Az allergiás légúti gyulladás súlyosságát és kezelhetőségét befolyásoló tényezők

Doktori tézisek

Dr. Komlósi Zsolt István

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Témavezető:
Dr. Losonczy György egyetemi tanár, az orvostudományok doktora

Hivatalos bírálók:
Dr. Geiszt Miklós egyetemi adjunktus, Ph.D.
Dr. Helyes Zsuzsanna egyetemi adjunktus, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke:
Dr. Cserháti Endre egyetemi tanár, az orvostudományok doktora

Szigorlati bizottság tagjai:
Dr. Gálffy Gabriella egyetemi adjunktus, Ph.D.
Dr. Herjavecz Irén egyetemi magántanár, kandidátus

Budapest
2007

Az asthma bronchiale hátterében perzisztáló allergiás légúti gyulladás súlyosságát és kezelhetőségét a természetes immunrendszer működése jelentősen befolyásolhatja. Lipopolisacharid (Lps) – vagy más természetes immunstimulátor anyagok – expozíciója, valamint az élettani terhesség [1] egyaránt a veleszületett immunfolyamatok aktiválódását váltja ki. Ezen tényezők szerepének feltárása céljából az alábbi vizsgálatokat végeztük:

ÁLLATKÍSÉRLTES VIZSGÁLATOK

Bevezetés és célkitűzések

Az Lps (bakteriális endotoxin) a környezetünkben mindenütt jelen lévő anyag, amely megtalálható a belélegzett levegőben, alkotóeleme a házipornak, (munkahelyi) szerves eredetű pornak, dohányfüstnek. Az Lps inhaláció hozzájárulhat mind a légúti allergiás gyulladás kiváltásához, mind az asthma tüneteinek romlásához. Kimutatták, hogy a kis dózisú Lps expozíció elengedhetetlen feltétele a légúti allergia kialakulásának egérben, továbbá az Lps felismeréséhez nélkülözhetetlen Lps-kötő fehérje (LBP) hiányában az allergizált állatoknál nem fejlődik ki légúti hiperreaktivitás (LHR), és nem emelkedik a légutakban a peroxi-nitrit koncentrációja sem. Az Lps okozhatja az allergiás asthma exacerbatióját, és az allergiás asthmás egyedek bizonyítottan érzékenyebbek az Lps hörgőgörcs-keltő hatásával szemben. Ráadásul az Lps inhaláció 1/5-ödére csökkenti az allergén PD20 értékét asthmásokban. A tisztán allergiás gyulladás kifejezetten jól reagál glükokortikoidokra, ugyanakkor az asthmás betegek körében a szteroid-válaszkészség meglehetősen nagy változékonyságot mutat. Az utóbbi jelenség magyarázata nem ismert. Figyelemreméltó, hogy az Lps-keltette gyulladás és LHR emberben és egérben egyformán csak kis mértékben reagál a glükokortikoid kezelésre. Az elmúlt években számos kísérletben tanulmányozták az Lps és allergén koexpozíció légúti gyulladásra gyakorolt hatását, de egy esetben sem vizsgálták, hogy az Lps hogyan befolyásolja az allergiás légúti gyulladás és LHR kezelhetőségét.

Célkitűzések

1. Az eosinophil légúti gyulladás és LHR olyan egérmodelljének létrehozása és jellemzése, amelyben a szenzitizált állatok allergén (Ova) provokációját megelőzően egy Lps előkezelést (priming-ot) alkalmazunk.
2. A dexamethason (Dex) hatékonyságának összehasonlítása az Lps előkezelt allergizált és a tisztán allergizált állatok között.

Az NO fontos mediátor mind az allergiás, mind a nem allergiás légúti gyulladásban, és az indukálható NO szintetáz (iNOS) inhibitorainak terápiás alkalmazása asthmában szintén felmerült. Ennek alapján a harmadik célkitűzésünk:

3. Az Lps előkezelt allergizált és a tisztán allergizált állatok légúti NO produkciójának becslése (nitrit méréssel), és az 1400W – szelektív iNOS inhibitor – hatásainak vizsgálata.

Módszerek

Állatok

Kísérleteinkben 6-8 hetes, SPF (meghatározott patogénektől mentes), nőstény BALB/c beltenyésztett egereket használtunk.

Allergizálás

Az egereket Ova-val szemben érzékenyítettük (szenzitizáltuk), majd ugyanezen fehérjével végzett légúti provokációval eosinophil légúti gyulladást hoztunk létre a tüdőben. A szenzitizációt a kísérlet 1. és 14. napján intraperitonealis oltással végeztük. Az oltóanyag 20 µg Ova-t (PBS-ben oldva) és 2,25 mg alumínium-hidroxidot (szuszpenzióban, Imject Alum) tartalmazott. Az allergizált állatok 100 µL-t kaptak a fenti oldatból, míg a kontrollok 100 µL PBS-t placeboként. Ezt követően, a kísérlet 28. 29. és 30. napján, naponta 20 percig 1% Ova-t tartalmazó aeroszol-inhalációval kezeltük az állatokat (allergénprovokáció). A porlasztáskor Ova 1%-os, PBS-ben készült oldatát használtuk, míg a kontroll állatokat tiszta PBS-aeroszollal kezeltük (placébó). A tüdőellenállás-mérés és a mintagyűjtés a kísérlet befejező, 31. napján történt.

Lps kezelés és előkezelés (priming)

Az intranasalis Lps instillatio során az egereket egy étergőzzel telt edényben altattuk el, majd 3 X 20 µL Lps oldatot pipettáztunk ismétlő pipettával az orrjáratokra (részben az orrjáratokba). Az állatok az oldat jelentős részét aspirálták. A kezelés alkalmával 10 µg (055:B5 szerotípusú) Escherichia coli Lps-t adtunk be 167 µg / mL PBS-es oldatban. A kontroll állatok minden esetben tiszta PBS-t kaptak.

Szteroid kezelés

A szteroiddal kezelt állatcsoportok szubkután (sc.) dexamethason nátrium-foszfát injekciót kaptak két napon keresztül, naponta egyszer 5

mg/kg dózisban. A gyógyszert összesen 100 µL térfogatban, fiziológiás sóoldatban hígítva kapták. Placebo kezelésként 100 µL fiziológiás sóoldatot adtunk a megfelelő csoportoknak.

1400W kezelés

Az N-(3-(Aminometil) benzil) acetamidin (1400W) szelektív iNOS bénító, amelynek hatékonysága (*in vitro*) az iNOS-on több mint 5000-szer nagyobb, mint az eNOS-on és mintegy 200-szor nagyobb, mint az nNOS-on. Az 1400W-t a kezelt állatcsoportok 2 mg/kg dózisban, szubkután kapták összesen 100 µL térfogatban, PBS-ben hígítva. Placebo kezelésként 100 µL PBS-t adtunk a megfelelő csoportoknak.

Tüdőellenállás (R_L) mérése

A légúti reaktivitást – illetve LHR-t, –invazív módon, altatott, géppel lélegeztetett állatokon határoztuk meg. Az egereket intravénás (iv.) methacholin (MCh: acetil-β metilkolin klorid) infúzióval provokáltuk, miközben mértük az R_L változását. Az alapvonal (fiziológiás sóoldat infúziója közben végzett) rögzítése után az egymást követő MCh dózisokat kétpercenként, bólusban infundáltuk a vena jugularisba. A provokációt nem-kumulatív módon végeztük, mivel az egyes MCh adagok után minden esetben megvártuk, amíg az R_L értéke újra stabilizálódik az alapvonal körül (≤ 120%). A kezdődózis 43 µg/kg volt, ezután a MCh adagja mindig háromszorosára emelkedett. A kiértékelés során az egyes MCh dózisok beadása után mérhető R_L csúcsértékét használtuk a válaszkészséget meghatározó mutatóként.

Bronchoalveolaris lavage (BAL)

Az állatok tracheakanüljére csatlakoztatott fecskendővel 600 µL steril, izotóniás, pH 7,4-es PBS-t injektáltunk a bronchoalveolaris térbe, majd 1 perc elteltével visszaszívtuk a folyadékot. Összesen háromszor ismételtük ezt meg, és a teljes beinjektált mennyiség átlagosan 81,9 ± 0,7%-át sikerült visszanyerni. A sejteket Bürker kamrában számoltuk meg, majd a sejtszuszpenziót – megfelelő hígítás után – cytocentrifugával tárgylemezre centrifugáltuk. A preparátumokat hematológiai festékkel festettük, és a sejtes összetételt fénymikroszkóp alatt határoztuk meg minimum 300 sejt azonosításával.

Szövettan

A tüdőt fixáló oldattal (4% pufferolt formaldehid, pH 7,4) töltöttük meg a tracheán keresztül, majd – kivéve a mellüregből – 24 óráig fixáltuk a fenti oldatba merítve. Dehidrálás és parafinba ágyazás után 5 µm vastagságú metszeteket festettünk hematoxilin-eosinnal. A perivascularis és peribronchialis eosinophil infiltratumokat fénymikroszkóp alatt, szemikvantitatív pontrendszer szerint értékeltük.

Nitrát és nitrit mérések

A BALF felülúszók nitrát és nitrit koncentrációját kapilláris elektroforézissel, minta-indukált átmeneti izotachoforézis prekoncentráció alkalmazásával mértük. Mivel az állatokat konvencionális, nitrátot is tartalmazó kisrágcsáló-tápon és csapvízen tartottuk, a táplálék-eredetű bevitel egyformán magas nitrátszinteket eredményezett az összes vizsgálati csoport BALF mintáiban. A BALF nitrit koncentrációja azonban jó mutatója a tüdőben zajló NO szintézisnek, mivel oxigéntartalmú vizes oldatban az NO elsődlegesen nitritté alakul át.

Cytokin mérések

A BALF felülúszók IL-4, IL-5, IL-13, INF-γ, TNF-α és GM-CSF koncentrációját kereskedelmi forgalomban kapható szendvics-ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) kitekkel határoztuk meg. Az analíziseket a gyártói használati utasítások alapján végeztük.

Kísérleti terv

1. Lps előkezelés hatása a légúti gyulladásra, LHR-re és a szteroid-válaszkészségre allergizált egérben.

Állatcsoportok (n=12-14 / csoport):

C: kontroll (csak placebo kezelések)

LPS: intranasalis Lps kezelés 96 órával az R_L mérés és a BAL előtt – a szenzitizáció és légúti provokáció csak placeboval (PBS) történt

OVA: Ova szenzitizáció és provokáció (allergizálás) – intranasalis előkezelés csak placeboval (PBS)

LPS/OVA: Ova szenzitizáció, intranasalis Lps előkezelés (96 órával az R_L mérés és a BAL előtt) és Ova provokáció

OVA+DEX: Az Ova provokáció 2. és 3. napján sc. dexamethasonnal kezelt OVA állatok

LPS/OVA+DEX: Az Ova provokáció 2. és 3. napján sc. dexamethasonnal kezelt LPS/OVA állatok

Minden OVA és LPS/OVA állat sc. fiziológiás só injekciót kapott (placeboként) az OVA+DEX és LPS/OVA+DEX állatok Dex kezelésével egy időben.

A BALF sejtek kvalitatív és kvantitatív értékelése, a felülúszó cytokin és nitrit (nitrát) koncentrációjának meghatározása és a tüdő szövettani vizsgálata minden állat esetében megtörtént. Az LHR-t az egyedek felénél mértük meg (az állatokat véletlenszerűen választottuk ki, n= 6-8).

2. 1400W akut (2 órás) hatása az LHR-re.

Állatcsoportok (n=6-8 / csoport):

C, **LPS**, **OVA** és **LPS/OVA** csoportok mint az előbbi (1.) kísérleti rendszerben, kivéve, hogy az utóbbi két csoport állatai az 1400W kezelésekkel egyidőben kaptak sc. placebo (PBS) injekciót.

OVA+1400W: Ova szenzitizáció és provokáció (allergizálás), sc. 1400W (2 órával az R_L mérés és a BAL előtt)

LPS/OVA+1400W: Ova szenzitizáció, intranasalis Lps előkezelés és Ova provokáció, majd sc. 1400W (2 órával az R_L mérés és a BAL előtt)

A BALF sejtek kvalitatív és kvantitatív értékelése és az LHR meghatározása minden állat esetében megtörtént. Mivel a két kísérlet C, LPS, OVA és LPS/OVA állatainak BALF sejtszámai és LHR-je között nem volt szignifikáns különbség, ezeket a csoportokat a kiértékelés során összevontuk.

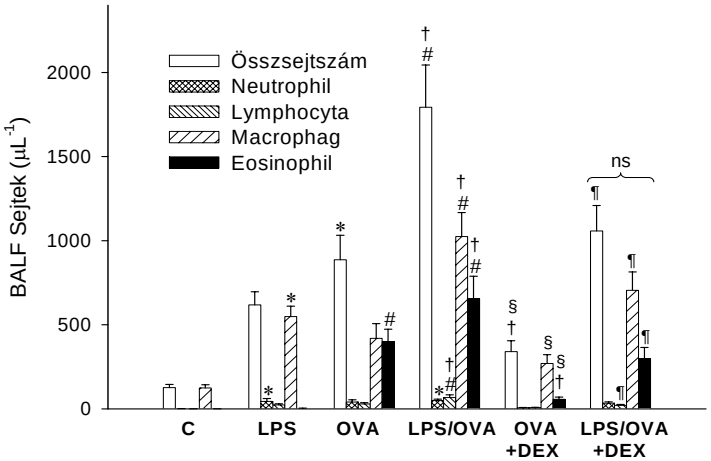
Statisztika

A normál eloszlást mutató adatokat átlag ± átlag szórása (SEM: standard error of the mean) formátumban, míg az ordinalis skála felhasználásával becsült eredményeket (szövettani pontrendszer) a medián és (zárójelben) az interkvartilis terjedelem feltüntetésével adtuk meg. Egyutas varianciaanalízist (ANOVA-t) alkalmaztunk az előbbi, és Kruskal-Wallis tesztet az utóbbi esetben a csoportok közötti különbség meghatározására. A csoportok páronkénti összehasonlítását a paraméteres próba esetén Neumann-Keuls, míg a nem-paraméteres esetében Dunn post-hoc teszttel végeztük.

Eredmények

Légúti gyulladás

Az OVA (allergizált) állatokban – az Ova inhalációt követően – jelentősen megnőtt a BALF eosinophil és macrophag sejtszáma. Az LPS/OVA állatokban viszont a macrophagok, lymphocyták és különösen az eosinophil granulocyták száma nagyobb mértékben emelkedett, mint az OVA egerekben, tehát az egy nappal az Ova inhalációk előtt alkalmazott intranasalis Lps instillatio (priming) szignifikánsan súlyosbította a légúti gyulladást és kiváltképp annak eosinophil jellegét (1. ábra).



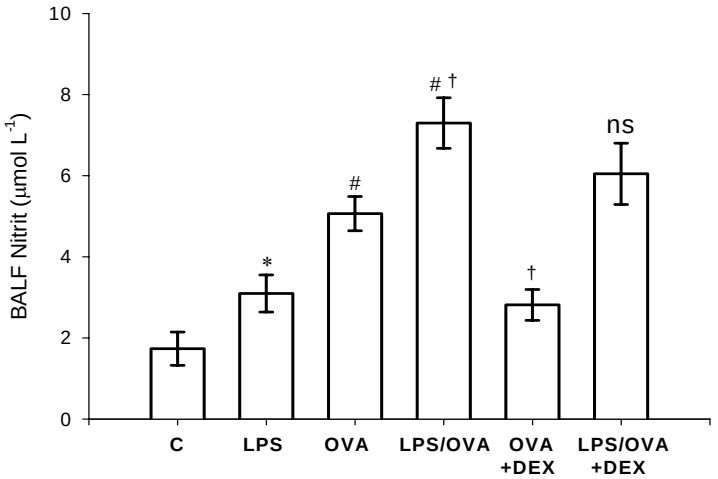
1. ábra: ***A BALF mennyiségi és minőségi sejtösszetétele. *: p<0,05 vs. C; #: p<0,01 vs. C és LPS; †: p<0,05 vs. OVA; §: p<0,05 vs. LPS/OVA+DEX; ¶: p<0,05 vs. LPS/OVA; ns: p>0,05 vs. OVA minden típusú sejt esetében. (n=18-20 a C, LPS, OVA és LPS/OVA csoportokban; n=12-14 az OVA+DEX és LPS/OVA+DEX csoportokban).***

A perivascularis és peribronchialis eosinophil infiltratumok szövettani metszeteken végzett értékelése kimutatta, hogy bár az LPS csoportban is előfordultak eosinophil sejtek a légutak és az erek körül, szemikvantitatív pontértékük alapján ezek az állatok nem különböztek szignifikánsan a kontroll egerektől (C: 0,5 (0–1); LPS: 2 (1–2); p>0,05 C vs. LPS). Az OVA és LPS/OVA csoportokban azonban kiterjedt eosinophil

infiltratumokat találtunk a morfometriai analízis során (OVA: 3,5 (3–4); LPS/OVA: 4 (3–4); p<0,05 vs. C és LPS).

Nitrát és nitrit

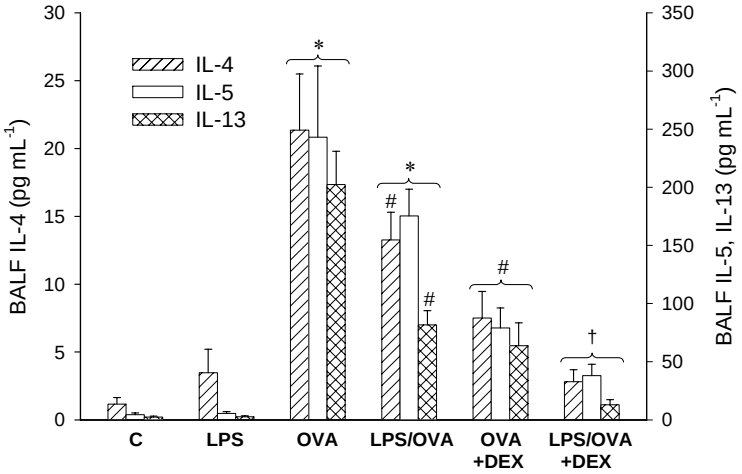
Kísérleti csoportjaink között különbség mutatkozott a BALF nitrit koncentrációjában. Kissé emelkedett NO_2 szintet mértünk az LPS állatok esetében. Ennél magasabb volt az NO_2 koncentrációja az OVA, és a legmagasabb az LPS/OVA csoportban. Az Lps előkezelés tehát fokozta az Ova inhaláció utáni NO_2 képződést szenzitizált állatokban (2. ábra).



2. ábra: A BALF nitritkoncentrációja. *: p<0,01 vs. C; #: p<0,01 vs. LPS; †: p<0,01 vs. OVA; ns: p>0,05 vs. LPS/OVA (n=12-14).

Cytokinek

A várakozásnak megfelelően – kifejezetten emelkedett az IL-4, IL-5 és IL-13 koncentrációja az OVA állatok BALF-jában. Ugyanakkor az OVA-hoz képest az LPS/OVA egerekben az IL-4 és IL-13 szintje kisebb volt, míg az IL-5 koncentrációját azonosnak találtuk a két csoportban (3. ábra). Az Lps kezelés önmagában nem okozott szignifikáns változást ezen cytokinek szintjében. A BALF IFN-γ, GM-CSF és TNF-α koncentrációja a kimutatási határ alatt maradt minden csoportban.



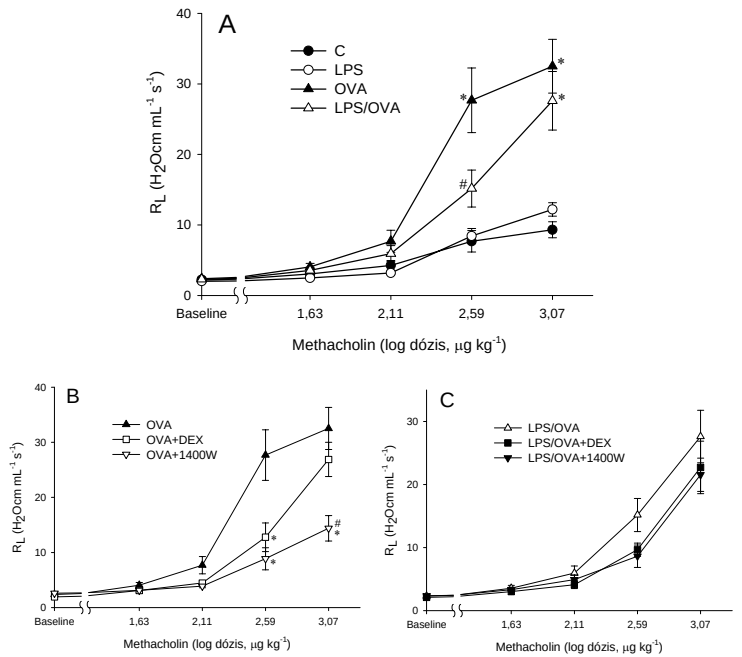
3. ábra: A Th2-es cytokinek koncentrációja a BALF felülúszóban. *: p<0,05 vs. C és LPS; #: p<0,05 vs. OVA; †: p<0,05 vs. LPS/OVA (n=12-14).

Légúti reaktivitás

Bár az Lps kifejezett LHR-t okoz 24 órával a kezelés után, később, 96 óra múlva már nem eredményezett fokozott légúti válaszkészséget iv. MCh provokációval szemben. A szenzitizált és allergénprovokált OVA állatokban ezzel szemben a – modellre jellemző – kifejezett LHR fejlődött ki. Az R_L mintegy négyszer nagyobb mértékben emelkedett a két legnagyobb MCh dózis hatására, mint a C és LPS állatokban Ugyanakkor az LPS/OVA állatokban csak egy kisebb mértékű LHR alakult ki. A R_L emelkedés mértéke körülbelül fele volt az OVA csoportban tapasztalhatónak (4 / A. ábra).

A dexamethason hatásai

A Dex hatékonyan csökkentette az eosinophil légúti gyulladást az OVA allergizált állatokban (1. ábra, OVA+DEX). Bár az LPS/OVA egerek esetében a Dex kezelés szintén csökkentette a sejtes gyulladást (1. ábra, LPS/OVA+DEX), az eosinophil és macrophag sejtszámok mégis szignifikánsan magasabbak voltak ezekben az egyedekben, mint az OVA+DEX csoportban. Figyelemreméltó ugyanakkor, hogy az LPS/OVA+DEX és az OVA (szteroiddal nem kezelt) csoportokban a fenti két sejttípus esetében egyformán magas sejtszámokat találtunk.



4. ábra: A. Az Lps előkezelés hatása az LHR-re. *: p<0,001 vs. C és LPS; #: p<0,01 vs. OVA. B. A Dex és az 1400W (iNOS inhibitor) hatása az Ova szenzitizált és provokált (OVA) állatok LHR-jére. *: p<0,05 vs. OVA; #: p<0,05 vs. OVA+DEX. C. A Dex és az 1400W hatása az Lps előkezelt, Ova szenzitizált és provokált (LPS/OVA) állatok LHR-jére. (n=14-16 a C, LPS, OVA és LPS/OVA csoportokban; n=6-8 az OVA+DEX, LPS/OVA+DEX, OVA+1400W és LPS/OVA+1400W csoportokban).

Az eosinophil infiltratumok szövettani metszeteken végzett értékelése megerősítette a BALF vizsgálati eredményeket (OVA+DEX: 1 (1–1); p<0,001 vs. OVA; LPS/OVA+DEX: 2 (2–2); p<0,05 vs. C és LPS/OVA). Az LPS/OVA+DEX és az OVA egerek szemikvantitatív pontértéke szintén hasonló volt egymáshoz (p>0,05). A BALF nitritkoncentrációját hatékonyan csökkentette a Dex az OVA+DEX állatokban, ugyanakkor nem befolyásolta szignifikánsan az LPS/OVA+DEX egerekben (2. ábra, p>0,05 vs. LPS/OVA). A gyulladásos sejtszámok és a nitrit esetében tapasztaltakkal ellentétben mindhárom vizsgált Th2-es cytokin BALF-ban mérhető szintjét arányosan csökkentette a Dex mind az OVA+DEX, mind az

LPS/OVA+DEX egerekben a szteroiddal nem kezelt párjaikhoz (OVA és LPS/OVA) viszonyítva (3. ábra). A tisztán allergizált állatok LHR-jét jelentősen csökkentette a Dex (OVA+DEX), míg az LPS/OVA egerek esetében csak egy kisebb mértékű (nem szignifikáns) mérséklődést figyeltünk meg (LPS/OVA+DEX, 4 / B. és C. ábra).

Az 1400W hatásai

Kísérletünk második részében az 1400W – szelektív iNOS inhibitor – LHR-re gyakorolt hatását vizsgáltuk OVA és LPS/OVA egereken. Az állatok egyetlen 1400W injekciót kaptak 2 órával az R_L mérés előtt. Az OVA állatok esetében az LHR hatékonyabb gátlószerének bizonyult ez az anyag (egyszeri dózisban), mint a két napig alkalmazott nagydózisú Dex-kezelés (OVA+1400W, 4 / B. ábra). Az LPS/OVA egereknél viszont – a Dex-hez hasonló módon – kevéssé bizonyult hatékonynak az 1400W (LPS/OVA+1400W, 4 / C. ábra). A BALF sejtszám-értékeit egyik vizsgálati csoportban sem befolyásolta az alkalmazott rövidtávú 1400W kezelés. Az OVA és OVA+1400W valamint az LPS/OVA és LPS/OVA+1400W csoportok BALF minőségi és mennyiségi sejtösszetétele (páronként) gyakorlatilag azonos volt (az adatokat nem mutattuk be).

Összefoglalás és következtetések

Állatkísérletünkben [2] létrehoztuk az eosinophil légúti gyulladás és légúti hiperreaktivitás (LHR) olyan modelljét, melyet az Lps hatása és az allergia együttesen alakít ki. Az allergénprovokáció, és az azt megelőző Lps kezelés (priming) szenzitizált, BALB/c egerekben súlyosabb eosinophil légúti gyulladást és nagyobb mértékű NO képződést eredményezett, mint az allergénexpozíció önmagában. A Th2-es cytokinek szintézise és az LHR csökkent az Lps előkezelést követően, de így is mindkettő esetében szignifikánsan nagyobb értékeket mértünk, mint a kontroll egyedekben. Lps előkezelés tehát valószínűleg járulékos – nem Th2-es – immun-mechanizmusokat is aktivált az allergiás gyulladás kialakulása során. Dexamethason kezelés hatására ezekben az állatokban az eosinophil gyulladás csak kis mértékben csökkent, az NO képződés és az LHR pedig nem változott. Következésképp sikerült létrehoznunk a szteroidrezisztens asthma egy állatkísérletes modelljét egérben. Ezt követően az indukálható nitrogén-monoxid szintetáz (iNOS) szerepét vizsgáltuk az LHR kiváltásában. Eredményeink azt mutatták, hogy az 1400W – szelektív iNOS inhibitor – kezelés hatékonyan és gyorsan (mintegy 2 óra alatt) megszüntette

az LHR-t allergizált állatokban. Az Lps előkezelés azonban az 1400W LHR-csökkentő hatását szintén meggátolta. Megfigyeléseink felvetik tehát, hogy az Lps inhaláció – vagy egy alsó légúti bakteriális infekció – asthmásokban súlyosbíthatja a légúti allergiás gyulladást, és szerepet játszhat a gyulladáscsökkentő terápiával szembeni rezisztencia kialakulásában.

HUMÁN VIZSGÁLATOK

Bevezetés és célkitűzések

Az asthma bronchiale súlyossági foka változhat a terhesség során, bár a változás iránya nehezen jósolható meg előre. A szülés utáni 3 hónapban viszont az esetek 73%-ában visszatér a betegség a terhesség előtti súlyossági fokra. Az egymást követő terhességek során szintén konkordancia figyelhető meg az asthma kórlefolyása tekintetben. Az asthma és a terhesség egymásra gyakorolt negatív hatása valószínűleg kölcsönös, mivel – több ezer alanyt magába foglaló, népesség-alapú vizsgálatok alapján – még az enyhe és középsúlyos asthma is növeli a magzati növekedési retardáció, a koraszülés, a praeeclampsia és más szülészeti szövődmények előfordulási gyakoriságát. Habár a terhes nők mintegy 3-12%-a szenved asthmában, az asthma és a terhesség közötti kölcsönhatás eddig mégis nagyrészt ismeretlen maradt.

Célkitűzések

Mivel T-sejtek között antagonizmus vagy szinergizmus alakulhat ki terhes asthmásokban, ezért a keringő vér $IL\text{-}4^+$ és $IFN\text{-}\gamma^+$ T-lymphocyta szubpopulációinak méretét, továbbá ezen sejtcsoportok és az anyai légzésfunkció valamint a születő gyermekek születési testtömege közötti összefüggéseket vizsgáltuk. Az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

1. A terhesség hatására kialakuló immunológiai változások hogyan befolyásolják az asthma hátterében lévő allergiás mechanizmusokat?
2. Az asthmát fenntartó immunfolyamatok hogyan hathatnak a magzat fejlődésére?

Módszerek

Vizsgálati alanyok

Vizsgálatunk során az alábbi csoportokba vontunk be alanyokat:

- asthmás terhes nők (n=48; második trimeszter: n=12; harmadik trimeszter: n=36)
- egészséges terhesek (n=18; gesztációs és életkor megoszlása a vizit időpontjában megegyezett az asthmás terhesekével, második trimeszter: n=4; harmadik trimeszter: n=14)
- egészséges nem terhesek (n=8)
- asthmás nem terhesek (n=13).

A részletes anamnézisfelvétel során különös figyelmet fordítottunk az alábbi kérdésekre: 1. atópia, 2. asthmaticus tünetek súlyossága, 3. gyakorisága, 4. aktuális gyógyszeres terápia, 5. tünetek változása a terhesség alatt. A rutin vérképellenőrzéssel egy időben vettünk vért az áramlási cytometriás (FACS) mérések elvégzéséhez. Ezután teljestest-pletizmográffal vizsgáltuk a légzésfunkciót majd arterializált kapilláris vérgáz-analízis történt. A szülést követő első viziten feljegyeztük a vizsgálati alanyok alábbi kérdésekre adott válaszait: Hogyan változtak asthmaticus tünetei a terhesség alatt és átlagosan mennyi szükség esetén alkalmazandó, rohamoldó gyógyszert használt? Kielégítőnek érezte az asthma kezelését a terhesség során? Pontosan milyen gyógyszereket, milyen dózisban szedett? Ezen kívül adatokat gyűjtöttünk az újszülöttekről és az esetleges szülészeti szövődményekről.

A lymphocyták cytokintermelésének meghatározása

A nátrium-heparinnal alvadásgátolt perifériás vérből sűrűséggradiens centrifugálással mononukleáris sejteket szeparáltuk, majd az így nyert lymphocyták *in vitro* cytokintermelését határoztuk meg. A sejteket forbol-észter és ionomicin hozzáadásával stimuláltuk Brefeldin-A jelenlétében. A sejtfelszíni CD3 molekulákat PerCP-vel konjugált antihumán CD3-ellenes antitesttel jelöltük. Ezt követően a sejteket permeabilizáltuk, majd fluoreszcens isotiocianáttal jelölt antihumán IFN-γ, illetve phycoerythreinnel jelölt antihumán IL-4 monoklonális ellenanyagokkal inkubáltuk. A méréseket áramlási cytométerrel végeztük.

Eredmények

Az egészséges terhes nők perifériás vérében mérhetően megemelkedett mind az IL-4^+/$CD3^+$, mind az IFN-γ^+/$CD3^+$ sejtpopuláció. Mindez azt mutatja, hogy egyes T-sejt szubpopulációk normál terhesség alatt is proliferálódnak (aktiválódnak). Asthmás terhes vizsgálati

alanyainkban viszont sokkal magasabb T-sejtszámokat találtunk. Elsősorban a IFN-γ-termelő T-sejtszám emelkedett jelentősen, habár az IL-4^+ sejtpopuláció is nőtt. Ezen asszonyok vérében kb. 20-szor nagyobb mennyiségű IFN-γ-termelő T-sejt volt, mint a hasonló súlyossági fokú asthmában szenvedő, nem terhes nők mintáiban. Az IL-4^+ sejtszám az IFN-γ^+ populációval arányosan, de kisebb mértékben szintén megnövekedett. Következésképp úgy tűnik, hogy a terhesség asthmásokban kevert fenotípusú, kulmináló cytokinválaszt eredményez, amelyben – az abszolút sejtszámokat figyelembe véve – az IFN-γ dominál. Bár a terhes asthmások proinflammatorikus cytokintermelése jelentősen fokozódott, a tünetek ezzel párhuzamosan – a nem terhes asthmásokhoz viszonyítva – nem voltak súlyosabbak. Az IFN-γ^+, valamint az IL-4^+ T-sejtek száma azonban szignifikáns negatív korrelációt mutatott a kilégzési csúcsáramlás (PEF) értékekkel. Megfigyeltük továbbá, hogy a magasabb dózisú inhalációs kortikoszteroid fenntartó terápiát igénylő betegek szignifikánsan magasabb IFN-γ^+ és IL-4^+ T-sejtszámmal rendelkeztek. Mindezek mellett, az asthmás terhesek asszonyok IFN-γ^+ T-sejtszámai és a magzataik születési súlya között szignifikáns negatív korrelációt találtunk. Három asthmás terhes asszony esetében praeeclampsiával végződött a terhesség. Adataink arra utalnak, hogy a kiugróan magas IFN-γ-termelő T-sejtszám praeeclampsiával járhat együtt.

Összefoglalás és következtetések

Humán vizsgálatainkban [3] a terhesség és az asthma immunológiai kölcsönhatását vizsgáltuk. Asztmás terhesek perifériás vérében jelentősen emelkedett IFN-γ^+ és IL-4^+ T-lymphocyta sejtszámokat detektáltunk áramlási cytometriával. Ezen sejtpopulációk mérete és a kilégzési csúcsáramlás (PEF), továbbá a magzati születési súly között szignifikáns negatív korrelációt találtunk. A terhesség alatt megfigyelhető, kulmináló IFN-γ^+ és IL-4^+ T-sejtszám emelkedés tehát kiválthatja asthmás tünetek súlyosbodását és hozzájárulhat az intrauterin retardáció kialakulásához.

KÖZLEMÉNYEK

Az értekezés témájában megjelent közlemények

1. Losonczy G, Bohacs A, **Komlosi ZsI**, Tamasi L, Rigo J, Jr., Muller V, Magyar P. Anergia és immunstimuláció terhességben. Med Thor 2006; 59:37-46.

2. **Komlosi ZsI**, Pozsonyi E, Tabi T, Szoko E, Nagy A, Bartos B, Kozma GT, Tamasi L, Orosz M, Magyar P, Losonczy G. Lipopolysaccharide exposure makes allergic airway inflammation and hyper-responsiveness less responsive to dexamethasone and inhibition of iNOS. Clin Exp Allergy 2006; 36:951-9. ***IF: 3.668***

3. Tamasi L, Bohacs A, Pallinger E, Falus A, Rigo J, Jr., Muller V, **Komlosi ZsI**, Magyar P, Losonczy G. Increased interferon-gamma- and interleukin-4-synthesizing subsets of circulating T lymphocytes in pregnant asthmatics. Clin Exp Allergy 2005; 35:1197-203. ***IF: 3.553***

Egyéb közlemények

Kozma GT, Losonczy G, Keszei M, **Komlosi ZsI**, Buzas E, Pallinger E, Appel J, Szabo T, Magyar P, Falus A, Szalai C. Histamine deficiency in gene-targeted mice strongly reduces antigen-induced airway hyper-responsiveness, eosinophilia and allergen-specific IgE. Int Immunol 2003; 15:963-73. ***IF: 3.690***

Konferencia absztraktok

Komlósi ZsI, Pozsonyi É, Tábi T, Magyar P, Losonczy Gy. Bacterial lipopolysaccharide interferes with late phase allergic airway response in mice. Tissue Antigens 2004; 64:418-419.

Komlósi ZsI, Pozsonyi É, Bartos B, Magyar P, Losonczy Gy. Endotoxin interferes with allergy-induced airway inflammation in mice. Eur Respir J 2004; 24: Suppl. 48, 348s

Komlósi ZsI, Kunos L, Yang D, Magyar P, Losonczy Gy. Effects of

high dietary salt intake on airway inflammation in mice. Eur Respir J 2005; 26: Suppl. 49, 160s.

Komlósi ZsI, Joetham A, Balhorn A, Magyar P, Gelfand EW, Dakhama A, Losonczy Gy. Airway allergy in pregnant mice: reduced Th2 responses but enhanced airway hyperresponsiveness. Eur Respir J 2006; 28: Suppl. 50, 590s.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm Szüleimnek és Feleségemnek a támogatást és a türelmet. Köszönöm szépen témavezetőmnek, Prof. Dr. Losonczy Györgynek, valamint Prof. Dr. Magyar Pálnak, a légzőszervi megbetegedések Ph. D. program vezetőjének, hogy lehetőséget biztosítottak kutatási munkám elvégzésére és mindvégig támogattak. Losonczy György professzor úrnak köszönettel tartozom a sok-sok pótolhatatlan szakmai segítségért is, melyet tudományos munkám során tőle kaptam. Köszönetet mondok továbbá az alábbi személyeknek a hasznos együttműködésért: Vannay Ádám, Tábi Tamás, Halász Attila Sándor, Pozsonyi Éva, Tamási Lilla, Kozma Gergely, Nagy Andrea, Horváth Ildikó, Szökő Éva, Bornemisza Beryll és a Pulmonológiai Klinika valamennyi munkatársa. Hálás vagyok Nekik, mert megosztották velem tudásukat és tapasztalataikat.