

# A bronchoalveolaris lavage citológia helye a tüdőtranszplantáltak akut gyulladáisos kórképeiben

dr. Bikov András, dr. Süttő Zoltán, dr. Bohács Anikó, dr. Csiszér Eszter, Gáll Orsolya,  
dr. Komlósi Zsolt, dr. Losonczy György, dr. Müller Veronika

Semmelweis Egyetem, Pulmonológiai Klinika, Budapest

A tüdőtranszplantációt követő akut gyulladáisos kórképek (akut rejekció és infekció) mielőbbi diagnózisa és kezelése alapvető a betegek gondozása során. Ugyanakkor a két kórkép elkülönítése sokszor nehézségekbe ütközik. Kérdés, hogy a bronchoalveolaris lavage folyadék (BALF) citológiai elemzése mennyiben segíthet a klinikai döntéshozatalban. Feldolgoztuk a Semmelweis Egyetem Pulmonológiai Klinikáján 2011 novembere és 2015 augusztusa között levett BALF mintákat. A vizsgálatba 64 beteg 227 mintája került be. Összehasonlítottuk a stabil állapotot, az akut rejekciót és az akut infekciót jellemző BALF citológiai profilt. Eredményeink szerint a minták döntő többsége normál sejtképet mutatott függetlenül attól, hogy melyik csoportba tartozott. A transzplantációt követő első évben nem találtunk szignifikáns különbségeket a BALF citológiai összetételében a három csoport között. Stabil betegektől vett mintákat vizsgálva az első év az azt követő időszakhoz képest lymphopeniával és neutropeniával volt jellemezhető ( $p < 0,05$ ). Az első évet követő időszakban az akut rejekció a stabil állapothoz képest eosinophiliával ( $p = 0,01$ ), az infekcióhoz képest neutrophiliával volt jellemezhető ( $p < 0,01$ ). A stabil állapotú betegek mintáiban észlelt neutrophilia felvetette a 12 hónapon belüli BOS lehetőségét ( $p = 0,04$ ). Nem volt különbség a BALF citológiai arányokban az alapbetegségek vagy az alemtuzumab indukcióban részesülő betegek között ( $p > 0,05$ ). Vizsgálataink alapján a BALF rutinszerű citológiai vizsgálata mérsékelt klinikai relevanciával bír az akut gyulladáisos kórképek felismerésében. Az első évet követő BALF citológiai változások ugyanakkor felvethetik akut rejekció lehetőségét. A hisztológia késése esetén a tünetek és egyéb klinikai mutatók alapján a BALF citológia segíthet a megfelelő terápiás döntéshozatalban.

**Kulcsszavak:** akut rejekció, bronchoalveolaris lavage, infekció, tüdőtranszplantáció

## **Role of bronchoalveolar lavage cytology in acute inflammatory disease of lung transplanted patients**

The early diagnosis of acute inflammatory events (acute rejection and infections) is essential during the follow up of patients with lung transplantation. However, the differential diagnosis of the two phenomena is often challenging. It is not fully explored if the analysis of cellular composition of the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) can help in clinical settings. We analysed the BALF samples collected between November 2011 and August 2015 at the Department of Pulmonology, Semmelweis University. Two hundred and twenty-seven samples of 64 patients were included. We compared the BALF cellular pattern of stable patients and of those in acute rejection as well as infection. The BALF cellular profile was normal in the majority of the cases irrespectively of which group they belonged to. We could not find any difference in the cellular profile among the three groups during the first year after transplantation. In BALF samples of stable patients we observed lymphopenia and neutropenia during the first year after transplantation com-

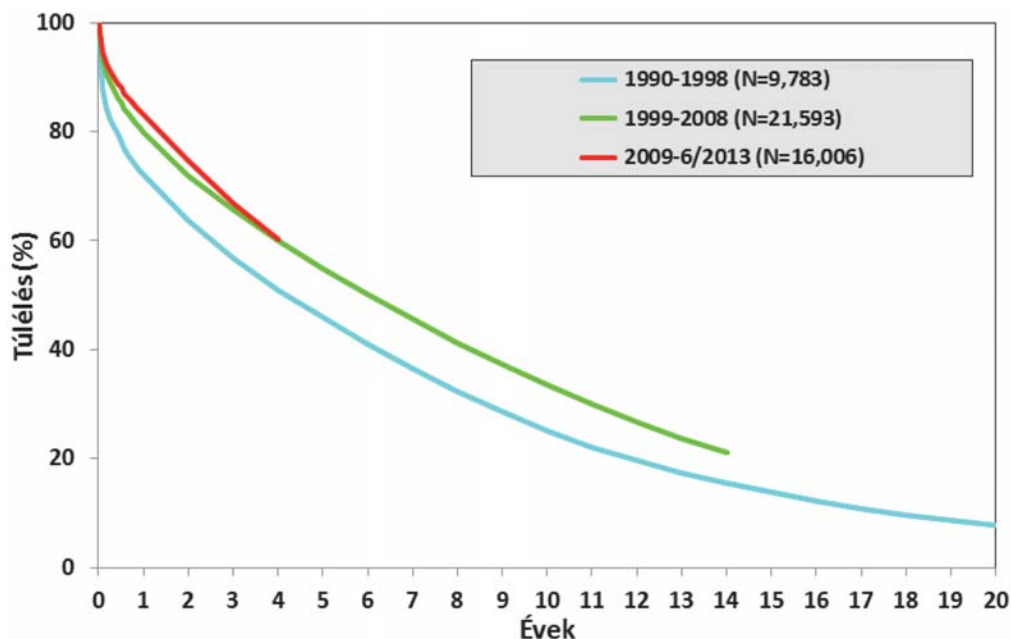
pared to the following period (both  $p < 0.05$ ). After the first year, we observed eosinophilia in acute rejection compared to samples from stable patients ( $p = 0.01$ ), and neutrophilia in acute rejection compared to infection ( $p < 0.01$ ). Neutrophilia in stable patients was predictive for the development of bronchiolitis obliterans syndrome within 12 months ( $p = 0.04$ ). We could not find any difference in cellular profile among underlying diseases or between those who received or did not receive alemtuzumab induction (both  $p > 0.05$ ). According to our results the routine assessment of BALF cellular profile has limited clinical value in the diagnosis of acute inflammatory events during the follow up of patients with lung transplantation. However, the changes in cellular composition following the first year may reflect the possibility of acute rejection. Taking into account the patients' complaints together with clinical parameters, cellular profile of BALF can help in the clinical decision when the histological assessment is delayed.

**Key-words:** acut rejection, bronchoalveolar lavage, infection, lung transplantation

## Bevezetés

A tüdőtranszplantáció a tüdő végstádiumú légúti, vascularis és parenchymás megbetegedéseinek terápiáját jelenti a megfelelő kritériumokat teljesítő betegeknél (1). Az International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) kimutatása alapján évente közel 3900 tüdőtranszplantáció történik világszerte (2). A transzplantációhoz vezető leggyakoribb kórokok a krónikus obstruktív tüdőbetegség (COPD, az esetek 32%-ában), az idiopathiás tüdőfibrozis (IPF, 24%), a cystas fibrosis (CF, 16%), az alfa-1-antitripszin hiány (5%), az egyéb interstitialis

tüdőbetegségek (4%) és az idiopathiás pulmonalis artériás hypertonia (IPAH, 3%) (2). A közel 40 éves tapasztalat ellenére, a tüdőtranszplantációt követő túlélés elmarad más szolid szervek transzplantációihoz képest (3–5). Az ISHLT adatai szerint a medián túlélés a beavatkozást követően 5,7 év. Amennyiben megfigyeljük a trendeket, úgy látható, hogy a 90-es évekhez képest az ezredfordulót követően szignifikánsan, közel 1,5 évvel nőtt a betegek túlélése (1. ábra) (2). Ugyanakkor az is látható, hogy a 2010-es évtizedtől induló statisztikák a korábbi évtizeddel megegyezőek, lényegi javulás nincs.



1. ábra A tüdőtranszplantációt követő túlélés a 90-es, 2000-es években és napjainkban az ISHLT adatai alapján (2)

A görbék pontosabb analízise azt is mutatja, hogy a 90-es évek és az ezredforduló közötti különbségek jórészt az első évi túlélés javulásából adódnak, a görbék lefutása az első évet követően közel párhuzamos. Ez azt jelentheti, hogy a lényegi fejlődés a perioperatív ellátásban történt, illetve könnyebben kezelhetőek az akut komplikációk, úgymint az akut infekciók és rejekciók. A krónikus rejekció okozta halálozásában ugyanakkor nincs jelentős előrelépés.

A transzplantált tüdőt érő krónikus tüdőallograft dysfunkció (CLAD) formái közül a bronchiolitis obliterans szindróma (BOS) a leggyakoribb, amely 10 éves távlatban a transzplantáltak 75%-ában kialakul (2). Ismert, hogy a CLAD kialakulásában a repetitív akut rejekciók és infekciók vezető szerepet játszanak (6). Miután ezek közvetlenül halálhoz, közvetve pedig a BOS kialakulásához vezetnek, mielőbbi diagnózisuk és kezelésük elmaradhatatlan része a transzplantált betegek gondozásának. Akut rejekció merül fel, ha a beteg állapota, illetve légzésfunkciója rapidan romlik, mely más egyéb okokkal (pl. szívelégtelenség, infekció) nem magyarázható. Fontos megjegyezni, hogy a rejekció és infekció nagyon gyakran klinikailag (tünetileg, légzésfunkciós csökkenés, radiológia jelek és laboratóriumi értékek) igen hasonló képet mutat (7). Az akut rejekció diagnózisához transbronchialis tüdőbiopszia (TBTB) szükséges (8). Jól ismertek ugyanakkor a mintavételből származó ritka, de nemkívánatos mellékhatások, mint a tüdővérzés és a légmell (6, 9). A transzplantált betegeknél a vérzés veszélye magasabb a nem-transzplantált populációhoz képest (9), ezért a TBTB-hez képest kevésbé invazív technikák használta különösen fontos. Ilyen módszer lehet a kilégzett levegő, a spontán vagy indukált köpet, illetve a bronchoalveolaris lavage (BAL) vizsgálata. A kilégzett levegő vizsgálatának előnye, hogy a betegtől minimális kollaborációt igényel, ugyanakkor sokszor nem tudni, hogy a minta mennyire reprezentálja a tüdőben zajló folyamatokat, illetve a mintavételi technikák számos metodikai nehézséggel járnak (10). Munkacsoporthunk korábban kimutatta, hogy a tüdőtranszplantáltak kilégzett levegőjének gázösszetétele különbözik

a nem-transzplantáltaktól és azt jelentősen befolyásolja az immunszuppresszív szerek használata (11). Tüdőtranszplantált betegek a csökkent izomerő következtében sokszor nem tudnak megfelelő spontán, nyálmentes köpetet leadni, megfelelő minőségű mintához fokozott kooperáció szükséges (12).

A BAL során ismert mennyiségű (100–300 ml) fiziológiás sóoldat instillációját követően nyerünk vissza hörgőmosó folyadékot (BALF). A sejtösszetétel függ az instilláció helyétől, a bevitt és visszanyert folyadékmennyiségtől, illetve a szívnyomástól (7, 13). A módszer előnye, hogy a beteg részéről minimális kooperációt igényel és a mintavétel helye pontosan ismert (13). Fontos, hogy nemcsak citológia céljából tudunk mintát nyerni, hanem abból mikrobiológiai analízis is történik, illetve a felülűszóból kutatás céljából mediátorok kerülhetnek kimutatásra. Hátránya, hogy invazív beavatkozás és a mintavétel ritkán lázhoz, vérzéshez vagy bronchospazmushoz vezethet (7). Az Amerikai Tüdőgyógyász Társaság (American Thoracic Society, ATS) 2012-ben iránymutatást adott ki a BALF feldolgozásához és interpretálásához interstitialis tüdőbetegségekben (13). Ezek alapján a normális BALF sejtprofil  $>85\%$  macrophag arány,  $10\text{--}15\%$  lymphocyt arány,  $<3\%$  neutrophil arány és  $<1\%$  eosinophil arány jellemzi. A  $>5\%$  laphámot tartalmazó mintákat nem lehet interpretálni, az  $5\%$  feletti bronchialis epithelsejtet tartalmazó mintákat kellő aggálllyal kell kezelni (13). Transzplantáltaknál ugyanakkor egységesen elfogadott normálértékek nincsenek. Egy a közelmúltban megjelent összefoglaló közlemény alapján stabil betegeknél  $71\text{--}94\%$  macrophag arányt,  $5\text{--}19\%$  lymphocyt arányt,  $4\text{--}12\%$  neutrophil arányt és  $<1\%$  eosinophil arányt mértek (6).

Az elmúlt évtizedekben számos vizsgálatban analizálták a BALF citológiai összetételét transzplantáltak követése során (6, 7). Összességében az eddigi adatok ellentmondásosak, hiszen egyaránt írtak le eosinophiliát (14), neutrophiliát (15) és lymphocytosist (14, 15) is akut rejekció során. A különbségek adódhatnak abból, hogy az elmúlt évtizedekben változott, és a különböző centrumokban jelenleg is eltérő a protokoll az indukciót (anti-thymocyt globulin vs. alemtuzumab) és a követésben használt immun-

szuppressziót, illetve antibiotikus profilaxist tekintve. Ezen kívül a korai vizsgálatok a transzplantációt követő első három hónapban neutrophiliáról számoltak be (7), más vizsgálatok pedig a lymphocytá arány időbeli változását írták le (6), melyek arra utalnak, hogy a BALF citológiai képe időbeli változást mutat.

Speck és munkatársai egy közelmúltban megjelent közleményben összefoglalták a BALF citológia eddigi eredményeit a transzplantáltak követésében (6). A szerzők szerint akut állapotromlás esetén elsőként a vérképet kell értékelni. Vér neutrophilia ( $>9$  G/l) elsősorban infekcióra utal. Minden más esetben, illetve azoknál, akik empirikus antibiotikus terápiára nem reagálnak, bronchoszkópos vizsgálatot és BAL-t kell végezni. A BALF mintában a neutrophilia ( $\geq 12\%$ ), eosinophilia ( $>0\%$ ), lymphocytosis ( $>20\%$ ) és basophilia ( $>2\%$ ) külön-külön is akut rejekcióra utal. A neutrophiliát azt akut infekció kizárása esetén lehet értelmezni (6).

Tekintettel arra, hogy a különböző centrumok között jelentős különbségek vannak a betegségek gondozásában, illetve a különböző vizsgálatok jelentős metodikai különbségeket mutatnak, az ezekből származó konzekvenciák egy-egy centrum esetében megteveszthetők lehetnek. Jelen vizsgálatunk célja ezért a Semmelweis Egyetem Pulmonológiai Klinikáján gondozott betegektől származó, itt levett és feldolgozott BALF minták analízise és klinikai interpretációja volt.

## Módszerek

### Vizsgálati protokoll

A transzplantált betegek követése során 1, 2, 3, 6 és 12 hónappal a transzplantációt követően bronchoszkópos vizsgálat történik. Ezeket a surveillance hörghőtükrözéseket egészítik ki az akut állapotrosszabbodáshoz köthető beavatkozások. A vizsgálatok során a klinikus megítélése alapján történik TBTB, illetve BAL. Vizsgálatunkban feldolgoztuk a Semmelweis Egyetem Pulmonológiai Klinikáján 2011 novembere és 2015 augusztusa között levett BAL adatokat. Ez alatt az időszak alatt 263 BAL mintavétel történt. Ezek közül 16 esetben nem volt értékelhető a minta, további 20 esetben a laphám arány

$\geq 5\%$  volt. A további számításokból ezért ezeket a mintákat kizártuk, így végül 227 BALF eredmény feldolgozása történt.

A 227 mintát 3 csoportba osztottuk aszerint, hogy transbronchialis biopsziában volt-e akut rejekcióra utaló eltérés (akut rejekció csoport), a BALF mintából szignifikáns csíraszámban ( $>10^3$ ) tenyésztett kórokozó vagy a perifériás vérben szignifikáns volt-e a cytomegalovírus (CMV) antigenemia (akut infekció csoport), illetve ha ezek egyike sem állt fenn (stabil csoport).

A vizsgálatokat a Semmelweis Egyetem Regionális, Intézményi Tudományos és Kutatásügyi Bizottsága jóváhagyta (TUKÉB 258/2013) és a vizsgált személyek írásos beleegyezésüket adták a vizsgálatba.

### Vizsgálati személyek

A vizsgálatba 64 beteget vontunk be. 24 esetben CF, 17 esetben IPF, 15 esetben COPD, 4 esetben IPAH, 2 esetben lymphangioliomyomatosis, 1 esetben krónikus tromboemboliás pulmonalis hypertonia, 1 esetben extrinsic allergiás alveolitis volt a transzplantációhoz vezető tüdőbetegség, négy esetben történt re-transzplantáció. Minden transzplantáció Bécsben, a Medizinische Universität Wien Mellkassébeszeti Osztályán történt. Az esetek döntő többségében bilaterális transzplantációt végeztek. Két esetben történt szív-tüdő transzplantáció, 1 esetben unilaterális tüdőtranszplantáció. Négy esetben vizsgáltunk re-transzplantációt követő mintákat, ebből 2 esetben a betegől mind a primer transzplantációt, mind a re-transzplantációt követően is történt mintavétel.

### Bronchoalveolaris lavage feldolgozása

A bronchoszkópia lokális lidocainos érzéstelenítésben orron vagy szájon keresztül történt. A betegek többségénél midazolamos premedikációt alkalmaztunk. A szegmenshögőbe ékeltük a bronchoszkópot, majd általában 120 ml szobahőmérsékletű, steril 0,9%-os fiziológiás sóoldat installációja történt 40 ml-es frakciókban. Az egyes frakciókat 0,2 mBar szívás mellett nyertük vissza. A nyert folyadékból mikrobiológiai tenyésztés céljára küldtünk mintát. 15 ml BALF mintából határoztuk meg a citológiai

**1. táblázat** A neutrophilia ( $\geq 12\%$ ), eosinophilia ( $>0\%$ ), lymphocytosis ( $>20\%$ ) és a normál sejttözetétel (az előbbieket egyike sem) gyakorisága a különböző csoportokon belül az esetszám százalékában kifejezve

	Neutrophilia (%)	Eosinophilia (%)	Lymphocytosis (%)	Normális BALF sejtarány (%)
Akut rejeckció	28	31	5	51
Infekció	11	21	4	72
Stabil	18	16	14	60
P érték	0,07	0,15	0,05	0,07

összetételt. A mintához 1:1 arányban adtunk acetil-ciszteint tartalmazó lízis oldatot, majd az elegyet 20 percig inkubáltuk. Ezt követően a mintát 10 percen keresztül 2200-as fordulatszámra centrifugáltuk, majd szeparáltuk a felülúszót és a sejteket tartalmazó pelletet. Amennyiben a beteg a vizsgálatba belegyezett, a felülúszót mediátorok meghatározásának céljából  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -n eltároltuk. A pelletet felöntöttük 12 ml-ig fiziológiás foszfát pufferben, majd vérképpautomatával meghatároztuk a sejttszámot. A BAL átlagosan  $2,2 \pm 7,2 \times 10^6/\text{l}$  sejtet tartalmazott, mely megfelel a korábbi publikációkban tapasztaltaknak (7). A mintát ezután úgy hígítottuk, hogy milliliterenként 50000 sejtet tartalmazzon, majd citocentrifugálás történt 20 percen keresztül 1500-as fordulatszámra. A mintákat etanollal fixáltuk, majd Diff-Quick festéssel megfestettük. Citológiai kép meghatározását szakasszisztens vagy szakorvos végezte. A minták jelentős többségénél (92%) a BALF több mint 5% bronchialis epithel sejtet tartalmazott. A bronchialis epithelsejt arány összefüggött a BAL során instillált és visszanyert folyadék arányával ( $p < 0,01$ ,  $r = -0,23$ ).

### Statisztikai analízis

A statisztikai analíziseket a Statistica 12 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, US) és Graph Pad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, US) szoftverekkel végeztük. Az adatok normalitását Kolmogorov-Smirnov teszt segítségével határoztuk meg. A különböző sejttözetéseket a három csoport között Kruskal-Wallis tesztel, 1–1 csoport között Mann-Whitney tesztel hasonlítottuk össze. Célunk volt, hogy Speck és munkatársai algoritmusát teszteljük (6). Ezért meghatároztuk a csoportokon belül a lymphocytosis

( $>20\%$ ), neutrophilia ( $\geq 12\%$ ) és eosinophilia ( $>0\%$ ) gyakoriságát, és a csoportokat Chi négyzet tesztel hasonlítottuk össze. Az utóbbi analízist külön elvégeztük CF-ben, IPF-ben és COPD-ben is. Vizsgáltuk az alemtuzumab hatását, illetve az infekció etiológiájának szerepét a BALF sejttözetételére. Összevetettük a BALF sejttözetételét az 1 éven belül BOS-ba kerülő és nem kerülő betegekben. A különböző sejttözetéseket közötti korrelációkat Spearman tesztel elemeztük.  $P < 0,05$ -t tekintettük szignifikánsnak.

## Eredmények

### A csoportok összehasonlítása

Az akut rejeckció csoportba 39, az infekció csoportba 72, a stabil csoportba 116 minta került. A három csoport között nem volt szignifikáns különbség sem a lymphocytosis ( $p = 0,46$ ), sem a neutrophil ( $p = 0,17$ ), sem az eosinophil ( $p = 0,15$ ) arányban. A macrophag arányt tekintve ugyanakkor tendenciaszerű eltéréseket találtunk ( $p = 0,07$ ). Amikor 1-1 csoportot hasonlítottunk össze, az akut rejeckció csoportban tendenciaszerűen magasabb volt az eosinophil arány a stabil csoporthoz képest ( $p = 0,05$ ). Másrészt akut rejeckcióban az infekcióhoz képest szignifikánsan alacsonyabb volt a macrophag arány ( $p = 0,01$ ). Nem találtunk különbséget a BAL össz-sejttszámát tekintve a három csoport között ( $p = 0,91$ ).

### Abnormális BAL sejttözetétel arányának vizsgálata a csoportok között

Akut rejeckcióban tendenciaszerűen gyakoribb volt a neutrophilia ( $p = 0,07$ ) és az abnormális BAL sejttözetétel ( $p = 0,07$ ). Ezzel szemben lymphocytosis a stabil csoportban volt tendenciaszerűen gyakoribb

**2. táblázat** A neutrophilia, eosinophilia, lymphocytosis és a normál sejttözetétel gyakorisága a különböző csoportokon belül IPF-ben az esetszám százalékában kifejezve

IPF	Neutrophilia (%)	Eosinophilia (%)	Lymphocytosis (%)	Normális BALF sejtarány (%)
Akut rejeckció	13	25	0	63
Infekció	6	22	11	72
Stabil	10	16	6	77
P érték	0,81	0,79	0,11	0,19

**3. táblázat** A neutrophilia, eosinophilia, lymphocytosis és a normál sejttözetétel gyakorisága a különböző csoportokon belül COPD-ben az esetszám százalékában kifejezve

COPD	Neutrophilia (%)	Eosinophilia (%)	Lymphocytosis (%)	Normális BALF sejtarány (%)
Akut rejeckció	25	13	0	63
Infekció	20	20	0	80
Stabil	24	21	15	45
P érték	0,95	0,86	0,26	0,14

**4. táblázat** A neutrophilia, eosinophilia, lymphocytosis és a normál sejttözetétel gyakorisága a különböző csoportokon belül CF-ben az esetszám százalékában kifejezve

CF	Neutrophilia (%)	Eosinophilia (%)	Lymphocytosis (%)	Normális BALF sejtarány (%)
Akut rejeckció	40	27	13	47
Infekció	10	23	3	68
Stabil	23	16	21	55
P érték	0,05	0,62	0,09	0,34

( $p=0,05$ ). Normális BALF sejtprofil volt megfigyelhető az akut rejeckciók 51%-ban, az infekciók 72%-ban és a stabil állapotú betegek mintáinak 60%-ban (1. táblázat).

### Az alapbetegség hatása

Elsőként megnéztük, hogy stabil állapotban az alapbetegség (IPF, COPD vagy CF) vezet-e abnormális BAL sejtarányhoz. Nem volt különbség a BALF neutrophiliában ( $p=0,25$ ), eosinophiliában ( $p=0,80$ ) vagy lymphocytosisban ( $p=0,23$ ) a három alapbetegség között. IPF-ben szignifikánsan gyakrabban fordult elő a stabil mintákban normális BAL sejtarány ( $p=0,02$ ) más betegcsoportokkal összehasonlítva.

Ezután az egyes alapbetegségeket külön-külön is elemeztük. IPF-ben nem volt eltérés a csoportok

között az abnormális BAL sejtarányokat tekintve (2. táblázat).

COPD-ben sem találtunk különbséget a csoportok között az abnormális BAL sejtarányokat tekintve (3. táblázat).

CF-ben tendenciaszerűen gyakoribb volt a neutrophilia akut rejeckció során, és a lymphocytosis a stabil csoportban (4. táblázat).

### A transzplantáció után

#### eltelt idő hatása

Stabil betegekben megvizsgáltuk, hogy a BALF sejttözetételét befolyásolja-e, hogy a transzplantációt követően mikor történt a mintavétel. Szignifikáns különbségeket tapasztaltunk a lymphocyta arányban ( $p=0,01$ ) és a macrophag arányban ( $p<0,01$ ), a neutrophil arányt tekintve a különbség tendenciaszerű

**5. táblázat** A különböző sejtpopuláció arányok a BALF össz-sejtszámának arányában stabil állapotban attól függően, hogy a transzplantációt követően a minta mikor került levételre

Transzplantációt követő	Lymphocyta (%)	Macrophag (%)	Eosinophil (%)	Neutrophil (%)
<3 hónap	5±6	90±13	0,3±0,9	5±9
3 hónap-12 hónap	7±10	87±15	0,4±1,5	6±10
>12 hónap	15±19 *	72±25 *	0,2±0,8	13±19 *

\* p<0,05, az első és a második év között

**6. táblázat** A különböző sejtpopuláció arányok a BALF össz-sejtszámának arányában egy évet követően a három vizsgált csoport összehasonlításában

	Lymphocyta (%)	Macrophag (%)	Eosinophil (%)	Neutrophil (%)
Akut rejeckció	9±7	72±20 B	1,7±3,5 B, γ	17±22 B
Infekció	7±7	89±12 γ, α	1,0±4,3 α	3±6 γ α
Stabil	15±19	72±25 B	0,2±0,8 α	13±19 B

α - p<0,05 vs. akut rejeckció, B - p<0,05 vs. infekció, γ - p<0,05 vs. stabil

volt (p=0,05), eosinophil arányban nem találtunk különbséget (p=0,36, 5. táblázat). Az össz-sejtszámában nem volt szignifikáns különbség (p=0,23).

Nem volt szignifikáns különbség az egy éven belül levett mintákon belül a három hónapnál hamarabb és később levett mintákban (minden p>0,05). Egy éven túl ugyanakkor magasabb volt a BAL lymphocyta arány (p<0,01) és a neutrophil arány (p<0,01), míg alacsonyabb volt a macrophag arány (p=0,02).

Ezek alapján megvizsgáltuk, hogy van-e különbség a stabil, akut rejeckció és infekciós csoportok között, ha csak az 1 éven belüli, majd azon túli mintákat vizsgáljuk.

Az egy éven belül levett mintákban nem találtunk különbséget egyik sejtfrakcióban sem a három csoport között (minden p>0,05).

Az egy éven túli mintákat vizsgálva nem volt különbség a három csoport között a lymphocyta arányban (p=0,30), ugyanakkor mind a macrophag (p<0,01), mind az eosinophil (p<0,01), mind a neutrophil arányokban (p=0,02) szignifikáns különbségeket tapasztaltunk. Stabil állapot és akut rejeckció között az eosinophil arányban volt különbség (p=0,01). Stabil állapot és infekció között a mac-

rophag (p<0,01) és neutrophil arányban (p=0,02) találtunk különbséget. Infekció és akut rejeckció között a macrophag arányban (p<0,01), az eosinophil arányban (p=0,03) és a neutrophil arányban (p<0,01) is szignifikáns különbség volt (6. táblázat).

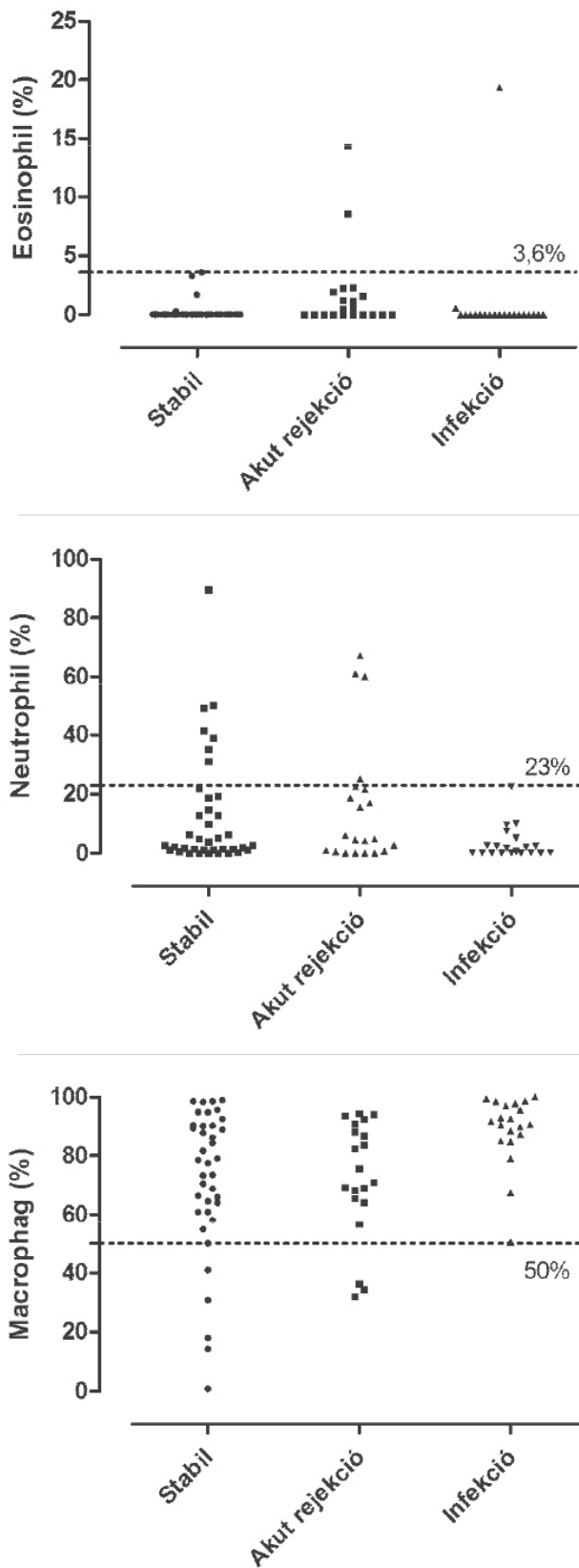
Vizsgáltuk az egy éven túl levett minták eloszlását a három, szignifikáns különbséget mutató sejtarányban. 3,6%-os eosinophil arány felett a stabil, 23%-os neutrophil arány felett, illetve 50%-os macrophag arány alatt az infekció volt kizárható (2. ábra).

### **Alemtuzumab indukció hatása**

Stabil mintákat vizsgálva nem találtunk különbséget az alemtuzumab indukcióban részesült és nem részesült betegek BALF citológiai profiljában (minden p>0,05). Nem volt különbség ebben a szerint sem, hogy a minták a transzplantációt követő első évben, vagy azon túl lettek legyűjtve (minden p>0,05).

### **A BALF citológiai összetétele a 12 hónapon belül BOS-ba kerülő betegeknél**

Stabil mintákat elemezve szignifikánsan magasabb neutrophil arányt észleltünk (12±18% vs. 5±9%,



2. ábra Sejtpopulációk a három csoportban. Szaggatott vonallal a klinikailag releváns határértékeket tüntettük fel

$p=0,04$ ) alacsonyabb macrophag arány mellett ( $74\pm 24\%$  vs.  $87\pm 15\%$ ,  $p<0,01$ ) azok körében, akik 12 hónapon belül BOS-ba kerültek. Ez független volt attól, hogy a mintákat az első évben, vagy azt követően vettük le.

**Az infekció etiológiai szerepe**

Amennyiben összevetettük a gombás, bakteriális és CMV fertőzések BALF citológiai képét, sem a gombás fertőzések, sem a CMV-infekció nem jártak szignifikáns eltéréssel ( $p>0,05$ ).

**A leukocyta szubpopulációk közötti korrelációs analízis**

Minden mintát összegezve szignifikáns összefüggés volt a macrophag arány és a lymphocyta arány ( $p<0,01$ ,  $r=-0,70$ ), a neutrophil arány ( $p<0,01$ ,  $r=-0,67$ ) és az eosinophil arány ( $p<0,01$ ,  $r=-0,29$ ) között. A lymphocyta arány szignifikáns összefüggésben állt a neutrophil aránnyal ( $p=0,02$ ,  $r=0,15$ ) és az eosinophil aránnyal ( $p=0,01$ ,  $r=0,16$ ). Szignifikáns összefüggést találtunk továbbá az eosinophil arány és a neutrophil arány között ( $p<0,01$ ,  $r=0,18$ ).

A macrophag arány az akut rejeckió csoporton belül is szignifikáns összefüggést mutatott a lymphocyta aránnyal ( $p<0,01$ ,  $r=-0,58$ ), a neutrophil aránnyal ( $p<0,01$ ,  $r=-0,73$ ) és az eosinophil aránnyal ( $p=0,04$ ,  $r=-0,33$ ). Nem volt ugyanakkor összefüggés semelyik másik két sejtarány között (minden  $p>0,05$ ).

Az infekció csoporton belül is szignifikáns összefüggést találtunk a macrophag arány és az összes többi sejtarány között ( $p<0,01$ ,  $r=-0,70$  a lymphocyta aránnyal,  $p<0,01$ ,  $r=-0,62$  a neutrophil aránnyal és  $p<0,01$ ,  $r=-0,47$  az eosinophil aránnyal). A lymphocyta arány itt nem függött össze az eosinophil aránnyal vagy a neutrophil aránnyal (minden  $p>0,05$ ), ugyanakkor szignifikáns összefüggés volt az eosinophil arány és a neutrophil arány között ( $p<0,01$ ,  $r=0,31$ ).

Amennyiben csak a stabil betegeket vizsgáltuk, úgy az eosinophil arány nem függött össze egyik frakcióval sem (minden  $p>0,05$ ). Szignifikáns összefüggés volt ugyanakkor a macrophag arány és a lymphocyta arány között ( $p<0,01$ ,  $r=-0,72$ ),



a macrophag arány és a neutrophil arány ( $p < 0,01$ ,  $r = -0,67$ ), illetve a lymphocytá arány és a neutrophil arány között ( $p = 0,04$ ,  $r = 0,19$ ).

## Diszkusszió

Vizsgálatunkban feldolgoztuk a tüdőtranszplantáltak követése során közel négy év alatt levett és feldolgozott BALF kvalitatív citológiai eredményeket. Megállapítható, hogy a BALF citológiai analízise limitált klinikai értékkel bír, egy-egy különleges esetben ugyanakkor támpont lehet a klinikai döntéshozatalban.

Számos vizsgálat írt le BAL neutrophiliát akut rejección során (15-19), ugyanakkor ezt több másik tanulmány nem támasztotta alá (20, 21). Vizsgálatunkban nem volt különbség a neutrophil arányban a stabil és az akut rejección csoport között, bár tendenciájában az akut rejección neutrophilia jellemezte. Megjegyzendő ugyanakkor, hogy ha az 1 éven túl transzplantáltak vettük figyelembe, az akut rejección az infekcióhoz képest szignifikánsan markánsabb neutrophilia jellemezte. Ugyanakkor e két kórkép elkülönítéséhez a 23%-os vágóérték limitált relevanciával bír, hiszen akut rejecciónban lévő betegek jó részét ennél alacsonyabb neutrophilia jellemezte. Érdekes megfigyelés, hogy a stabil betegeknél, akiknél később BOS fejlődött ki, magasabb volt a neutrophil arány. Eredményeink nem meglepőek, más munkacsoport is magasabb BALF neutrophil arányokat észlelt azokban a betegeknél, akiknél CLAD, ezen belül BOS fejlődött ki (22, 23). *Speck* és munkatársai összefoglaló közleményükben kiemelik, hogy a korai és újabb tanulmányok eredményei nehezen összevethetőek a makrolid hatóanyagú antibiotikumok egyre gyakoribb használata miatt (6). Klinikánkon a tüdőtranszplantált betegeknél gyakran használunk azithromycint profilaktikus és immunmoduláns céllal, illetve valamennyi esetben, ha a tüdőfunkció esését a BALF neutrophil szám növekedése kísérte. Ez lehet a kiugró neutrophil eredmények elmaradásának legvalószínűbb oka.

A korábbi vizsgálatok többsége magasabb lymphocytá arányokat írt le akut rejección során (15

–17, 24, 25), bár az adatok itt is ellentmondásosak (19). Bár a BALF lymphocytosis a vizsgálatokban konzekvens, jelentős átfedéseket tapasztaltak az akut rejección mutató és a kontroll csoportok között (6). Vizsgálatunkban a lymphocytá arány nem volt szignifikánsan eltérő egyik akut kórképet tekintve sem, sőt a lymphocytosis ( $>20\%$ ) tendenciájában a stabil csoporton belül volt leggyakoribb. A negatív eredmények pontos magyarázata nem tisztázott, feltehetőleg a markáns immunszuppresszív terápia állhat a háttérben, illetve az a klinikai gyakorlat, hogy amennyiben a tüdőfunkció esését a BALF minta lymphocytosis kísérte, úgy sok esetben montelukast kezelés került bevezetésre a korábbi irodalmi adatok alapján. Az alemtuzumab terápia nem magyarázza ezt, hiszen nem találtunk különbséget az ezzel a gyógyszerrel indukción átesett és indukcióban nem részesült betegek között. Érdekes, hogy a lymphocytá arány szignifikánsan, közel kétszeresére nőtt egy évvel a transzplantációt követően. Adataink rávilágítanak arra, hogy a BALF normálértékek megadásánál ezt a változást figyelembe kell venni. Ezeket a megfigyeléseket alátámasztja a *Speck* közelmúltban publikált közleménye, aki a lymphocytá arányok interpretálását a transzplantációt követő időtől tette függővé (6).

Több vizsgálatban is magasabb BALF eosinophil arányt mértek akut rejección során (14, 15, 17, 21). Hasonlóan a többi sejtfrakcióhoz, az eredmények itt sem koherensek (16, 20, 26). Vizsgálatunkban a legalább 1 évvel operációt követően levett mintákban az eosinophilia egyszerre utalt akut rejecciónra és infekciónra. Ezek az eredmények nem meglepőek, hiszen tüdőtranszplantált betegeknél eosinophilia jellemezheti az akut fertőzést is (27).

A különböző centrumokban a transzplantációhoz vezető betegségek aránya variabilitást mutathat. A feldolgozott hazai betegcsoportban a nemzetközi trendekhez képest a CF-es betegek felül, a COPD-s alul voltak reprezentálva. Felmerült, hogy ennek szerepe lehet az eltérő adatokban, ugyanakkor vizsgálatunk eredményei ezt cáfolták. Érdekes megfigyelés, hogy a stabil, IPF alapbetegségben szenvedő transzplantáltak mintáit szignifikánsan

gyakrabban jellemezte normális sejtkép. Összességében ugyanakkor a BALF citológiai interpretálásánál nem kell figyelembe venni az alapbetegséget.

Vizsgáltuk, hogy a különböző sejtfrakciók egymással milyen összefüggésben vannak. Tekintettel arra, hogy sejtarányokról beszélünk, nem meglepő, hogy a macrophagok aránya fordítottan függött össze a lymphocyták és granulocyták arányaival. Érdekes ugyanakkor, hogy az akut rejección belül nem találtunk összefüggést a granulocyták és lymphocyták között. Ez alátámaszthatja azt a nézetet, hogy abnormális sejtarányok egymástól függetlenül is akut rejecciónra utalnak (6). Ezzel összefüggenek az adataink is, miszerint az abnormális sejttözszelet az akut rejección belül volt tendenciaszerűen a leggyakoribb. Infekció során a neutrophil arány szignifikánsan összefüggött az eosinophil aránnyal. Sem a gombás, sem a vírusos fertőzések nem jártak eltérő sejtarány összetétellel. Bár teoretikusan a gombás fertőzések eosinophiliával, a vírusos infekciók lymphocytosissal járnak, eredményeink azt mutatják, hogy infekció esetén a sejtfrakciók önálló vizsgálata nem ad támpontot az etiológiát tekintve. Ezt alátámasztva, eosinophilia tüdőtranszplantált betegeknel egyaránt jelenthet bakteriális, virális vagy gombás fertőzést is (27).

A vizsgálat adatait kellő kritikával kell illetni. Stabil állapotúnak tekintettük a betegeket, ha a TBTB-ből nem igazolódott akut rejección, a BALF-ből nem tenyésztett kórokozó és a CMV antigenemia negatív volt. Ugyanakkor ezen vizsgálatok negatív prediktív értéke nem 100%, így felmerülhet, hogy néhány esetben tévesen feltételeztük stabil állapotúnak a beteget. A BAL mintavételezéséhez használt instillált folyadékmennyiség (120 ml) a nemzetközi ajánlások alsó tartományába esik (13). Feltételezhető, hogy nagyobb folyadékmennyiség beadása a distalis, alveolaris teret jobban reprezentálná. Másrészt, az előzőtől nem teljesen függetlenül, a minták döntő többségében (92%) a bronchialis epithel arány meghaladta a kívánt 5%-os értéket (13). A diszkrepanciát a nemzetközi irodalomban tapasztaltakkal ezen metodikai különbségek is magyarázhatják. Tekintettel arra, hogy a mintavételben, a feldolgozásban

és az analízis során is különböző személyek vettek részt, felmerül az ebből származó hiba esélye. Ezeket a faktorokat ebben a közleményben nem vetjük figyelembe. Ki kell emelnünk a vizsgálat nagy esetszámát, mint a tanulmány erősségét. Mivel a fent leírt technikai faktorok konzekvensen voltak jelen, adataink megfelelően reprezentálják a centrumunkban követett tüdőtranszplantált betegekben történő különböző eseményeket. Vizsgálatunk retrospektív. Az eredményeink pontosságát egy független prospektív kohorszban történő validálás határozhatná meg.

Fontos megjegyezni, hogy interstitialis tüdőbetegségekhez hasonlóan (13) a BALF citológiai összetételének vizsgálata korlátozottan diagnosztikus értékű. Az akut és krónikus kórképektől függetlenül az esetek többségében a BALF normális sejtképet mutat mind a nemzetközi összevetésben (6, 7), mind a saját adatainkat tekintve. Tüdőtranszplantáltakat vizsgálva a BALF citológiai analízise negatív prediktív értéke kifejezetten rossz, akut állapotromlás esetén sem nyújt döntő támpontot az infekció és az akut rejección elkülönítésében. Perzisztensen abnormális sejtprofil ugyanakkor CLAD-ra utalhat (22).

Összességében vizsgálatunk alapján kimondható, hogy a BALF minták rutin klinikai analízise limitált értéket hordoz a klinikai döntéshozatalban a tüdőtranszplantált betegek követése során. A minták többségénél normális sejtarány észlelhető az akut gyulladáshoz kórképek esetén is, ezért a BAL negatív prediktív értéke nagyon alacsony. Megállapítható, hogy az egy éven belül és azt követően levett minták eltérő sejtprofil mutatnak, melyet figyelembe kell venni az interpretálásnál. A BALF lymphocyták arány klinikai relevanciát nem mutat. Eosinophilia (>3,6%) egy éven túli mintákban utal akut gyulladáshoz kórképre. Stabil mintákban neutrophilia volt észlelhető azoknál, akiknél 12 hónapon belül BOS alakult ki. Akut állapotrosszabbodást mutató betegeknel magas neutrophilia (>23%) segíthet az akut gyulladáshoz kórképek (akut rejección vs. infekció) elkülönítésében, kritikus esetben (a hisztológia késlekedése esetén) terápiás iránymutató lehet.

## Köszönetnyilvánítás

A vizsgálatokat a Magyar Pulmonológiai Alapítvány támogatta. A publikáció a Bolyai János Kutatási Ösztöndíj (dr. Bikov András részére) támogatásával készült. A szerzők külön köszönetet mondanak a mintagyűjtésben és feldolgozásban közreműködő orvosoknak, illetve bronchológiai és laboratóriumi asszisztenseknek.

## IRODALOMJEGYZÉK

1. Arcasoy SM, Kotloff RM. Lung transplantation. *The New England journal of medicine* 1999; 340:1081-91.
2. Yusen RD, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Dipchand AI, Goldfarb SB, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-second Official Adult Lung and Heart-Lung Transplantation Report–2015; Focus Theme: Early Graft Failure. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 2015; 34:1264-77.
3. Trulock EP, Christie JD, Edwards LB, Boucek MM, Aurora P, Taylor DO, et al. Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-fourth official adult lung and heart-lung transplantation report-2007. *J Heart Lung Transplant* 2007; 26:782-95.
4. Sharples LD, McNeil K, Stewart S, Wallwork J. Risk factors for bronchiolitis obliterans: a systematic review of recent publications. *J Heart Lung Transplant* 2002; 21:271-81.
5. Orens JB, Garrity ER, Jr. General overview of lung transplantation and review of organ allocation. *Proceedings of the American Thoracic Society* 2009; 6:13-9.
6. Speck NE, Schuurmans MM, Murer C, Benden C, Huber LC. Diagnostic value of plasma and bronchoalveolar lavage samples in acute lung allograft rejection: differential cytology. *Respiratory research* 2016; 17:74.
7. Tiroke AH, Bewig B, Haverich A. Bronchoalveolar lavage in lung transplantation. State of the art. *Clinical transplantation* 1999; 13:131-57.
8. Stewart S, Fishbein MC, Snell GI, Berry GJ, Boehler A, Burke MM, et al. Revision of the 1996 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of lung rejection. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 2007; 26:1229-42.
9. Diette GB, Wiener CM, White P, Jr. The higher risk of bleeding in lung transplant recipients from bronchoscopy is independent of traditional bleeding risks: results of a prospective cohort study. *Chest* 1999; 115:397-402.
10. Bikov A, Lazar Z, Horvath I. Established methodological issues in electronic nose research: how far are we from using these instruments in clinical settings of breath analysis? *Journal of breath research* 2015; 9:034001.
11. Kovacs D, Bikov A, Losonczy G, Murakozy G, Horvath I. Follow up of lung transplant recipients using an electronic nose. *Journal of breath research* 2013; 7:017117.
12. Paggiaro PL, Chanez P, Holz O, Ind PW, Djukanovic R, Maestrelli P, et al. Sputum induction. *The European respiratory journal Supplement* 2002; 37:3s-8s.
13. Meyer KC, Raghu G, Baughman RP, Brown KK, Costabel U, du Bois RM, et al. An official American Thoracic Society clinical practice guideline: the clinical utility of bronchoalveolar lavage cellular analysis in interstitial lung disease. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2012; 185:1004-14.
14. Reynaud-Gaubert M, Thomas P, Gregoire R, Badier M, Cau P, Sampol J, et al. Clinical utility of bronchoalveolar lavage cell phenotype analyses in the postoperative monitoring of lung transplant recipients. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery* 2002; 21:60-6.
15. Tikkanen J, Lemstrom K, Halme M, Pakkala S, Taskinen E, Koskinen P. Cytological monitoring of peripheral blood, bronchoalveolar lavage fluid, and transbronchial biopsy specimens during acute rejection and cytomegalovirus infection in lung and heart-lung allograft recipients. *Clinical transplantation* 2001; 15:77-88.
16. Vanaudenaerde BM, Dupont LJ, Wuyts WA, Verbeke EK, Meys I, Bullens DM, et al. The role of interleukin-17 during acute rejection after lung transplantation. *The European respiratory journal* 2006; 27:779-87.
17. Tikkanen J, Lemstrom K, Halme M, Pakkala S, Taskinen E, Koskinen P. Detailed analysis of cell profiles in peripheral blood, bronchoalveolar lavage fluid, and transbronchial biopsy specimens during acute rejection and CMV infection in lung and heart-lung allograft recipients. *Transplantation proceedings* 1999; 31:163-4.
18. Zeevi A, Rabinowich H, Paradis I, Gryzan S, Dauber JH, Hardesty RL, et al. Lymphocyte activation in bronchoalveolar lavages from heart-lung transplant recipients. *Transplantation proceedings* 1988; 20:189-92.
19. Shennib H, Lee AG, Serrick C, Giaid A. Altered nonspecific lymphocyte cytotoxicity in bronchoalveolar lavage of lung transplant recipients: can it be useful in monitoring rejection or infection? *Transplantation* 1996; 62:1262-7.
20. Laan M, Linden A, Riise GC. IL-16 in the airways of lung allograft recipients with acute rejection or obliterative bronchiolitis. *Clinical and experimental immunology* 2003; 133:290-6.
21. Riise GC, Schersten H, Nilsson F, Ryd W, Andersson BA. Activation of eosinophils and fibroblasts assessed by eosinophil cationic protein and hyaluronan in BAL. Association with acute rejection in lung transplant recipients. *Chest* 1996; 110:89-96.
22. Verleden SE, Rutten D, Vandermeulen E, Vaneylen A, Dupont LJ, Van Raemdonck DE, et al. Bronchiolitis obliterans syndrome and restrictive allograft syndrome: do risk factors differ? *Transplantation* 2013; 95:1167-72.
23. Neurohr C, Huppmann P, Samweber B, Leuschner S, Zimmermann G, Leuchte H, et al. Prognostic value of bronchoalveolar lavage neutrophilia in stable lung transplant recipients. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 2009; 28:468-74.
24. De Hoyos A, Chamberlain D, Schwartzman R, Ramirez J, Kesten S, Winton TL, et al. Prospective assessment of a standardized pathologic grading system for acute rejection in lung transplantation. *Chest* 1993; 103:1813-8.
25. Greenland JR, Jewell NP, Gottschall M, Trivedi NN, Kukreja J, Hays SR, et al. Bronchoalveolar lavage cell immunophenotyping facilitates diagnosis of lung allograft rejection. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2014; 14:831-40.
26. Hohlfeld JM, Tiryaki E, Hamm H, Hoymann HG, Krug N, Haverich A, et al. Pulmonary surfactant activity is impaired in lung transplant recipients. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1998; 158:706-12.
27. Mogayzel PJ, Jr., Yang SC, Wise BV, Colombani PM. Eosinophilic infiltrates in a pulmonary allograft: a case and review of the literature. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 2001; 20:692-5.