett emelkedik a makrofágok és T-limfociták száma, míg súlyosabb esetben a B-limfociták száma is. Az aktivált makrofágok kemotaktikus faktorokat (interleukin-8 [IL-8], leukotrién B4 [LTB<sub>4</sub>]), kemokinek szabadítanak fel, amelyek további neutrofilejteket vonzanak a tüdőbe. A provokatív stimulusra kialakuló LTB<sub>4</sub>-szekréció következtében az aktivált makrofágokból TNF- $\alpha$ , IL-1, illetve proteázok szabadulnak fel, ugyanakkor a

neutrofilesejtekből szekretálódó neutrofil-elasztáz (NE) hatására az epitelsejtekből további kemoattraktánsok aktiválódnak (IL-8, granulocita-makrofág kolónia stimuláló faktor [GM-CSF], NO, LTB<sub>4</sub>), amelyek így hozzájárulnak a folyamatos gyulladás fenntartásához. A gyulladás kialakulásának másik fontos mozzanata, hogy a leukocita-endoteliális adhéziós molekulák (pl. intercelluláris adhéziós molekula-1 [ICAM-1], endoteliális leukocita adhéziós molekula-1 [ELAM-1]) expressziója fokozódik az endotél- és epitelsejtek felszínén. A leukocitákból NE, a makrofágokból elasztáz, katepszin B és L, a neutrofilesejtekből proteináz 3 és katepszin G proteázok halmozódnak fel a tüdőben. A masszív neutrofilejt infiltráció következtében kialakuló proteáz termelés meghaladja az anti-proteáz aktivitással rendelkező molekulák kapacitását, ami a proteáz/anti-proteáz egyensúly eltolódásához és a kötőszövetes elemek lebomlásához, valamint emfizéma kialakulásához vezet. A folyamathoz fokozott nyák szekréció is társul, valamint a citotoxikus (CD8+) T-sejtek által termelt proteázok szintén hozzájárulhatnak az alveoláris fal destrukciójához.

A COPD-t kísérő légúti gyulladás együtt jár a gyulladás szisztémás megjelenésével is, amit jól mutat, hogy számos gyulladási marker emelkedése mutatható ki a betegek véréből (28). *Augusti és mtsai.* a közelmúltban azt igazolták, hogy a tartós szisztémás gyulladással rendelkező fenotípus rosszabb klinikai prognózissal jár (29). A fennálló szisztémás gyulladás hozzájárulhat a COPD-s betegekben gyakran előforduló társbetegségek (ischaemiás szívbetegség, hipertónia, depresszió) magas prevalenciájához is (30, 31).

### **2.2.1.1. Neutrofilesejtek**

A neutrofilesejteknek a COPD patofiziológiájában betöltött szerepe évtizedek óta ismert, miként az is, hogy a proteáz/anti-proteáz egyensúly felborulásának hátterében elsősorban a neutrofilesejtek működése áll (32). Mind a stabil, mind az exacerbációban lévő COPD-s betegekből származó köpet (33) és BAL folyadék (34, 35) nagy mennyiségben tartalmaz neutrofilesejteket. A neutrofilesejtek az immunrendszert károsító oxidatív metabolitok, citokinek, lipid mediátorok, antibakteriális peptidok, valamint proteázok fő forrásai (36). A neutrofilesejtek által felszabadított NE és reaktív oxigén szabadgyökök fokozzák az epitelsejtek mucin szekrécióját és elősegítik az alveoláris struktúra destrukcióját is (37).

### **2.2.1.2. Makrofágok**

Az alveoláris makrofágok száma és az emfizémás tüdőkárosodások súlyossága között általában szoros korreláció áll fent, amint ezt számos tanulmány is igazolta (38). A dohányzás hatására a makrofágok száma emelkedik a bronchiális mirigyeket körülvevő szubmukózában,

valamint a kislégutakban az epitelsejtek körül (39). A makrofágok dohányfüst hatására aktiválódva nagy mennyiségben szekretálnak oxidatív szabadgyököket, kemotaktikus faktorokat, gyulladáshoz citokineket, simaizom konstriktort indukáló faktorokat és különböző extracelluláris mátrix (ECM) fehérjéket. Bár a makrofágok szerepe a nyák szekréció fokozásában is igazolt, a legtöbb tanulmány mégis e sejtek szerepét elsősorban emfizémában emeli ki, mivel a makrofágok mátrix-metalloproteináz (MMP) termelése jelentősen hozzájárul a szövetelhaláshoz a COPD ezen fenotípusában (40).

### **2.2.1.3. T-limfociták**

A neutrofilek mellett a COPD-re jellemző gyulladás kialakulásában a CD8<sup>+</sup> T-sejtek játszik a fő szerepet (41). Pulmonalis emfizémában a CD8<sup>+</sup> T-sejtek kimutathatóak az alveolusokban, a kis és a nagy légutak falában (42), valamint a perifériális légutakat körülvevő simaizomsejtek környezetében is (43). A CD8<sup>+</sup> T-sejtek apoptózist indukáló hatásukkal, valamint a fertőzött sejtek elpusztításával vesznek részt a COPD patomechanizmusában (44).

A CD8<sup>+</sup> T-limfociták COPD-ben betöltött szerepét számos *in vitro* és *in vivo* kísérlettel igazolták. Így például állatkísérletek során bizonyították, hogy a CD8<sup>+</sup> T-sejtek IFN- $\gamma$ -t expresszálnak, ami hozzájárul az emfizéma kialakulásához, illetve hogy bizonyos vírusokkal fertőzött egereknél a CD8<sup>+</sup> T-sejtek fokozott expressziója letális tüdőkárosodáshoz vezet (45). Bár e tüdőkárosodások patológiai háttere még nincs teljesen feltárva, a feltevések szerint a CD8<sup>+</sup> T-sejtek által termelt lítikus anyagok, úgymint a granzim és a perforin felelősek a tüdőben bekövetkező változásokért (46).

Bár a CD4<sup>+</sup> T-sejtek elsősorban az asztmás kórképekben játszanak kóros szerepet, e sejtek emelkedett számban vannak jelen a COPD-s betegek légutaiban is (34). A CD4<sup>+</sup> T-sejtek számos pro-inflammatorikus (TNF- $\alpha$ , GM-CSF, IFN- $\gamma$  és IL-2) és Th2-típusú citokint (IL-4, IL-5 és IL-6) termelnek, amelyek hozzájárulnak a COPD-re jellemző légúti gyulladáshoz és súlyosbodásához (47). Egyes hipotézisek szerint a CD4<sup>+</sup> T-limfocitáknak hasonlóan fontos szerepük lehet az emfizéma kialakításában és fenntartásában is, mint a CD8<sup>+</sup> T-sejteknek, mivel fenntartják a CD8<sup>+</sup> T-sejtekhez kötődő memória funkciót és egyben biztosítják e sejtek hosszabb túlélését is (47).

### **2.2.1.4. Természetes ölüsejtek**

A citotoxikus limfociták speciális populációját alkotják a természetes ölüsejtek (NK) (48). Az NK sejteknek a COPD-ben betöltött szerepe a CD8<sup>+</sup> T-sejtekhez képest kevésbé ismert, bár

több vizsgálatban is rámutatnak arra, hogy e sejtek is emelkedett számban vannak jelen a dohányos COPD-s betegek légúti szöveteiben (49). Egyes megfigyelések szerint az NK sejtek számának emelkedése az ismételt bakteriális és/vagy virális fertőzések hatására következik be (50).

#### **2.2.1.5. Eozinofilsejtek, hízósejtek**

Az eozinofilsejtek és hízósejtek gyulladást szabályozó szerepe az asztmában közismert. A COPD típusos eseteiben az eozinofilsejtek légúti aránya igen alacsony (<1%). Az eozinofilsejtszám emelkedésről ellentmondó megfigyeléseket találunk az irodalomban: több szerző emelkedett eozinofilsetjszámot talált stabil betegek kis alcsoportjának a köpetében (51), BAL folyadékában (52) és légúti szövetmintáiban (53), míg mások nem találtak ilyen jellegű változásokat COPD-s betegekben (54). Egyes közlemények arról is beszámolnak, hogy stabil állapotban csak olyan eozinofilsejtek mutathatóak ki COPD-s betegekben, amelyek inaktívak (55). Az eozinofilsejtek száma COPD exacerbációban megemelkedhet, és akár meg is közelítheti az asztmában észlelhető mértéket (56).

Több vizsgálat is igazolta, hogy a köpet eozinofiliával (>2-3%) rendelkező és nem rendelkező COPD-s betegek klinikai megjelenése között szignifikáns különbséget lehet észlelni. Az elmúlt években a köpet eozinofiliát összefüggésbe hozták a kortikoszteroidokra való fokozottabb válaszkészséggel, azaz az eozinofilsejtek jelenléte a köpetben valószínűsítheti a későbbi szteroid kezelés hatékonyságát (51, 57, 58). A kortikoszteroidokra adott gyengébb válaszkészséget ugyanakkor az eozinofilsejtszámok alacsony száma jelzi, amelynek a háttérben molekuláris szempontból a hiszton-deacetiláz (HDAC) enzimsalád inaktiválódása áll. A COPD-ben fennálló oxidatív stressz hatására peroxinitrit (ONOO-) képződik, amely az HDAC2 enzimsaládot gátolja, így az egyensúly a hiszton fehérjék acetilálódása felé tolódik el, és a szteroidok gyulladáscsökkentő hatásukat nem vagy csak korlátozott mértékben képesek kifejteni (59).

A hízósejtek vonatkozásában több munkacsoport emelkedett sejtszámot mutatott ki COPD-s betegek légútjaiban (60). A hízósejtek neutrofil kemotaktikus faktorok, valamint triptáz és elasztáz enzimek termelése révén hozzájárulnak a COPD-t jellemző szöveti károsodások kialakulásához (61). *Pesci és mtsai.* kimutatták, hogy a hízósejtek degranulációjának a mértéke a krónikus bronchitises betegek bronchiális nyálkahártyájában sokkal nagyobb mértékű, mint az egészséges kontroll személyekben (62). Más vizsgálatokban ugyanakkor nem találtak bizonyítékot a hízósejtek túlműködésére COPD-s betegekben (63).



### 2.2.2. Az oxidatív stressz szerepe COPD-ben

Oxidatív stressz alatt azt a molekuláris folyamatot értjük, amikor a szervezetben reaktív oxigén szabadgyökök (ROS) halmozódnak fel, amelyek károsítják a sejteket felépítő alkotóelemeket (DNS, fehérjék, lipidek). Az oxidatív stressz fontos szerepet játszik számos akut és krónikus betegség (pl. daganatok, kardiovaszkuláris, neurodegeneratív és pulmonológiai kórképek), valamint az öregedés patomechanizmusában. Az oxidatív stressz hozzájárul gyulladásozó gének aktivációjához, anti-proteázok inaktiválásához, a plazmaexudáció és a bronchialis nyákelválasztás fokozásához is, amely folyamatok együttesen a COPD patomechanizmusában is érintettek.

Általában elmondható, hogy az oxidatív stressz kialakulását belső és külső környezeti tényezők egyaránt befolyásolják. A ROS-ok exogén forrásai között szerepelnek légszennyező anyagok, ipari szennyeződések, nanopartikulumok, kipufogó gázok és a dohányfüst expozíció (64, 65). Endogén úton ROS-ok szabadulhatnak fel a mitokondriumból, a plazmamembránból, az endoplazmatikus retikulumból, valamint a peroxisómából is (66). Mivel a dohányfüst több mint 6000 kémiai összetevőt – köztük számos szabadgyököt is – tartalmaz, ezért a COPD patomechanizmusának egyik meghatározó eleme a dohányfüstből származó oxidáns anyagok felhalmozódása a tüdőben (67). A cigarettafüstben legnagyobb mennyiségben fellelhető szabadgyök természetű molekulák az alkil-peroxil gyökök csoportjába tartoznak, bár a szintén szabadgyök tulajdonságú nitrogén-monoxid (NO) is relatíve nagy koncentrációban van jelen a dohányfüstben (68). A szervezetben keletkező ROS-ok között az egyik legreakcióképesebb a hidroxilgyök (HO<sup>•</sup>), amely leggyakrabban az ún. *Fenton* és *Haber-Weiss reakciók* során keletkezik. A felszabaduló, rendkívül agresszív HO<sup>•</sup> molekula ezt követően szerves molekulákkal reagálva, több lépésben stabilizálódik, károsítva ezáltal számos fehérje, DNS és membránlipid biológiai funkcióját és tulajdonságát (69). A sejtekben a ROS-ok felszabadulása különböző enzimrendszerek – így például a nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (NADPH)-oxidáz (NOX), a xantin-oxidáz (XOX) vagy a hem-peroxidázok – működéséhez is kapcsolódik. Egyes megfigyelések szerint ezek az enzimek emelkedett koncentrációban mutathatók ki COPD-s betegek BAL folyadékában (70, 71).

A ROS-ok indirekt módon számos gyulladásozó mediátor felszabadulását serkentik és fokozzák a neutrofil és más gyulladásozó sejteknek a vérpályából a tüdő szöveteibe történő migrációját (72). Több vizsgálatban is igazolták, hogy a gyulladásozó folyamatokban szerepet játszó citokinek (pl. IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-6) transzkripciójájért felelős transzkripciósozó faktorok (nukleáris faktor- $\kappa$ B [NF- $\kappa$ B] és aktivátor protein-1 [AP-1]) oxidatív stressz hatására fokozott

aktivitást mutatnak. Az NF- $\kappa$ B transzkripció faktor aktiválásán keresztül további gyulladáso gének átírása is fokozódhat.

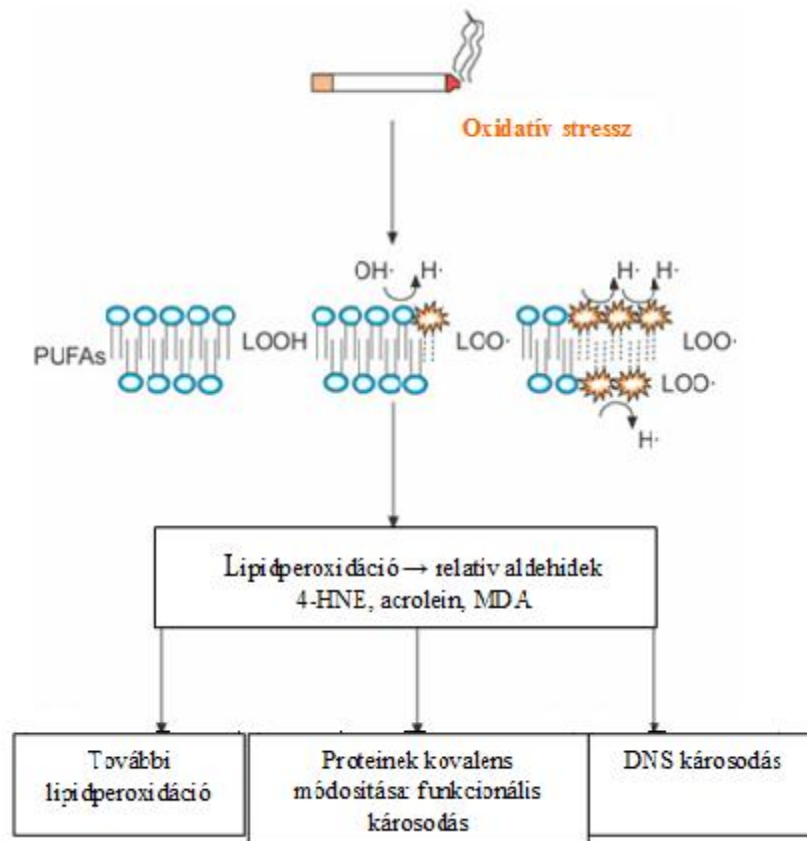
Az oxidatív stressz hatása nemcsak a stabil, hanem az akut exacerbációt mutató COPD-s betegekben is tettenérhető. Így például COPD exacerbációban szenvedő betegekből származó limfocitákban az NF- $\kappa$ B szintje magasabb, mint stabil állapotú betegekben (35). Számos vizsgálat mutatott ki továbbá korrelációt a magas ROS koncentráció és a betegség klinikai változói között. Összefüggést találtak a dohányzás intenzitása és az aktivált neutrofilejtek szuperoxid anion ( $O_2^{\cdot-}$ ), valamint mieloperoxidáz (MPO) szekeációja között exacerbációban lévő betegekben (71, 73). Fokozott oxidatív stresszre utal továbbá az alveoláris makrofágok emelkedett hidrogén-peroxid ( $H_2O_2$ ) és  $O_2^{\cdot-}$  termelése is (74).

### 2.2.3. A lipidperoxidáció folyamata COPD-ben

A ROS-ok felhalmozódásának egyik következménye a lipidperoxidáció, melynek során a sejtmembránok felépítésében résztvevő többszörösen telítetlen zsírsavak oxidálódnak, ami a sejtmembránok súlyos károsodását okozza.

A lipidperoxidáció fő célpontjai a glikolipidek, a foszfolipidek, valamint a koleszterin. A lipidperoxidáció következtében a membránhoz kötött receptorok és enzimek inaktiválódnak, a sejtek permeabilitása fokozódik. Az ROS-ok és a telítetlen lipidek reakciójának eredményeként a sejtmembrán foszfolipidjeiből a megfelelő lipid hidroperoxidok (LOOH) keletkeznek, melyek lebomlása során aldehidek, így például malondialdehid (MDA), hexanal, heptanal, nonanal, akrolein, 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) és 4-hidroxi-2-hexenal (4-HHE) keletkezik. Az irodalmi adatok szerint e termékek közül az MDA a legmutagénebb, míg a 4-HNE az egyik legtoxikusabb (75). Emellett a lipidperoxidáció során felszabaduló termékek fokozzák a pro-inflammatorikus citokineket és kemokineket kódoló gének transzkripcióját is, ami a gyulladás súlyosbodását eredményezi.

A lipidperoxidáció folyamata három szakaszra osztható. Elkülönítjük az iniciáció, a propagáció, valamint a termináció szakaszát. Az iniciációs szakaszban a prooxidánsok hidrogénelvonás révén C-központú lipid gyököt hoznak létre. Molekuláris átrendeződés után a lipid gyök stabilizálódik és egy konjugált dién jön létre. A propagációs szakaszban a lipid gyök gyors reakcióba lép a molekuláris oxigénnel, és az így keletkező lipid-peroxi gyök újabb hidrogént von el egy másik lipid molekuláról, ezáltal létrehozva egy újabb lipid gyököt, valamint lipid hidroperoxidot. A terminációs szakaszban az anti-oxidánsok egy hidrogén atomot adnak a lipid-peroxi gyöknek, amelyből ezáltal már nem gyök formájú termék keletkezik (2. ábra).



2. ábra. Az oxidatív stressz által kiváltott lipid peroxidáció folyamata és hatásai (Chung és Adcock alapján módosítva [22])

PUFA: többszörösen telítetlen zsírsav, LOOH: lipid hidroperoxid, 4-HNE: 4-hidroxi-2-nonenal, MDA: malondialdehid

#### 2.2.4. Anti-oxidáns rendszerek COPD-ben

A lipidperoxidáció a sejtek különböző válaszreakcióját idézheti elő. Fiziológias körülmények között az emlősök szervezetében számos olyan anti-oxidáns rendszer működik, amelyek képesek a termelődő ROS-okat és a lipidperoxidáció során keletkező egyéb, potenciálisan káros termékeket inaktiválni vagy kevésbé reaktív molekulává átalakítani. Ilyen anti-oxidáns hatású molekulák például a C- és E-vitaminok, karotinoidok, polifenolok, fémkötő vegyületek, valamint különböző enzimek, mint például a glutation peroxidáz (GSH), a kataláz (CAT), a szuperoxid-dizmutáz (SOD). Oxidatív stressz során az oxidáns és az anti-oxidáns anyagok egyensúlya az előzőek javára tolódik el, ami a sejtek károsodásához és apoptózisához vezet.

A felsorolt anti-oxidáns molekulák koncentrációját és COPD-ben betöltött szerepét számos vizsgálatban tanulmányozták. Így például *Dhakar és mtsai.* az egészségesekénél magasabb

MDA koncentrációt és alacsonyabb E-vitamin szintet és CAT enzimaktivitást mértek COPD-s betegek vérplazmájában (76). Más vizsgálatokban arról számoltak be, hogy COPD exacerbáció kialakulása során az A-vitamin szérum szintje csökken, és ez a koncentráció-csökkenés az exacerbáció kórházi kezelése során sem normalizálódik (77).

### 2.2.5. A COPD exacerbációja

Amennyiben COPD-s beteg panaszai (dyspnoe, köhögés és/vagy köpetürítés) a mindennapi ingadozást meghaladó mértékűek és ez legalább két napig áll fenn, valamint a tünetek hirtelen súlyosbodnak, ami az alapbetegség fenntartó kezelésének megváltoztatását is szükségessé teszi, COPD akut exacerbációról beszélünk. A COPD exacerbáció a légzésfunkciós értékek csökkenése mellett fokozott légúti gyulladással jellemezhető állapot (78).

Az akut exacerbációk háttérében általában a hörgőrendszer bakteriális vagy virális fertőzései vagy légszennyezés állnak, bár az esetek kb. 1/3-ában a pontos kiváltó okot nem sikerül azonosítani. A virális fertőzések kimutatása gyakoribbá vált a polimeráz-láncreakció (PCR) módszerrel történő kimutatás megjelenése óta. Míg korábban a szerológiai vizsgálatok adatai alapján hozzávetőlegesen 20%-ra becsülték a vírus infekciók arányát az exacerbációk háttérében (79), addig a PCR technikával történő meghatározással az esetek 40%-ában valószínűsíthető virális kórokozó a folyamat háttérében (80). Az exacerbációs epizódok alatt az esetek 23%-ában rhinovírusok detektálhatóak, ugyanez a kórokozó csoport a stabil COPD-s betegekben mindössze 1%-ban mutatható ki (81). A virális exacerbációk kisebb hányadánál más, ritkább légúti vírusok (respiratory syncytial vírus [82], H1N1 [83], H3N2 [84], picorna- és coronavírusok [80]) etiológiai szerepe merül fel.

A klinikai gyakorlatban nagyobb jelentőségű, ha az exacerbációk háttérében akut bakteriális fertőzést sikerül kimutatni. Egyes irodalmi adatok szerint a COPD-s betegek 25-50%-ánál kimutatható az alsó légutak bakteriális fertőzöttsége (kolonizációja), ami jól korrelál a betegség súlyosságával és a dohányzással (85). A légutak krónikus bakteriális fertőzése hozzájárulhat az epitélisejtek károsodásához, a mukociliáris clearance gátlásához, a fokozott szubmukozális érpermeabilitáshoz és a gyulladós sejtek fokozott infiltrációjához, és egyben akut exacerbációt is előidézhethet.

Közismert, hogy a leggyakoribb baktériumok, amelyek COPD exacerbációban kóroki szerepet játszanak, a *Haemophilus influenzae*, a *Streptococcus pneumoniae* és a *Moraxella catarrhalis* (86). Súlyosabb esetekben *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas* és más Gram negatív baktériumok etiológiai szerepe is igazolható (87, 88).

Az exacerbációk háttérében a fent említett etiológiai faktorok mellett egyéb tényezők is állhatnak. Egy vizsgálatban 1016 COPD exacerbációs eset elemzése során 51%-ban állapítottak meg akut fertőzést, 26%-ban szívelégtelenséget, míg az esetek 30%-ában az exacerbációt kiváltó ok ismeretlen maradt (89). Epidemiológiai kutatások bizonyítják, hogy az exacerbációkra való hajlamot, illetve a mortalitást fokozhatják légköri szennyező gázok (kén-dioxid, ózon, nitrogén-dioxid) mennyiségének növekedése is (17).

### **2.3. Biomarkerek meghatározása különböző biológiai mintákban**

A biomarkerek fogalmát 2011-ben a *The National Institute of Health* az alábbiak szerint definiálta: a biomarkerek objektíven mérhető és becsülhető biológiai paraméterek vagy tulajdonságok, amelyek alkalmasak lehetnek egy fiziológiás vagy patológiás folyamat vagy terápiás kezelésre adott válaszreakció nyomonkövetésére. A kilégtett biomarkerek jelentőségét mutatja, hogy az Európai Tüdőgyógyász Társaság (ERS) 2010-ben egy teljes monográfiát jelentetett meg a kilégtett biomarkerekkel kapcsolatos kutatási eredmények ismertetésére (90).

A biomarkereket farmakodinámiás, prognosztikus és prediktív biomarkerekre oszthatjuk. A COPD kórfolyamatában szerepet játszó gyulladási mediátorok mint lehetséges biomarkerek az elmúlt évtized során a tudományos érdeklődés középpontjába kerültek (91, 92). A biomarkerek a diagnózis felállításában, a fenotipizálásban, a monitorozásban vagy egy adott terápiára (pl. szteroidokra) való válaszkészség megítélésében lehetnek a klinikusok segítségére. Biomarkerek a szérumban vagy a vizeletben is detektálhatók, azonban szemben a légúti mintákkal, az így kapott adatok nem közvetlenül a tüdőben zajló folyamatokról adnak információt.

#### **2.3.1. Szisztémás minták, mint a biomarkerek lehetséges forrásai**

A perifériás vérből történő mediátor meghatározás a klinikumban leggyakrabban alkalmazott eljárás, azonban a vérből történő meghatározáskor tekintettel kell lenni arra, hogy egy-egy egyénben párhuzamosan több betegség is előfordulhat, melynek következtében a különböző patofiziológiai folyamatok markerei együttesen jelennek meg a vérben. A vizeletből is lehet gyulladási mediátorokat meghatározni, és úgy tűnik, hogy ennek az emfizémás betegek esetében lehet jelentősége. Emfizémásokban ugyanis a fokozott proteolízis miatt emelkedett desmosin koncentráció mutatható ki a vizeletből (93).

Egy közelmúltban közölt metaanalízis alapján a vérből kimutatható biomarkerek általában nem mutatnak összefüggést a COPD klasszikus, FEV<sub>1</sub>-alapú stádiumbeosztásával (94). Viszonylag szenzitív, vérből könnyen mérhető és a klinikai gyakorlatban is széles körben használt gyulladási marker a C-reaktív protein (CRP), ugyanakkor még az exacerbációban lévő COPD-s betegek 50%-ában is normál CRP szint mutatható ki (95). Több szerző véleménye, hogy a CRP-emelkedés és az exacerbáció között akkor figyelhető meg számottevő összefüggés, ha a háttérben bakteriális fertőzés áll. Bár mind a perifériás vér, mind a vizelet könnyen hozzáférhető biológiai minta, hátrányuk, hogy csak közvetett információt adnak a szervspecifikus, légutakban zajló gyulladási folyamatokról.

### **2.3.2. Légúti minták, mint a biomarkerek lehetséges forrásai**

Bár a légúti gyulladás kimutatására a BAL vagy a transbronchialis biopszia is alkalmas lehet, e vizsgálmódszerek nagy hátránya, hogy mint *invazív* beavatkozások szövödményekkel járhatnak és csak korlátozott számban végezhetőek, így a rutin klinikai gyakorlatban a gyulladási folyamatok vizsgálatára nem terjedtek el.

Az utóbbi években a pulmonológiai kutatások terén egyre inkább előtérbe kerültek a légutakból *non-invazív* módon vizsgálati mintát biztosító mintavételi eljárások, úgymint az indukált köpet vagy az EBC gyűjtése (92, 96). E módszerek előnye, hogy könnyebben kivitelezhetőek, a betegek számára sem jelentenek különösebb megterhelést és szükség esetén rövid időn belül ismételtelők is. Hátrányuk, hogy a használatukkal nyert adatok általában nagy variabilitást mutatnak, sok esetben a mérés technika sincs megfelelően standardizálva, így a kapott eredmények kiértékelése egyelőre kutatási fázisban van.

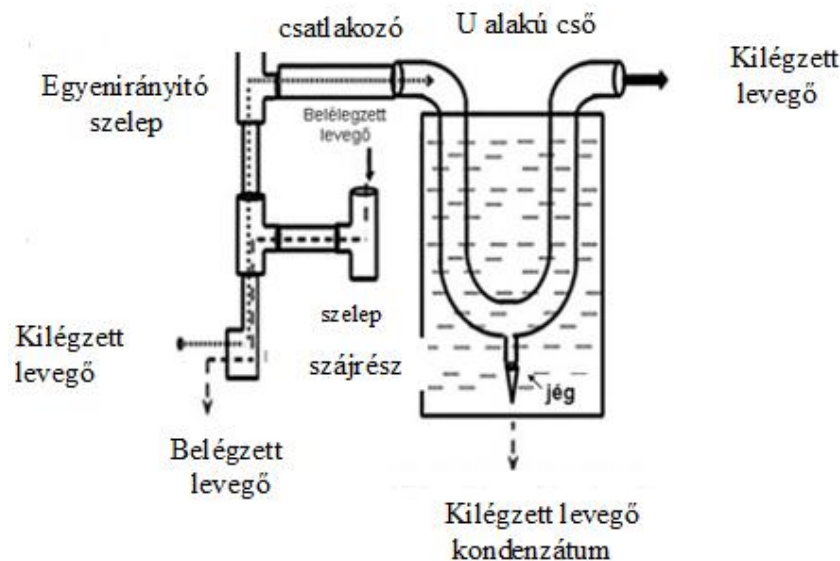
#### **2.3.2.1. Bronchoalveolaris lavage**

A bronchoszkóppal elvégzett BAL során főleg a perifériás légutakból nyerhetünk mintát (97). A BAL folyadékból meghatározhatóak gyulladási mediátorok, ezek mennyisége, valamint a gyulladási folyamatokban résztvevő sejtek aránya. Mivel az eljárás *invazív* és csak meghatározott indikációk alapján végezhető, széleskörű, kutatási céllal végzett biomarker vizsgálatokra nem alkalmas.

#### **2.3.2.2. Kilégzett levegő kondenzátum**

Az EBC gyűjtése azon a jelenségen alapul, hogy a tüdőből kilégzett levegő páratartalma egy előzetesen lehűtött gyűjtőcső falán lecsapódik (3. ábra). A vizsgálmódszer a 90-es évek közepén kezdett elterjedni a kutató laboratóriumokban, az Amerikai Tüdőgyógyász Társaság

(ATS) az ERS-sel közösen 2005-ben jelentetett meg szakmai ajánlást az EBC gyűjtés módszertani kérdéseiről (98). Az EBC-ben számos, a légúti betegségek patomechanizmusában szerepet játszó mediátor detektálható. A módszer diagnosztikai felhasználása azon alapul, hogy e mediátorok koncentrációja a betegekben eltérhet az egészségesekben mért értékektől. Az EBC gyűjtésének óriási előnye, hogy a beteg számára nem megterhelő mintavételi módszer, és gyermekeknél, illetve súlyosabb állapotban lévő felnőtt betegeknek is elvégezhető, akiknél amúgy más, invazívabb módszerek alkalmazása nem jöhetne szóba (72, 99). A gyűjtés szükség esetén, naponta akár többször is ismételhető, nincs hatása a légutakban zajló patofiziológiai folyamatokra. A jelenleg forgalomban lévő kondenzáló készülékekkel 10-15 perc alatt 1-3 mL kondenzátum gyűjthető. Az eljárás során a beteg egy szeleppel ellátott szájrészen keresztül egyenletes légzés mellett lélegzik a kondenzáló eszközbe. A kilégzett levegőpára a mintagyűjtő cső falán és a cső végéhez csatlakoztatott, hűtött műanyag tartályban csapódik le.



3. ábra. A kilégzett levegő kondenzátum gyűjtésének elve (Augusto és mtsai. alapján módosítva [100])

Az EBC gyűjtésének azonban számos módszertani nehézsége van. Az EBC-ben mért mediátorok mennyiségét (koncentrációját) befolyásolhatja a beteg életkora, a mintavételi eszköz típusa, a mintavétel módja és a mediátor mérésére alkalmazott analitikai módszerek különbözősége. Sokat vitatott, hogy a minták nyál kontaminációja milyen mértékben mutatható ki és befolyásolja-e a kapott eredményeket. Mindezen tényezők miatt a mediátorok

koncentrációi általában nagy egyéni variabilitást mutatnak az EBC-ben (72). A mérés klinikumban történő alkalmazását tovább nehezíti, hogy egyéb technikai faktorok, mint például a kilégzési áramlási sebesség, a légúti átmérő, a környezeti páratartalom szintén hatással lehet a különböző mediátorok szintjére.

Az EBC biomarkerek koncentrációjának mérése során további komoly nehézséget jelent, hogy a mediátorok a mintában sokszor igen kis koncentrációban vannak jelen, és sok esetben az analitikai módszerek alsó detekciós limitjének közelében lehet csak mérni a vizsgált biomarkert. A felsorolt nehézségek miatt az EBC-ből való biomarker mérések klinikai gyakorlatban történő alkalmazása egyelőre nem várható.

### **2.3.2.3. Köpet**

A köpet nyákot, légúti sejteket és különböző, általuk termelt anyagokat tartalmazó bio-gél, amely összetételét tekintve jól reprezentálja a légutakban zajló patológiás folyamatokat, ezért alkalmas lehet a légúti gyulladás vizsgálatára. A mintavétel módja alapján megkülönböztetünk spontán és indukált köpetet. A biomarkerek meghatározása szempontjából nagy előny, hogy a köpet felülúszójában a mediátorok koncentrációja az EBC-ben mért értékeknek többszöröse lehet.

A köpetgyűjtés technikailag legegyszerűbb és a beteg számára is a legkevésbé megterhelő formája a spontán köpet gyűjtése, amely valójában nem különbözik az egyéb, mikrobiológiai célokra történő rutin köpetleadástól. Spontán köpet olyan betegektől gyűjthető, akikben fokozott légúti váladékképződéssel járó kórfolyamatok zajlanak. A spontán köpetminta nagyobb arányban tartalmazhat elhalt sejteket, amelyek befolyásolhatják a sejtprofil és a mediátorok koncentrációját.

A köpetindukció *szemi-invazív* légúti mintavételi eljárás, melynek során hipertóniás (2-4%) sóoldat ultrahangos porlasztóval történő belélegzésével segítjük elő a köpet felszakadását és az expectorációt. A köpetindukciót mint eljárást évtizedekkel korábban tumorok diagnosztizálása céljából alkalmazták először (101). Az ERS 2002-ben jelentetett meg szakmai ajánlást a köpetindukció és köpetfeldolgozás módszerére (102). Az indukált köpet eredetét tekintve az alsó légutakból származik, így sejtes fázisa nagy mennyiségben tartalmaz makrofágokat az egyéb gyulladásos sejtek, elsősorban neutrofil granulociták és limfociták mellett (103). A spontán és az indukált köpet sejtprofilja általában hasonló, bár az egyik összehasonlító vizsgálat kimutatta, hogy az indukált köpetben szignifikánsan nagyobb az élő sejtek aránya (104).



A köpetindukció során a beteg először légzésfunkciós vizsgálaton vesz részt. Ezt követően meghatározott ideig (~10 perc) hipertóniás sóoldatot lélegez be egy porlasztóból, miközben percenként megpróbálja felköhögni a köpetet egy steril tartályba (105). A köpet akkor számít megfelelő minőségűnek, ha a nyálkontaminációt jelző laphámsejtek aránya nem haladja meg a 20%-ot.

Bár a köpetindukció viszonylag könnyen kivitelezhető, a betegek által jól tolerált beavatkozás, a módszernek vannak veszélyei, ugyanis a sóoldat inhalációja ritkán bronchospazmust válthat ki. További problémát jelent, hogy a sóoldat inhalációja kisfokú neutrofilejtes légúti gyulladást vált ki, ami akár 24 órán át is fennállhat, így ezen időtartamon belül újabb köpetindukció nem végezhető (106). A köpetindukció ezért mindig orvosi felügyeletet igényel.

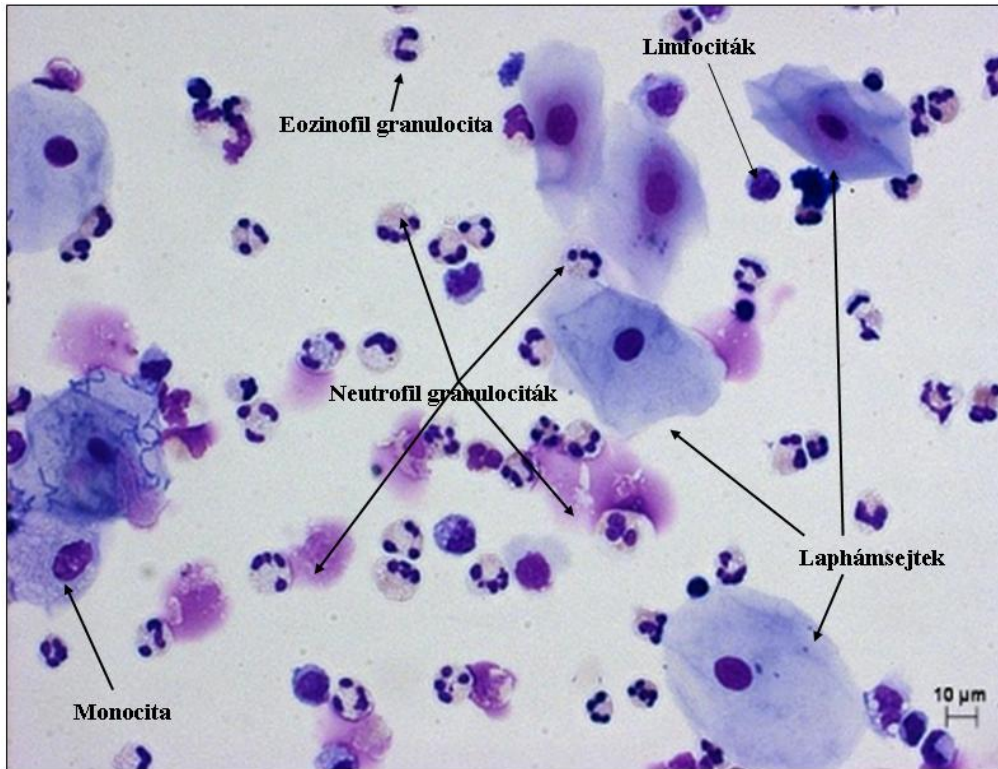
Tekintettel a köpet magas mucin tartalmára, homogenizálásához mucolitikum szükséges. A leggyakrabban alkalmazott detergens a dithiothreitol (DTT). A homogenizálást követően a köpet sejtes fázisának és felülúszójának szétválasztásához a mintát centrifugálják. Az így elkülönített felülúszót a későbbi mérésekig általában  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tárolják, a sejteket pedig tárgylemezen megfestve kiértékelik. A köpet sejtprofiljának meghatározása céljából a különböző gyulladós sejttípusok arányát százalékos formában adják meg.

A köpetfeldolgozás egyik kritikus lépése a homogenizálást segítő detergens, például a DTT használata. A DTT ugyanis bontja a fehérjék oldalláncai között fennálló diszulfid-kötéseket, felismerhetlenné téve ezáltal bizonyos fehérjéket az antitestek számára. Hasonló problémát jelentenek a köpetben jelenlévő proteázok is. Egyes vizsgálatok kimutatták, hogy a proteázok gátlása és a DTT dialízissel történő eltávolítása növeli a detektálható citokinek mennyiségét COPD-s betegek köpetében (107). Több munkacsoport is végzett összehasonlító méréseket a DTT-vel, illetve DTT nélkül feldolgozott köpetek mediátor koncentrációira vonatkozóan. Azt tapasztalták, hogy a DTT-vel történő feldolgozás bizonyos citokinek (pl. TNF- $\alpha$ , LTB<sub>4</sub>, és MPO) detektálhatóságát csökkenti, míg más markerek (pl.  $\alpha$ 1-AT) kimutathatóságát növeli (108).

A köpet sejtprofilja információt szolgáltat a légutakban zajló gyulladós folyamatokról, és annak súlyosságáról. A légúti gyulladásra utalhat a gyulladós sejtek arányának megváltozása, a sejtek abszolút számának növekedése.

A köpetben típusosan neutrofil és eozinofil granulociták, makrofágok, hízósejtek, limfociták és epitelsejtek fordulnak elő (4. ábra). Míg az asztmás betegek köpetében az eozinofil granulociták nagyszámú jelenléte jellemző, addig COPD-ben neutrofilejtes gyulladás dominál. Stabil COPD-ben a betegek köpetében a sejtek 70-90%-a neutrofil granulocita, 10-

20%-ban találunk makrofágokat, míg a limfociták csak 1-3%-ban fordulnak elő (109). Típusos esetekben a COPD-s betegek köpetében csak elvétve fordulnak elő eozinofilek. Klinikai szempontból ugyanakkor a köpet eozinofília (>3%) kimutatásának jelentősége van, mivel az ilyen esetekben jobb eredmény várható a kortikoszteroid kezeléstől, mint a neutrofilejtes gyulladás esetén.



4. ábra. COPD-s betegk köpetéből készített citospin

A köpetfelülúszó a köpetfeldolgozás során keletkező, sejtmentes, a mediátorok meghatározására alkalmas frakció. Az elmúlt két évtizedben számos kutatócsoport elemezte a különböző gyulladásos mediátorok kimutathatóságát a köpetfelülúszóban. A leggyakrabban vizsgált markerek közé pro-inflammatorikus citokinek (IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ) (110, 111), NE, mátrix metalloproteinázok (MMP-9 és -12) (112), oxidatív stressz markerek (113) és a különböző arachidonsav-származékok (PG, LT) tartoznak (114).

#### **2.4. Biomarkerek a COPD kutatásában és diagnosztikájában**

Bár a légúti biomarkerek jelenleg még intenzív kutatás alatt állnak, elképzelhető, hogy e markerek a jövőben bizonyos korlátok között a klinikai gyakorlatba is bevezetésre kerülnek. A továbbiakban a kutatások középpontjában lévő légúti biomarkerek kerülnek ismertetésre.

### **2.4.1. Frakcionált kilégzett nitrogén-monoxid**

A COPD-t kísérő légúti gyulladás *non-invazív* monitorozására gyakran használt vizsgálómódszer a frakcionált kilégzett nitrogén-monoxid (FENO) koncentráció mérése. 1991-ben *Gustaffson és mtsai.* írták le először, hogy a kilégzett emberi levegő NO-t tartalmaz (115). Az azóta eltelt több mint 20 év alatt bebizonyosodott, hogy a legtöbb légúti sejt képes NO termelésre. Az NO rövid féléletidejű (kb. 5 másodperc), rendkívül reakcióképes molekula, amely a szervezetben hamar átalakul még reakcióképesebb vagy toxikusabb molekulákká. Az NO fokozott reakciókészségét szabadgyök természete és párosítatlan elektronjai okozzák. Az NO fokozza az erek permeabilitását, szabályozza a csillók működését, relaxálja a bronchusokat, de ezenfelül szerepe van a bronchusok non-adrenerg és non-kolinerg beidegzésében is (116).

Míg a stabil COPD-s betegek FENO szintje általában nem nagyon különbözik az egészségesekben mért értékektől, addig COPD exacerbációban a marker szintje megemelkedik, amint ezt korábbi munkáink során mi is igazoltuk (117). Saját munkacsoportunk ezenfelül azt is kimutatta, hogy a FENO jó prediktív értékű markere az exacerbációban lévő betegek funkcionális válaszkészségének a kezelés során (118), valamint, hogy szoros kapcsolat mutatkozik a FENO szint és a köpet eozinofilsejtszáma között az exacerbációban lévő betegekben (118). A jobb funkcionális válaszkészség a betegek nagyobb szteroidérzékenységgel lehet összefüggésben (119). A FENO szint emellett korrelációt mutat a légúti obstrukció reverzibilitásának mértékével is a COPD-s betegekben (120).

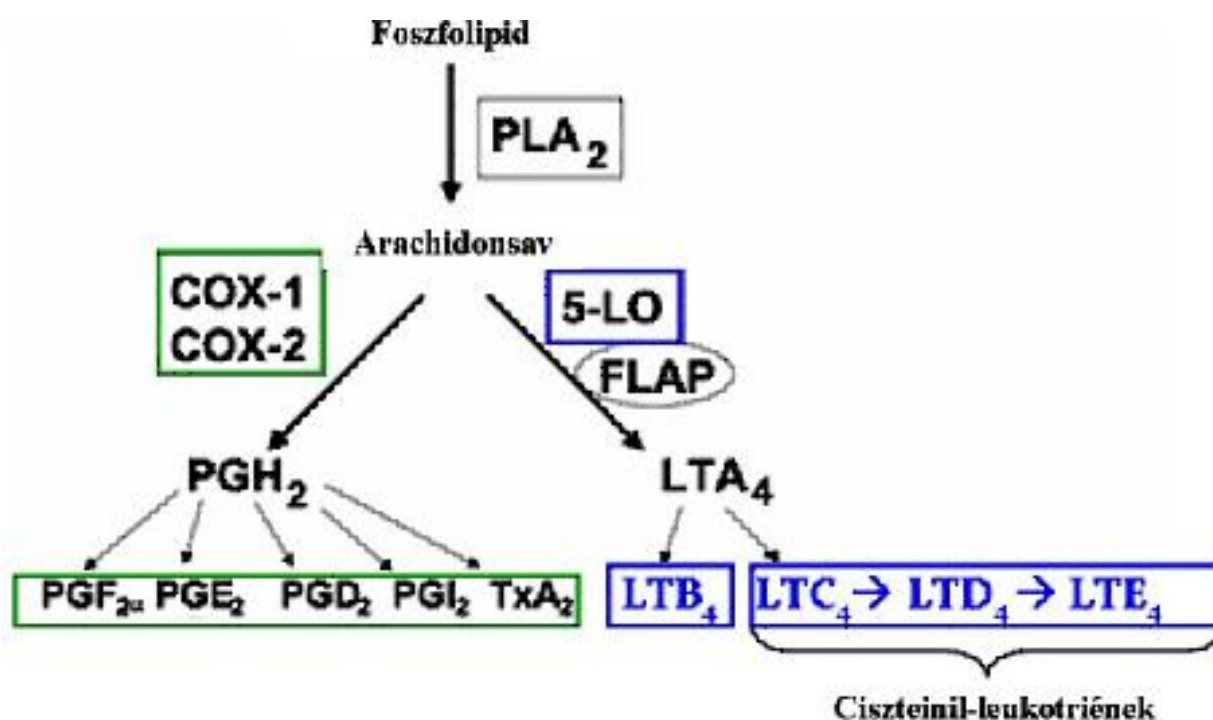
### **2.4.2. Kilégzett levegő kondenzátumának pH-ja**

A EBC pH-ja a légzőrendszer felszínét borító folyadékfilm (ASL) sav-bázis viszonyairól ad képet, bár sokan vitatják, hogy az EBC pH-jából valójában milyen bizonyossággal lehet az ASL kémhatására következtetni. Munkacsoportunk egy korábbi tanulmányában kimutatta, hogy míg az exacerbációban lévő asztmás betegek EBC mintái savasabbak az egészségesekhez képest és a pH az exacerbáció kezelése során normalizálódik, addig a COPD-s betegek akut exacerbációja során az EBC pH-ja nem változik számottevően (121). Ezen mérési eredményekből kiindulva, az EBC pH-mérése nem alkalmas a gyulladás monitorozására a COPD-s betegekben.

### 2.4.3. Arachidonsav-származékok

Az eikozanoidok a sejtmembránokat alkotó húsz szénatomos zsírsavak ( $\Omega$ -3 és  $\Omega$ -6 zsírsavak) enzimatis átalakulása során keletkező szignalizációs molekulák, amelyekhez számos élettani és kórélettani folyamat köthető. Megfigyelések sora támasztja alá, hogy az eikozanoidok csoportjába tartozó LT-eknek és PG-oknak szerepe van a légúti betegségek patomechanizmusában, részt vesznek a gyulladáshoz vezető sejtek toborzásában, a vaszkuláris és a bronchialis simaizomtónus szabályozásában, valamint az oxidatív stressz kialakulásában.

Az eikozanoidok bioszintézisének első lépéseként a sejtmembrán foszfolipidjeiből a foszfolipáz-A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) enzim hatására arachidonsav szabadul fel. Az így keletkező arachidonsavat két kulcsenzim két különböző reakció úton alakítja tovább. A ciklooxygenáz (COX) által katalizált úton PG-ok és a tromboxánok (TX-ok) keletkeznek, míg az 5-lipoxigenáz (5-LO) enzim az arachidonsavat LT-ekké alakítja át (5. ábra).



5. ábra. Az arachidonsav metabolizmusa

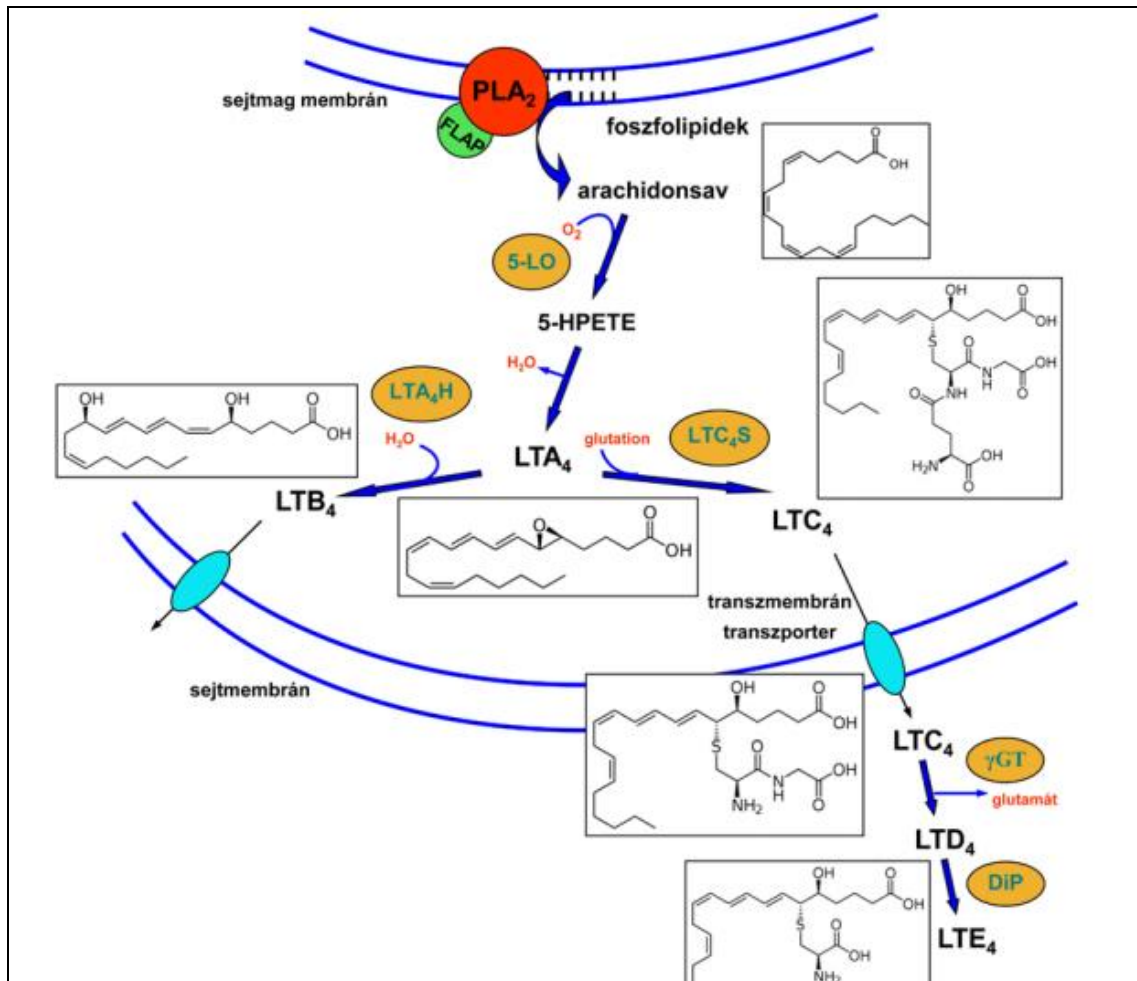
PLA<sub>2</sub>: foszfolipáz A<sub>2</sub>, COX: ciklooxygenáz, 5-LO: 5-lipoxigenáz, FLAP: 5-lipoxigenáz-aktiváló protein, LTA<sub>4</sub>: leukotrién A<sub>4</sub>, PGF<sub>2α</sub>: proszttaglandin F<sub>2α</sub>, PGE<sub>2</sub>: proszttaglandin E<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>: proszttaglandin D<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>: prosztaciklin I<sub>2</sub>, TxA<sub>2</sub>: tromboxán A<sub>2</sub>, LTB<sub>4</sub>: leukotrién B<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>: leukotrién C<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>: leukotrién D<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>: leukotrién E<sub>4</sub>

#### 2.4.3.1. Leukotriének

A leukotriéneket 1938-ban *Feldberg* és *Kellaway* nevezte el *slow reacting substance of anaphylaxis-nak*, miután tengerimalac perfundált tüdejét kobra méreggel kezelve simaizom

kontrakciót tapasztaltak (122). Megfigyelték, hogy e vegyület hatásmódja eltér a hisztaminétól, és szerepe lehet asztmás hörgőgörcs kialakításában. Mivel a három konjugált kettős-kötést tartalmazó vegyületet először leukocitákból izolálták, a kémiai anyagot 1979-ben *Samuelsson* svéd biokémikus „leukotrién”-nek nevezte el (123).

A leukotriének szerkezetileg két csoportra oszthatók. A szabad arachidonsavat az 5-LO enzim az 5-lipoxigenáz-aktiváló protein (FLAP) jelenlétében előbb egy intermedierré (5-hidroperoxi-eikozatetraénsav, 5-HPETE) alakítja át, majd az intermedieren keresztül leukotrién A<sub>4</sub> (LTA<sub>4</sub>) keletkezik (6. ábra). Az LTA<sub>4</sub>-ből a leukotrién B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>)-szintáz által katalizált úton az ún. dihidroxi-leukotriének (köztük az LTB<sub>4</sub>) keletkeznek, míg az LTC<sub>4</sub>-szintáz által katalizált úton az ún. ciszteinil-leukotriének (cisz-LT, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> és LTE<sub>4</sub>) jönnek létre. Az LTB<sub>4</sub> és az LTC<sub>4</sub> speciális transzportfehérjék segítségével kijutnak a sejtől, majd az LTC<sub>4</sub>-ből a glutamil-transzpeptidáz enzim LTD<sub>4</sub>-et szintetizál, amely szekvenciális aminosav-hidrolízis útján LTE<sub>4</sub>-gyé alakul. A leukotriének a receptorhoz való kötődés után a citoplazmában elhelyezkedő G-fehérjével lépnek kapcsolatba, melynek következtében az intracelluláris Ca<sup>2+</sup> szint nő, a cAMP szint csökken, ami a protein-kinázok aktiválása révén szerteágazó élettani hatásokhoz vezet.



6. ábra. A leukotriének biosintézise

5-LO: 5-lipoxigenáz, LTA<sub>4</sub>H: leukotrién A<sub>4</sub>-hidroláz, LTC<sub>4</sub>S: leukotrién C<sub>4</sub>-szintáz, 5-HPETE: 5-hidroperoxi-eikozatetraénsav, LTA<sub>4</sub>: leukotrién A<sub>4</sub>, LTB<sub>4</sub>: leukotrién B<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>: leukotrién C<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>: leukotrién D<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>: leukotrién E<sub>4</sub>, γGT: γ-glutamil-transzpeptidáz, DiP: dipeptidáz

#### 2.4.3.2. Ciszteinil-leukotriének

A cisz-LT-nek patofiziológiai szerepe az asztmás gyulladás és az allergiás rhinitis kialakulásában közismert (124). Bronchokonstriktor hatásuk mellett fokozzák a nyákképződést, az érpermeabilitást, elősegítik a szöveti ödéma kialakulását, serkentik a légúti nyálkahártya eozinofilsejtes infiltrációját, csökkentik a ciliumok mozgását, valamint szenzitizálják a szenzoros idegvégződéseket, neuropeptidok felszabadulását okozva. Inhalációjuk légúti eozinofiliát okoz, koncentrációjuk a BAL-ban szorosan korrelál a légutakban megtelepedett eozinofilsejtek számával. Hatásukat a tüdőben döntően az 1-es típusú receptorok (cisz-LT<sub>1</sub>R) közvetítik, amelyek kimutathatóak a peribronchialis és peribronchiolaris izomzatban, az alveolaris makrofágokban és a fehérvérsejtekben.

Termelődésük főleg a hízósejtekhez, az eozinofil- és a bazofilsejtekhez, valamint a makrofágokhoz köthető.

A cisz-LT-eknek a COPD kórfolyamatában betöltött szerepe sokkal kevésbé ismert. Jelentőségük a teljes COPD-s populációban bizonyosan kisebb az asztmához képest, ugyanakkor elképzelhető, hogy a COPD-s betegek egyes alcsoportjaiban, így például az asztmás fenotípust vagy az inhalációs  $\beta_2$ -agonistákra részleges reverzibilitást mutató betegekben lényeges mediátor funkciót töltenek be (125).

Cisz-LT-ek detektálhatók COPD-s betegek köpetében (126, 127), BAL (128) és EBC folyadékában (128). Koncentrációjuk az EBC-ben a legalacsonyabb (128). Mennyiségi változásukat elemző vizsgálatok száma a COPD-ben kevés. A közelmúltban egy lengyel munkacsoport közölte, hogy stabil betegekben szintjük az EBC-ben magasabb az egészséges kontroll csoporthoz képest (129). Exacerbációban koncentrációjuk tovább emelkedik, amely aztán néhány héttel az exacerbáció kezelése után a stabil állapotra jellemző szintre tér vissza (124). Az eredmények jó összhangban vannak egy másik, szintén a közelmúltból származó megfigyeléssel, amely szerint markáns cisz-LT<sub>1</sub>R expresszió mutatható ki endobronchialisán az akut exacerbációban lévő COPD-s betegekben (130). A szerzők adatai szerint a receptorokat a bronchusok falában főleg a hízósejtek és a makrofágok expresszálják.

Az eddigi eredmények alapján a cisz-LT-gátlás, mint terápiás beavatkozás a COPD-ben szerény haszonnal bír. Az egyik prospekív, randomizált, 2 hónapon keresztül tartó vizsgálatban a szerzők kisfokú emelkedést észleltek az életminőségi mutatókban és a spirometriás paraméterekben montelukast kezelés mellett (131); míg egy másik, közel 2 éven át tartó vizsgálatban az életminőségi mutatók javulását, a fenntartó gyógyszerigény (inhalációs kortikoszteroidok és hörgőtágítók) csökkenését, valamint az akut exacerbációk miatti hospitalizációk számának visszaszorulását tapasztalták a kiegészítő montelukast terápia mellett (132). Ez utóbbi vizsgálatban a montelukast a légzésfunkciós értékeket azonban nem befolyásolta.

#### **2.4.3.3. Leukotrién B<sub>4</sub>**

*In vitro* megfigyelések szerint a dihidroxi-leukotriének csoportjába tartozó LTB<sub>4</sub> fontos neutrofil kemoattraktáns: fokozza a neutrofilsejtek légutakba történő toborzását, elősegíti a neutrofil- és endotelsejtek közötti interakciót, fokozza a neutrofilsejtek granulációját, melynek következtében proteázok (pl: MPO, HNE), ROS-ok és egyéb mediátorok szabadulnak fel (133). Az LTB<sub>4</sub> fokozza a monociták IL-6 termelését, valamint a nociceptív küszöb csökkentésével részt vesz a gyulladáshoz vezető fájdalom kialakításában is. Bár az LTB<sub>4</sub>-nek

közvetlen hatása a légúti simaizomzatra nincs, a nyákszekréció és érpermeabilitás fokozása útján hozzájárulhat a légúti obstrukció növekedéséhez is.

Az LTB<sub>4</sub> a 8-izoprosztán mellett az egyik legtöbbet vizsgált lipid mediátor COPD-ben. Az LTB<sub>4</sub> könnyen kimutatható COPD-s betegek köpetének felülúszójából és BAL folyadékából is. Az EBC-ben való kimutathatósága ugyanakkor ellentmondásos. Jóllehet több munkacsoport is leközelítette, hogy az LTB<sub>4</sub> koncentrációja magasabb a COPD-s betegek mintáiban az egészségesekhez képest (134), illetve, hogy akut exacerbációban az LTB<sub>4</sub>-szint tovább emelkedik, a mérési eredmények rendkívül nagy variabilitást mutattak, még hasonló eszközök és detekciós technikák alkalmazásával is. Az adatok gyenge reprodukálhatóságát több kutatócsoport is megfigyelte, melynek hátterében metodikai tényezőket, esetleg a minták nyállal való kontaminációját valószínűsítették (135). Laboratóriumunkban az LTB<sub>4</sub> nem volt kimutatható az EBC-ben (136). Valószínű, hogy az LTB<sub>4</sub> nagyon alacsony (sokszor méréshatár alatti) koncentrációban van csak jelen az EBC-ben.

A köpetben több kutatócsoport is emelkedett LTB<sub>4</sub> szintet igazolt a stabil COPD-s betegekben az egészségesekhez képest, bár a mért értékek itt is nagy variabilitást mutatnak (134, 137). Úgy tűnik, hogy az LTB<sub>4</sub> szérumszintje is magasabb COPD-ben az egészségesekhez képest (138). Mások ugyanakkor nem igazoltak emelkedett LTB<sub>4</sub> szintet COPD-s betegek köpetében (139). Néhány vizsgálat alapján akut exacerbációban a marker koncentrációja tovább emelkedik a köpetben (140).

Az LTB<sub>4</sub>-nek a dohányzási státusszal való kapcsolata ellentmondásos. *Carpagnano és mtsai.* szerint dohányzás hatására az LTB<sub>4</sub> szint emelkedik (141), míg más kutatók munkái alapján az LTB<sub>4</sub> szint a dohányzási állapottal nem függ össze (142, 143); sőt, a dohányzásról való leszokás után a marker szintje éveken át folyamatosan emelkedett marad a köpetben (144). Több szerző is igazolta, hogy az LTB<sub>4</sub> mint potens neutrofil kemoattraktáns szoros pozitív korrelációt mutat a köpet neutrofil sejtszámával (138), sőt a köpet megnövekedett kemotaktikus kapacitásáért is részben az LTB<sub>4</sub> lehet felelős COPD-ben (145).

Az LTB<sub>4</sub> farmakológiai gátlása kézenfekvő terápiás lehetőség lehet COPD-ben. A gátlás specifikus receptor blokkolókkal vagy 5-LO inhibitorokkal történhet. Ez utóbbiak a cisz-LT-ek és az LTB<sub>4</sub> szintézisét egyaránt gátolják. E farmakonokkal az utóbbi években több kisebb klinikai vizsgálat is folyt. A vizsgálatok általában negatív eredménnyel zárultak. Így például az LTB<sub>4</sub> receptor antagonistá LTB019 négy hetes kezelési periódusban való alkalmazása nem befolyásolta sem a légzésfunkciós értékeket, sem a köpet neutrofil sejtszámát vagy gyulladási mediátor koncentrációját (146). Hasonlóan egy másik, randomizált, kettős-vak, placebo-kontrollált vizsgálatban az 5-LO inhibitor zileuton additív alkalmazása nem

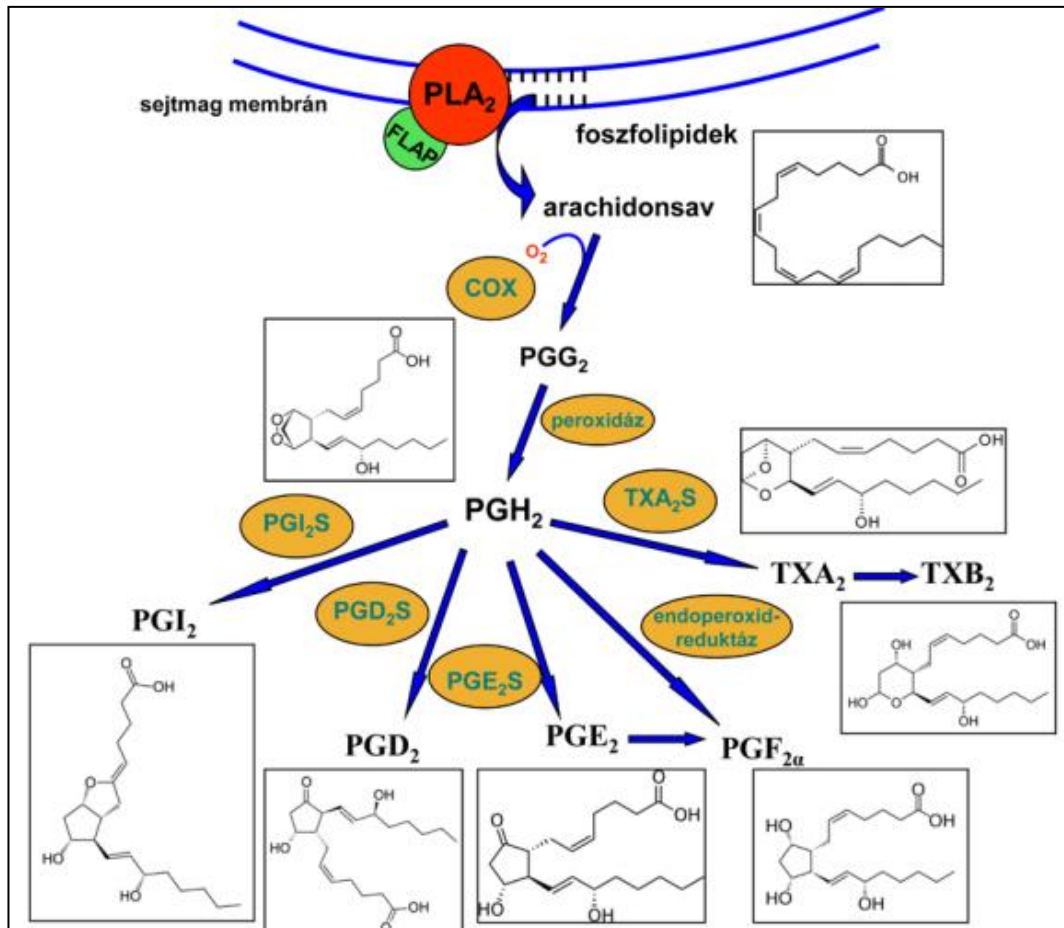


rövidítette le az akut exacerbáció miatt hospitalizált COPD-s betegek kezelési időtartamát (147). Számos más receptor antagonistával és FLAP-gátlóval jelenleg is folynak kísérletek és vizsgálatok.

#### **2.4.3.4. Prostaglandinok**

A PG-okat először az 1930-as években humán ondóból izolálták és azonosították, mint simaizom-serkentő anyagok. Szerkezetüket 1964-ben *Bergstrom és Samuelsson* tárták fel. A PG-okat a legtöbb szerv és szövet sejtjei szintetizálják, minden testfolyadékban fellelhetők. A PG-ok szintéziséért felelős COX kulcsenzimnek több izoformája is ismert, a legfontosabbak a COX-1 és a COX-2. Míg a COX-1 fiziológias körülmények között folyamatosan termelődik a sejtekben és egy normál PG szintért felelős, addig a COX-2 gyulladás hatására indukálódik (148). A bioszintézis első lépéseként a COX enzim az arachidonsavat prosztoglandin  $G_2$ -vé ( $PGG_2$ ) konvertálja, amely ezt követően prosztoglandin  $H_2$ -vé ( $PGH_2$ ) alakul át (endoperoxidok). A  $PGH_2$  különböző enzimek által katalizált folyamatokban alakul tovább prosztoglandin  $E_2$  ( $PGE_2$ ), prosztoglandin  $D_2$  ( $PGD_2$ ), prosztaciklin  $I_2$  ( $PGI_2$ ), valamint tromboxán  $A_2$  ( $TXA_2$ ), illetve tromboxán  $B_2$  ( $TXB_2$ ) molekulákká (7. ábra).

A légúti traktusban a prosztoglandinok rendkívül változatos, sokszor egymással is ellentétes hatást fejtenek ki. A hörgőtónus szabályozásában egyaránt van bronchokonstriktor és bronchodilátor hatásuk.



7. ábra. A prosztoglandinok bioszintézise

PLA<sub>2</sub>: foszfolipázA<sub>2</sub>, FLAP: 5-lipoxigenáz aktiváló protein, COX: ciklooxigenáz, PGG<sub>2</sub>: prosztoglandin G<sub>2</sub>, PGH<sub>2</sub>: prosztoglandin H<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>: prosztaciklin I<sub>2</sub>; PGD<sub>2</sub>: prosztoglandin D<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>: prosztoglandin E<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>: prosztoglandin F<sub>2α</sub>, TXA<sub>2</sub>: tromboxán A<sub>2</sub>; TXB<sub>2</sub>: tromboxán B<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>-S: PGI<sub>2</sub>-szintáz, PGD<sub>2</sub>-S: PGD<sub>2</sub>-szintáz, PGE<sub>2</sub>-S: PGE<sub>2</sub>-szintáz, TXA<sub>2</sub>-szintáz

#### 2.4.3.5. Prosztoglandin E<sub>2</sub>

Hasonlóan a többi PG-hoz, a PGE<sub>2</sub> hatásai is szerteágazóak. A molekula egyik legismertebb szerepe az aszpirin-indukálta asztma patomechanizmusában van (149). Kimutatták, hogy az asztmás betegekből izolált bronchialis fibroblasztokban a PGE<sub>2</sub>-szintézis intrinsic defektust mutat, amely az aszpirin-indukálta asztmában a legkifejezettebb (150). A feltételezések szerint a bronchodilatátor hatású PGE<sub>2</sub> mennyiségének csökkenése túlzott cisz-LT képzéshez vezet, amely hörgőgörcsöt okoz („PGE<sub>2</sub>-fék” kiesési hipotézis). Az aszpirin-indukálta hörgőgörcs PGE<sub>2</sub> inhalációjával gátolható (151).

A fenti hatások mellett több munkacsoport is igazolta a PGE<sub>2</sub> nyákszekréciót stimuláló hatását, melyet a molekula, egyes mucin gének (MUC5AC, MUCB) expressziójának fokozódásán keresztül fejt ki (152). Ezen *in vitro* eredményekkel jó egyezést mutat annak a

kettős-vak, placebo-kontrollált klinikai vizsgálatnak az eredménye, amely szerint az indometacin, mint nem-szelektív COX-gátló kúraszerű belélegzése a köpet mennyiségének és a légzési panaszok csökkenéséhez vezet krónikus bronchitises és bronchiectasiás betegekben (153). Ezen betegek köpetében számos PG (pl. PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>) és TX (pl. TXB<sub>2</sub>) csökkenését is igazolták a szerzők. Mivel a PGE<sub>2</sub> stimulálja a légúti érző idegvégződéseket, a molekula szerepet játszhat a köhögési inger kialakításában is (154). Az idegi mechanizmusok szerepére utal az is, hogy a PGE<sub>2</sub> gátolja az acetilkolinok a légúti kolinerg idegvégződésekből való felszabadulását (155). Más kísérleti körülmények között a PGE<sub>2</sub> gátolja tüdő fibroblasztok migrációját, myofibroblasztokká történő differenciációját és kontrakcióját is.

Végül megemlíthető, hogy a PGE<sub>2</sub> érintett a légúti gyulladás szabályozásában is. Ezt támasztják alá azok a megfigyelések, amelyek szerint a PGE<sub>2</sub> inhalációja enyhíti az allergén-indukált válaszreakciót és a légúti gyulladást asztmás betegekben (156); valamint, hogy a PGE<sub>2</sub> gátolja pro-inflammatorikus citokinek monocitákból való felszabadulását (157). Kimutatták továbbá, hogy a PGE<sub>2</sub> fokozza a foszfodiészteráz-gátlók antiinflammatorikus hatását is (158).

Több kutatócsoport vizsgálta a PGE<sub>2</sub> mennyiségi változását COPD-s betegek légúti mintáiban. Az eredmények szerint az EBC PGE<sub>2</sub> szintje emelkedett COPD-ben az egészséges kontroll személyekhez képest (129, 159, 160), bár az adatok bizonyos kritikával kezelendők az EBC-mérések ismert metodikai problémái (gyenge reprodukálhatóság és visszamérhetőség) miatt. Exacerbációban lévő betegek EBC mintáiban nem észleltek PGE<sub>2</sub> szint emelkedést a stabil állapothoz képest (129). A PGE<sub>2</sub> szintje a légúti traktusban nem-szelektív COX-gátló (ibuprofen) kezeléssel csökken, míg a szelektív COX-2 gátló (rofecoxib) alkalmazása a PGE<sub>2</sub> szintjét nem befolyásolja (161).

Az EBC mellett a COPD-s betegek köpetében is kimutatható PGE<sub>2</sub>. A betegek és az egészségesek elkülönítését azonban a dohányzás, mint zavaró tényező nehezíti, ugyanis egészségesekben a dohányzás hatására a köpet PGE<sub>2</sub> koncentrációja éppúgy megemelkedik, mint az ex-dohányos COPD-s betegekben (162). Jelentős PGE<sub>2</sub> szint emelkedés látszik továbbá a krónikus köhögésben szenvedő eozinofil bronchitises betegekben is (163, 164), bár az összefüggést nem mindegyik vizsgálatban igazolták (165). A köpet PGE<sub>2</sub> koncentrációjának a COPD súlyosságával vagy rutin spirometriai paraméterekkel való kapcsolata bizonytalan, az egyik vizsgálatban negatív korrelációt igazoltak a PGE<sub>2</sub> szint és a FEV<sub>1</sub> között (166).

A PGE<sub>2</sub> szintjének meghatározása mellett több munkacsoport vizsgálta a szintéziséért felelős enzim, a COX-2 mennyiségi változását is COPD-ben. Úgy tűnik, hogy a köpet sejtes

fázisában a COX-2 szintje jó korrelációt mutat a felülúszó PGE<sub>2</sub> koncentrációjával: értéke a dohányzó COPD-s betegekben a legmagasabb, a dohányzásról leszokott betegekben pedig szintje csökken (157). A COX-2 expresszió dohányos egészségesekben is megemelkedik.

#### **2.4.3.6. Tromboxánok**

A TX-ok közül a TXA<sub>2</sub> és TXB<sub>2</sub> szintén erős broncho- és vazokonstriktor hatású molekulák (167). *Zheng és mtsai.* kimutatták, hogy COPD-ben az emelkedett TXA<sub>2</sub> szint hozzájárulhat a pulmonáris hipertónia kialakulásához (168). *Montuschi és mtsai.* kimutatták, hogy a TXB<sub>2</sub> koncentrációja nem különbözik COPD-s betegek és egészséges személyek EBC-jében (159). Ezzel szemben, más tanulmányokban azt találták, hogy a TXB<sub>2</sub> metabolitjának szintje magasabb a COPD-s betegek vizeletében (169), illetve, hogy a TX-receptor antagonist *seratrodast* alkalmazásával a vizelet 11-dehidro-TXB<sub>2</sub> szintje csökkenthető, mellyel párhuzamosan a betegek nehézlégzéses panaszai is mérséklődnek (170).

#### **2.4.3.7. Prosztaciklinek**

A prosztaciklinek vazodilatátor hatását a pulmonalis artériás hipertónia kezelésében használják fel terápiásan (prosztaciklin-analógok). PGI<sub>2</sub> inhalációja a légúti obstrukció enyhüléséhez vezet, legalábbis az arra érzékeny (responder) asztmás betegek csoportjában (171). Az irodalom beszámol a prosztaciklinek gyulladáskeltő hatásáról is allergiában (172), valamint arról, hogy a PGI<sub>2</sub>-ek fokozzák a fibroblasztok vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF) termelését egészségesekben és COPD-s betegekben.

#### **2.4.3.8 Prostaglandin D<sub>2</sub>**

A PGD<sub>2</sub> inhalációja asztmás betegekben és egészségesekben dózis-függően fokozza a bronchialis simaizomzat összehúzódását (173). A PGD<sub>2</sub> elsősorban a tüdő hízósejtjeiben termelődő arachidonsav-származék, ami szerepet játszik a bronchiális simaizomsejtek kontrakciójában, és részt vesz a humán légutak akut allergiás válaszkészségének kialakításában is (174). Kevés irodalmi adat áll rendelkezésre a PGD<sub>2</sub> mennyiségi változásáról COPD-ben. *Montuschi és mtsai.* nem találtak eltérést COPD-s betegek és egészséges személyek EBC-jének PGD<sub>2</sub> szintje között (160).

## 2.4.4. Oxidatív stressz markerek

### 2.4.4.1. Kilégzett szén-monoxid

Bár a szén-monoxid (CO) elsősorban a dohányfüst expozíció következtében mutat emelkedést a kilégzett levegőben, több tüdőbetegségben (175), többek között a COPD-ben (176) is emelkedett kilégzett CO szintről számoltak be. A CO legjelentősebb exogén forrása a dohányfüst, ugyanakkor a gáz a hem molekulából a hem-oxigenáz enzim által katalizált endogén úton is keletkezik a szervezetben (141). Munkacsoportunk eredményei alapján a kilégzett CO szintet elsősorban a dohányzás határozza meg, és a marker koncentrációja még az akut exacerbáció kialakulása során sem emelkedik meg számottevő mértékben a COPD-s betegekben, ami a marker korlátozott klinikai felhasználhatóságára utal (177).

### 2.4.4.2. 8-izoprosztán

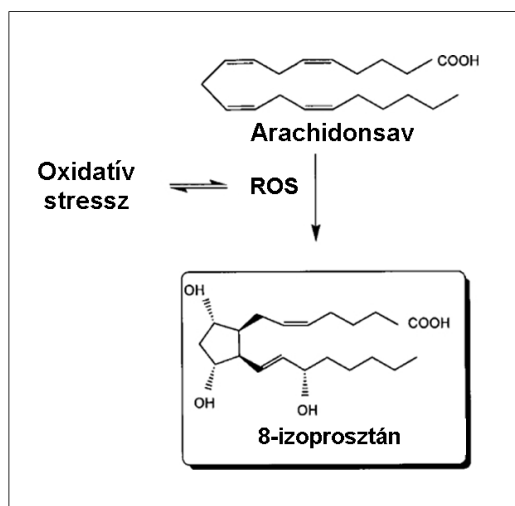
A COPD patomechanizmusának meghatározó eleme az oxidatív stressz, amely a felborult oxidáns-antioxidáns egyensúly következménye. Közismert, hogy a belélegzett dohányfüst és más irritánsok a légúti epitelsejtekből, illetve az aktivált neutrofilejtekből és makrofágokból citokineket, gyulladáscsökkentő mediátorokat, proteázokat, valamint ROS-okat szabadítanak fel. A dohányfüst önmagában is nagy mennyiségben tartalmaz ROS molekulákat. A felszabaduló ROS molekulák ( $O_2^-$ ,  $OH^-$ ,  $ONOO^-$ ) nukleinsavakkal, lipidekkel és fehérjékkel reakcióba lépve károsodást okoznak a sejtekben, többek között inaktiválják az antiproteázokat, amely a szöveti proteáz/anti-proteáz egyensúly megbomlásához vezet. A citokinek és a ROS-molekulák az NF- $\kappa$ B transzkripciós faktor, valamint a TNF- $\alpha$  aktiválásán keresztül hozzájárulnak neutrofil kemoattraktánsok (pl. IL-8 és  $LTB_4$ ) termeléséhez is. Az oxidatív stressz további következménye, hogy a HDAC enzimcsalád aktivitása csökken, amely a glükokortikoidok gyulladáscsökkentő hatásának felfüggesztéséhez, és ennek következtében számos proinflammatorikus gén expressziójának fokozódásához vezet.

Az arachidonsav nem enzimátikus, ROS-ok által történő oxidációja vezet a PG egyik csoportjának, az izoprosztánok szintéziséhez. A prosztaglandin-szerű, többszörösen telítetlen zsírsavak autooxidációjával keletkező vegyületcsoportot az 1970-es évek közepén írták le, de jelenlétüket az emberben *in vivo* csak 1990-ben tudták kimutatni (178). Az izoprosztánok általában vaso- és bronchokonstriktor hatású prosztanoidok, amelyek fontos nyomjelzői (biomarkerei) a szöveteket károsító oxidatív stressznek a legkülönbözőbb tüdő- és bel- és idegyógyászati kórképekben (179).

COPD-ben az egyik legtöbbet vizsgált prosztanoid az F2-izoprosztánok közé tartozó prosztaglandin F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ), azaz a 8-izoprosztán (8. ábra). Az elmúlt években több kutatócsoport is kimutatta, hogy a 8-izoprosztán szintje emelkedett COPD-s betegek köpetfelülúsójában, BAL folyadékában vagy kondenzátumában az egészségesekhez képest, amely a megnövekedett oxidatív stresszre utal (180, 181, 182). Többen összehasonlító méréseket is végeztek: a mediátor koncentrációja a BAL-ban és a köpetben magasabb, mint az EBC-ben (128, 183). Viszonylag szoros összefüggés látszik a légúti 8-izoprosztán szint és az ismert spirometriai paraméterek, illetve a COPD súlyosságát jellemző egyéb klinikai mutatók között. Így például a FEV<sub>1</sub> fordított arányban van a markernek a köpetben vagy az EBC-ben mért koncentrációjával (175, 178), míg pozitív korreláció látszik a 8-izoprosztán szint és az emphysema nagy felbontóképességű számítógépes tomográfion (HRCT) meghatározott súlyossági foka (score) között (184).

Több munkacsoport is igazolta, hogy a dohányzás önmagában is növeli a kilégzett 8-izoprosztán szintet mind a légutakban (185), mind a perifériás vérben (186), amely a dohányzás oxidatív stresszt indukáló hatásai miatt könnyen érhető. Ez a körülmény azonban nehezíti az egészséges dohányzók és a COPD-s betegek egymástól való elkülönítését és a marker klinikai felhasználhatóságát. Más vizsgálatokban a dohányzás zavaró hatását nem tudták kimutatni (143). Jelenleg nem ismert, hogy a marker felhasználható-e a dohányzással szembeni fokozott érzékenység kimutatására.

A 8-izoprosztán szint tovább emelkedik akut exacerbációban mind a köpetben, mind az EBC-ben (187). Az exacerbáció antibiotikumokkal és kortikoszteroidokkal való kezelése után a 8-izoprosztán szint csökken (182), ami felveti a marker klinikai monitorozásra való felhasználhatóságának lehetőségét. Ennek megítélésére azonban további követéses vizsgálatokra van szükség.



**8. ábra. Az arachidonsavból oxidatív stressz hatására a prosztaglandinoktól és a leukotriénektől eltérő metabolitok is keletkeznek, többek között a 8-izoprosztán (188)**

#### **2.4.4.3. Malondialdehid**

A lipidperoxidáció során keletkező fontosabb aldehideket az értekezésem 2.3.3. pontjában már részleteztem. Az aldehidek mennyiségi kimutatásával indirekt módon az adott szövetekben zajló oxidatív stressz mértékére lehet következtetni. Koncentrációjukat legpontosabban tömegspektroszkópiával kombinált gáz- vagy folyadékkromatográfiával lehet meghatározni. E módszerek azonban bonyolultak, igen költségesek, jelentős laboratóriumi infrastruktúrát igényelnek, így széles körben való elterjedésük nem várható. A mérések legtöbbször vérben történnek, ami a szervezet szisztémás redox folyamatairól ad információt, viszont a szervspecifikus viszonyok megítéléséhez ezek a mérések nem megfelelőek.

A omega-3- és omega-6-zsírsavak peroxidációjakor keletkező aldehidek közül az egyik leggyakrabban meghatározott molekula az MDA. Az MDA kisméretű, egyszerű szerkezetű, kémiaiilag stabil, önmagában is biológiai aktivitással rendelkező molekula (189). Az MDA többféle módon is keletkezhet a szervezetben. Egyrészt keletkezhet az arachidonsav oxidációja során a  $PGH_2$ , illetve más intermediereken keresztül, másrészt ismert az MDA-nak enzimatis úton való bioszintézise is  $PGH_2$ -ből kiindulva  $TXA_2$  keletkezése mellett (189, 190). A nem enzimatis úton keletkező MDA szöveti felhalmozódásában fontos tényező az oxidatív stressz (191).

Az MDA sejtkárosító hatását a fehérjék lizin aminosavjával kialakított keresztkötések létrehozásával éri el. Ennek következtében a fehérjék biológiai funkciójukat elvesztik, enzimaktivitásuk csökken. Az MDA kapcsolódhat a DNS lánc felépítésében résztvevő

dezoxi-guanozinnal is, amely karcinogén hatású és a traszkripció különböző zavaraihoz vezethet.

Az MDA kimutatására az elmúlt évek során többféle módszert is kidolgoztak. Egyes munkacsoportok az MDA koncentrációját a tiobarbiturátsav (TBA)-teszt alkalmazásával határozzák meg, bár a teszt nem elég specifikus (192). A módszert először az élelmiszeriparban használták zsírok és olajok autooxidatív degradációjának vizsgálatára (193). Az MDA pontos meghatározása gáz- vagy folyadékkromatográfiás eljárással lehet, de ismert számos derivatizáción alapuló kvantifikálási módszer is (194).

Általánosan elfogadott, hogy az MDA mérése az oxidatív stressz meghatározásának egyik megbízható módszere (194), ugyanakkor az nagyon kevésbé ismert, hogy az MDA mérésén keresztül a légutakban zajló oxidatív stressz-hatás mértékére is lehet-e következtetni. Az elmúlt évtizedben történt ugyan néhány vizsgálat ezen mediátor légúti kimutathatóságára vonatkozóan, azonban e vizsgálatok többnyire ellentmondó eredménnyel zárultak, és számos kérdés tisztázatlan maradt.

A vizsgálatok értékelését nehezíti, hogy sok esetben nem vették figyelembe a dohányzás zavaró hatását, jóllehet közismert, hogy az oxidatív stressz egyik fő induktora maga a dohányfüst. Több kutatócsoport kimutatta, hogy egészségesekhez képest a dohányfüst hatására a plazma MDA szintje szignifikánsan nő (195, 196, 197). Végül meg kell jegyezni, hogy a legtöbb vizsgálatban a mérések a vérplazmából (198, 199) és nem légúti mintákból történtek, így bizonytalan, hogy az esetlegesen kimutatott marker szint-emelkedés nem a társbetegségek oxidatív stresszt indukáló hatásának tulajdonítható-e. A vérplazmában a COPD mellett más tüdőbetegségekben, így például obstruktív alvási apnoe szindrómában (OSAS), tüdődaganatban vagy pulmonalis hipertóniában is kimutatható az MDA koncentrációjának emelkedése (198, 200, 201, 202).

A korábbi években két olasz és egy koreai munkacsoport közölt adatokat stabil klinikai állapotú COPD-s betegek légúti (EBC vagy köpet) mintáiban végzett MDA mérésekről. A beválasztott betegek részben dohányosak, részben ex-dohányosak voltak.

Lee és mtsai. az EBC-ben igazoltak emelkedett MDA szintet COPD-s betegekben az egészségesekhez képest (203), míg Bartoli és mtsai. a COPD mellett az asztmában, valamint a bronchiectáziában is emelkedett MDA szintet mutattak ki az EBC-ben az egészségesek kontroll csoportához képest (204). A COPD-sek vonatkozásában hasonló eredményre jutottak Corradi és mtsai. is, bár az értékelhetőséget és a klinikai felhasználhatóságot bizonytalanná teszi, hogy a vizsgálatban a dohányos és az ex-dohányos betegek nem voltak megfelelően szétválasztva, valamint hogy a szerzők nem végeztek megfelelő reprodukálhatósági méréseket



sem (205). A vizsgálatban az EBC mellett indukált köpetben is történtek mérések, a köpetben az MDA koncentrációja jóval magasabbnak bizonyult, a két különböző légúti mintában mért marker szintek között azonban korreláció nem volt. Az MDA-nak a COPD exacerbációban való mennyiségi meghatározásáról saját vizsgálataink előtt irodalmi közlésről nem volt tudomásunk. Hasonlóan, mivel a fenti vizsgálatok keresztmetszeti jellegűek voltak, nem állt rendelkezésre arra vonatkozóan sem adat, hogy a COPD farmakológiai kezelése alatt hogyan változik a MDA koncentrációja a köpetben vagy az EBC-ben.

Az MDA biomarkerként való megítélését az is nehezíti, hogy nincs konzekvensen bizonyított összefüggés a légúti vagy plazma MDA szint és az ismert klinikai betegségmutatók között. Így például az irodalmi adatok alapján ellentmondásos az MDA és a légzésfunkció kapcsolata: Montano és mtsai-nak vizsgálatában az MDA szint és a légzésfunkciós paraméterek között szignifikáns fordított korreláció mutatkozott (195), ugyanakkor más vizsgálatokban nem találtak összefüggést az MDA koncentrációja és a légzésfunkciós értékek között (206). Moussa és mtsai. szignifikáns korrelációt találtak a szérum MDA szint és a 6 perces járástávolság, valamint egyes, fizikai aktivitást jellemző mutatók között (201).

### **3. CÉLKITŰZÉSEK**

Munkám célja egyrészt a COPD patomechanizmusában feltételezetten szerepet játszó eikozanoidok és lipidperoxidációs markerek légúti mintákból való kimutathatóságának összehasonítása volt. Másrészt, vizsgálni kívántam e molekulák koncentráció-változását a COPD-s betegek köpetében stabil klinikai állapotban, akut exacerbációban és az exacerbáció kezelése után. E célkitűzésekre az alábbi három vizsgálatsorozat keretén belül kerestem a választ:

- 1. Invazív és non-invazív légúti mintavételi módszerek összehasonlítása különböző eikozanoidok kimutathatóságára vonatkozóan.**
- 2. Köpet LTB<sub>4</sub>, cisz-LT, PGE<sub>2</sub> és 8-izoprosztán szintjének vizsgálata COPD akut exacerbációjában és az exacerbáció kezelése után.**
- 3. Az oxidatív stressz vizsgálata COPD-ben a légúti MDA koncentráció mérésén keresztül.**

## 4. MÓDSZEREK

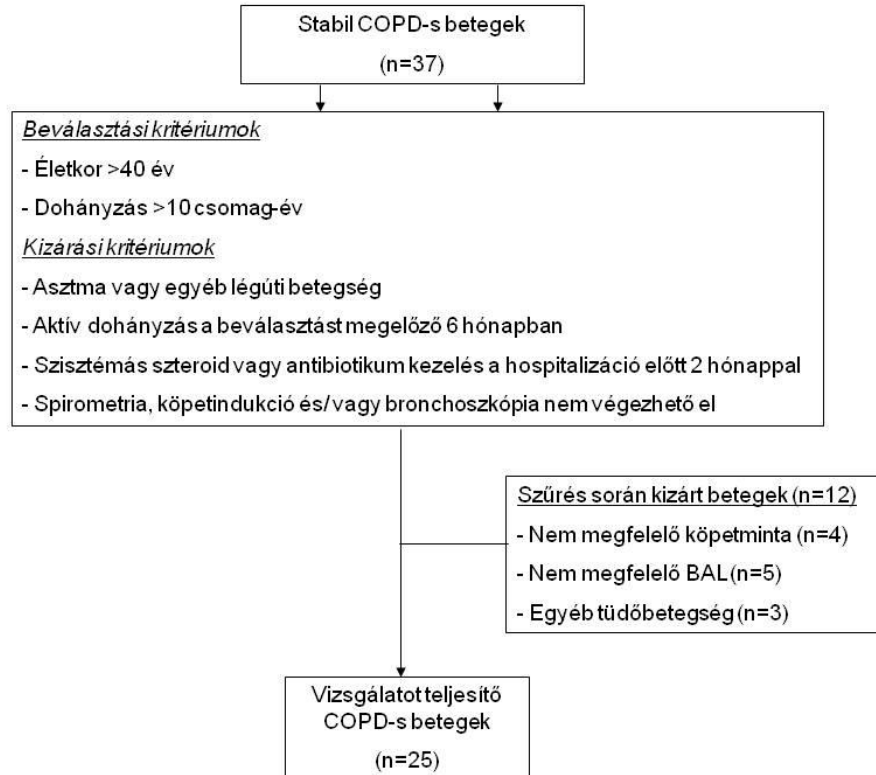
A COPD-s betegek beválasztása a vizsgálatokba az Országos Korányi Tbc és Pulmonológiai Intézetben kezelt betegek közül történt. A dolgozatban ismertetett vizsgálatokat a vonatkozó etikai törvények és az Országos Korányi Tbc és Pulmonológiai Intézet Etikai Bizottságának engedélyével végeztük. Valamennyi beteg a vizsgálatokra vonatkozó részletes betegtájékoztatót kapott és írásos beleegyező nyilatkozatot írt alá.

### 4.1. Invazív és non-invazív légúti mintavételi módszerek összehasonlítása különböző eikozanoidok kimutathatóságára vonatkozóan.

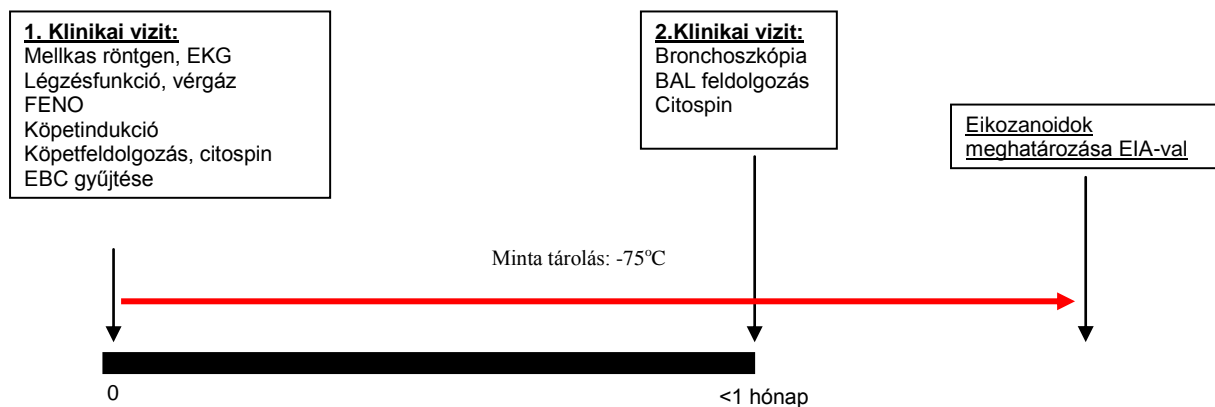
#### 4.1.1. Betegek és vizsgálati protokoll

Keresztmetszeti vizsgálatunkba stabil állapotú, 40 évnél idősebb, GOLD II-III súlyosságú, ex-dohányos COPD-s beteget vontunk be, akik minimum 6 hónapja felhagytak a dohányzással (9. ábra). Kizárási kritériumot jelentett az anamnézisben szereplő (i) asztma bronchiale vagy egyéb fennálló tüdőbetegség (pneumonia, interstitialis tüdőbetegség, tüdődaganat stb.), (ii) aktív dohányzás a vizsgálatot megelőző 6 hónapban, (iii) szisztémás kortikoszteroid vagy antibiotikum kezelés akut exacerbáció miatt az elmúlt 2 hónapban, valamint (iv) gyenge klinikai állapot és/vagy súlyos nehézlégzés, amely nem tette lehetővé a bronchoszkópia, köpetindukció vagy a légzésfunkciós mérések elvégzését.

Az ambuláns vizitek során minden résztvevő légzésfunkciós vizsgálaton vett részt, mértük a FENO szintjét, továbbá rutin klinikai és vérvizsgálat, illetve vérgáz mérés történt (10. ábra). Ugyanazon napon a résztvevőktől indukált köpetet és EBC-t gyűjtöttünk. A bronchoszkópia a fent említett vizsgálatokat követően egy másik napon zajlott. A gyűjtött mintákat a mérések előtt  $-75^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.



9. ábra. Az 1. vizsgálat beválasztási/ kizárási kritériumai



10. ábra. Az 1. vizsgálat folyamatábrája

FENO: frakcionált kilégzett nitrogén-monoxid, EBC: kilégzett levegő kondenzátum, EIA: enzim immunoassay

#### 4.1.2. Légzésfunkciós vizsgálatok

A légzésfunkciós vizsgálatokat elektronikus spirométerrel (Medicor, MS-11, Piston Ltd., Budapest, Magyarország) végeztük, a vizsgálat során a rutin légzésfunkciós paramétereket, mindenekelőtt a forszírozott kilégzési másodperc térfogatot ( $FEV_1$ ) határoztuk meg.

#### **4.1.3. FENO-mérés**

A FENO mérése kemilumineszcens módszerrel történt (Model LR2500, Logan Research, Rochester, UK). A készüléket ismert NO koncentrációjú gázkeverékkel kalibráltuk (BOC Special gases, Guilford, UK). A FENO mérése a teljes tüdőkapacitás szintjéről indulva, lassú kilégzés mellett (5-6 L/min), 20-30 sec alatt, 50 mL/sec kilégzési áramlás mellett  $0,4 \pm 0,05$  Hgmm ellenállással szemben történt. A betegek a mérés alatt orrklippet nem viseltek.

#### **4.1.4. Bronchoszkópia**

A BAL gyűjtése során a hanyattfekvő vagy félig ülő helyzetben lévő betegbe helyi érzéstelenítés után, a vér oxigénszaturációjának állandó monitorozása mellett flexibilis endoszkóp került bevezetésre. A bal felső tüdőlebenybe történt 5x20mL 0,9%-os sóoldat (NaCl) befecskendezése után lassú visszazívással nyert BAL mintát steril gézen átfiltráltuk és centrifugáltuk (400g, 4°C, 15 min), majd a mérésekig -75°C-on tároltuk.

#### **4.1.5. EBC gyűjtése**

Az EBC gyűjtése konstans körülmények között EcoScreen kondenzáló eszközzel (Jaeger, Hoechberg, Németország) történt. A mintavétel során a vizsgált személyek szájöblítést követően 10 percen keresztül nyugalmi légzési volumennel és frekvenciával egy előzetesen lehűtött gyűjtőtartályba lélegeztek. Az EBC mintákat a mérések előtt -75°C-on tároltuk.

#### **4.1.6. Indukált köpet gyűjtése**

A köpetindukció rövid-hatású hörgőtágító (Salbutamol, Ventolin<sup>®</sup>, GlaxoSmithKline Kft. Budapest, Magyarország) előkezelés után, orvosi felügyelet mellett történt. Az indukció során a beteg egy ultrahangos porlasztó (Ultra-Neb 2000, DeVilbiss Healthcare Ltd., Tipton, UK) segítségével hipertóniás (2-4%) NaCl oldatot lélegzett be 10 percen át, majd a felköhögött légúti váladékát (köpetét) egy steril tartályba ürítette.

#### **4.1.7. Köpet feldolgozása**

A köpetminták a mintavételt követően két órán belül feldolgozásra kerültek. Homogenizálásuk 0,1%-os DTT-t tartalmazó foszfát-puffer (PBS) hozzáadásával történt. A homogenizátumot egy 40 µm pórusátmérőjű szűrőn át szűrtük, majd centrifugáltuk és citospint készítettünk belőle. A sejtek viabilitását tripánkék-festéssel mikroszkóp alatt

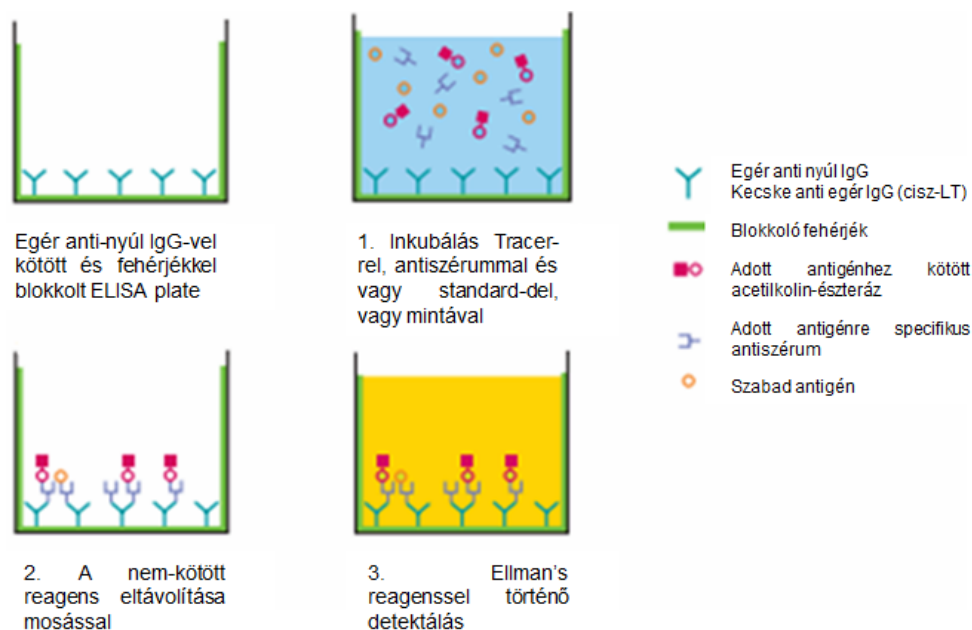
határoztuk meg. A köpetmintát akkor tartottuk megfelelőnek, ha a sejtszámolás során a laphámsejtek aránya 20% alatt volt.

#### 4.1.8. Citospin és sejtmegoszlás meghatározás

May-Grünwald-Giemsa oldattal festett citospineken differenciált sejtszámolást végeztünk. Preparátumonként legalább 400 gyulladásos sejtet számoltunk. Vizsgálati eredményeinkben a különböző sejttípusok (makrofág, neutrofil és eozinofil granulocita és limfocita) gyakoriságát százalékos arányban adtuk meg az összes gyulladásos sejt számához viszonyítva.

#### 4.1.9. Arachidonsav-származékok mérése

A légúti minták  $LTB_4$ , cisz-LT, 8-izoprosztán és  $PGE_2$  stabil derivátumának koncentrációját enzim immunoassay technikával (EIA, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) határoztuk meg a gyártó utasításait követve. Az antigén-antitest reakción alapuló eljárásban az enzimmel (acetilkolin-észteráz) jelzett antigén keveredik a vizsgálati minta antigénjeivel, és az antigének között kompetíció alakul ki a korlátozott mennyiségű eikozanoid-specifikus antitestekhez való kötődésért. Az antitestekhez kötődő eikozanoid-enzim konjugátum mennyisége fordítottan arányos a mérendő eikozanoid koncentrációjával. A nem kötött antigéneket azután eltávolítják a rendszerből és kromogén szubsztrátot (Ellman's reagens) hozzáadva a rendszer enzimatis aktivitása spektrofotometriás módszerrel mérhető. Az eljárás lényegét a 12. ábra foglalja össze.



11. ábra. Az AChE-alapú EIA technika sematikus ábrája (207)

*AChE*: acetilkolin-észteráz, EIA: enzim immunoassay, ELISA: enzimmel kapcsolt immunoszorbens assay, IgG: immunoglobulin G

Az egyes eikozanoidokra meghatározott detekciós limitek a következők voltak: LTB<sub>4</sub>: 13 pg/mL; 8-izoprosztán: 2,7 pg/mL; cisz-LT: 20 pg/mL, illetve PGE<sub>2</sub>: 2 pg/mL.

#### **4.1.10. Az EIA mérések reprodukálhatósága köpetben**

Az EIA mérések reprodukálhatóságát egy előkísérlet során vizsgáltuk meg, melynek során összesen 6 COPD-s betegtől gyűjtöttünk köpetet. Minden mintát két részre osztottunk, melyekből párhuzamosan eikozanoidok mérése történt.

#### **4.1.11. Statisztikai analízis**

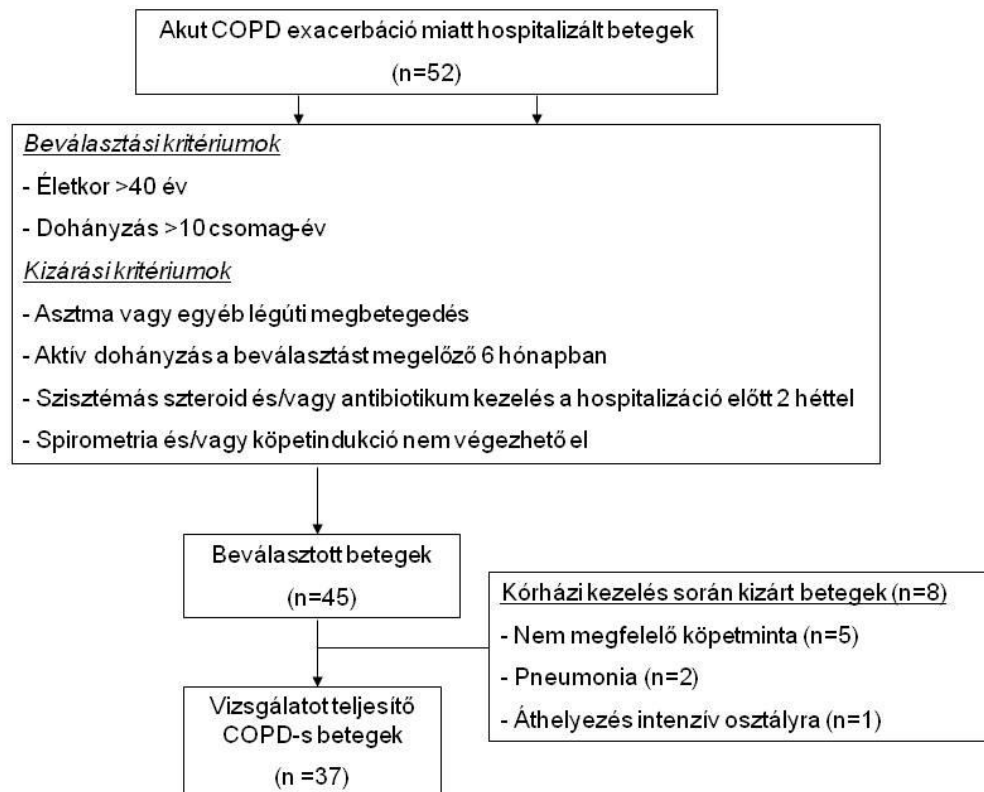
Az adatokat átlag  $\pm$  SEM vagy medián (interquartilis tartomány) formában adtuk meg. A lipidmediátorok koncentrációinak összehasonlítását Mann-Whitney próba alkalmazásával végeztük. A korrelációkat a Spearman (nem-parametrikus adatok) és a Pearson (parametrikus adatok) módszerrel vizsgáltuk. A statisztikai elemzéshez a GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) szoftvert használtuk. A  $p < 0,05$  értékeket tekintettük szignifikánsnak.

## 4.2. Köpet LTB<sub>4</sub>, cisz-LT, PGE<sub>2</sub> és 8-izoprosztán szintjének vizsgálata COPD akut exacerbációjában és az exacerbáció kezelése után.

### 4.2.1. Betegek és vizsgálati protokoll

A vizsgálatot 37 akut exacerbáció miatt az Országos Korányi Tbc és Pulmonológiai Intézetbe felvett és kezelt COPD-s betegen, valamint 25 klinikailag stabil COPD-s betegen végeztük el. A kórházba került betegek beválasztási és kizárási kritériumait, valamint a kórházi kezelés során kizárt betegek adatait a 12. ábra foglalja magában.

Az exacerbációban lévő COPD-s betegekből spontán köpetgyűjtésre, valamint FENO, vérgáz és légzésfunkciós mérésre két alkalommal került sor: először a betegek kórházi felvételekor, majd másodszer a kezelés után a betegek kórházból való távozásakor (13. ábra). A stabil betegekből ambuláns vizitek alkalmával indukált köpetet gyűjtöttünk. A betegek kórházi terápiáját a betegek mindenkori kezelőorvosa határozta meg. A kezelőorvosok a vizsgálatban közvetlenül nem voltak érintettek.



12. ábra. A 2. vizsgálat beválasztási/kizárási kritériumai





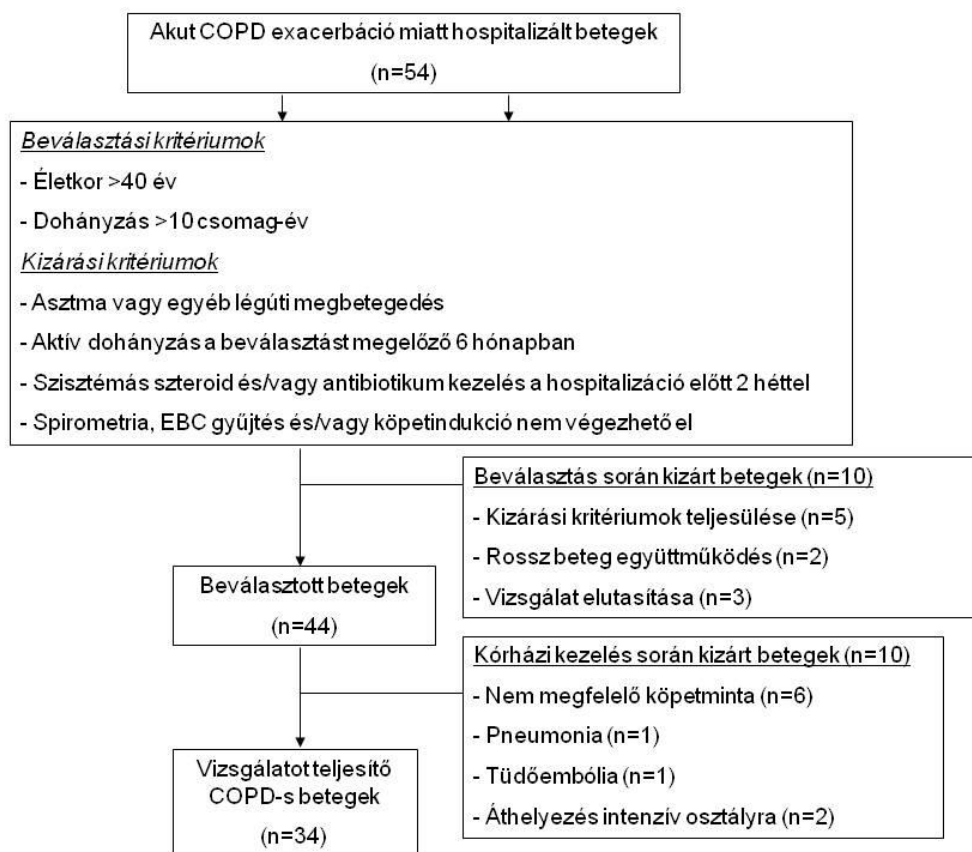
Prism 4.0 (GraphPad Software Inc.) szoftvert használtuk. A  $p < 0,05$  értékeket tekintettük szignifikánsnak.

### **4.3. Az oxidatív stressz vizsgálata COPD-ben a légúti MDA koncentráció mérésén keresztül.**

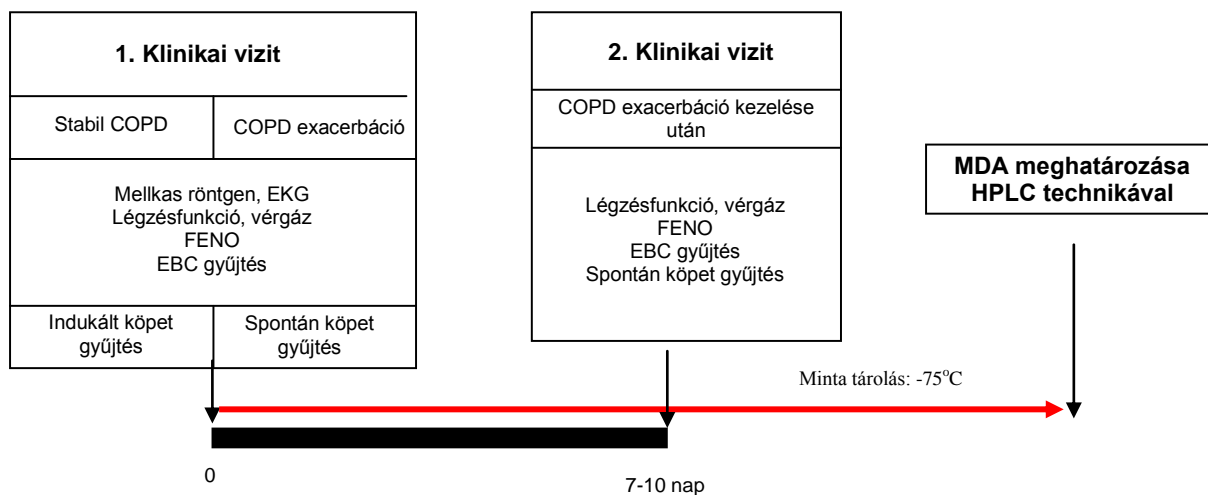
#### **4.3.1. Betegek és vizsgálati protokoll**

A vizsgálatot 34 akut exacerbáció miatt az Országos Korányi Tbc és Pulmonológiai Intézetbe felvett és kezelt COPD-s betegen végeztük el. A vizsgálatba történő beválasztási és kizárási kritériumokat, valamint a vizsgálat során kizárt betegek adatait a *14. ábra* foglalja össze. A vizsgálatba a fentiek mellett 21 stabil COPD-s beteg, valamint 20 egészséges kontroll személy került még bevonásra.

Az akut exacerbációban lévő COPD-s betegektől két alkalommal, először a kórházi felvétel napján, majd másodszor a kezelést követően, a távozás napján gyűjtöttünk spontán köpetet, valamint EBC-t (*15. ábra*). A stabil COPD-s betegekből és az egészséges kontroll személyekből ambuláns klinikai vizsgálat során indukált köpetet, valamint EBC-t gyűjtöttünk. A vizsgálatok során mértük a résztvevők légzésfunkcióját, vérgáz paramétereit, valamint a FENO értékét is. A betegek kórházi terápiáját a betegek mindenkori kezelőorvosai határozták meg. A kezelőorvosok a vizsgálatban közvetlenül nem voltak érintettek.



14. ábra. A 3. vizsgálat beválasztási/kizárási kritériumai



15. ábra. A 3. vizsgálat folyamatábrája

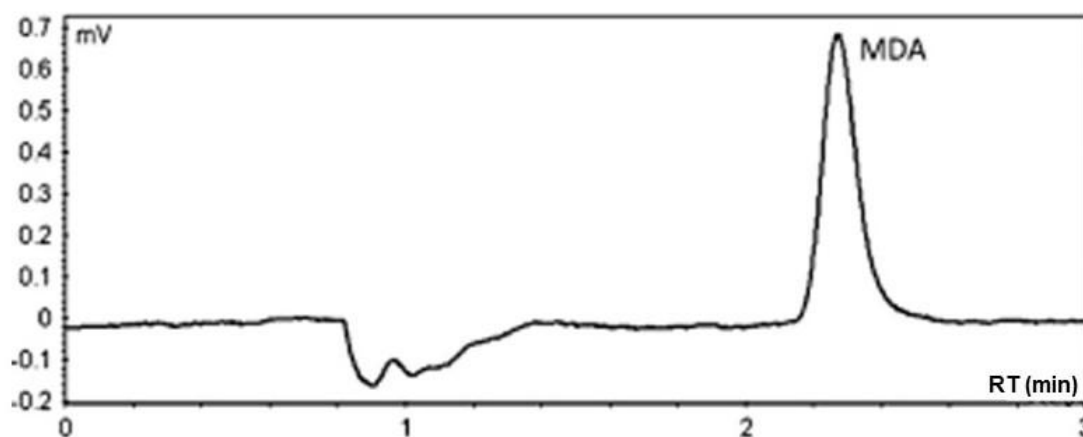
FENO: frakcionált kilégzett nitrogén-monoxid, EBC: kilégzett levegő kondenzátum, HPLC: nagy teljesítményű folyadékkromatográfia

#### 4.3.2. Légzésfunkciós vizsgálatok, FENO-mérés, EBC- és köpetgyűjtés, mintafeldolgozás

A légzésfunkciós vizsgálatok az 4.1.2. pontban foglaltakkal megegyezően történtek. A FENO mérését az 4.1.3. pontban foglaltak szerint, míg az indukált köpet gyűjtését és feldolgozását a 4.1.6., illetve a 4.1.7-8. pontok szerint végeztük.

### 4.3.3. MDA meghatározása

A köpetfelülúszók és az EBC minták MDA koncentrációját nagy teljesítményű folyadékkromatográfiával (HPLC) határoztuk meg. A méréseket fluoreszcens detektorral felszerelt HPLC készülékkel (Jasco FP-2020 Plus, ABL&E-Jasco Ltd., Budapest, Magyarország) végeztük. A mérési egység detektorból, légmentesítőből, kétcsatornás pumpából, automata mintaadagolóból és kolonna termosztátból épült fel. Az MDA meghatározásához megfelelő kitet és MDA HPLC-oszlopot használtunk (MDA Reagens kit, Chromsystems GmbH, München, Németország). A köpet és EBC minták preparálását a forgalmazó cég által javasolt protokoll szerint végeztük. A mintákból 25  $\mu\text{L}$ -t fénytől védett reakciócsövekbe pipettáztunk és 125  $\mu\text{L}$  Precipitációs Reagenst adtunk hozzá, majd a mintákat rövid vortexelés után lecentrifugáltuk (5 perc, 13000 rpm). A felülúszóból 125  $\mu\text{L}$ -t derivatizációs csövekbe pipettáztunk és 25  $\mu\text{L}$  Derivatizációs Reagens adtunk hozzá. Az így kapott elegyet egy órán át  $95^{\circ}\text{C}$ -os vízfürdőben inkubáltuk. Az inkubálás és gyors hűtés után a mintákhoz 125  $\mu\text{L}$  Neutralizációs Reagenst adtunk. A feldolgozott mintákból 20  $\mu\text{L}$ -t injektáltunk a HPLC-rendszerbe. A mérések  $1,0 \text{ mL/min}$  áramlási sebesség mellett  $515 \text{ nm}$  excitációs, illetve  $553 \text{ nm}$  emissziós hullámhosszon történtek. Az MDA típusos kromatogramját a 16. ábra szemlélteti. A méréseknél intra- és inter-assay reprodukálhatóságot (lásd. 4.3.4. pont) és napi-variabilitást (lásd. 4.3.5. pont) számoltunk. A köpetindukciónak az MDA szintre gyakorolt hatását előkísérletekben vizsgáltuk.



16. ábra. Egészséges kontroll személy köpetében mért MDA reprezentatív kromatogramja

#### **4.3.4. A köpetindukció hatásának vizsgálata**

A köpetindukciónak az MDA szintre gyakorolt hatását előkísérletben vizsgáltuk. Ennek során 10 betegől gyűjtöttünk párhuzamosan spontán és indukált köpetet, és mértük azok MDA koncentrációját.

#### **4.3.5. MDA-mérések intra-assay és inter-assay variabilitása**

Az MDA-mérések intra-assay variabilitásának meghatározásához 6 stabil COPD-s és 6 egészséges kontrol személy EBC-jét (n=12) és köpetét (n=12) vizsgáltuk. Mintafeldolgozás és az MDA koncentrációjának mérése után a maradék mintákat két héten keresztül 4°C-on tároltuk, majd újra meghatároztuk az MDA szintjét.

Az MDA-mérések inter-assay variabilitásának meghatározásához a köpet és EBC minták egy csoportját (n=12) két részre osztottuk, majd ezeket külön-külön feldolgoztuk és meghatároztuk a minták MDA szintjét.

#### **4.3.6. MDA-mérések napok közötti variabilitása**

Az MDA-mérések napok-közötti variabilitásának vizsgálatához a stabil COPD-s betegek (n=12) egy alcsoportjától két egymást követő napon EBC és spontán köpetmintát gyűjtöttünk, majd a mintákat külön-külön feldolgoztuk és mértük ezek MDA koncentrációját.

#### **4.3.7. Statisztikai analízis**

Az adatokat átlag  $\pm$  SEM, illetve medián (interkvartilis tartomány) formátumban adtuk meg. Az MDA koncentrációk összehasonlítását egyutas ANOVA-t követő Neuman-Keuls teszttel végeztük. A kórházi felvételnél és a kezelést követően mért MDA koncentrációk és klinikai paraméterek összehasonlításához párosított Student-féle *t*-tesztet (paraméteres adatok) és Wilcoxon próbát (nem-paraméteres adatok) alkalmaztunk. Az egészséges, valamint a stabil állapotú betegek klinikai adatainak összehasonlítását párosítatlan *t*-teszttel vagy Mann-Whitney teszttel végeztük. A korrelációkat a Spearman (nem-parametrikus adatok) vagy a Pearson teszttel (parametrikus adatok) számoltuk. Az MDA-mérések reprodukálhatóságát és variabilitását a variációs koefficiens (CV) kiszámításával és a Bland-Altman tesztetel határoztuk meg. A statisztikai kiértékeléshez a GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software Inc) használtuk. A  $p < 0,05$  értékeket tekintettük szignifikánsnak.

## 5. EREDMÉNYEK

### 5.1. Invazív és non-invazív légúti mintavételi módszerek összehasonlítása az eikozanoidok kimutathatóságára vonatkozóan.

#### 5.1.1. A résztvevők demográfiai és klinikai adatai

A vizsgálatba beválasztott 25 stabil COPD-s beteg demográfiai adatait, klinikai változóit, valamint a köpet sejtprofilját a 3. táblázat foglalja össze.

#### 3. táblázat. A stabil COPD-s betegek demográfiai és klinikai adatai

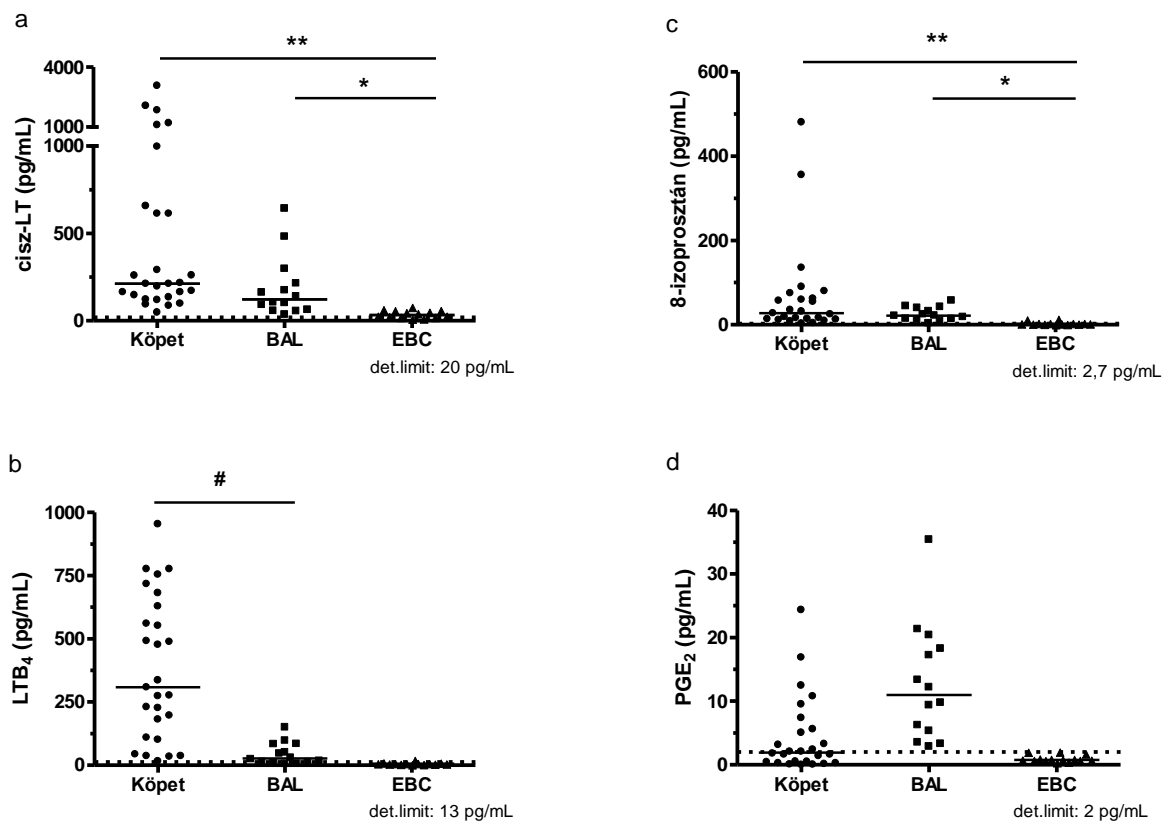
Az adatok átlag  $\pm$  SEM formában szerepelnek, kivéve, ha ezt másképp jelöltük. FEV<sub>1</sub>: forszírozott kilégzési térfogat 1 másodperc alatt, PaCO<sub>2</sub>: parciális szén-dioxid nyomás, PaO<sub>2</sub>: parciális oxigén nyomás, FENO: frakcionált kilégzett nitrogén-monoxid. ppb: részecske per milliárd, †medián (interkvartilis tartomány)

	Stabil COPD n=25
Nem (férfi/nő, n)	13 / 12
Életkor (év)	62,1 $\pm$ 1,8
Dohányzás (csomag-év)	48,1 $\pm$ 4,8
<b>GOLD (n,%)</b>	
<b>I.</b>	5 (20)
<b>II.</b>	12 (48)
<b>III.</b>	8 (32)
<b>Légzésfunkció</b>	
FEV <sub>1</sub> (L)	2,91 $\pm$ 0,1
FEV <sub>1</sub> (%)	63,4 $\pm$ 4,5
<b>Vérgáz</b>	
PaCO <sub>2</sub> (kPa)	5,1 $\pm$ 0,1
PaO <sub>2</sub> (kPa)	8,4 $\pm$ 0,21
FENO (ppb) <sup>†</sup>	8,6 (5,6 - 9,9)
<b>Köpet sejtprofil (<math>\square 10^6/g</math>)<sup>†</sup></b>	
Teljes sejtszám	0,8 (0,40-1,750)
Neutrofil granulocita	0,65 (0,34-1,16)
Eozinofil granulocita	0 (0-0,01)
Makrofág	0,05 (0,01-1,5)
Limfocita	0,02 (0,01-0,04)

#### 5.1.2. Eikozanoidok koncentrációjának összehasonlítása köpetben, BAL-ban, EBC-ben

A cisz-LT-ek, a LTB<sub>4</sub> és a 8-izoprosztán koncentrációja magasabb volt a köpetben, mint a BAL-ban (cisz-LT: 211,9 [128,6-827,1] pg/mL vs. 122,5 [60,4-256,1] pg/mL; 8-izoprosztán: 29,7 [13,8-60,8] vs. 22,0 [12,7-57,7] pg/mL, p>0,05), bár statisztikailag szignifikáns

különbséget csak a  $LTB_4$  esetében tudtunk kimutatni (276,1 [105,4-594,7] vs. 27,5 [10,7-84,3] pg/mL,  $p < 0,05$ ; 17. ábra). A  $PGE_2$  koncentrációja a BAL-ban kismértékben magasabb volt, mint a köpetben, a különbség azonban nem volt szignifikáns (3,0 [0,8-14,6] vs. 11,3 [7,1-18,3],  $p > 0,05$ ). EBC-ben a négy marker közül csak a cisz-LT-eket tudtuk minden mintában a detekciós limit feletti tartományban kimutatni, szintjük az EBC-ben szignifikánsan alacsonyabb volt a köpethez és a BAL-hoz képest (33,8 [19,9-58,1] pg/mL,  $p < 0,05$  és  $p < 0,001$ ). A 8-izoprosztán az EBC minták 73%-ban volt kimutatható a detekciós limit felett, a mediátor szintje azonban itt is alacsonyabb volt, mint a BAL-ban vagy a köpetben ( $p < 0,05$  és  $p < 0,001$ ; 17. ábra) A  $LTB_4$  és a  $PGE_2$  az EBC mintákban nem volt kimutatható a kiték detekciós limitje feletti méréstartományban.



17. ábra. Az eikozanoidok („a-d” panel) koncentrációja a stabil állapotú COPD-s betegek köpetében, EBC-ben és BAL-ban

### 5.1.3. Az eikozanoid mérések reprodukálhatósága

Ugyanazon köpetminta két részre osztása után a két aliquotból történt eikozanoid-mérés hasonló eredményt adott ( $p > 0,05$ ), a variációs koefficiens (CV) értéke 15,4 és 20,8% között mozgott, az egyezési tartomány (Bland-Altman teszt) a  $LTB_4$ -nél volt a legnagyobb.

#### 5.1.4. Korrelációk a mediátorok, valamint a köpet sejtprofilok között

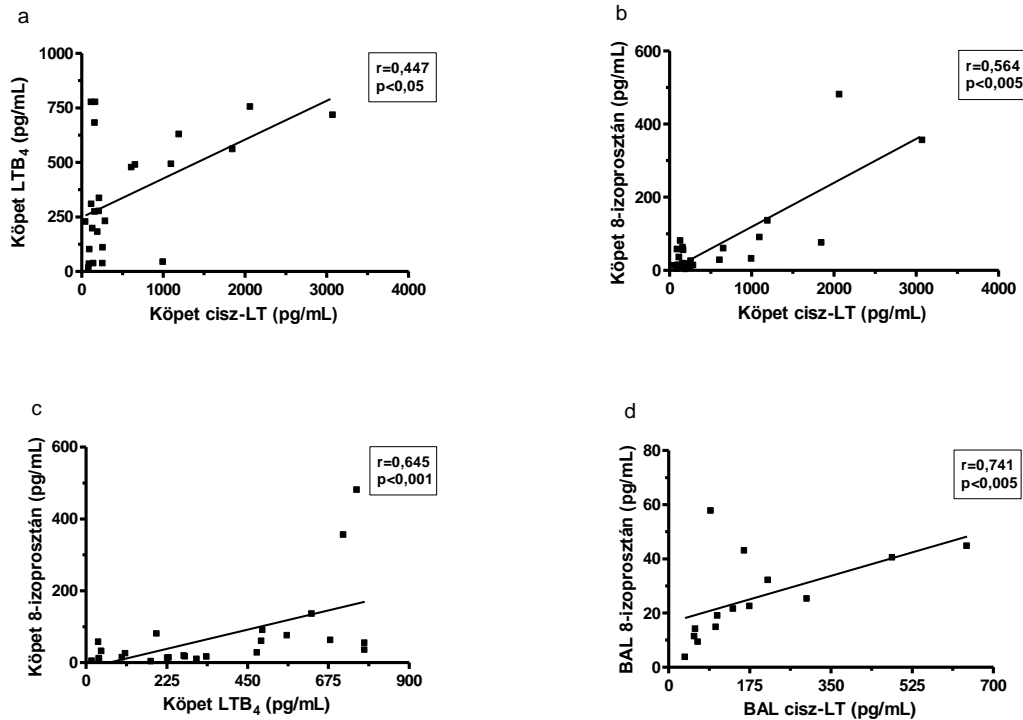
A vizsgálat során egyrészt összefüggéseket kerestünk a mintákban mérhető különböző eikozanoidok koncentrációi között, másrészt azt elemeztük, hogy van-e korreláció ugyanazon markernek a különböző légúti mintákban mért koncentrációi között. Végül azt vizsgáltuk, hogy a köpet és a BAL gyulladásosejtprofilja mutat-e kapcsolatot ezen minták eikozanoid koncentrációival.

A köpet  $LTB_4$  és a 8-izoprosztán szintje szignifikáns pozitív korrelációt mutatott a köpet cisz-LT koncentrációjával ( $LTB_4$ :  $r=0,447$ ,  $p<0,05$ ; 8-izoprosztán:  $r=0,564$ ,  $p<0,005$ ; *18/a,b ábra*). A 8-izoprosztán szint a BAL-ban is szignifikánsan korrelált a BAL cisz-LT szinttel ( $r=0,741$ ,  $p<0,005$ ; *18/d ábra*). A köpetben további szignifikáns összefüggést találtunk a 8-izoprosztán és a  $LTB_4$  koncentrációk között ( $r=0,645$ ,  $p<0,001$ ; *18/c ábra*). A  $PGE_2$  szintje más mediátorokkal egyik légúti mintában sem mutatott korrelációt (adatot nem mutatjuk).

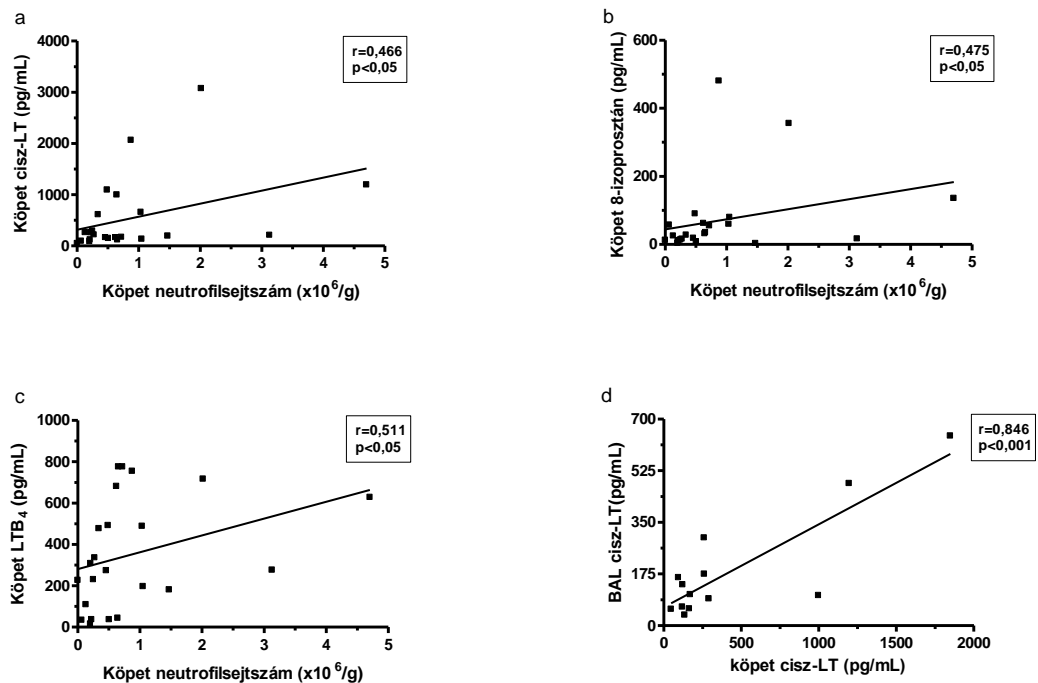
A köpet neutrofilejtszáma szignifikáns pozitív korrelációt mutatott a köpet cisz-LT ( $r=0,466$ ,  $p<0,05$ ), 8-izoprosztán ( $r=0,475$ ,  $p<0,05$ ) és  $LTB_4$  koncentrációjával ( $r=0,511$ ,  $p<0,05$ ; *19/a,b,c ábra*). A köpet neutrofilejtszámához hasonlóan a köpet teljes sejtszáma is pozitív korrelációt mutatott a köpet cisz-LT ( $r=0,435$ ,  $p<0,05$ ), 8-izoprosztán ( $r=0,452$ ,  $p<0,05$ ) és  $LTB_4$  koncentrációjával ( $r=0,455$ ,  $p<0,05$ ; *20/a,b,c ábra*). Más sejttípusok összefüggést a légúti eikozanoid szintjeivel nem mutattak. Hasonlóan, a BAL egyetlen sejttípusa sem mutatott összefüggést az eikozanoid koncentrációkkal (adatokat nem mutatjuk).

Ugyanazon mediátornak a különböző légúti mintáiban mért szintjeit elemezve szignifikáns korrelációt kaptunk a köpetben és BAL-ban mért cisz-LT koncentrációk között ( $r=0,846$ ,  $p<0,001$ ; *19/d ábra*). A többi lipid mediátor szintje nem mutatott összefüggést a köpetben és a BAL-ban. Hasonlóan, a betegek légzésfunkciós és FENO értékei sem mutattak összefüggést az eikozanoidok koncentrációival (adatokat nem mutatjuk).

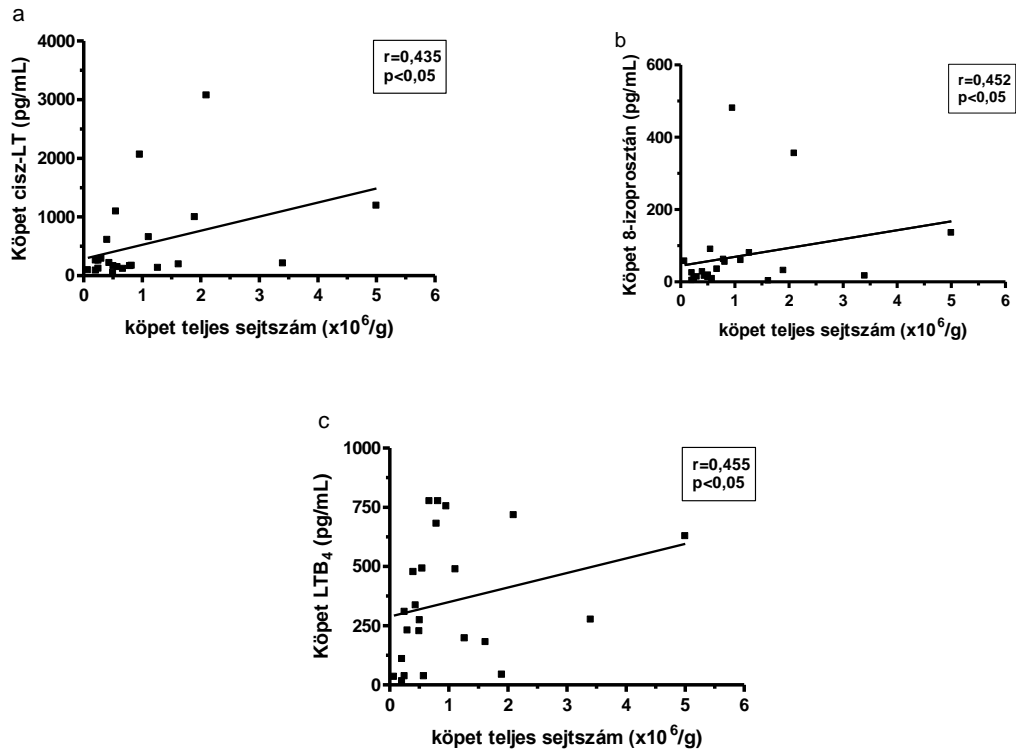




18. ábra. Korrelációk a különböző eikozanoidok szintjei között a köpetben („a-c” panel) és a bronchoalveolaris lavage (BAL)-ban („d” panel) stabil COPD-s betegekben. LTB<sub>4</sub>: leukotrién B<sub>4</sub>, cisz-LT: ciszteinil-leukotriének



19. ábra. Korrelációk a köpet neutrofilejtszáma és a köpet eikozanid koncentrációi között („a-c” panel), valamint különböző légúti minták, úgymint a köpet és a bronchoalveolaris lavage (BAL) cisz-LT szintje között („d” panel).

LTB<sub>4</sub>: leukotrién B<sub>4</sub>, cisz-LT: ciszteinil-leukotriének

20. ábra. Korrelációk a köpet teljes sejtszáma és a köpet eikozanoid koncentrációi között („a-c” panel).

LTB<sub>4</sub>: leukotrién B<sub>4</sub>, cisz-LT: ciszteinil-leukotriének

## 5.2. Köpet LTB<sub>4</sub>, cisz-LT, PGE<sub>2</sub> és 8-izoprosztán szintjének vizsgálata COPD akut exacerbációjában és az exacerbáció kezelése után.

### 5.2.1. A klinikai paraméterek változása az exacerbáció során és a kezelést követően

A vizsgált 54 exacerbációban levő COPD-s beteg közül 45 felelt meg a beválasztási kritériumoknak és egyezett bele a vizsgálatba. A kórházi kezelés során összesen 8 beteg került kizárásra, így a vizsgálatot végül 37 beteg fejezte be. A 37 COPD exacerbációban levő és a 25 stabil, kontrollként bevont COPD-s beteg adatait a 4. táblázatban foglaltuk össze.

#### 4. táblázat. Klinikai paraméterek változása az exacerbáció során és a kezelést követően

Az adatokat átlag ± SEM formátumban adtuk meg, kivéve, ha ezt másképp nem jelöltük. FVC: forszírozott vitálkapacitás, FEV<sub>1</sub>: forszírozott kilégzési térfogat 1 másodperc alatt, FENO: kilégzett frakcionált nitrogén-monoxid, ppb: részecske per milliárd, PaCO<sub>2</sub>: parciális szén-dioxid nyomás, PaO<sub>2</sub>: parciális oxigén nyomás \*p<0,05, #p<0,01 és \$p<0,001 vs. kórházi felvétel. †medián (interquartilis tartomány)

	Stabil COPD n=25	COPD exacerbáció n=37	
<b>Nem (férfi/nő, n)</b>	15 / 10	22 / 15	
<b>Életkor (év)</b>	62,1 ± 1,6	64,6 ± 2,2	
<b>Dohányzás (csomag-év)</b>	48,8 ± 4,8	45,8 ± 4,1	
<b>GOLD stádiumok (n, %)</b>			
<b>I.</b>	5 (20)	5 (13)	
<b>II.</b>	12 (48)	14 (38)	
<b>III.</b>	8 (32)	11 (30)	
<b>IV.</b>	-	7 (19)	
<b>Légzésfunkció</b>		Kórházi felvétel	Kezelés után
<b>FVC (L)</b>	3,55 ± 0,21	1,93 ± 0,13	2,23 ± 0,17 <sup>#</sup>
<b>FVC (%)</b>	84,7 ± 3,0	65,4 ± 3,4	76,5 ± 4,0 <sup>\$</sup>
<b>FEV<sub>1</sub> (L)</b>	2,91 ± 0,11	0,92 ± 0,08	1,14 ± 0,10 <sup>\$</sup>
<b>FEV<sub>1</sub> (%)</b>	63,4 ± 4,5	40,2 ± 2,7	49,6 ± 3,2 <sup>\$</sup>
<b>FEV<sub>1</sub>/FVC (%)</b>	50,8 ± 2,1	0,48 ± 0,03	0,53 ± 0,02 <sup>*</sup>
<b>Vérgáz</b>			
<b>PaCO<sub>2</sub> (kPa)</b>	5,14 ± 0,11	5,54 ± 0,13	5,80 ± 0,14
<b>PaO<sub>2</sub> (kPa)</b>	8,40 ± 0,21	6,81 ± 0,20	7,16 ± 0,15 <sup>*</sup>
<b>FENO (ppb)<sup>†</sup></b>	8,6 (5,6 - 9,9)	13,1 (8,4 - 26,5)	10,7 (6,9 - 17,3) <sup>*</sup>

A stabil és az exacerbációban lévő betegek között nem volt szignifikáns eltérés az életkort, nemi arányt és dohányzási szokásokat tekintve (p>0,05). Az exacerbációban lévő betegek között ugyanakkor GOLD IV-es stádiumú betegek (19%) is előfordultak. Az exacerbációs betegek kórházi kezelését követően a FEV<sub>1</sub>, FVC, FVC/FEV<sub>1</sub>, PaO<sub>2</sub>, valamint a FENO értékek szignifikánsan javultak (4. táblázat).

A kórházi kezelés alatt minden exacerbációban lévő beteg kortikoszteroid és hörgtágító kezelést (antikolinerg és/vagy  $\beta_2$ -agonista) kapott. Antibiotikus kezelésben összesen 25-en részesültek. A kórházi tartózkodás átlagos időtartama  $12,0 \pm 0,9$  nap volt. A kezelés javította a betegek légzésfunkciós értékeit és oxigenizációját ( $\text{PaO}_2$ ), a kedvező klinikai változásokkal párhuzamosan a köpet teljes sejtszáma, valamint neutrofil- és limfocitasejtszáma is csökkent (5. táblázat). A sejtek aránya ugyanakkor a köpetben nem változott.

5. táblázat. Köpet sejtprofiljának változás az exacerbáció kezelése során  
Az adatokat mediánban (interquartilis tartomány) adtuk meg. \* $p < 0,05$  és # $p < 0,01$  vs. kórházi felvétel

	Stabil COPD	COPD exacerbáció	
		Kórházi felvétel	Kezelés után
<b>Teljes sejtszám <math>\times 10^6/\text{g}</math></b>	0,6 (0,30-1,27)	2,4 (0,97-6,56)	1,2 (0,64-3,01)*
<b>Neutrofil granulocita</b>			
%	88 (79,1-91,4)	95 (90,0-97,2)	94 (89,9-96,2)
$\times 10^6/\text{g}$	0,6 (0,24-1,04)	1,9 (0,87-5,18)	1,0 (0,42-2,34)#
<b>Makrophág</b>			
%	7,5 (5,1-12,2)	1,5 (0,47-2,6)	2,5 (1,1-4,5)
$\times 10^5/\text{g}$	0,5 (0,1-1,4)	0,4 (0,13-1,3)	3,4 (0,07-0,74)
<b>Limfocita</b>			
%	3,9 (2,2-5,1)	2,3 (1,4-3,8)	2,5 (1,4-3,1)
$\times 10^4/\text{g}$	1,9 (1,0-3,4)	5,5 (1,9-16,5)	2,7 (1,0-4,7)#
<b>Eozinofil granulocita</b>			
%	0 (0-1,9)	0 (0-1,7)	0 (0-0,82)
$\times 10^4/\text{g}$	0 (0-0,2)	0 (0-2,6)	0 (0-1,7)

### 5.2.2. A spontán és indukált köpet eikozanoid koncentrációinak összehasonlítása

A spontán és indukált köpetekben mért eikozanoid szinteket a 6. táblázat foglalja össze. Nem találtunk számottevő eltérést indukált és spontán köpetminták eikozanoid koncentrációi között ( $p < 0,05$ ), ugyanakkor szoros korrelációt figyeltünk meg a két mintában mért értékek között ( $r > 0,72$ ,  $p < 0,05$ )

### 6. táblázat. Spontán és indukált köpetben mért eikozanoid koncentrációk

Az adatokat medián (interquartile tartomány) formában adtuk meg, kivéve, ha ezt másképp jelöltük. Cisz-LT: ciszteinil-leukotriének, PGE<sub>2</sub>: prosztaglandin E<sub>2</sub>, LTB<sub>4</sub>: leukotrién B<sub>4</sub>, CV: variációs koefficiens. #Bland-Altman teszt

Mediátorok	Köpet (pg/mL)		p érték	CV (%)	Egyezési tartomány <sup>#</sup>
	spontán	indukált			
<b>8-izoprosztán</b>	183,0 (4,1-1233)	195,7 (3,4-1299)	0,937	18,9	-179,1 és 127,2
<b>Cisz-LT</b>	446,5 (50,9-1563)	399,2 (151,3-1563)	0,902	22,0	-204,9 és 281,7
<b>PGE<sub>2</sub></b>	28,7 (6,6-80,6)	22,4 (2,2-81,4)	0,605	21,8	-13,2 és 22,1
<b>LTB<sub>4</sub></b>	973,5 (418,9-1654)	907,1 (346,2-1500)	0,798	14,8	-245,0 és 383,1

### 5.2.3. Eikozanoidok koncentrációjának meghatározása

#### 5.2.3.1. 8-izoprosztán

A betegek köpetében egy személytől eltekintve a 8-izoprosztán szintje mindig a detekciós limit feletti értéket mutatott. Az exacerbációban lévő betegek köpetében szignifikánsan magasabb 8-izoprosztán koncentráció volt mérhető, mint a stabil COPD-s betegekben (89,5 [36,9-184,7] vs. 29,7 [13,8-68,8] pg/mL,  $p < 0,01$ ; 21/a. ábra). A kórházi kezelést követően a 8-izoprosztán koncentrációja nem változott (84,1 [34,1-185,3] pg/mL,  $p > 0,05$ )

#### 5.2.3.2. Cisz-LT-ek

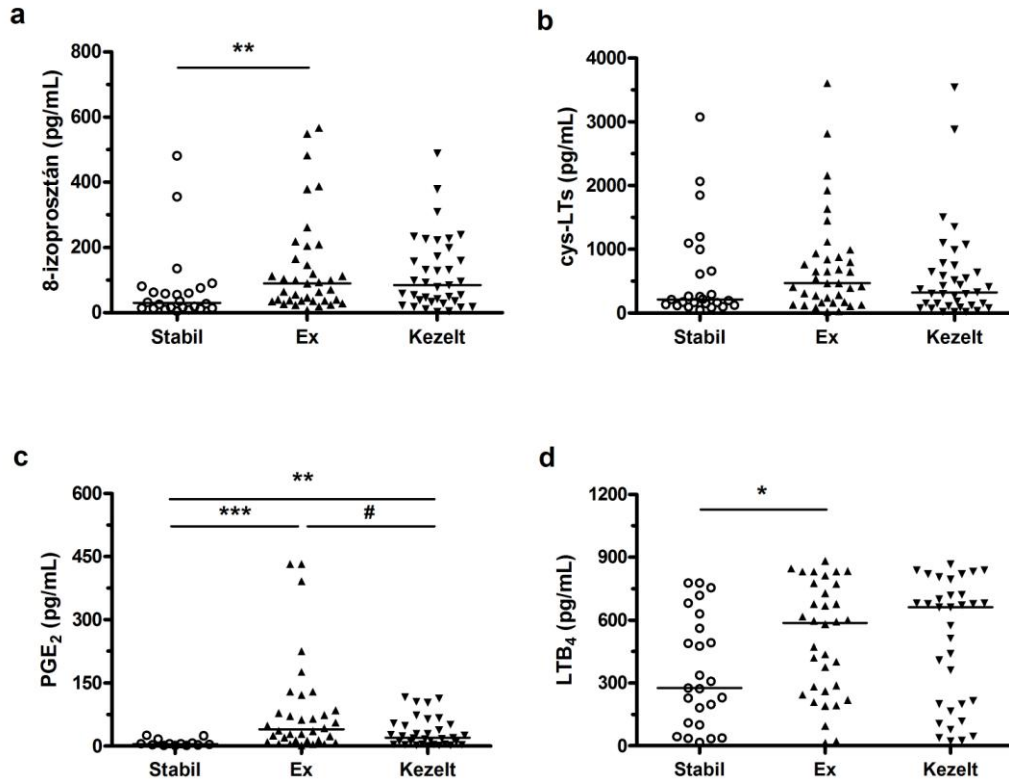
A cisz-LT-eket minden köpetmintában a detekciós határ felett tudtuk kimutatni. Bár az exacerbációs csoport cisz-LT szintje emelkedést mutatott a stabil állapotú csoporthoz viszonyítva, a változás statisztikailag nem volt szignifikáns (211,9 [128,6-827,1] vs. 469,9 [169,2-906,8] pg/mL,  $p > 0,05$ ; 21/b. ábra). A kórházi kezelés nem befolyásolta számottevően a köpet cisz-LT koncentrációját (324,2 [114,3-698,1] pg/mL,  $p > 0,05$ ).

#### 5.2.3.3. PGE<sub>2</sub>

A PGE<sub>2</sub>-t a stabil állapotú betegek közül csupán 16 esetben, míg az exacerbációs csoportban minden betegnél detektálni tudtuk. COPD exacerbációban a PGE<sub>2</sub> koncentrációja jelentősen magasabb volt, mint a stabil állapotú betegekben (39,8 [13,3-103,3] vs. 3,82 [1,77-6,63] pg/mL,  $p < 0,001$ ; 21/c. ábra), a kórházi kezelés pedig ezt az emelkedett szintet szignifikánsan csökkentette (19,6 [4,6-52,5] pg/mL,  $p < 0,01$ ).

### 5.2.3.4. LTB<sub>4</sub>

A LTB<sub>4</sub> minden résztvevő köpetében mérhető volt. Az exacerbációs csoportban szignifikánsan magasabb LTB<sub>4</sub> szintet mértünk, mint a stabil betegeknél (587,7 [252,9-774,8] vs. 276,1 [105,4-594,7] pg/mL,  $p < 0,05$ ; 21/d. ábra). A kórházi kezelés ugyanakkor nem befolyásolta a LTB<sub>4</sub> koncentrációját (661,5 [182,6-758,1] pg/mL,  $p > 0,05$ ).



21. ábra. Az eikozanoidok koncentrációja („a-c” panel) a stabil klinikai állapotú (stabil) és az exacerbációban lévő (ex) COPD-s betegek köpetében, valamint az exacerbációban lévő betegek kórházi kezelése (kezelt) után.

A vízszintes vonal a medián értéket jelzi. cisz-LT: ciszteinil-leukotriének, LTB<sub>4</sub>: leukotrién B<sub>4</sub>, PGE<sub>2</sub>: prosztaglandin E<sub>2</sub>. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  és \*\*\*  $p < 0,001$  COPD exacerbáció vs. stabil COPD, #  $p < 0,01$  exacerbáció vs. kezelés után

### 5.2.4. Korrelációk

A fontosabb korrelációkat a 7. táblázat és 22. ábra foglalja magába. Stabil betegeknél a köpet 8-izoprosztán és a LTB<sub>4</sub> koncentrációja szignifikánsan korrelációt mutatott a köpet neutrofilejtszámaival ( $p < 0,005$  és  $p < 0,05$ ), továbbá szoros összefüggést láttunk a 8-izoprosztán és a cisz-LT koncentrációk és a limfociták száma között is ( $p < 0,005$ ).

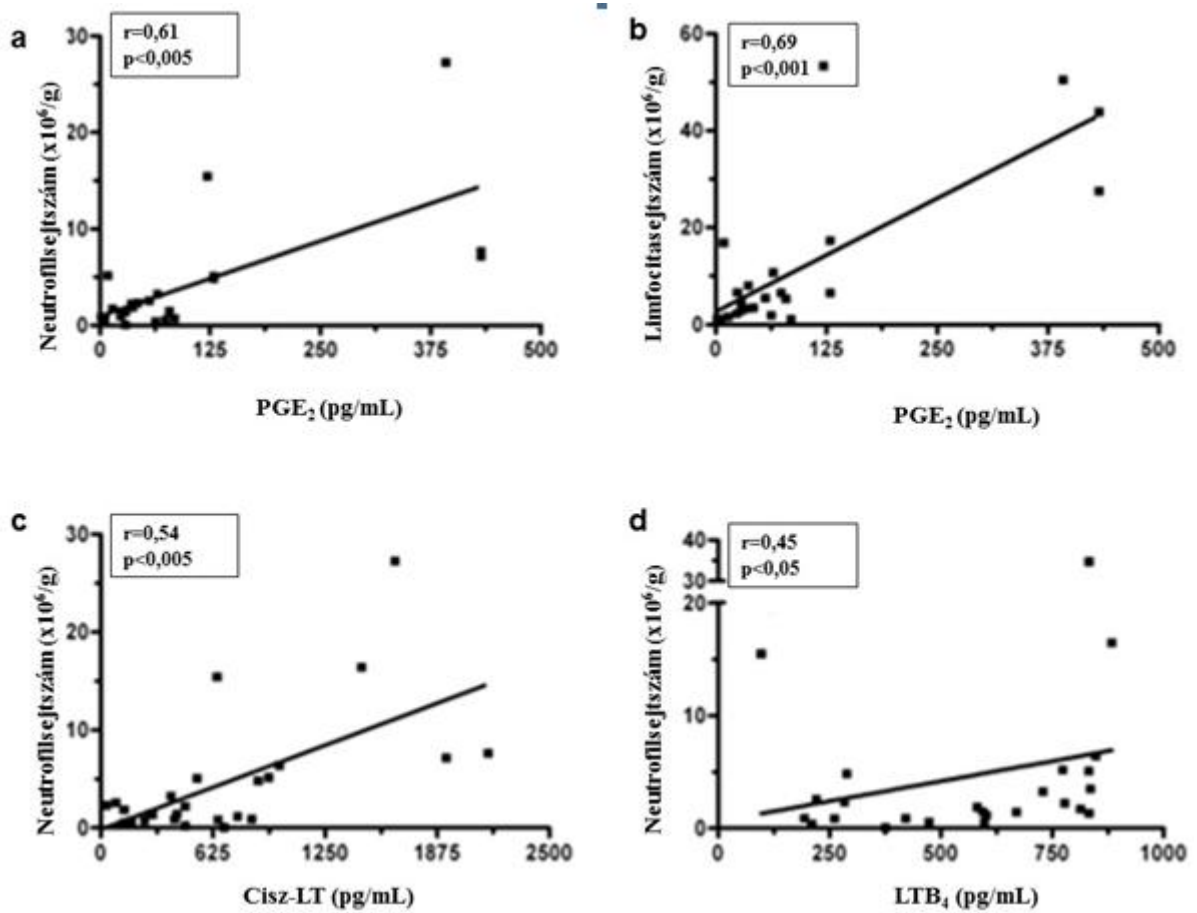
A COPD exacerbációban szenvedő betegek esetében szignifikáns összefüggést figyeltünk meg a PGE<sub>2</sub> szint és a köpet neutrofil -, valamint limfocitasejtszáma között ( $p < 0,005$ ) (22/a, b. ábra). További összefüggés mutatkozott a cisz-LT és a LTB<sub>4</sub> koncentrációk, valamint a neutrofilejtek száma között is ( $p < 0,05$  és  $p < 0,005$ ) (22/c, d. ábra), valamint a cisz-LT-nek és

a limfociták száma között ( $p < 0,005$ ). A felsorolt összefüggéseken kívül további szignifikáns korrelációkat nem találtunk, így nem volt összefüggés az eikozanoidok és a légzésfunkciós értékek vagy más klinikai paraméterek között sem (adatokat nem mutatjuk).

**7. táblázat. Korrelációk a köpet lipid mediátor koncentrációi, a klinikai paraméterek, valamint a köpet gyulladásos sejtjei között stabil és exacerbációban lévő COPD-s betegekben**

Cisz-LT: ciszteinil-leukotriének, LTB<sub>4</sub>: leukotrién B<sub>4</sub>, PGE<sub>2</sub>: prosztaglandin E<sub>2</sub>, FEV<sub>1</sub>: forszírozott kilégzési térfogat 1 másodperc alatt. †szignifikáns korrelációk

Klinikai változók	8-izoprosztán		cisz-LT		PGE <sub>2</sub>		LTB <sub>4</sub>	
	r érték	p érték	r érték	p érték	r érték	p érték	r érték	p érték
<b>Stabil COPD</b>								
FEV <sub>1</sub> (%)	-0,18	0,39	-0,13	0,52	-0,45	0,10	0,20	0,35
Neutrofil granulociták	0,61	0,004 <sup>†</sup>	0,39	0,07	0,18	0,53	0,52	0,013 <sup>†</sup>
Limfociták	0,64	0,002 <sup>†</sup>	0,60	0,003 <sup>†</sup>	0,27	0,35	0,38	0,084
<b>COPD exacerbáció</b>								
FEV <sub>1</sub> (%)	0,07	0,75	-0,37	0,07	0,03	0,91	-0,37	0,11
Neutrofil granulociták	-0,05	0,82	0,54	0,003 <sup>†</sup>	0,61	0,001 <sup>†</sup>	0,45	0,024 <sup>†</sup>
Limfociták	0,07	0,72	0,55	0,002 <sup>†</sup>	0,69	<0,001 <sup>†</sup>	0,24	0,25



22. ábra. Korrelációk a köpet eikozanoidok koncentrációi és a köpet neutrofil- („a, c és d” panel) és limfocitasejtszáma („b” panel) között az akut exacerbációban lévő COPD-s betegekben.

Cisz-LT: ciszteinil-leukotriének, LTB<sub>4</sub>: leukotrién B<sub>4</sub>, PGE<sub>2</sub>: prosztaglandin E<sub>2</sub>



### 5.3. Az oxidatív stressz vizsgálata COPD-ben a légúti MDA koncentráció mérésén keresztül.

#### 5.3.1. A klinikai paraméterek változása az exacerbáció kezelés során

A vizsgált 54 beteg közül összesen 44 felelt meg a beválasztási kritériumoknak; a kórházi kezelés során 10 résztvevő került kizárára a vizsgálatból. A vizsgálatot teljesítő 34 résztvevő demográfiai és klinikai adatait a 8. táblázat foglalja össze.

A kezelés során minden résztvevő szisztémás szteroid és rövid-hatású hörgőtágító (antikolinerg-  $\beta_2$ -agonista) kezelésben részesült, valamint - a résztvevők 73%-a - hosszú-hatású  $\beta_2$ -agonista és antikolinerg kezelést is kapott. Antibiotikus kezelésre 19 páciens szorult, míg oxigén terápiát a betegek 89%-ka kapott. A hospitalizáció átlagos időtartama  $10,9 \pm 1,5$  nap volt. A kezelés javította a légzésfunkciós és vérgáz ( $\text{PaO}_2$ ) értékeket, és csökkentette a köpet teljes és neutrofilejtszámát (9. táblázat).

#### 8. táblázat. A résztvevők demográfiai és klinikai adatai

Az adatokat átlag  $\pm$  SEM formában adtuk meg, kivéve, ha ezt másképp jelöltük. FVC: forszírozott vitálkapacitás,  $\text{FEV}_1$ : forszírozott kilégzési térfogat 1 másodperc alatt,  $\text{PaCO}_2$ : parciális szén-dioxid nyomás,  $\text{PaO}_2$ : parciális oxigén nyomás, FENO: frakcionált kilégzett nitrogén-monoxid. ppb: részecske per milliárd, \*  $p < 0,05$  és \*\*  $p < 0,001$  egészséges kontroll vs. stabil COPD; #  $p < 0,05$  és ##  $p < 0,001$  kezelés után vs. kórházi felvétel. † Medián (interquartilis tartomány).

	Egészséges kontroll	Stabil COPD	COPD exacerbáció	
	n=20	n=21	n=34	
Nem (férfi/nő, n)	10 / 10	13 / 8	20 / 14	
Életkor (év)	$61,8 \pm 1,6$	$63,1 \pm 1,8$	$64,2 \pm 2,5$	
Dohányzás (csomag-év)	$51,6 \pm 5,2$	$39,5 \pm 3,9$	$40,5 \pm 4,2$	
GOLD stádiumok (n, %)	-			
I.		4 (19)	2 (6)	
II.		12 (57)	10 (29)	
III.		5 (24)	15 (44)	
IV.		0 (0)	7 (21)	
			Kórházi felvétel	Kezelés után
<b>Légzésfunkció</b>				
$\text{FEV}_1$ (L)	$3,92 \pm 0,20$	$3,39 \pm 0,16$	$1,96 \pm 0,11$	$2,16 \pm 0,13^{\#}$
FVC (%)	$104,2 \pm 2,7$	$83,4 \pm 2,9$	$72,1 \pm 3,3$	$79,9 \pm 3,4^{\#\#}$
$\text{FEV}_1$ (L)	$2,93 \pm 0,14$	$1,74 \pm 0,13$	$0,94 \pm 0,07$	$1,11 \pm 0,08^{\#\#}$
$\text{FEV}_1$ (%)	$111,3 \pm 3,6$	$63,1 \pm 4,3^{**}$	$43,7 \pm 2,85$	$51,9 \pm 3,1^{\#\#}$
$\text{FEV}_1/\text{FVC}$ (%)	$77,0 \pm 1,4$	$49,4 \pm 2,2^{**}$	$0,48 \pm 0,02$	$0,52 \pm 0,02^{\#}$
<b>Vérgáz</b>				
$\text{PaCO}_2$ (kPa)	$5,2 \pm 0,13$	$5,2 \pm 0,12$	$5,33 \pm 0,17$	$5,64 \pm 0,21$
$\text{PaO}_2$ (kPa)	$10,3 \pm 0,73$	$8,4 \pm 0,22^*$	$6,92 \pm 0,23$	$7,57 \pm 0,20^{\#}$
FENO (ppb) <sup>†</sup>	7,1 (5,9-9,9)	8,7 (6,03-11,4)	12,7 (6,18-28,7)	10,2(6,55-17,3) <sup>#</sup>

9. táblázat. A vizsgálati csoportok köpetének sejtprofilja  
Az adatokat medián (interquartilis) formában adtuk meg. \* $p < 0,05$  stabil COPD vs. kontroll, # $p < 0,05$  és \$ $p < 0,01$  kezelés után vs. kórházi felvétel

Köpet sejtprofil	Egészséges kontroll	stabil COPD	COPD exacerbáció	
			kórházi felvétel	kezelés után
<b>Teljes sejtszám</b> ×10 <sup>6</sup> /g	0,3 (0,24-0,7)	0,6 (0,30-2,1)*	2,4 (0,96-7,6)	1,3 (0,64-3,01)*
<b>Neutrofil granulocita</b> %	76,6 (69,8-87,1)	87,5 (73,7-91,7)	95 (92,6-97,2)	94 (90,4-96,1)
×10 <sup>6</sup> /g	0,3 (0,13-0,6)	0,5 (0,25-2,0)*	2,1 (0,89-5,8)	1,0 (0,62-2,33)#
<b>Makrofág</b> %	16,5 (10,8-25,9)	9,1 (5,3-12,1)	1,4 (0,46-2,95)	2,6 (1,5-4,4)
×10 <sup>5</sup> /g	0,8 (0,27-1,4)	0,5 (0,28-1,2)	0,4 (0,15-1,3)	0,39 (0,07-0,74)
<b>Limfocita</b> %	2,2 (0,84-3,8)	4,1 (2,3-5,3)*	2,3 (1,4-3,8)	2,5 (1,4-3,3)
×10 <sup>4</sup> /g	0,8 (0,25-3,7)	1,9 (1,4-3,0)*	5,6 (1,9-16,7)	2,7 (1,0-4,6)#
<b>Eozinofil granulocita</b> %	0 (0-1,2)	0 (0-2,3)	0 (0-1,2)	0 (0-0,77)
×10 <sup>4</sup> /g	0 (0-2,2)	0 (0-6,5)	0 (0-1,8)	0 (0-1,2)

### 5.3.2. A spontán és indukált köpet MDA szintjének összehasonlítása

A spontán és indukált köpetekben mért eikozanoid szinteket a 10. táblázat foglalja össze. Nem találtunk számottevő eltérést az indukált és a spontán köpetminták MDA koncentrációi között ( $p > 0,05$ ), a Bland-Altman teszt segítségével számolt egyezési tartományok hasonlóak az MDA-mérések inter-assay reprodukálhatósága (5.3.5. pont) során számolt egyezési tartományokkal.

10. táblázat. Spontán és indukált köpetben mért eikozanoid koncentrációk  
Az adatokat átlag±SEM formában adtuk meg, kivéve, ha ezt másképp jelöltük. MDA: malondialdehid, CV: variációs koefficiens. #Bland-Altman teszt

Mediátor	Köpet (nmol/L)		CV (%)	Egyezési tartomány#
	spontán	indukált		
<b>MDA</b>	148,1 ± 7,3	135,7 ± 9,7	0,22	8,1 -30,8 és 55,7

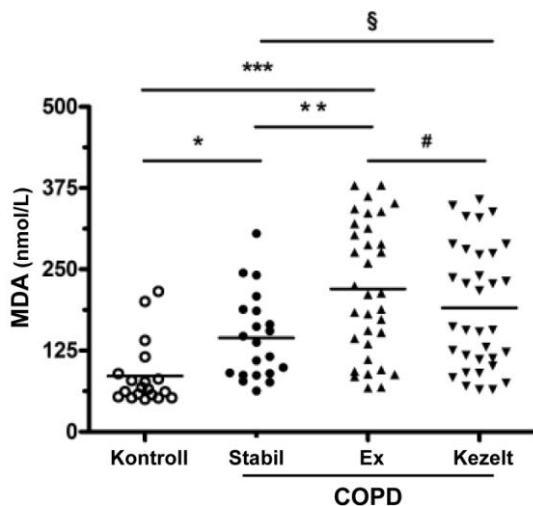
### 5.3.3. Az MDA koncentrációjának változása a köpetben

A COPD-s betegek köpetének MDA szintje szignifikánsan magasabb volt, mint az egészséges kontrollok köpetében mért koncentráció ( $144,6 \pm 14,3$  nmol/L vs.  $85,9 \pm 11,3$  nmol/L,  $p < 0,05$ ). Akut exacerbációban az MDA szint további emelkedést mutatott a stabil állapotban mért értékekhez képest ( $220,0 \pm 17,5$  nmol/L,  $p < 0,01$ ). A kezelés hatására az MDA szint csökkent ( $190,7 \pm 6,3$  nmol/L,  $p < 0,05$ ) (23/a. ábra).

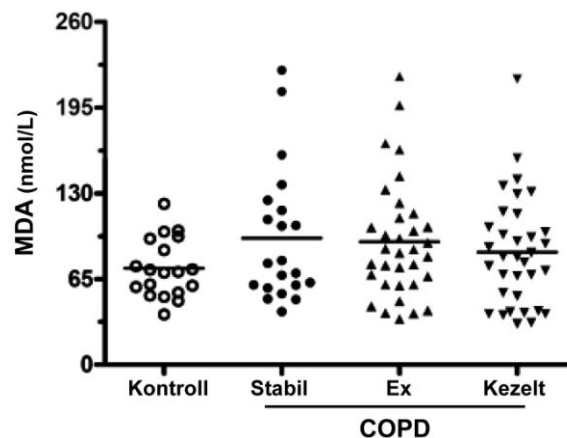
### 5.3.4. A MDA koncentrációjának változása az EBC-ben

Az EBC-ben mért MDA koncentrációk az egészségesekben ( $73,1 \pm 5,1$  nmol/L), a stabil ( $96,1 \pm 11,6$  nmol/L), valamint az exacerbációban lévő betegekben ( $93,3 \pm 7,6$  nmol/L) hasonlóak voltak ( $p > 0,05$ ). A kezelésnek nem volt számottevő hatása az exacerbáció alatt mért MDA szintre ( $85,3 \pm 7,1$  nmol/L,  $p > 0,05$ ) (23/b. ábra).

a.



b.



23. ábra. Az MDA koncentrációja az egészséges személyek (kontroll), a stabil (stabil) és az akut exacerbációban lévő (ex) COPD-s betegek köpetében (a), EBC-ben (b), valamint az exacerbációban lévő betegekben a kezelés után (kezelt).

A vízszintes vonal az átlagértéket jelzi. \*  $p < 0,05$  és \*\*\*  $p < 0,001$  stabil COPD vs. egészséges kontroll, \*\*  $p < 0,01$  exacerbáció vs. stabil COPD, #  $p < 0,05$  kezelt vs. exacerbáció, §  $p < 0,05$  kezelt vs. stabil COPD

### 5.3.5. MDA-mérések intra-assay reprodukálhatósága

A köpet és az EBC minták két hétig  $4^{\circ}\text{C}$ -on való tárolása nem befolyásolta szignifikánsan a minták MDA koncentrációját (11. táblázat). A mérések CV értékei és egyezési tartományai (Bland-Altman teszt) a két mintában hasonlóak voltak.

### 5.3.6. MDA-mérések inter-assay reprodukálhatósága

Ugyanazon köpet vagy EBC minta két részre osztása után a két aliquotból történt MDA-mérés hasonló eredményt adott (11. táblázat). Az mérések CV értékei ugyan az EBC-ben kissé nagyobbak bizonyultak, mint a köpetben, a különbség azonban nem volt szignifikáns ( $p > 0,05$ ). A mérések egyezési tartományai az EBC-ben és a köpetben hasonlóak voltak.

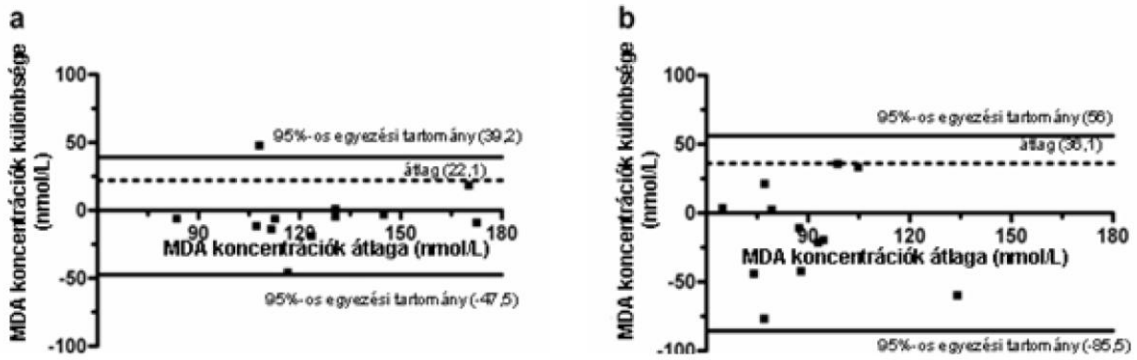
11. táblázat. Az MDA-mérések intra- és inter-assay reprodukálhatósága, valamint napok-közötti variabilitása különböző légúti minták esetében.

12. Az adatok átlag  $\pm$  SEM formában szerepelnek, kivéve, ha ezt másképp jelöltük. CV: variációs koefficiens, EBC: kilégzett levegő kondenzátum. \* $p < 0,05$  EBC vs. köpet, #Bland-Altman teszt alapján

	MDA mérések (nmol/L)		CV (%)	Egyezési tartomány <sup>#</sup>
	Első minta	Második minta		
<b>Intra-assay reprodukálhatóság</b>				
köpet	115,5 $\pm$ 19,3	110,7 $\pm$ 16,3	6,6	-19,6 és 29,3
EBC	61,2 $\pm$ 8,2	56,4 $\pm$ 6,3	7,6	-11,6 és 21,0
<b>Inter-assay reprodukálhatóság</b>				
köpet	152,8 $\pm$ 11,5	161,3 $\pm$ 16,0	9,1	-31,9 és 45,0
EBC	74,0 $\pm$ 8,4	77,1 $\pm$ 7,8	12,9	-37,3 és 31,2
<b>Napok-közötti variabilitás</b>				
köpet	123,9 $\pm$ 8,5	128,1 $\pm$ 7,8	9,3	-47,5 és 39,2
EBC	81,9 $\pm$ 7,0	96,7 $\pm$ 7,7	24,3*	-85,5 és 56,0

### 5.3.7. MDA-mérések napok-közötti variabilitása

Ugyanazon betegből két, egymást követő napon gyűjtött köpetminta MDA koncentrációja hasonlóan bizonyult (11. táblázat). A mért értékek közötti átlagos különbség 15,5 nmol/L volt. Bár ugyanazon betegből két, egymást követő napon gyűjtött EBC minták MDA koncentrációi is hasonlóak voltak, az átlagos különbség elérte a 30,9 nmol/L értéket. A mérések CV értéke az EBC-ben szignifikánsan nagyobb volt, mint a köpetben ( $p < 0,05$ ). Hasonlóan, az egyezési tartományok is szélesebbek voltak az EBC-ben, mint a köpetben (24. ábra).



24. ábra. Az MDA koncentrációk napok-közötti variabilitása a Bland-Altman teszt alapján a COPD-s betegek köpetében (a) és kilégzett levegő kondenzátumában (EBC) (b).

### 5.3.8. Összefüggés a $\Delta$ FEV<sub>1</sub> és az MDA koncentráció között

Az exacerbációban lévő betegeket a kórházi kezelés alatt elért FEV<sub>1</sub>-növekedés ( $\Delta$ FEV<sub>1</sub>) mértéke alapján három csoportba osztottuk, és azt vizsgáltuk, hogy van-e különbség a kismértékű (<3%), a közepes (3-14%), illetve a nagyfokú (>14%) FEV<sub>1</sub>-növekedést mutató alcsoportokban észlelt MDA koncentráció-változások között (12. táblázat). A különböző funkcionális válaszkészségű betegekben eltérő volt az MDA koncentráció-csökkenés mértéke: azokban a betegekben, akiknél a FEV<sub>1</sub>-változás közepes vagy nagyfokú volt, szignifikáns MDA szint-csökkenés volt megfigyelhető a kezelés hatására ( $p < 0,05$ ), míg abban az alcsoportban, ahol a FEV<sub>1</sub>-növekedés csak kismértékű volt az MDA koncentráció szignifikáns változást nem mutatott a kezelés során ( $p > 0,05$ ).

#### 13. táblázat. A köpet MDA koncentrációja a különböző funkcionális válaszkészségű ( $\Delta$ FEV<sub>1</sub>) betegekben

Az adatok átlag  $\pm$  SEM formátumban szerepelnek. FEV<sub>1</sub>: forszírozott kilégzési térfogat 1 másodperc alatt \* $p < 0,05$  kórházi felvétel vs. kezelés után

MDA (nmol/L)	$\Delta$ FEV <sub>1</sub> (L)			$\Delta$ FEV <sub>1</sub> (%)		
	<0,04	0,04-0,29	>0,29	<3	3-14	>14
<b>Kórházi felvétel</b>	200,3 $\pm$ 32,6	239,0 $\pm$ 30,6	218,7 $\pm$ 32,1	197,1 $\pm$ 32,1	235,5 $\pm$ 29,7	226,5 $\pm$ 30,7
<b>Kezelés után</b>	207,0 $\pm$ 32,8	177,3 $\pm$ 26,5*	188,8 $\pm$ 27,4*	203,3 $\pm$ 23,8	175,2 $\pm$ 26,6*	193,2 $\pm$ 27,8*

### **5.3.9. Korrelációk**

A vizsgálat során nem találtunk szignifikáns összefüggéseket a köpet és az EBC MDA koncentrációja, valamint a különböző klinikai paraméterek (FENO, légzésfunkció, vérgáz) illetve a köpet sejtpofilja között sem a stabil, sem az exacerbációban lévő COPD-s betegekben (adatokat nem mutatjuk).

## 6. MEGBESZÉLÉS

### 6.1. Invazív és non-invazív légúti mintavételi módszerek összehasonlítása az eikozanoidok kimutathatóságára vonatkozóan.

Első vizsgálatunkban különböző eikozanoidok, így az LTB<sub>4</sub>, PGE<sub>2</sub> és a cisz-LT-ek, valamint a lipidperoxidáció során keletkező 8-izoprosztán detektálhatóságát vizsgáltuk COPD-s betegek különböző eredetű légúti mintáiban. Kimutattuk, hogy a vizsgált mediátorok közül a LTB<sub>4</sub> nagyobb koncentrációban van jelen COPD-s betegek köpetében, mint a BAL folyadékában. A cisz-LT-ek és a 8-izoprosztán vonatkozásában csak kisebb, tendencia-szintű emelkedést észleltünk a köpetben a BAL-hoz képest, míg a PGE<sub>2</sub> koncentrációja inkább a BAL-ban volt magasabb, bár szignifikáns különbség itt sem mutatkozott. Az EBC-ben az eikozanoidok szintje alacsonyabb volt, mint a másik két légúti mintában, ha egyáltalán a marker kimutathatónak bizonyult.

Az elmúlt évtizedben a légúti gyulladás non-invazív mérése kutatási és klinikai szempontból egyaránt fontos területté vált. Régóta ismert, hogy a különböző mintavételi eljárással nyert légúti mintákban a biomarkerek detektálhatósága eltérő lehet. A pulmonológiai gyakorlatban a BAL viszonylag gyakran alkalmazott invazív mintavételi eljárás, elsősorban a perifériális légutakban, valamint az alveolusokban zajló gyulladásról ad információt. Ezzel szemben, a köpet, ami a szemi-invazív eljárásnak tekinthető köpetindukció útján nyerhető, inkább a nagyobb légutakban zajló patofiziológiai eseményeket tükrözi (208), míg a non-invazív módon nyert EBC az elképzelések szerint az ASL összetételéről, illetve az alsó légutak levegőjének az összetételéről nyújt információt (209).

Tudomásunk szerint e három légúti minta ugyanazon vizsgálaton belüli összehasonlítására a nemzetközi irodalomban a korábbiakban nem volt példa. Egy korábbi vizsgálatban a szerzők a köpet, a BAL, valamint a bronchialis biopszia sejtprofilját, valamint a köpet és a BAL IL-8 és ECP koncentrációját hasonlították össze (208). Eredményeik szerint a neutrofilsejtek százalékos aránya, az IL-8, valamint az ECP koncentrációja a köpetben lényegesen magasabb, mint a BAL-ban, míg a makrofágok és a limfociták aránya a BAL-ban bizonyult magasabbnak a köpethez képest. A köpet és a BAL ECP szintje korrelációt nem mutatott, míg e légúti minták IL-8 koncentrációja összefüggést mutatott a COPD-s betegekben. Az egészségesekben ugyanakkor korreláció nem volt.

A cisz-LT-ekkel, a LTB<sub>4</sub>-gyel, valamint a 8-izoprosztánnal ellentétben a PGE<sub>2</sub> a BAL-ban mutatta a legnagyobb koncentrációt, az EBC-ben a mediátor egyáltalán nem volt kimutatható.

A BAL-ban tapasztalt viszonylag magasabb PGE<sub>2</sub> koncentráció oka nem ismert. Érdekes módon *Antczak és mtsai.* egy korábbi munkájukban különböző tüdőbetegségben szenvedő betegeket vizsgálva az EBC-ben is ki tudtak mutatni PGE<sub>2</sub>-t, melynek koncentrációja összevethető volt a BAL-ban mért értékekkel (128).

Azon eredményünket, miszerint az eikozanoidok szintje magasabb a köpetben, mint a BAL-ban, néhány korábbi vizsgálat is megerősíti. Így például *Nocker és mtsai.* asztmásokban hasonlították össze a légúti gyulladás potenciális prediktív markereit indukált köpetben és BAL-ban (210). A szerzők a minták sejttözetételét és plazma protein koncentrációját vizsgálva megállapították, hogy az indukált köpetből való marker meghatározás a légúti gyulladás monitorozására és a glükokortikoid terápiára adott válaszkészség megítélésére sokkal megbízhatóbb eljárás, mint a BAL-ból való mérés. Asztmás betegeket vizsgálva hasonló következtetésekre jutottak *Pizzichini és mtsai.* is (211). *Antczak és mtsai*-nak, valamint *Ono és mtsai*-nak vizsgálati eredményei szintén egyezést mutatnak kutatócsoportunk eredményeivel, ugyanis e munkacsoport is magasabb koncentrációban mérte a cisz-LT-eket, a LTB<sub>4</sub>-et és a 8-izoprosztánt a BAL-ban, mint az EBC-ben (123, 212).

Vizsgálatunk egy másik fontos eredménye az volt, hogy az EBC-ben a cisz-LT-ekkel és a 8-izoprosztánnal ellentétben a LTB<sub>4</sub> és a PGE<sub>2</sub> nem vagy csak nyomokban mutatható ki. Amint ez értekezésem irodalmi összefoglalójában részletes kifejtésre került, a metodikai bizonytalanságok ellenére az EBC-ben való gyulladásos biomarker meghatározásnak kiterjedt irodalma van. Eredményeinkkel megegyezően számos munkacsoport igazolta a cisz-LT-ek kimutathatóságát az asztmások (213), allergiás rhinitisesek (214), COPD-s betegek és aktív dohányosok EBC-jében (177). Eredményeinkkel ellentétben azonban néhány munkacsoport LTB<sub>4</sub>-et is sikerrel detektált az EBC-ben (114, 215). Eredményeink és az ezen irodalmi adatok közötti ellentmondást leginkább technikai/metodológiai faktoroknak tulajdonítjuk. Feltételezzük, hogy az EBC összetételét bizonyítottan befolyásoló tényezők, úgymint a kilégzett levegő áramlási sebessége, a légúti átmérő, a periventilláció, a környezet páratartalmának változása, a mintagyűjtő készülékek, valamint a mintavételi idő különbözősége magyarázhatják elsősorban ezeket az eltéréseket (105).

Vizsgálatunk további fontos eredményeként kimutattuk, hogy a köpet neutrofilejtszáma, valamint a köpet LTB<sub>4</sub>, cisz-LT és a 8-izoprosztán koncentrációja között szignifikáns korreláció figyelhető meg. *Pizzichini és mtsai.* asztmában találtak hasonló szignifikáns korrelációt a köpet mediátor koncentrációja és neutrofilejtszáma között (206).

Ezzel ellentétben, vizsgálatunk során nem találtunk összefüggést a BAL sejtprofilja és eikozanoid koncentrációi között, ami arra utal, hogy a BAL mediátor koncentrációjának



meghatározásával a légúti gyulladás mértékére nem lehet következtetni COPD-s betegekben. Mivel a köpet neutrofil-, mind a limfocitasejtek számának növekedése, továbbá az emelkedett LTB<sub>4</sub> és 8-izoprosztán koncentráció is a légúti gyulladás súlyosbodásának következménye, ezért a kimutatott összefüggések arra utalnak, hogy az indukált köpet vizsgálata alkalmas vizsgálómódszer lehet a légúti gyulladás monitorozására COPD-s betegekben.

**Összefoglalva, az általunk vizsgált eikozanoidok szintje általában köpetben volt a legmagasabb, míg EBC-ben a legalacsonyabb. A köpet sejtprofillal (neutrofilejtszámmal) való kapcsolat a cisz-LT-ek, a 8-izoprosztán és a LTB<sub>4</sub> esetében volt igazolható. A BAL-ban és az EBC-ben való lipid mediátor meghatározás relevanciája bizonytalan.**

## **6.2. Köpet LTB<sub>4</sub>, cisz-LT, PGE<sub>2</sub> és 8-izoprosztán szintjének vizsgálata COPD akut exacerbációjában és az exacerbáció kezelése után.**

Második vizsgálatunkban arra a kérdésre kerestünk választ, hogy a gyulladás szempontjából markáns szerepet játszó eikozanoidok koncentrációja változik-e a köpetben COPD akut exacerbációjában, illetve, az exacerbáció kezelése során.

E követéses vizsgálat talán legjelentősebb eredménye az a megfigyelés volt, hogy a köpet PGE<sub>2</sub> koncentrációja stabil állapotban nagyon alacsony, ugyanakkor az exacerbáció kialakulása során jelentősen megemelkedik, majd a betegek kórházi kezelése során csökken. A vizsgálatunkban detektált további lipid mediátorok, így a LTB<sub>4</sub> és a 8-izoprosztán szintje ugyan szintén megemelkedett exacerbációban, de koncentrációjuk az exacerbáció kezelését követően is emelkedett marad. A három lipid mediátorral ellentétben, a cisz-LT-ek koncentrációja nem változott akut exacerbációban, ami arra enged következtetni, hogy a cisz-LT-eknek nincs számottevő kóros szerepe a COPD exacerbációra jellemző légúti obstrukció és gyulladás fokozódásának mechanizmusában.

Mivel a cisz-LT-ek termelődéséért az eozinofilejtek felelősek elsősorban, vizsgálatunk során külön is elemeztük a köpet eozinofiliát (>2%) mutató, illetve nem mutató (<2%) COPD-s betegeket, feltételezve, hogy a köpet eozinofiliát mutató csoportban cisz-LT emelkedés lesz kimutatható. Nem találtunk azonban eltérést a különböző eozinofilejtszámú betegek cisz-LT szintje között (adatokat nem mutatjuk), ami tovább erősíti azt a következtetést, hogy a cisz-LT-ek nem játszanak döntő szerepet az exacerbációval összefüggő gyulladós folyamatokban.

A PGE<sub>2</sub> koncentrációjának változása COPD akut exacerbációjában korábban nem volt ismert a nemzetközi irodalomban. Vizsgálatunk során kimutattuk, hogy a köpet PGE<sub>2</sub> koncentrációja akut exacerbációban szignifikánsan megemelkedik, majd a kezelés következtében csökken, bár a marker szintje még a kezelést követően sem éri el a stabil állapotban mért értéket. Az exacerbáció alatt észlelt PGE<sub>2</sub>-emelkedést többféleképpen lehet értelmezni. Egyes kutatók szerint a PGE<sub>2</sub> anti-inflammatorikus, védő és szabályozó szereppel bír asztmában és COPD-ben, ami szekunder jellegű és mintegy ellensúlyozza az e betegségekben kialakuló gyulladási folyamatokat (159, 216). Egy másik referátum azonban éppen ellenkezőleg, a PGE<sub>2</sub> pro-inflammatorikus hatására hívja fel a figyelmet: e munkában a szerzők azt igazolták, hogy a PGE<sub>2</sub> egy COX-2-függő mechanizmus során fokozza a neutrofilejtek adhézióját a bronchiális epitelsejtekhez, valamint szerepet játszik a neutrofilejtek légutakba történő toborzásában is COPD-ben (162). Ezt az elméletet támasztja alá saját megfigyelésünk is, miszerint COPD exacerbációban a PGE<sub>2</sub> szint szorosán korrelál a köpet neutrofil- és limfocitasejtszámával. Végül, a PGE<sub>2</sub> az MMP-k szabályozásán keresztül is befolyásolhatja a légúti gyulladást és a tüdőparenchima károsodását, mivel egyes szerzők a PGE<sub>2</sub> és az MMP-2 termelődése között szoros ok-okozati kapcsolatot mutattak ki COPD-ben (161).

Bár a PGE<sub>2</sub> szintet a kórházi kezelés szignifikánsan csökkentette, értéke a stabil állapotban mért szinthez képest továbbra is emelkedett maradt. Ez a megfigyelés azzal magyarázható, hogy az exacerbáció kezelése után a légúti gyulladás mértéke még mindig igen kifejezett volt, hiszen a vizsgált exacerbációs betegcsoportban a neutrofilejtjeinek száma a kezelés után szignifikánsan emelkedett volt a stabil betegekhez képest. A neutrofilejtek gyulladási citokinek (TNF- $\alpha$ , NF $\kappa$ B és IL-1 $\alpha$ ) hatására a COX-2 útvonal aktiválásán keresztül nagy mennyiségű PGE<sub>2</sub>-t termelnek, ami hozzájárulhatott a kórházi távozáskor észlelt magasabb biomarker szinthez (217). Feltételezéseink szerint a gyulladási citokinek aktiválódása a kórházi kezelés során is fennáll, serkentve ezáltal a PGE<sub>2</sub>-nek a neutrofilejtekből és fibroblasztokból történő szintézisét. Végül, a kezelést követően észlelt viszonylag magasabb PGE<sub>2</sub> szint magyarázható a COPD exacerbációt előidéző bakteriális ágensek, így például a *Moraxella catarrhalis*, illetve a *Haemophilus influenzae* hatásaival is, amelyek szintén fokozhatják a COX-2 útvonal aktiválásán keresztül a PGE<sub>2</sub> szintézisét a különböző légúti sejtekben (218).

Megjegyzendő, hogy a cisz-LT-ekre és a PGE<sub>2</sub>-re vonatkozó eredményeink eltérnek *Antczak és mtsai*-nak eredményeitől (129). Az eltérés hátterében az állhat, hogy *Antczak és mtsai*. kizárólag pozitív bakteriális köpet tenyésztéssel rendelkező exacerbációs betegeket vontak be vizsgálatukba, míg a mi vizsgálatunkban a pozitív köpet tenyésztési lelet nem szerepelt külön

a beválasztási kritériumok között. Az eltérést okozhatja az is, hogy a két vizsgálatban a marker-meghatározások eltérő típusú légúti mintákból (köpet vs. EBC) történtek.

A 8-izoprosztán vagy a LTB<sub>4</sub> mérések reprodukálhatóságára vonatkozó eredményeink megegyeznek más szerzők eredményeivel, azaz e markerek megbízhatóbban mutathatók ki a köpetből, mint az EBC-ből (135). Az általunk a COPD exacerbáció során a köpetben megfigyelt LTB<sub>4</sub> koncentráció-emelkedés szintén megegyezik más kutatócsoportok eredményeivel (140, 219). A LTB<sub>4</sub> és a neutrofilejtek között kimutatott korreláció alátámasztja azt a nézetet, hogy a LTB<sub>4</sub>-nek kulcsszerepe van a neutrofilejtek légutakba történő toborzásában (139, 220). Az a megfigyelésünk, miszerint a LTB<sub>4</sub> koncentrációja nem csökkent a kórházi kezelés során, nem különösebben meglepő, ugyanis a gyulladáshoz tartozó lassú kinetikájú lecsengését az exacerbációból való gyógyulás során több korábbi vizsgálatban is igazolták (221). A LTB<sub>4</sub> szintjének a kezelést követően is fennmaradó emelkedettsége talán alátámasztható a LTB<sub>4</sub> viszonylag hosszú féléletidejével is, melyet *Taylor és mtsai.* in vivo kísérletben mutattak ki (222).

Korábbi tanulmányok azt igazolták, hogy a köpet, illetve az EBC 8-izoprosztán koncentrációja stabil COPD-s betegekben magasabb, mint egészséges kontroll személyekben (180,181). Jelen vizsgálatunkban elsőként mutattuk ki, hogy a köpet 8-izoprosztán szintje COPD exacerbációban tovább emelkedik a stabil állapotban mért szinthez képest. Korábban csak EBC-ben mutattak ki hasonló emelkedést exacerbációban (129, 187, 223). Eredményeink jól összhangban vannak más szerzők azon megállapításaival, miszerint a COPD exacerbációt kísérő oxidatív stressz-emelkedés biomarkerekkel - így például a kilélegzett H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vagy a szérum  $\alpha_1$ -AT mérésével - jól nyomon követhető (monitorozható) (224). Ugyanakkor, a köpetből történő marker meghatározás sokkal megbízhatóbb módszer lehet az oxidatív stressz kimutatására, mivel a megfelelő oxidatív markerek (pl. 8-izoprosztán) kb. 5-10-szer nagyobb koncentrációban vannak jelen a köpetben, mint az EBC-ben (183).

Vizsgálatunk során nem találtunk összefüggést a lipid mediátorok koncentrációja és a betegek légzésfunkciós paraméterei között. Irodalmi adatok alapján elmondható, hogy más munkacsoportok sem számoltak be ilyen jellegű korrelációról asztmás (183) vagy COPD-s betegekben (187). Egyes szerzők ezt azzal magyarázzák, hogy a légzésfunkciós paraméterek (FEV<sub>1</sub>) és a gyulladáshoz tartozó markerek a COPD különböző karaktereit jellemzik: az eikozanoidok a légúti gyulladásáról, míg a légzésfunkciós értékek a légutak átmérőjéről, illetve az áramláskorlátozottság mértékéről adnak elődlegesen információt (129).

Számos megfigyelés utal arra, hogy a cigarettafüst befolyásolhatja az eikozanoidok szintjét a légutakban (163, 180). Így például több szerző is közölt adatokat arról, hogy a dohányzás

növeli a 8-izoprosztán, PGE<sub>2</sub>, LTB<sub>4</sub>, valamint a cisz-LT-ek koncentrációját a légutakban (225). Mivel vizsgálatunkból a beválasztási kritériumok alapján az aktív dohányzók kizárásra kerültek, jelen munkánk során a dohányzásból adódó zavaró hatásokkal nem kellett számolnunk.

**Összefoglalva, a COPD exacerbáció során a PGE<sub>2</sub> szintje emelkedik a köpetben, és ez összefüggést mutat a légúti gyulladás fokozódásával. A kórházi kezelés hatására a gyulladás mérséklődésével párhuzamosan a PGE<sub>2</sub> szintje is csökken, ami felveti, hogy a gyulladásos mediátor biomarkerként is alkalmas lehet a légúti gyulladás monitorozására. Az exacerbáció során emelkedett 8-izoprosztán szint a fokozott oxidatív stressz következménye. Mivel azonban a 8-izoprosztán koncentrációja a kórházi kezelés hatására nem csökkent, a klinikumban való felhasználása e marker vonatkozásában korlátozottnak tűnik. Eredményeink alapján az LTB<sub>4</sub> hozzájárulhat a neutrofilejtek fokozott légúti infiltrációjához a COPD akut exacerbációjának kialakulása során, míg a cisz-LT-ek szerepére az exacerbáció patomechanizmusában nem találtunk bizonyítékokat.**

### **6.3. Az oxidatív stressz vizsgálata COPD-ben a légúti MDA koncentráció mérésén keresztül.**

Az értekezésben leírásra került harmadik vizsgálatunkban a COPD patofiziológiájában szerepet játszó oxidatív stressz mértékét vizsgáltuk egy, az irodalomban széles körben ismert lipidperoxidációs végtermék, az MDA detektálásán keresztül.

A vizsgálatunkban egyrészt kimutattuk, hogy a köpet MDA koncentrációja a stabil állapotú COPD-s betegekben szignifikánsan magasabb, mint az egészséges kontroll személyekben. Ez a megfigyelés egybevág *Corradi és mtsai.* által korábban már publikált eredménnyel (226). Fontos azonban megjegyezni, hogy mivel a COPD legfőbb rizikófaktoraként számontartott dohányfüst nagy mennyiségben tartalmaz ROS-okat, azaz a dohányzás önmagában is fokozza a légúti oxidatív stresszt, ezért vizsgálatunkban kizárási kritériumként szerepelt az aktív dohányzás. A *Corradi és mtsai*-által közölt vizsgálatban a dohányzás nem szerepelt kizárási kritériumként, ami torzíthatta a kapott vizsgálati eredményeket, különösen a stabil klinikai állapotú betegek vonatkozásában.

Vizsgálatunk másik fontos megfigyelése az volt, hogy COPD exacerbációban a stabil állapotban mért értékhez képest a köpet MDA szintje tovább emelkedik, majd az exacerbáció kezelése során a marker szintje szignifikánsan csökken, miközben a betegek klinikai állapota

(légzésfunkciós értékek, vérgáz paraméterek) javul, valamint a betegek köpetének teljes- és neutrofilejtszáma is csökken.

Az MDA koncentráció-csökkenése összefüggést mutatott a betegek légúti áramláskorlátozottságának javulásával ( $\Delta FEV_1$ ): azokban a betegekben, amelyekben jelentős  $FEV_1$ -emelkedést észleltünk a kezelés során (a betegek felső és középső tercilise), az MDA koncentráció szignifikánsan csökkent. Ezzel szemben, azokban a betegekben, akikben a  $FEV_1$  nem vagy csak kismértékben növekedett (a betegek alsó tercilise), az MDA szint szignifikánsan nem változott a kezelés során. Összességében, eredményeink arra utalnak, hogy a COPD exacerbáció során az oxidatív stressz mértéke a légutakban fokozódik, majd a kezelés hatására csökken, és mindezek a változások a köpet MDA szintjének mérésén keresztül jól monitorozhatóak.

Alcsoport analízisünk eredményei egybevágnak egy másik munkacsoport közelmúltban publikált eredményeivel, miszerint szignifikáns kapcsolat van a légzésfunkciós értékek és a plazma MDA szintje között. *Schünemann és mtsai*-nak eredményei szerint ugyanis a legalacsonyabb százalékos  $FEV_1$  kvartilisbe (légzésfunkció szempontjából) eső COPD-s betegek MDA szintje a plazmában szignifikánsan magasabb a felső kvartilisekbe tartozó betegekhez képest (227). Megjegyzendő ugyanakkor, hogy e munkában az MDA mérése a TBA teszt segítségével történt, ami kevésbé megbízható detektálási módszer, mint az általunk használt HPLC technika.

A légúti MDA koncentráció-változás EBC-ből való detektálására ez idáig nagyon kevés irodalmi adat áll rendelkezésünkre (226). Vizsgálatunkban a köpettel ellentétben az EBC nem bizonyult megfelelő légúti mintának az oxidatív stressz-hatások kimutatására. Az EBC MDA koncentrációja alapján ugyanis az egészségesek és a COPD-s betegek nem voltak elkülöníthetőek egymástól, és az EBC MDA koncentrációja az exacerbációs betegekben sem mutatott változást a stabil COPD-sekhez képest. Bár egy közelmúltban megjelent közlemény szerint az obstruktív tüdőbetegségekben az oxidatív stressz markerek - köztük az MDA - emelkedett szintje mérhető az EBC-ben (228), eredményeink alapján úgy tűnik, hogy az EBC-ből történő MDA meghatározás nem alkalmas az oxidatív stressz monitorozására COPD-ben. Ennek hátterében az EBC-vel kapcsolatos ismert metodikai problémák állhatnak. Az EBC-ben való mediátorok mérését ugyanis nagymértékben befolyásolja a kilégzési áramlási sebesség, a légúti átmérő, valamint a mintagyűjtő készülékek hatékonysága, anyaga és a mintavételi idő (229). Ezen túlmenően, az EBC-ből történő MDA-mérés validitását megkérdőjelezi az általunk kimutatott jelentős napi variabilitás és a gyenge

reprodukálhatósági mutatók. Úgy tűnik, hogy más biomarkerek tekintetében is elég nagy variabilitás mutatkozik az EBC-ben való meghatározás során (135).

Fontos ugyanakkor kihangsúlyozni, hogy az általunk alkalmazott HPLC-vel történő mérés technika megbízható módszer az MDA meghatározására, hiszen mind az intra-, mind az inter-assay reprodukálhatósági mutatók az EBC-ben és a köpetben hasonlóak és igen kedvezőek voltak. A módszer szenzitivitását igazolja, hogy az MDA még a közismerten híg EBC-ben is detektálható volt. Megjegyzendő továbbá, hogy a HPLC-meghatározás reprodukálhatósági mutatói jobbak voltak az irodalomban ismert EIA-mérések hasonló mutatóinál, ami szintén a HPLC-n alapuló mérés technika megbízhatóságát támasztja alá.

A köpetindukciónak számos előnye van a spontán módon történő köpetgyűjtéssel szemben, viszont egyes ajánlások szerint a beavatkozás a bronchospasmust generáló hatás miatt csak az enyhe és a középsúlyos (GOLD I. és II. stádium) COPD-s betegekben végezhető megfelelő biztonsággal (230). Mivel a vizsgálatunkba bevont betegek több mint 60%-a GOLD III és IV-es stádiumú volt, illetve a betegek súlyos, hospitalizációt igénylő akut exacerbációban szenvedtek, ezért az indukció helyett ezeknél a betegeknél spontán köpetet gyűjtöttünk. Az előkísérletek adatai alapján azonban az indukció önmagában nem befolyásolja a köpet MDA koncentrációját. Így, hasonlóan más markerekhez (pl. IL-8) az indukált és a spontán köpet mérési adatai közvetlenül összehasonlíthatók (104).

Vizsgálatunkban az MDA koncentrációja és a betegek légzésfunkciós értékei között közvetlen korrelációt nem találtunk. Az irodalmi adatok e tekintetben ellentmondásosak. Egyes kutatók kimutattak ilyen korrelációkat (226), míg mások nem tudtak munkájuk során összefüggéseket igazolni az MDA szint és a légzésfunkció számszerű értékei között. Eredményeink arra utalnak, hogy az oxidatív stressz mértéke független a légúti áramláskorlátozottság mértékétől.

**Összefoglalva, mind a köpetben, mind az EBC-ben az MDA koncentrációja HPLC módszer segítségével pontosan mérhető. Ugyanakkor, szemben az EBC-vel, a köpetből történő MDA meghatározás esetén a mérések napok-közötti variabilitása kisebb, ami a mérések jobb reprodukálhatóságára utal. Eredményeink alapján a köpet MDA mérésén keresztül az oxidatív stressz mértéke jól nyomon követhető a COPD-s betegekben a betegség kórlefolyásának különböző fázisaiban (stabil állapot és exacerbáció). A jövőben az MDA mint légúti biomarker mérésének vizsgálata és elemzése javasolt más obstruktív tüdőbetegségekből is.**

## 7. KÖVETKEZTETÉSEK

Az értekezésben részletezett vizsgálatokból az alábbi következtetések vonhatók le:

1. Eikozanoidok és oxidatív stressz markerek széles körben kimutathatók a köpetben és a BAL-ban, míg az EBC-ben csak a cisz-LT-ek, illetve a 8-izoprosztán detektálható biztonságosan. Az eikozanoidok szintje a PGE<sub>2</sub> kivételével a köpetben a legmagasabb, míg az EBC-ben a legalacsonyabb.
2. Stabil COPD-s betegekben a köpet neutrofilejtszáma pozitív korrelációt mutat a köpet cisz-LT, LTB<sub>4</sub> és 8-izoprosztán szintjével. Ezzel ellentétben, a BAL sejtprofilja és az eikozanoidok szintje korrelációt nem mutat.
3. COPD exacerbációban a köpetben emelkedett PGE<sub>2</sub>, 8-izoprosztán és LTB<sub>4</sub> szint mérhető. Kórházi kezelés hatására a PGE<sub>2</sub> szint szignifikánsan csökken, ami felveti a PGE<sub>2</sub>-nek légúti biomarkerként való alkalmazását a jövőben. A másik két lipid mediátor szintje ugyanakkor nem változik a kezelés hatására a kórházból való távozás időpontjáig.
4. A cisz-LT-ek koncentrációja a köpetben nem változik COPD exacerbációban, így az eikozanoidok ezen csoportja feltehetően nem játszik meghatározó szerepet az exacerbációval összefüggő gyulladási folyamatokban.
5. Stabil COPD-s betegekben szignifikánsan magasabb a köpet MDA koncentrációja, mint egészséges kontroll személyekben, igazolva ezzel a COPD-ben fennálló fokozott oxidatív stresszt.
6. COPD exacerbációban a köpet MDA koncentrációja szignifikánsan emelkedik a stabil állapothoz képest, majd a betegek kórházi kezelés után a marker szintje csökken. Eredményeink alapján a köpet MDA mérésén keresztül az oxidatív stressz mértéke jól nyomon követhető (monitorozható) a COPD-s betegekben.
7. EBC-ben nem mutatható ki MDA koncentráció-különbség az egészségesek és a stabil, valamint az akut exacerbációban lévő COPD-s betegek között, melynek hátterében valószínűleg a markernek az EBC-ben észlelt nagyfokú napi variabilitása áll.

## 8. ÖSSZEFOGLALÁS

Az együttesen eikozanoidoknak nevezett leukotriének és prosztaglandinok közismert gyulladáshoz vezető mediátorok, melyek szerepet játszanak a gyulladáshoz vezető sejtek toborzásában, a vaszkuláris és a bronchialis tónus szabályozásában, valamint az oxidatív stressz kialakulásában. A lipid mediátoroknak a krónikus obstruktív tüdőbetegségben (COPD) patofiziológiájában betöltött szerepe kevésbé ismert. Vizsgálataink során a prosztaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), 8-izoprosztán, ciszteinil-leukotriének (cisz-LT), leukotrién B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), valamint a malondialdehid (MDA) szintjét vizsgáltuk COPD-s betegek légúti mintáiban.

Vizsgálatainkban kimutattuk, hogy a cisz-LT-ek, LTB<sub>4</sub>, és a 8-izoprosztán jól detektálhatóak a köpetben és a bronchoalveolaris lavage (BAL)-ban, míg a kilégzett levegő kondenzátumában (EBC) csak a cisz-LT-ek, illetve a 8-izoprosztán mérhető biztonságosan. Kimutattuk, hogy a köpet neutrofilejtszáma és a legtöbb eikozanoid szintje között korreláció van, míg a BAL sejtprofilja és a lipid mediátorok szintje között kapcsolat nincs.

Követéses vizsgálataink során kimutattuk, hogy a stabil COPD-s betegek köpetében alacsony szinten kimutatható PGE<sub>2</sub> koncentrációja exacerbáció esetén jelentősen megemelkedik, majd az exacerbáció kezelését követően csökken. A köpet LTB<sub>4</sub> és 8-izoprosztán koncentrációja COPD exacerbációban szintén megemelkedik, de szintjük a kórházi kezelés után továbbra is emelkedett marad. A cisz-LT-ek koncentrációja ugyanakkor nem változik az exacerbáció során, ami arra utal, hogy a cisz-LT-ek nem játszanak meghatározó szerepet az exacerbációval összefüggő gyulladáshoz vezető folyamatokban és légzésfunkciós romlásban.

További vizsgálatainkban kimutattuk, hogy a köpet MDA koncentrációja stabil állapotú COPD-s betegekben szignifikánsan magasabb, mint az egészségesekben, illetve, hogy akut exacerbáció során a köpet MDA szintje tovább emelkedik, majd kórházi kezelést követően szignifikánsan csökken. Ezzel ellentétben, az EBC MDA szintje nem mutatott különbséget a vizsgálati csoportok között, amelynek hátterében az MDA-nak az EBC-ben észlelt nagyfokú napi variabilitása állhat.

Az arachidonsav-származékok tehát a légúti minták közül legnagyobb mennyiségben a köpetből mutathatók ki. A vizsgált eikozanoidok közül a PGE<sub>2</sub> tölthet be biomarker szerepet a COPD exacerbációval összefüggő légúti gyulladás monitorozásában, bár ennek megerősítésére további vizsgálatokra van még szükség. A MDA-ról megállapítottuk, hogy a köpetből megfelelő pontossággal és jó reprodukálhatósággal mutatható ki, illetve, hogy az MDA a köpetben mérve szintén biomarker szerepet tölthet be a COPD-val összefüggő oxidatív folyamatok monitorozásában.



## 9. SUMMARY

The role of lipid mediators in the pathophysiology of COPD is less understood. In our studies concentrations of prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), 8-isoprostane, cysteinyl-leukotrienes (cys-LTs), leukotriene B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) and malondialdehyde (MDA) were investigated in the airways of patients with COPD.

We demonstrated that cys-LTs, LTB<sub>4</sub> and 8-isoprostane can be easily measured in sputum and bronchoalveolar lavage (BAL), while in exhaled breath condensate (EBC) only cys-LTs and 8-isoprostane can be detected reliably. We found correlations between the number of neutrophils and the levels of most eicosanoids in sputum, while lipid mediator levels in the BAL did not correlate with inflammatory cell profiles.

In our longitudinal studies we found that sputum PGE<sub>2</sub>, 8-isoprostane and LTB<sub>4</sub> levels were increased in COPD patients with exacerbation compared to stable subjects. However, after treatment only PGE<sub>2</sub> was decreased significantly, the levels of other eicosanoids remained elevated by the time of discharge from hospital care. Sputum cys-LT levels were similar in stable patients and in those with exacerbations indicating that cys-LT may not be involved in the exacerbation-associated inflammatory processes and functional decline.

In further longitudinal studies we demonstrated that levels of MDA were elevated in the sputum of stable COPD patients compared with healthy controls. MDA concentrations were further increased in patients with acute exacerbations, and decreased after treatment by the time of hospital discharge. In contrast to sputum, EBC MDA levels were comparable between controls as well as stable and exacerbated patients with COPD, probably because of the high between-day variability of MDA measurement in EBC.

In summary, arachidonic acid derived metabolites can usually be detected in highest concentration in sputum among different types of respiratory samples. Besides investigated eicosanoids, PGE<sub>2</sub> in sputum appears to be a useful marker for monitoring exacerbation-associated inflammation within the airway of patients with COPD, although further studies are needed to investigate this issue. MDA can be measured in sputum precisely and with good reproducibility. Our results suggest that MDA could also be a useful sputum marker for monitoring exacerbation-associated oxidative processes in patients with COPD.

Leukotrienes and prostaglandins, collectively known as eicosanoids, are important inflammatory mediators in allergic rhinitis and asthma. Several lines of evidence indicate that these mediators are involved in the recruitment of inflammatory cells in the airways, the regulation of the vascular and bronchial tone and the development of oxidative stress.

## 10. IRODALOMJEGYZÉK

- 1 Górska K, Krenke R, Kosciuch J, Korczynski P, Zukowska M, Domagala-Kulawik J, M Maskey-Warzechowska, Chazan R. (2010) Airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Pulm Med*, 16: 89-96.
- 2 British Thoracic Society. Guidelines for the management of chronic obstructive pulmonary disease. (1997) *Thorax*, 52: 1-28.
- 3 Briscoe WA, Nash ES. (1965) The slow space in chronic obstructive pulmonary diseases. *Ann N Y Acad Sci*, 121: 706-722.
- 4 Mannino DM, Buist AS. (2007) Global burden of COPD: risk factors, prevalence, and future trends. *Lancet*, 370: 765-773.
- 5 Buist AS, Vollmer WM, Sullivan SD, Weiss KB, Lee TA, Menezes AM, Crapo RO, Jensen RL, Burney PG. (2005) The Burden of Obstructive Lung Disease Initiative (BOLD): rationale and design. *COPD*, 2: 277-83.
- 6 Murray CJ, Lopez AD (1997) Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020 – Global Burden of Disease Study. *Lancet*, 349: 1498-1504.
- 7 Lozano R, Naghavi M, Foreman (2012) Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010 – a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, 380: 2095-2128.
- 8 Pauwels RA, Buist AS, Calverley PM, Jenkins CR, Hurd SS. (2001) Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global initiative for chronic obstructive lung disease (GOLD) workshop summary. *Am J Respir Crit Care Med*, 163: 1256-1276.
- 9 Lopez AD, Murray CC. (1998) The global burden of disease: 1990-2020. *Nat Med*, 4: 1241-1243.
- 10 Cosio MG, Saetta M, Agusti A. (2009) Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*, 360: 2445-2454.
- 11 Mathers CD, Loncar D. (2006) Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PloS Med*, 3: 2011-2030.
- 12 Strausz J, Böszörményi NG, Csekeő A, Csoma Z, Herjavec I, Kovács G, Nyári L, Ostoros Gy, Zsarnóczai I. (2010) A pulmonológiai intézmények 2009 évi epidemiológiai és működési adatai. *Korányi Bulletin*, 2: 2-25.

- 13 Bakos A, Böszörményi Nagy Gy, Csoma Zs, Gaudi I, Herjavec I, Horváth I, Kovács G, Ostoros Gy, Szabó N, Zsarnóczai I. (2015) A pulmonológiai hálózat 2014. évi epidemiológiai és működési adatai. *Korányi Bulletin*, 1: 31-34.
- 14 Böszörményi NG, Balikó Z, Kovács G, Somfay A, Strausz J, Szilasi M, Varga J. (2014) Egészségügyi szakmai irányelv a krónikus obstruktív tüdőbetegség (chronic obstructive pulmonary disease-COPD) diagnosztikájáról és kezeléséről, az alap-, a szak- és a sürgősségi ellátás területére. *Medicina Thoracalis*, 67: 81-82.
- 15 US Surgeon General. (1984) The health consequences of smoking. Chronic Obstructive Pulmonary Disease. A Report of the Surgeon General. Washington DC, US Department of Health and Human Services.
- 16 Balmes J, Becklake M, Blanc P, Henneberger P, Kreiss K, Mapp C, Milton D, Schwartz D, Toren K, Viegi G. (2003) American Thoracic Society statement: occupational contribution to the burden of airway disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 167: 787-97.
- 17 Anderson HR, Spix C, Medina S, Schouten JP, Castellsague J, Rossi G, Zmirou D, Touloumi G, Wojtyniak B, Ponka A, Bacharova L, Schwartz J, Katsouyanni. (1997) Air pollution and daily admissions for chronic obstructive pulmonary disease in 6 European cities: results from the APHEA project. *Eur Respir J*, 10: 1064-1071.
- 18 Yang Q, Chen Y, Krewski D, Burnett RT, Shi Y, McGrail KM. (2005) Effect of short-term exposure to low levels of gaseous pollutants on chronic obstructive pulmonary disease hospitalizations. *Environ Res*, 99: 99-105.
- 19 Forastiere F, Stafoggia M, Picciotto S, Bellander T, D'Ippoliti D, Lanki T, von Klot S, Nyberg F, Paatero P, Peters A, Pekkanen J, Sunyer J, Perucci CA. (2005) A case-crossover analysis of out-of-hospital coronary deaths and air pollution in Rome, Italy. *Am J Respir Crit Care Med*, 172: 1594-1555.
- 20 Gryparis A, Forsberg B, Katsouyanni K, Analitis A, Touloumi G, Schwartz J, Samoli E, Medina S, Anderson HR, Niciu EM, Wichmann HE, Kriz B, Kosnik M, Skorkovsky J, Vonk JM, Dörtbudak Z. (2004) Acute effects of ozone on mortality from the 'Air Pollution and Health: a European Approach' Project. *Am J Respir Crit Care Med*, 170: 1080-1087.
- 21 Barker DJ, Godfrey KM, Fall C, Osmond C, Winter PD, Shaheen SO. (1991) Relation of birth weight and childhood respiratory infection to adult lung function and death from chronic obstructive airways disease. *BMJ*, 303: 671-675.

- 22 Kartaloglu Z. (2003) Socioeconomic status and chronic obstructive pulmonary disease. *Prev Med Bull*, 12: 87-96.
- 23 Laurell CB, Eriksson S. (1963) The electrophoretic pattern  $\alpha$ 1-globulin pattern of serum in  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency. *Scan J Clin Lab Invest*, 15: 132-140.
- 24 Böszörményi NG. Pulmonológiai Útmutató 2010: Klinikai irányelvek kézikönyve In: Böszörményi NG (szerk), Pulmonológia: diagnosztikus és terápia ajánlások pulmonológiai kórképekben. Medition, Budapest, 2010.
- 25 [www.goldcopd.org](http://www.goldcopd.org)
- 26 Fletcher C, Peto R. (1997) The natural history of chronic airflow obstruction. *Br Med J*, 1: 1645-1648.
- 27 Chung KF, Adcock IM. (2008) Multifaceted mechanisms in COPD: inflammation, immunity, and tissue repair and destruction. *Eur Respir J*, 31: 1334-1356.
- 28 Eagan TM, Ueland T, Wagner PD, Hardie JA, Mollnes TE, Damås JK, Aukrust P, Bakke PS. (2010) Systemic inflammatory markers in COPD: results from the Bergen COPD Cohort Study. *Eur Respir J*, 35: 540-548.
- 29 Agustí A, Edwards LD, Rennard SI, MacNee W, Tal-Singer R, Miller BE, Vestbo J, Lomas DA, Calverley PM, Wouters E, Crim C, Yates JC, Silverman EK, Coxson HO, Bakke P, Mayer RJ, Celli B. (2012) Persistent systemic inflammation is associated with poor clinical outcomes in COPD: a novel phenotype. *PLoS One*, 7: e37483.
- 30 Schane RE, Walter LC, Dinno A, Covinsky KE, Woodruff PG. (2008) Prevalence and risk factors for depressive symptoms in persons with chronic obstructive pulmonary disease. *J Gen Intern Med*, 23: 1757-1762.
- 31 Soriano JB, Visick GT, Muellerova H, Payvandi N, Hansell AL. (2005) Patterns of comorbidities in newly diagnosed COPD and asthma in primary care. *Chest*, 128: 2099-2107.
- 32 Tetley TD. (1993) New perspectives on basic mechanisms in lung disease. 6. Proteinase imbalance: its role in lung disease. *Thorax*, 48: 560-565.
- 33 Hill AT, Bayley D, Stockley RA. (1999) The interrelationship of sputum inflammatory markers in patients with chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med*, 160: 893-898.
- 34 Betsuyaku T, Nishimura M, Takeyabu K, Tanino M, Venge P, Xu S, Kawakami Y. (1999) Neutrophil granule proteins in bronchoalveolar lavage fluid from subjects with subclinical emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*, 159: 1985-1991.

- 35 Drost EM, Skwarski KM, Sauleda J, Soler N, Roca J, Agusti A, MacNee W. (2005) Oxidative stress and airway inflammation in severe exacerbations of COPD. *Thorax*, 60: 293-300.
- 36 Hiemstra PS, van Wetering S, Stolk J. (1998) Neutrophil serine proteinases and defensins in chronic obstructive pulmonary disease: effects on pulmonary epithelium. *Eur Respir J*, 12:1200-1208.
- 37 Voynow JA, Young LR, Wang Y, Horger T, Rose MC, Fischer BM. (1999) Neutrophil elastase increases MUC5AC mRNA and protein expression in respiratory epithelial cells. *Am J Physiol*, 276: 835-843.
- 38 Finkelstein R, Fraser RS, Ghezzi H, Cosio MG. (1995) Alveolar inflammation and its relation to emphysema in smokers. *Am J Respir Crit Care Med*, 152: 1666-1672.
- 39 Turato G, Zuin R, Miniati M, Baraldo S, Rea F, Beghé B, Monti S, Formichi B, Boschetto P, Harari S, Papi A, Maestrelli P, Fabbri LM, Saetta M. (2002) Airway inflammation in severe chronic obstructive pulmonary disease: relationship with lung function and radiologic emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*, 166: 105-110.
- 40 Churg A, Zhou S, Wright JL. (2012) Series "matrix metalloproteinases in lung health and disease": Matrix metalloproteinases in COPD. *Eur Respir J*, 39: 197-209.
- 41 Barnes PJ, Cosio MG. (2004) Characterization of T lymphocytes in chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS Med*. 2004; 1: e20.
- 42 Saetta M, Di Stefano A, Turato G, Facchini FM, Corbino L, Mapp CE, Maestrelli P, Ciaccia A, Fabbri LM. (1998) CD8+ T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 157: 822-826.
- 43 Baraldo S, Turato G, Badin C, Bazzan E, Beghé B, Zuin R, Calabrese F, Casoni G, Maestrelli P, Papi A, Fabbri LM, Saetta M. (2004) Neutrophilic infiltration within the airway smooth muscle in patients with COPD. *Thorax*, 59: 308-312.
- 44 Kägi D, Vignaux F, Ledermann B, Bürki K, Depraetere V, Nagata S, Hengartner H, Golstein P. (1994) Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science*, 265: 528-30.
- 45 Cannon MJ, Openshaw PJ, Askonas BA. (1998) Cytotoxic T cells clear virus but augment lung pathology in mice infected with respiratory syncytial virus. *J Exp Med*, 168: 1163-1168.

- 46 Garcia-Sanz JA, Velotti F, MacDonald HR, Masson D, Tschopp J, Nabholz M. (1988) Appearance of granule-associated molecules during activation of cytolytic T-lymphocyte precursors by defined stimuli. *Immunology*, 64: 129-134.
- 47 Majo J, Ghezzi H, Cosio M G. (2001) Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema. *Eur Respir J*, 17: 946-953.
- 48 Loetscher P, Seitz M, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B. (1996) Activation of NK cells by CC chemokines. Chemotaxis, Ca<sup>2+</sup> mobilization, and enzyme release. *J Immunol*, 156: 322-327.
- 49 Wang J, Urbanowicz RA, Tighe PJ, Todd I, Corne JM, Fairclough LC. (2013) Differential activation of killer cells in the circulation and the lung: a study of current smoking status and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *PLoS One*, 8: e58556.
- 50 Wilson, R. (1992) The pathogenesis and management of bronchial infections: the vicious circle of respiratory decline. *Rev Contemp Pharmacother*, 3: 103-112.
- 51 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.
- 52 Linden M, Rasmussen JB, Piitulainen E, Tunek A, Larson M, Tegner H, Venge P, Laitinen LA, Brattsand R. (1993) Airway inflammation in smokers with non obstructive and obstructive chronic bronchitis. *Am Rev Respir Dis*, 148: 1226-1232.
- 53 Panzner P, Lafitte JJ, Tsicopoulos A, Hamid Q, Tulic MK. (2003) Marked up-regulation of T lymphocytes and expression of interleukin-9 in bronchial biopsies from patients with chronic bronchitis with obstruction. *Chest*, 124: 1909-1915.
- 54 Peleman RA, Ryttilä PH, Kips JC, Joos GF, Pauwels RA. (1999) The cellular composition of induced sputum in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*, 13: 839-843.
- 55 Rutgers SR, Postma DS, ten Hacken NH, Kauffman HF, van Der Mark TW, Koeter GH, Timens W. (2000) Ongoing airway inflammation in patients with COPD who do not currently smoke. *Thorax*, 55:12-18.
- 56 Zhu J, Qiu YS, Majumdar S, Gamble E, Matin D, Turato G, Fabbri LM, Barnes N, Saetta M, Jeffery PK. (2001) Exacerbations of bronchitis: bronchial eosinophilia and gene expression for interleukin-4, interleukin-5 and eosinophil chemoattractants. *Am J Respir Crit Care Med*, 164: 109-116.

- 57 Brightling CE, McKenna S, Hargadon B, Birring S, Green R, Siva R, Berry M, Parker D, Monteiro W, Pavord ID, Bradding P. (2005) Sputum eosinophilia and the short term response to inhaled mometasone in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*, 60:193-198.
- 58 Chanez P, Vignola AM, O'Shaughnessy 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.
- 59 Barnes PJ. (2013) Corticosteroid resistance in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol*, 131: 636-645.
- 60 Grashoff WF, Sont JK, Sterk PJ, Hiemstra PS, de Boer WI, Stolk J, Han J, van Krieken JM. (1997) Chronic obstructive pulmonary disease: role of bronchiolar mast cells and macrophages. *Am J Pathol*, 151:1785-1790.
- 61 Sommerhoff CP, Caughey GH, Finkbeiner WE, Lazarus SC, Basbaum CB, Nadel JA. (1989) Mast cell chymase. A potent secretagogue for airway gland serous cells. *J Immunol*, 142: 2450-2456
- 62 Pesci A, Rossi GA, Bertorelli G, Aufiero A, Zanon P, Olivieri D. (1994) Mast cells in the airway lumen and bronchial mucosa of patients with chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med*, 149: 1311-1316.
- 63 Di Stefano A, Capelli A, Lusuardi M, Balbo P, Vecchio C, Maestrelli P, Mapp CE, Fabbri LM, Donner CF, Sietta M. (1998) Severity of airflow limitation is associated with severity of airway inflammation in smokers. *Am J Respir Crit Care Med*, 158: 1277-1285.
- 64 Kirkham A, Barnes PJ. (2013) Oxidative Stress in COPD. *Chest*, 144: 266-273.
- 65 Kodgule R, Salvi S. (2012) Exposure to biomass smoke as a cause for airway disease in women and children. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 12: 82-90.
- 66 Moldovan L, Moldovan NI. (2004) Oxygen free radicals and redox biology of organelles. *Histochem Cell Biol*, 122: 395-412.
- 67 MacNee W. (2001) Oxidants/antioxidants and COPD. *Chest*, 117: 303-317.
- 68 Pryor WA, Stone K. (1993) Oxidants in cigarette smoke: radicals hydrogen peroxides peroxyxynitrate and peroxyxynitrite. *Annals N Y Acad Sci*, 686: 12-28.
- 69 Ghio AJ, Pritchard RJ, Dittrich KL, Samet JM. (1997) Non-heme (Fe<sup>3+</sup>) in the lung increases with age in both humans and rats . *J Lab Clin Med*, 129: 53-61.

- 70 Pinamonti S, Muzzoli M, Chicca MC, Papi A, Ravenna F, Fabbri LM, Ciaccia A. (1996) Xanthine oxidase activity in bronchoalveolar lavage fluid from patients with chronic obstructive lung disease. *Free Radic Biol Med*, 21: 147–155.
- 71 Aaron SD, Angel JB, Lunau M, Wright K, Fex C, Le Saux N, Dales RE. (2001) Granulocyte inflammatory markers and airway infection during acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 163: 349-355.
- 72 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.
- 73 Rahman I, Morrison D, Donaldson K MacNee W. (1996) Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers. *Am J Respir Crit Care Med*, 154: 1055-1060.
- 74 Morrison D, Rahman I, Lannan S, MacNee W. (1999) Epithelial permeability, inflammation and oxidant stress in the airspaces of smokers. *Am J Respir Crit Care Med*, 159: 473-479.
- 75 Esterbauer H, Eckl P, Ortner A. (1990) Possible mutagens derived from lipids and lipid precursors. *Mutat Res*, 238: 223-233.
- 76 Dhakal N, Lamsal M, Baral N, Shrestha S, Dhakal SS, Bhatta N, Dubey RK. (2015) Oxidative stress and nutritional status in chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Diagn Res*, 9: 1-4.
- 77 Tug T, Karatas F, Terzi SM. (2004) Antioxidant vitamins (A, C and E) and malondialdehyde levels in acute exacerbation and stable periods of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Invest Med*, 27: 123-128.
- 78 Bhowmik A, Seemungal TAR, Sapsford RJ, Wedzicha JA. (2000) Relation of sputum inflammatory markers to symptoms and lung function changes in COPD exacerbations. *Thorax*, 55: 114-200.
- 79 Glezen WP, Greenberg SB, Atmar RL, Piedra PA, Couch RB. (2000) Impact of respiratory virus infections on persons with chronic underlying conditions. *JAMA*, 283: 499-505.
- 80 Beckham JD, Cadena A, Lin J, Piedra PA, Glezen WP, Greenberg SB, Atmar RL. (2005) Respiratory viral infections in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Infect*, 50: 322–330.



- 81 Seemungal TA, Harper-Owen R, Bhowmik A, Jeffries DJ, Wedzicha JA. (2000) Detection of rhinovirus in induced sputum at exacerbation of chronic bronchitis. *Eur Respir J*, 16: 677-683.
- 82 Borg I, Rohde G, Löseke S, Bittscheidt J, Schultze-Werninghaus G, Stephan V, Bufe A. (2003) Evaluation of a quantitative real-time PCR for the detection of respiratory syncytial virus in pulmonary diseases. *Eur Respir J*, 21: 944-951.
- 83 Thompson WW, Shay DK, Weintraub E, Brammer L, Bridges CB, Cox NJ, Fukuda K. (2004) Influenza-associated hospitalizations in the United States. *JAMA*, 292: 1333-1340.
- 84 Thompson WW, Shay DK, Weintraub E, Brammer L, Cox N, Anderson LJ, Fukuda K. (2003) Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. *JAMA*, 289: 179-186.
- 85 Zalacain R, Sobradillo V, Amilibia J, Barrón J, Achótegui V, Pijoan JI, Llorente JL. (1999) Predisposing factors to bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*, 13: 343-348.
- 86 Sapey E, Stockley RA. (2006) COPD exacerbations 2: aetiology. *Thorax*, 61:250-258.
- 87 Bogaert D, van der Valk P, Ramdin R, Sluijter M, Monninkhof E, Hendrix R, de Groot R, Hermans PW. (2004) Host-pathogen interaction during pneumococcal infection in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Infect Immun*, 72: 818-823.
- 88 Soler N, Torres A, Ewig S, Gonzalez J, Celis R, El-Ebiary M, Hernandez C, Rodriguez-Roisin R. (1998) Bronchial microbial patterns in severe exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) requiring mechanical ventilation. *Am J Respir Crit Care Med*, 157: 1498-505.
- 89 Connors AF Jr, Dawson NV, Thomas C, Harrell FE Jr, Desbiens N, Fulkerson WJ, Kussin P, Bellamy P, Goldman L, Knaus WA. (1996) Outcomes following acute exacerbations of severe chronic obstructive lung disease. The SUPPORT investigators. *Am J Respir Crit Care Med*, 154: 959-967.
- 90 Horvath I, de Jongste JC. (2010) Exhaled Biomarkers. In: Horvath I (szerk.), *European Respiratory Society Monographs 49*. Latimer Trend, Plymouth, UK.
- 91 Barnes PJ. (2004) Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol Rev*, 56: 515-548.

- 92 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 Crit Care Med*, 174: 6-14.
- 93 Cocci F, Miniati M, Monti S, Cavarra E, Gambelli F, Battolla L, Lucattelli M, Lungarella G. (2002) Urinary desmosine excretion is inversely correlated with the extent of emphysema in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 34: 594-604.
- 94 Gan WQ, Man SF, Senthilselvan A, Sin DD. (2004) Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis. *Thorax*, 59: 574-580.
- 95 Weis N, Almdal T. (2006) C-reactive protein: can it be used as a marker of infection in patients with exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease? *Eur J Intern Med*, 17: 88-91.
- 96 Borrill ZL, Roy K, Singh D. (2008) Exhaled breath condensate biomarkers in COPD. *Eur Respir J*, 32: 472-486.
- 97 Larsson K. (2008) Inflammatory markers in COPD. *Clin Respir J*, 2: 84-87.
- 98 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.
- 99 Baraldi E, Ghio L, Piovan V, Carraro S, Zacchello F, Zanconato. (2003) Safety and success of exhaled breath condensate collection in asthma. *Arch Dis Child*, 88: 358-360.
- 100 Augusto VS, Rodrigues AJ, C Silveira AP, de Castro E Silva O Jr, Mente ED, Evora PR. (2014) Exhaled and plasma nitrite: a comparative study among healthy, cirrhotic and liver transplant patients. *Arq Gastroenterol*, 51: 16-20.
- 101 Bickerman HA, Sproul EE, Barach AL. (1958) An aerosol method of producing bronchial secretions in human subjects: a clinical technique for the detection of lung cancer. *Dis Chest*, 33: 347-362.

- 102 Paggiaro PL, Chanez P, Holz O, Ind PW, Djukanović R, Maestrelli P, Sterk PJ. (2002) Sputum induction. *Eur Respir J*, 37: 3-8.
- 103 Belda J, Leigh R, Parameswaran K, O'Byrne PM, Sears MR, Hargreave FE. (2000) Induced sputum cell counts in healthy adults. *Am J Respir Crit Care Med*, 161: 475-478.
- 104 Bhowmik A, Seemungal TA, Sapsford RJ, Devalia JL, Wedzicha JA. (1998) Comparison of spontaneous and induced sputum for investigation of airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*, 53: 953-956.
- 105 Horváth I. (2004) A légúti megbetegedések újabb, nem invazív vizsgáló módszerei. *Lege Artis Medicina*, 14: 392-397.
- 106 Nightingale JA, Rogers DF, Barnes PJ. (1998) Effect of repeated sputum induction on cell counts in normal volunteers. *Thorax*, 53: 87-90.
- 107 Erin EM, Barnes PJ, Hansel TT. (2002) Optimizing sputum methodology. *Clin Exp Allergy*, 32: 653–657.
- 108 Woolhouse IS, Bayley DL, Stockley RA. (2002) Effect of sputum processing with dithiothreitol on the detection of inflammatory mediators in chronic bronchitis and bronchiectasis. *Thorax*, 57: 667-671.
- 109 Jayaram L, Parameswaran K, Sears MR, Hargreave FE. (2000) Induced sputum cell counts: their usefulness in clinical practice. *Eur Respir J*, 16: 150-158.
- 110 Yamamoto C, Yoneda T, Yoshikawa M, Fu A, Tokuyama T, Tsukaguchi K, Narita N. (1997) Airway inflammation in COPD assessed by sputum levels of interleukin-8. *Chest*, 112: 505-510.
- 111 Cao Y, Gong W, Zhang H, Liu B, Li B, Wu X, Duan X, Dong J. (2012) Comparison of Serum and Sputum Inflammatory Mediator Profiles in Patients with Asthma and COPD. *J of Internat Med Res*, 40: 2231-2242.
- 112 Demedts IK, Morel-Montero A, Lebecque S, Pacheco Y, Cataldo D, Joos GF, Pauwels RA, Brusselle GG. (2006) Elevated MMP-12 protein levels in induced sputum from patients with COPD. *Thorax*, 61: 196-201.
- 113 Antus B. Oxidative stress markers in sputum. (2016) *Oxid Med Cell Longev*, 2016: 2930434.
- 114 Corhay JL, Moermans C, Henket M, Nguyen Dang D, Duysinx B, Louis R. (2014) Increased of exhaled breath condensate neutrophil chemotaxis in acute exacerbation of COPD. *Respir Res*, 15: 115.

- 115 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.
- 116 Antus B, Horváth I. (1996) A nitrogen-monoxid szerepe a pulmonalis rendszerben. *Medicina Thoracalis* 42: 162-167.
- 117 Antus B, Barta I, Horvath I, Csiszer E. (2010) Relationship between exhaled nitric oxide and treatment response in COPD patients with exacerbations. *Respirology*, 15: 472-477.
- 118 Soter S, Barta I, Antus B. (2013) Predicting sputum eosinophilia in exacerbations of COPD using exhaled nitric oxide. *Inflammation*, 36: 1178-1185.
- 119 Maziak W, Loukides S, Culpitt S, Sullivan P, Kharitonov SA, Barnes PJ. (1998) Exhaled nitric oxide in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 157: 998-1002.
- 120 Papi A, Romagnoli M, Baraldo S, Braccioni F, Guzzinati I, Saetta M, Ciaccia A, Fabbri LM. (2000) Partial reversibility of airflow limitation and increased exhaled NO and sputum eozinofilia in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 162: 1773-1777.
- 121 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.
- 122 Feldberg W, Hliden HF, Kellaway CH. (1938) The formation of lyscithin and of a muscle-stimulating substance by snake venoms. *J Phisiol*, 94: 232-248.
- 123 Samuelsson B. (2000) The discovery of the leukotrienes. *Am J Respir Crit Care Med*, 161: 2-6.
- 124 Herjavec I, Csoma Z. (2009) A krónikus légúti gyulladós szindróma. *Medicina Thoracalis*, 62: 246-260.
- 125 Drakatos P, Lykouras D, Sampsonas F, Karkoulas K, Spiropoulos K. (2009) Targeting leukotrienes for the treatment of COPD. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 8: 297-306.
- 126 Zakrzewski JT, Barnes NC, Costello JF, Piper PJ. (1987) Lipid mediators in cystic fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis*, 136: 779-782.

- 127 Chapell GP, Xiao X, Pica-Mendez A, Varnell T, Green S, Tanaka WK, Laterz O. (2011) Quantitative measurement of cysteinyl leukotrienes and leukotriene B4 in human sputum using high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol BiomedLife Sci*, 879: 277-284.
- 128 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.
- 129 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.
- 130 Zhu J, Bandi V, Qiu S, Figueroa DJ, Evans JF, Barnes N, Guntupalli KK, Jeffery PK. (2012) Cysteinyl leukotriene 1 receptor expression associated with bronchial inflammation in severe exacerbations of COPD. *Chest*, 142: 347-357.
- 131 Celik P, Sakar A, Havlucu Y, Yuksel H, Turkdogan P, Yorgancioglu A. (2005) Short-term effects of montelukast in stable patients with moderate to severe COPD. *Respir Med*, 99: 444-450.
- 132 Rubinstein I, Kumar B, and Schriever C. (2004) Long-term montelukast therapy in moderate to severe COPD – a preliminary observation. *Respir Med*, 98:134-138.
- 133 Busse WW. (1998) Leukotrienes and inflammation. *AmJ Respir Crit Care Med*, 157: 210-213.
- 134 Kostikas K, Gaga M, Papatheodorou G, Karamanis T, Orphanidou D, Loukides S. (2005) Leukotriene B4 in exhaled breath condensate and sputum supernatant in patients with COPD and asthma. *Chest*, 127:1553-1559.
- 135 Borrill ZL, Starkey RC, Singh SD. (2007) Variability of exhaled breath condensate leukotriene B4 and 8-isoprostane in COPD patients. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2: 71-76.
- 136 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.
- 137 Profita M, Giorgi RD, Sala A, Bonanno A, Riccobono L, Mirabella F, Gjomarkaj M, Bonsignore G, Bousquet J, Vignola AM. (2005) Muscarinic receptors, leukotriene B4 production and neutrophilic inflammation in COPD patients. *Allergy*, 60: 1361-1369.

- 138 Seggev JS, Thornton WH Jr, Edes TE. (1991) Serum leukotriene B4 levels in patients with obstructive pulmonary disease. *Chest*, 99: 289-291.
- 139 Corhay JL, Henket M, Nguyen D, Duysinx B, Sele J, Louis R. (2009) Leukotriene B4 contributes to exhaled breath condensate and sputum neutrophil chemotaxis in COPD. *Chest*, 136: 1047-1054.
- 140 Bathoorn E, Liesker JJ, Postma DS, Koëter GH, van der Toorn M, van der Heide S, Ross HA, van Oosterhout AJ, Kerstjens HA. (2009) Change in inflammation in out-patient COPD patients from stable phase to a subsequent exacerbation. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 4: 101-109.
- 141 Carpagnano GE, Kharitonov SA, Foschino-Barbaro MP, Resta O, Gramiccioni E, Barnes PJ. (2003) Increased inflammatory markers in the exhaled breath condensate of cigarette smokers. *Eur Respir J*, 21: 589-593.
- 142 Stravinskaite K, Sitkauskiene B, Dicipinigaitis PV, Babusyte A, Sakalauskas R. (2009) Influence of smoking status on cough reflex sensitivity in subjects with COPD. *Lung*, 187: 37-42.
- 143 Hoffmeyer F, Harth V, Bunger J, Bruning T, Raulf-Heimsoth M. (2009) Leukotriene B4, 8-iso-prostaglandin F2 alpha, and pH in exhaled breath condensate from asymptomatic smokers. *J Physiol Pharmacol*, 60: 57-60.
- 144 Miller M, Cho JY, Pham A, Friedman PJ, Ramsdell J, Broide DH. (2011) Persistent airway inflammation and emphysema progression on CT scan in ex- smokers observed for 4 years. *Chest*, 139: 1380-1387.
- 145 Woolhouse IS, Bayley DL, Stockley RA. (2002) Sputum chemotactic activity in chronic obstructive pulmonary disease: effect of alpha (1) -antitrypsin deficiency and the role of leukotriene B (4) and interleukin 8. *Thorax*, 57: 709-714.
- 146 Grönke L, Beeh KM, Cameron R, Kornmann O, Beier J, Shaw M, Holz O, Buhl R, Magnussen H, Jörres RA. (2008) Effect of the oral leukotriene B4 receptor antagonist LTB019 on inflammatory sputum markers in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Pulm Pharmacol Ther*, 21: 409-417.
- 147 Woodruff PG, Albert RK, Bailey WC, Casaburi R, Connett JE, Cooper JA Jr, Criner GJ, Curtis JL, Dransfield MT, Han MK, Harnden SM, Kim V, Marchetti N, Martinez FJ, McEvoy CE, Niewoehner DE, Reilly JJ, Rice K, Scanlon PD, Scharf SM, Sciurba FC,

- Washko GR, Lazarus SC; Copd Clinical Research Network. (2011) Randomized trial of zileuton for treatment of COPD exacerbations requiring hospitalization. *COPD*, 8: 21-29.
- 148 Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Reboul P, Pelletier JP. (2003) Therapeutic role of dual inhibitors of 5-LOX and COX, selective and non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Ann Rheum Dis*, 62: 501-509.
- 149 Vizi É, Huszár É. Terhelés indukálta asztma. In: Herjavec I. (szerk.): Légúti allergológia. Asztma és társbetegségei. Melania, 2004.
- 150 Pierzchalska M, Szabó Z, Sanak M, Soja J, Szczeklik A. (2003) Deficient prostaglandin E2 production by bronchial fibroblasts of asthmatic patients, with special reference to aspirin-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 111: 1041-1048.
- 151 Szczeklik A, Mastalerz L, Nizankowska E, Cmiel A. (1996) Protective and bronchodilator effects of prostaglandin E and salbutamol in aspirin-induced asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 153: 567-571.
- 152 Borchers MT, Carty MP, Leikauf GD. (1998) Regulation of human airway mucins by acrolein and inflammatory mediators. *Am J Physiol*, 276: 549-555.
- 153 Tamaoki J, Chiyotani A, Kobayashi K, Sakai N, Kanemura T, Takizawa T. (1992) Effect of indomethacin on bronchorrhea in patients with chronic bronchitis, diffuse panbronchiolitis, or bronchiectasis. *Am Rev Respir Dis*, 145: 548-552.
- 154 Maher SA, Birrell MA, Belvisi MG. (2009) Prostaglandin E2 mediates cough via the EP3 receptor: implications for future disease therapy. *Am J Respir Crit Care Med*, 180: 923-928.
- 155 Spicuzza L, Giembycz MA, Barnes PJ, and Belvisi MG. (1998) Prostaglandin E2 suppression of acetylcholine release from parasympathetic nerves innervating guinea-pig trachea by interacting with prostanoid receptors of the EP3-subtype. *Br J Pharmacol*, 123: 1246-1252.
- 156 Gauvreau GM, Watson RM, O'Byrne PM. (1999) Protective effects of inhaled PGE2 on allergen-induced airway responses and inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*, 159: 31-36.
- 157 Meja KK, Barnes PJ, Giembycz MA. (1997) Characterization of the prostanoid receptor(s) on human blood monocytes at which prostaglandin E2 inhibits lipopolysaccharide- induced tumour necrosis factor- $\alpha$ . *Br J Pharmacol*, 122: 149-157.

- 158 Au BT, Teixeira MM, Collins PD, Williams TJ. (1998) Effect of PDE4 inhibitors on zymosan-induced IL-8 release from human neutrophils: synergism with prostanoids and salbutamol. *Br J Pharmacol*, 123: 1260-1266.
- 159 Montuschi P, Kharitonov SA, Ciabattoni G, Barnes PJ. (2003) Exhaled leukotrienes and prostaglandins in COPD. *Thorax*, 58: 585-588.
- 160 Fritscher LG, Post M, Rodrigues MT, Silverman F, Balter M, Chapman KR, Zamel N. (2012) Profile of eicosanoids in breath condensate in asthma and COPD. *J Breath Res*, 6: e026001.
- 161 Montuschi P, Macagno F, Parente P, Valente S, Lauriola L, Ciappi G, Kharitonov SA, Barnes PJ, Ciabattoni G. (2005) Effects of cyclo-oxygenase inhibition on exhaled eicosanoids in patients with COPD. *Thorax*, 60: 827-833.
- 162 Profita M, Sala A, Bonanno A, Riccobono L, Ferraro M, La Grutta S, Albano GD, Montalbano AM, Gjomarkaj M. (2010) Chronic obstructive pulmonary disease and neutrophil infiltration: role of cigarette smoke and cyclooxygenase products. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 298: 261-269.
- 163 Sastre B, Fernández-Nieto M, Mollá R, López E, Lahoz C, Sastre J, del Pozo V, Quirce S. (2008) Increased prostaglandin E2 levels in the airway of patients with eosinophilic bronchitis. *Allergy*, 63: 58-66.
- 164 Birring SS, Parker D, Brightling CE, Bradding P, Wardlaw AJ, Pavord ID. (2004) induced sputum inflammatory mediator concentrations in chronic cough. *Am J Respir Crit Care Med*, 169: 15-19.
- 165 Brightling CE, Ward R, Woltmann G, Bradding P, Sheller JR, Dworski R, Pavord ID. (2000) Induced sputum inflammatory mediator concentrations in eosinophilic bronchitis and asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 162: 878-882.
- 166 Chen Y, Chen P, Hanaoka M, Droma Y, Kubo K. (2008) Enhanced levels of prostaglandin E2 and matrix metalloproteinase-2 correlate with the severity of airflow limitation in stable COPD. *Respirology*, 13: 1014-1021.
- 167 Allen IC, Hartney JM, Coffman TM, Penn RB, Wess J, Koller BH. (2006) Thromboxane A2 induces airway constriction through an M3 muscarinic acetylcholine receptor-dependent mechanism. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 290: 526-533.



- 168 Zheng L, Duan SF, Zhang ZX. (1991) Changes of thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) and prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) in COPD patients with pulmonary hypertension. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*, 30: 91-93.
- 169 Davì G, Basili S, Vieri M, Cipollone F, Santarone S, Alessandri C, Gazzaniga P, Cordova C, Violi F. (1997) Enhanced thromboxane biosynthesis in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 156: 1794-1799.
- 170 Horiguchi T, Tachikawa S, Kondo R, Shiga M, Hirose M, Fukumoto K. (2002) Study on the usefulness of seratrodist in the treatment of chronic pulmonary emphysema. *Arzneim-Forsch*, 52: 764-768.
- 171 Hutás I, Hadházy P, Debreczeni L, Vizi ES. (1981) Relaxation of human isolated bronchial smooth muscle. Role of prostacyclin and prostaglandin F<sub>2</sub> alpha in muscle tone. *Lung*, 159: 153-161.
- 172 Stacy LD, Stokes P. (2012) PGI as a regulator of inflammatory diseases. *Med Infl*, doi: 10.1155/2012/926968.
- 173 Hardy CC, Robinson C, Tattersfield AE, Holgate ST. (1984) The bronchoconstrictor effect of inhaled prostaglandin D<sub>2</sub> in normal and asthmatic men. *N Engl J Med*, 311: 209-213.
- 174 Shin D, Park SH, Choi JY, Kim JH, Antika LD, Habibah NB, Kang MK, and Kang JH. (2015) Dietary compound kaempferol inhibits airway thickening induced by allergic reaction in a bovine serum albumin-induced model of asthma. *Int J Mol Sci*, 16: 29980–29995.
- 175 Ryter SW, Sethi JM. (2007) Exhaled carbon monoxide as a biomarker of inflammatory lung disease. *J Breath Res*, 1: e026004.
- 176 Chatkin G, Chatkin JM, Aued G, Petersen GO, Jeremias ET, Thiesen FV. (2010) Evaluation of the exhaled carbon monoxide levels in smokers with COPD. *J Bras Pneumol*, 36: 332-338.
- 177 Antus B, Drozdovszky O, Barta I. (2016) Assessment of exhaled carbon monoxide in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Acta Physiol Hung* (in press)
- 178 Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, Roberts LJ. (1990) A series of prostaglandin F<sub>2</sub>-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87: 9383-9387.

- 179 Montuschi P, Barnes PJ, Roberts LJ. (2004) Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *FASEB J*, 18: 1791-1800.
- 180 Kinnula VL, Ilumets H, Myllärniemi M, Sovijärvi A, Ryttilä P. (2007) 8-Isoprostane as a marker of oxidative stress in nonsymptomatic cigarette smokers and COPD. *Eur Respir J*, 29: 51-55.
- 181 Montuschi P, Collins JV, Ciabattini 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.
- 182 Inonu H, Doruk S, Sahin S, Erkorkmaz U, Celik D, Celikel S, Seyfikli Z. (2012) Oxidative stress levels in exhaled breath condensate associated with COPD and smoking. *Respir Care*, 57: 413-419.
- 183 Mazur W, Stark H, Sovijärvi A, Myllärniemi M, Kinnula VL. (2009) Comparison of 8-isoprostane and interleukin-8 in induced sputum and exhaled breath condensate from asymptomatic and symptomatic smokers. *Respiration*, 78: 209-216.
- 184 Makris D, Paraskakis E, Korakas P, Karagiannakis E, Sourvinos G, Siafakas NM, Tzanakis N. (2008) Exhaled breath condensate 8-isoprostane, clinical parameters, radiological indices and airway inflammation in COPD. *Respiration*, 75: 138-144.
- 185 Stravinskaite K, Sitkauskiene B, Dicipinigaitis PV, Babusyte A, Sakalauskas R. (2009) Influence of smoking status on cough reflex sensitivity in subjects with COPD. *Lung*, 187: 37-42.
- 186 Morrow JD, Frei B, Longmire AW, Gaziano JM, Lynch SM, Shyr Y, Strauss WE, Oates JA, Roberts LJ. (1995) Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) in smokers. Smoking as a cause of oxidative damage. *N Engl J Med*, 332: 1198-1203.
- 187 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.
- 188 Basu S. (2007) The enigma of in vivo oxidative stress assessment: isoprostanes as an emerging target. *Scand J Food Nutr*, 51: 48-61.
- 189 Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med*, 11: 81-128.

- 190 Tsikas D, Suchy MT, Niemann J, Tossios P, Schneider Y, Rothmann S, Gutzki FM, Frölich JC, Stichtenoth DO. (2012) Glutathione promotes prostaglandin H synthase (cyclooxygenase) dependent formation of malondialdehyde and 15(S)-8-iso-prostaglandin F2 $\alpha$ . *FEBS Lett.* 2012. 586: 3723-3730.
- 191 Zarkovic N, Cipak A, Jaganjac M, Borovic S, Zarkovic K. (2013) Pathophysiological relevance of aldehydic protein modifications. *Journal of Proteomics*, 92: 239-247.
- 192 Brambilla G, Sciabà L, Faggin P, Maura A, Marinari UM, Ferro M, Esterbauer H. (1986) Cytotoxicity, DNA fragmentation and sister-chromatid exchange in Chinese hamster ovary cells exposed to the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal and homologous aldehydes. *Mutat Res*, 171: 169-176.
- 193 Sinnhuber RO, Yu TC, Yu TC. (1958) Characterization of the red pigment formed in the 2-thiobarbituric acid determination of oxidative rancidity. *J Food Sci*, 23: 626-634.
- 194 Giera M, Lingeman H, Niessen WM. (2012) Recent advancements in the LC- and GC-based analysis of malondialdehyde (MDA): a brief overview. *Chromatographia*, 75: 433-440.
- 195 Montaña M, Cisneros J, Ramírez-Venegas A, Pedraza-Chaverri J, Mercado D, Ramos C, Sansores RH. (2010) Malondialdehyde and superoxide dismutase correlate with FEV(1) in patients with COPD associated with wood smoke exposure and tobacco smoking. *Inhal Toxicol*, 10: 868-874.
- 196 Waseem SM1, Mobarak MH, Islam N, Ahmad Z. (2012) Comparative study of pulmonary functions and oxidative stress in smokers and non-smokers. *Indian J Physiol Pharmacol*, 56: 345-352.
- 197 Isik B, Ceylan A, Isik R. (2007) Oxidative stress in smokers and non-smokers. *Inhal Toxicol*, 19: 767-769.
- 198 Ahmad A, Shameem M, Husain Q. (2013) Altered oxidant-antioxidant levels in the disease prognosis of chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Tuberc Lung Dis*, 17: 1104-1109.
- 199 Arja C, Surapaneni KM, Raya P, Adimoolam C, Balisetty B, Kanala KR. (2013) Oxidative stress and antioxidant enzyme activity in South Indian male smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Respirology*, 18: 1069-1075.

- 200 Cristóvão C, Cristóvão L, Nogueira F, Bicho M. (2013) Evaluation of the oxidant and antioxidant balance in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Rev Port Pneumol.* 19: 70-75.
- 201 Joppa P, Petrásová D, Stancák B, Dorková Z, Tkáčová R. (2007) Oxidative stress in patients with COPD and pulmonary hypertension. *Wien Klin Wochenschr,* 119: 428-434.
- 202 Sunnetcioglu A, Alp HH, Sertogullarından B, Balaharoglu R, Gunbatar H. (2016) Evaluation of Oxidative Damage and Antioxidant Mechanisms in COPD, Lung Cancer, and Obstructive Sleep Apnea Syndrome. *Respir Care,* 61: 205-211.
- 203 Lee JS, Shin JH, Hwang JH, Baek JE, Choi BS. (2014) Malondialdehyde and 3-nitrotyrosine in exhaled breath condensate in retired elderly coal miners with chronic obstructive pulmonary disease. *Saf Health Work,* 5: 91-96.
- 204 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. *Med Inflamm,* 2011: e891752.
- 205 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.
- 206 Ben Moussa S, Rouatbi S, Ben Saad H. (2016) Incapacity, Handicap, and Oxidative Stress Markers of Male Smokers With and Without COPD. *Respir Care,* 61: 668-679.
- 207 [www.caymanchem.com](http://www.caymanchem.com)
- 208 Rutgers SR, Timens W, Kaufmann HF, van der Mark TW, Koëter GH, Postma DS. (2000) Comparison of induced sputum with bronchial wash, bronchoalveolar lavage and bronchial biopsies in COPD. *Eur Respir J,* 15: 109-115.
- 209 Antus B. (2012) Légúti gyulladás vizsgálata krónikus obstruktív tüdőbetegségben: biomarkerek a kilégzett levegő kondenzátumban. *Orv Hetil* 153: 848-851.
- 210 Nocker RE, Out TA, Weller FR, de Riemer MJ, Jansen HM, van der Zee JS. (2000) Induced sputum and bronchoalveolar lavage as tools for evaluating the effects of inhaled corticosteroids in patients with asthma. *J Lab Clin Med,* 136: 39-49.
- 211 Pizzichini E, Pizzichini MM, Kidney JC, Efthimiadis A, Hussack P, Popov T, Cox G, Dolovich J, O'Byrne P, Hargreave FE. (1998) Induced sputum, bronchoalveolar lavage and

blood from mild asthmatics: inflammatory cells, lymphocyte subsets and soluble markers compared. *Eur Respir J*, 11: 828-834.

212 Ono E, Mita H, Taniguchi M, Higashi N, Tsuburai T, Miyazaki E, Kumamoto T, Akiyama K. (2008) Comparison of cysteinyl leukotriene concentrations between exhaled breath condensate and bronchoalveolar lavage fluid. *Clin Exp Allergy*, 38: 1866-1874.

213 Kazani S, Planaguma A, Ono E, Bonini M, Zahid M, Marigowda G, Wechsler ME, Levy BD, Israel E. (2013) Exhaled breath condensate eicosanoid levels associate with asthma and its severity. *J Allergy Clin Immunol*. 132: 547-553.

214 Zagórska W, Grzela K, Kulus M, Sobczyński M, Grzela T. (2013) Increased cysteinyl leukotrienes in exhaled breath condensate and decrease of PNIF after intranasal allergen challenge support the recognition of allergic rhinitis in children. *Arch Immunol Ther Exp*, 61: 327-332.

215 Kaźmierczak M, Ciebiada M, Pękala-Wojciechowska A, Pawłowski M, Nielepkowicz-Goździńska A, Antczak A. (2015) Evaluation of markers of inflammation and oxidative stress in COPD patients with or without cardiovascular comorbidities. *Heart Lung Circ*, 24: 817-823.

216 Aggarwal S, Moodley YP, Thompson PJ, Misso NL. (2010) Prostaglandin E2 and cysteinyl leukotriene concentrations in sputum: association with asthma severity and eosinophilic inflammation. *Clin Exp Allergy*, 40: 85-93.

217 He LK, Liu LH, Hahn E, Gamelli RL. (2001) The expression of cyclooxygenase and the production of prostaglandin E2 in neutrophils after burn injury and infection. *J Burn Care Rehabil*, 22: 58-64.

218 Xu F, Xu Z, Zhang R, Wu Z, Lim JH, Koga T, Li JD, Shen H. (2008) Nontypeable *Haemophilus influenzae* induces COX-2 and PGE2 expression in lung epithelial cells via activation of p38 MAPK and NF-kappa B. *Respir Res*, 9: 16.

219 Crooks SW, Bayley DL, Hill SL, Stockley RA. (2000) Bronchial inflammation in acute bacterial exacerbations of chronic bronchitis: the role of leukotriene B4. *Eur Respir J*, 15: 274-280.

220 Warwick G, Thomas PS, Yates DH. (2013) Non-invasive biomarkers in exacerbation of obstructive lung disease. *Respirology*, 18: 874-884.

- 221 Mohan A, Prasad D, Sharma A, Arora S, Guleria R, Sharma SK, Pandey RM. (2012) Delayed resolution of inflammatory response compared with clinical recovery in patients with acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Respirology*, 17: 1080-1085.
- 222 Taylor BM, Sun FF. (1985) Disappearance and metabolism of leukotriene B4 during carrageenan-induced pleurisy. *Biochem Pharmacol*, 34: 3495-3498.
- 223 Carpagnano GE, Resta O, Foschino-Barbaro MP, Spanevello A, Stefano A, Di Gioia G, Serviddio G, Gramiccioni E. (2004) Exhaled Interleukine-6 and 8-isoprostane in chronic obstructive pulmonary disease: effect of carbocysteine lysine salt monohydrate (SCMC-Lys). *Eur J Pharmacol*, 505: 169-175.
- 224 Koczulla AR, Noeske S, Herr C. (2012) Alpha-1 antitrypsin is elevated in exhaled breath condensate and serum in exacerbated COPD patients. *Respir Med*, 106: 120-126.
- 225 Thomson NC, Chaudhuri R, Spears M, Messow CM, Jelinsky S, Miele G, Nocka K, Takahashi E, Hilmi OJ, Shepherd MC, Miller DK, McSharry C. (2014) Arachidonic acid metabolites and enzyme transcripts in asthma are altered by cigarette smoking. *Allergy*, 69: 527-536.
- 226 Corradi M, Rubinstein I, Andreoli R, Manini P, Caglieri A, Poli D, Alinovi R, Mutti A. (2003) Aldehydes in exhaled breath condensate of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 167: 1380-1386.
- 227 Schünemann HJ, Muti P, Freudenheim JL, Armstrong D, Browne R, Klocke RA, Trevisan M. (1997) Oxidative stress and lung function. *Am J Epidemiol*, 148: 939-948.
- 228 Casimirri E, Stendardo M, Bonci M, Andreoli R, Bottazzi B, Leone R, Schito M, Vaccari A, Papi A, Contoli M, Corradi M, Boschetto P. (2015) Biomarkers of oxidative-stress and inflammation in exhaled breath condensate from hospital cleaners. *Biomarkers*, 9: 1-8.
- 229 Hunt J. (2007) Exhaled Breath Condensate—an overview. *Immunol Allergy Clin North Am*, 27: 587-596.
- 230 Bathoorn E, Liesker J, Postma D, Koeter G, van Oosterhout AJ, Kerstjens HA. (2016) Safety of sputum induction during exacerbations of COPD. *Chest*, 131: 432-438.

## 11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

### Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények:

1. **Drozdovszky O**, Barta I, Antus B. (2014) Sputum eicosanoid profiling in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Respiration*, 87: 408-415.
2. Antus B, Harnasi G, **Drozdovszky O**, Barta I. (2014) Monitoring oxidative stress during chronic obstructive pulmonary disease exacerbations using malondialdehyde. *Respirology*, 19: 74-79.

### Egyéb - nem az értekezés témájában megjelent – eredeti közlemények:

1. Balassa T, Varró P, Elek S, **Drozdovszky O**, Szemerszky R, Világi I, Bárdos G. (2013) Changes in synaptic efficacy in rat brain slices following extremely low-frequency magnetic field exposure at embryonic and early postnatal age. *Int J Dev Neurosci*, 31:724-730.
2. Köteles F, Szemerszky R, Gubányi M, Körmendi J, Szekrényesi C, Lloyd R, Molnár L, **Drozdovszky O**, Bárdos G. (2013) Idiopathic environmental intolerance attributed to electromagnetic fields (IEI-EMF) and electrosensitivity (ES) - are they connected? *Int J Hyg Environ Health*, 216: 362-370.
3. Páska C, Barta I, **Drozdovszky O**, Antus B. (2014) RNS-izolálás optimalizálása COPD-s betegek köpetéből. *Medicina Thoracalis*, 67: 408-415.
4. Antus B, **Drozdovszky O**, Barta I, Kelemen K. (2015) Comparison of airway and systemic malondialdehyde levels for assessment of oxidative stress in cystic fibrosis. *Lung*, 193: 597-604.

## 12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Doktori munkámhoz kapcsolódóan mindenekelőtt köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek, dr. Antus Balázsnak, aki lehetővé tette számomra, hogy az Országos Korányi Tbc és Pulmonológiai Intézet Kóréletteni Osztályának munkacsoportjában több évet eltölthessek, és aktív kutatómunkát folytathassak. Hálás vagyok témavezetőmnek mindenkori bizalmáért és támogatásáért, a vizsgálatok megtervezésében nyújtott segítségéért, szakmai tudásának megosztásáért, illetve a mindig hasznos kritikai észrevételeiért.

Hálás vagyok Barta Imre biológus kollegámnak, akitől számos laboratóriumi technikát – többek között a köpetfeldolgozás metodikáját is – elsajátíthattam. Köszönöm szakmai tanácsait, kritikai észrevételeit, a dolgozat megírásával kapcsolatos javaslatait, valamint a mindig baráti támogatását és biztatását. Köszönettel tartozom Páska Csilla biológus kolléganőmnek is, aki szintén segítségemre volt szakmai tanácsaival, kritikai megjegyzéseivel.

Nagy-nagy köszönettel tartozom a Kóréletteni Osztály asszisztenseinek is, így Hernádi Jánosnénak és Mikoss Máriának, akik mindvégig segítségemre voltak a laboratóriumi technikák elsajátításában, a mintagyűjtésben és a különféle intézeti adminisztratív feladatok megoldásában.

Köszönöm az Intézet korábbi igazgatójának, dr. Strausz Jánosnak, valamint jelenlegi vezetőjének, dr. Kovács Gábornak támogatását is, hogy egyetemi tanulmányaim után az Intézet Kóréletteni Osztályán tudományos kutatómunkát folytathattam. Köszönöm az OTKA 83338. számú pályázatának, illetve a Magyar Pulmonológiai Alapítványnak is, hogy kutatómunkámhoz anyagi támogatást nyújtott.

Végül köszönöm családomnak, hogy az elmúlt évek folyamán mindig nagy szeretettel kitartásra és türelemre biztattak céljaim elérésében.