

**A szén-monoxid gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálata
akut tüdőkárosodásban**

-Tézisek-

Dr. Dolinay Tamás

Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum

Tüdőgyógyászati Klinika

Mentorok:

Dr. Szilasi Mária¹, Dr. Horváth Ildikó² és Dr. Augustine M. K. Choi³

¹ Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum

Tüdőgyógyászati Klinika, Debrecen

² Országos Korányi TBC és Tüdőgyógyászati Intézet, Kórlelettan Tanszék, Budapest

³ University of Pittsburgh, Department of Medicine, Division of Pulmonary, Allergy
and Critical Care Medicine, Pittsburgh, Pennsylvania, USA

Debrecen, 2005

Összefoglalás

Az akut tüdőkárosodás (ALI) gyakori és súlyos megbetegedés, mely az intenzív osztályokon kezelt betegek 5-15%-át érinti. A betegség gyakran csak legelőrehaladottabb formájában, akut respiratórikus distress szindrómaként (ARDS) kerül felismerésre, amikor a beteg halálozási valószínűsége 40-50%. Az intenzív kutatás ellenére az ALI patomechanizmusa nem teljesen ismert és a terápiás eszköztárunk szűkös.

Az ALI mechanizmusának alaposabb megismerésére állatkísérletes modelleket használtam. Rágcsálóknak intravénásan baktérium poliszacharidot adva és/vagy gépi lélegeztetve tüdőkárosodást hoztam létre. Microarray technikával elemeztem a károsodott egér tüdők génexpressziójának változását. Ezen technika révén kollegáimmal meghatároztunk olyan új, eddig le ALI-ben le nem írt géneket, melyek termékeinek szerepe lehet a betegség mechanizmusában. Egy *in vivo* állat kísérletbenben sikeresen modelleztem az ARDS jellegzetes patológiai elváltozásait: az alveoláris ödémát, az epithelium feltöredezését és a gyulladásos sejtek invázióját az alveolusokba. A gépi lélegeztetés hatására emelkedett tumor necrosis factor- α (TNF- α) kibocsátást és az oxidatív stressz által aktiválható hemoxigenáz-1 (HO-1) enzim fokozott expresszióját figyeltem meg. A neutrophil leukocyták invázióját és a pro-inflammatórikus citokinek szintjét hörgő lavázs folyadékban jó hatásfokkal csökkentette a kis dózisú belélegzett szén monoxid (CO). Eközben az anti-inflammatórikus interleukin-10 (IL-10) szintje nőtt. A CO anti-inflammatórikus hatása ismert más tüdőkárosodást elemző kísérleti modellekben is, de annak mechanizmusáról csak keveset tudunk. Kísérleteim eredményei azt mutatják, hogy a CO a két ismert intracellularis gyulladásos transzkripció faktortól, a nuclear factor-

κ B-től (NF κ B) és az activator protein-1-től (AP-1) függetlenül, a p38 mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) útvonalra hatva fejti ki hatását.

Összefoglalva, eredményeim tovább erősítik korábbi kísérletek eredményeit, mely szerint a szén-monoxid csökkenti a tüdőben lezajló gyulladást, továbbá felveti a CO terápás alkalmazás lehetőségét ALI/ARDS-ben. Szeretném a jövőben tovább folytatni CO kísérleteimet akut tüdőkárosodásban és bízom benne, hogy annak eredményei egy nap alkalmazhatóak lesznek majd az intenzív betegellátásban.

Bevezetés és célkitűzések

A gépi lélegeztetés széles körű elterjedésével az 1960-as években az akut tüdőkárosodás a tüdőgyógyászati intenzív ellátás kiemelt fontosságú területévé vált. A Vietnámi Háború alatt több ezer katona szenvedett multiplex szervi károsodást, amely miatt gépi lélegeztetésre szorultak. Ez a szomorú esemény vezetett a tüdőgyógyászati intenzív ellátás robbanásszerű fejlődéséhez. A gépi lélegeztetés révén a tüdőkárosodottakat hosszabb ideig életben tarthatták életben és a lélegeztető gépről leszoktatva visszakerülhettek a mindennapi életbe. Ashbaugh és kollegái ekkor íták le az akut tüdőkárosodás súlyosabb formáját az akut respiratórikus distressz szindrómát. A betegséget először felnőtt típusú respiratórikus distressz szindrómának, hogy megkülönböztessék az újszülöttekben lezajló respiratórikus distressz szindrómától. A mai elfogadott elnevezés akut respiratórikus distressz szindróma (ARDS).

Mérföldkö az ALI/ARDS történetében az ARDS Network klinikai tanulmányok. Az eredeti vizsgálat 1996 és 1999 között 10 egyetemi kórházból gyűjtött betegeket az Egyesült Államokban. A vizsgálatban olyan gépi lélegeztetett betegeket vontak be, akik ALI-ben is szenvedtek. Az ALI definícióját az

Amerikai-Európai Konszenzus Konferencia ajánlásának megfelelően határozták meg a vizsgálat vezetői. 861 beteget választottak be a vizsgálatban, aki 6ml/kg vagy 12ml/kg protokoll szerint gépi lélegeztetésben részesültek. Az eredmények 2000-ben kerültek közlésre. Ezek szerint az ALI/ARDS okozta halálozás 22%-al csökkenthető alacsonyabb térfogatú gépi lélegeztetés alkalmazásával. A csökkentett térfogatú lélegeztetés másik pozitív következménye a gépi lélegeztetéstől mentes napok számának növekedése volt ARDS-ben.

Az ARDS Network vizsgálat betegeinek adatait elemezve Gross és kollegái az ARDS incidenciáját 22.4/100000 főben határozták meg az Egyesült Államokban. Más fejlett országokban készült tanulmányok hasonló adatokat közöltek. Az intenzív osztályok betegeinek körülbelül 10-15%-a szenved ARDS-ben, míg ez a szám a gépi lélegeztetettek között magasabb, közel 20%. A gépi lélegeztetés okozta tüdőkárosodás (ventilator-induced lung injury, VILI) gyakori a gépi lélegeztetettek között és kórháztani lelete megkülönböztethetetlen az ARDS-étől. Ugyanakkor továbbra is vitatott, hogy a gépi lélegeztetés önmagában vezethet-e ALI-hoz. Az alsó légutak a külső ártalmaknak és sérülésnek egyik leginkább kitett szervek egyike. Az ARDS leggyakoribb kiváltó okai a szepszis (38-43%), a gyomortartalom aspirációja (30-37%), pneumonia (28-36%) és a mellkasi sérülés (11-17%). ARDS-ben a halálozás magas és nagyban függ a kiváltó októl. Brun-Buisson és kollegái vizsgálataikban azt találták (6522 intenzív osztályos beteg, 78 kórházban, 10 európai országban), hogy az ARDS okozta halálozás a legmagasabb a szepszis ha következtében alakul ki (43%), alacsonyabb tüdőgyulladás esetén (36%) és a legalacsonyabb trauma (11%) esetén. A legtöbb beteg azonban mégsem izolált légzési elégtelenségben, hanem többszervi elégtelenségben hal meg.

Az intenzív kutatások ellenére az ALI/ARDS-sel kapcsolatos halálozás magas és és terápiás lehetőségeink korlátozottak.

Egyre több adat támasztja alá az a paradigmát, mely szerint a stressz által indukálható heme oxigenáz-1 (HO-1) vagy katalitikus mellékterméke a szén-monoxid (CO) citoprotektív hatást fejt ki szövet és sejtkárosodásban. A HO-1 és a CO citoprotektív hatását részben gyulladáscsökkentés révén fejt ki. Laboratóriumunk eredményei azt mutatják, hogy a kis dózisu belélegeztetett CO csökkenti a tüdőkben lezajló gyulladást és citoprotektív hatást fejt ki számos szövetkárosodást mutató kísérletes modellben.

Diszsertációm célja kettős. 1. Jellemzem az akut tüdőkárosodás legfontosabb kórbonctani és immunológiai jellemzőit gén expresszió analízis és molekuláris biológiai technikák segítségével állatkísérletes modellekben. 2. Bemutatom a CO gyulladáscsökkentő egy *in vivo* ALI modellben.

Célkitűzések

1.célkitűzés: Gén expresszió elemzése akut tüdőkárosodást követően egér tüdőben.

1. Azon gének meghatározása, melyek expressziója szignifikánsan megváltozott akut tüdőkárosodásban. A gének csoportosítása funkciójuk alapján.
2. Azon gének elkülönítése és csoportosítása, melyeket baktérium lipopoliszacharid (LPS) és/vagy gépi lélegeztetés befolyásol. A csak gépi lélegeztetés által modulált gének csoportjainak leírása.

2.célkitűzés: Új, a gépi lélegeztetés által kiváltott tüdőkárosodás mechanizmusában szerepet játszó gének leírása.

1. Az új gének expressziójának azonosítása RNS és fehérje szinten.
2. Az amphiregulin szerepe, egy új gén akut tüdőkárosodásban.

3.célkitűzés: A gépi lélegeztetés hatásának vizsgálata akut tüdőkárosodásban

1. A gépi lélegeztetés hatása az alveoláris oedemára és a gyulladásra LPS által kiváltott tüdőkárosodásban
2. Hem-oxigenáz aktiváció és fokozott citokin termelés gépi lélegeztetés által kiváltott tüdőkárosodásban (TNF- α , IL-10).

4. célkitűzés: A kis dózisú, belélegzett CO gyulladáscsökkentő hatásának leírása és bizonyítása gépi lélegeztetés által kiváltott tüdőkárosodásban

1. A CO hatásának bemutatása az akut tüdőkárosodás direkt és indirekt markereinek segítségével (csökkent gyulladásos sejt beáramlás, csökkent proinflammatorikus citokin szintek).
2. A CO hatása a szervezet haemodinamikájára és az oxigenizációra (vérnyomás, vérgázok)
3. Az intracelluláris mechanizmus meghatározása, mely révén a CO gyulladáscsökkentő hatását kifejti. A CO p38 MAPK révén, függetlenül az NF κ B és AP-1 transzkripciós faktoroktól fejt ki hatását a modellben

Módszerek

1. A gén expresszió változás meghatározásához egy izolált, perfundált és gépi lélegeztetett egér állatkísérletes modellt használtam. Ezt a modellt gyakran *ex vivo*-nak is nevezik, hogy hangsúlyozzák átmeneti szerepét *in vitro* és *in vivo* kísérleti összállítások között. Az *ex vivo* modell előnye, hogy a mellkas szinte intakt és így nem vész el a mellkas fal hatása a légzés mechanikájára. Ugyanakkor a nagy nyomású gépi lélegeztetés nem befolyásolja a szív funkcióját, mint azt korábban VILI

modellekben leírták. Röviden, 9 Balb/c egeret (22-30g) negatív nyomással lélegeztettünk 1 órán keresztül -3 vízcm kilégzési végnyomással és -10 vízcm belégzési végnyomással (EIP). Ezt követően az egereket random 3 csoportba osztottuk és 3 órán át tovább lélegeztettük ($n=3$ /csoport). Kontroll csoport: gépi lélegeztetés -10 vízcm EIP-vel, LPS csoport: gépi lélegeztetés -10 vízcm EIP-vel 3mg/kg Escherichia coli baktérium LPS jelenlétében, OV csoport: nagy nyomású gépi lélegeztetés -25 vízcm EIP-vel. A 3 csoport állat génexpresszióját microarray segítségével elemeztem. A géneket funkciójuk alapján csoportosítottam. Egyes géneket csak a gépi lélegeztetés befolyásolt, az LPS nem. 5 gén expressziójának változását quantitative real time polymarease chain reactionnal (QRT-PCR) megerősítettem. Az amphiregulin expressziójának fokozódását fehérje szinten is igazoltam.

2. Egy második, *in vivo* modellben 26ml/kg térfogatú gépi lélegeztetést positive end expiratory pressure (PEEP) alkalmazása nélkül használtam akut tüdőkárosodás előidézésére. Ezekben az állatokban a sejtes folyamatokat, tüdőoedema kialakulást, cytokin termelést, intracelluláris útvonalak aktiválódását figyeltem meg. Ezen túlmenően a kis dózisú, belélegzett CO gyulladáscsökkentő hatását vizsgáltam. Felnőtt $275\text{-}375\text{g}$ -os hím Sprague-Dawley patkányokat ($n=88$) használtam (Harlan, Indianapolis, IN). Az állatokat 3mg/kg Escherichia coli baktérium LPS, Serotype O127:BO-val vagy salinával (phosphate buffered saline, PBS) kezeltem. Az állatokat 75mg/kg ketaminnal és acepromazinnal ($2,5\text{mg/kg}$) altatattam el a kísérlet kezdetén (Sigma). Egy óra spontán légzés után tracheostomizáltam az állatokat és kanült helyeztem a tracheába. Az állatokat random 7 csoportba osztottam: kontroll, LPS, gépi lélegeztetés, gépi lélegeztetés/CO, LPS/gépi lélegeztetés, LPS/gépi lélegeztetés/CO és SB203580/LPS/gépi lélegeztetés/CO ($n=6$ /csoport). CO-al kezelt

és nem kezelt állatokon felváltva végeztem a kísérletet. A gépi lélegeztetés, gépi lélegeztetés/CO, LPS/gépi lélegeztetés, LPS/gépi lélegeztetés/CO és SB203580/LPS/gépi lélegeztetés/CO csoport állatait 26ml/kg térfogattal lélegeztettük. Lélegeztető gázként légköri levegő és 250 parts per million (ppm) CO keverékét használtam. Az állatcsoportokat 15 perc- 4 órán át lélegeztettem PEEP alkalmazása nélkül. Az SB203580/LPS/gépi lélegeztetés/CO csoport állatait SB203580 p38-kináz inhibitorral (20mg/kg) kezeltem 30 perccel a kísérlet kezdete előtt. Artériás vérnyomást és vérgázt mértem a LPS/gépi lélegeztetés, LPS/gépi lélegeztetés/CO csoportokban (pressure transducer UFI, Morro Bay, CA; blood gas analyzer Radiometer ABL5, Copenhagen, Denmark). A CO dózis-válasz kísérletben LPS/gépi lélegeztetés/CO csoport állatai 10, 100 vagy 250 ppm CO-t kaptak (n=3-6/dózis).Ezekben a kísérletekben tüdőkárosodási markereket: sejtszámot és citokin szinteket határoztam meg bronchoalveolaris lavage folyadékban (BALF). Az akut tüdőkárosodást szövettani metszetekben, electrophoretic mobility shift assayel (EMSA), western-és northern immunoblottingal is vizsgáltam.

Eredmények

Célkitűzés 1. *Gén expresszió analízis egy izolált, perfundált és gépi lélegeztetett egér tüdő modellben*

Összehasonlítottam a –10 vízcm EIP-vel lélegeztetett (kontroll), a –25 vízcm EIP-vel lélegeztetett (nagy nyomású gépi lélegeztetés) és az LPS-szel kezelt egerek géneszpressziós képét. A három csoport állat génexpressziója eltéréseket mutatott. Három csoport olyan géncsoportot talláltam (clusterek), melyek különbözően viselkedtek a 3 kezelés hatására. Az A cluster géneinek expressziója csökkent a nagy nyomással lélegeztetett (OV) egerek tüdejében és nem változtak LPS kezelés(LPS)

hatására. Ezek a gének döntő többsége alacsony expressziós szintet mutat. A B cluster génjeinek expressziója csökkent OV kezelés hatására, de fokozódott LPS hatására. A C cluster génjeinek expressziója fokozódott OV kezelés hatására. A legtöbbjüket az LPS is fokozta, de csak kisebb mértékben. Az eredmények elemzésére két statisztikai módszert használtam: Significance Analysis of Microarrays (SAM, Stanford, CA) program és Scoregene software csomag (Scoregene Package, <http://compbio.cs.huji.ac.il/scoregenes/>) (Scoregene TNoM=0 és SAM $p < 0.05$). 567 olyan gént találtam, amelyek expressziója szignifikánsan megváltozott LPS és/vagy OV hatására a kontroll állatokhoz képest. 182 gén expresszióját csak az OV befolyásolta. Ebből 36 gén expressziója fokozódott, 146 géné csökkent. A fokozott expressziójú gének között megtaláljuk az általános metabolizmus, növekedési faktorokkal kapcsolatos, sejten belüli transzport génjeit, 1 citokin ligandot és 1 antioxidáns. A csökkent expressziójú gének között növekedési faktorról kapcsolatos géneket, sejt ciklus regulátorokat, antioxidánsokat, onkogéneket, komplement és az alvadási kaszkádhoz kapcsolódó géneket figyelhetünk meg. Mind az LPS és az OV kezelés hatásal volt 385 gén expressziójára. Ebben a csoportban olyan fontos növekedési faktorokat is megfigyelhetünk mint a granulocita-macrophág kolónia stimuláló faktor (GM-SCF) és a Nur 77. LPS és OV kezelés szignifikánsan csökkentette az expresszióját egyes jól ismert protein kinázoknak, sejt ciklus regulátornak, transzkripciós faktoroknak és növekedési faktoroknak.

A génes funkcionális csoportosítása tüdőkárosodásban

Az analízisben meghatároztam azon sejtfunkciókat is, amelyeket az LPS és/vagy OV kezelés befolyásolt. Először $\log_2$ alapra hoztuk a gén expressziós értékeket, majd lps/c , ov/c és ov/lps hányadosokat képeztünk. Ezt követően egy

GeneXpress nevű programmal (<http://www.genexpress.stanford.edu>) meghatároztam azokat a specifikus sejt funkciókat amelyek dúsultak egyik vagy másik hányados kombinációban. A szignifikanciát egy hipergeometrikus model segítségével határoztam meg és False Discovery Rate (FDR) módszerrel korrigáltam a multiplex tesztfolyamatok közben jelentkező statisztikai hibákat 95%-os szignifikancia szinten. Az eredményeket egy színtérképen mutatom be, melyen a narancs a fokozott génexpressziót tartalmazó sejtfunciót jeleníti meg, míg a kék szín a csökkent génexpressziójú sejtfunciókat jelöli. A sejt kommunikáció és cytoskeleton génjeit csak az OV kezelés befolyásolta. LPS kezelés a citokin funkcióra és a nuklein savhoz kötődésre volt hatással. Mindkét kezelés befolyásolta az immun választ, a hordozó aktivitást és a fehérjéhez kötődés sejt funkciókat.

Célkitűzés 2. Signifikáns expresszió változás egyes génekben

A cluster analízis és a génexpressziós adatok alapján kollegáimmal 5 gént választottunk ki további elemzésre: Areg (Amphiregulin), Akap12 (A kinase anchoring protein), Cyr61 (Cystein-rich protein 61), Nur77 (nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1) and Il11 (Interleukin-11). Ezen gének expressziójának változását RNS szinten is meghatároztam. Mind az 5 gén a C clusterben helyezkedik el és expressziójuk fokozott LPS és OV kezelés hatására. A fokozott mRNA expressziót QRT-PCR-al határoztuk meg. Eredményeinket tovább erősíti az amphiregulin expresszió immunoblotting elemzése. Az amphiregulin fehérje expresszió fokozott volt a kontroll és LPS csoportokban láttotakéhoz képest. Ugyanazt az antitestet használva immunfluoreszens festéssel megfestettem mindhárom csoport állat tüdőszövetéből készült preparátumokat. Az immunfestés

gépi lélegeztetés hatására fokozott fluoreszcencia jelentkezett a kontroll és LPS-sel kezelt állatokhoz képest. A fluoreszcencia elsősorban epithelialis lokalizációt mutatott.

Célkitűzés 3. A gépi lélegeztetés fokozza az LPS-által kiváltott tüdőkárosodást patkányokban

Az LPS, a gépi lélegeztetés és az LPS/gépi lélegeztetés által kiváltott tüdőkárosodás mértékének meghatározására 2 órán át tartó kísérleteket végeztem. Az LPS csoport állatait 2 órával az LPS beadása után leöltem. Az LPS/gépi lélegeztetés csoportban lévőknek LPS-t adtam majd 1 órán át szabadon lélegezni hagytam őket. Ezt követően 1 órán át gépi lélegeztetésnek voltak kitéve. A csak gépi lélegeztetés csoport állatait 2 órán át gépi lélegeztettem. Minden állatban teljes sejtszámot és totál protein szintet határoztam meg a hörgőmosó folyadékból. Az LPS, a gépi lélegeztetés és az LPS/gépi lélegeztetés kezelés egyaránt szignifikánsan emelte a teljes sejtszámot a lavage-ban. LPS/gépi lélegeztetés kezelés szignifikánsan emelte a lavage teljes fehérje tartamát is, még a másik két kezelés nem. Szövettani eredményeim tovább erősítik a megfigyelést, mely szerint a gépi lélegeztetés tovább fokozza az LPS által okozott tüdőkárosodást. amennyiben PBS (kontroll) kezeléshez viszonyítjuk, az LPS vagy a gépi lélegeztetés gyulladásos sejt beáramlást okoz az alveoláris szeptumokba, mely a szeptum megvastagodásához vezetnek. Az LPS és gépi lélegeztetés kombinációja volt a legkárosítóbb hatású, mely az alveolus fal elszakadását okozta. A pro-inflammatórius citokin TNF- α szintje jelentősen megemelkedett a lavage folyadékban LPS/gépi lélegeztetés hatására a LPS vagy gépi lélegeztetés kezelés eredményeihez képest. A kinetikus vizsgálatok eredményei azt mutatják, hogy 30 perc LPS/gépi lélegeztetés után már szignifikánsan emelkedett a citokin szintje. A

maximális értéket 1 óra gépi lélegeztetés után mértük, a 3 órán keresztül megfigyelt állatokban.

Gépi lélegeztetés okozta tüdőkárosodásban fokozott a hem-oxigenáz-1 expresszió

A stressz indukált HO-1 RNS és fehérje expresszió szintjét Northern és western blotting segítségével határoztam meg a tüdőszövetben. Az LPS és gépi lélegeztetés kezelések fokozták a HO-1 gén és fehérje expresszióját. LPS/gépi lélegeztetés kezelés hatására nőtt meg leginkább a HO-1 gén és fehérje expressziója. Ez az eredmény azt mutatja, hogy a HO-1, mely egy fontos stressz-válasz gén termék szerepet játszhat a szervezet védekező folyamataiban VILI-ben.

Célkitűzés 4. *A belélegzett CO csökkenti a gépi lélegeztetés által okozott tüdőkárosodást*

A belélegzett CO szignifikánsan csökkentette az LPS/gépi lélegeztetés kezelés hatására fokozott teljes sejtszámot a lavage folyadékban. A csak gépi lélegeztetés kezelésben (gépi lélegeztetés/CO csoport állatai) a sejtszám csökkenés nem érte el a szignifikáns szintet. A CO nem befolyásolta a sejtszámot az LPS és kontroll csoportokban. A CO kezelés nem módosította a teljes fehérje tartalmat a lavage-ban.

Dózis dependens pro-inflammatorikus cytokin TNF- α szint csökkenést figyeltem gépi lélegeztetés során, amennyiben CO-ot kevertem a lélegeztető gép által használt levegőbe. Az anti-inflammatorikus IL-10 szintje nem változott meg LPS és gépi lélegeztetés hatására. A CO kezelés azonban fokozta a IL-10 szintjét a LPS/gépi lélegeztetés/CO csoportban. Ez a hatást nem tudtam kiváltani a csak gépi lélegeztetett állatoknál (gépi lélegeztetés/CO csoport állatai). A CO-nak nem volt hatása a citokin szintekre a kontroll és az LPS-sel kezelt állatoknál. A sejtszám és a gyulladás mérékelt csökkenése volt megfigyelhető a tüdőszövetben CO kezelés hatására.

A kvalitatív sejtanalízis során megfigyeltem, hogy 2 óra 250 ppm CO kezelés szignifikánsan csökkentette a lavage-ban található macrophagok számát. A neutrophilek száma ebben az időpontban meg elhanyagolható volt a hörgőmosó folyadékban. Arra, a kérdésre, hogy vajon a neutrophil leukocytákra is hatással van-e a CO 4 órás gépi lélegeztetés kísérlettel adtam választ. LPS/gépi lélegeztetés és LPS/gépi lélegeztetés/CO protokoll alapján kezeltük az állatokat. 250 ppm CO szignifikánsan csökkentette a teljes és a neutrophil sejtszámot a lavage folyadékban. Ebből arra következtethetünk, hogy a CO a neutrophil leukocyták alveoláris infiltrációjának gátlása révén fejt ki gyulladáscsökkentő hatást VILI-ben.

A belélegzett kis dózisú CO nincs hatással a haemodinamikára és az oxigenizációra

Az LPS/gépi lélegeztetés és az LPS/gépi lélegeztetés/CO állataiban artériás vérnyomást és vérgáz szinteket mértem, hogy meggyőződjem arról, hogy az alkalmazott CO dózisa nem befolyásolja a szervezet haemodinamikáját és a tüdő gáz cseréjét. A tracheostomiát követően a jobb artéria carotist kanuláltam és a vérnyomást folyamatosan mértem a lélegeztetés ideje alatt. Vért a vizsgálat elején és végén vettem vérgáz analízisre. Nem találtam szignifikáns eltérést a vér pH-jában, a PCO_2 , PO_2 nyomásában a csoporton belül és két csoport állatai között. LPS kezelés vagy a csak gépi lélegeztetés nem befolyásolta a haemodinamikát. A carboxi-hemoglobin szint, mint várható volt, szignifikánsan megemelkedett CO kezelés hatására.

A CO gyulladáscsökkentő hatásának mechanizmusa

A transzkripciós faktorok szerepet játszanak a szervezetet érő stressz hatására létrejövő génexpresszió változás mediálásában. Ezek olyan biológiai folyamatokat foglalnak magukba mint a gyulladás, a sejt proliferáció, a sejtek túlélése. Ezek fontos

védekező mechanizmusok sejt vagy szövet károsás idején. Kísérletekben azt is vizsgáltam, hogy vajonismert gyulladásos transzkripciós faktorokat, mint az NFκB vagy az AP-1 befolyásol e a CO gyulladáscsökkentő hatása révén. LPS és a gépi lélegeztetés fokozta a NFκB és az AP-1 aktivációját, de a CO nem befolyásolta ezen faktorok transzlokációját a nucleusbba.

Egy másik fontos gyulladásos útvonal a p38 MAPK. Ebben a modellben mind az LPS, mind a gépi lélegeztetés fokozta a p38MAPK aktiválódását. CO hatására az aktiváció szignifikánsan megnőtt. Azért, hogy megvizsgáljam a CO által aktivált p38 MAPK biológiai hatását anti-inflammatórikus IL-10 szintet mértem a lavage-ban. Specifikus p38 inhibitorral (SB203580) kezelt állatokban a CO által kiváltott IL-10 szint növekedés nem volt megfigyelhető. A tüdőszövetből készült metszetek itt hemorrhagiát és gyulladást mutatnak.

Megbeszélés

Egy nemzetközi tanulmány közlése szerint az intenzív osztályon kezelt betegek 39% részesül gépi lélegeztetésben. Közülük sokakban gépi lélegeztetés által okozott tüdőkárosodás (VILI) alakul ki. A VILI hozzájárulhat ARDS kialakulásához. Annak ellenére, hogy klinikai vizsgálatok azt mutatták, hogy az ARDS/VILI-hez kapcsolódó halálozás csökkenthető alacsony térfogatú lélegeztetéssel, PEEP-pel és legújabbán recruitment maneuverrel kombinált protektív légzési technikával, a szindróma egy komoly kihívás az intenzív betegellátás számára.

1. Új genek expresszió analízise gépi lélegeztetés által okozott tüdőkárosodásban (Célkitűzés 1)

Egyre több kísérleti és klinikai kutatási eredmény azt mutatja, hogy gépi lélegeztetésben az alveolusok erőltetett kitágulása tüdőkárosodáshoz vezet. Ezt a

hatást gyakran fokozzák az akut tüdőkárosodás egyéb okai, mint például mikrobák által okozott gyulladások. A lipopoliszaharidok (LPS), sav aspiráció, bél perforáció által kiváltott szepszis gyakran alkalmazott technikák gyulladás kiváltására VILI modellekben. Ugyanekkor nem ismert, hogy az alveolusok túlfeszülése és a microbiális gyulladás ugyanazon vagy különböző intracellularis mechanizmusokra hatva fejti ki hatását a tüdőben. Én LPS-sel kezelt és gépi lélegeztetett egerek génexpresszió analízis révén közelítettem meg ezt a problémát. A gén expresszió elemzése kulcsfontosságú lehet az ALI/ARDS mechanizmusának megismerésében. Ezen elemzési technika alkalmazása *in vivo* nehézségekbe ütközik, mivel: 1. intakt állatokban az alveolusok túlfeszítését akadályozza mellkas fal és az összkapcsolódó alveolusok, 2. az alveolusokba bevándorló gyulladásos sejtek befolyásolják a génexpressziót. Ezt a két nehézséget egy izolált, perfundált és gépi lélegeztetett egérmodell segítségével oldottam meg. Ebben a kísérletben microarray analízissel az alveolusok feszülésének és az LPS adásnak következtében kialakuló gén expresszió változást összehasonlítottam össze. 567 olyan gént azonosítottam, melyeket szignifikánsan befolyásolt a nagy nyomású gépi lélegeztetés és/vagy az LPS. Ezek közül sok gént, különösen a citokineket, a növekedési faktorokat és az apoptózisban szerepet játszó géneket mindkét kezelés befolyásolt. Ezen eredmény alapján egy közös intracelluláris útvonal meglétét tételezhetjük fel. Ugyanakkor, egyes növekedési faktorok, metabolizmusban szereplő enzimek, mediátorok és citoskeletális proteinek génjeit csak a gépi lélegeztetés befolyásolta. Ezen adatokra támaszkodva arra a következtetésre juthatunk, hogy létezik egy másik mechanizmus, mely a jól ismert gyulladásos útvonalaktól eltérő úton befolyásolja a szervezet válaszreakcióit.

A legnagyobb csoport gén, melyet a gépi lélegeztetés befolyásolt a programozott sejthalálhoz kapcsolódik. Az epithelium apoptosisa megfigyelhető *in*

vitro és *in vivo* VILI modellekben. A gének amelyeket a vizsgálat során kiemeltem a Fas ligand és a caspase útvonalakhoz tartoznak. Számos gén olyan gén, amelynek expressziója megváltozott az idegrendszerben tölt be fontos szerepet. Ez egy feltételezett neuro-inflammatorikus tengelyre endeg következtetni. Például, a preprotachykinin-1 neuropeptid expresszióját már korábban leírták más VILI modellekben is. Hayashi és kollegái a közelmúltban publikálták, hogy spinális musculáris atrophiaiban gépi lélegeztetés közrejátszik a neuodegenerációs folyamatokban.

Különbségek a nagy nyomású gépi lélegeztetés és az LPS kezelés között

Számos olyan gént felismerhetünk az általam közöltek között, melyek korábbi tanulmányokban is szerepelnek. Egy másik módszer a gének elemzésére statisztikai módszerek alkalmazása, mellyel ugyanazon kísérletben belül megfigyelt gének expressziójának sszehasonlítjuk. A SAM és a Scoregene módszerek közös statisztikai erejével vizsgáltam a génexpressziót az én modellemben. A két program által szignifikánsnak tartott gének 90% egybeesett. Így találtam 567 olyan gént, melyek expresszióját szignifikánsan befolyásolta vagy a gépi lélegeztetés és/vagy az LPS kezelés.

Az LPS és nagy nyomású gépi lélegeztetés által is fokott expressziót mutató gének között sok pro-inflammatorikus (IL-6, GM-CSF, MIF) és anti-inflammatorikus (IL-10, IL-1ra). Érdemes megjegyezni, hogy vannak olyan citokinek is a listán, amelyek újak a tüdőkárosodás témában mint például az Il-11 (QRT-PCR-ral azonosítva ezen vizsgálatban), macrophage migration inhibition factor (MIF) és IL-22 (Il-10-related T cell-derived inducible factor). Egyéb azonosított extracelluláris faktorok az amphiregulin (lásd lent Az amphiregulin feltételezett szerepe részben) és

a Cyr-61 (QRT-PCR-rel azonosítva ezen vizsgálatban). A Cyr-61 sejtfelszíni integrinekhez kötődik és intracellularis folyamatokat indít el, melyek a sejt szaporodáshoz és az angiogenezishez köthetőek. Ezen felül kollegáim és én azonosítottunk több intracelluláris signal útvonalat: gravin (Akap 12) és Nur 77 (Nr4a1), melyek aktiválódnak gépi lélegeztetésben. Ezek expresszióját QRT-PCR-rel tovább vizsgáltam. Az Akap gének termékei multivalens signalizációs komplexeket tartanak formában, úgy, hogy kináz és foszfatáz enzimeket kapcsolnak a cytoskeletonhoz. Ezen fehérjéknek szerepük lehet a sejt alakjának változás révén létrejövő singalizációs folyamatok beindításában. Nur 77, amelyet NGFIB-nak vagy TIS1-nek is neveznek egy olyan ligand nélküli (orphan) nuclear receptor, mely szerepet játszik a sejt osztódásban és sejthalálban, valamint anti-apoptotikus tulajdonsággal is rendelkezik.

A gének egyik csoportja csak a gépi lélegeztetés hatására aktiválódott. Ezek közé tartozik a 1. TNfrsf12a (Fibroblast growth factor regulated protein 2, Fn14), mely befolyásolja az NFκB aktivációt és stimulálja a human bronchialis epithel sejteket, hogy IL-8-at és GM-SCF-et termeljenek, 2. a kevésbé ismert CXCL16 kemokin és a CCR5 kemokin receptor. Ezen faktorok legtöbbjének funkciója nem ismert a VILI pathomechanizmusában és továbbbővíti az ismeretlen specifikus mechanotranszdukciós útvonal létezését.

Szintén izgalmas téma, hogy egyes gének expressziója csökkent gépi lélegeztetés során. Eddig a gén reguláció vizsgálata főleg a fokozott génexpresszióra korlátozódott. A csökkent expressziójú gének közül kiemelkedő jelentőségű a hypoxia-inducible factor 1α (HIF1α).

2. Az amphiregulin szerepe (egy új gén a gépi lélegeztetés által okozott tüdőkárosodásban) (Célkitűzés 2)

A mechanikai nyújtás növekedési faktorokat aktivál epithel sejtekben. Tschumperlin és kollegái azt figyelték meg, hogy az epithelium nyújtása során epidermal growth factor receptor (EGFR) ligand jut a laterális intracellularis részbe, mely intracellularis szignalizációt indít be. A ligand az EGFR-hoz kapcsolódik, mely extracellular signal-regulated kinase (ERK) MAPK aktivációhoz vezet. Ez a mechanizmus megmagyarázhatja, hogy miért aktiválódott számos növekedési faktorhoz kapcsolódó gén expressziója a kísérleti modellemben gépi lélegeztetés hatására.

Egyik ezek közül az amphiregulin. Ez a polipeptid az epidermalis növekedési faktorok családjába tartozik. Egyéb más EGFR ligandokkal együtt az amphiregulin kapcsolódik az EGFR extracellularis domainjéhez, mely a ERK és NFκB aktivációhoz vezet. EGFR fokozza a sejtosztódást és IL-8 és/vagy MIP-2 cytokin kibocsátását. Amphiregulin jelen van a tüdőszövetben és kiemelkedő szerepe van bronchusok növekedésének és elágazódásának serkentésében. Humán tüdő epithel sejtekben a dohányfüst és az apró volatile szemcsék (PM10) fokozzák az amphiregulin expresszióját. Mindezek mellett az amphiregulin fokozza a GM-CSF szekrécióját. Krónikus asthma egér modelljében az ovalbuminnal szenzitizált állatok fokozott amphiregulin immunfluorenciát mutatnak epitheliumukban. Az én kísérleteimben is az epitheliumra lokalizálható fokozott amphiregulin immunfluorescenciát figyeltem meg. Ezek azoka sejtek, melyekben az ERK aktiválódik gépi lélegeztetés hatására. A feltételezés, mely szerint az amphiregulin befolyásolja a szignalizációs folyamatok egy részét további kutatásokat igényel.

Összefoglalva elmondható, hogy az alveolusok falát túlfeszítő, a klinikai gyakorlatban gyakran alkalmazott nagy nyomású gépi lélegeztetés specifikus sejtfolyamatokat indít be, melyek különböznek az LPS hatásától. A jövőben

szükségünk lesz ezeknek az útvonalaknak a részletes megismerésére, hogy kivédhessük a gépi lélegeztetés káros mellékhatásait.

4. A szén-monoxid gyulladáscsökkentő hatása gépi lélegeztetés által kiváltott tüdőkárosodásban (Célkitűzés 3 és 4)

Az *in vivo* gépi lélegeztetés kísérletek elsődleges célja az volt, hogy igazoljam hipotézisem, mely szerint a belélegzett CO gyulladáscsökkentő hatással bír VILI-ben. Intravénás LPS injekció és/vagy nagy volumenű gépi lélegeztetés hatására akut tüdőkárosodást idéztem elő CO jelenlétében és hiányában. A CO protektív hatását figyeltem meg. Ezt követően meghatároztam a feltételezett mechanizmust, mely révén a CO gyulladáscsökkentő hatást fejt ki. Az általam alkalmazott kezelés súlyos elváltozást okozott a tüdőben, mely gyulladásához és oedemához vezet. A folyamatokat BALF-ből nyert sejtszám, fehérje tartalom és TNF- α segítségével elemeztem. TUNEL assay nem mutatott sejthallált VILI-t követően a tüdőszövetben. Ahhoz, hogy a lehető leg életszerűbb VILI modellt hozzam létre és maximalizáljam a tüdőkárosodást sublethalis dosisban LPS-sel előkezelttem az állatokat. Ilyen módszert más szerzők is alkalmaznak. A vér pH, PCO₂ és PO₂ szintje és az artériás vérnyomás nem változott szignifikánsan a kezelés hatására.

A VILI modellben a vizsgálatok kezdetén fokozott HO-1 expressziót figyeltem meg. Laboratóriumunk és mások is kimutatták, hogy a HO-1 indukció *in vitro* és *in vivo* modellekben nemcsak a sejt károsodás megbízható jelzője, de a szervezet stresszhatásban jelentkező fiziológiás válaszreakációjának is része. Mivel HO-1 expressziója fokozódott a kísérletben kíváncsi voltam, hogy CO segítségével befolyásolható e a VILI.

A korábban *in vitro* és *in vivo* rendszerekben leírt eredményekhez hasonlóan a CO mérsékelte a gyulladást VILI-ben. A belélegzett CO csökkentette a BALF sejtszámát és TNF- α szintjét. Érdekes módon a CO növelte az anti-inflammatorikus IL-10 szintjét a lavage folyadékban. Ezek az eredmények megegyeznek az Otterbein és kollegái által egérben és emlős makrofágokban megfigyelttel.

A LPS/gépi lélegeztetés kezelés után a lavage folyadékban a leggyakoribb sejttípus a makrofág volt. A makrofágok érzékenyek a mechanikai stresszre és a BALF-ban megfigyelt sejtszám változások azt mutatják, hogy VILI-ben fontos szerepük lehet a citokinek kibocsátásban. Belperio és kollegái 6 óra nagy térfogatú gépi lélegeztetés (12ml/kg) után neutrophil leukocytá túlsúlyú gyulladást számol be. Az én modellemben a neutrofilek beáramlása az alveolaris térbe 4 óra gépi lélegeztetés után volt megfigyelhető. A belélegezett CO szignifikánsan csökkentette a neutrophil recruitmet az alveolusokba. Emellett a CO a BALF makrofág számot is csökkentette 2 óra lélegeztetés után. A TNF- α egy ismert és sokat vizsgált citokin amely pro-inflammatorikus hatással bír *in vitro* és *in vivo* modellekben. Az IL-10 gyulladásgátló hatással bír LPS által kiváltott gyulladásban. Érdekes megfigyelés, hogy a modellben a CO nem befolyásolta a lavage fehérje tartalmát, mely arra enged következtetni, hogy a nincs hatással az alveolo-capilláris barrierre. Ez a megfigyelés tovább erősíti azt a feltételezést, mely szerint a CO a gyulladásos folyamatok regulátora, mely csökkenti a pro-inflammatorikus és fokozza az anti-inflammatorikus citokinek szintjét.

A szignalizációs útvonal, mely révén a CO kifejti gyulladáscsökkentő hatását nem pontosan ismert. Korábbi megfigyelések szerint CO értágulatot okoz a szolubilis guanil-cikláz (sGC) és ciklikus GMP (cGMP) aktiválása révén. Ennek ellenére a VILI modellben nem figyeltem meg cGMP dependens hatást. Az eredmények azt is

mutatják, hogy a gépi lélegeztetés fokozta NF- κ B és AP-1 aktivációját, de a CO nem befolyásolja az. Ezen két transzkripciós faktor fontos szerepet játszik a gépi lélegeztetés okozta tüdőkárosodás intracelluláris folyamatának mediálásában. Megfigyeltem a p38 MAPK fokozott aktivitását CO hatására VILI-ben. Ismert, hogy a p38 MAPK szabályozza a TNF- α és a IL-10 termelést. Bár további vizsgálatok szükségesek, hogy megismerjük hogyan befolyásolja a CO a p38-at, feltételzhető, hogy a CO posttranscriptionálisan módosítja a TNF- α termelést.

Úgy vélem, hogy állatkísérletes modelljeim a hozzájárulnak a CO complex reguláló funkciójának megismeréséhez tüdőkárosodásban. Ezen vizsgálat eredményei alapján arra a csábító következtetésre juthatunk, hogy a belélegzett CO egy új terápiás eszközt jelenthet ki a gépi lélegezteés okozta tüdőkárosodás gyógyításában.

Közzelvények

1. (Dolinay T, Szilasi M, Liu M, Choi AM. Inhaled carbon monoxide confers antiinflammatory effects against ventilator-induced lung injury. Am J Respir Crit Care Med. 2004;170:613-620.(IF: 8.895)

2. Dolinay T, Kaminski N, Kim HP, Reynolds P, Karp D, Uhlig S, Choi AM. Gene expression profiling of target genes in ventilator-induced lung injury. (under revision at Am J Resp Cell Mol Biol. (IF:3.4)

3. Dolinay T, Choi AM, Ryter SW. Can carbon monoxide inhalation be used as a therapeutic in human disease? In: A Amann, editor. Proceedings of: Breath Gas Analysis for Medical Diagnosis Sept 23-26, 2004.Vorarlberg University of Applied Sciences, Dornbirn, Austria. World Scientific Publishing: Singapore 2005. (In Press)

4. Szilasi M., Brugós L., Dolinay T.: A légszennyezés és a krónikus obstruktív tüdőbetegségek kapcsolatának vizsgálata. Medicina Thoracalis 2000;53:21-26.

5.Dolinay T., Csiki Z., Brugós L., Sebesi J., Szilasi M.: Asthma bronchiális betegek életminőségének javulása Helicobacter pylori eradikációt követően. Endoscopia 2002; 4: 80-88.