

IMMUNOLÓGIAI SZEMINÁRIUMOK

IMMUNOLÓGIAI SZEMINÁRIUMOK

Szerkesztette

Fülöp András Kristóf

Írták

Pállinger Éva

Buzás Edit

Falus András

Nagy György

Holub Marianna Csilla

Tóth Sára

Kőhidai László

Pál Zsuzsanna

Szakmailag ellenőrizte

Buzás Edit

Falus András



Semmelweis Egyetem • Budapest, 2012

© Fülöp András Kristóf, 2012

Kézirat lezárva: 2012. május 31.

ISBN 978-963-9129-81-8

Semmelweis Egyetem

Nemzeti Fejlesztési Ügynökség
www.ujszachenyiterv.gov.hu
06 40 638 638



A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

A kiadásért felel a: Semmelweis Egyetem

Felelős szerkesztő: Fülöp András Kristóf

Műszaki szerkesztő: Ádám Adrienn

Terjedelem: 223 oldal

TARTALOM

1. BEVEZETÉS ÉS ALAPOK (PÁLLINGER ÉVA)	10
1.1. Immunológiai alapfogalmak	10
1.1.1. Veleszületett és szerzett immunitás	10
1.1.2. Mit ismer fel az immunrendszer?	11
1.1.3. Milyen struktúrák révén ismerik fel az immunrendszer sejtjei az antigéneket?	11
1.1.3.1. Mintázat felismerő receptorok (pattern recognition receptors: PRR)	11
1.1.3.2. T sejt receptor (TCR)	12
1.1.3.3. B sejt receptor BCR	12
1.1.4. Milyen következményei lehetnek az antigének felismerésének?	12
1.1.5. Lokális immunválasz	13
1.1.6. A felismerés és a válasz feltétele a találkozás	14
1.1.6.1. Limfocita recirkuláció	14
1.2. Az immunrendszer szervei	15
1.2.1. Nyirokcsomó	15
1.2.1.1. A nyirokcsomót alkotó sejttípusok	16
1.2.1.1.1. Órszemnyirokcsomó	16
1.2.2. Csontvelő	17
1.2.3. Lép	17
1.2.4. Timusz	18
1.2.5. Nyálkahártya asszociált nyirokcsőzövetek: MALT	19
1.3. Az immunrendszer sejtjei	20
1.3.1. Az immunrendszer sejtjeinek vizsgálata	20
1.3.1.1. Vérvék és csontvelő kenet vizsgálatok	21
1.3.1.2. Citokémiai reakciók	21
1.3.1.2.1. PAS reakció	21
1.3.1.2.2. Nem-specifikus észteráz reakció	21
1.3.1.2.3. Áramlási citometria	21
1.3.1.3. Immunhisztokémia	22
1.3.1.4. Genetikai vizsgálatok	22
1.4. Milyen módon kommunikálnak az immunrendszer sejtjei?	22
2. ANTITEST-ANTIGÉN KÖLCÖNCHATÁSON ALAPULÓ MÓDSZEREK I. (BUZÁS EDIT)	24
2.1. A diagnosztikus célra használt antitestek jellemzői	24
2.1.1. Alapfogalmak	26
2.1.2. Az antitestek jelölési lehetőségei	27
2.2. Módszerek	27
2.2.1. Áramlási citometria	27
2.2.2. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)	27
2.2.2.1. Indirekt ELISA reakció	29
2.2.2.2. Szendvics ELISA	29
2.2.2.3. Kompetitív ELISA	30
2.2.2.4. Mire kell figyelni az ELISA kivitelezése során? Mi okozhat problémát?	31
2.2.3. ELFA (Enzyme Linked Immunofluorescent Assay)	31
2.2.4. ELISPOT	32
2.2.5. Immuno blot (Western blot)	33
2.2.6. Radioaktív jelölésen alapuló módszerek	35
2.2.6.1. Radioimmunoassay (RIA)	35
2.2.6.2. Immunoradiometric assay (IRMA)	36

2.2.7.	Immuncitokémia (Immunhisztokémia).....	36
2.2.7.1.	Direkt módszer.....	37
2.2.7.2.	Indirekt módszer.....	37
2.2.7.3.	Kontrollok.....	38
2.2.7.4.	PAP Method (peroxidase anti-peroxidase módszer).....	38
2.2.7.5.	Avidin-Biotin Complex (ABC) módszer.....	38
2.2.7.6.	Fluoreszcencia mikroszkóp és lézer konfokális mikroszkópia.....	38
2.2.8.	Lateral flow tesztek.....	39
2.2.8.1.	Multiplex immunoassay rendszerek.....	41
2.3.	Az alkalmazandó immunoassay kiválasztásának szempontjai.....	41
2.4.	Feladatok.....	42
2.4.1.1.	Lateral flow assay.....	42
2.4.1.2.	Indirekt immuncitokémiai preparátum tanulmányozása.....	43

3. ANTITEST-ANTIGÉN KÖLCSONHATÁSON ALAPULÓ MÓDSZEREK II.: IMMUNSZEROLÓGIA (FALUS ANDRÁS, NAGY GYÖRGY)..... 44

3.1.	Immunkomplex és immunprecipitátum.....	44
3.2.	Kétdimenziós immundiffúzió.....	48
3.3.	Szérum elektroforézis.....	49
3.4.	Immunelektroforézis és immunofixáció.....	51
3.5.	Rakéta elektroforézis.....	53
3.6.	Kétdimenziós immunelektroforézis.....	53
3.7.	Turbidimetria és nephelometria.....	53
3.8.	A szerológiai módszerek alkalmazása.....	54
3.9.	Agglutináció típusai és alkalmazása.....	56
3.10.	Feladatok.....	58

4. A KOMPLEMENT RENDSZER GYAKORLATI VONATKOZÁSAI (BUZÁS EDIT)..... 59

4.1.	Bevezetés.....	59
4.2.	A komplement rendszer működésének vizsgálata.....	60
4.2.1.	A CH50 érték és mérése.....	61
4.2.2.	Liposzóma immunoassay.....	62
4.2.3.	Az alternatív komplement aktiváció vizsgálata.....	64
4.2.4.	A lektin út vizsgálata.....	64
4.2.5.	Komplement konvertáz assay (CCA).....	64
4.2.6.	Komplement fehérjék kimutatására alkalmas egyéb eljárások.....	64
4.2.7.	Egyéb, komplementtel kapcsolatos módszerek.....	66
4.2.8.	A komplement rendszer elemeinek vizsgálata különböző kórállapotokban.....	67
4.2.8.1.	Esetismertetés: HANO.....	67
4.3.	Feladatok.....	69

5. ÁRAMLÁSI CITOMETRIA (PÁLLINGER ÉVA)..... 70

5.1.	Bevezetés.....	70
5.2.	Az áramlási citométer.....	71
5.2.1.	Képi megjelenítés (data display).....	73
5.2.1.1.	Hisztogram.....	73
5.2.1.2.	Felhőkép (dot plot).....	75
5.2.1.3.	Kinetikai mérések (time-based collection).....	76
5.3.	A FACS eredmények értelmezése.....	76
5.3.1.	Méret és granuláltság.....	76
5.3.2.	Fluoreszcencia.....	77

5.4.	Mintaelőkészítés diagnosztikus FACS mérésekhez.....	80
5.4.1.	Sejtszuspenzió készítés.....	80
5.4.2.	Eritrolízis (erytholysis).....	80
5.4.3.	Fluoreszcens jelölés.....	80
5.4.3.1.	Közvetlen jelölés.....	81
5.4.3.2.	Immunfenotipizálás.....	81
5.5.	A áramlási citometria alkalmazási területei.....	82
5.5.1.	Metodika központú felosztás.....	83
5.5.1.1.	Fehérje kimutatások.....	83
5.5.1.2.	Szintézis vizsgálatok.....	83
5.5.1.3.	Enzimaktivitás mérések.....	84
5.5.1.4.	Nukleinsav vizsgálatok.....	85
5.5.1.5.	Sejtalkotórészek vizsgálata.....	85
5.5.1.6.	Funkcionális vizsgálatok.....	85
5.5.1.7.	Molekulák relatív távolságának meghatározása: FRET.....	86
5.5.1.8.	Szolubilis molekulák mérése (mikrogyöngy-alapú detektáló rendszerek).....	86
5.5.1.9.	Abszolút sejtszám meghatározás.....	87
5.5.1.10.	Sejtszeparálás.....	88
5.5.2.	Kórképek szerinti felosztás.....	88
5.5.2.1.	Malignus hematológiai betegségek.....	88
5.5.2.1.1.	Diagnosztika és differenciál diagnosztika.....	88
5.5.2.1.2.	Minimális reziduális betegség diagnosztikája.....	89
5.5.2.1.3.	Recurrens hematológiai betegségek kimutatása.....	89
5.5.2.1.4.	Terápia iránti érzékenység vizsgálata (MDR = multidrug resistance).....	89
5.5.2.2.	Immunhiányos kórképek.....	91
5.5.2.2.1.	Fenotípus vizsgálatok az immunhiányos állapotok diagnosztikájában és nyomon követésében.....	91
5.5.2.3.	Autoimmun betegségek.....	91
5.5.2.3.1.	Autoimmun betegségek diagnosztikája.....	91
5.5.2.3.2.	Az autoimmun betegségek aktivitásának nyomon követése.....	92
5.5.2.4.	Szervtranszplantáció.....	92
5.5.2.4.1.	HLA-asszociáció.....	92
5.5.2.5.	Fertőzések nyomonkövetése.....	92
5.6.	Minőségellenőrzés (quality control).....	94
5.7.	Laboratóriumi normál értékek.....	94

6. IMMUNIZÁLÁS (BUZÁS EDIT) 95

6.1.	Immunizálás.....	95
6.1.1.	Az immunizálás célja és gyakorlati kivitelezése.....	95
6.1.2.	Az adjuvánsok, szerepük és formulázásuk.....	96
6.1.3.	Az immunizálás hatékonyságát befolyásoló tényezők.....	97
6.1.4.	Antigének és epitópok funkcionális csoportosítása.....	97
6.1.5.	Az oltás módja.....	97

7. VAKCINÁCIÓ (HOLUB MARIANNA CSILLA) 99

7.1.	Aktív vakcinálás.....	100
7.1.1.	Az aktív vakcináció jelentős részében elsődleges antitest választ vált ki az oltóanyag.....	100
7.1.1.1.	A T-sejtes memória kialakulása előfeltétele a hatékony T-dependens B-sejt válasznak.....	103
7.1.2.	Az antitest választ kiváltó vakcináció mellett bizonyos esetekben a sejt-mediálta immunválasz kialakítása a cél.....	103
7.1.2.1.	A T-memóriasejtek típusai.....	105
7.2.	Életkorfüggő oltási stratégiák a B-sejt repertoár életkor függő különbözősége miatt.....	107
7.2.1.	Miért okoz a vakcináció problémákat csecsemőkorban?.....	108
7.2.2.	Oltási stratégiák csecsemők és idősek esetén.....	108

7.3.	A vakcinák típusai	109
7.4.	A vakcinafejlesztés irányai	110
7.4.1.	Jelenlegi vakcinák tökéletesítése	110
7.4.2.	Biotechnológiai vakcinafejlesztés	112
7.4.3.	Új vakcinák fejlesztése	114

8. SEJTTENYÉSZTÉS (TÓTH SÁRA)..... 116

8.1.	A sejttenyésztés definíciója, típusai, formái	116
8.2.	A sejttenyésztés környezeti feltételei	117
8.3.	A sejtszám változása és sejtszámolás	119
8.4.	Sejtszeparálás és szelekció	121
8.5.	A sejttenyészetek felhasználása	123
8.5.1.	Plating efficencia meghatározása	124
8.5.2.	Sejtproliferáció/szaporodóképesség meghatározás	124
8.5.3.	Citotoxicitás mérés	125
8.5.4.	A monoklonális antitestek gyártása	125
8.6.	Speciális tenyésztési típusok	126
8.7.	Szuszpenziós tenyészetek sejteinek vizsgálata	127
8.8.	A sejttenyésztés alkalmazási lehetőségei	129

9. AZ IMMUNSEJTEK MIGRÁCIÓJA, HOMING ÉS GYULLADÁSOS EXTRAHAZÁRÁS (KŐHIDAI LÁSZLÓ)..... 130

9.1.	Bevezetés	130
9.2.	A sejtmigráció fő formái	130
9.3.	A kemotaxis kiváltó molekulák	132
9.4.	Kemotaxis receptorok	133
9.5.	Az emberi szervezet motilitást mutató sejtei és mozgásformáik	134
9.6.	Sejtmotilitás és az immunválasz	135
9.6.1.	Limfociták transzendentális migrációja	135
9.6.2.	Dendritikus sejtek migrációs útvonalai	137
9.7.	Sejtmotilitás (kemotaxis) mérésének módszerei	138
9.7.1.	Reverzibilis rendszerek	139
9.7.2.	Irreverzibilis rendszerek	141
9.7.3.	In vivo technikák	143
9.7.4.	Legújabb technikák	144
9.7.5.	Egyéb migrációvizsgálathoz kapcsolódó eljárás	146
9.8.	Kérdések – Feladatok	147

10. AUTOANTITESTEK VIZSGÁLÓ MÓDSZEREI, HLA TIPIZÁLÁS (NAGY GYÖRGY, PÁL ZSUZSANNA) 149

10.1.	Autoantitestek és azok vizsgáló eljárásai	149
10.1.1.	Az autoantitestek keletkezése, jellemzői	149
10.1.2.	Autoimmun betegségek jellemzői	151
10.1.2.1.	A systemas lupus erythematosus (SLE)	151
10.1.2.2.	Az ANA	152
10.1.2.3.	A cryoglobulinok és a cryoglobulinok kimutatása	153
10.1.2.4.	Rheumatoid arthritis:	153
10.1.2.5.	Szerv specifikus autoimmun betegségek	155
10.2.	HLA tipizálás	156
10.2.1.	A HLA rendszer nomenklatúrája	156
10.2.2.	Tipizáló módszerek	157
10.2.2.1.	Szerológiai	157

10.2.2.2.	Molekuláris metodikák.....	158
10.2.3.	Szövet és szerv transzplantáció.....	159
10.2.4.	Rheumatoid arthritis genetikai és HLA asszociációja.....	159
10.2.5.	Spondylitis ankylopoetica (SPA, Bechterew-kór)	160

11. AZ IMMUNRENDSZER TÚLMŰKÖDÉSE I.: ALLERGIA (HOLUB MARIANNA CSILLA) 162

11.1.	Az allergiás reakció kialakulása	162
11.1.1.	Az allergia tünetei.....	165
11.1.2.	Az allergiás tünetegyüttes kialakulásáért felelős anyagok	165
11.1.2.1.	A hízósejtből felszabaduló anyagok	166
11.1.2.2.	Receptorok.....	167
11.1.3.	Allergiás keresztreakció	167
11.1.4.	Élelmiszer intolerancia és élelmiszer allergia	168
11.1.5.	Anafilaktoid reakció / Pszeudoallergia.....	169
11.1.5.1.	Gyógyszer kiváltotta pszeudoallergia	169
11.1.5.2.	Élelmiszer kiváltotta pszeudoallergia	170
11.1.5.3.	Fizikai faktorok és érzelmi stressz által kiváltott pszeudoallergia	170
11.1.6.	Napallergia.....	171
11.2.	Az allergia diagnózisa	171
11.3.	Az allergia terápiája:.....	173
11.3.1.	Gyógyszeres terápia	173
11.3.2.	Immunterápia: (hiposzennitizálás/deszennitizálás)	175
11.4.	Feladatok	176
11.4.1.	Allergiás reakció.....	176
11.4.2.	Diagnózis	177
11.4.3.	Terápia.....	177

12. AZ IMMUNRENDSZER TÚLMŰKÖDÉSE II.: II-IV-ES TÍPUSÚ TÚLÉRZÉKENYSÉGI REAKCIÓK (HOLUB MARIANNA CSILLA) 178

12.1.	II. típusú túlérzékenység	178
12.1.1.	Extrinsic antigén által kiváltott II. túlérzékenység (példák)	178
12.1.1.1.	Újszülöttek haemolitikus anémiája	178
12.1.1.2.	Szervátültetéskor fellépő II. típusú túlérzékenység	179
12.1.1.3.	Gyógyszer által kiváltott II. típusú túlérzékenység	179
12.1.2.	Intrinsic antigén – Autoantitest komplex kialakulása következtében kiváltott betegségek (példák).....	179
12.1.2.1.	Goodpasture szindróma	179
12.1.2.2.	Myasthenia gravis (MG)	180
12.1.2.3.	Basedow-kór	180
12.1.3.	Diagnózis	180
12.1.4.	Terápia.....	181
12.2.	III. típusú hiperszenzitivitás	181
12.2.1.	Lokális III. hiperszenzitivitásra jellemző példabetegség	182
12.2.2.	Akut szisztémás III. hiperszenzitivitásra példabetegség	183
12.2.3.	Krónikus szisztémás III. hiperszenzitivitásra példabetegség.....	183
12.2.4.	Terápia.....	183
12.3.	IV. típusú hiperszenzitivitás – késői típusú túlérzékenység.....	184
12.3.1.	Késői típusú túlérzékenység bőrteszt.....	184
12.3.2.	Kontakt túlérzékenység / kontakt dermatitisz	185
12.3.3.	Glutén szenzitív enteropátia.....	186
12.3.4.	Terápia.....	187

13. IMMUNOLÓGIAI TERÁPIÁK (NAGY GYÖRGY, PÁLLINGER ÉVA, PÁL ZSUZSANNA).....	188
13.1. Alapfogalmak	188
13.2. Célzott molekuláris terápia (CMT, targeted molecular therapy, targeted therapy)	189
13.2.1. Irányított célbajuttatás	189
13.2.1.1. Célbajuttatás monoklonális ellenanyagokkal.....	190
13.2.1.2. Célbajuttatás peptidekkel	192
13.2.1.3. Kemotaktikus célbajuttatás (chemotactic drug targeting)	192
13.3. Immunterápia	192
13.3.1. Aktív immunterápia	192
13.3.2. Preventív (profilaktikus) vakcinák.....	192
13.3.3. Terápiás vakcinák	193
13.3.3.1. A vakcinák hatékonyságának növelése	193
13.3.3.1.1. Adjuvánások	193
13.3.3.1.2. Az APC funkció fokozása.....	194
13.3.3.1.3. A citotoxikus T sejtek működésének fokozása	194
13.3.3.2. Citokinek az aktív immunterápiában	194
13.3.3.3. Tolerancia indukció	195
13.3.3.4. Sejt-alapú immunterápiák	195
13.3.3.4.1. A tumor ellenes effektor választ serkentése.....	195
13.3.3.4.2. Bispecifikus antitestek alkalmazása	196
13.3.3.4.3. A tumor indukálta immuntolerancia a gátlása	196
13.4. Passzív immunoterápia	196
13.4.1. Monoklonális ellenanyagok a terápiában	196
13.4.1.1. A monoklonális ellenanyagok előállítása	197
13.4.1.2. A monoklonális antitest terápia veszélyei.....	198
13.4.1.3. Monoklonális antitestek a gyógyításban.....	199
13.4.1.3.1. Terápiás antitestek a reumatológiában	199
13.4.1.3.1.1 Rheumatoid arthritis patomechanizmusa, proinflammatorikus citokinek szerepe a betegség patogenezisében.....	199
13.4.1.3.1.2 TNF központi szerepe RA-ben	199
13.4.1.3.1.3 Jelenleg elérhető TNF blokkoló gyógyszerek.....	200
13.4.1.3.1.4 TNF blokkoló gyógyszerek mellékhatásai	200
13.4.1.3.1.5 TNF blokkolás spondylitis ankylopoeticában.....	201
13.4.1.3.1.6 B limfocita deplécio anti CD-20 monoklonális antitesttel	201
13.4.1.3.1.7 T limfocita aktiváció gátlása RA-ben CTLA-4 immunglobulin fúziós protein alkalmazásával	201
14. AZ INFORMATIKA NÉHÁNY IMMUNOLÓGIAI ALKALMAZÁSA (BUZÁS EDIT).....	203
FOGALOMTÁR (BUZÁS EDIT)	209
RÖVIDÍTÉSEK	220

1. BEVEZETÉS ÉS ALAPOK

(PÁLLINGER ÉVA)

Környezetünk nem steril, azonban az ember és a patogénekben gazdag környezete között egyensúlyi állapot van. Ennek az egyensúlyi állapotnak a fenntartásáért az immunrendszer a felelős. Az immunrendszer feladata a szervezet külső és belső károsító hatásokkal szembeni védelme, az immunválasz pedig nem más, mint a védekezés folyamata. A technikai fejlődés következtében megváltozott életkörülmények immunrendszerünket hatalmas kihívás elé állítják: alkalmazkodnia kell pl. a nagyvárosi környezet és az utazási szokások átalakulása miatt megváltozott patogén „palettához” és expozícióhoz (mutáns törzsek, gyógyszer rezisztens törzsek, stb.).

Az immunrendszer azon szervrendszereink egyike, mely működésének a célja a szervezet identitásának fenntartása. Feladatát azért tudja ellátni, mert képes a szervezet saját anyagait az idegen anyagoktól, ill. a szervezetre veszélyes anyagokat a veszélytelenektől megkülönböztetni. Az idegen anyag felismerése immunválaszt vált ki, ami azonban az idegen anyag természetétől, ill. az aktuális környezeti és élettani hatásoktól függően effektor válaszban (az idegen anyag eliminálásában), immuntolerancia, vagy bizonyos esetekben immunológiai „némaság”, azaz ignorancia kialakulásában nyilvánulhat meg.

Az immunrendszer legfontosabb jellemzői: a specificitás, a szenzitivitás, a szelektivitás és az immunológiai memória.

1.1. Immunológiai alapfogalmak

1.1.1. Veleszületett és szerzett immunitás

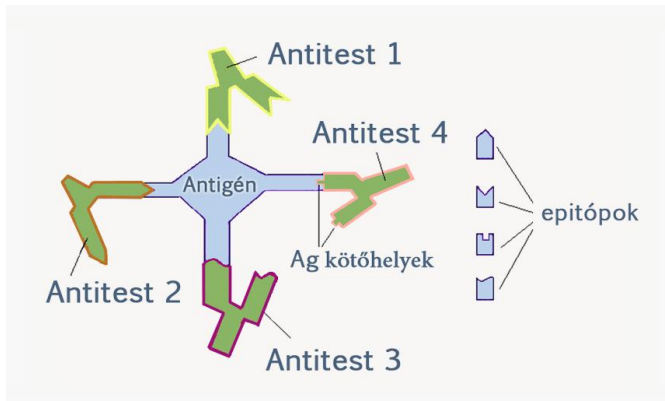
Az immunrendszer működése 2 pilléren nyugszik: az egyik a veleszületett, a másik a szerzett immunitás. A veleszületett (természetes; nem-specifikus) immunválasz gyors, a kórokozók behatolása után azonnal, percek-órán belül kialakul. Nem antigén-specifikus reakció: a kórokozók azonosítása széles patogén-specifitású mintázat-felismerő receptorok segítségével történik (PAMP-PRR). Kialakulásáért az idegen anyagokat és kórokozókat bekebelezni képes szöveti falósejtek (makrofágok, granulociták), a dendritikus sejtek, a természetes ölősejtek (natural killer, NK), valamint a különböző testnedvekben jelenlévő komplement rendszer működése a felelős. Lezajlását nem követi immunológiai memória kialakulása.

Ezzel ellentétben a szerzett (adaptív; specifikus) immunitásra jellemző, hogy késleltetett: a válaszreakció a kórokozók megjelenése után csak napokkal, ill. hetekkel mutatható ki. Antigén-specifikus reakció, melyet a szűk patogén-specifitású specifikus antigén-receptorok (BCR, TCR) aktiválódása indít el. Lezajlását immunológiai memória kialakulása követi. Legfontosabb sejt résztvevői a T és a B limfociták.

Az immunválasz az idegen anyag (sejt / kórokozó) felismerését és a felismerést követő válaszreakciót jelenti.

1.1.2. Mit ismer fel az immunrendszer?

Az immunrendszer antigéneket ismer fel. Antigénnek nevezünk minden struktúrát, amely képes immunválaszt kiváltani. Az antigén molekula azon részlete, amely a specifikus receptorok által felismerésre kerül, az **antigén determináns**, vagy más néven **epitóp**. Egyetlen antigén több epitópot is tartalmazhat. Az epitópok feltérképezésének diagnosztikus és terápiás jelentősége van. (1.1. ábra) Ha az antigén a saját szervezet struktúrája, akkor **autoantigén**ről, ha ugyanazon faj egy másik, genetikailag eltérő egyedéből származik, akkor **alloantigén**ről, ha pedig másik faj eredetű, akkor **xenoantigén**ről beszélünk.



1.1. ábra: Antigén és epitópok

1.1.3. Milyen struktúrák révén ismerik fel az immunrendszer sejtjei az antigéneket?

Az antigének felismerésére alkalmas receptorokat nagy általánosságban 2 csoportba sorolhatjuk: 1) a patogének egyes csoportjaira általánosan jellemző struktúrák felismerésére alkalmas mintázat felismerő receptorokra (PRR), és 2) az egyedi kórokozók felismerésére alkalmas specifikus receptorokra.

A mintázat felismerő receptorok elsősorban a nem specifikus immunrendszer sejtjein találhatók meg, míg a specifikus antigénreceptorok a T- és a B limfociták felszínén (TCR és BCR). Fontos kiemelni, hogy minden limfocita csak egy adott antigén egyetlen epitópjának felismerésére alkalmas receptort expresszál.

1.1.3.1. Mintázat felismerő receptorok (pattern recognition receptors: PRR)

A mintázat felismerő receptorok a patogénekre jellemző általános struktúrákat (PAMP = pathogen-associated molecular patterns), és a sejtek stressz hatására kialakuló megváltozott mintázatát (DAMPs = danger-associated molecular patterns) ismerik fel. Patogénnel asszociált struktúra lehet pl. a Gram negatív baktériumok sejtfalának egyik összetevője, az LPS, a mikrobiális nukleinsavak és peptidek, stb.

Stressz indukálta veszély szignált (DAMP) jelenthetnek az intracelluláris fehérjék, pl. a hősokk fehérjék, a HMGB1 (chromatin-associated protein high-mobility group box 1), az extracelluláris mátrix fehérjéi, a húgysav, a kiszabadult DNS, stb. DAMP-ként nagyon sokféle molekula viselkedhet, az adott szöveti reakcióban „megjelenő” molekulák típusát elsősorban a lokális sejtösszetétel határozza meg.

1.1.3.2. T sejt receptor (TCR)

A T limfociták felszínén expresszáldó, valamely antigén egyik peptid epitópját specifikusan felismerő struktúrát T sejt receptornak nevezzük. (Az általánosan elterjedt TCR rövidítés az angol T Cell Receptor kifejezésből származik.) A TCR-on keresztül történő felismerés feltétele az antigén feldolgozása és MHC molekula jelenlétében történő bemutatása. Azokat a sejteket, amelyek képesek az idegen anyagok felvételére, feldolgozására és a T sejtek felé történő bemutatásra, professzionális antigénprezentáló sejteknek (APC) nevezzük. Professzionális APC-k a dendritikus sejtek (DC), a makrofágok (Mf) és a B limfociták. Vannak nem professzionális APC-k is: ezek csak aktiválódásuk után jelenítik meg a felszínükön az antigén bemutatáshoz elengedhetetlen MHC molekulákat. Idetartoznak a fibroblasztok, bizonyos epitel sejtek (pl. a timusz és a pajzsmirigy hámsejtjei), a pancreas béta sejtjei és az endotel sejtek.

1.1.3.3. B sejt receptor BCR

Az aktivált B limfocitákból differenciálódó plazmasejtek által termelt, nagyméretű glikoproteineket **ellenanyag**nak, vagy más néven **antitest**nek, vagy szolubilis **immunglobulinnak** nevezzük. Az ellenanyagok egyaránt jelen vannak a vérben és a biológiai folyadékokban, feladatuk a szervezetbe jutó bakteriális vagy virális antigének megkötése. A B limfociták felszínéhez kötött immunglobulin, mint jelfelismerő, a hozzá kapcsolódó 2 heterodimer molekulával (Ig α -Ig β), mint jeltovábbító, alkotja a BCR-t.

1.1.4. Milyen következményei lehetnek az antigének felismerésének?

Amint azt már korábban összefoglaltuk, az immunrendszer válaszába két útvonalon keresztül valósul meg: a gyorsan kialakuló természetes és a lassabban létrejövő specifikus immunválaszon keresztül.

A specifikus immunválasz lehet ellenanyagok által közvetített (humorális) és sejtközvetített (celluláris). A B sejtek aktivációja az antigén felismerésével indul, amit klonális szaporodás, centroblaszt kialakulás, intenzív mutációkkal járó osztódás és a nagy affinitású receptorral rendelkező B sejtek kisselektálódása követ. Ez után jönnek létre az ellenanyag termelő plazmasejtek és a memóriasejtek.

A T limfociták antigénnel történő találkozása során ugyancsak megfigyelhető a klonális sejtproliferáció és a memória sejtekké történő átalakulás, de emellett a sejtek aktivációja szabályozó fehérjék (citokinek) termelődését és az effektor funkciók beindulását is elindítja. Már itt érdemes megjegyezni, hogy a T és a B limfociták között szoros együttműködés van: a dendritikus sejtek mellett a B sejtek is bemutatják a felismert, felvett és lebontott antigénjeiket MHC-II expressziójuk révén a T sejteknek (professzionális APC-k), ugyanakkor a T sejtek az aktiválódásuk után olyan citokineket is termelnek, amelyek elengedhetetlenek a B limfociták differenciálódásához és funkcionális épségéhez.

Klinikai szempontból lényeges megismerni az aktív és a passzív immunitás fogalmával. **Aktív immunitás** alakul ki, ill. hozható létre, ha a szervezetbe immunogének (patogének: fertőzés vagy

védőoltás) jutnak be. **Passzív immunitást** ezzel szemben egy már immunizált egyed immunológiailag kompetens sejtjeinek és/vagy ellenanyagainak (szérumának) a recipiens szervezetbe juttatásával lehet kiváltani.

1.1.5. Lokális immunválasz

Az immunsejtek sokféleségének és szoros együttműködésüknek a megismerése az orvosi szemlélet kialakulásában nagy jelentőségű. Ezt az immunválasz lokálisan zajló esemény sorozatán keresztül szeretnénk szemléltetni.

A szöveti sérülés területén kórokozók és különféle irritáló ágensek jutnak a szervezetbe. A kérdés természetesen az, hogy kik és hogyan reagálnak erre? A szöveti sérülés az esetek többségében együtt jár az érpalta sérülésével, vagy legalább is az érpalta áteresztő képességének fokozódásával. Ennek következtében a vér alakos elemei és plazma kerül szövetek közé. Az extravazáció mind a sejt, mind a szolubilis elemek működésére hatással van.

A szövetek közé kikerülő vérlemezkék az elsők között aktiválódnak. Aktivációjuk elősegíti az alvadási rendszer beindulását. Ez egyrészt átjárhatatlan és feloldhatatlan fibrinháló kialakulását eredményezi, amely mechanikus akadályt képez a kórokozókkal szemben, másrészt ugyanez a fibrinháló és az aktiválódott trombociták képezik a trombus-alapot is, amely a sérült érpalta elzárására szolgál. Nem szabad azonban elfelejtenünk azt sem, hogy a trombocitákból számos olyan biológiailag aktív anyag szabadul fel, amely a környező sejtek működésére hatással van, tehát szabályozó szerepük is van.

A kikerülő plazma tartalmazza a komplement rendszer elemeit is. Az aktiválódó komplement rendszer sokféle feladatot lát el. A keletkező C3a és C5a fragmensek kemotaktikus hatásúak pl. a neutrofil granulocitákra nézve. A C3b opszonizálja a baktériumokat és ezáltal elősegíti az eliminációjukat. Ugyanakkor számos szöveti immunsejt, a DC-k, a makrofágok, a hízósejtek és granulociták is rendelkeznek C3b – kötő receptorokkal, tehát ezeknek a sejteknek a működését is befolyásolja. Végül, de nem utolsó sorban a komplement aktivációs útvonal végén képződő membrán attack komplex (MAC) direkt citolitikus hatású.

A szövetek közé kijutó neutrofil granulociták elsősorban effektor funkciót látnak el: képesek bekebelezni a kórokozókat, de reaktív oxigén intermedier (ROI) termelésük és proteolitikus enzim kibocsátásuk révén extracellulárisan is pusztítják a bekerült baktériumokat. Természetesen ez szöveti sérüléssel is jár. A keletkező szövettörmelék eltakarításában a makrofágok játszanak szerepet. Fontos azonban tudnunk azt is, hogy a szöveti makrofágok és a dendritikus sejtek a felvett idegen anyagokat képesek bemutatni a többi sejtnak, vagyis antigén prezentáló tulajdonságúak (professzionális APC-k). Ezzel bekerülnek a képbe a limfociták, hiszen a bemutatott antigéneket a limfociták ismerik fel. Tulajdonképpen úgy is fogalmazhatnánk, hogy ezzel összekapcsolódott a nem specifikus és a specifikus immunválasz. Mindez világosan szemlélteti, hogy az immunrendszer sejtjei nagyon szorosan együttműködnek, működésük szabályozza / meghatározza a környező sejtek funkcionális aktivitását és ezáltal, tulajdonképpen bármelyikük kiérdemelheti a megtisztelő karmesteri címet.

1.1.6. A felismerés és a válasz feltétele a találkozás

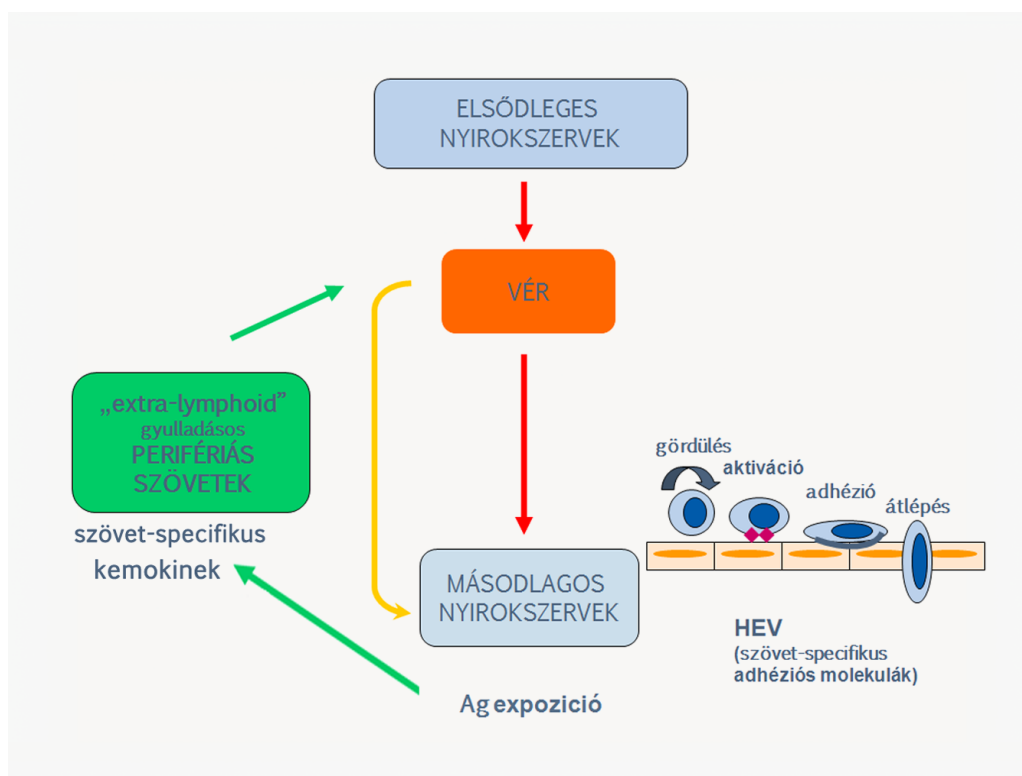
A specifikus immunválasz kialakulásának feltétele, hogy az antigének felismerésére képes limfociták eljussanak az antigénekhez. Ennek érdekében a T és a B limfociták folyamatosan őrzáratoznak. Ez a folyamat a limfocita recirkuláció (homing).

1.1.6.1. Limfocita recirkuláció

A limfocita recirkuláció során a naiv / szűz limfociták (amelyek még nem találkoztak az antigénnel) az elsődleges nyirokszervekből a véráram úján eljutnak a másodlagos nyirokszervekbe / szövetekbe, majd onnan, ha nem történt antigén expozíció, a nyirokutakon keresztül visszajutnak a véráramba és folytatják a járőrözést.

A véráramból történő kilépésük a nyirokszövet magas endotéllel bélelt venuláin (HEV) keresztül a legeredményesebb, de nemcsak a HEV-en keresztül mehet végbe. A folyamatot szövet-specifikus adhéziós molekulák szabályozzák. (lásd TK 3.1. fejezet)

Ha a limfociták a másodlagos nyirokszervekben találkoznak a nekik megfelelő, specifikus antigénnel, akkor aktiválódnak. Aktivációjuk egyrészt sejtproliferációban és effektor sejté történő differenciálódásban nyilvánul meg, másrészt megváltozik a vándorlási képességük is. A vándorlási képesség megváltozása a sejtfelszíni adhéziós molekula mintázat megváltozásának következménye. Ez teszi lehetővé, hogy a szövet-specifikus kemokinek irányítása alatt az extra-limfoid szövetekbe vándoroljanak és közvetlenül a „támadás” helyszínén fejtsek ki effektor feladataikat. (1.2. ábra)



1.2. ábra: Az immunsejtek recirkulációja

1.2. Az immunrendszer szervei

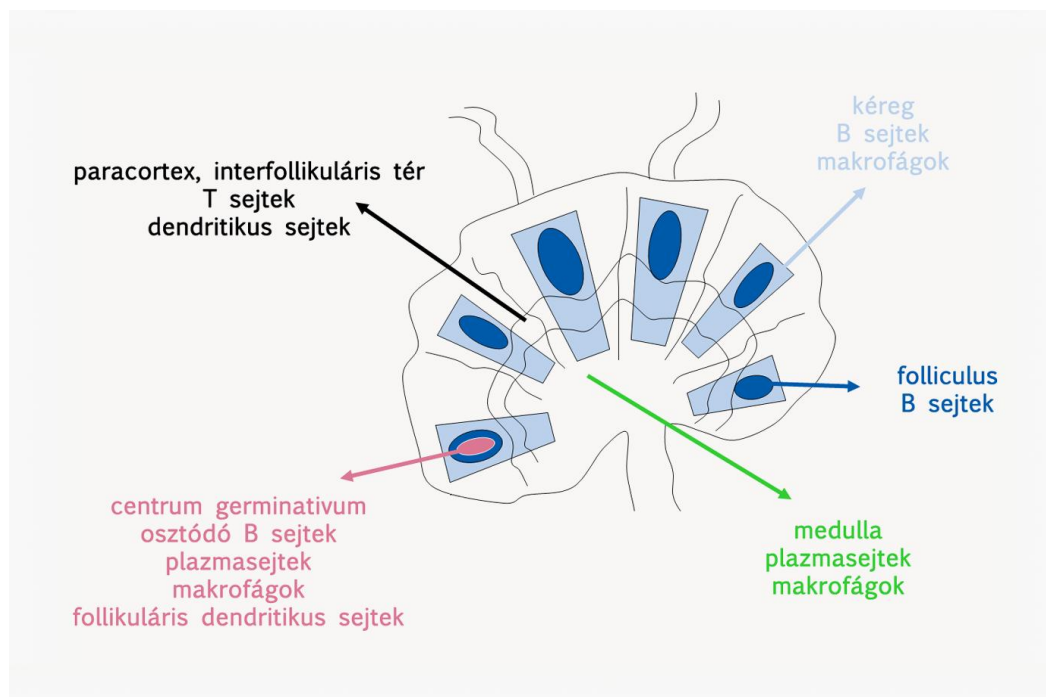
Az immunrendszer, vagy ahogyan korábban nevezték, a nyirokrendszer, az elsődleges (központi) és a másodlagos (perifériás) nyirokszervekből áll. A központi nyirokszervek közé tartozik a csontvelő és a timusz (csecsemőmirigy). Itt képződnek és részben itt differenciálódnak az immunrendszer sejtjei. Ezekben a szervekben történik meg az immunglobulin gének, illetve a TCR gének átrendeződése. Vagyis itt alakulnak ki az antigén felismerésre képes, egyedi, specifikus receptorral rendelkező, érett B- és T limfocita klónok, és itt tanulják meg a limfociták felismerni a saját struktúrákat.

A másodlagos, vagy perifériás nyirokszervek csak részben alkotnak jól körülhatárolt, önálló szervet, többségük a szervezetben testszerte, a kórokozók lehetséges és legvalószínűbb behatolási kapuinak közelében elhelyezkedő nyirokszövet. A perifériás nyirokrendszer része a lép, a féregnyúlvány (vakbél, appendix), a mandulák (tonsilla) és a nyirokcsomók (lymphoglandulae), de idetartoznak a tápcsatorna, a légutak és a húgyivarszervek nyálkahártyájában, ill. a bőrben elhelyezkedő nyirokszövetek is. Ezek a szervek a nyirokerek (vasa lymphatica) útján állnak kapcsolatban egymással. A nyirokerek a periféria felől gyűlnek össze, a fő nyirokerekben egyesülnek (truncus lymphaticus dexter és ductus thoracicus), s végül a vérpályába torkollnak.

Az immunrendszer működésének megértése szempontjából fontos kiemelni, hogy a másodlagos nyirokszervek közé tartoznak a folyamatos őrjáratot végző limfociták és ellenanyagok is.

Röviden összefoglalva tehát: míg az elsődleges nyirokszervek feladata az immunrendszer sejtjeinek „termelése”, addig a másodlagos nyirokszervek biztosítják a helyszínt a limfociták és az antigének találkozásának.

1.2.1. Nyirokcsomó



1.3. ábra: A nyirokcsomó szerkezete

A nyirokcsomók apró, babhoz hasonló alakú struktúrák, amelyek testszerte megtalálhatók, azonban a szervezet egyes területein feldúsulnak, pl. a hónalji, az ágyéki (inguinális), a nyaki (submandibuláris) és az aorta körüli (paraaorticus) régiókban. Ezen régiók vizsgálata a rutin fizikális vizsgálat része.

A nyirokcsomóknak 2 fő funkciója van: 1) fagocita sejtjei a mikroorganizmusokat és a szervezetbe került korpuszkuláris természetű idegen anyagokat távolítják el; 2) itt történik a felvett idegen anyagok bemutatása az immunrendszer számára (antigén-prezentáció).

A nyirokcsomók sokkal körülvevő szervek, amelyek, hasonlóan a léphez, kötőszövetes gerendák (trabekulák) által részekre vannak osztva. A trabekulák közti alapállomány, a parenchyma három részből áll: a kéregből (cortex), a parakortikális régióból és a velőállományból (medulla). (1.3. ábra)

1.2.1.1. A nyirokcsomót alkotó sejtípusok

A nyirokcsomó anatómiailag elkülöníthető területein különböző sejtípusok helyezkednek el:

A kéregben B limfociták és makrofágok (járulékos sejtek) vannak. A B sejtek a magas endotéllel borított (HEV) vénákon keresztül jutnak be a nyirokcsomókba, ahol a follikulusokban dúsulnak fel. Az antigén stimulus hatására aktiválódó B sejtek megmaradnak a nyirokcsomókban és osztódni kezdenek, míg a stimulálatlan B sejtek visszatérnek a keringésbe. Az aktiválódott B sejtek a **follikulus** centrumában helyezkednek el és a **centrum germinativum** elnevezésű központi állományt alkotják. Ezt veszi körül a naiv **B sejteket** és a kevés **T sejtet** tartalmazó **marginális zóna**. Az aktiválódott és blasztos transzformáción átesett B sejtek elhagyják a follikulust és a parakortikális ill. a medulláris szinuszokba jutnak. Ezekből a sejtekből alakulnak ki az ellenanyag termelő **plazmasejtek** és a **memória B sejtek**.

A parakortikális és az interlobuláris régió a T sejtek és a **dendritikus sejtek** találkozási helye. Ide érkeznek meg a perifériáról a dendritikus sejtek, és itt mutatják be a felvett antigéneiket a specifikus T sejteknek.

A medulla plazmasejtekben gazdag. A plazmasejtek által termelt ellenanyagok az efferens nyirokéren keresztül hagyják el a nyirokcsomót.

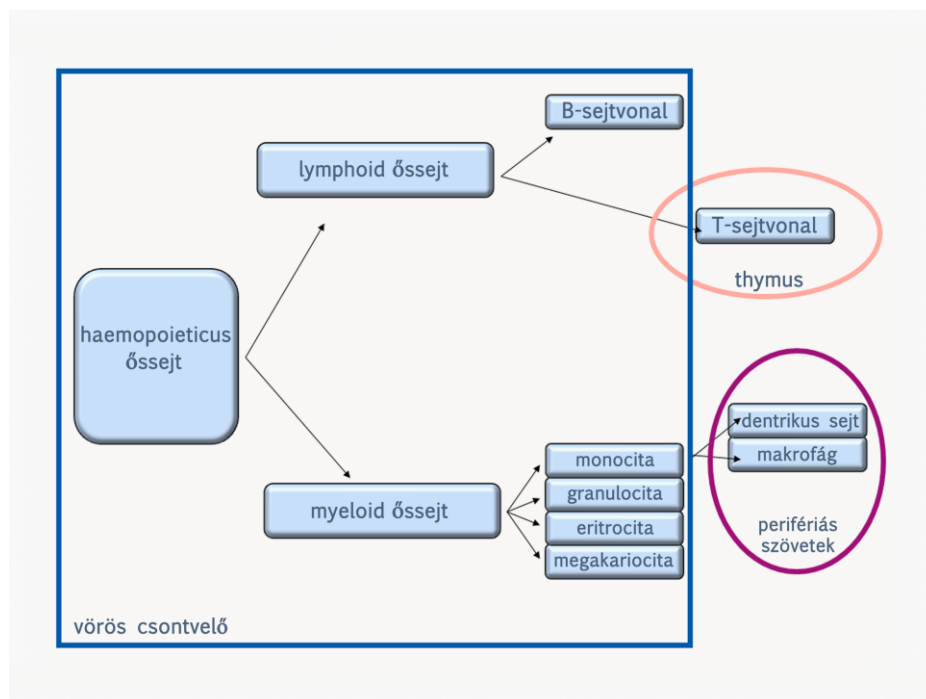
1.2.1.1.1. Őrszemnyirokcsomó

A legtöbb rosszindulatú daganat sebészi kezelésének szerves része az elvezető nyirokcsomó régiójának műtéti eltávolítása, az úgynevezett regionális blokkdisszekció. A beavatkozás célja egyrészt a betegség lokalizációjának regionális kontrollja, másrészt a regionális stádium-meghatározás (volt). Mivel a regionális blokkdisszekció szövődményekkel, illetve kedvezőtlen következményekkel járhat, sőt az ennek alapján végzett regionális stádium meghatározást sem tartják ma már megfelelőnek, ezért az 1990-es években kidolgoztak és azóta a klinikai gyakorlatba is bevezettek egy új regionális stádium-meghatározási eljárást: az őrszemnyirokcsomó-biopsziát. Ennek az a lényege, hogy a műtét előtt vagy közben feltérképezik a daganat nyirokelvezetését, és eltávolítják az elvezetés első állomását, az ún. őrszemnyirokcsomót. Ennek az egy vagy néhány nyirokcsomónak a részletes patológiai vizsgálata pontosabban jelzi a régió daganatos státuszát, mint a korábban alkalmazott rutin eljárás, és emellett lehetőséget biztosíthat a régió szelektív sebészi, illetve sugárkezelésére is.

1.2.2. Csontvelő

A vörös csontvelő a vérképzés helyszíne. Amint azt részletezni fogjuk a későbbiekben, a vérképzés egyetlen hemopoietikus őssejtből alakul ki. (A közös hemopoietikus őssejteket számos névvel illetik: a totipotens őssejt kifejezéstől kezdve, az angol „hematopoietic stem cell” (HSC) elnevezésig, de az anatómia tankönyvekben még továbbra is a haemocytoblast elnevezést használják.)

Leegyszerűsítve a folyamatot, a hemopoietikus őssejtek limfoid és mieloid progenitorokká differenciálódnak. A mieloid sejtek és a B limfociták érése a csontvelőben zajlik, míg a T sejtek előalakjai a timuszba vándorolnak és ott differenciálódnak. A monocita eredetű mononukleáris fagocita rendszer sejtjei végső érésüket a perifériás szövetekben érik el. (1.4. ábra)



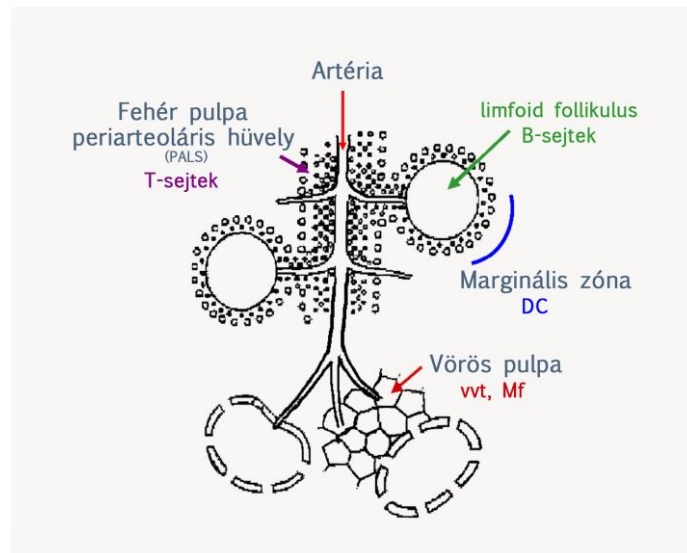
1.4. ábra: Hematopoezis a csontvelőben

1.2.3. Lép

Szervezetünk legnagyobb nyirokszerve, a lép, a bal hypochondrium-ban (a hasüreg bal felső quadránsában) helyezkedik el. Kötőszövetes tok veszi körül, amelyből ereket tartalmazó gerendák (trabekulák) indulnak a lép belsejébe. A trabekulák között elhelyezkedő parenchymát 2 állomány alkotja: a vörös és a fehér pulpa. Mindkét alapállomány vázát retikuláris kötőszövet képezi.

A vörös pulpa vérrel telt szinuszoidokat (speciális, kitágult erek) tartalmaz. Fő feladata az előregedett vörösvértestek kiszűrése (filtráció).

A fehér pulpa limfoid szöveti aggregátumokból áll és a lép immunológiai funkciójáért felelős. A fehér pulpa periarterioláris része az ún. periarterioláris hüvely (PALS), amely főként T limfocitákban gazdag. A B sejtek a fehér pulpa limfoid folliculusaiban dúsulnak fel. A folliculusok körül elhelyezkedő marginális zóna jellegzetes sejtjei a dendritikus sejtek és a nagyobb méretű (aktiválódott) limfociták (1.5. ábra).

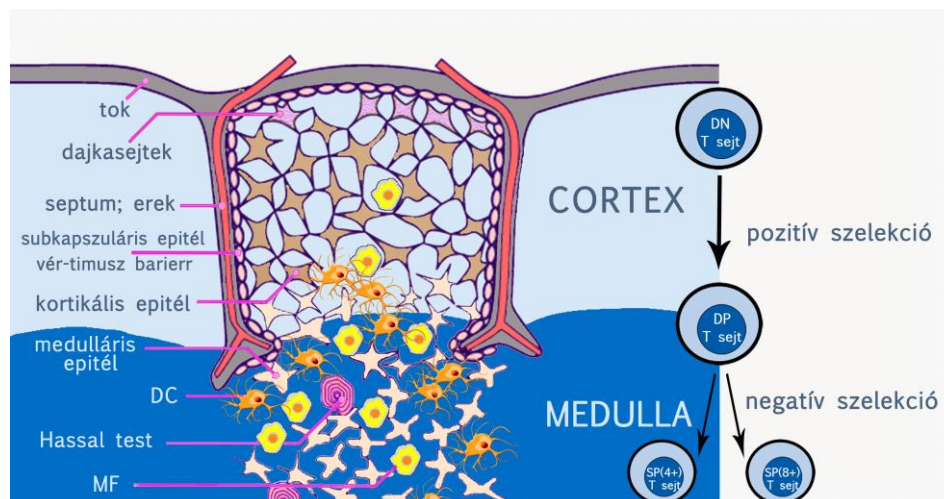


1.5. ábra: A lép szerkezete

1.2.4. Timusz

Az elülső mediasztinumban elhelyezkedő csecsemőmirigy nevét onnan kapta, hogy mérete csecsemőkorban a legnagyobb, majd életünk során egyre csökken. Ennek ellenére funkcióját teljes élettartamunk alatt megtartja. A timusz a T sejt differenciálódás helyszíne. Az éretlen T-sejtek a tímuszban tanulják meg felismerni a szervezet saját struktúráit, továbbá itt jelennek meg a felszínükön az érett T-sejtekre jellemző, egyedi T-sejt-receptorok és a CD4 ill. a CD8 járulékos molekulák is. A T sejtek differenciálódását nagyfokú sejtpusztulás kíséri: az osztódott ill. differenciálódott sejtek mindössze 1-2 százaléka kerül ki érett T limfocitaként a perifériára.

A csontvelőből érkező T sejt progenitorok osztódása a kéreg állományban, a szubkapszuláris régióban kezdődik el. Itt alakulnak ki a CD4-/CD8- kettős negatív (DN) T sejtek, amelyek aztán a kéregben a velőállomány felé haladva pozitív szelekción mennek keresztül. A kéreg-velő határt már CD4+/CD8+ kettős pozitív (DP) sejtékként érik el. A velőállományban történik a negatív szelekció, miközben azérés során elveszítik vagy a CD4, vagy a CD8 molekuláikat és érett, egyszerűen pozitív (SP) Th ill. Tc sejtékké alakulnak (1.6. ábra).

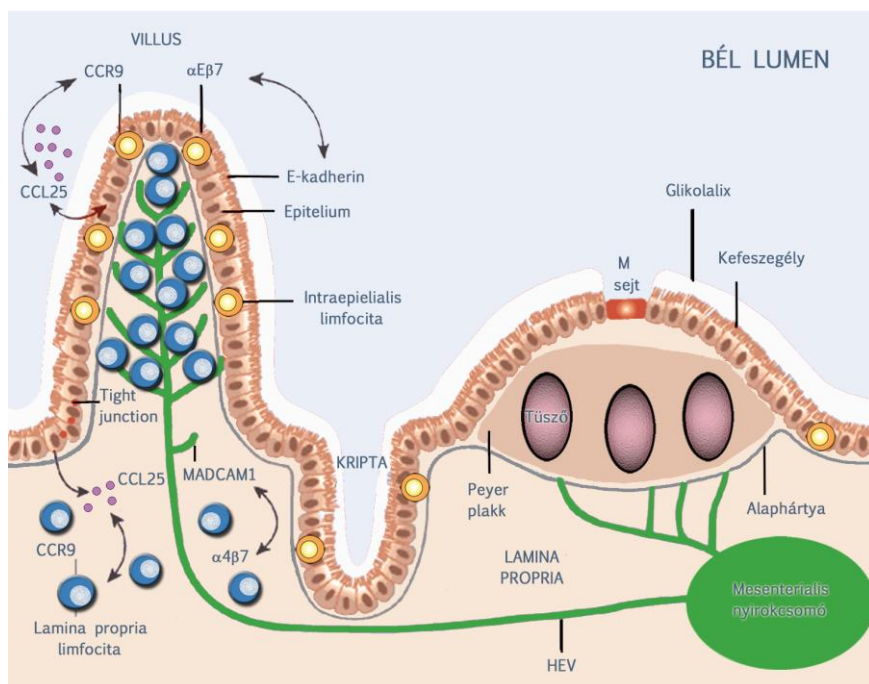


1.6. ábra: A csecsemőmirigy szerkezete

1.2.5. Nyálkahártya asszociált nyirokszövetek: MALT

Az elnevezés az otthont adó szervtől függ, BALT-ról, ha a hörgő nyálkahártyában van, vagy éppen GALT-ról, ha a gyomor-bél traktusban található, stb.

A vékonybél nyálkahártyájában a nyirokszövet limfoid aggregátumok (nyiroktüszők) formájában található meg. Ezek a tüszők az ún. Peyer plakkok. A hámban nagy mennyiségű, ún. intraepiteliális limfocita (IEL) mutatható ki. Az epitél sejtek egy része speciális funkciót ellátó, ún. M sejté alakult át. Az M sejtek felveszik az antigéneket a bél lumenből és továbbítják a Peyer plakkokban elhelyezkedő immunsejtek felé. Az antigénnel történő találkozás hatására megkezdődik a Peyer plakkok naiv ill. memória B sejtjeinek aktiválódása, ami aztán a mezenterális nyirokcsomókban teljesedik ki (1.7. ábra).

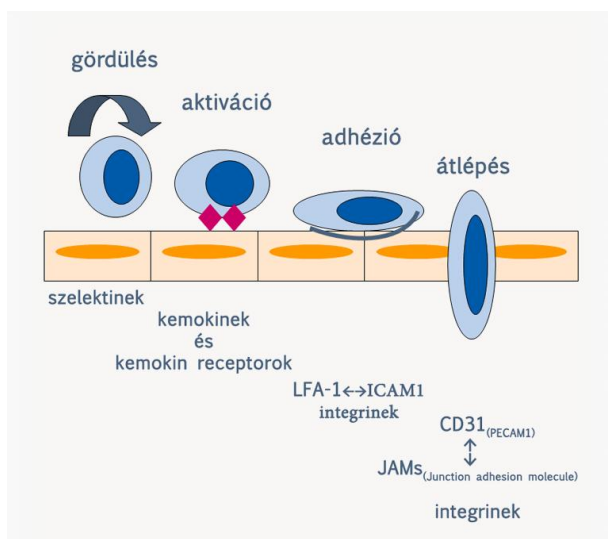


1.7. ábra: A GALT szerkezete

Az aktiválódott B sejtek felszínén integrinek jelennek meg, melyek segítségével, miután a *ductus thoracicus*-on és a véráramon keresztül visszajutottak a bélbe, kötődni tudnak a bélszövet HEV (high endothel venule) sejtjeihez és kifejtetik effektor funkciójukat (1.8. ábra).

A nyirokszervek és szövetek lokalizációjával, szerkezetével és szövettanával részletesebben az anatómia foglalkozik.

1.8. ábra: Extravazáció a HEV-en keresztül



1.3. Az immunrendszer sejtjei

Az immunrendszert dinamikusan változó sejtösszetétel jellemzi. Általánosságban igaz, hogy a sejtek az immunrendszer elsődleges szerveiben, a csontvelőben és a timuszban képződnek, de végső érésüket csak a perifériás nyirokszervekben, vagy éppen közvetlenül az immunválasz helyszínén érik el. Kategorizálásuk sokkal inkább a funkcionális tulajdonságaik alapján, mint a morfológiájuk szerint történik. Az immunsejtek mennyiségének csökkenése és funkcionális zavara immunhiányos állapot kialakulásához vezet.

Az immunrendszer sejtjei egy közös csontvelői őssejtből származnak. Ez a sejt önmegújító képességén kívül differenciálódásra is képes. A differenciálódás 2 irányú: egyaránt belőle alakul ki a mieloid és a limfoid vonal. A mieloid vonal a granulocita – eritrocita – monocita – megakariocita kolóniaformáló egységből a csontvelőben fejlődik ki. A limfoid progenitorok három irányba differenciálódnak. Egy részük a csontvelőben marad, belőlük alakulnak ki a B sejtek. A másik részük a timuszba vándorol, ezekből lesznek a T sejtek és az NKT sejtek. A harmadik részükből differenciálódnak az NK sejtek, azonban ennek helyszíne mind a mai napig nem tisztázott.

A vérképzés szabályozásában direkt sejt-sejt interakciók (csontvelői stroma – hemopoietikus sejtek), citokinek és növekedési faktorok ill. alacsony molekulásúlyú biogén aminok játszanak szerepet.

Az utóbbi években számos új szempont merült fel a vérképzéssel kapcsolatban. Ezek leglényegesebb vonása az, hogy eltűnni látszanak a merev kategóriák, azaz egyre inkább úgy gondolják, hogy a progenitor sejtek elkötelezettsége nem visszafordíthatatlan, hanem az aktuális élettani állapottól függően többirányú differenciálódást tesz lehetővé.

A vérképző rendszer sejtjeinek azonosítása a morfológiai és citokémiai tulajdonságaik mellett elsősorban a felszíni és citoplazmatikus fehérje mintázatuk révén lehetséges. Az 1980-as években egy nemzetközi munkaértekezleten egységesítették a fehérvérsejtekre jellemző differenciálódási markerek / antigének nevezéktanát. Ez lett a „Cluster of Differentiation”. (lásd az Áramlási citometriáról szóló fejezetben).

1.3.1. Az immunrendszer sejtjeinek vizsgálata

Az immunrendszer sejtjeinek vizsgálata többlépcsős folyamat. A kvalitatív és kvantitatív vérkép vizsgálat segítségével meghatározható a keringő fehérvérsejtek mennyisége és megoszlása, esetleg kiszűrhetők kóros morfológiájú sejtek is. Lényegesen invazívabb beavatkozás a csontvelő aspiráció ill. biopszia, amelyet elsősorban a malignitások igazolására és kizárására végeznek el (pl. valamely sejtvonal hiánya, vagy kóros felszaporodása).

Az immunrendszer sejtjeit érintő megbetegedések kezelésének és a prognózis megállapításának alapvető feltétele a kórosan működő sejtek pontos azonosítása. Erre szolgálnak a citokémiai vizsgálatok, az áramlási citometria és az immunhisztokémia. Az immunrendszer sejtjeit érintő malignitások igazolására és prognosztikai megítélésére alkalmasak a citogenetikai és a molekuláris genetikai vizsgáló módszerek.

1.3.1.1. Vérvék és csontvelő kenet vizsgálatok

A quantitativ vérvék vizsgálat eredményének értékelésekor két szempontra kell különösen figyelni: 1) ha a quantitativ vérvékben semmiféle eltérés nincs, az még nem zárja ki sem az immunhiányos állapotok, sem a malignus hematológiai betegségek fennállását. 2) Lehetnek olyan eltérések a quantitativ vérvékben, amelyek nem patológiás folyamat következményei: pl. a terhesség előrehaladtával, fiziológiás körülmények között is jelentős fokú leukocitózis figyelhető meg, aminek azonban semmiféle hematológiai kórkép nem áll a hátterében.

A qualitativ vérvék értékelésével kapcsolatban ugyanarra a két dologra érdemes gondolni, mint amit a quantitativ vérvék vizsgálat eredményének értékelésekor kiemeltünk: 1) ha a qualitativ vérvékben semmiféle eltérés nincs, az még nem zárja ki sem az immunhiányos állapotok, sem a malignus hematológiai betegségek fennállását. 2) Lehetnek olyan eltérések a qualitativ vérvékben, amelyek nem patológiás folyamat következményei, pl. akut nagyfokú vérvesztést követően, vagy gyulladásos állapotokban a csontvelőből kompenzatórikusan fokozódik a sejtáramlás, ami éretlenebb sejtalakok perifériára jutását eredményezheti (balra tolt vérvék).

A csontvelő kenetek értékelése során a következő 3 dologra kell figyelni: 1) Valamennyi sejtvonalhoz, ill. érési stádiumhoz tartozó sejtalak jelen van-e a mintában? 2) Milyen a különféle sejtvonalak ill. érési alakok egymáshoz viszonyított aránya, 3) Vannak-e kóros sejtalakok a vizsgálati mintában?

1.3.1.2. Citokémiai reakciók

A sejtvonat eredet megállapításának egyik lehetséges, és olcsó módszere a citokémiai reakciók elvégzése. A számos citokémiai reakció (Sudan black B festés, MPO kimutatás, nem-specifikus észteráz reakció, a-naftilbutirát észteráz reakció NaF gátlással és anélkül, PAS, stb.) közül mindössze kettőt szeretnénk kiemelni:

1.3.1.2.1. PAS reakció

A PAS reakció nem specifikus, mert mind a mieloid, mind a limfoid eredetű sejtek citoplazmájában tárolt glikogént kimutatja. Azonban amíg a mieloid sejtek és az érett limfociták citoplazmája homogénen festődik, addig a limfoblasztok durva rögös szemcsézettséget adnak, így elkülönítésük lehetővé válik.

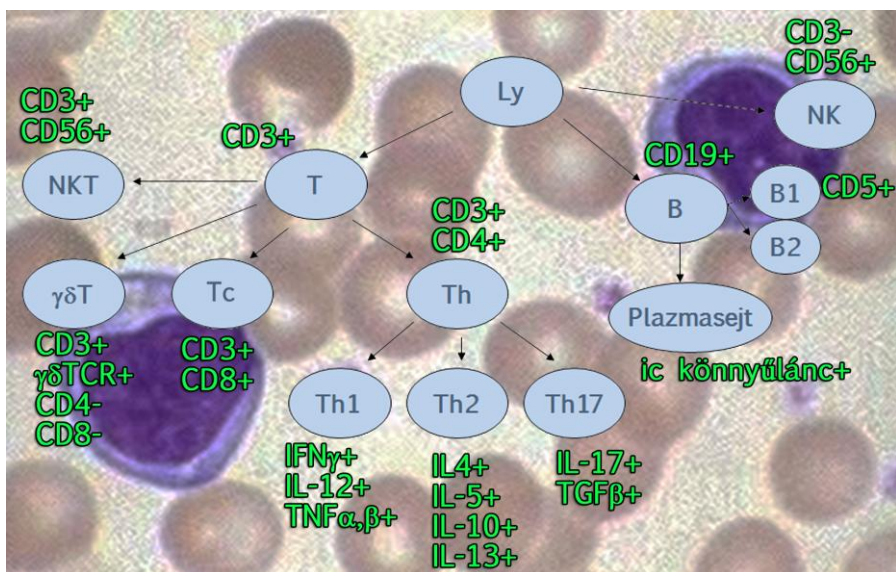
1.3.1.2.2. Nem-specifikus észteráz reakció

A nem-specifikus észteráz reakciót a mieloid sejtek citoplazmájában található észteráz enzimek adják. A reakció elvégzése után tehát elkülöníthetők lesznek a mieloid és a limfoid eredetű sejtek. Mivel a monociták plazmájában található enzimek működése gátlható nátrium fluoriddal (NaF), de a granulocitáké nem, ha elvégezzük a reakciót NaF gátlással és anélkül is, akkor elkülöníthetjük a kétféle mieloid populációt, a monocitákat és a granulocitákat.

1.3.1.2.3. Áramlási citometria

Áramlási citometriával a sejtfelszíni és citoplazmatikus fehérje mintázat feltérképezése révén (immunfenotipizálás), az immunrendszer sejtjeit differenciáltsági és aktiváltsági állapotuk alapján

jellemezhetjük (1.9. ábra). (Az áramlási citometria alkalmazási lehetőségeit az 5. fejezetben tárgyaljuk.)



1.9. ábra: Immunfenotipizálási markerek

1.3.1.3. Immunhisztokémia

A szolid szövetek immunfenotipizálását immunhisztokémiai módszerrel végzik. A módszer részletes leírása egy későbbi fejezetben található meg.

1.3.1.4. Genetikai vizsgálatok

Az immunrendszer sejtjeinek kóros működését genetikai módszerekkel is lehet vizsgálni. Az immunsejtek funkcionális zavara megjelenhet immunhiányos kórképek ill. a sejtek malignus elfajulása formájában. A molekuláris genetikai módszerek, mint a citogenetika, a FISH, a PCR vagy akár a teljes génexpressziós mintázat feltérképezésére alkalmas génlapka technikák, napjainkban már az immunrendszer rutin vizsgálómódszerei közé tartoznak. (Ezeknek a módszereknek a részletes leírása a Genetika jegyzetben található meg.)

1.4. Milyen módon kommunikálnak az immunrendszer sejtjei?

Nem lehet elégszer hangsúlyozni, hogy az immun szervrendszert, mint funkcionális egységet, a szervezetben gyakorlatilag mindenütt jelen lévő különálló sejtek, szövetek és szervek összehangolt munkája / működése alakítja ki. Ez pedig csak folyamatos kommunikáció révén valósulhat meg.

Hosszú időn keresztül úgy gondolták, hogy a sejtek közti párbeszéd alapján véve kétféle módon valósulhat meg: egyrészt ismert volt, hogy az egymás mellett elhelyezkedő sejtek különféle sejtfelszíni struktúráik révén kölcsönhatásba kerülhetnek egymással, ez a sejt-sejt kapcsolódáson alapuló **juxtakrin** vagy **kontakt** kommunikáció. (Az immunrendszeren belüli direkt sejt-sejt interakció kiváló példája a T limfociták és az APC-k kapcsolódása, amely elengedhetetlenül szükséges a T sejtek antigén-specifikus aktiválásához.) A másik lehetőség a sejtekből kibocsátott különféle anyagok

(szolubilis hírvivők) révén közvetített üzenet átadás. A sejtek által szecernált anyagok a szöveti diffúzió, a nyirokkeringés, vagy éppen a véráramlás révén jutnak el azokhoz a közeli (parakrin) vagy távoli (endokrin) célsejtekhez, ahol kifejtik hatásukat. (Az immunrendszer működése szempontjából nagyon fontos szolubilis szabályozó molekulák pl. a citokinek.) A sejtek közti párbeszédnek egy harmadik, nem kevésbé fontos formája, a mikrovezikulákon (MV) keresztül történő üzenet átadás. A MV-k a sejtek által kibocsátott csomagok, amelyek a felszínükön szállított fehérjékkel a célsejtek receptoraihoz kapcsolódhatnak, vagy a belsejükben szállított anyagokat (RNS, fehérje) a célsejtbe juttatva fejthetik ki hatásukat. Egyes esetekben beleolvadnak a célsejt membránjába, és így a fehérjéiket átadják a célsejtnek. Ezt úgy is mondhatjuk, hogy megváltoztathatják a célsejt fenotípusát. A MV-k 30-1000 nm méretű, kettős lipidréteggel körülvett részecskék, amelyek felszínén specifikus, a donorsejtre jellemző fehérjemintázat mutatható ki. Belsejükben citoplazma van, amely fehérjéket, nukleinsavakat és más egyéb anyagokat tartalmaz. Jelen ismereteink szerint gyakorlatilag bármely sejt képes MV kibocsátásra, leggyakrabban aktiváció hatására, de akár nyugalmi állapotban is. Napjainkban a MV-k vizsgálatára főként áramlási citométert és elektronmikroszkópot használnak.

A MV-k üzenetközvetítésének legjelentősebb vonásai a következők:

1. Mivel membránjukban több fehérjét szállítanak, hatásukat komplex fehérjemintázat révén fejtik ki. Úgy is mondhatnánk, hogy egyidejű stimuláló és kostimuláló hatásuk van.

2. Mivel az üzenetet membránhoz kötött fehérjék közvetítik, ezért a hatás időtartama megnő. (A hatás időtartamának fontos szabályozó szerepe van)

3. A MV-k belsejében olyan anyagok is átjuthatnak egyik sejtől a másikba, amelyek fiziológias körülmények között nem diffundálhatnak szabadon a szövetek között, hiszen ezeket az immunrendszer idegennek ismerné fel. Ilyenek pl. a nukleinsavak.

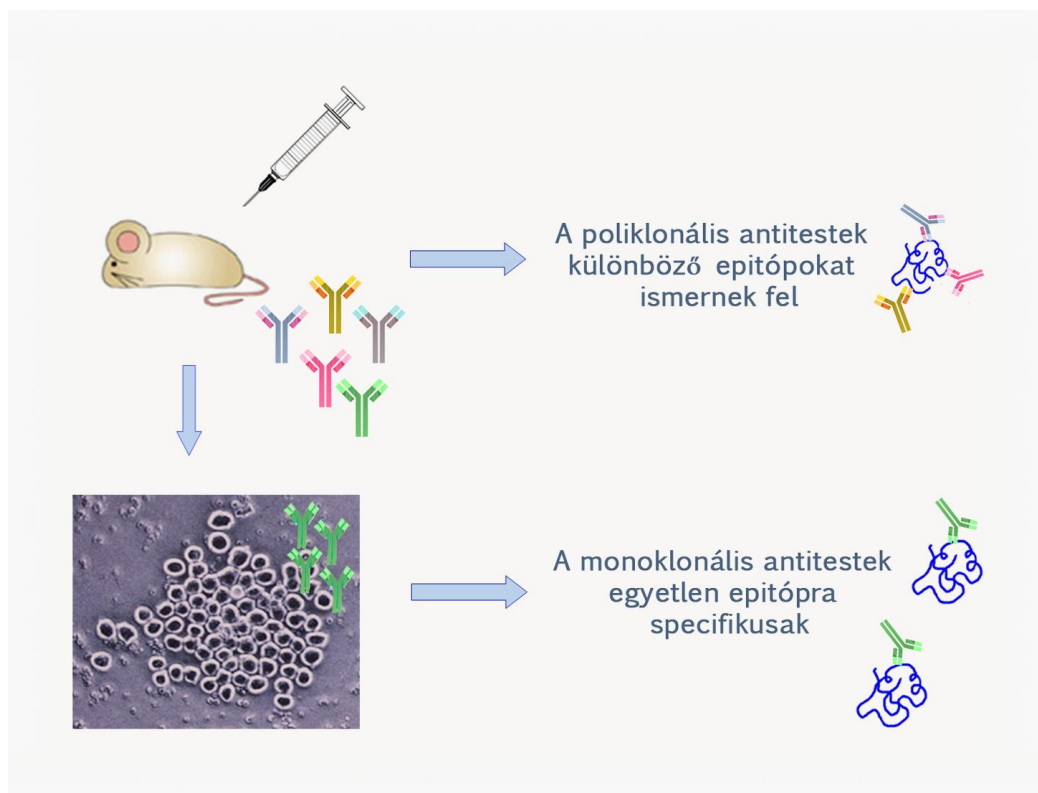
2. ANTITEST-ANTIGÉN KÖLCSÖNHATÁSON ALAPULÓ MÓDSZEREK I. (BUZÁS EDIT)

A jelenleg alkalmazott klinikai laboratóriumi diagnosztikus vizsgálatok jelentős része antigén-antitest kölcsönhatáson alapul, ez indokolja, hogy ezeket az alapvető módszereket sorra vegyük.

A vizsgálatok során alkalmazott antitestek kereskedelembe hozzáférhetők, hasonlóan a kémiai reagensekhez. Antitestek előállítására és forgalmazására szakosodott cégek sora kínálja a különböző specifitású poliklonális és monoklonális ellenanyagokat.

2.1. A diagnosztikus célra használt antitestek jellemzői

A **poliklonális antitestek** immunizált állatok szérumból származnak; fajidegen fehérjével történt immunizálást követően az immunizált szervezetben, a vészérumban nagy mennyiségben vannak jelen az antigén több különböző, általában konformációs epitópjaival reagáló antitest molekulák. A poliklonális antitestek sokféle B sejt/plazmasejt termékei. A szérumból izolálható antitestek többféle antitest osztályba tartoznak, többféle affinitás jellemzi őket, és antigénspecifitásukat illetően is heterogének, a kívánt specifitás mellett más antigénekkal is reagálnak. Egyetlen oltást követően zömében IgM típusú antitestek termelődnek (primer immunválasz), míg többszöri ismételt oltást követően az IgG válik a domináns antitest osztállyá a szérumban. A poliklonális ellenanyagokat többnyire szekunder antitestként alkalmazzuk. Célszerű nagytestű állatokat (sertés, kecske, nyúl) alkalmazni poliklonális antitestek termelésre, mert így nagy mennyiségben állítható elő poliklonális antitest készítmény a vészérumból. Csak összehasonlításképpen: nyúl esetében 15 ml, egér esetében 0,3 ml, patkány esetében 2 ml, tengerimalac esetén 5 ml, hörcsög esetén 0,3 ml, birka véreztetésekor 200-600 ml, kecskéből 150-400 ml, lóból 500-7000 ml szérum nyerhető. Az immunizálandó faj kiválasztásakor további lényeges szempont az antigén és az immunizálandó szervezet közötti filogenetikai távolság. A poliklonális ellenanyagok előállítása viszonylag kis költségigényű, és 4-8 hetet vesz igénybe. A leggyakrabban poliklonális ellenanyag termelése céljából immunizált faj a nyúl, melyből vérvételenként kb. 250 mg antitest nyerhető. A nyúlban termelt poliklonális antitestek szekunder antitestekként jól alkalmazhatóak az egér eredetű monoklonális antitestekkel együtt (2.1. ábra és 2.1-2. táblázat).



2.1. ábra: Monoklonális és poliklonális antitestek

Jelölés	Példa	Alkalmazás
Flouorkróm	FITC (fluoreszcein izotiocianát) PE (fikoertitrin) rhodamin Texas vörös	Immuncitokémia
Enzim	Peroxidáz (HRPO) Alkalikus foszfatáz (ALP)	ELISA [kolorimetriás vagy kemilumineszcens (CLIA)] és ELISPOT, immunoblot
Biotin	Biotin	Indirekt immuncitokémia (detektálás avidinnel vagy sterptavidinnel konjugált enzimmel)
Aranykolloid	Aranykolloid	Elektronmikroszkópos immuncitokémia
Radioaktív jelölés	I^{125}	RIA és IRMA

2.1. táblázat: Az antitestekkel konjugált néhány gyakori jelzőmolekula.

Enzim	Szubsztrát
Peroxidáz (HRPO)	DAB (diaminobenzidin): barna
	AEC (aminoetil-karbazol): vörös
	True Blue: kék
	Luminol: lumineszcens
Alkalikus foszfatát (ALP)	NBT (nitroblue tetrazolium): kék
	BCIP (bromo-kloro-indoil foszfát): kék
	Dioxietán származékok: lumineszcens

2.2. táblázat: Néhány gyakori enzim-szubsztrát rendszer.

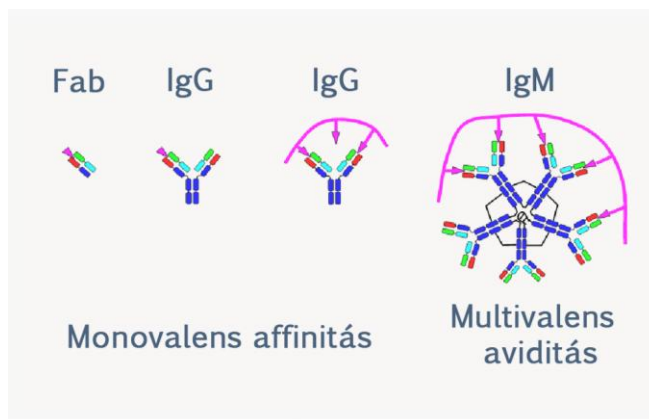
A **monoklonális antitesteket** szövettenyésztői körülmények között, hibridóma technikával állítjuk elő tumorsejtek és plazmasejtek szomatikus fúziójával. A fúzió eredményeképpen létrejött, immortalizált hibridóma sejtek mindegyike azonos monoklonális ellenanyagot termel. A monoklonális ellenanyagok előállítása átlag 3-6 hónapot vesz igénybe. A kereskedelemben hozzáférhető monoklonális antitestek azonos immunglobulin izotípushoz tartozó, azonos epitóppal reagáló immunglobulinok, melyeket szükség szerinti mennyiségben tud előállítani a gyártó cég hibridóma sejtek felhasználásával. A monoklonális ellenanyagoknak nem csak az az előnye, hogy szükség szerinti mennyiségben állíthatók elő, hanem, hogy a termelt immunglobulinok azonosak, és ez különösen fontos standard klinikai diagnosztikai tesztek esetében és antitest terápia esetén. A kereskedelemben hozzáférhető antitestek hatalmas választékát találhatjuk meg a <http://www.antibodyresource.com/onlinecomp.html> webcímen, amelyen keresztül 184 cég teljes antitest választékát érhetjük el.

2.1.1. Alapfogalmak

Antigén-antitest kapcsolat: reverzibilis, nem kovalens kölcsönhatásokon alapul.

Affinitás: az affinitás egyetlen antigén determináns (epitóp) és egy antitest egyetlen antigén kötőhelye közötti kötőerő, mely az epitóp és az antitest közötti vonzó- illetve taszítóerők összege. Az affinitás az egyensúlyi konstans, mely az antigén-antitest reakciót jellemzi. A legtöbb antitestre nagy antigén affinitás jellemző.

Aviditás: a több kötőhelyen mért kötőerők összege, azaz az összkötőerő multivalens antigének és antitestek közt (2.2. ábra).



2.2. ábra: Affinitás és aviditás

Specifititás: az antitest azon sajátossága, hogy képes csak egyetlen antigén determinánssal reagálni. Az antitestek az eltérő antigéneket 1) azok primer szerkezete 2) izomer formái és 3) szekunder, valamint tercier szerkezete alapján képesek megkülönböztetni.

Keresztreaktivitás: egy adott keresztreaktív antitest egynél több antigénnel képes reagálni. Ennek oka lehet, hogy a keresztreakáló antigén rendelkezik olyan epitóppal, melyhez hasonló egy másik antigénben is előfordul.

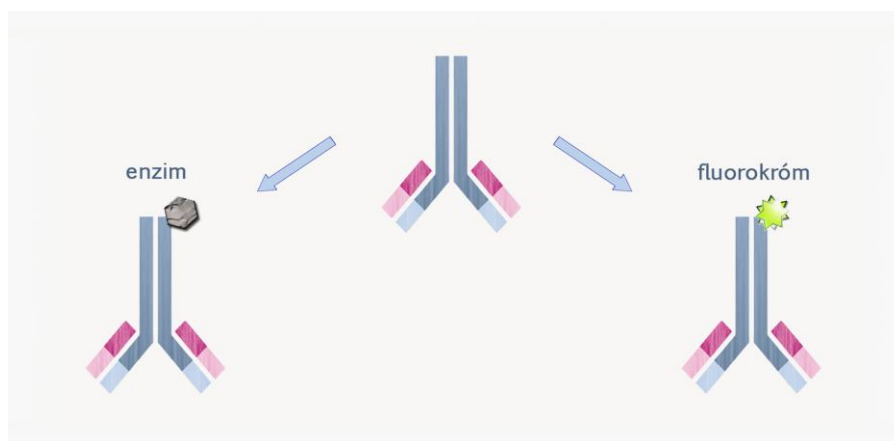
Antitest titer: az az utolsó hígítás, mely mellett még mérhető az antigén-antitest kölcsönhatás.

Szenzitivitás: az a paraméter, mely kifejezi, hogy a diagnosztikus célra használt antitest mennyire érzékeny, a betegek hány %-át ismeri fel pozitívként.

Specifitás: az a paraméter, mely kifejezi, hogy a diagnosztikus célra használt antitest az egészségeseket milyen arányban ismeri fel negatívnak.

2.1.2. Az antitestek jelölési lehetőségei

Ahhoz, hogy az antigén lokalizációját és / vagy mennyiségét meg tudjuk állapítani, az antitesteket láthatóvá kell tennünk. Ehhez különböző jelző (*marker*) molekulákat használunk (2.3. ábra).



2.3. ábra: Gyakoribb jelzőmolekulák

2.2. Módszerek

2.2.1. Áramlási citometria

Napjainkban a klinikai laboratóriumi gyakorlatban az egyik legelterjedtebben alkalmazott, antigén-antitest kölcsönhatáson alapuló immunoassay. Az áramlási citometria jelentősége, széleskörű felhasználhatósága és a módszertani komplexitása miatt külön fejezet témáját képezi, ezért e helyen nem foglalkozunk vele bővebben, jóllehet egyértelműen az immunoassay-k kategóriájába sorolható módszer.

2.2.2. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

A legelterjedtebben alkalmazott, antigén-antitest kölcsönhatáson alapuló nem radioaktív immunoassay az ELISA. A módszerhez 96 (8x12) lyukú polisztirol alapú műanyag lemezeket (*ELISA*

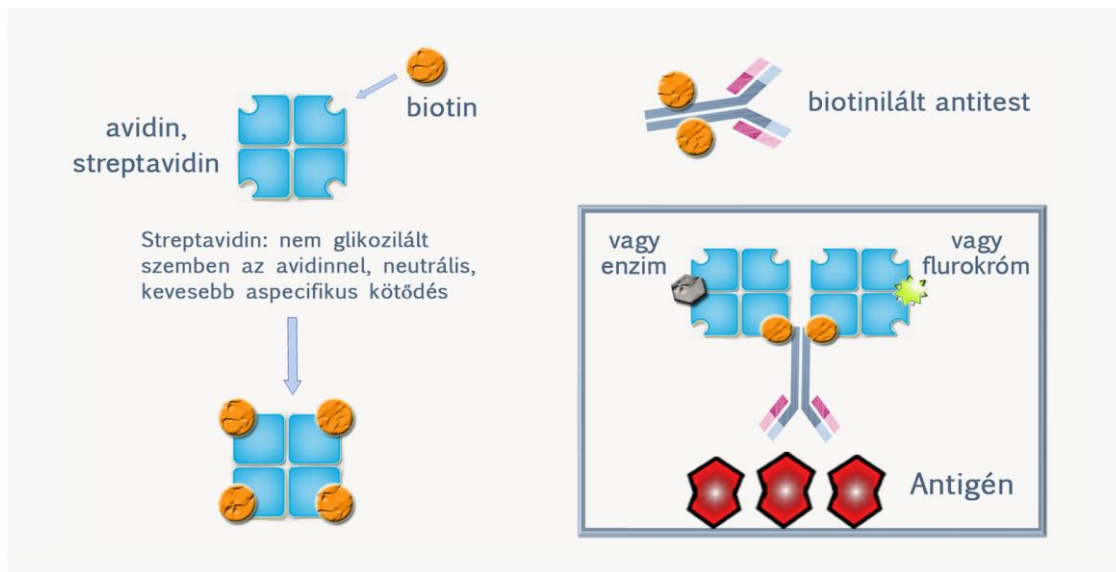
plate) használunk, melyek elődjének az elsőként a magyar származású dr. Takátsy Gyula által 1951-ben alkalmazott 6 x 12 lyukat tartalmazó mikrotitrátor lemez tekinthető.

Az ELISA lemez lyukainak aljához és oldalához fehérjét adszorbeáltatunk. Az adszorpciót többek között *van der Waals* erők, hidrofób- és elektrosztatikus kölcsönhatások közvetítik. A lyukak oldalfalainak szabad fehérjekötő kapacitását olyan indifferens fehérjével telítjük, melyek várhatóan nem vesznek részt az immunreakcióban, tehát sem olyan antigént, sem olyan antitestet nem tartalmaznak, mely részt venne az ELISA immunreakcióban. Erre a célra szarvasmarha (*bovine*) szérum albumint vagy zselatint alkalmazhatunk.

Az ELISA rendszerben alkalmazott ellenanyagok lehetnek jelöletlenek vagy enzimmel illetve biotinnal konjugáltak. Az antitestek jelölésére leggyakrabban a tormaperoxidáz (*horse radish peroxidase*, HRP) vagy az alkalikus foszfatáz (AP) enzimjelölést alkalmazzuk. Az enzim (pl. HRP) önmagában nem látható, azáltal válik láthatóvá, hogy a H_2O_2 és egy kolorimetriás indikátor közti elektrontranszfert katalizálja, és az oxidált kromogén szubsztrát (TMB, DAB, ABTS) színe megváltozik. Az átalakított kromogén mennyisége az abszorpciós maximum érték mellett mért optikai denzitás mérésével követhető, arányos az enzim aktivitással. Kromogén szubsztrátok helyett alkalmazhatunk fluorogén szubsztrátokat is.

Biotin jelzés estében a biotin-avidin illetve biotin-streptavidin nagy affinitású kölcsönhatást használjuk ki. A biotin-avidin kölcsönhatás az egyik legerősebb ismert nem kovalens fehérje-ligandum kapcsolat. A tojásfehérjéből származó avidin bázikus glikoprotein, mely 30% szekvencia egyezést mutat a *Streptomyces avidinii* által termelt streptavidinnal, de szekunder, terciér és quaterner szerkezetük szinte teljesen megegyezik. Mind az avidin, mind a streptavidin tetramer szerkezetű, mindegyik alegység egy biotin megkötésére képes. Számos biotin képes egyetlen biotinnal jelzett fehérjéhez kapcsolódni, és így a biotinilált fehérje egyidejűleg több avidinnal is kapcsolódhat (2.4. ábra). Az avidin nagyobb aviditással köti a biotint, mint a streptavidin, de szemben a streptavidinnal az avidin glikozilált (ezért kötődik lektinekhez is), pozitív töltéssel rendelkezik (kötődik pl. a sejtmaghoz), és hajlamosabb aspecifikus kötődésre.

A mintákkal általában 2-3 párhuzamos mérést végzünk, és ezek átlagával számolunk az értékelésnél.



2.4. ábra: Biotin – avidin rendszer

Az ELISA módszerek három alaptípusát ismerjük:

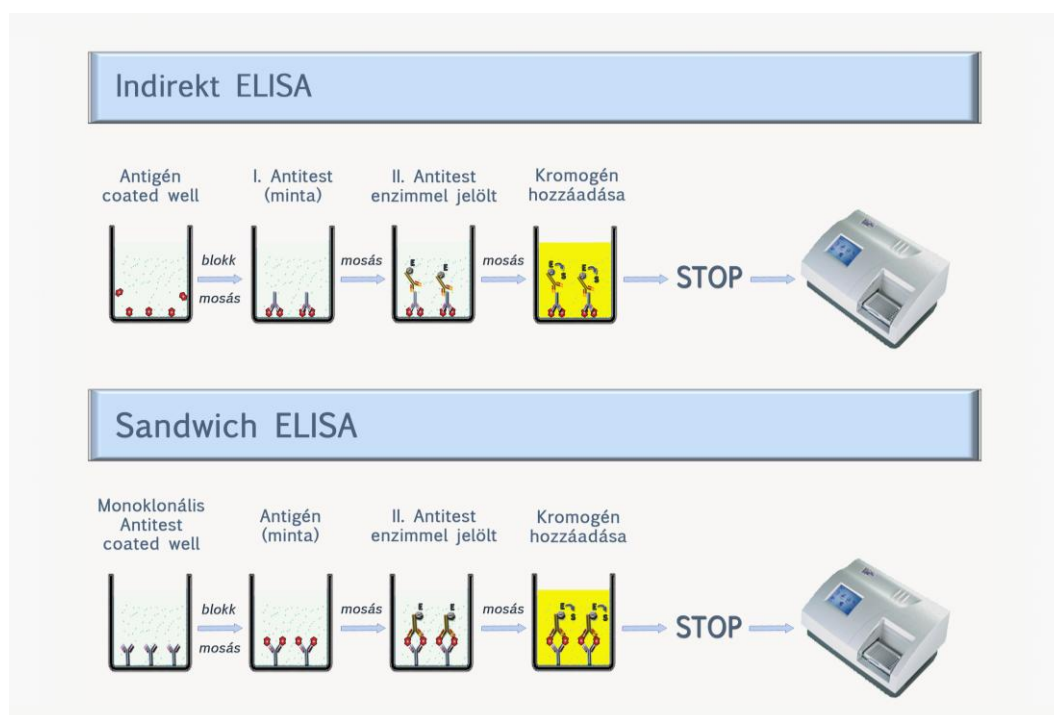
1. **indirekt ELISA**
2. **szendvics ELISA**
3. **kompetitív ELISA assay**

2.2.2.1. Indirekt ELISA reakció

Az indirekt ELISA reakció során az ELISA lemez felszínéhez adszorbeáltatunk egy adott fehérjét (pl. vírus antigént), ez a *coating*. Majd indifferens fehérjével (pl. bovin szérum albumin) blokkoljuk a lemezt, melyet a biológiai mintával (pl. vérérum) inkubálunk. Mosást követően a biológiai mintában található primer antitestnek megfelelő jelölt szekunder antitesttel (pl. HRP-vel konjugált anti humán immunglobulinnal) inkubáljuk a lemezt. Újabb mosást követően H_2O_2 és kromogén hozzáadását követően a lyukakban létrejött színreakciót spektrofotométerrel mérjük adott hullámhosszon. Célszerű minden lemezen negatív (antitestet biztosan nem tartalmazó biológiai mintát) és pozitív kontrollt (antitestet biztosan tartalmazó mintát) is tesztelni. Az ELISA lemezen szintén célszerű egy standard referencia szérum sorozathígítását is együtt tesztelni a vizsgálandó mintákkal, hogy kalibrációs görbét vehessünk fel, melyre az ismeretlen minták abszorbancia értékeit illeszthetjük.

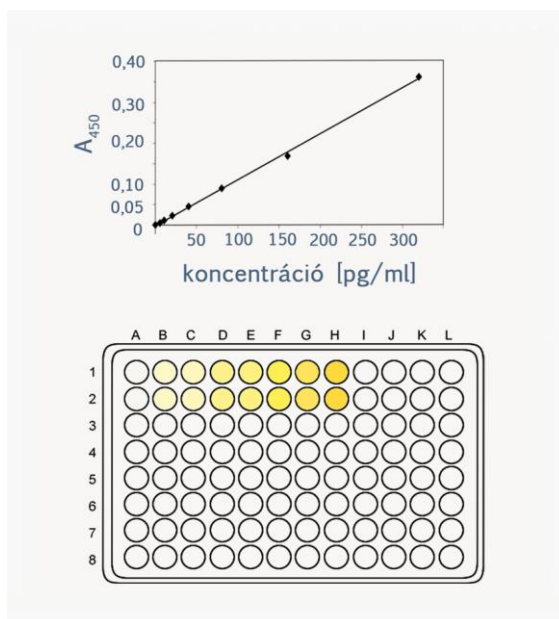
2.2.2.2. Szendvics ELISA

A szendvics ELISA során a lemez felületéhez elkapó/elfogó (capture) antitestet adszorbeáltatunk (coating), majd blokkolást követően a capture antitestnek megfelelő specifikitású antigént (pl. citokint tartalmazó vérérumot) inkubálunk a lemezzel. Mosást követően azonos antigénspecifikus, de az antigén más epitópjával reagáló HRP-jelölt antitesttel inkubáljuk a lyukakat. Majd H_2O_2 és kromogén hozzáadás után a színreakciót adott hullámhosszon spektrofotométerrel mérjük (2.5. ábra).



2.5. ábra: Indirekt és szendvics ELISA elve

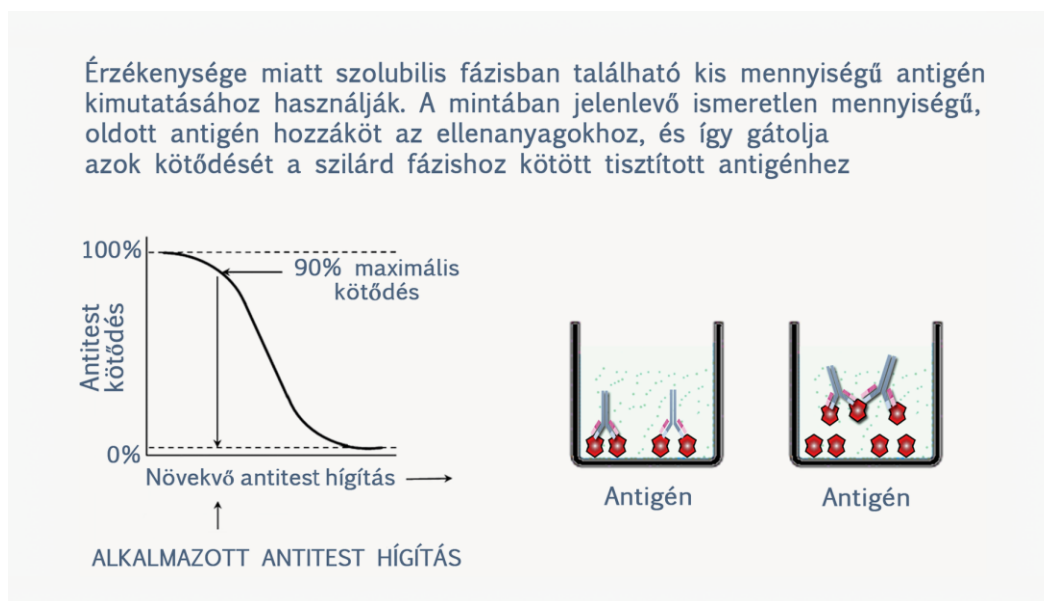
Ebben az esetben a kalibrációs görbe megrajzolásához ismert koncentrációjú antigénhígításokból álló sor adja az ismeretlennel azonos lemezen az alapot (2.6. ábra).



2.6. ábra: ELISA standard sor

2.2.2.3. Kompetitív ELISA

Első lépésben a jelöletlen antitesteket előinkubáljuk az antigént tartalmazó biológia mintákkal, majd miután lehetőség nyílt antigén-antitest komplexek létrejöttére, az így előinkubált biológiai mintákat visszük fel az antigénnel fedett ELISA lemez felszínére. Minél több antigént tartalmaz a biológia minta, annál kevesebb antitest molekula maradt szabadon, hogy az ELISA lemezhez adszorbeáltatott antitesthez kapcsolódjék. Az ELISA reakció befejezéséhez enzimmel (pl. HRP) jelzett másodlagos antitestet, majd kromogén szubsztrátot alkalmazunk (2.7. ábra). A kompetitív eljárások előnye, hogy kis mennyiségű, jelöletlen antigén kimutatására is lehetőséget ad.



2.7. ábra: A kompetitív ELISA elve

2.2.2.4. Mire kell figyelniünk az ELISA kivitelezése során? Mi okozhat problémát?

Pontatlan reakciót eredményezhet, ha nem elégséges a lyukak kimosása (mosófolyadék térfogata és/vagy az áztatási idő elégtelen), ha a lyukakat a mosási illetőleg inkubációs lépések között nem sikerül maradéktalanul kiüríteni, ha nem cserélünk pipettahegyet a minták között, ha nem végzünk párhuzamos vizsgálatokat, ha nem sikerül légmentesen lezárni a *plate*-et az inkubációs lépések során.

Amennyiben a színreakció gyenge vagy egyáltalán nem jön létre, célszerű az antitest konjugátum és a szubsztrát oldatot 1:1 arányban egy külön csőben összekeverni, amikor is létre kell jönnie a színreakciónak. Tormaperoxidázzal (HRP) konjugált antitestek alkalmazása során a reakció elmaradásának oka lehet, ha a szubsztrát oldat tárolására nem sötétben került sor, illetőleg, ha az alkalmazott H_2O_2 oldat régi és részben elbomlott.

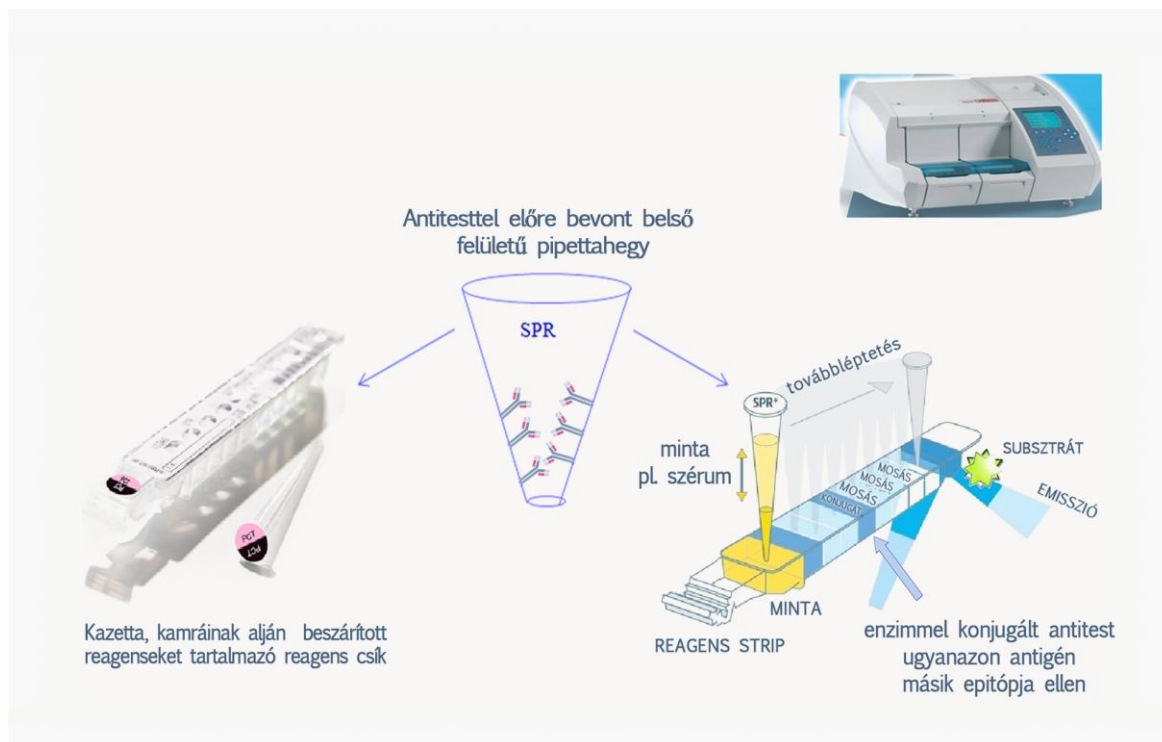
Autoimmun diagnosztika	C-Anca P-Anca Anti-Cardiolipin IgG
	Anti-Cardiolipin IgM
	ss/DNA ds/DNA Jo-1
	Histone Complex
	Immune Complex
	Anti-Thyroid Microsomal
	Anti-Mitochondrial SSa SSb ANA, SM
	Sm/RNP Thyroglobulin Anti Thyroglobulin
Endokrinológia	Gliadin IgG, IgA, IgM
	Androstenedione
	FSH, HCG, HGH, LH, Estradiol, Estriol Progesterone 17-OH
	Progesterone
	Free-Testosterone
	Testosterone
Mikrobiológiai vizsgálatok	Cortisol, TSH, T3, T4, TPA
	Anti-HBsAg; Anti-HCV; Anti-HIV; Anti-HEV IgM; Anti-HAV IgM, IgG; Anti-tuberculosis IgG; Anti-syphilis; anti-EBV; Anti-Rotavirus
Tumor diagnosztika	AFP, CEA, ferritin
	HCG, b-HCG, PAP,
	PSA, Free PSA

2.3. táblázat: Példák ELISA alapú diagnosztikus tesztekre

2.2.3. ELFA (Enzyme Linked Immunofluorescent Assay)

Fluorogén szubsztrátot (pl. 4 Methyl umbelliferyl phosphate (MUP)) alkalmazó ultraszenzitív rendszer. Tekintettel arra, hogy a fluoreszcens molekulák pikomoláris mennyiségben is detektálhatók, ezért fluorogén szubsztrát alkalmazásával az immunoassay szenzitivitása jelentősen megnövelhető (pl.

rotavírus kimutatás esetén az ELISA százszorosa). Az ELFA fluoriméterébe kompatibilis SPR-t helyezünk (solid phase receptacle), mely olyan szolid fázisú, pipettahegyre emlékeztető tartály, melynek belső felületéhez a mérendő anyagra specifikus antitestet kötöttek. A fluoriméterbe helyezhető kazetta elválasztott rekeszeinek aljában található reagenscsík adott pozíciójában alkalikus foszfáttal konjugált antitest, illetőleg fluorogén szubsztrát található. Az SPR-en keresztül a rendszer felszívja a vizsgálandó mintát, majd pipettahegyszerűen a kazetta üregeiből az újabb és újabb oldatokat (2. 8. ábra).

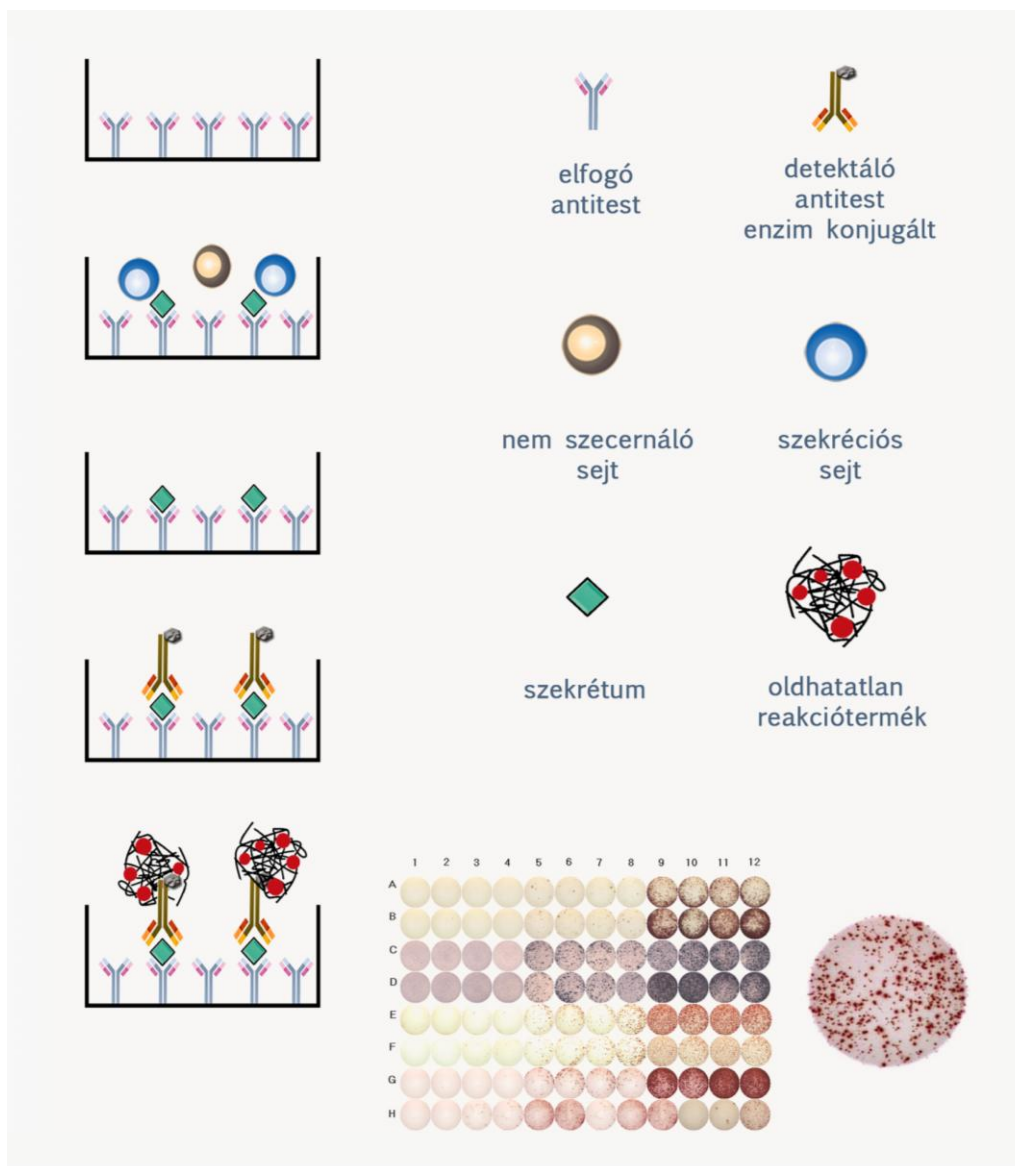


2.8. ábra: Az ELFA módszer elve

2.2.4. ELISPOT

Indirekt immunoassay, mely egyedi sejtek által szecernált molekulák (leggyakrabban citokinek) kimutatására alkalmas. A speciális, nitrocellulóz vagy PVDF membrán fenekű lyukakat tartalmazó 96 lyukú ELISPOT lemezt steril körülmények között capture antitestekkel vonjuk be (coating), majd blokkoljuk a szabad fehérjekötő felszíneket indifferens fehérjét (pl. bovin szérum albumint) tartalmazó pufferrel. Ezt követően ismert számú élő sejtet (limfocitákból 1-300 000 sejtet) helyezünk el a lyukakba tápfolyadékban, és a sejteket egy-két napig CO₂ termosztátban, 37 °C-on tenyésztjük. Majd kimossuk a sejteket, és az általuk szecernált, és a capture antitestek által megkötött molekulákat jelzett detektáló antitesttel és oldhatatlan csapadékot adó szubsztráttal tesszük láthatóvá (2.9. ábra). Kiszáritás után a lemez lyukainak fenekén látható színes spotokat szkennelést követően képanalizáló szoftverrel értékeljük ki.

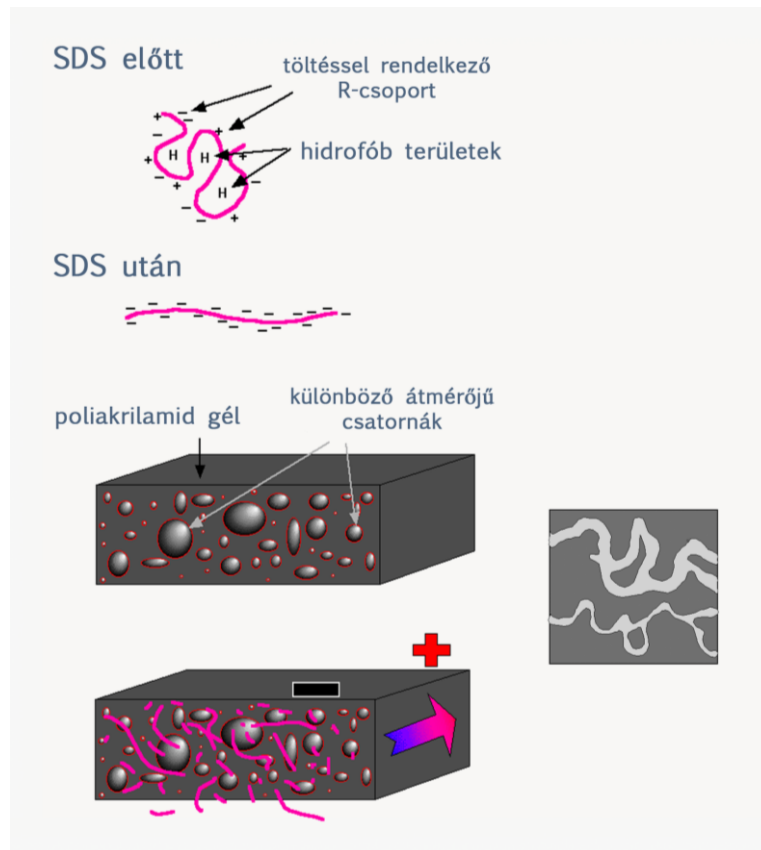
Igen szenzitív módszer, 1/300 000 arány esetében is lehetőséget a pozitív sejtek számának pontos meghatározására.



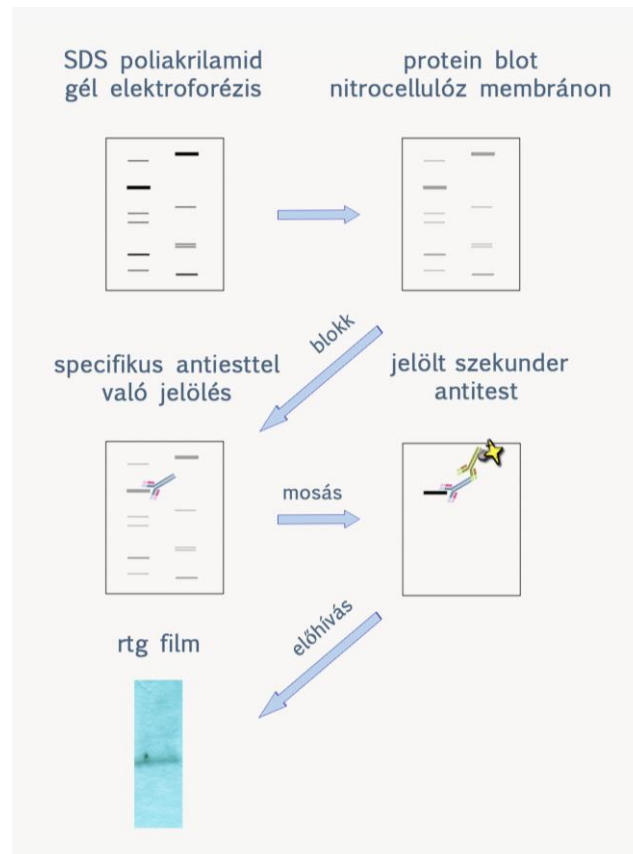
2.9. ábra: Az ELISPOT módszer elve

2.2.5. Immuno blot (Western blot)

A módszer révén egy adott primer antitest segítségével meghatározható egy biológiai mintában található fehérje relatív mennyisége. Sejt vagy szövet lizátumot / homogenizátumot proteázgátlókat tartalmazó puffer segítségével hozunk létre. A mintában található fehérjéket SDS poliakrilamid gélelektroforézissel választjuk szét különböző molekulatömegű komponensekre. Ezt követően átvisszük (transzferáljuk) nitrocellulóz- vagy PVDF membránra a gél tartalmát úgy, hogy a géllal megegyező pozícióban kerüljenek át a szétválasztott fehérjék. membránra. A membrán szabad fehérjékötő felszínét indifferens fehérjékkel (pl. sovány tejpor fehérjével) blokkoljuk. Majd specifikus fehérjét kötni képes primer antitesttel inkubáljuk a membránt. Ezt követően szekunder antitestet (pontosabban antitest-enzim konjugátumot) alkalmazunk, mely képes a primer antitesthez kötődni. Így rámutat arra a helyre, ahová a primer antitest bekötődött (2.10-11. ábra).

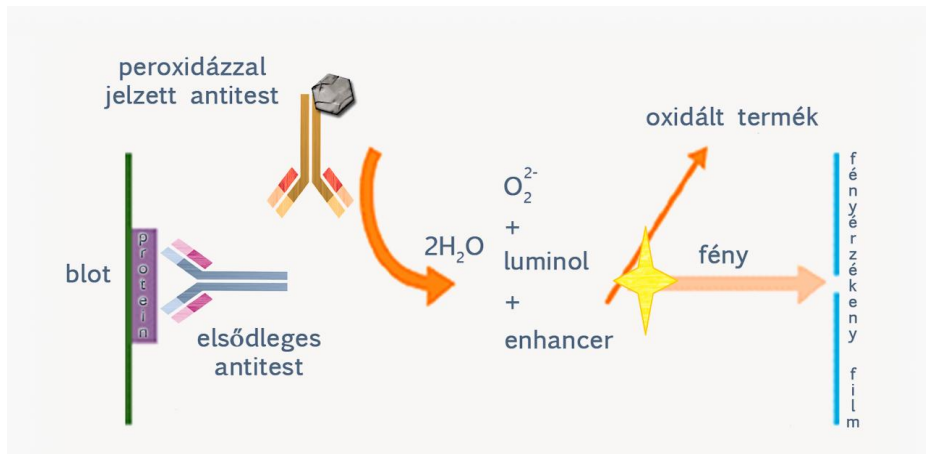


2.10. ábra: A Western blot elve



2.11. ábra: A Western blot lépései

Leggyakrabban HRP-vel konjugált szekunder antitestet alkalmazunk. A HRP katalizálja azt a reakciót, mely során a luminol oxidációja során 428nm-en fényemisszió történik, melyet fényérzékeny filmmel vagy CCD kamerával rögzítünk (2.12. ábra). Valamely *housekeeping* gén által kódolt fehérjére (pl. béta aktin) standardizálva elemezhetők az eredmények, melyek a fehérje relatív mennyisége mellett a fehérjék molekulatömegére nézve is információt szolgáltathatnak.



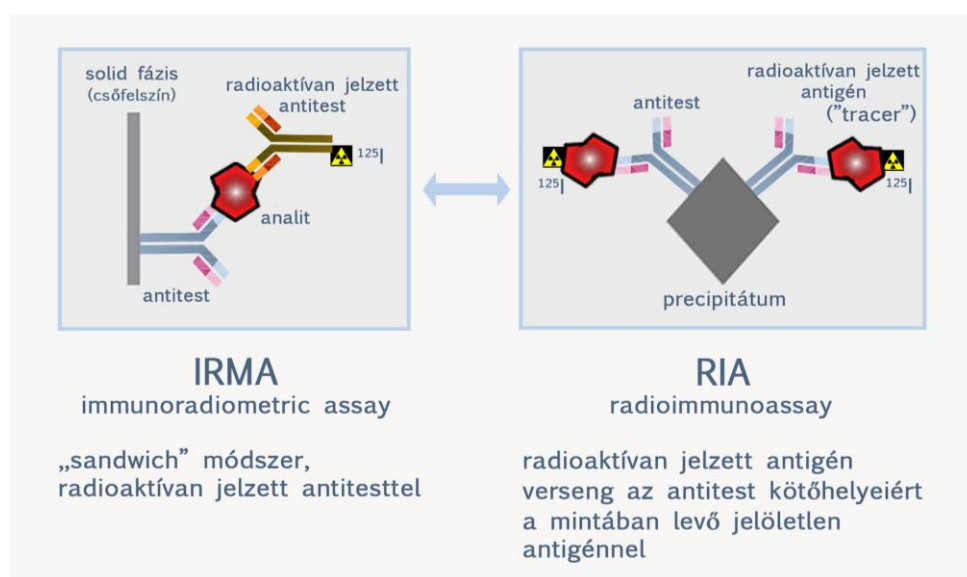
2.12. ábra: A kemilumineszcenciás detektálás elve

2.2.6. Radioaktív jelölésen alapuló módszerek

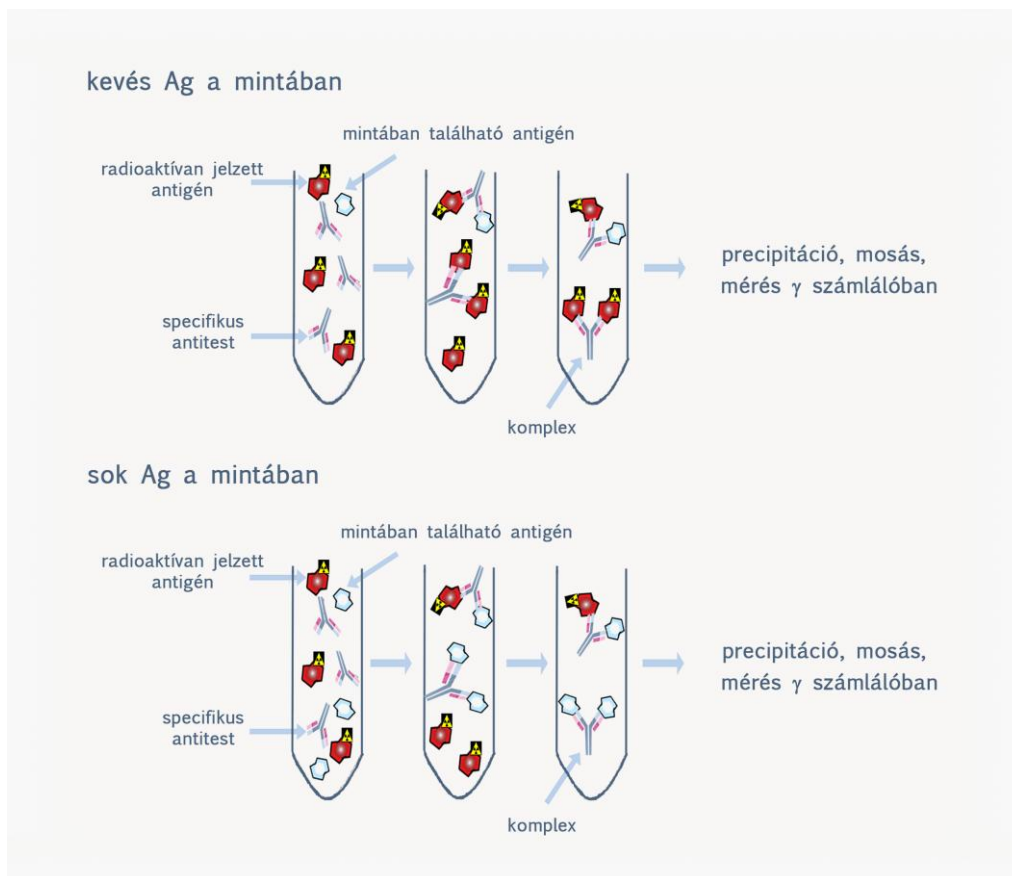
2.2.6.1. Radioimmunoassay (RIA)

Igen szenzitív, specifikus és rendkívül olcsó módszer, mely segítségével antigének pl. hormonok koncentrációja mérhető. Hátránya, hogy speciális berendezést (pl. gammaszámláló) igényel, és a radioaktív anyag alkalmazása miatt külön engedélyhez kötött, valamint fokozott elővigyázatosságot igényel. Egyik formája a RAST test (radioallergosorbent test).

Gyakran a fehérjék tirozin aminosavához kötünk I^{125} izotópot. A radioaktív antigént összekeverjük ismert mennyiségű antitesttel. Majd ismeretlen antigén mennyiséget tartalmazó biológiai mintát adunk a rendszerhez, mely esetben a biológiai mintában levő (hideg, jelöletlen) antigén verseng a jelölt antigénnel az antitesthez való kötődés során (2.13-14. ábra).



2.13. ábra: Az IRMA és a RIA elve



2.14. ábra: RIA

Az antitesteket megkötni képes *S. aureus* Protein A sejtalkivonata (Zysorbin), melynek segítségével vagy anti-immunoglobulin antitestek alkalmazásával az antitestek kiülepíthetők, elválaszthatók a jelöletlen antitestektől és mérhetők.

2.2.6.2. Immunoradiometric assay (IRMA)

Ebben a rendszerben polisztiirén csövek belső felületéhez kötött monoklonális antitesteket alkalmazunk. A betegek mintáit radioaktívan (I^{125} -dal jelölt) antitestekkel inkubáljuk. A mintákban található antigénhez egyidejűleg kötődik az immobilizált (cső falához kötött) jelöletlen és az oldatban található, radioaktívan jelzett antitest. Így végeredményben szilárd fázishoz kötött komplex jön létre. A le nem kötődő jelzett antitesteket mosással eltávolítjuk. A csövekben mérhető radiaktivitás arányos a betegekből származó minta antigéntartalmával. A kvantitatív kiértékelés ismert mennyiségű antigének felhasználásával készült standard görbe segítségével történik.

2.2.7. Immuncitokémia (Immunhisztokémia)

A módszer segítségével specifikus fehérjéket mutathatunk ki sejteken / szöveteken belül jelzett antitestek segítségével. Vizsgálhatunk metszeteket, keneteket és tenyésztett adherens sejteket, illetőleg sejtszuspenziót tárgylemezre centrifugálva (citospin preparátumok).

Az antigén / antitest kapcsolat láthatóvá tehető fluoreszcens festék, fémkolloid, radioaktív jelölés vagy enzim segítségével.

Sejten vagy sejtmagon belüli reakciókhoz az ellenanyag át kell, hogy jusson a biológiai membránokon. Permeabilizálás céljából detergenssek (0.25% Triton X-100 vagy 0.5% saponin) alkalmazására lehet szükség. Aceton, metanol vagy ethanol fixálás esetén további permeabilizálás nem szükséges. Triton alkalmazása kerülendő, ha membrán antigéneket szeretnénk kimutatni, mert a Triton tönkreteszi a membránokat.

Aldehyd alapú fixálószeresek esetén (pl. formalin) inter- és intramolekuláris keresztkötések (metilén hidak) jönnek létre bizonyos struktúrfehérjéken belül és fehérjék között, melyek maszkírozzák a szöveti antigéneket. Ez a maszkírozó hatás függ a fixálás idejétől, a hőmérséklettől, a fixálószer koncentrációjától, és a keresztkötéseket kialakítani képes lokális fehérjék mennyiségétől. A szöveti antigének demaszkírozására proteáz emésztés (pl. tripszin) vagy hevítés (pl. mikrohullámú sütőben, rövid ideig) alkalmazható.

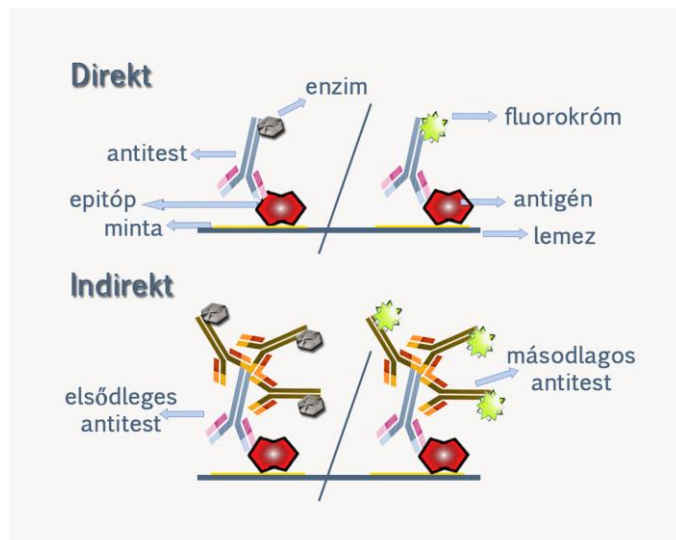
A fagyasztott illetve fixált metszeteket / preparátumokat tehát a fentiek alapján szükség szerint permeabilizáljuk, majd az aspecifikus kötőhelyeket blokkoljuk (bovin szérumból albuminnal, 1% zselatinnal vagy 10% normál szérummal, mely a szekunder antitestnek megfelelő fajból származik). Primer, majd mosásokat követően szekunder antitesttel inkubáljuk a metszeteket. Háttérfestésnek célszerű a magokat megfesteni (pl. 0.1-1 µg/ml Hoechst vagy DAPI (DNS festékkel). Aspecifikus festődés jöhet létre hidrofób vagy elektrosztatikus kölcsönhatások következtében. Az aspecifikus festődés többnyire egyenletes, és csökkenthető normál szérummal történő előinkubációval. Számos szövet endogén peroxidáz aktivitással rendelkezik. A metszet H_2O_2 -vel való előkezelése (a primer antitest alkalmazása előtt) segít kiküszöbölni az endogén peroxidáz aktivitást. Az ugyancsak számos szövetre jellemző endogén alkalikus foszfatáz aktivitás *levamisole*-al történő előkezeléssel eliminálható. Bizonyos szövetek (pl. máj és vese) endogén biotint tartalmaznak, ezért esetükben konjugátlan avidinnel történő előkezelést célszerű alkalmaznunk.

2.2.7.1. Direkt módszer

Egyetlen lépésben jelölt antitesttel (pl. FITC jelzett antitesttel) inkubáljuk a mintát. Gyors, rövid, specifikus módszer, de kevésbé szenzitív.

2.2.7.2. Indirekt módszer

Jelöletlen primer antitest képezi az első réteget, ez az antitest reagál a szöveti antigénnel. Ezt követően egy jelölt másodlagos antitest (második réteg) kerül felhasználásra. Ez az antitest reagál a primer antitest fájának immunglobulinjával. Ez a módszer szenzitívebb (a jel amplifikálódik, hiszen számos szekunder antitest molekula reagál a primer antitest különböző epitópjaival). A miatt is gazdaságos, hogy egyetlen jelölt szekunder antitest használható sok különböző primer antitest esetén második „réteggént”. Immunfluoreszcens jelölés során a jelölő fluoreszcens molekula FITC, rhodamin vagy Texas vörös, az immunenzimátikus jelölés során peroxidáz vagy alkalikus foszfatáz (2.15. ábra).



2.15. ábra: Az immuncitokémia elve

2.2.7.3. Kontrollok

Pozitív kontrollt alkalmazunk annak megítélésére, hogy a protokoll maga működik-e. Olyan szövetet célszerű alkalmaznunk, mely esetében a reakciónak ismert módon működnie kell.

Negatív kontroll: az antitest specifikitásának megítélésére alkalmazandó. Kihagyhatjuk a primer antitestet, illetőleg azonos fajból származó izotípus kontroll antitesttel vagy normál szérummal helyettesíthetjük.

Új antitestek alkalmazása esetén a primer antitestnek tisztított antigénnel történő előinkubációjával (kimerítés) gátolni kell a reakciót.

2.2.7.4. PAP Method (peroxidase anti-peroxidase módszer)

Indirekt technika, melyben 3 „réteg” szerepel: jelöletlen primer antitest, jelöletlen szekunder antitest, mely egyrészt reagál a primer antitesttel, másrészt hidat képez (reagál) a harmadik „réteggel”: ez stabil peroxidáz anti-peroxidáz komplex. A szenzitivitása kb. 100-1000x nagyobb, mert a peroxidáz immunológiai és nem kémiai kötött, így jóval nagyobb primer antitest hígítást alkalmazhatunk, csökkentve az aspecifikus kötődést.

2.2.7.5. Avidin-Biotin Complex (ABC) módszer

Ebben a módszerben is három „réteg” szerepel. Az első „réteg” jelöletlen primer antitest. A második „rétegben” biotinilált szekunder antitest található, míg a harmadik „réteg” avidin-biotin peroxidáz komplexet tartalmaz.

2.2.7.6. Fluoreszcencia mikroszkóp és lézer konfokális mikroszkópia

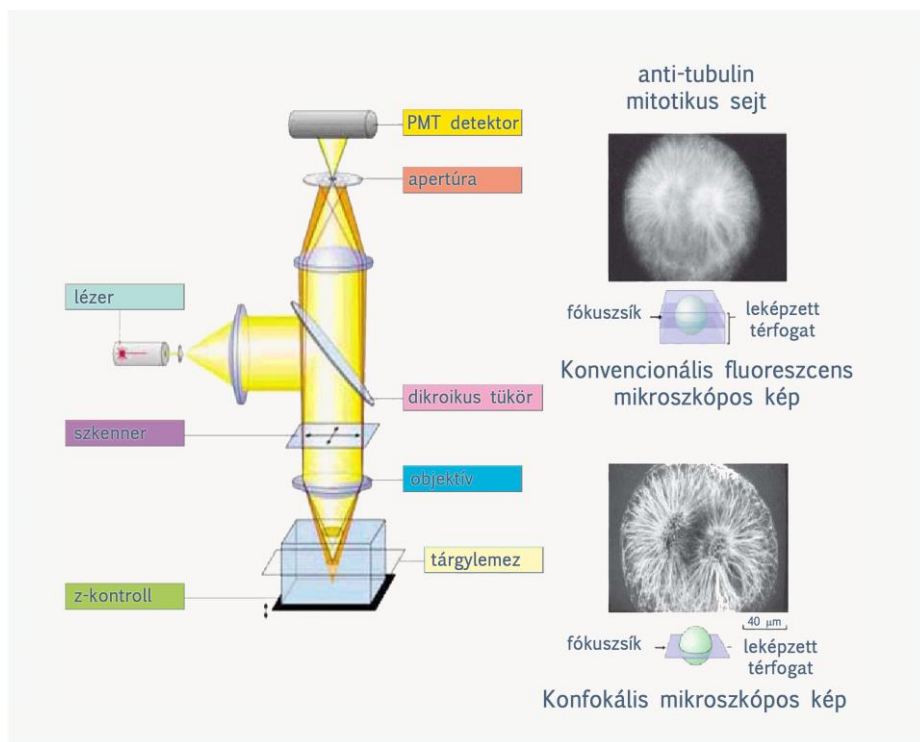
A fluoreszcens (immuncitokémiai) minták vizualizálásához fluoreszcens mikroszkóp szükséges.

A fluoreszcencia mikroszkópban a megvilágító rendszerből érkező kisebb hullámhosszúságú gerjesztő fényt (általában UV, mely károsítaná a szemet) az objektív és az okulár közé helyezett

színszűrő elnyeli, a megfigyelő szemét vagy a fényérzékeny filmet csak a minta által kibocsátott hosszabb hullámhosszúságú fény éri el. Ezzel láthatóvá tehetők a preparátumban lévő fluoreszkáló struktúrák.

Ez a fluoreszcencia származhat természetes sejtkomponensekből (autofluoreszcencia, pl. A vitamin) vagy fluorokrómokkal (fluoreszkáló festékekkel) megfestett sejtalkotókból (lásd fent). Egyes fluorokrómok változtatják a kibocsátott fény hullámhosszát (színét) a pH vagy a Ca^{++} koncentráció függvényében. Ezek felhasználhatók a sejten belüli pH vagy Ca^{++} koncentráció mérésére.

Szintén fluoreszcens optikával van felszerelve a lézer konfokális mikroszkóp (LCM). Ebben az eszközben egy nagyon vékony lézer nyaláb pásztázza végig a mintát. A lézer sugár fókuszpontja a minta mélységében is változtatható, a preparátum rétegeiről nyert információ számítógépben tárolható és összesíthető (2.16. ábra). Így vastagabb minták is vizsgálhatók a harmadik dimenzió információinak elvesztése nélkül. A számítógép által rekonstruált kép tv monitoron jelenik meg. Ezzel a módszerrel helyettesíthető az igen idő- és munkaigényes sorozatmetszés és 3D-rekonstrukció.



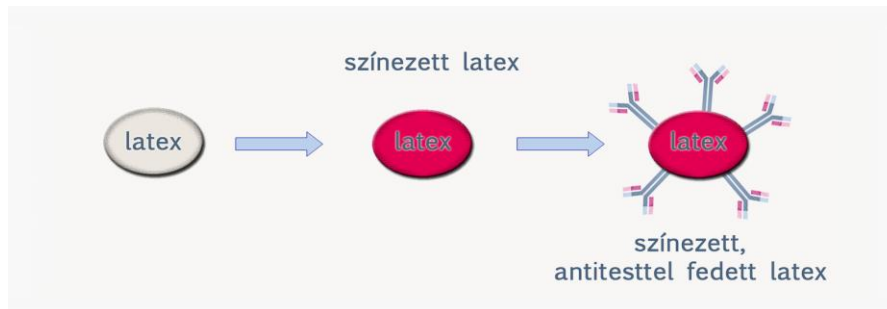
2.16. ábra: A lézer konfokális mikroszkóp működésének elve

2.2.8. Lateral flow tesztek

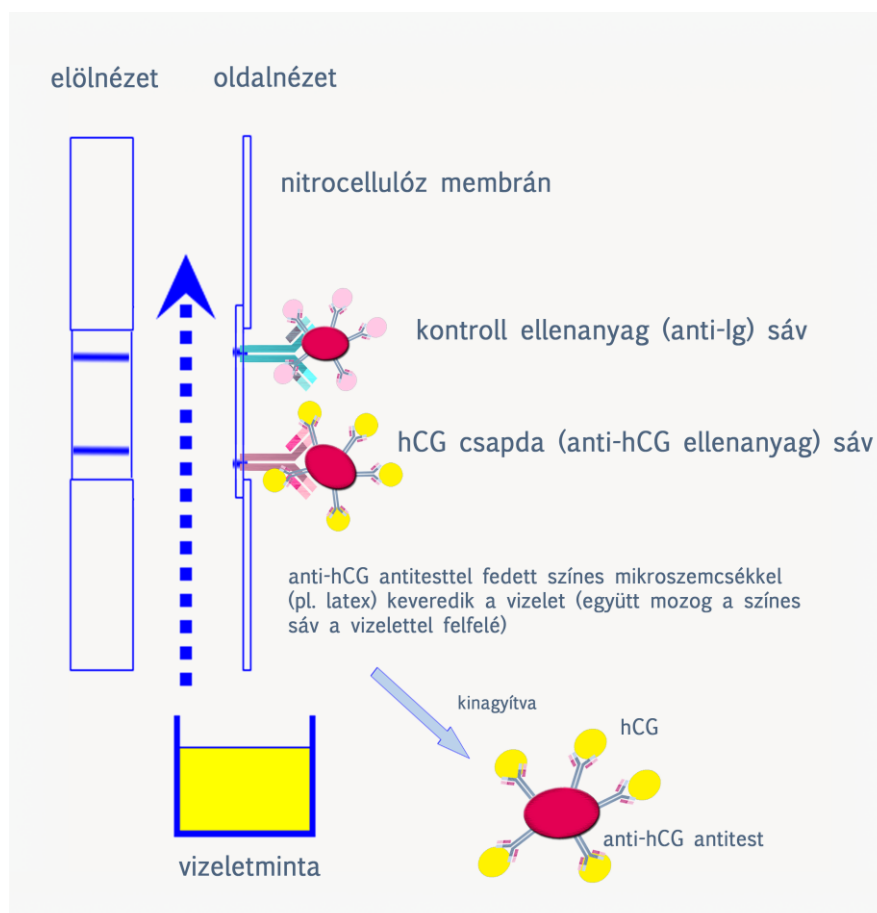
Napjainkban mind szélesebb körben alkalmazott egylépcsős immunkromatográfiás immunoassay / immunkromatográfiás módszeren alapuló gyors tesztek. Előállításuk olcsó, kivitelezésük percek alatt igénybe (szemben a hagyományos assay-k órákban mérhető idejével), nem igényelnek szakértelmet, otthon is elvégezhetők, az eredmények könnyen archiválhatók.

Az alaptermésztéket az 1960-as években fejlesztették ki, de az első *lateral flow* alapú terhességi teszt csak 1988-ban került kereskedelmi forgalomba. Azóta a *lateral flow* tesztek igen széleskörben alkalmazzák klinikai, állatgyógyászati, mezőgazdasági, élelmiszeripari és környezetvédelmi célra.

A módszer elve, hogy a biológiai mintába mártott tesztcsíkban kapillaritás elve alapján vándorol a folyadék. Színezett, a keresett antigénre specifikus antitesttel fedett mikroszemcsékkel (pl. latex) keveredik a minta, a benne található antigén hozzákötődik a színes mikroszemcsékhez, és vándorol a tesztcsík mentén (2.17-18. ábra).



2.17. ábra: Antitesttel fedett latex gyöngy



2.18. ábra: A *lateral flow* teszt elve

A tesztcsík adott pozíciójában a csík felszínéhez az adott antigén egy másik epitópjára specifikus antitestet szárítottak. Itt tehát a színezett szemcsék összegyűlnek, amennyiben a biológiai mintában jelen van a kérdéses antigén (pl. anti-hCG-t, LH-t vagy HIV-et). A továbbvándorló színezett szemcsék a tesztcsík mentén még egy helyen összegyűlnek, ebben a pozícióban egy anti-immunoglobulint szárítottak a felszínre, ez tehát minden mikroszemcsét megköt tekintet nélkül arra, hogy annak felszínéhez antigén kapcsolódott-e. Ez a kirajzolódó második színes csík tehát a teszt belső kontrollja.

A tejjesség igénye nélkül néhány kereskedelmi forgalomban elérhető *lateral flow* teszt: *H. pylori* IgG, *H. pylori* antigén (székletből), terhességi teszt, rotavírus, adenovírus, RSV, széklet hemoglobin, *Sterptococcus*, morfin, *E. coli* O157.

2.2.8.1. Multiplex immunoassay rendszerek

A közelmúltban mind elterjedtebbé vált a multiplex immunoassay-k alkalmazása.

A multiplex rendszerek előnyei a következőkben foglalhatók össze:

1. nagy áteresztőképességű vizsgálati rendszereket jelentenek
2. alkalmazásuk esetén kisebb térfogatú mintára van szükség
3. idő és költséghatékony rendszerek
4. lehetőséget nyújtanak arra, hogy egy adott molekula szintjét több másikkal együtt mérjük
5. lehetőséget teremtenek arra, hogy különböző fehérjéket széles dinamikus tartományban mérjünk

Kereskedelmi forgalomban vannak olyan multiplex rendszerek (pl. Proteome Profiler Arrays), melyekben membránokra duplikátumban előre felvittek gondosan kiválasztott specifitású elfogó (capture) antitesteket. Ezek a rendszerek kemilumineszcens kimutatási elven alapulva működnek.

Léteznek 96 „Antibody Array” rendszerek, mely esetében 96 lyukú microplate alapú rendszerben többféle molekula párhuzamos kimutatására nyílik lehetőség (Mosaic™ ELISAs). A mozaik ELISA rendszerek esetében a 96 lyukú lemezek egy-egy lyukának fenekére akár 8-16 antitestet is köthetünk egy-egy kicsi foltszerű pozícióban. Arra is van mód, hogy 384 lyukú lemez formátumban, egy-egy lyukban akár 25 különböző capture antitest foltszerű felvitele után végezzünk vizsgálatot. Minden egyes folt különböző capture antitestet vagy fehérje populációt képvisel. Ezekben a rendszerekben is kemilumineszcens jel detektálására kerül sor, és a digitális kamerával rögzített kemilumineszcens kép alapján történik a kiértékelés.

2.3. Az alkalmazandó immunoassay kiválasztásának szempontjai

1. A legegyszerűbb és legolcsóbb vizsgálat a lateral flow gyorsesztekkel végezhető. Amennyiben beszerezhető a vizsgálni kívánt molekulákra specifikus, pl. terhesség vagy fertőzések kimutatására szolgáló gyorsesztest, percek alatt, szakképzettség nélkül kaphatunk választ igen-nem típusú kérdésekre.
2. Amennyiben szérumban vagy vérplazmában található antitestek vagy antigének szintjét kívánjuk meghatározni, de kereskedelmi forgalomban levő gyorsesztest nem áll rendelkezésre, az ugyancsak viszonylag egyszerű és olcsó ELISA reakció az elsődleges választás. Szükség lehet az antitestek (és antitest izotípusok) szintjének meghatározására immundeficiencia gyanúja esetén, fertőzőes állapotokban, allergiás és autoimmun megbetegedésekben. E mellett antitestszint mérésével követhetjük nyomon az immunsuppressziót. Összeállíthatunk magunk „házilagosan” is ELISA rendszert, ebben az esetben külön be kell szereznünk a *plate*-eket, az antigént, a szekunder antitest konjugátumot, valamint pozitív és negatív kontroll

szérumot vagy plazmát a vizsgálandó minták mellett. Jóval költségesebb, ha kereskedelembe hozzáférhető ELISA kit-et választunk. Ebben az esetben ugyanakkor standard és optimalizált ELISA reakciókat végezhetünk a gyártó által javasolt protokoll alapján. Rutin diagnosztikus tesztként a kereskedelmi kitek alkalmazása garantálja a standard és reprodukálható méréseket.

3. Amennyiben az ELISA érzékenysége nem elegendő, a RIA választandó módszer (pl. hormonszintek meghatározására). A RIA viszonylag olcsó eljárás, de az alkalmazott radioaktív anyagok miatt elővigyázatosságot és speciális műszer háttérrel (gamma-számláló) igényel.
4. Autoimmun diagnosztikában elengedhetetlen az indirekt immuncitokémia alkalmazása antinukleáris, szervspecifikus autoantitestek vagy pl. ANCA (anti neutrophil cytoplasmatic antitest) kimutatására.
5. Amennyiben sejtszuspenziók sejtjeit szeretnénk mérni az áramlási citometriát alkalmazzuk. Rutinban sejtfelszíni antigének (CD antigének) azonosítása alapján limfocita alpopulációkat azonosíthatunk. A módszerrel külön fejezet foglalkozik.
6. A Western bolt vizsgálatokat idő és munkaigényes voltak miatt rutinvizsgálatok céljára nem alkalmazzuk, kiegészítő/diagnózist megerősítő tesztként illetőleg kutatási célra alkalmazzuk.
7. ELFA rendszert laboratóriumi rutindiagnosztikában alkalmazzák (egyetemünkön is). Érzékeny, standard technika, mely azonban speciális műszer háttérrel igényel.
8. Az ELISPOT vizsgálatok alkalmazása a fenti módszerekhez képest viszonylag kevésbé elterjedt. Bizonyos molekulákat (elsősorban citokineket) szecernáló sejtek számának meghatározásával elsősorban celluláris immunológiai vizsgálatokra alkalmazható. Kutatási célú felhasználása során fertőzőes, tumoros, allergiás és autoimmun állapotokban detektálhatjuk az ELISPOT rendszer alkalmazásával a specifikus immunválaszt. Az ELISPOT igen fontos alkalmazási területe a vakcinafejlesztés során (vírus illetőleg tumor elleni vakcina tesztelése), illetőleg a T sejt reaktivitás monitorozása specifikus immunterápia során.
9. A multiplex vizsgálatok – annak ellenére, hogy viszonylagosan gazdaságos mérési lehetőséget kínálnak nagyszámú paraméter egyidejűleg történő meghatározására – összességükben mégis igen magas költségigényűek, ezért jelenleg elsősorban az alapkutatásban alkalmazzuk őket.

2.4. Feladatok

2.4.1.1. Lateral flow assay

- 1) Ismeretlen vizelet mintákból határozzák meg kereskedelmi forgalomban kapható lateral flow assay segítségével, hogy melyik származik terhes nőtől!
- 2) A 2.3. táblázatból válassza ki, hogy min alapszik ez az eljárás!

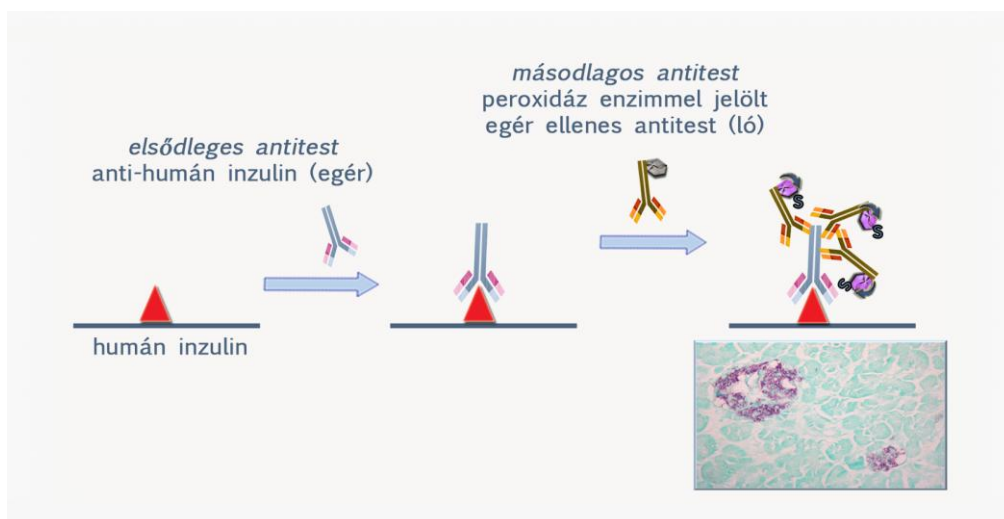
2.4.1.2. Indirekt immuncitokémiai preparátum tanulmányozása

3) Figyelje meg fénymikroszkóppal az inzulin tartalmú sejteket a hasnyálmirigy metszetében!

Az eljáráshoz humán hasnyálmirigy paraffinba ágyazott metszeteit használtuk. A paraffin kioldása után a metszeteket (egérben termelt) humán inzulin ellenes antitestekkel inkubáltuk. A pufferoldatban történő mosást követően biotin jelölt (lóban termelt) szekunder ellenanyagot használtunk. Mosás után a szendvics negyedik tagjaként a metszeteket sztreptavidin-peroxidáz konjugátummal kezeltük. (A szendvics tagjai: antigén, primer antitest, biotin jelölt szekunder antitest, sztreptavidin-peroxidáz konjugátum). Ezt követően a peroxidáz enzim aktivitását lila színű csapadék formájában hívtuk elő. Háttérfestésként a sejtek magjait metilzölddel festettük meg.

Az indirekt immunreakció eredménye:

A hasnyálmirigy Langerhans szigeteinek béta-sejt csoportjai lila színűek (2.19. ábra). A festődés a citoplazmában kis szemcsék (szekréciós granulumok) formájában látható.



2.19. ábra: Az indirekt immuncitokémia elve és alkalmazása a hasnyálmirigy inzulint termelő sejtjeinek a kimutatására

3. ANTITEST-ANTIGÉN KÖLCSÖNHATÁSON ALAPULÓ MÓDSZEREK II.: IMMUNSZEROLÓGIA (FALUS ANDRÁS, NAGY GYÖRGY)

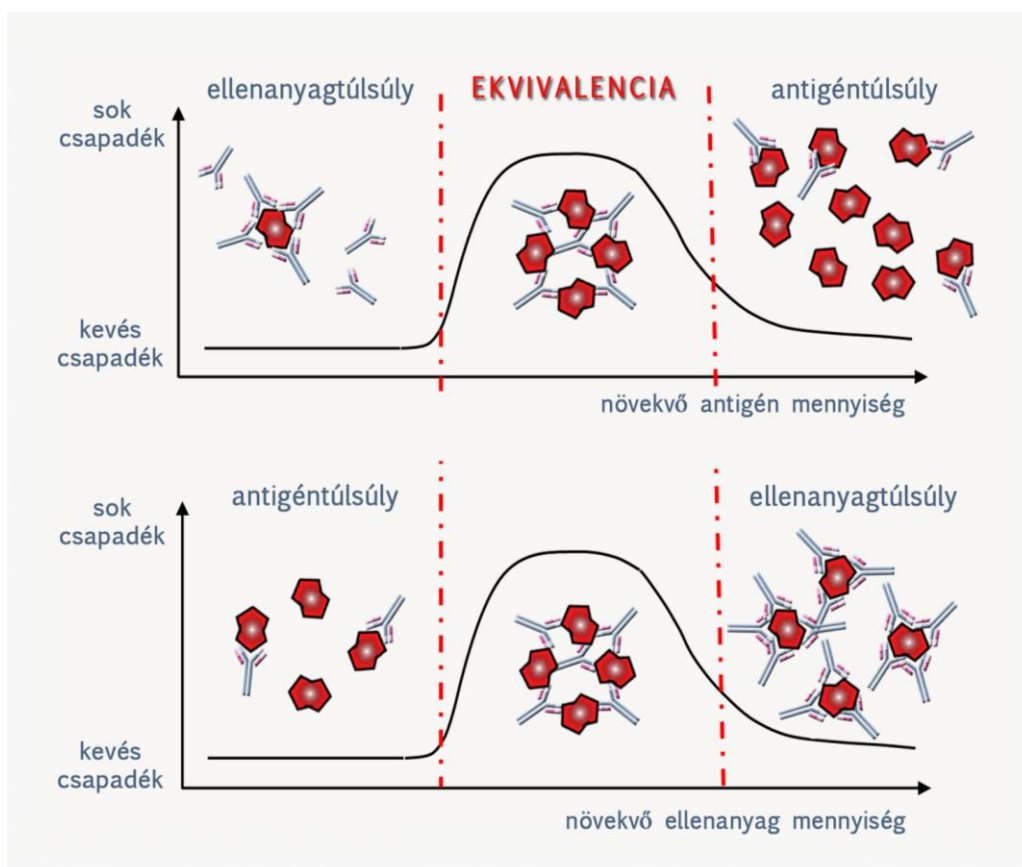
A szerológia eredetileg a vérszérum vizsgálatát, annak módszereit jelentette. Ma már kicsit szélesebb értelemben használják ezt az elnevezést, hiszen hasonló módszerek alkalmazhatók egyéb testfolyadékok (vizelet, liquor) analízisére is. Az oldott fehérjék vizsgálatára szolgáló néhány módszert (ELISA, RIA, immunoblot) az előző fejezetben tárgyaltunk.

3.1. Immunkomplex és immunprecipitátum

Az antigének nagy része jelentős számú különböző antigén determinánssal rendelkezik, továbbá az antitestek egy része (különösen a pentamer IgM) egyszerre több antigénhez is kötődhet. Így antigéneket és antitesteket tartalmazó immunkomplexek állhatnak össze. Clemens von Pirquet és Schick Béla írta le első alkalommal (1906-ban), hogy gyermekek immunizálása lóban termeltetett diftéria antiszérummal az immunizálást követő 7-14 napon nagy mennyiségű immunkomplex megjelenésével járó ún. szérumbetegséghez vezet¹, Pirquet és Schick feltételezték, hogy a betegséget a gyermekekben a lószérum ellen termelődő antitestek okozzák, oly módon, hogy az antitestek az általuk felismert antigénekkal immunkomplexet alkotva különböző szervekben lerakódnak. Évtizedekkel később Gertmuth és Dixon a szérumbetegséget nyúlban vizsgálva igazolta Pirquet és Schick hipotézisének helyességét. Gertmuth és Dixon kísérletei során nyulak idegen eredetű, például szarvasmarha szérumot kaptak. Az idegen eredetű antigének szintje folyamatosan csökkent, majd 10-12 nappal a szérum beadását követően igen gyors antigén csökkenést mértek. Ezzel egy időben a nyulakban az idegen eredetű antigének ellen antitestek termelődnek, immunkomplexek alakulnak ki, amelyek különböző szervekben, például a vesében lerakódtak. Az immunkomplex szint csökkenéssel a tünetek megszűnnek, újabb idegen fehérje expozícióval ismételten indukálható a betegség. Ha mérjük az állatokban az idegen antigén, antitest és immunkomplex szintet, a betegség három szakaszát különíthetjük el: kezdeti antigén túlsúly, equivalencia és antitest túlsúly. Az első szakaszban kevés immunkomplex képződik antitestek hiányában, a második szakaszban kevés a szabad antigén, vagy antitest és magas immunkomplex szint mérhető, míg a harmadik szakaszban nagyméretű immunkomplexek képződnek folyamatosan csökkenő mennyiségben, majd az immunkomplexek eltűnnek a keringésből. Az immunkomplexek proinflammatorikus hatása jelentős részben komplementaktiváló képességük következménye. Kísérletesen indukált szérumbetegségben a C3 és C4 komplement proteinek szintje a komplement aktivációval párhuzamosan csökken.

¹ Schick Béla magyar származású gyermekgyógyász, Balatonbogláron született, Ausztriában nőtt fel és a Mount Sinai Kórházban dolgozott New Yorkban.

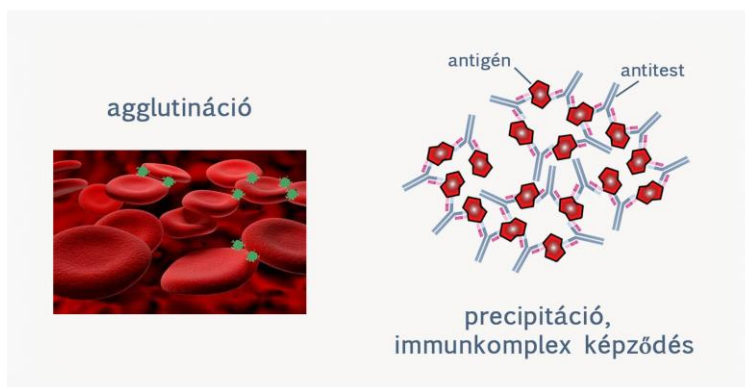
A szérumbetegség emberben Schick és Pirquet eredeti megfigyelései szerint többnyire lázzal, lymphadenopathiával, polyarthritissel, proteinuriával és utricariával jár. 7-14 nap alatt az antigén koncentráció csökkenés és az antitest koncentráció-növekedés az immunkomplex képződéshez optimális mennyiségű antigén / antitest arányhoz vezet, ezért alakul ki ebben az időszakban a betegség. Az **immunkomplexek az antigének és antitestek oldható komplexei** és mennyiségük függ a rendelkezésre álló antigének és antitestek arányától. Az ellenanyag, vagy az antigén mennyiségének növelésével (ellenanyagtúlsúly, antigéntúlsúly) az immunkomplexek mennyisége csökken (3.1 ábra).



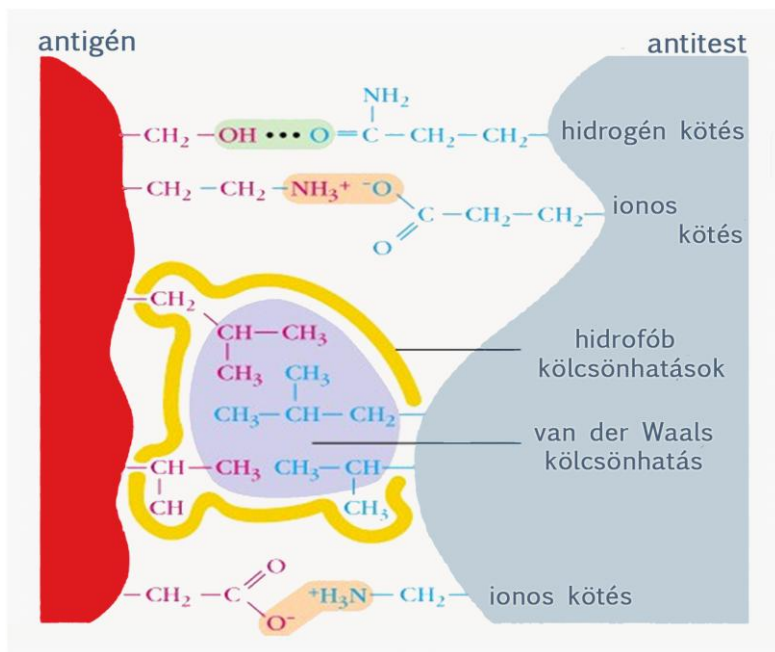
3.1. ábra: Az immunkomplex-képződés koncentrációviszonyai

Az immunkomplex képződést befolyásolja a pH, hőmérséklet, sókoncentráció, az antitestek szerkezete (monomer, dimer, pentamer). Az **immunkomplexek kicsapódása precipitációhoz vezet, mely** szabad szemmel is látható. A precipitátum **oldhatatlan csapadék**. Sejtekkel összemérhető méretű antigének összekapcsolódását **agglutinációnak** nevezzük (3.2. ábra).

3.2 ábra:
Agglutináció és precipitáció



Antigén, antitest kötés gyors és reverzibilis reakció, melyet nem kovalens kapcsolatok hoznak létre, így ionos kötés, van der Waals kötés és hidrogénhíd (3.3. ábra). Számos, a napi gyakorlatban és a kutatásban alkalmazott módszer alapul antigén / antitest reakción.

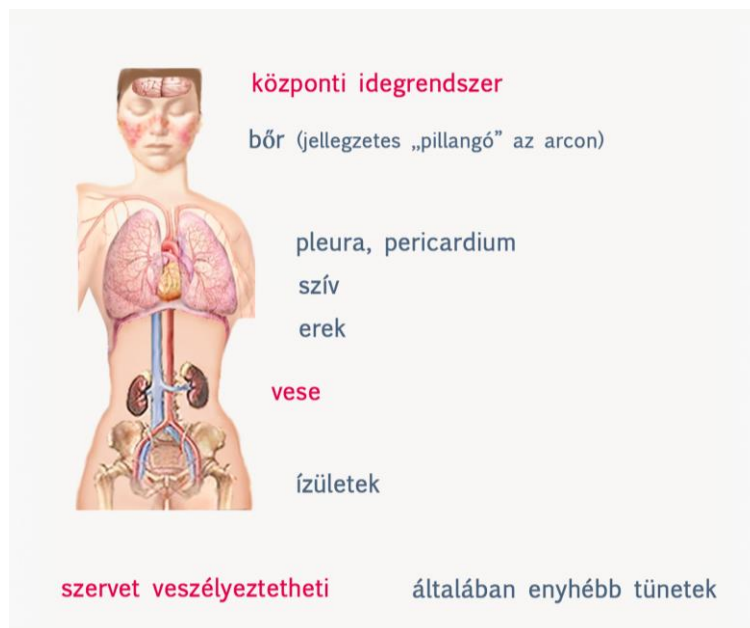


3.3 ábra: Antigén és antitest közötti kémiai interakciók

Az immunkomplexek biológiai hatásait megszabja, hogy milyen affinitással kötődnek sejtfelszíni receptorokhoz (például Fcγ receptorral rendelkező fagocitákhoz), milyen mértékben rakódnak le szövetekben, szövetekben (pozitív töltésű immunkomplexek nagyobb valószínűséggel rakódnak le a glomerulusokban) és mennyire hatékonyan aktiválják a komplementrendszer. A komplementrendszer a természetes immunrendszer részét képező, kaszkádszerűen aktiválódó, hőre igen érzékeny enzimrendszer (lásd a komplement rendszerről szóló 4. fejezetet is).

Az immunkomplexek eltávolításában jelentős szerepet játszanak a vörösvértestek felszínén lévő komplement receptorok. Amint említettük, az immunkomplexek komplementet aktiválnak és így gyakran komplement komponenseket is tartalmaznak. A vörösvértestek felszínén lévő CR1 receptorok megkötik a C3b, C4b komplement proteinek tartalmazó immunkomplexeket, majd a májon áthaladva az immunkomplexek a Kupffer sejtek Fc receptorára kerülnek, hiszen ezek a receptorok nagyobb affinitással kötik az immunkomplexeket, mint a CR1 receptor. Az immunkomplexek átadása nem jár a vörösvértestek károsodásával, így a szabaddá váló kötőhelyeken újabb immunkomplexeket tudnak megőtni és a májba szállítani.

Egyes autoimmun betegségekre is komplement eltérések jellemzőek, különösen szisztémás lupus erythematosusban (SLE) van központi szerepe a komplementrendszer aktivációjának. Az SLE szisztémás autoimmun kórkép, különösen jellemző ebben a betegségben az autoantitestek széles spektruma, ezek közül a sejtmag alkotók ellen termelődő antitestek (anti DNS, ANA) a betegség diagnózisának felállításában is fontos. Az SLE szinte minden szervet megbetegíthet, klinikailag legfontosabb a vese és központi idegrendszeri érintettség (3.4. ábra).



3.4 ábra: Az SLE

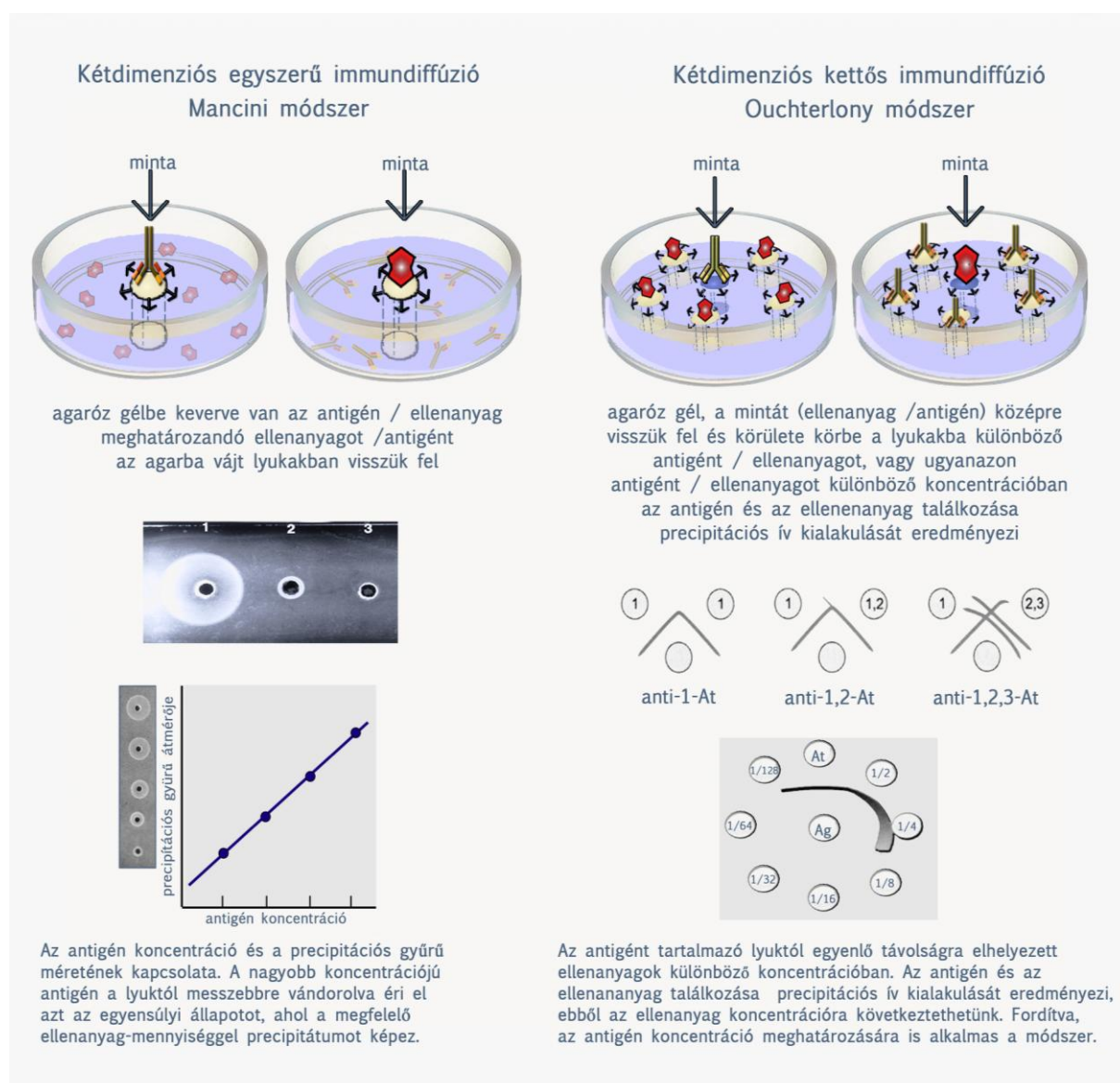
A különböző szervekben lerakódó immunkomplexeknek alapvető szerepük van a betegség patogénizálásában, az SLE az immunkomplex betegségek prototípusa. SLE-ben jellemző a C3 és C4 komplement komponens alacsony szintje a fokozott komplement aktiváció miatt, továbbá a komplement aktiváció során keletkező komplement fragmentumok, hasítási termékek szintje is magasabb SLE-ben (pl. C4a, szolubilis terminális komplex). A keringő immunkomplexek szintje magas SLE-ben (ebben fontos szerepe van a termelődő autoantitesteknek), fokozott a klasszikus és az alternatív út aktiváció mértéke is. SLE-ben folyamatosan fokozott immunkomplex képződés mérhető a betegek nagy részében, ez korrelál a komplement aktivációval, de független a betegség klinikai aktivitásától. A fent említett CR1 receptorok alacsonyabb szintjének szerepe lehet az SLE patomechanizmusában. Ritka betegség a teljes C1q hiány, ez 90 százalékos valószínűséggel SLE-hez vezet. A C2 és C4 faktor hiánya gyakoribb, az esetek 33-75 százalékában ezek is SLE-hez vezethetnek. Az immunkomplexek a keringésből főként a monocitákon található Fc receptorokhoz kötődve ürülnek ki. A gyengébb immunkomplex kötődést eredményező immunkomplex polimorfizmusok (pl. FcγRII és FcγRIII receptor polimorfizmusok) hajlamosíthatnak SLE-re (3.5. ábra).



3.5. ábra: Az immunkomplexek komplement aktivációját befolyásoló genetikai polimorfizmusok

Béta laktám antibiotikumok, szulfonamidok, tiazid diuretikumok szintén vezethetnek szérumbetegséghez. Fokozott immunkomplex képződéshez jellemző számos más immunmediált kórképre is, így cryoglobulinemiában, rheumatoid arthritisben, vagy leukocitoklasztikus vasculitisben. Immunkomplexek mérésére számos módszert dolgoztak ki, de még nem áll rendelkezésünkre olyan megbízható módszer, amivel a különböző méretű és összetételű immunkomplexek szintjét pontosan mérni lehetne. Immunszuppresszió (szteroid kezelés) többnyire hatékony immunkomplex betegségekben.

3.2. Kétdimenziós immundiffúzió



3.6 ábra: Immundiffúzió

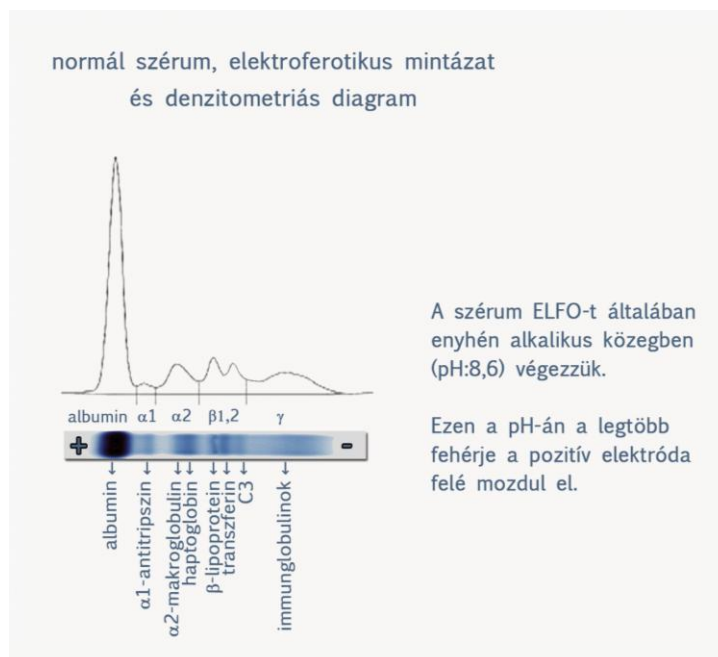
Mindkét módszer az antigén-antitest agargélben történő precipitációs reakcióján alapul.

Radiális immundiffúzió során (Mancini módszer) az antitest oldatot meleg (de nem forró) folyékony agaróz gélbe keverik, majd ezt öntik tárgylemezre és hagyják megszilárdulni. Az agaróz gélbe lyukakat vágunk és az antigén oldatokat ezekbe a lyukakba pipetázzuk. Nedves kamrában két-három napig hagyjuk diffundálni (amíg az antigén antitest egyensúly kialakul és precipitátum képződik. Ezután fixálás, szárítás és festés (pl. Coomassie) következik. Minél több az antigén, annál nagyobb körben diffundál szét az oldata a precipitátum kialakulásáig, tehát a kör területe arányos lesz az antigén koncentrációval (3.6. ábra) Antitest koncentrációt lehet így mérni, ha az agaróz gélbe immunglobulin ellenes antitesteket keverünk.

A kétdimenziós kettős immundiffúzió során (Ouchterlony módszer) agaróz gélbe lyukakat vágunk, egy lyukat az antigénnek és több ettől a lyuktól egyenlő távolságra lévőket az antitesteknek (vagy fordítva). Például az antigént a centrális lyukba, míg az ismeretlen antitest mennyiséget tartalmazó vizsgálandó mintát felező hígításban a körív mentén elhelyezkedő lyukakba öntik. Inkubációt, fixálást, szárítást és festést követően következtethetünk a minták antitest koncentrációjára (3.6. ábra). **Precipitációs titernek** nevezzük azt a legnagyobb antitest-hígítást, amely még precipitációt hoz létre.

3.3. Szérum elektroforézis

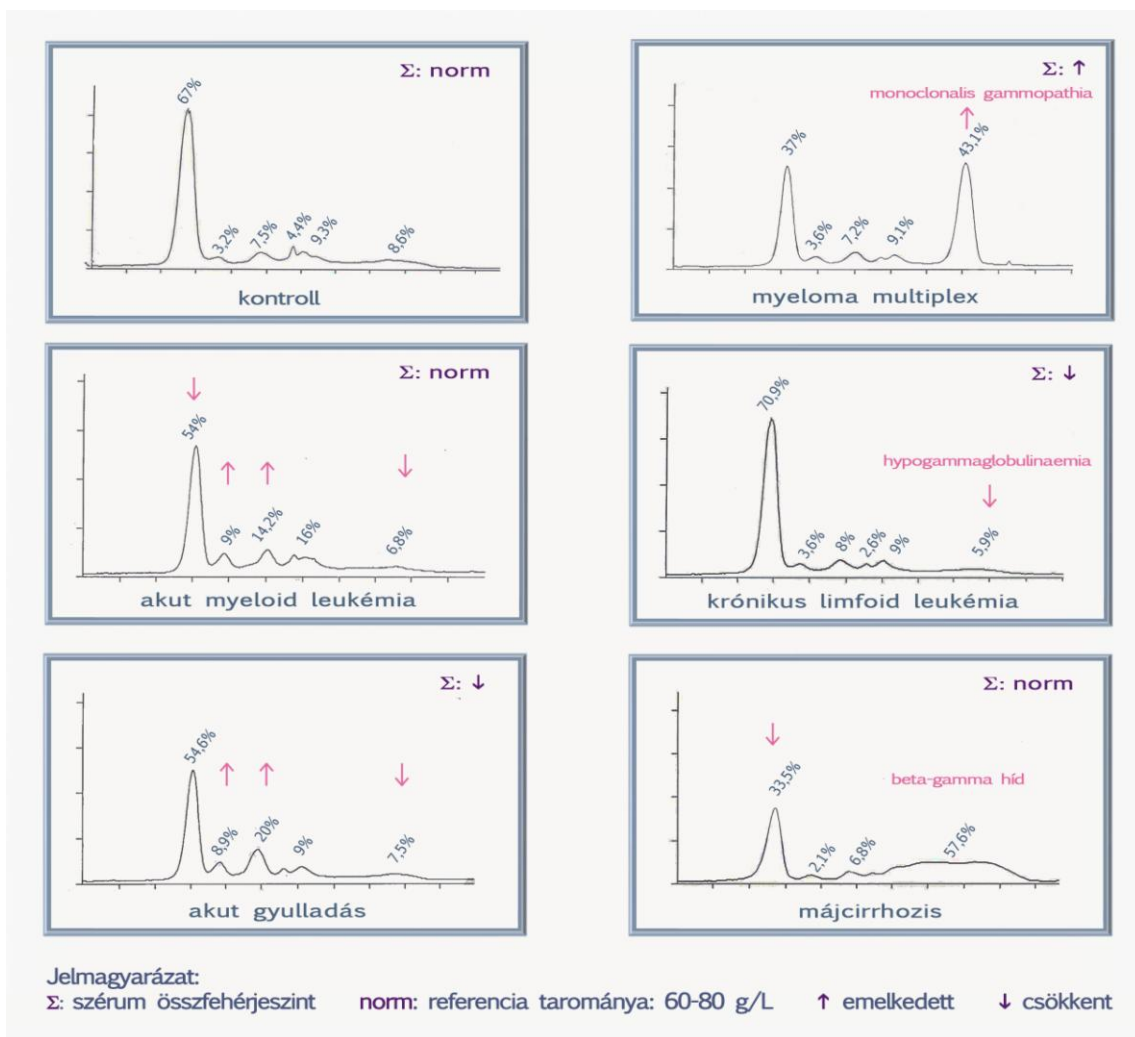
A klinikai napi gyakorlat részét képezi a szérum összfehérje meghatározás. Egészséges felnőtt szérumának összfehérje tartalma 60-80 g/l, ennek legnagyobb része (35-50g/l) albumin. Ha az összfehérje szint 60 g/l alatti, vagy 80 g/l fölötti értéket mutat, szérumfehérje elektroforézist kell végezni a fehérje tartalom pontosabb azonosítására. A szérum elektroforézis a fehérjék azon tulajdonságán alapul, hogy elektromos térben töltésük és méretük szerint vándorolnak. Így a fehérjék elektroforetikus mobilitásuknak megfelelően szétválnak. Ezt követően fehérjefestési módszerekkel (pl. Coomassie Brilliant Blue) a különböző mobilitású fehérjék láthatóvá tehetőek. Leggyorsabban vándorol elektromos térben a (tiroid hormonkötő) prealbumin frakció, míg a leglassabb az immunglobulin frakció vándorlása. A prealbumin frakció nagyon halvány, az ábrákon nem látható. Így elektroforézis során elkülönülő frakciók albumin, alfa globulinok (pl. cöruoplazmin, alfa-1-antitripszin, lipoproteinek), béta globulinok (pl. transferrin és beta-2- mikroglobulin) és gamma globulinok (immunglobulinok). Az elektroforetogramokat az jobb és kvantitatív kiértékelhetőség miatt denzitometrálják (3.7. ábra).



3.7. ábra: Szérum elektroforézis

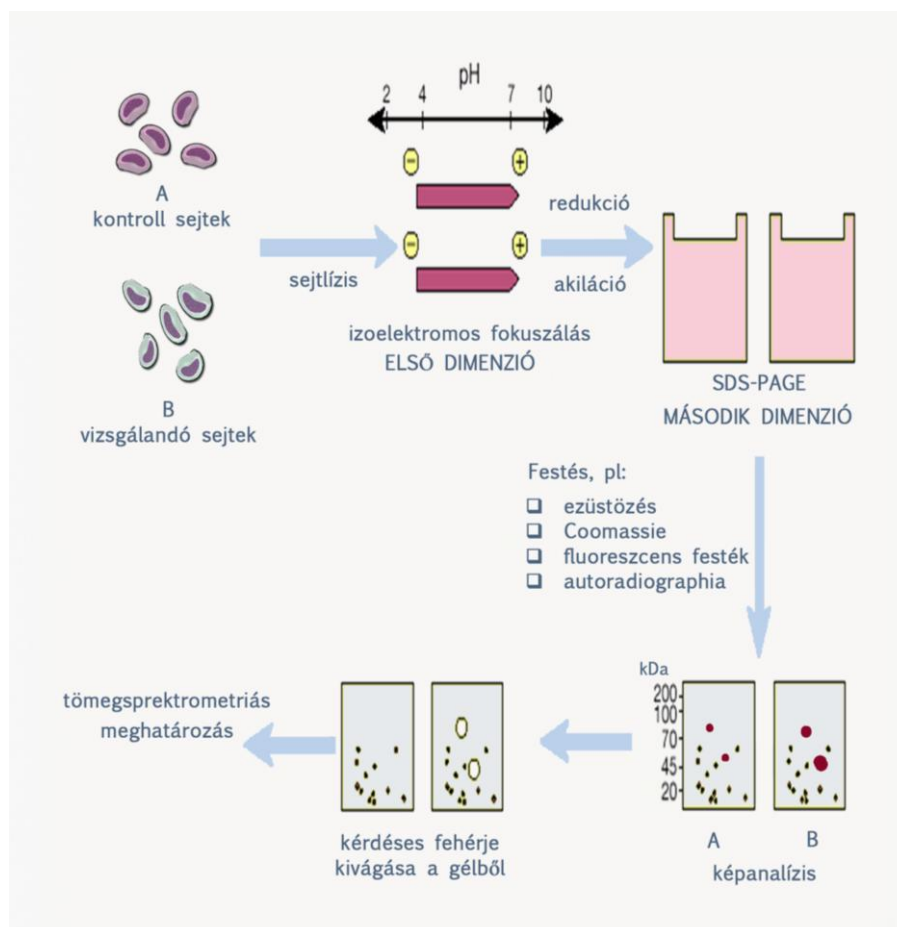
Az albumin szint csökkenésének hátterében állhat nephrosis szindróma, májbetegség, vagy krónikus gyulladásos betegség. Az alfa és béta globulinok mennyiségének eltérése szintén jelenthet betegséget. Poliklonális gammopátiák esetében a gamma-globulinok relatív arány megnövekszik, kiemelkedő hegyes csúcs (M-spike) nélkül. Krónikus májbetegségben nem gamma-globulinok mennyisége több, hanem az egyéb plazma fehérjék termelődnek kisebb mennyiségben. A gamma-globulinok ténylegesen emelkedhetnek lehetnek krónikus gyulladás (SBE: subacute bacterial endocarditis, fertőzés (pl. AIDS) esetén vagy autoimmun betegségekben.

Monoklonális gamma globulin szaporulat társulhat malignus haematológiai betegségekhez. Így például myeloma multiplexben egy malignus B limfocita klón proliferációja azonos immunglobulin láncok termeléséhez vezet. Ennek következtében magas szérumszfehérje szintet mérünk, gyakran normál tartományba eső albuminszint mellett. Myeloma multiplexben vörösvértest süllyedés jelentősen gyorsult (jellemzően 100mm/óra fölötti érték), ugyanakkor a gyulladást jelző CRP értéke a normál tartományban van az esetek jelentős részében. Magas süllyedés és összfehérje mellett normál CRP szint esetén myeloma multiplexre gondolni kell. Ebben a kórképben a gyorsult süllyedés oka nem a gyulladás, hanem a termelődő monoklonális immunglobulin, amely a vörösvértest süllyedést befolyásolja. Hegyes csúcs (M-spike) a gamma régióban monoklonális gammopátiára utalhat, gyakran plazma sejt myeloma okozza. A többi gamma fehérje és albumin általában csökkent (3.8. ábra).



3.8. ábra: A szérumszfehérje elektroforetogram módosulásai különböző kórképekben

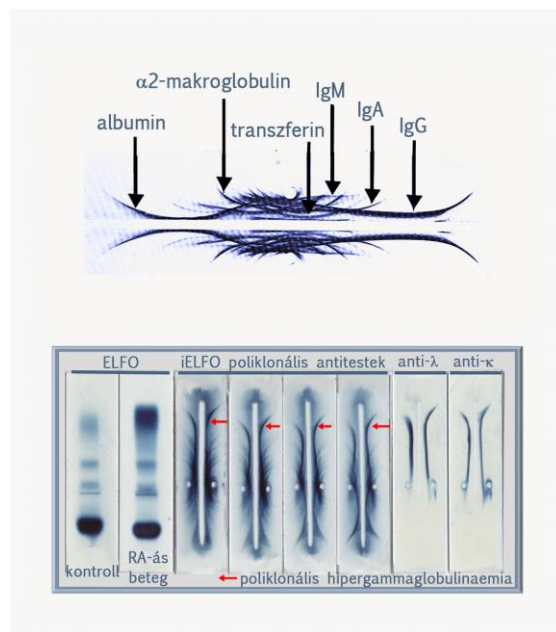
A módszer speciális formája a 2 dimenziós (2D) elektroforézis (3.9. ábra). 2D elektroforézis során a minták összetevői izoelektromos pontjuk és moláris tömegük szerint két irányba is elválnak egymástól. Így lehetővé válik a klasszikus Western blot módszerrel nem elkülöníthető fehérjék azonosítása is. Kiértékelése bonyolult, ezért a kutatásban használják.



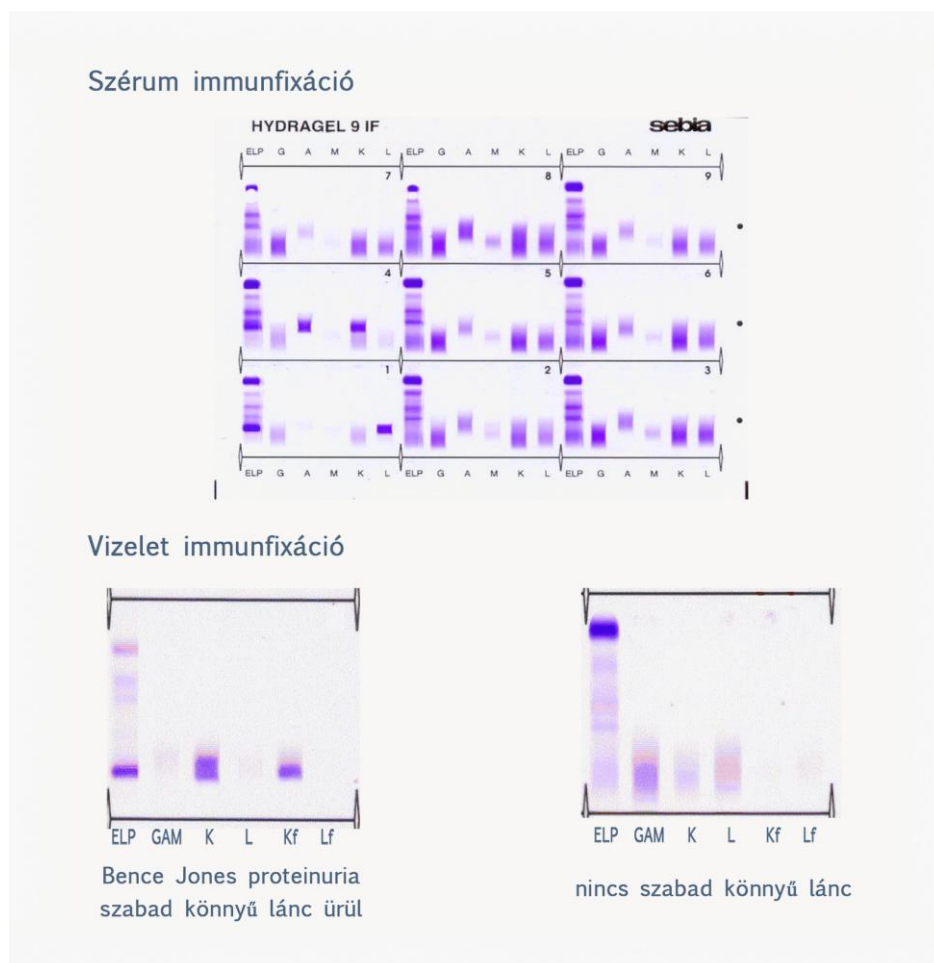
3.9. ábra: Kétdimenziós elektroforézis

3.4. Immunelektroforézis és immunofixáció

Az elektroforézisek speciális formája az immunelektroforézis is, mely alkalmas az immunglobulin láncok mennyiségi eltéréseinek diagnosztizálására. Az immunelektroforézis során az elektroforetikus fehérjeszétválasztást immundiffúziós eljárással (lásd fenn) kombinálják. **Immunelektroforézis** során a beteg széruma reagál anti-immunglobulin antitestekkel, a precipitációs ívek méretéből következtetnek az immunglobulinok mennyiségére. A precipitációs ívek alakjának és méretének megváltozása diagnosztikus értékű lehet. Nehézlánc és könnyűlánc specifikus monoklonális antitestekkel azonosíthatjuk az egyes szérum protein frakciókat. A kóros fehérjék azonosításához szükség lehet a vizsgálandó minták hígítására, a normál fehérjefrakciók ilyenkor fokozatosan eltűnnek, míg a kóros proteinek nagy mennyiségük miatt a hígított mintákban is jelen lehetnek (3.10. ábra).



3.10 ábra: Immunelektroforézis



3.11. ábra: Immunofixáció

Immunfixáció során agaróz gélben futtatják meg elektromos erőterben a mintákat. Ezt követően ezt követően specifikus antitesttel átitatott cellulóz csíkot helyeznek a gélre. Antigén antitest komplex jön

létre a megfuttatott fehérjék és az antitestek találkozásánál. Az immunfixációnak előnye az immunelektroforézissel szemben hogy gyorsabban kivitelezhető, jobban reprodukálható, érzékenyebb, könnyebben értékelhető és részben automatizálható módszer (3.11. ábra).

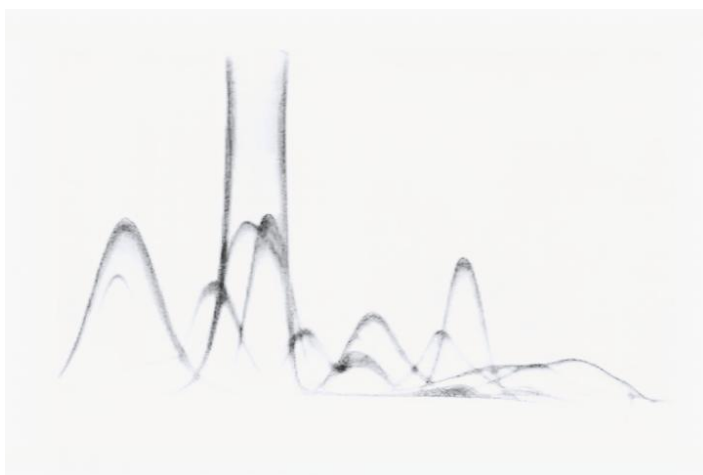
3.5. Rakéta elektroforézis

Az ellenanyagot az agaróz gélbe keverik, a mérendő mintát (antigént) pedig lyukakba helyezik el (a radiális immundiffúzióhoz hasonlóan), de ezek után elektromos árammal (elektroforézissel) segítik az antigén mozgását, ami így nem körkörös, hanem egy irányba történik. Ebben az esetben is a precipitátum által határolt terület lesz arányos az antigén mennyiségével, de jó közelítést ad a csúcsok magassága is (3.12. ábra).



3.12 ábra: Rakéta immunelektroforézis

3.6. Kétdimenziós immunelektroforézis



3.13. ábra: Kétdimenziós immunelektroforézis

Ebben az esetben az első dimenzióban egy szérum elektroforézist végeznek, majd erre merőlegesen (második dimenzió) polivalens antitest tartalmú agaróz gélbe vándoroltatják az elektroforézissel szétválasztott fehérjéket. Nagyon látványos képet kapunk, de a kiértékelés bonyolultsága miatt rutinban nem használatos (3.13. ábra).

3.7. Turbidimetria és nephelometria

Antigén, antitest kapcsolódáson alapuló rutin klinikai gyakorlatban is alkalmazott módszerek a turbidimetria és a nephelometria. Kolloid oldaton átbocsátott fény intenzitása a kolloid részecskék fényszórása miatt gyengül. A fény intenzitásának gyengülése arányos az oldat turbiditásával (zavarosságával). Tehát a turbidimetriánál az átbocsátott fény csökkenését mérik. Meghatározandó

szérumfehérje és a módszer során alkalmazott (monoklonális, vagy poliklonális) antitest antigén ellenanyag komplexet hoz létre, ennek fényáteresztő képességén alapuló módszer a turbidimetria. Állandó ellenanyag koncentráció mellett az antigén koncentráció növelésével fokozódik az oldat zavarossága, így standard görbe vehető fel. Ennek alapján az ismeretlen antigén koncentráció meghatározható. A turbidimetria érzékenysége hozzávetőleg 50 µg/ml.

A nephelometria a kolloid részecskéken szórt fény mérésén alapuló módszer. A nephelometria nagy érzékenységű, speciális formája a lézernephelometria, ahol lézerfény a fényforrás. Nephelometriával, vagy turbidimetriával szérumfehérjék koncentrációja meghatározható, így gyakran alkalmazzák ezeket a módszereket albumin, immunglobulin, transferrin, lipoprotein, vagy komplement fehérjék mérésére. Turbidimetria néhány alkalmazásánál nem szükséges antitest így a módszer alkalmazható baktérium növekedés mérésére, ezen keresztül antibiotikum érzékenység megállapítására, vagy véralvadás vizsgálata során alvadási idő meghatározására (3.14. ábra).



3.14. ábra: Turbidimetria és nephelometria

3.8. A szerológiai módszerek alkalmazása

Immundiffúzió: pl: bakteriális, virális és gomba antigének jellemzésére

- radiális egyszerű (Mancini-módszer): antigének mennyiségének összehasonlító vizsgálata, szérum fehérjék (immunoglobulin izotípusok [IgM, IgG, IgA], akut fázis fehérjék, transferrin, komplement komponensek) mennyiségi meghatározása különböző testfolyadékokban, ellenanyagok mennyiségi meghatározása

- radiális kettős (Ouchterlony módszer): precipitációs ekvivalencia zóna becslése, precipitáló ellenanyagok relatív szintjének (titerének) meghatározása, állandó ellenanyag koncentráció mellett az antigén mennyisége is megbecsülhető

Elektroforézis:

- immunoelektroforézis: szérumból fehérjék frakciókba való elválasztása, plazmasejt rendellenesség (myeloma multiplex, elsődleges amiloidózis) során képződő, monoklonális eredetű immunoglobulinok kimutatása
- rakéta elektroforézis: antigén/ellenanyag koncentráció meghatározása
- két-dimenziós elektroforézis: elektroforetikus mobilitás alapján szétválasztott frakciók (pl: szérumból fehérjék) koncentrációjának meghatározása, szérumból, vizeletből, cerebrospinalis folyadék fehérje összetételének kvantitatív és kvalitatív vizsgálata.

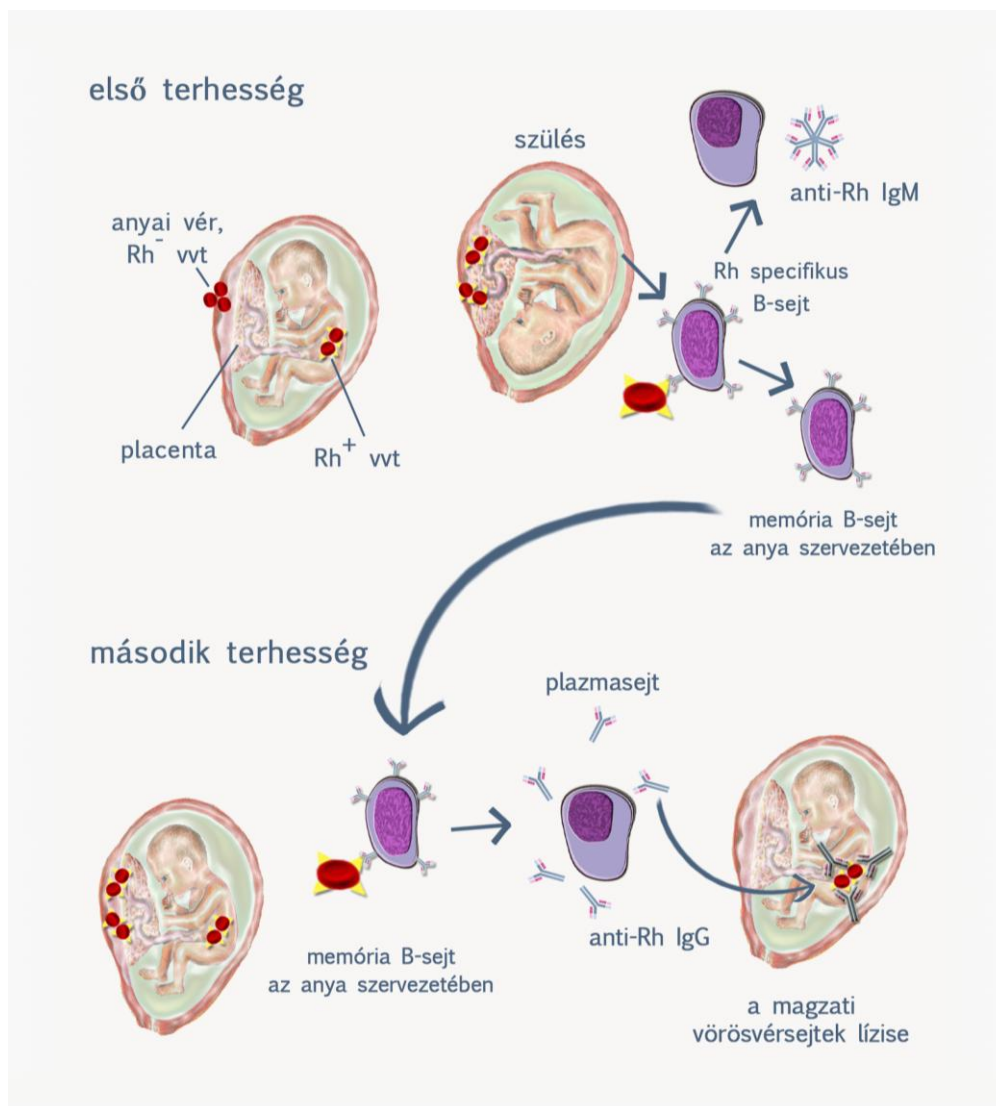
A vörösvértest membránján számon autoantigént tartalmaz, ezek közül a legjobban ismert és legfontosabb az A és B agglutinogén. Ezek jelenléte, vagy hiánya alapján 4 fő vércsoportot különböztetünk meg: A, B, AB és 0 vércsoportot. Az A és B vércsoportok kialakulását kodominánsan öröklődő specifikus enzimek irányítják. A baktériumok és vírusok felszínén a human AB antigénekhez hasonló szerkezetű glikoproteinek találhatók. A 0 vércsoportú egyének (nincs A és B antigén sem a vörösvértestek felszínén) anti-A és anti-B antitesteket is termelnek. Az A vércsoportú egyének anti-B, a B vércsoportúak anti-A, míg a 0 vércsoportúak anti-A és anti-B antitesteket is termelnek. Az anti-A antitest a B csoportú vörösvérsejtek agglutinációját és haemolízisét okozza, hasonlóképpen az anti-B antitest az A csoportú vörösvértestek agglutinációjával és haemolízisével jár (3.15. ábra).

recipient	donor			
	0	A	B	AB
0 anti-A anti-B antitest	—	+	+	+
A anti-B antitest	—	—	+	+
B anti-A antitest	—	+	—	+
AB nincs antitest	—	—	—	—

Ma már csak elvi lehetőség, rutinban kizárólag csoportazonos (AB0 és Rh) vér transfundálható!

3.15. ábra: AB0 inkompatibilitás

Az AB0 antigének mellett klinikailag legjelentősebb az Rh antigén (nevét rhesus majomról kapta). Számos antigén tartozik az Rh antigének közé, ezek közül a D antigén antigenitása a legkifejezettebb. Rh negatív egyénekben nincs anti-D antitest, ugyanakkor anti-D termelődés indukál D-pozitív vörösvértestek transfúziója. Ha Rh negatív anya Rh pozitív magzatot hordoz, a szülés során Rh pozitív magzati vér kerülhet az anyai keringésbe, ezzel anti-D antitest-termelést indukálva. Az anti-D antitest IgG, a placentán átjut. Így Rh negatív anya ismételt Rh pozitív terhessége során az anti-D antitestek a magzatba kerülve újszülöttkori haemolitikus betegséget okozhat. A szülést követően alkalmazott Rh immunglobulin gátolja az anyai anti-D antitest-termelést (3.16. ábra).

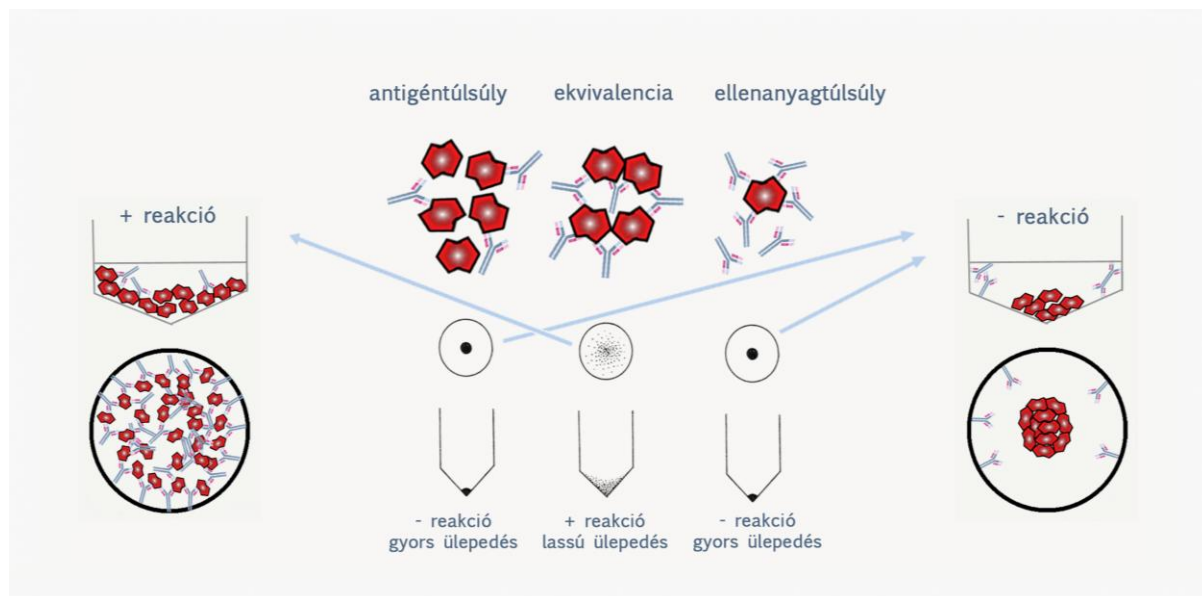


3.16. ábra: Újszülöttek hemolitikus anémiája és a kezelés elve.

3.9. Agglutináció típusai és alkalmazása

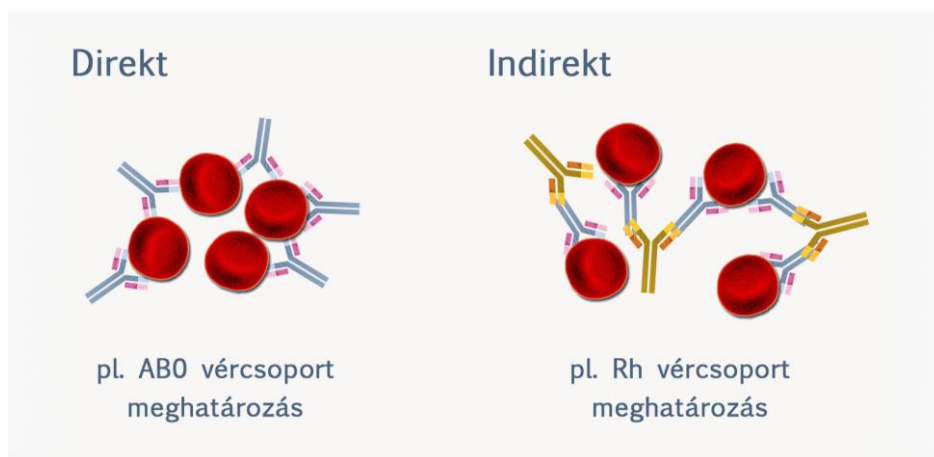
Sejtes elemek és ellenük irányuló antitestek reakcióját agglutinációnak nevezzük (3.17 ábra). IgG jelenlétében is létrejöhet agglutináció, de a pentamer szerkezetű IgM a leghatékonyabb agglutináló antitest. Az agglutináció kialakulásához optimális antigén antitest arány szükséges, antitest túlsúly, vagy az agglutinálódó sejtes elemek túlsúlya esetén nem alakul ki agglutináció. Direkt agglutináció

során az antigén az agglutinálandó partikulum része. Direkt agglutináció történik direkt Coombs teszt során, hiszen a vörösvértestek az ellenük irányuló antitestekkel be vannak borítva. A vörösvértest szuszpenzióhoz adott anti immunglobulin antitest agglutinálja a vörösvértesteket.



3.17. ábra: Agglutináció

Indirekt agglutinációról beszélünk, ha az antitestek kötődését követően, azok térbeli elhelyezkedése miatt nem alakul ki agglutináció, csak az antitestekkel reagáló második antitest kötődését követően (3.18. ábra). Passzív agglutináció esetén partikulumhoz (latex, birka vörösvértest) mesterségesen kötnek antigént. Megfelelő antitest jelenlétében agglutináció alakul ki. Ha a rendszerhez a kötött antigén szolubilis formáját adják, az agglutináció dóziszfüggő gátlását eredményezi. Passzív agglutinációval meghatározható többek között proteinek szintje. A reumatoid faktor (az antitestek Fc része ellen termelődő különböző izotípusú antitestek, reumatoid faktor pozitivitás jellemző reumatoid arthritisre, szisztémás lupus erythematosusra, de kialakulhat fertőzéseket követően is) koncentráció mérés lehetséges latex szemcséhez kapcsolt IgG alkalmazásával, vagy hemolizinnel érzékenyített birka vörösvértestek agglutinációjával (Rose-Waaler teszt). A napi gyakorlatban a reumatoid faktor szintet ELISA módszerrel, nephelometriával, vagy turbidimetriával történik.



3.18. Direkt és indirekt agglutináció

3.10. Feladatok

Válaszolja meg az alábbi kérdéseket az újszülöttek hemolitikus anémiájával kapcsolatban!

- 1) Miért nem alakul ki az első Rh+ magzattal szemben immunreakció?
- 2) Van-e kivétel az előző szabály alól, miért van / nincs?
- 3) Miért adunk anti-D IgG-t profilaktikusan?
- 4) Miért véd az AB0-inkompatibilitás az Rh-inkompatibilitás következményeitől?
- 5) Miért ritkább az AB0-inkompatibilitásból eredő hemolitikus betegség?

4. A KOMPLEMENT RENDSZER GYAKORLATI VONATKOZÁSAI (BUZÁS EDIT)

4.1. Bevezetés

Napjainkra – csaknem egy évszázaddal a komplement rendszer felfedezése után – egyértelművé vált, hogy a komplement rendszer funkciói messze túlmutatnak a kórokozók eliminálásán. A komplement rendszer szerepet játszik az elpusztult sejtek maradványainak valamint a fertőző ágensek eliminálásában, összehangolja az immunrendszeri folyamatokat, és vészjeleket küld, mely által hozzájárul az immunhomeosztázis fenntartásához.

Bár az apoptotikus sejtek felszínét is felismerik mintázatzelismerő fehérjék, ennek ellenére szabályozó fehérjék képesek megakadályozni a komplement aktivációt. Így a komplement opszonizáló hatása hozzájárul az apoptotikus testek „csendes” eliminációjában.

A komplement kaszkádban számos mintázat felismerő molekula vesz részt. A C1q felszínhez kötött IgG-t és IgM-et köt, de e mellett C-reaktív proteint (CRP) és patogénnel asszociált molekuláris mintázatokat (PAMP-okat) is, a mannoz kötő lektin (MBL) szénhidrát mintázatot ismer fel, a fikolinok (1, 2 és 3) szintén szénhidrátmintázat felismerő molekulák, a properdin mind PAMP-okat, mind szövetkárosodással asszociált molekuláris mintázatokat (damage associated molecular pattern, DAMP) képes felismerni. A CRP ugyancsak mind PAMP-okat, mind DAMP-okat képes felismerni az apoptotikus és mikrobiális sejteken, a complement factor H-related protein (CFHR-4) pedig monomer CRP-t juttat a nekrotikus sejtekre

Számos hatásra képes aktiválódni a komplement rendszer. Korábban úgy vélték, hogy a komplement aktiváció különböző útvonalak lineáris kaszkádjaként értelmezhető. Mai értelmezésünk szerint azonban inkább hálózatként fogható fel, mely más rendszerekkel szorosan együttműködik.

I. A legősibb komplement aktivációs mechanizmus közülük az alternatív útvonal, melynek aktiválódása az alternatív C3 konvertáz komplexet hozza létre.

II. A másik jól ismert aktivációs út a klasszikus útvonal, mely filogenetikailag fiatalabb, és amelyről mára ismertté vált, hogy nem csak az IgM és IgG klaszterek képesek aktiválni, hanem a C1q igen sokrétű mintázatzelismerési kapacitása révén részben közvetlenül tud mikrobiális vagy apoptotikus sejt felszínre kötődni, részben endogén mintázatzelismerő receptorokon keresztül (pl. immunglobulinokon, CRP-n keresztül).

III. A harmadik, lektin útvonal aktivációjában az MBL és a fikolinok (mint endogén mintázatzelismerő receptorok) játsszák a kulcsszerepet, melyek elsődlegesen szénhidrát mintázatokat ismernek fel. A lektin útvonal a C4 hasítása révén C4b keletkezést eredményezi, innentől kezdve a klasszikus és lektin útvonalak megegyeznek.

4.2. A komplement rendszer működésének vizsgálata

A komplement fehérjét elsősorban a májsejtek termelik. A komplement fehérjék a szérumban globulin frakciójának 12-15%-át teszik ki, tehát igen nagy mennyiségben vannak jelen, azonban egészséges szervezetben funkcionálisan inaktív állapotban vannak. Megfelelő inger hatására aktiválódva hatékonyan képesek baktériumokat, gombákat és vírusokat pusztítani, illetőleg immunkomplexeket eliminálni.

A legegyszerűbb módon vörösvértest lízis révén, a kiszabaduló hemoglobin alapján demonstrálhatjuk a komplement aktivációt (4.1. ábra).



4.1. ábra: Komplement mediálta vörösvértest lízis

- Amennyiben a birka vörösvérsejteket anti-birka vörösvértest antitestekkel inkubáljuk, nem történik látható változás az inkubáció hatására. Ilyen poliklonális antitestekhez úgy juthatunk, hogy előzetesen birka vörösvértestekkel immunizálunk pl. nyulat, kecskét, és az immunizált állat vérszérumát használjuk fel poliklonális antitestforrásul.
- Ha azonban a birka vörösvértestek és az anti-birka vörösvértest antitestek mellett humán szérumot is adunk a rendszerhez, jól látható hemolízis következik be, hemoglobin szabadul ki, mely elszínezi az inkubáció során alkalmazott puffert.
- Ha a birka vörösvértesteket anti-birka vörösvértest antitestekkel és e emellett még 56 °C-on 30 percre előinkubált humán szérummal inkubáljuk, nem következik be a vörösvértestek lízise.

A komplement rendszer fehérjéi hőre érzékenyek, mintavételkor a szérumokat minimális ideig tarthatjuk szobahőn, célszerű a -70°C-on történő tárolás. A komplement rendszer fehérjéi 30' 56°C-on hőinaktiválódnak, miközben a szérum más fehérjéi, pl. az antitestek nem károsodnak.

Az 56°C-on 30 percig végzett komplement inaktivációt a mindennapi szövettenyésztői gyakorlatban is felhasználjuk. A tenyésztéshez használt tápfolyadék kiegészítésére magzati borjúsavót alkalmazunk. A magzati borjúsavó komplement tartalmát a fenti módon inaktiváljuk, mielőtt a savót hozzáadjuk a szövettenyésztői tápfolyadékhoz. Ezáltal megakadályozható, hogy komplement által közvetített sejtlízis és/vagy opszonizáció következzen be a tenyészetekben.

A klinikai laboratóriumi gyakorlatban szükség lehet a vérérszérum komplement aktivitásának a meghatározására. Szem előtt kell azonban tartanunk, hogy a komplementfehérjék mennyiségét egy adott pillanatban a szintézisük és a komplement rendszer aktivációjával összefüggő felhasználódásuk mértéke egyaránt befolyásolja.

4.2.1. A CH50 érték és mérése

A **CH50** értéke annak a szérumhígításnak a reciproka, mely az antitesttel fedett birka vörösvértestek 50%-át lizálja (4.2. ábra). A CH50 mérés a klasszikus komplement-aktiváció mérésére alkalmas. Azt tükrözi, mely mértékben képes a szérum komplement tartalma birka vörösvértesteket lizálni. Értéke csökken, ha az egyes komplementfehérjék hiányoznak vagy felhasználódnak (pl. komplement deficienciákban és bizonyos vasculitisekben).

A CH50 értékének meghatározásához nyúlban termelt ellenanyaggal fedett birka vörösvérsejtekkel aktiváljuk az emberi szérum komplement rendszerét. A MAC komplex kialakulásának következtében hemoglobin szabadul ki a vörösvértestekből, ennek mennyiségét spektrofotométerrel határozhatjuk meg. Az összkomplement szint (titer) a vörösvérsejt lízis mértékével jellemezhető (4.1. táblázat).

A CH50 meghatározására szolgáló rendszerben tehát anti-birka vörösvértest antitestekkel fedett birka vörösvértesteket inkubálunk a vizsgálandó vérsavók sorozathígításaival. Vizsgáljuk a különböző szérumkoncentrációk mellett bekövetkező vörösvértest lízist.

	CH50 normál értékei
Szérum CH50	142-279 CH50 egység/mL
Egyéb testnedvekben	A fenti 1/3-a, 1/4-e
C1 szint	16-33 mg/dL
C3 szint	férfi: 88-252 mg/dL nő: 88-206 mg/dL
C4 szint	férfi: 12-72 mg/dL nő: 13- 75 mg/dL

4.1. táblázat: A CH50 normál értékei.

A birka vörösvértest-anti-birka vörösvértest komplexhez adott savó mennyisége és a hemolízis mértéke közti összefüggést szigmoid görbe írja le (Van Krogh egyenlet). Ennek logaritmikus transzformációjából vezethető le a lineáris összefüggést mutató egyenlet:

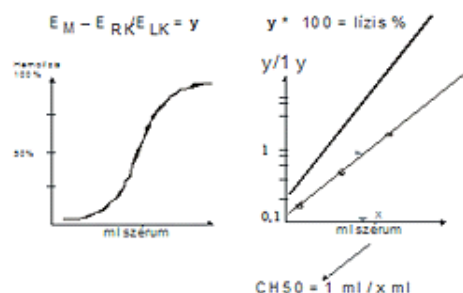
$$E_M - E_{RK}/E_{LK} = y,$$

E:	extinkció
M:	minta
RK:	reagens kontroll szérum nélkül
LK:	lízis kontroll, desztillált víz
y*100:	lízis %

A birka vörösvértest lízist spektrofotometriásan követhetjük a szabad hemoglobin alapján. Azt a plazmamennyiséget, mely mellett 50%-os birka vörösvértest lízis következik be, tekintjük 1 CH50 egységnek. Minthogy a CH50 görbe nem lineáris, ahhoz, hogy jelentős CH50 eltérések mutakozzanak, nagyfokú komplement felhasználásra kell, hogy sor kerüljön (4.2. ábra).

CH50 meghatározás

- reagens kontroll (RK): szérum nélkül
- lízis kontroll (LK): deszt.víz
- minta (M) hígítási sor



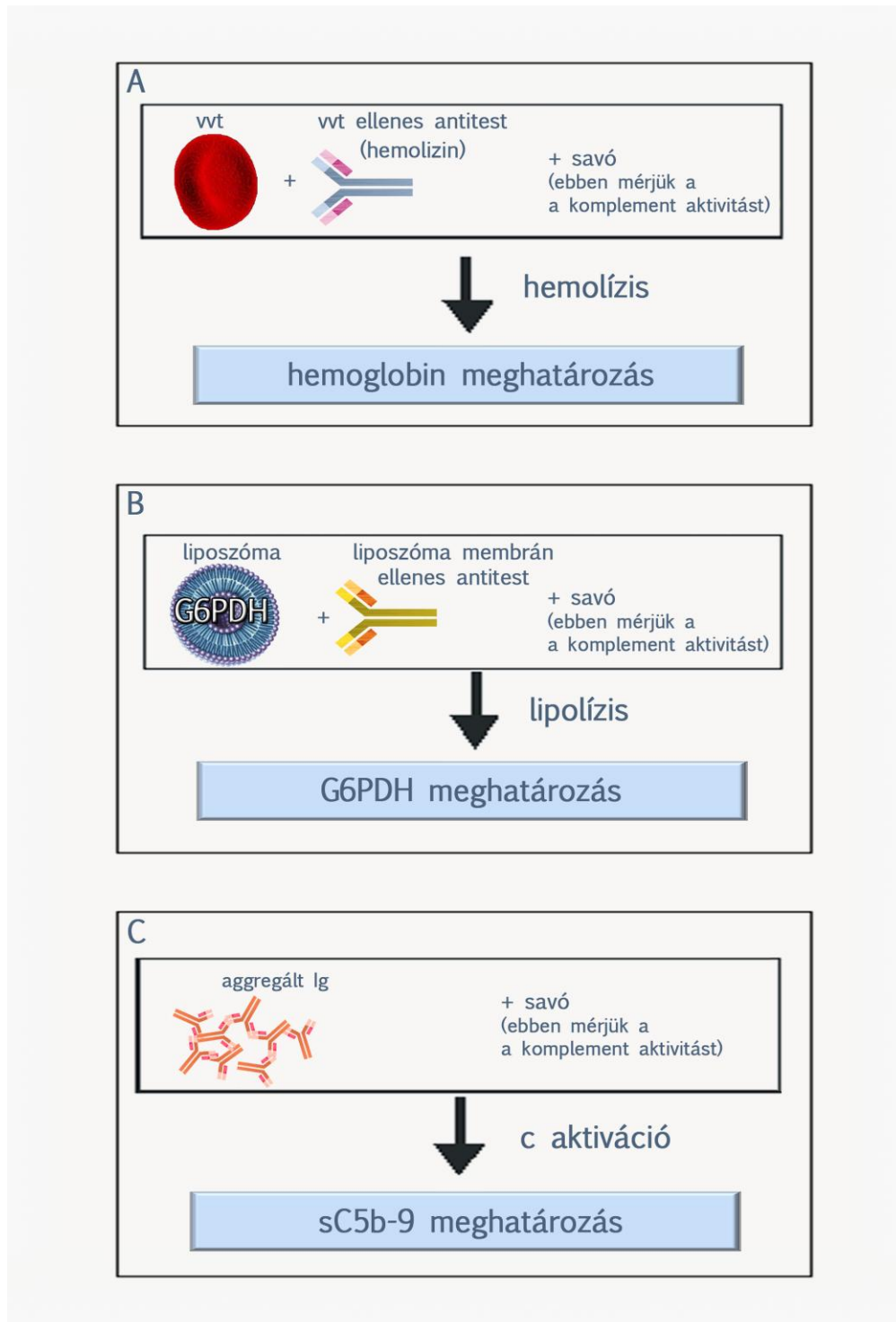
4.2. ábra: Szérum CH50 meghatározás (vörösvértest lízis)

4.2.2. Liposzóma immunoassay

A CH50 meghatározására szolgáló alternatív eljárás során DNP (dinitrophenol) hapténnel fedett felszínű liposzómákat alkalmazunk. A liposzómák belsejébe zártan G6PDH enzim található. Anti-DNP antitestek hozzáadásával antigén-antitest komplexek jönnek létre a liposzómák felszínén. Amennyiben aktiválódik a komplement, úgy a liposzóma fala felnyílik, a G6PDH kiszabadul, és a bekövetkező NAD→NADH redukció következtében a 340 nm-en mérhető abszorbancia a komplement aktivitással arányos mértékben megnő (4.3. ábra).

A leggyakrabban tapasztalt CH50 eltérés esetén a mért érték magasabb a normál értéknél, ugyanis a legtöbb komplement fehérje akutfázis fehérje is egyben. Természetesen előfordul a normál értéknél szignifikánsan alacsonyabb CH50 érték is, ez általában immunológiai megbetegedésre utal (immunkomplex megbetegedések, SLE). Az alacsonyabb CH50 szint rekurrens sinopulmonaris bakteriális fertőzésekre, Neisseria által okozott meningitisre vagy sepsisre hajlamosít. Ugyanakkor a normál CH50 érték mindössze azt bizonyítja, hogy valamennyi komplement komponens jelen van, ugyanis az egyes komplementfaktorok szintje jelentős mértékben csökkenhet a nélkül, hogy a CH50 aktivitás változna. Minthogy gyulladásos betegségekben a szintézis fokozódik, ezért a normál értékek nem jelentik, hogy nincs komplement által közvetített szövetkárosodás. Különböző gyulladásos

arthritisben (pl. rheumatoid arthritisben vagy gonococcus arthritisben) szenvedő betegek esetében a gyulladt ízületben lokálisan felhasználódik a komplement, e miatt a synoviális folyadékban csökkent CH50 aktivitás és komplementfehérje szint lehet mérhető, miközben a szérumban normál lehet a komplement szint.



4.3. ábra: Szérum CH50 meghatározás különböző módszerekkel

4.2.3. Az alternatív komplement aktiváció vizsgálata

Ha Ca^{2+} kelátorral (pl. EGTA) elvonjuk a Ca^{2+} ionokat (melyek elengedhetetlenek a klasszikus úthoz), úgy az alternatív út szelektív módon vizsgálható. E közben biztosítanunk kell a B faktor működéséhez elengedhetetlen Mg^{2+} ionokat.

Az alternatív utat mosott nyúl vörösvértestekkel is vizsgálhatjuk szenzitizáció (antitestekkel való inkubálás) nélkül is. Ebben a rendszerben az úgynevezett AP50 értéket határozhatjuk meg.

4.2.4. A lektin út vizsgálata

A lektin út vizsgálatához elsőként azt kell kizárnunk, hogy a szérumban található mannóz-specifikus antitestek révén a klasszikus út aktiválódott. Erre alkalmas egy C1q-t felismerő és blokkoló monoklonális ellenanyag (Mab 2204). Bár a klasszikus út gátlása mellett a lektin és az alternatív út egyaránt aktiválódhat, azonban az alternatív aktiváció csak töményebb (1% feletti) szérum jelenlétében mérhető, szemben a lektin-függő úthoz szükséges 0,1-1% közötti savó koncentrációval. Ennek alapján a lektin és az alternatív út elkülöníthető.

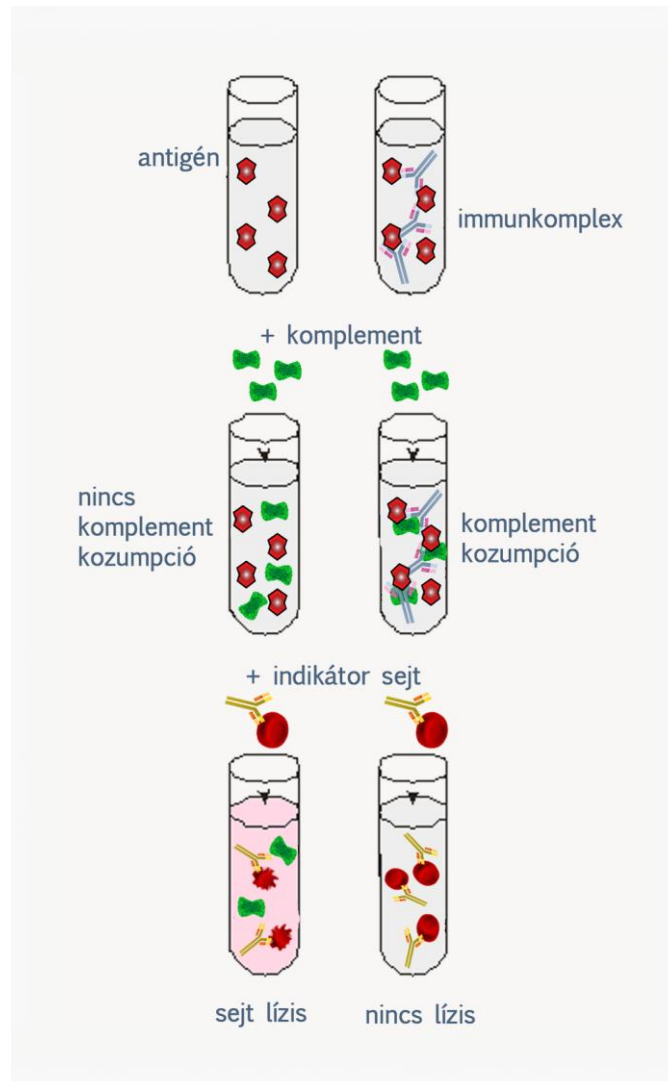
4.2.5. Komplement konvertáz assay (CCA)

A komplement rendszer azáltal is aktiválódhat, hogy a vért gyógyászati segédanyagokkal vagy eszközökkel inkubáljuk. Az enzimkaskád természetes szabályozója az enzimek instabilitása. E szabályozó mechanizmusok elégtelenné válhatnak, ha olyan felszínt alkalmazunk, mely aktiválja a komplementet. Ezért szükséges a komplement konvertáz aktivitást megvizsgálni a gyógyászati segédanyagok és eszközök felületén, hogy megítélhessük azok „hemokompatibilitását”. A vizsgálatra kromogén szubsztrát felhasználásával kolorimetriás mérést alkalmazhatunk.

4.2.6. Komplement fehérjék kimutatására alkalmas egyéb eljárások

1. A komplement fehérjéket kimutathatjuk pl. C3 ELISA-val. Az in vivo komplementaktiváció vizsgálatára az aktivációs termékeket vagy a képződő komplexeket szelektíve felismerő ellenanyagok használhatók.
2. A sejtek C3 és egyéb komplement fehérje termelését vizsgálhatjuk RT PCR-rel is.
3. Vizsgálhatjuk továbbá a sejtfelszínre lerakódott (ahhoz kovalensen kötődött) C3-at áramlási citometriával.
4. E mellett tanulmányozhatjuk a komplement receptorokat RNS és fehérje szinten is.
5. Alkalmazhatunk az immunkomplexek kimutatására komplement konszumpciós tesztet (4.4. ábra). Amennyiben a vizsgálandó mintában jelen van antigén-antitest komplex (az úgynevezett immunkomplex), úgy az a mintákhoz adott komplementet megköti (felhasználja), a mintában nem marad szabad komplement fehérje. Ha a komplement vizsgálati rendszerekben gyakran alkalmazott birka vörösvértest-anti-birka vörösvértest komplexet hozzáadunk a mintákhoz, ott következik be hemolízis, ahol eredetileg nem volt elég immunkomplex a komplement megkötésére, így a szabadon maradt komplement hozzá tud kapcsolódni a birka vörösvértest-anti-birka vörösvértest komplexhez annak lízisét okozva.

Amennyiben a vizsgálandó mintában jelentős mennyiségű immunkomplex volt jelen, úgy a komplement felhasználódik, nem marad szabad komplement, így hemolízis sem következik be.

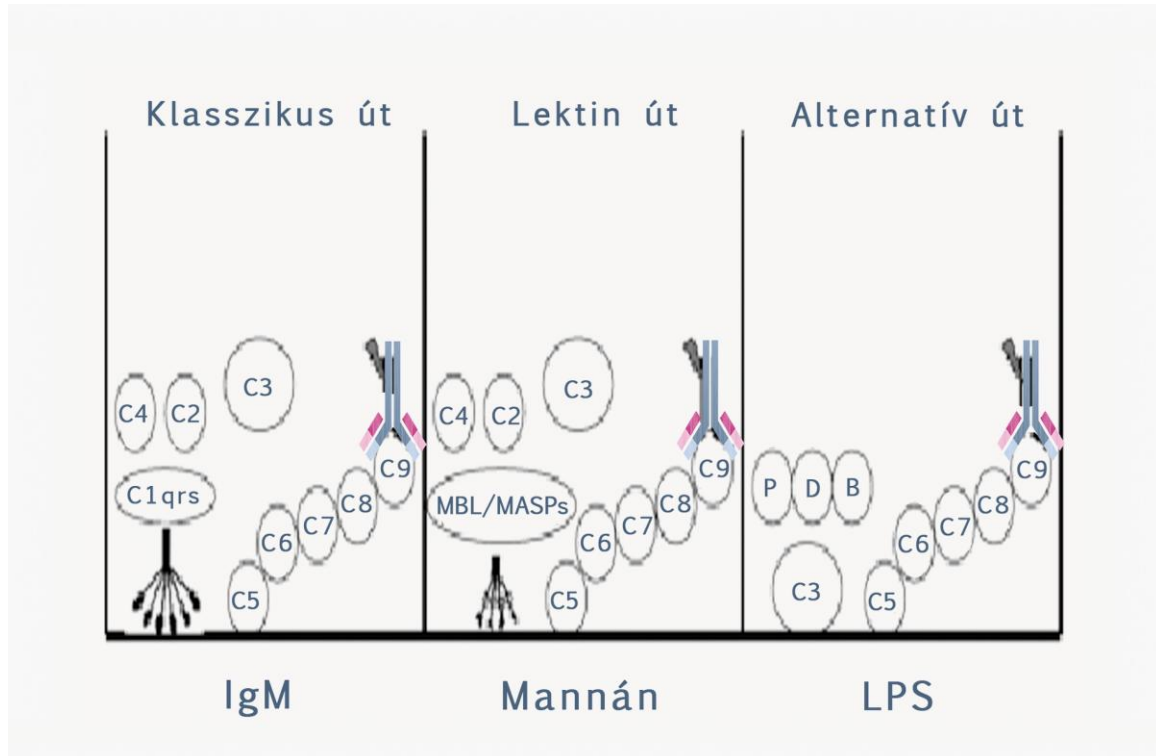


4.4. ábra: A komplement konzumpciós teszt elve

6. Komplement aktivációs ELISA

A módszertan leírása Zwirner (Zwirner et al. 1989) nevéhez fűződik, aki elsőként figyelte meg a komplement komponensek egész sorának lerakódását megfelelő műanyag felszínre. Ennek alapján a különböző komplement aktivációs utak vizsgálatára ELISA módszereket fejlesztettek. Az IgM-mel bevont felszíneken a klasszikus, a *Salmonella typhi* LPS-sel bevont felszínen az alternatív út vizsgálatára nyílt lehetőség. Vagy C9 neoepitóppal, vagy properdinnel reagáló monoklonális alkalmazásával mérhetjük a komplement aktivációt. A lektin út vizsgálatára egyszerűen kivitelezhető mannózzal bevont felszíneken, amennyiben anti-C1q antitesttel blokkoljuk a klasszikus utat. Az úgynevezett Wielisa® alkalmazásával (Wieieslab, Lund, Svédország), három ELISA kombinációjával valamennyi útvonal vizsgálható (4.5. ábra). A Wielisa alkalmazása során komplement aktivációt indukálunk megfelelő módon bevont mikrolemezen, majd a keletkező terminális komplexet detektáljuk. A

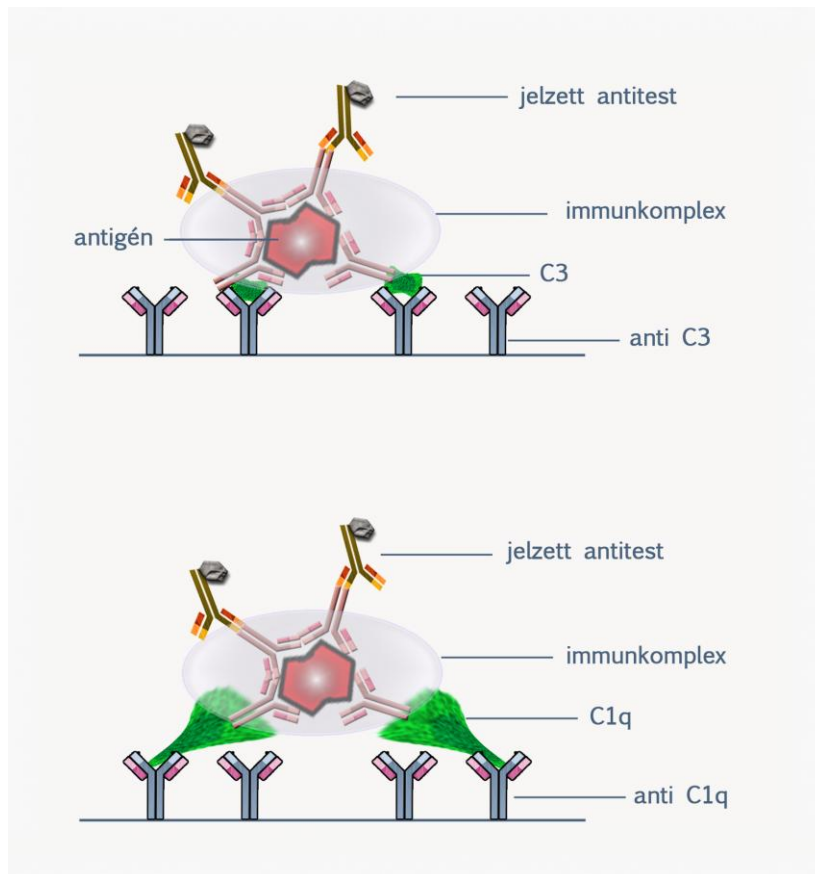
komplementaktiváció irányítása a puffer és a hígítás fokának megválasztásával történik (Ca^{++} , Mg^{++} szükséges a klasszikus, lektin és terminális út működéséhez), a Mg^{++} (EGTA mellett) elegendő az alternatív működéséhez, a klasszikus és lektin út: 1:100 vagy magasabb hígítás mellett is működik, az alternatív: 1:20 alatt működik. A Wielisa® előnye, hogy nem teszi szükségessé birka vörösvértestek felhasználását, és mindhárom aktivációs utat méri.



4.5. ábra: Komplement-aktivációs ELISA

4.2.7. Egyéb, komplementtel kapcsolatos módszerek

1. Az immunkomplexek ELISA alapú kimutatására alkalmas ELISA rendszerekben anti-C3 vagy anti-C1q antitestet kötünk az ELISA lemez felszínéhez. A bekötődött immunkomplexeket jelzett anti-immunglobulin antitesttel detektálhatjuk (4.6. ábra).
2. A HLA tipizálásra mikrolimfocitotoxicitási teszt végezhető. A módszer a HLA tipizálás úgynevezett szerológiai módszerei közé tartozik, melyek egykor az „aranystandardot” jelentették a HLA tipizálásban. Ma inkább molekuláris biológiai módszereket alkalmazunk helyettük. A mikrolimfocitotoxicitási teszt során az e célra alkalmazott, úgynevezett Terasaki plate-eken található lyukakba a tipizálandó személyekből származó, vérből izolált (Ficoll grádiensen szeparált) limfocitákat pipetázzuk. Antigénfelismerés esetén a megfelelő HLA-specifitású ellenanyag hozzákötődik a sejtekhez. A tipizáló savók többször terhes nőkből vagy többszörös vérátömlesztésen átesett személyektől származhatnak. Nyúlsérumot alkalmazunk komplement forrásul, mely aktiválódik, amennyiben az ellenanyag HLA antigénhez kötődött a sejtek felszínén. Ekkor a komplement aktiváció eredményeképpen lízis következik be, a sejtmembrán permeábilissá válik vitális festékek számára. A bejutó *ethidium bromide* vagy tripán kék festése alapján detektálható a bekövetkezett lízis.



4.6. ábra: Szérum immunkomplexek ELISA alapú kimutatása

4.2.8. A komplement rendszer elemeinek vizsgálata különböző kórállapotokban

1. Hereditær angioneuroticus oedema (HANO) I. típus: C1-inhibitor aktivitás és antigén alacsony, C4 alacsony, CH50 alacsony, C3 és C1q a referencia tartományban
2. AANO-C1-INH (Autoimmun eredetű angioneuroticus oedema): C1-inhibitor aktivitás csökkent, anti-C1-INH antitest pozitív, CH50 alacsony, C4 és C1q alacsony, C3 a referencia tartományban
3. Hemolitikus urémiás szindróma (HUS) (atípusos lefolyással), háttérében a komplement alternatív út szabályozási zavara áll

4.2.8.1. Esetismertetés: HANO

19 éves nőbeteg enyhe zavartsággal, súlyos hasi fájdalommal, és 12 órája fennálló émelygéssel és hányással kerül a sürgősségi osztályra. Arról számol be, hogy korábban jelentkeztek már hasi fájdalmai és kéz/lábduzzanata, melyek esetében élelmiszerallergiára gondoltak. Az ilyen tünetek együttes jelentkezése az utóbbi időben gyakoribbá vált. *Urticaria* sohasem társult a tünetekhez. A beteg arról is beszámol, hogy édesapjának is voltak hasonló panaszai. A beteg láztalan, vérnyomása 75/40 Hgmm, pulzusa 120/perc.

A kórképet Osler írta le 1888-ban, *hereditær angioneuroticus oedemáról*, autoszomális domináns öröklődésű **C1 inhibitor deficienciáról** van szó. Rekurrens epizódokként jelentkezik a nem viszkető

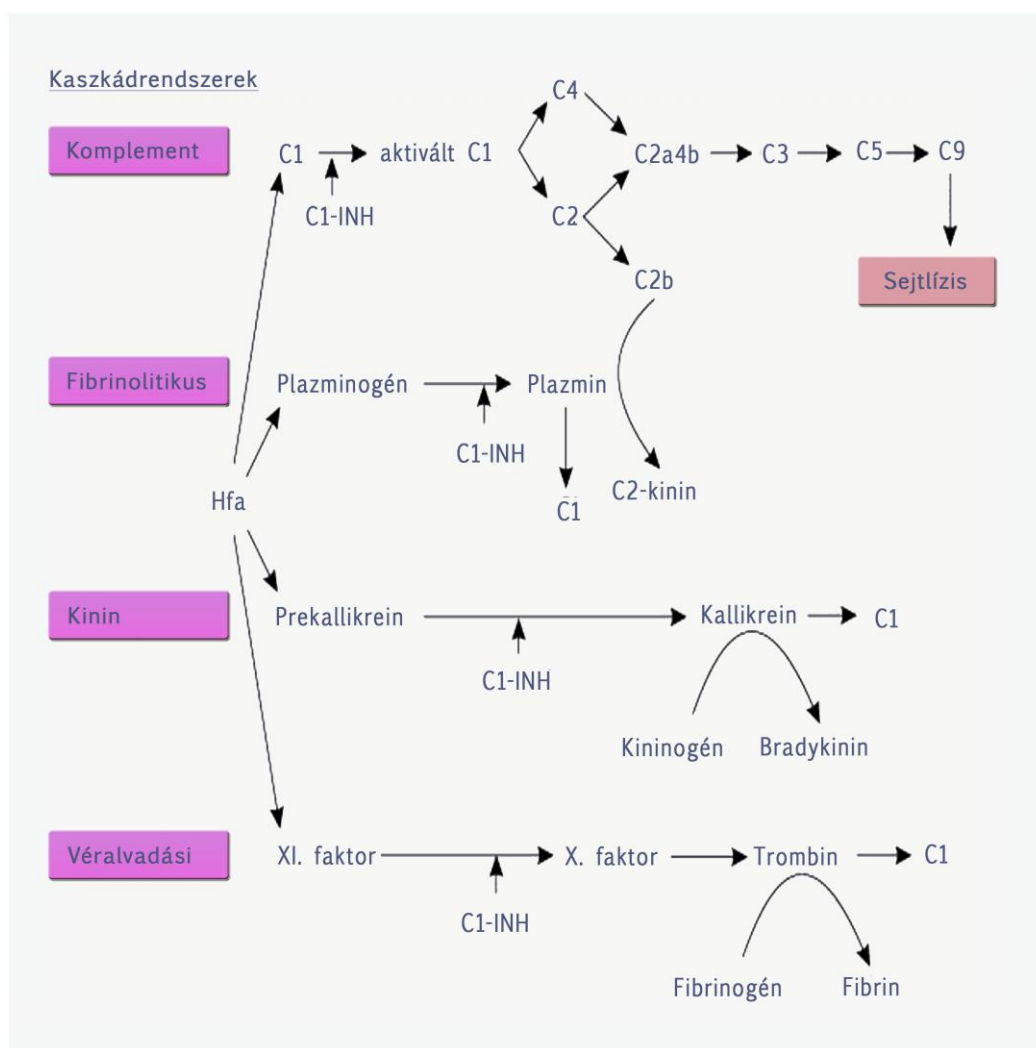
szubkután vagy szubmukozális *oedema*. Tipikus előfordulási helyei: karok, lábak, lábfej, belek, genitália, törzs, arc, nyelv vagy gége. Előfordulási gyakorisága ~ 1/50 000. A tünetek tipikusan gyermekkorban jelentkeznek először, pubertás körül romlik az állapot, és fennáll az élet végezetéig.

A tünetek hátterében a C1 inhibitor génjének mutációi állnak (napjainkig mintegy 150 különböző mutációt azonosítottak HANO-s betegekben).

A C1 inhibitor által gátolt proteázok a következők: a C1-komplex két alegysége (C1r, C1s), valamint a kallikrein, a plazmin, az aktivált XII. faktor (FXIIa) és az aktivált XI. faktor (FXIa).

Bár az I-es (az esetek 85%-a) és a II-es típusú (15%) HANO klinikailag nem különíthető el egymástól, azonban más mutációk állnak a két típus hátterében. Az I-es típusban létrejövő fehérjék nem szecernálódnak kellő hatékonysággal, ezért a C1 inhibitor szintje antigénként és aktivitást tekintve is csökken. A II-es típusú HANO esetében termelődő mutáns fehérje szecernálódik ugyan, de funkciója károsodik. Így ebben az esetben normál a C1 inhibitor antigén szintje, funkciója ugyanakkor jelentősen csökkent.

C1 inhibitor hiányában a HANO-s rohamok idején a plazma proteolitikus kaszkádjai aktiválódnak, és elsősorban a bradikinin a felelős a megnövekedett érfa permeabilitásért HANO-s rohamok során (4.7. ábra).



4.7. ábra: A HANO patomechanizmusa és az oedema kiváltásában szerepet játszó provokáló tényezők

A HANO diagnózisa akkor vetődik fel, ha visszatérő angioedemás rohamok jelentkeznek hasi fájdalommal, urticaria nélkül. Jellemző az alacsony C4 antigén szint normál C1 és C3 szintek mellett. Kezelés: intravénás tisztított C1 inhibitor pótlás (500-2000 Units) vagy rekombináns C1 inhibitor alkalmazása. Hatás: gátolja a plazma kallikreint, a XIIa és a XIa alvadási faktorokat, a C1s-t, a C1r-t, a MASP-1-et, a MASP-2-öt, és a plazmint.

4.3. Feladatok

Válaszolja meg az alábbi kérdéseket!

- 1) Az emelkedett vagy csökkent CH50 érték lehet a gyakoribb? Mi okból?
- 2) Mire utalhat a csökkent CH50 érték?
- 3) Mit mondhatunk ki teljes biztonsággal, ha az összkomplement (CH50) érték normál tartományba esik?
- 4) Melyik komplement fehérje van jelen a legnagyobb koncentrációban?
- 5) Mire utal a C3 és C4 együttes csökkenése?
- 6) Mire utal, ha a C3 szint csökken, a C4 érték viszont normál tartományba esik?
- 7) Csökkent CH50 titer és komplement fehérje szint jellemzi pl. a rheumatoid arthritises vagy gonococcus arthritises synoviális folyadékmintákat.
- 8) Milyen lehet a betegek szérumszintje?

Irodalom:

Farkas H. A hereditær angioneuroticus oedema patomechanizmusa és az oedema kiváltásában szerepet játszó provokáló tényezők. *Magyar Immunológia* 2002;1 (1): 5-11.

Zuraw BL. Hereditary Angioedema. *New England Journal of Medicine* 2008; 359:1027-103.

5. ÁRAMLÁSI CITOMETRIA (PÁLLINGER ÉVA)

A proteomikai vizsgálatához szükséges laboratóriumi metodikák (immunanalitikai módszerek, tömegspektrometria, monoklonális ellenanyaggyártás, stb.) kidolgozása soha nem látott lehetőségeket nyitott a diagnosztikában. Az eredmények értékelésekor azonban számos nehézséggel kell szembenézni, hiszen a sejtek fehérje összetétele nemcsak sejttípusonként tér el, de azonos sejten belül is, időről időre, sőt az aktuális funkcionális állapottól, vagy a környezettől függően változik. A detektált adathalmaz biológiai értelmezése tehát molekuláris sejtbiológiai, „citomikai” (*cytomics*) ismereteket igényel. A proteomika és a citomika összekapcsolására alkalmas laboratóriumi módszer az áramlási citometria, amely lehetővé teszi egyedi (individuális) sejtek egyidejű funkcionális és morfológiai jellemezését.

A áramlási citometria kezdetektől a nagy áteresztőképességű (*High throughput screening method* = HTS) módszerek közé tartozik, hiszen igen rövid idő alatt (néhány perc), több ezer sejt multiparaméteres detektálására képes. Erre a gyógyászatban kialakult szemléletváltás, a személyre-szabott gyógyítás igényének megfogalmazódása miatt egyre nagyobb szükség van. A HTS metodikák felgyorsítják a biomarker kutatást (új diagnosztikus és prognosztikus paraméterek), lehetővé teszik a gyógyszerhatások molekuláris nyomon követését (egyéni érzékenység és hatásfok), és a betegségek molekuláris patomechanizmusának pontosabb feltérképezését (új terápiás célpontok).

5.1. Bevezetés

Az áramlási citometria (*flow cytometry*: FCM, FACS: *fluorescence-activated cell sorting*) különálló sejtek rendkívül gyors, multiparaméteres (fizikai és / vagy kémiai tulajdonságok), kvantitatív vizsgálatára alkalmas laboratóriumi eljárás. Az analizálni kívánt sejtek morfológiai vagy funkcionális megkülönböztetésére fluoreszkáló festékekkel történő jelöléseket alkalmaznak. Az előkészített sejteket lézer sugár világítja meg, a készülék pedig a lézer indukálta optikai jeleket detektálja és dolgozza fel. Az áramlási citometria felhasználásával lehetővé válik a különféle sejtpopulációk azonosítása és szeparálása („*sorting*”) az immunfenotípus vagy akár a funkcionális állapot alapján is.

Az 1940-es években kezdődött története óta az áramlási citometria jelentős változásokon ment keresztül. A készülékek eleinte csupán a fényszórás és az elektromos impedancia mérésének elvén működő sejtszámlálók voltak, melyeket a későbbiekben továbbfejlesztettek a fluoreszcens jelek detektálására is. A rutin vizsgálatokra használt áramlási citométerek általában 1 lézerforrással rendelkeztek, és a sejtméret és a granuláltság mérésén kívül 2-6 fluoreszcens festéket tudtak megkülönböztetni egyszerre, ami sejtenként 4-8 különféle paramétert jelentett. Az áramlási citometria már ezekben a korai években megkezdte térhódítását az orvosi diagnosztika területén: ekkor elsősorban a keringő leukociták 1-, 2-színű immunfenotipizálására használták. Ezzel szemben

napjainkra már széles körben elterjedtek a szolubilis molekulák mérésére alkalmas mikrogöngy-alapú detektáló rendszerek (*Cytometric Bead Array = CBA; microsphere-based flow cytometric assay*), a fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer (FRET = *fluorescence resonance energy transfer*) kifejlesztésével lehetővé vált molekuláris interakciók (pl. protein-protein kölcsönhatások) jellemzése, és a foszforilált (módosított) fehérjék specifikus felismerésére képes ellenanyagok megjelenésével nyomon követhetők pl. a sejten belüli jelátviteli-, vagy metabolikus útvonalak is. Az egyidőben detektálható színek számának növekedése (10-17 szín detektálása egyszerre) lehetővé tette az intracelluláris fehérjék kimutatásának immunfenotipizálással történő kombinálását, vagyis a proteomikai vizsgálatok sejtszinten történő kivitelezését. Ezzel az áramlási citometria a citomika diagnosztikus arsenáljában nélkülözhetetlenné vált.

A sejtek funkcionális és morfológiai karakterizálása mellett az áramlási citometria egyedülálló módszer abban a tekintetben is, hogy rajta kívül nincs másik olyan készülék, amely jól definiált sejtpopulációkat (pl. a differenciálódási antigének expressziójával azonosított sejteket) nagy sebességgel és tisztasággal lenne képes szétválogatni (sejtszeparálás, „*sorting*”).

A flow cytometriás mérések során leggyakrabban a következő kérdésekre keresnek választ:

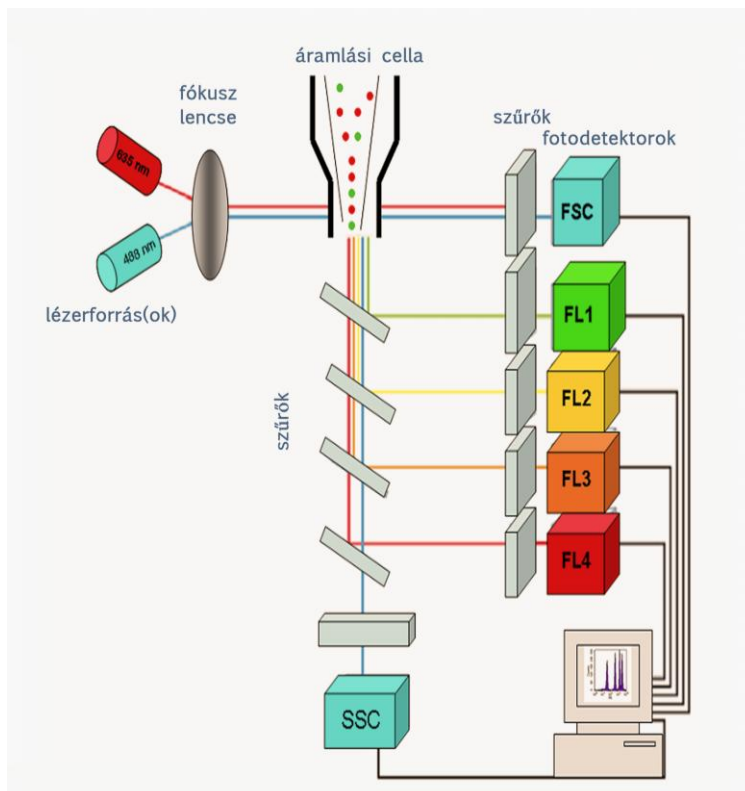
1. Jelen van-e a keresett sejt (pl. immunfenotípus alapján definiált populáció) a vizsgálati mintában?
2. Milyen arányban (abszolút mennyiségben) van jelen a keresett sejt a vizsgálati mintában?
3. Hányféle sejtpopuláció azonosítható (pl. méret és granuláltság szerint, immunfenotipizálással, a funkcionális állapot alapján, stb.) a vizsgálati mintában?
4. Milyen a detektált sejtek funkcionális állapota?

5.2. Az áramlási citométer

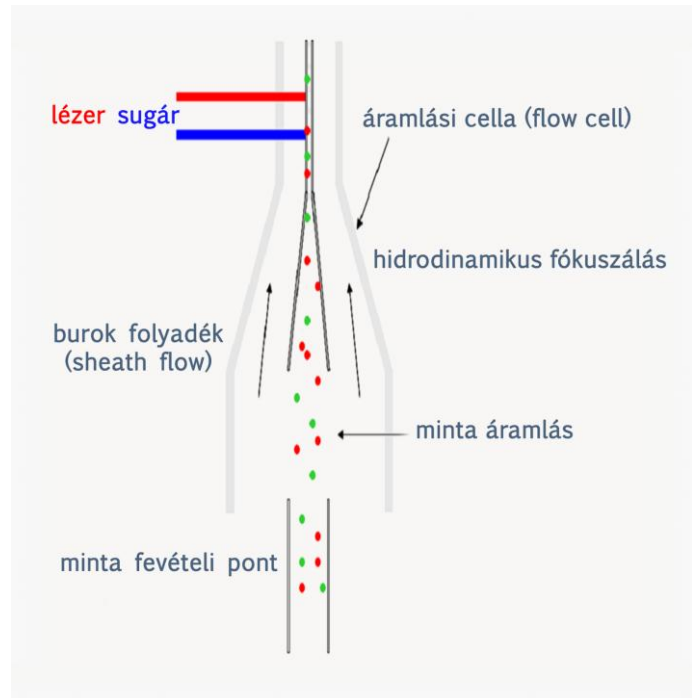
Az áramlási citométer funkcionális egységei a következők:

- 1) folyadék rendszer,
 - 2) optikai rendszer,
 - 3) elektronika,
 - 4) analízáló egység,
 - 5) sejtszeparátor („*sorter*”) (opcionális)
- (5.1. ábra).

5.1. ábra: Az áramlási citométer funkcionális egységei



1) A folyadék rendszer biztosítja a sejtek áramlását, szerepe a sejtek gerjesztés helyére történő eljuttatása. A készülékben keringő izotóniás puffer („sheath fluid”) hidrodinamikus fókuszálás révén az áramlási cella közepére irányítja a sejteket, amelyek a folyadékáramlás és az áramlási cella speciálisan kialakított formájának hatására „libasorba” állnak, így a cella közepére fókuszált lézernyaláb egyenként, optimális energiával tudja gerjeszteni őket (5.2. ábra). A rendszer zárt: a készülékben keringő folyadék és a sejtuszpenzió a mérést követően egy csőrendszeren keresztül a hulladék tartályba (waste) kerül.



5.2. ábra: Hidrodinamikus fókuszálás

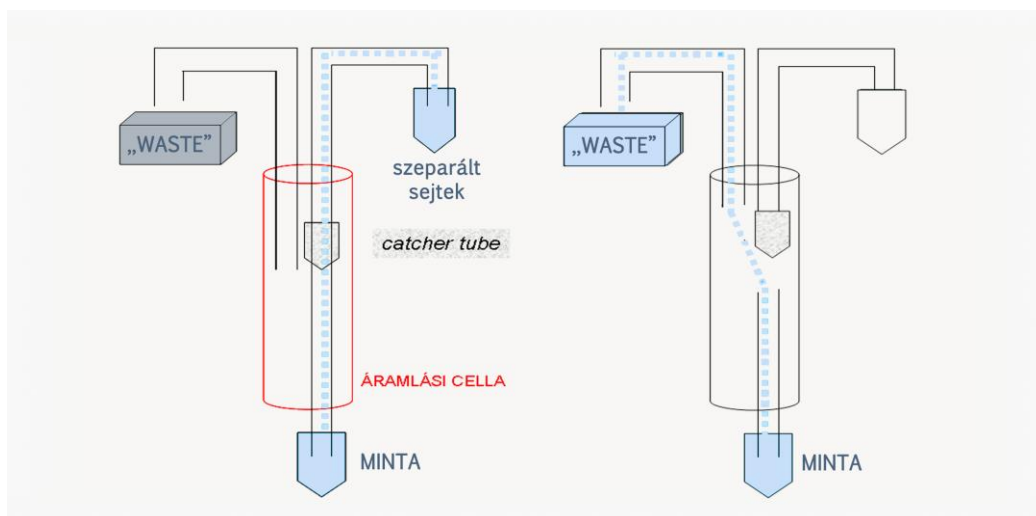
2) Az optikai rendszer 1) a sejtek megvilágítására és a fluoreszcens festékek gerjesztésére alkalmas fényforrás(ok)ból, 2) a gerjesztő fénynyalábok fókuszálásához szükséges lencserendszerből, 3) az emittált fény detektálására szolgáló fotodetektorokból és 4) az emittált fény útját meghatározó (irányító) tükör-rendszerből áll.

3) Az elektronika alakítja át a detektált fényjeleket a számítógépes feldolgozáshoz szükséges digitális jelekké (ADC = analóg digitális konverzió).

4) Az analizáló rendszer (számítógép) gondoskodik az adatok összegyűjtéséről, tárolásáról, a képi megjelenítésről és az értékeléshez szükséges szoftveres feldolgozás lehetőségeiről.

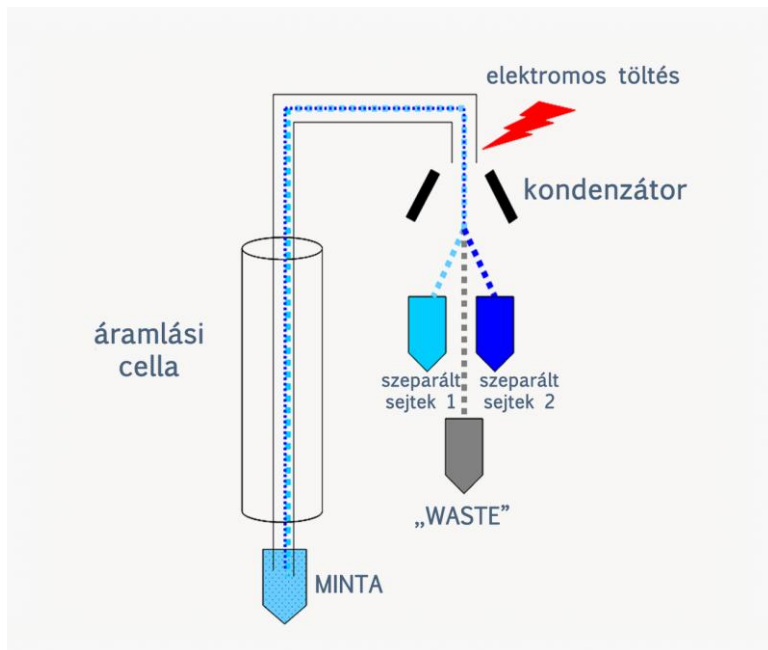
5) Sejtszeparátor („sorter”)

Technikai szempontból a sejtszeparálásra alkalmas FACS készülékek 2 csoportba sorolhatók: 1) mechanikus elven működők, és 2) elektrosztatikus elven működők. (5.3. ábra)



5.3a ábra: Sejtszeparálás FACS készülékkel

A szétválasztás alapja lehet bármely, a készülékkel detektálható paraméter: a sejtméret és a granuláltság (FSC/SSC, lásd később), vagy a fluoreszcens jelölésekkel azonosított tulajdonságok.



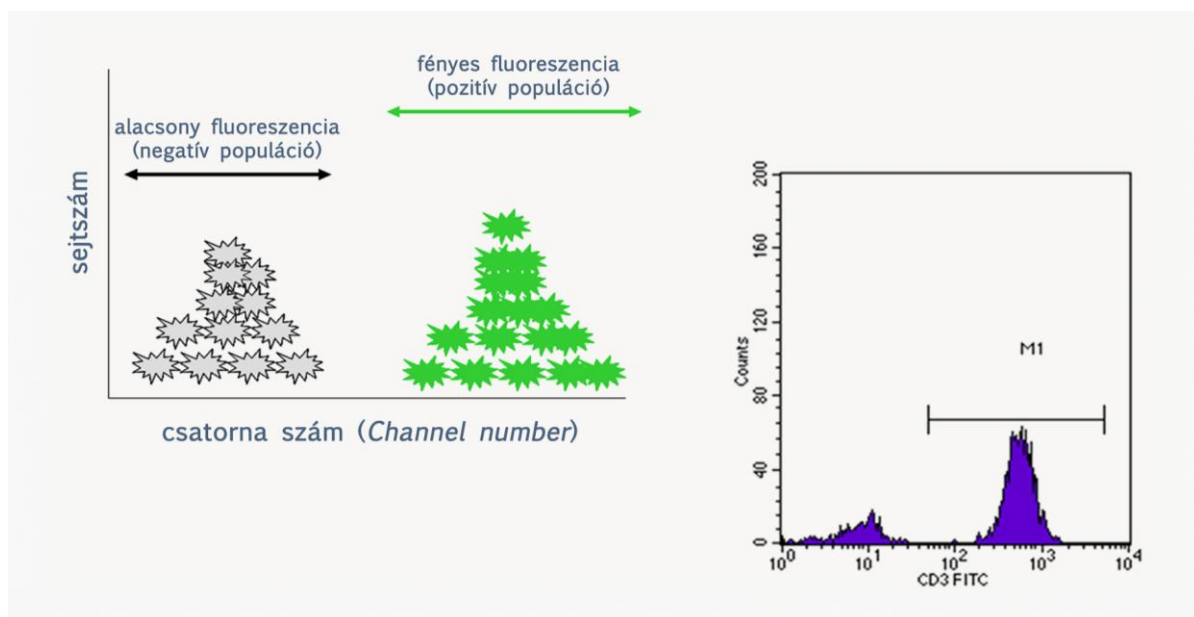
5.3b ábra: Elektrosztatikus sejtszeparálás

5.2.1. Képi megjelenítés (*data display*)

A detektált jelek képi megjelenítése hisztogramok vagy felhőképek (*dot plot*) formájában történik.

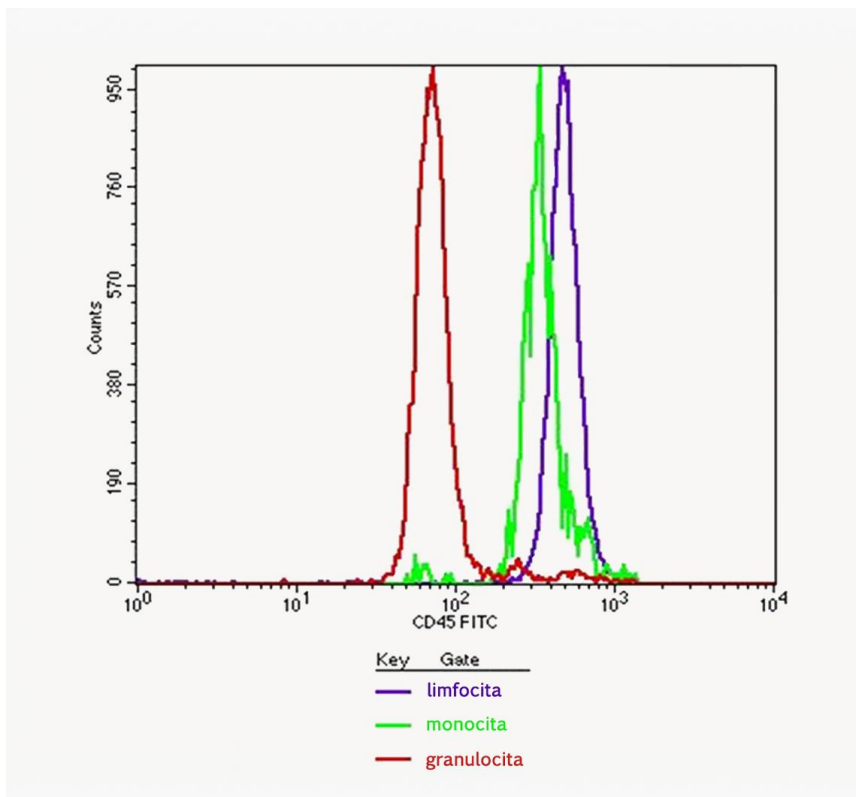
5.2.1.1. Hisztogram

A hisztogramok egyetlen paramétert, általában valamelyik detektált fluoreszcens jel intenzitását jelenítik meg a sejtszám függvényében. Biológiai értelemben a hisztogramok értékelésével jól definiált sejtpopulációk intra- vagy extracelluláris markereiről kaphatunk kvalitatív és kvantitatív információt (pl. membrán fehérjék expressziójának jelenléte és mértéke). (5.4. ábra)



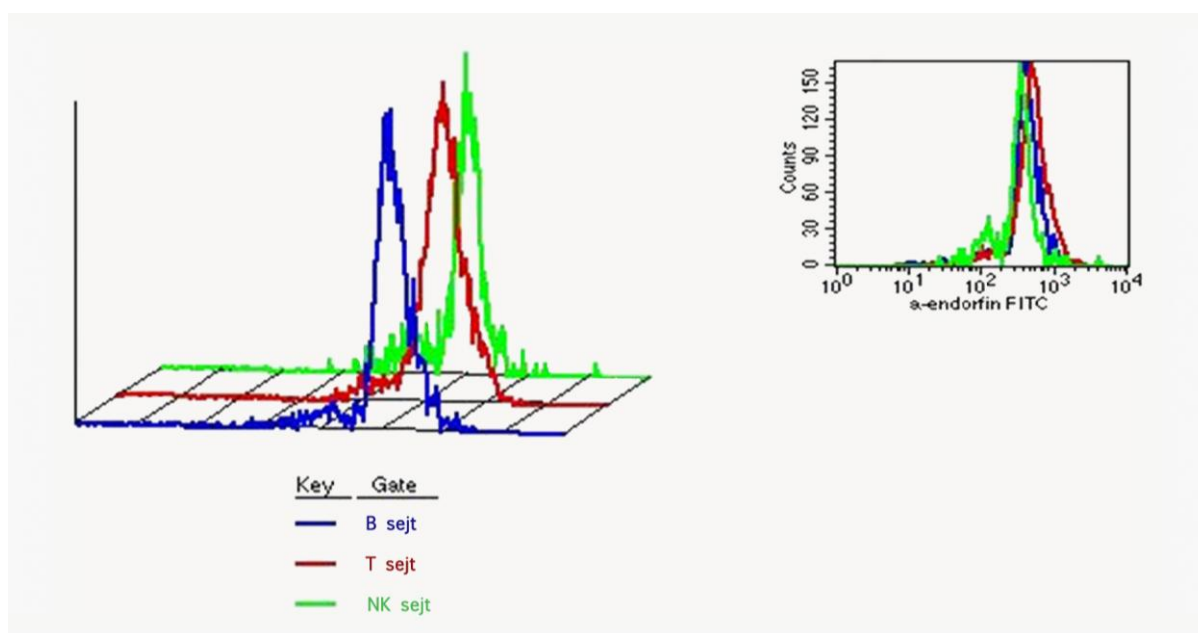
5.4. ábra: Hisztogram

A hisztogramok összehasonlításának igen látványos módja az egymásra vetített bemutatás, az ún. „overlay” ábrázolás. Ebben az esetben különböző minták azonos fluoreszcens jelöléséből származó görbék ugyanabban a koordináta rendszerben kerülnek ábrázolásra, így a jelintenzitásbeli eltérések (azaz az expresszió mértékének eltérései) azonnal láthatóvá válnak. (5.5. ábra)



5.5. ábra: Overlay hisztogram

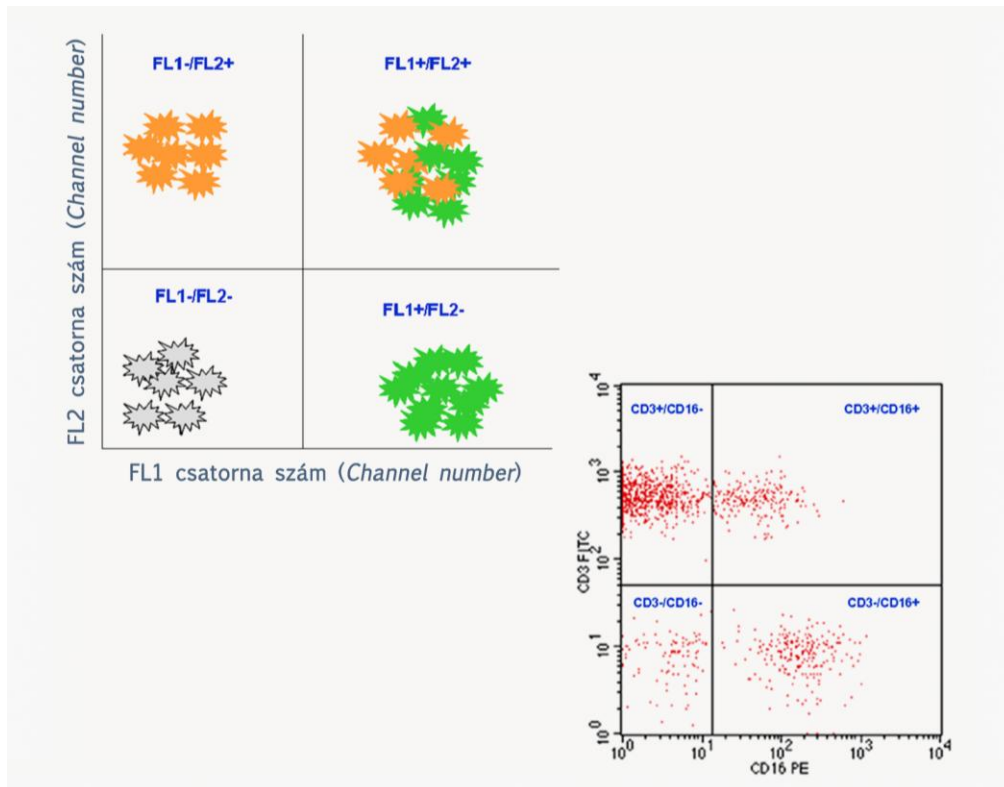
Az „overlay” hisztogramok 3 dimenziós ábrázolása lehetővé teszi a görbék közti nagyon kis különbségek illusztrálását is. (5.6. ábra)



5.6. ábra: 3D hisztogramok (balra)

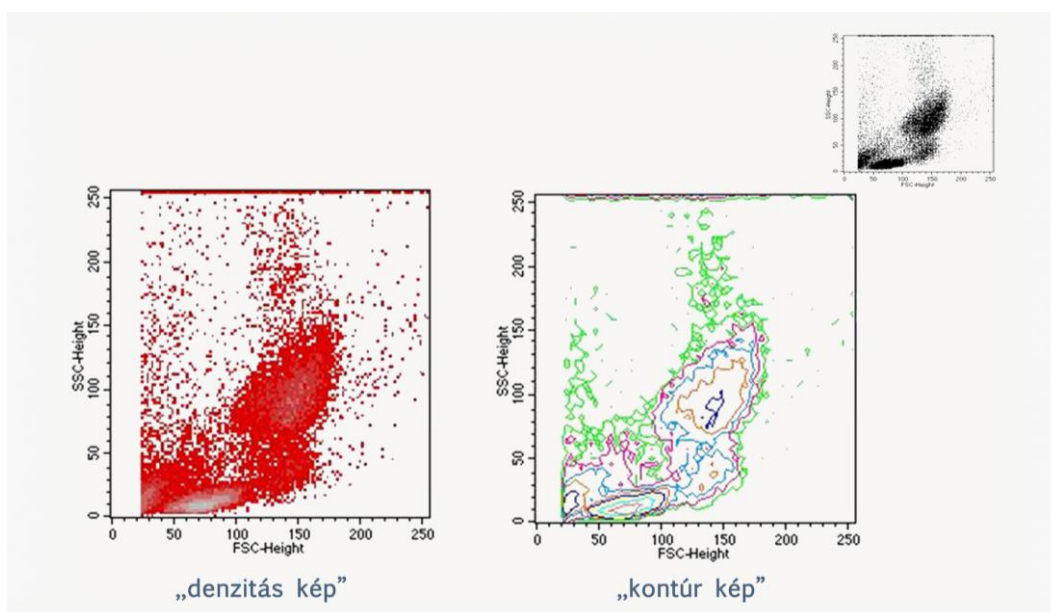
5.2.1.2. Felhőkép (dot plot)

A felhőképeken ugyanarról a sejtről származó 2 detektált paraméter egymás függvényében kerül ábrázolásra. A kép minden sejtet különálló pontként jelenít meg. A felhőképek lehetővé teszik különféle markerek (paraméterek) együttes jelenlétének kimutatását (pl. ko-expresszió), ami biológiai szempontból a sejtpopulációk, és alcsoportok pontosabb azonosítását jelenti. (5.7. ábra)



5.7. ábra: „Felhőkép” (dot plot)

A nehezen elkülöníthető populációk szétválasztását könnyíti meg a felhőképek speciális megjelenítése, az ún. „kontúr kép” (contour plot) és a „denzitás kép” (density plot). (5.8. ábra)



5.8. ábra: „Kontúr kép” (contour plot) és a „denzitás kép” (density plot).

5.2.1.3. Kinetikai mérések (time-based collection)

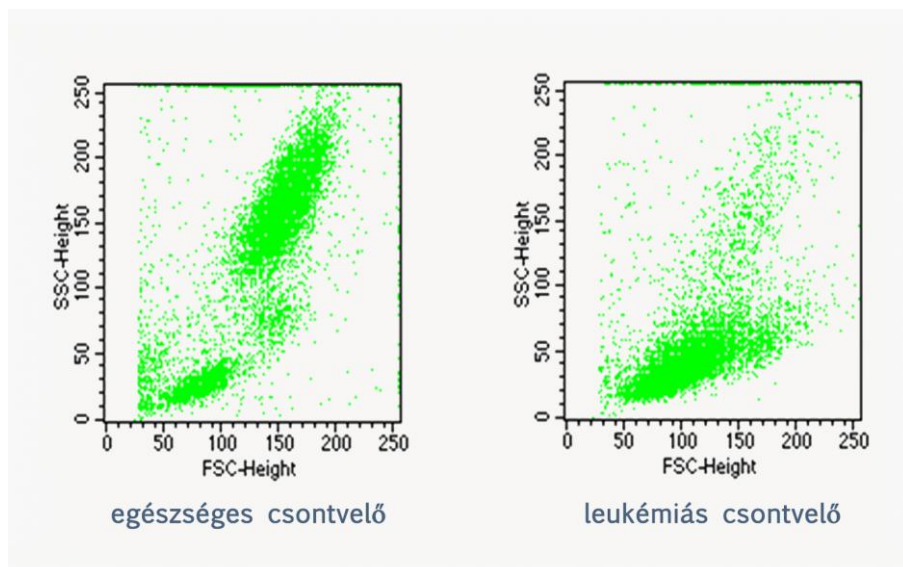
Az idő, mint detektálható paraméter felhasználásával kinetikai mérések végezhetők (pl. enzimaktivitás), illetve jellemezhető a vizsgált biológiai folyamatok dinamikája (pl. fluoreszcens ligandok bekötődése). Mivel a kinetikai méréseknél a detektált fluoreszcencia nagyságát nagymértékben meghatározza a stimulus óta eltelt idő, ezért az összehasonlíthatóság érdekében bevezették az ún. „*time-window analysis*-t”, vagy más néven „*fixed time flow cytometry*-t”. Eszerint a mérést a kezelés / stimuláció után nagyon pontosan meghatározott idővel kell elkezdeni, főként, ha gyors sejtválaszokat kívánunk detektálni. A mérések időtartama is meghatározott.

A kinetikai mérések ábrázolása során az abcisszán az idő, az ordinátán a fluoreszcencia intenzitás jelenik meg.

5.3. A FACS eredmények értelmezése

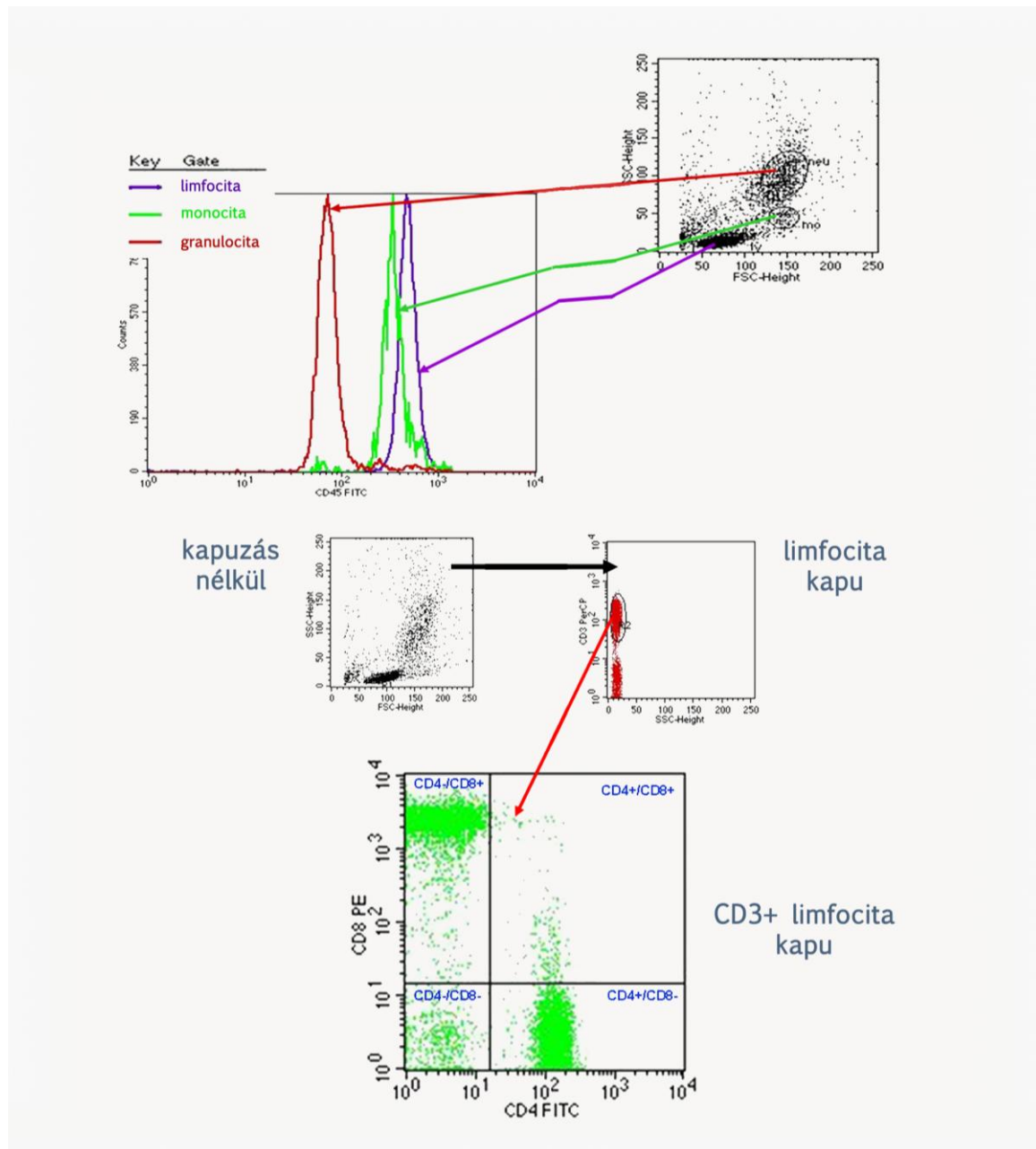
5.3.1. Méret és granuláltság

A sejtek morfológiájáról, méretükről és granuláltságukról, a sejtfelszínről és a sejtalkotórészekről szóródó fény detektálásával kapunk felvilágosítást. A sejtmérettel arányos, a sejtfelszínről kis szögben szóródó fényt, a megvilágító lézernyaláb elé helyezett fotodiódával mérik, ezért ennek előreszórás (FS = FSC = *forward scatter*; FALS = *forward angle light scatter*) a neve. A sejtorganelumokról nagy szögben szóródó fényt érzékelő fotoelektronsokszorozót (PMT = *photomultiplier tube*) a gerjesztő lézer nyaláb útjára merőlegesen, oldalt helyezik el, ezért ezt oldalszórásnak (SS = SSC = *side scatter*; RALS = *right angle light scatter*) hívják. Az előreszórás és az oldalszórás, tehát a méret és a granuláltság egymás függvényében történő ábrázolásával kapott felhőkép, az „FS/SS dot plot”. Az „FS/SS dot plot” analízisével nemcsak morfológiai információt kapunk a sejtszuspenzió összetételéről (heterogenitásáról) és az egyes sejtpopulációk egymáshoz viszonyított arányáról (pl. a perifériás vér leukocita populációi), de a sejtek morfológiai változásai tájékoztathatnak a funkcionális állapotukról (pl. viabilitás, sejtpusztulás, aktiváció, osztódás, stb.), sőt utalhatnak patológias folyamatok fennállására is (pl. blasztok jelenléte a perifériás vérben) (5.9. ábra).



5.9. ábra:
Limfoblasztok
felszaporodása
„felhőképén

Az „FS/SS” felhőkép szolgáltatja az alapot a sejtek további vizsgálatához is, hiszen ezt használják fel a vizsgálni kívánt populációk definiálására, a „kapuzás”-ra („gating”). (5.10. ábra)



5.10. ábra: „Kapuzás” (gating).

5.3.2. Fluoreszcencia

A sejtekről nyerhető információ megsokszorozható fluoreszcens jelöléssel. A fluoreszcencia, mint jelenség azt jelenti, hogy egy anyag gerjesztés hatására fényt bocsát ki. Fluorofórok azok a molekulák, amelyek képesek egy adott hullámhosszú fényt elnyelni (abszorpció), majd a megvilágítást (gerjesztést) követően fényt kibocsátani (emisszió). Az emittált foton energiája mindig kisebb, tehát hullámhossza mindig nagyobb, mint a megvilágító fény (Stokes törvény ld. Orvosi biofizika tankönyv).

Számos fluoreszcens festék létezik, melyek egy része közvetlenül és specifikusan képes kötődni sejtalkotórészekhez vagy molekulákhoz, másokat ellenanyagokhoz kapcsolva immunfestésre használnak. Az áramlási citometriában alkalmazható fluorokrómok száma a készülékekbe épített lézerforrások számának növelése (több hullámhosszon történő gerjesztés lehetősége) és új, pl. 2 fluorofór összekapcsolásával létrehozott tandem festékek kifejlesztése révén folyamatosan nő. A gerjesztés során a tandem festékek első tagja által emittált fény gerjeszti a hozzá kovalensen kötött második molekulát (akceptor), amelyből a detektálandó fény származik. Mivel a tandem festékeket úgy állítják össze, hogy az első tagjuk a FACS készülékekbe „konvencionálisan” beépített lézerek hullámhosszán (488nm) gerjeszthető, ezért használatuk nem igényli új lézerforrás beépítését, vagyis széles körben alkalmazható (5.1. táblázat).

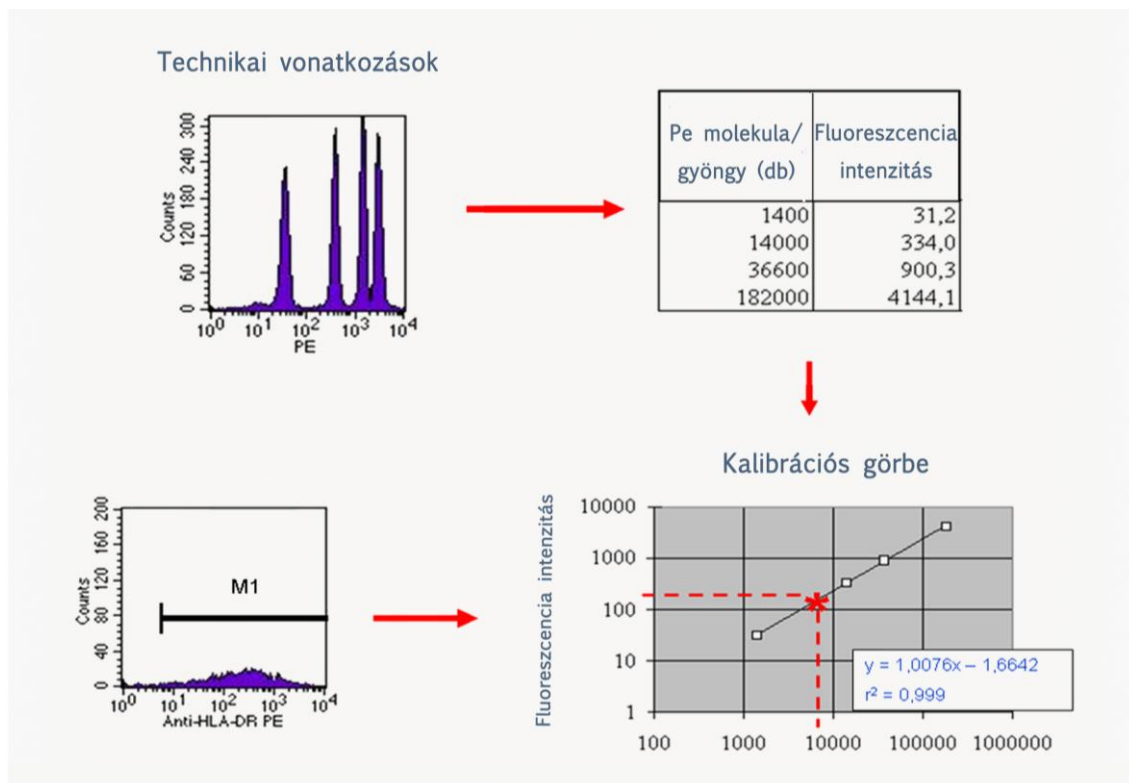
Gerjesztő hullámhossz: 488 nm (kék lézer)	FITC (fluoreszcens izotiocianát) Alexa Fluor 488 PE (fikoeritrin) PE-TX red (ECD; fikoeritrin - Texas vörös tandem) PE-Cy5 (fikoeritrin - Cy5 tandem) PerCP (peridinin klorofil A protein) PerCP-Cy5.5 (peridinin klorofil A protein komplex - Cy5.5 tandem) PE-Cy7 (fikoeritrin - Cy7 tandem)
Gerjesztő hullámhossz: 633 nm (piros lézer)	APC (allofikocianin) APC-Cy7 (allofikocianin - Cy7 tandem)
Gerjesztő hullámhossz: UV/Lila tartomány	Hoechst 33258 Hoechst 33342 Indo-1 Alexa fluor 405 Pacific Blue

5.1. táblázat: A FACS mérésekhez leggyakrabban használt fluoreszcens festékek

A diagnosztikus mérések során főként a különféle sejtpopulációk jelenlétének kimutatása, mennyiségük (arányuk) meghatározása, ritkábban funkcionális állapotuk jellemzése a cél. Ezt általában immunfenotipizálással, azaz a sejtfelszíni vagy a sejten belüli fehérjék antigén-antitest reakción alapuló jelölésével (fluorokrómmal konjugált monoklonális antitestek felhasználásával) végzik.

Egyetlen fluorokróm alkalmazása esetén a detektált fluoreszcens jel hisztogramon jelenik meg. A fluoreszcencia intenzitás alapján a hisztogramról leolvasható, hogy a vizsgált sejt specifikusan megkötötte-e a hozzáadott antitestet, vagy sem. Ez biológiai szempontból arról ad felvilágosítást, hogy a vizsgált sejtek expresszálják-e a keresett antigént (pl. differenciálódási vagy aktivációs markert), vagy sem („igen –nem” válasz). A hisztogramok számszerű értékelése (a görbe alatti terület

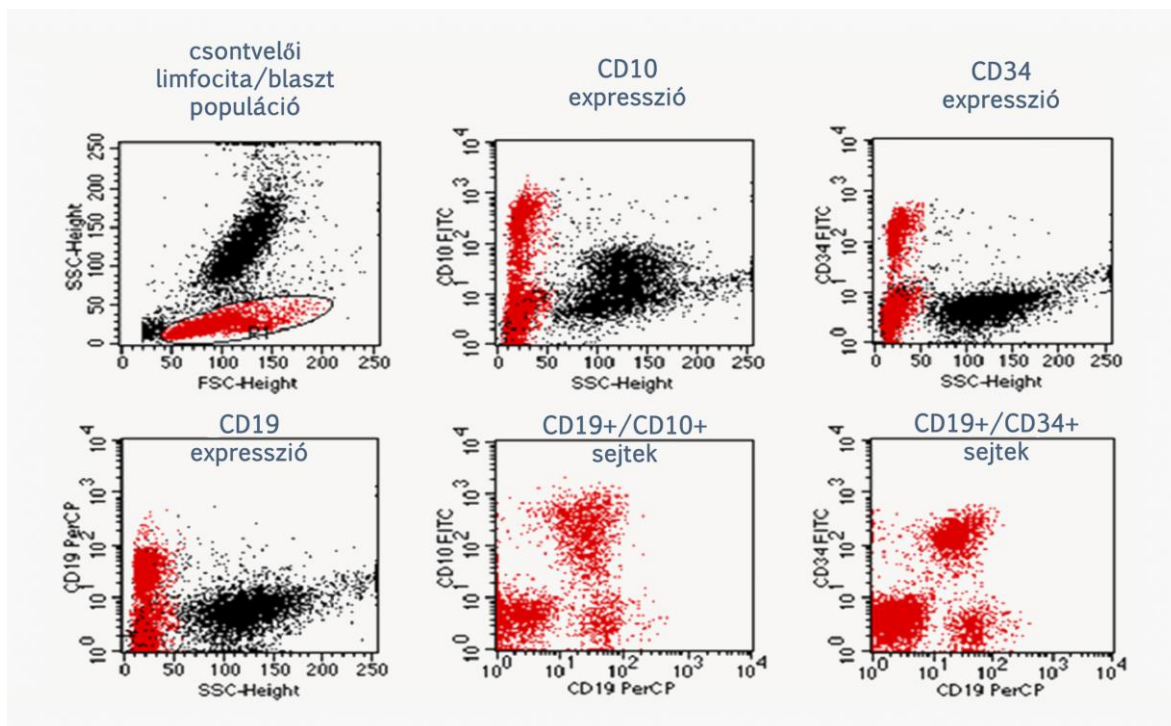
meghatározása) a pozitív (a keresett fehérjét expresszáló) és a negatív (a keresett fehérjét nem hordozó) populációk %-os arányáról is felvilágosítást ad. A detektált fluoreszcencia intenzitás mértéke a megkötött fluoreszcens festékekkel, vagyis közvetve a megkötött antitestek számával arányos. Ez biológiailag azt jelenti, hogy minél nagyobb fluoreszcens jelet detektálunk, annál nagyobb mértékben expresszálja a vizsgált sejt a keresett antigént. Ismert mennyiségű fluoreszcens festékkel jelölt kalibrációs gyöngyök alkalmazásával lehetőség nyílik a fehérje expresszió számszerű meghatározására is (5.11. ábra).



5.11. ábra: Fehérje expresszió számszerű meghatározása gyöngyök alkalmazásával

Tekintettel arra, hogy a sejtcsoportok korrekt azonosítása csak több fehérje egyidejű jelenléte alapján lehetséges (fehérje mintázat), az egyszínű festéseket egyre inkább felváltják a többszínű jelölések (különböző hullámhosszon emittáló festékek párhuzamos alkalmazása). Többszörös jelölések alkalmával a detektált fluoreszcenciák egymás függvényében, felhőképeken ábrázolódnak. A felhőképekről, hasonlóan a hisztogramokhoz, kideríthető az expresszió megléte, ill. hiánya („igen-nem” válasz), számszerűsíthető a vizsgált antigéneket hordozó sejtek aránya (%), a fluoreszcencia intenzitás meghatározásával megállapítható az expresszió mértéke, és nem utolsósorban kideríthető a ko-expresszió (5.12. ábra).

Mivel a fluorofórok nem egy diszkrét hullámhosszon bocsátják ki a fényt, hanem széles sávban, ezért többszínű jelölések esetén spektrális átfedésekkel kell számolni. Ezek kiküszöbölésére szolgál a fluoreszcencia kompenzáció.



5.12. ábra: Ko-expresszió ábrázolása

5.4. Mintaelőkészítés diagnosztikus FACS mérésekhez

5.4.1. Sejtszuspenzió készítés

Mivel áramlási citométerrel csak különálló sejteket lehet vizsgálni, ezért egyrészt leggyakrabban az eleve szuszpenzió formájában nyerhető biológiai mintákat (pl. perifériás vér, csontvelő aspirátum, liquor, vizelet) használják, másrészt szolid szövetek esetében a minta előkészítés első lépése a sejtszuspenzió előállítása. A sejtszuspenziók előállításának sokféle módszere ismert (pl. mechanikus szétválasztás, emésztés), de ezek részletezése jelen összefoglaló kereteit meghaladja. Annyit azonban mindenképpen érdemes megemlíteni, hogy a szövetek szétválasztásánál törekedni kell az egyes sejtek épségének és felszíni fehérje mintázatuk intaktságának megmaradására, hiszen ez a vizsgálat elvégzésének és értékelhetőségének egyik feltétele.

5.4.2. Eritrolízis (erythrolysis)

A perifériás vérminták és a csontvelő aspirátumok előkészítése során szükséges a „nagy többségben” jelen levő vörösvértestek feloldása (lizálás, *erythrolysis*). Az eritrolízisnek számos módszere ismert (hipotóniás oldattal, ammónium-klorid oldattal, stb. történő lizálás), amelyek részletes leírása helyett a szakirodalomra utalunk.

5.4.3. Fluoreszcens jelölés

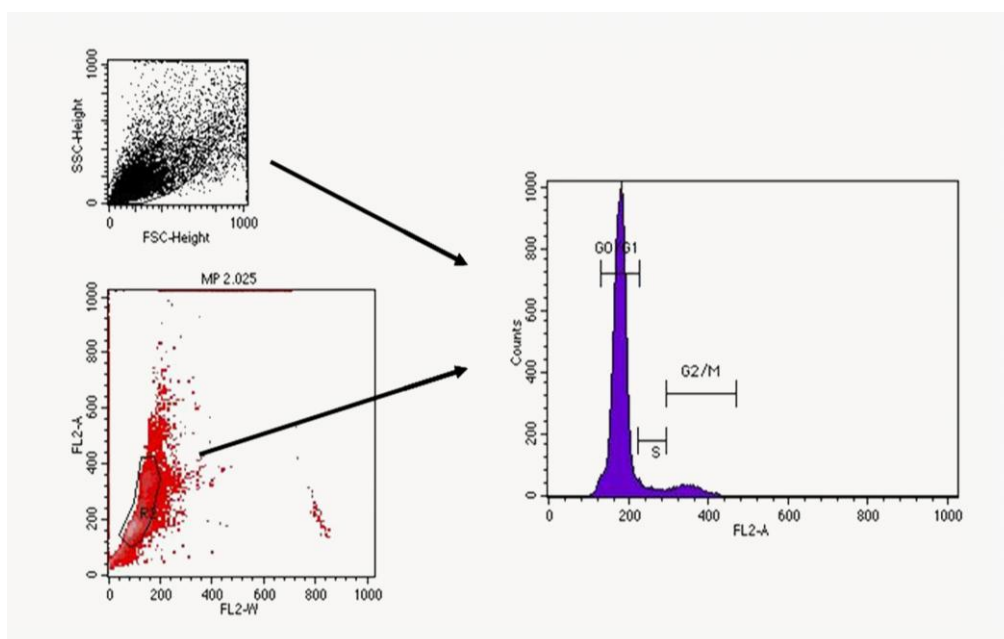
A sejtek fluoreszkáló festékekkel történő jelölése technikai szempontból alapvetően kétféle lehet: 1) alkalmazhatunk valamely sejtalkotórészhez ill. molekulához specifikusan kötődni képes fluoreszkáló

anyagot (direkt / közvetlen festés), vagy 2) megjelölhetjük a sejt valamely struktúráját (antigénjét) a hozzá specifikusan kötődő, fluorokrómmal jelzett ellenanyaggal (immunfenotipizálás).

5.4.3.1. Közvetlen jelölés

A klinikai laboratóriumi gyakorlatban leggyakrabban alkalmazott közvetlen festési eljárás a DNS tartalom propidium jodiddal (PI) történő jelölése. A PI sztöchiometrikus módon (5 bázispáronként 1 PI molekula) képes beépülni a kettősszalú DNS ill. RNS molekulákba, így RN-áz kezelés után, PI festéssel lehetőség nyílik a DNS tartalom quantitativ mérésére és sejtciklus analízisre. (5.13. ábra)

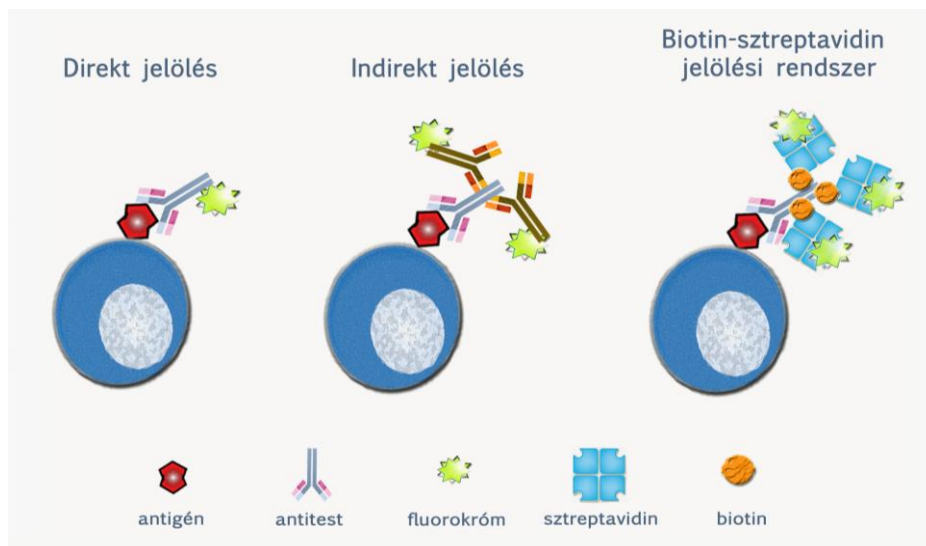
Közvetlen jelöléssel jellemezhető számos esetben a sejtek funkcionális állapota is, pl. fluoreszcens szubsztrátokkal az enzimek aktivitása, a sejtmembrán megváltozott lipid összetételének detektálásával az apoptózis, oxigén gyökökre érzékeny fluorokrómokkal a reaktív oxigén intermedier (ROI) termelés, stb. követhető nyomon.



5.13. ábra: Fluoreszcens jelölés a DNS tartalom kimutatására

5.4.3.2. Immunfenotipizálás

A sejtek fluorokrómmal konjugált antitestekkel történő jelölése során a specifitást az antigén–antitest kötődés biztosítja. A fluoreszcens festék és a specifitást biztosító monoklonális (ritkábban poliklonális) antitest kapcsolata szerint megkülönböztetünk direkt és indirekt immunfenotipizálási technikákat. Direkt immunfenotipizálás esetében a fluorokrómot a vizsgálni kívánt antigénre specifikus antitesthez (primer / elsődleges antitest) kapcsolják, míg indirekt eljárás esetében a primer antitest jelöletlen, ezért a láthatóvá tételéhez valamilyen második, jelzett antitestre van szükség (szekunder / másodlagos jelzett antitest). Az indirekt jelölés speciális lehetősége a biotinilált primer antitest használata, aminek a láthatóvá tételéhez fluorokrómmal konjugált streptavidin használható. (5.14. ábra) Mindkét technikai megoldásnak vannak előnyei: direkt jelölés esetén kisebb az aspecifikus bekötődés veszélye, az indirekt festés pedig felerősíti a detektálendő jelet, hiszen 1 elsődleges, antigén-specifikus ellenanyaghoz egyidejűleg több szekunder antitest is bekötődhet.



5.14. ábra: Antitesttel történő jelölések

A klinikai gyakorlatban az immunfenotipizálás a legelterjedtebb, vagyis főként a sejtfelszíni és a sejten belüli fehérje mintázat alapján azonosítják és jellemzik a sejteket.

A fehérvérsejtek vizsgálata során felfedezett antigéneket az 1980-as évek óta nemzetközi munkaértekezletek (*International Workshops on Human Leukocyte Differentiation Antigens*) keretén belül vetik össze és csoportosítják. A besorolásra kerülő antigének a könnyebb azonosíthatóság kedvéért egy számot kapnak, melyet a "Cluster of Differentiation" kifejezés rövidítéséhez, a „CD” elnevezéshez kapcsolnak. A sorrendben kilencedik munkaértekezletet 2010-ben, Barcelonában hívták össze, ekkor az azonosított és besorolásra került leukocita antigének száma 363 volt (CD363) (5.2. táblázat).

	Mieloid sejtek				Limfociták		
Össejt marker	Granulocita	Monocita	Magakariocita	Eritrocita	T sejt	B sejt	NK sejt
CD34	ic MPO	CD14	CD41	Glikoforin A	CD2	CD19	CD16
CD117	CD13	HLA-DR	CD61	CD71	CD3	CD20	CD56
CD133	CD33	CD4	CD42a		CD4	CD22	
	CD15	CD13	CD33		CD8	HLA-DR	
	CD11b	CD33	CD13		CD5	CD79a	
	CD16				CD7	(CD10)	

5.2. táblázat: A legfontosabb CD markerek

5.5. A áramlási citometria alkalmazási területei

Az áramlási citometria felhasználási területeit didaktikai szempontból kétféleképpen mutatjuk be: 1) metodika központú felosztás; 2) klinikai alkalmazások.

5.5.1. Metodika központú felosztás

(A felsorolt csoportosítás a teljességre való törekvés nélkül készült.)

5.5.1.1. Fehérje kimutatások

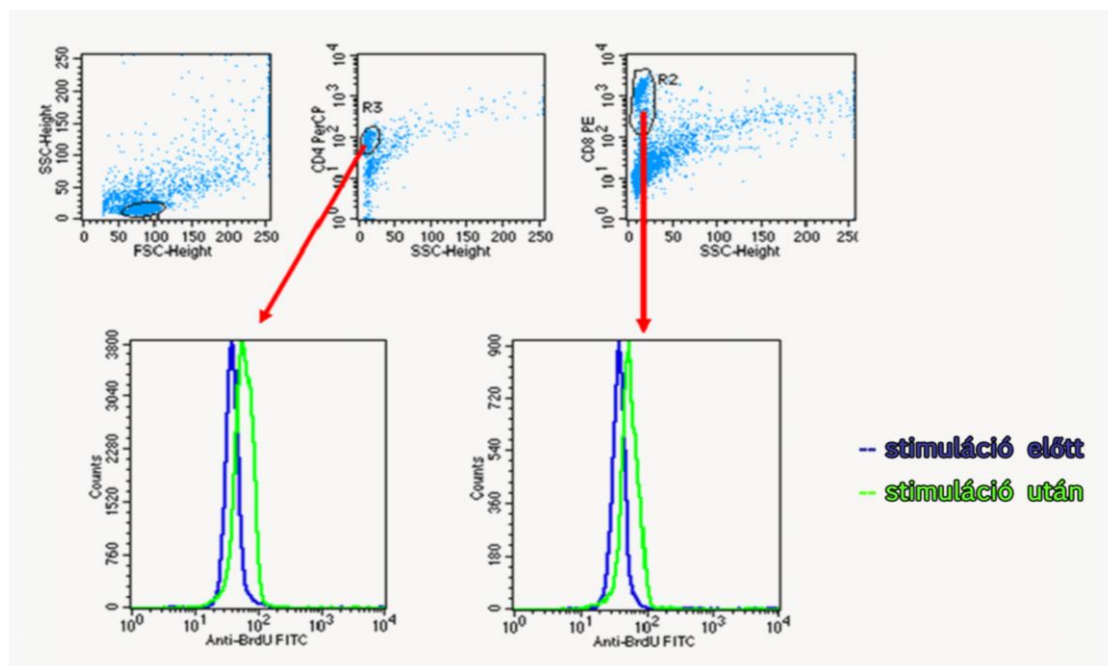
FACS módszerrel egyaránt lehetőség van a fehérjék specifikus és nem-specifikus kimutatására. A specifikus detektálás immunológiai alapokon nyugszik, a vizsgálni kívánt fehérjéket (mint antigéneket) fluoreszcensen jelölt ellenanyagokkal jelölik meg (immunfenotipizálás). Nem specifikus kimutatást az amino-, vagy a tiol-csoportok *in situ* detektálásával lehet végezni, ami azonban „csak” a fehérje jelenlétére, mennyiségére és lokalizációjára ad választ, azonban az összetételre nem. Ugyanakkor mindkét módszer alkalmas a receptor-ligand kölcsönhatások jellemzésére, hiszen amino-reaktív fluorokrómok használhatók különféle ligandok jelzésére is, ill. a tiol-reaktív anyagok alkalmasak a fehérjék konformáció változásainak detektálására is.

Speciális lehetőségeket nyitott meg a Zöld Fluoreszkáló Fehérje (*Green Fluorescent Protein* = GFP) felfedezése, mely sikeresen használható a transzfekciók hatásfokának detektálására. A transzfekció során a GFP-t kódoló *gfp* gént közvetlenül a vizsgálni kívánt fehérje stop kodonja elé építik be, így amikor a fehérjét kódoló gén átíródik, a GFP-t kódoló gén is át fog íródni, tehát a sejtben megjelenik a fluoreszcens fehérje. A fluoreszcencia megléte tehát a vizsgálni kívánt fehérjét kódoló gén sikeres expresszióját bizonyítja. Ha a *gfp* cDNS-t egy promóter régió után építik be, a GFP mindig meg fog jelenni, amikor a promóter aktiválódik, így a gén expressziójának szabályozása is tanulmányozható. A GFP riporter-plazmiddal történő kotranszfekciónak további előnye, hogy szortolással szelektálni lehet a sikeresen transzfektálódott sejteket.

Néhány patológiás állapot diagnózisához vagy prognosztikus megítéléshez bizonyos fehérjék sejtfelszíni expressziójának a mértékét kell ismernünk. Egyes esetekben elegendő, ha ki tudunk mutatni különbséget a kóros sejtek és az egészséges sejtek között: pl. a leukocita adhézión deficiencia (LAD) I. típusában a CD11b ill. a CD18, II. típusban pedig a Lewis X antigén szializált formájának csökkent expressziója detektálható a neutrofil granulocitákon. *Spondylitis ankylopoetica*-ban (Bechterew kór) éppen ellenkezőleg, a HLA-B27 fokozott expressziójának van prognosztikus jelentősége. Ismertek olyan klinikai állapotok is, amelyekben valamely expresszált protein abszolút számának ismerete az irányadó: pl. septicus állapotban a monociták HLA-DR és a granulociták CD64 (FcγRI) expressziójának quantitativ meghatározása alapvető fontosságú a folyamat kimenetelének megítélésében. A fehérje expresszió számszerű meghatározására ismert mennyiségű fluoreszcens festékkel jelölt kalibrációs gyöngyöket használnak (5.14. ábra).

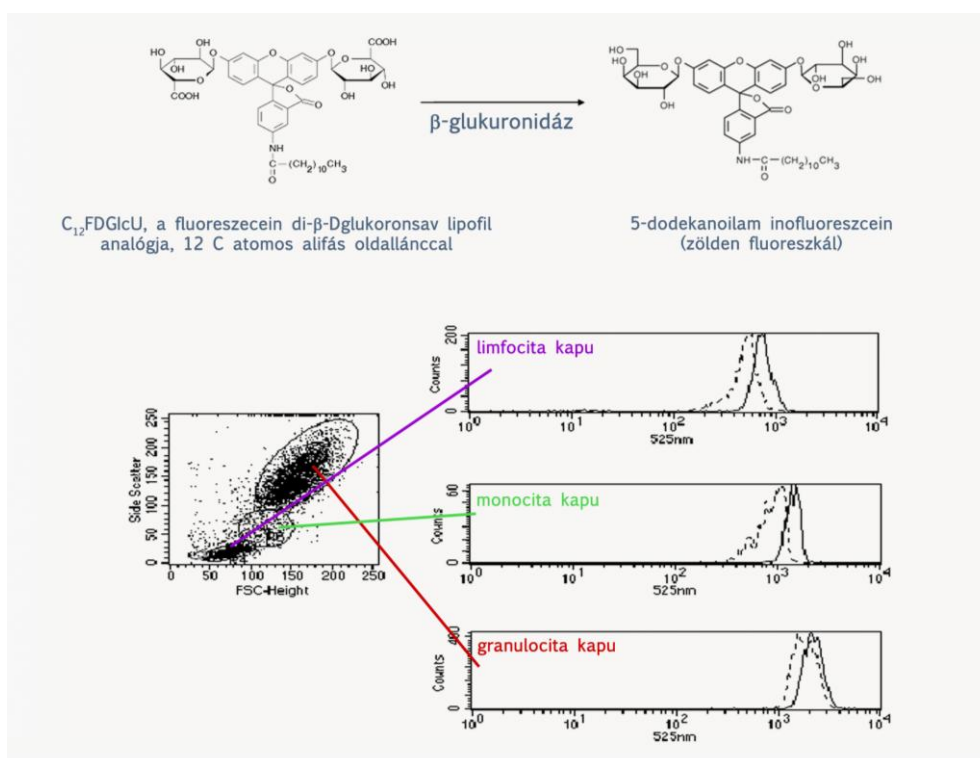
5.5.1.2. Szintézis vizsgálatok

Fluoreszcens „építőkövek” (pl. nukleotidok, monoszacharidok, zsírsavak, stb), vagy a sejtekből fiziológiásan hiányzó anyagok felhasználásával új molekulák képződése is nyomon követhető. PI. timidin-analógok (5-bróm-2'-deoxiuridin = BrdU, etinil deoxiuridin = EdU, stb) inkorporációjával sejtciklus analízis végezhető (5.15. ábra).



5.15. ábra: Sejtciklus-analízis BrDU beépülés mérésével

5.5.1.3. Enzimaktivitás mérések



5.16. ábra: Beta-glukuronidáz enzimaktivitás mérése

Fluoreszcens szubsztrátok felhasználásával az enzimaktivitás méréseket élő sejtekben, *in situ* körülmények között is el lehet végezni. A több paraméter együttes detektálása lehetőséget nyújt a sejtpopulációk egyidejű azonosítására, azaz sejt-specifikus enzimaktivitás meghatározására is.

Fluoreszcens szubsztrátokkal többek között vizsgálhatók már glikozidázok, foszfatázok, peptidázok, proteázok és oxidázok is. Biológiai szempontból ezek a mérések a sejtműködés széleskörű jellemzését (metabolikus útvonalak, jelátvitel, aktiváció, stb.) teszik lehetővé (5.16. ábra).

5.5.1.4. Nukleinsav vizsgálatok

Fluoreszcens nukleinsav festékek segítségével a sejtek DNS és RNS tartalma (sejtciklus és sejtpusztulás) vizsgálható. A nem-permeábilis nukleinsav festékek alkalmasak a sejtek életképességének (**viabilitás**) detektálására is. Diagnosztikus szempontból DNS tartalom meghatározást leggyakrabban a tumorsejtek osztódási képességének kimutatására vagy a kezelést követő sejtpusztulás mértékének meghatározására használják, míg az RNS tartalom detektálásával azonosítják pl. a retikulocitákat. A nukleinsav tartalom detektálásának mikrobiológiai jelentősége is van, hiszen egyrészt a mikrobák életképességének ismerete (viabilitás vizsgálatok) előre jelezheti a fertőzés kimenetelét, másrészt nyomon követhető a fertőzött sejtek nekrozis vagy apoptózis révén történő pusztulása is.

5.5.1.5. Sejtalkotórészek vizsgálata

Számos áramlási citométerre adaptált specifikus sejtorganelum kimutatási rendszer ismert. Pl. fluoreszcens jelöléssel vizsgálható a citoskeleton *in vivo* dinamikája, fluoreszcens lipid analógokkal nyomon követhető a plazmamembrán és a citoplazmatikus membrán-rendszerek működése, de fluoreszcens zsírsavakkal vizsgálhatók a jelátviteli útvonalak és a sejtaktiváció is.

5.5.1.6. Funkcionális vizsgálatok

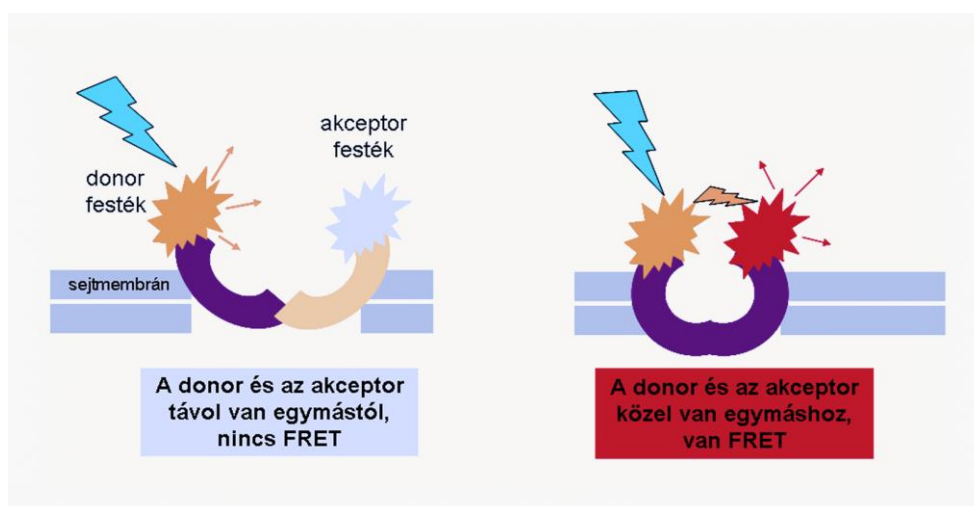
Az áramlási citométerrel detektálható funkcionális mérések sokfélesége miatt, elsősorban a lehetőségek felsorolására szorítkozunk és az egyes módszerek részletezésében az immunológia gyakorlat anyagára utalunk.

- Viabilitás
- Sejtosztódás / sejtciklus
- Apoptózis (kaspáz-aktivitás, mitokondriális membrán depolarizáció, TUNEL = Terminal DeoxynucleotideTransferase dUTP Nick End Labeling módszer)
- Fehérjeszintézis (pl. citokin termelés)
- Fagocitózis és endocitózis
- Jelátvitel (pl. fluoreszcens zsírsavak, anti-foszfoprotein antitestek, stb)
- Citoplazmatikus ion-koncentrációk (ion-szenzitív fluoreszkáló festékek)
- Transzport fehérjék működése (fluoreszcens szubsztrátok használata pl. multidrug rezisztencia = MDR kimutatására)
- Reaktív oxigén gyökök (ROI) és nitrogén monoxid (NO) detektálása
- Fém-ionok mérése (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} indikátorok)
- pH detektálás
- Membránpotenciál mérés

- Kinetikai mérések (pl. enzimaktivitások időbeni detektálása)
- a sejtek redox állapotának meghatározása (tiolok és diszulfid kötések quantitativ mérése)

5.5.1.7. Molekulák relatív távolságának meghatározása: FRET

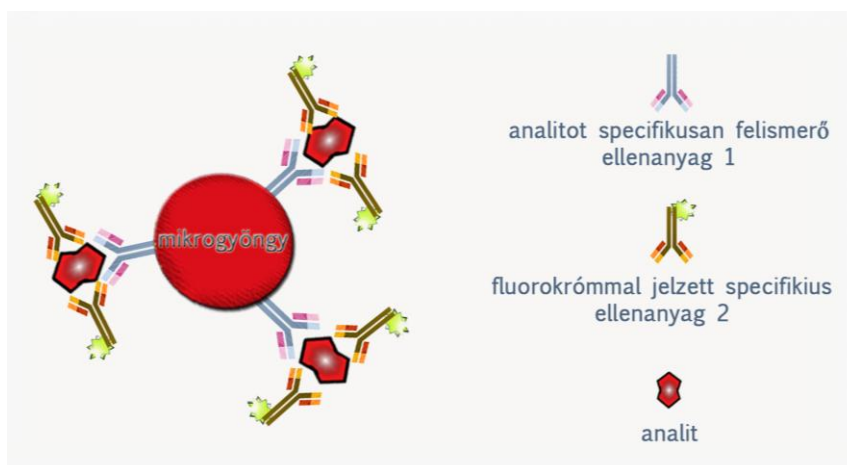
Molekulák relatív távolságának mérésére 2 fluoreszcens festéket használnak egyszerre. A donor fluorokróm a gerjesztésre használt fény hullámhosszára érzékeny, az akceptor a donor által emittált hullámhosszra. Ha a 2 molekula elég közel van egymáshoz, akkor a donor által kibocsátott fény gerjeszti az akceptort, tehát a mérés során az akceptor fluoreszcenciája jelenik meg. Ha a 2 molekula távol van egymástól, akkor a mérés során a donor fluoreszcenciája detektálható (5.17. ábra).



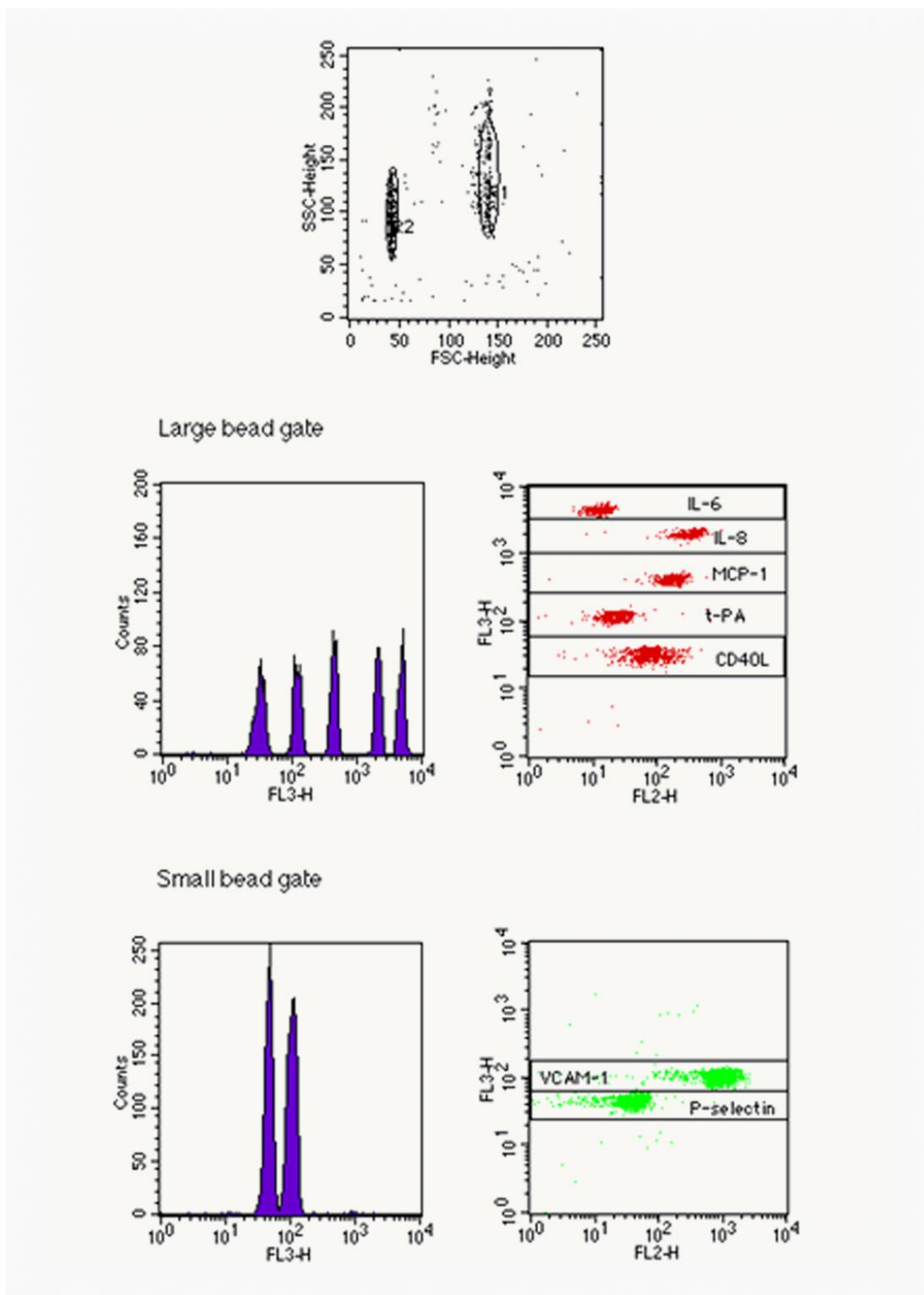
5.17. ábra: Molekulák relatív távolságának mérésére

5.5.1.8. Szolubilis molekulák mérése (mikrogyöngy-alapú detektáló rendszerek)

Szintetikus mikrogyöngyök felszínéhez kötött molekulák (fehérjék, oligonukleotidok, lipidek és szénhidrátok) segítségével lehetőség van különféle szolubilis analitok specifikus megkötésére. A méretbeli detektálhatóságot a mikrogyöngyök, az analitok megkülönböztetését a különböző színű fluorokrómmal konjugált detektáló ellenanyagokkal történő előhívás biztosítja. A vizsgálat előnye, hogy alkalmazásával nagyon kis mennyiségű mintából többféle analitot lehet egyidejűleg, quantitativ kimutatni (pl. >10 citokin 25 μ l szérumból). A módszer érzékenysége megegyezik az ultraszenzitív ELISA rendszerekével (pg/ml tartomány) (5.18. ábra).



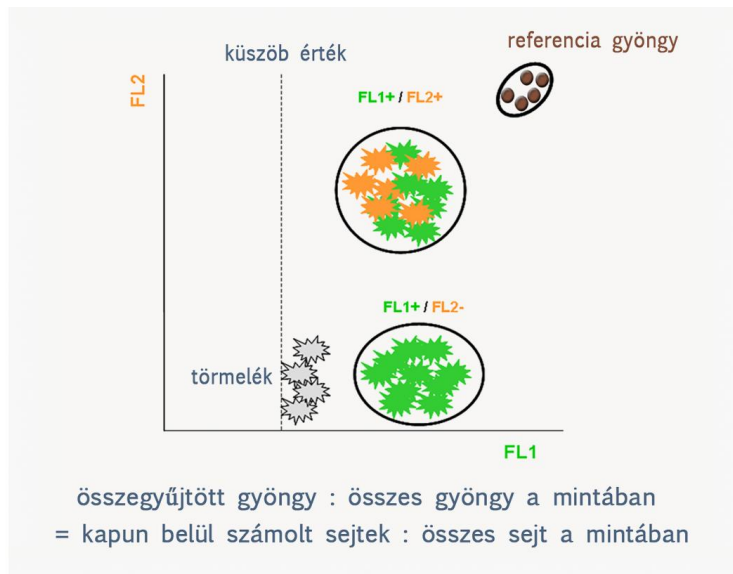
5.18a ábra: Mikrogyöngy alapú módszerek elve



5.18b ábra: Mikrogyöngy alapú mérés

5.5.1.9. Abszolút sejtszám meghatározás

Ismert mennyiségű polisztiirén referencia gyöngyök belső standardként történő felhasználásával abszolút sejtszám meghatározás végezhető (5.19. ábra).



5.19. ábra: Sejtszám mérés polisztién referencia gyöngyök standardként történő felhasználásával

5.5.1.10. Sejtszeparálás

A flow cytometriás sejtszeparálás előnyei a hagyományos módszerekkel szemben:

- A sejtpopulációk és szubpopulációk szétválasztása multiparaméteres kritériumok alapján történik (FS/SS; fluoreszcencia).
- A szeparálás sebessége egyedülállóan nagy: több mint 100000 sejt / sec, miközben a hatékonyság (tisztaság) meghaladja a 95%-t.
- A modern készülékek alkalmasak a nagyon alacsony arányban jelen lévő sejtek (< 0,1% / minta) biztos szeparálására is („rare event sorting”), aminek igen nagy jelentősége van pl. a minimális reziduális betegség monitorozásban, vagy az autológ transzplantációhoz szükséges ritka őssejt / progenitor sejt izolálásban.
- A szortolás steril körülmények között is végezhető, így a kiválogatott sejtek továbbtenyészthetők, klonálisan felszaporíthatók.

5.5.2. Kórképek szerinti felosztás

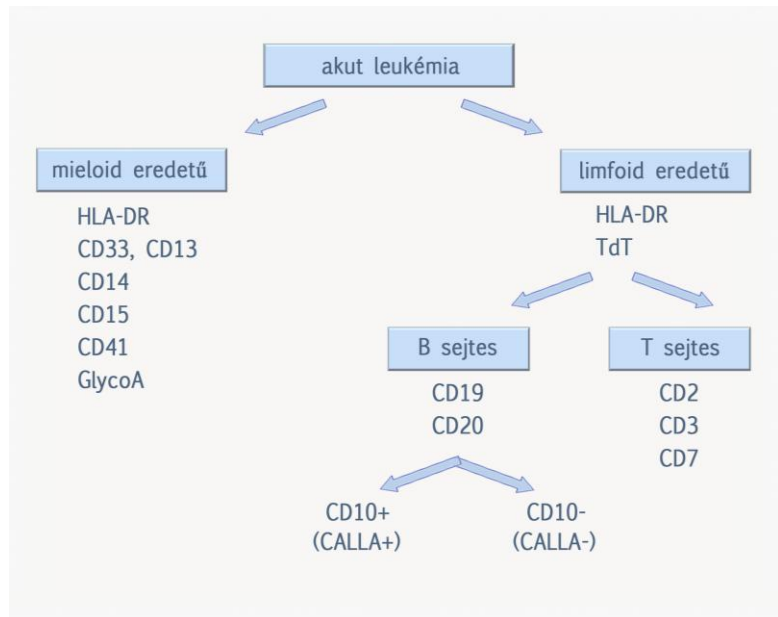
5.5.2.1. Malignus hematológiai betegségek

5.5.2.1.1. Diagnosztika és differenciál diagnosztika

Az áramlási citometria szempontjából a rosszindulatú vérképzőrendszeri megbetegedések diagnosztikája és a differenciáldiagnosztikája a sejtvonal eredet és az érési stádium megállapításán alapul, amelyet a sejtfelszíni és citoplazmatikus antigének (CD markerek) kimutatásával végeznek. Mivel a sejtfelszíni antigének többsége egy sejtvonal több érési stádiumában, esetleg többféle sejtvonalon is kimutatható, ezért diagnosztikus céllal csaknem mindig multiparaméteres méréseket kell végezni. A megfelelő diagnosztikus és differenciál diagnosztikus értékkel rendelkező, lehetőség szerint költségtakarékos, a laboratóriumok közötti összehasonlításra alkalmas mérési rendszereket konszenzus protokollokban foglalták össze.

A konszenzus protokollok több típusa használatos:

- Az “alappanel” célja a klinikai kép, a citológia, a citokémia, esetleg a genetikai vizsgálatok alapján felállított diagnózis megerősítése. Az immunfenotipizáláshoz viszonylag kevés sejtfelszíni és intracelluláris markert használ fel. Célja a mieloid és a limfoid eredet elkülönítése, valamint a legalapvetőbb prognosztikai markerek (pl. a CD10 = CALLA) expressziójának vizsgálata (5.20. ábra).



5.20. ábra: Alappanel malignus hematológiai betegségekhez

- A kibővített konszenzus protokollok célja a pontos stádiumbeosztás megállapítása. Az immunfenotipizáláskor vizsgálatra kerülnek a sejtvonal specifikus differenciálódási markerek mellett az egyes sejttípusok érettségi állapotára jellemző, valamint a prognosztikában jelentős antigének is. A malignus klón immunfenotípusának egyre pontosabb ismerete révén az áramlási citometriát a diagnózis felállításához a rosszindulatú hematológiai betegségek monitorozására, a terápia hatékonyság felmérésére és a recidívák korai felderítésére is használják.

5.5.2.1.2. Minimális reziduális betegség diagnosztikája

Az MRD (minimal residual disease) a terápia ellenére megmaradó, de klinikai tüneteket nem okozó állapot. Kimutatásában a FACS módszer előnye a gyorsaság és a nagyon nagyszámú sejt vizsgálatának lehetősége (500.000–1.000.000 / vizsgálat), hátránya a molekuláris genetikai vizsgálatokhoz képest kisebb érzékenység.

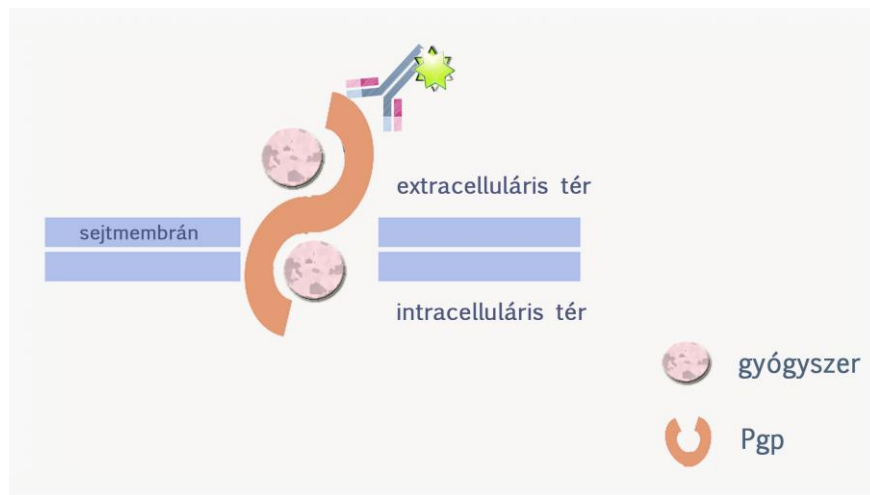
5.5.2.1.3. Recurrens hematológiai betegségek kimutatása

Habár a leukémiák újra-megjelenésének kimutatásában a fő szerep a molekuláris biológiai módszereké, a multiparaméteres immunfenotipizálásnak a szerepe sem elhanyagolható. Előnyei és hátrányai megegyeznek a MRD kimutatásával.

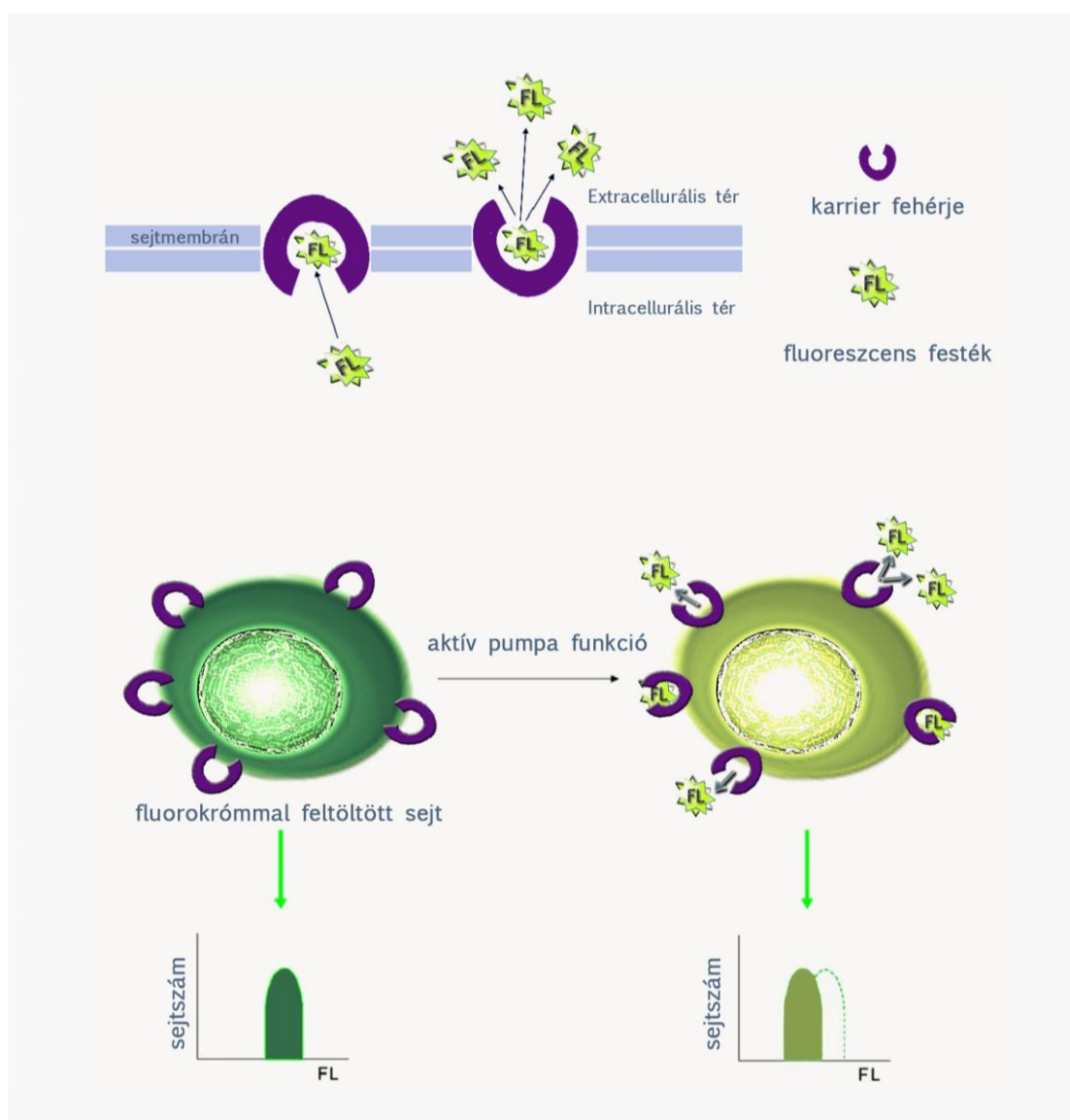
5.5.2.1.4. Terápia iránti érzékenység vizsgálata (MDR = multidrug resistance)

Aromlási citometriával a terápia hatékonyságának megítélésére többféle lehetőség kínálkozik: 1) monitorozható a diagnózis alapjául szolgáló malignus sejtek mennyisége, a kóros és az ép sejtek arányának alakulása (immunfenotipizálás), 2) vizsgálható a gyógyszer-rezisztenciával összefüggésbe hozható membránfehérjék jelenléte (immunfenotipizálás) és 3) nyomon követhető a rezisztenciáért felelős fehérjék pumpafunkciója (funkcionális vizsgálati módszer) (5.21a. ábra). A transzport fehérjék funkcionális aktivitását fluoreszcens szubsztrátjaik felhasználásával lehet detektálni. A fluoreszcens anyaggal feltöltött sejtek fluoreszcenciája a transzport-fehérje működésének hiányában magas (nem

tud kijutni belőle a festék), működő pumpa esetében azonban alacsony (kipumpálásra kerül a bejuttatott fluorokróm). A vizsgálat specifitásának ellenőrzésére specifikus transzport-működést gátló anyagokat használnak (5.21b-c. ábra)



5.21a. ábra: MDR membránfehérjék immunfenotipizálása



5.21b-c. ábra: MDR fehérje funkcionális jellemzése

5.5.2.2. Immunhiányos kórképek

Immunhiányos állapotok az immunrendszer egy vagy több sejttípusának mennyiségi vagy funkcionális zavara következtében kialakuló, az immunrendszer elégtelen működésével jellemezhető kórképek. Kialakulásuk szerint veleszületett és szerzett formái különböztethetők meg. A tüneteket az érintett sejttípusok morfológiai és/vagy funkcionális változásai okozzák.

Az immunrendszer vizsgálatának célkitűzései:

- a diagnózis felállítása (az immunrendszer betegségének kimutatása)
- a kórkép jellemzése
- a betegség aktivitásának nyomon követése
- a terápiás válasz monitorozása

5.5.2.2.1. Fenotípus vizsgálatok az immunhiányos állapotok diagnosztikájában és nyomon követésében

- Keringő limfocita szubpopulációk egymáshoz viszonyított arányának vizsgálata (pl. T-B sejtarány, CD4:CD8 arány, stb.)
- Keringő limfocita szubpopulációk jellemzése (pl. memória sejtek jelenlétének kimutatása; aktivált limfociták azonosítása, antigén-specifikus limfociták jelenlétének kimutatása, stb.)
- CD4+ / CD3+ T helper sejtek mennyiségének vizsgálata HIV fertőzésben, a folyamat aktivitásának nyomon követésére (az abszolút CD3+/CD4+ Th sejtszám monitorozásának terápiás vonzata van: a WHO (World Health Organization) 2010 állásfoglalása szerint a HIV fertőzésben szenvedő betegek antirális kezelését meg kell kezdeni, ha a CD4+ limfocita szám ≤ 350 sejt/mm³ alá süllyed).
- Fagocita képesség vizsgálata
- ROI (reaktív oxigén intermedier) termelés vizsgálata
- Citokin termelő képesség vizsgálata
- NK sejtek citotoxikus aktivitásának vizsgálata
- Stb.

5.5.2.3. Autoimmun betegségek

Az áramlási citometriát a szervezet saját antigénjei ellen irányuló, szövetkárosodáshoz vezető, kóros autoimmunitás vizsgálatában többféleképpen is fel lehet használni. Ki lehet mutatni a keringő autoantitestek jelenlétét, detektálni lehet az autoimmun folyamatban részt vevő sejtek számát és funkcionális állapotát, ill. monitorozni lehet a folyamat aktivitását.

5.5.2.3.1. Autoimmun betegségek diagnosztikája

A keringő autoantitestek kimutatásának egyik lehetséges módszere a mikrogöngy alapú detektálás. Az autoantigénnel fedett fluoreszcens műanyag részecskék felszínéhez a beteg szérumból bekötődő autoantitesteket más hullámhosszon emittáló fluorokrómmal konjugált anti-humán IgG ellenanyaggal teszik láthatóvá. Mivel a fluoreszcens partikulumokat meg lehet különböztetni a fluoreszcencia intenzitásuk szerint, ezért egyszerre több autoantitest mérésére van lehetőség (pl. dsDNA, SSA, SSB,

Sm, Sm/RNP, Scl70, Jo-1, stb). A vizsgálat előnyei: 1) a gyorsaság (nem kell összevágni több beteg vizsgálati mintáját, mint pl. az ELISA rendszerek esetén), 2) a szükséges minta mennyiség alacsony ($\approx 25 - 30 \mu\text{l}$), 3) több autoantitest mérhető szimultán (≥ 10).

A keringő autoantitestek kimutatásának speciális lehetősége, amikor a beteg szérumában jelen lévő ellenanyagokat egészséges egyénből izolált sejtekhez kötik, majd fluorokrómmal konjugált anti-humán immunglobulinnal hívják elő. Ezt a módszert alkalmazzák pl. autoimmun trombocitopeniákban (ITP), a vérlemezkékhez specifikusan kapcsolódó autoantitestek kimutatására.

5.5.2.3.2. Az autoimmun betegségek aktivitásának nyomon követése

Az autoimmun folyamatban szerepet játszó sejtpopulációk (regulatórikus T sejtek, Th17 limfociták, stb.) arányának és abszolút mennyiségének, esetleg aktiváltsági állapotának monitorozása hozzásegíthet a betegség prognózisának megítéléséhez. Fontos azonban hangsúlyozni, hogy a perifériás vérben keringő limfocita szubpopulációk jellemzése nem mindig reprezentálja a betegségre jellemző szöveti lokalizációt. Így pl. *rheumatoid arthritis* esetén célszerűbb az ízületi folyadék, *sclerosis multiplex* esetén a liquor, stb. sejtösszetételét vizsgálni.

Napjainkban egyre inkább felismerik az aktivált és elpusztuló sejtekből származó, membránnal körülvett részecskék, a mikrovezikulák klinikai jelentőségét. Számos közlemény utal arra, hogy plazma szintjük megnő aktív autoimmun folyamatokban, sőt jelenlétük biomarkerként is felhasználható. A mikrovezikulák vizsgálatának legelterjedtebb módszere az áramlási citometria.

5.5.2.4. Szervtranszplantáció

A sikeres szerv transzplantáció egyik alapfeltétele az immunológiai kilökődés (*rejectio*) megakadályozása. Az alkalmazott immunszuppresszív kezelések azonban a transzplantált betegeket fogékonyra teszik a fertőzésekre. Az áramlási citometria segítségével a transzplantáltak immunológiai válaszreakciói több ponton is monitorozhatók: 1) kimutathatók és osztályozhatók az alloreaktív ellenanyagok, így azonosíthatók a „nagy rizikójú donor – recipiens párosok”, 2) kontrollálhatók a sejtes immunválasz komponensei (rejekció *versus* infekció: differenciál diagnózis), 3) TCR analízis segítségével meghatározható a transzplantáció hatékonysága.

5.5.2.4.1. HLA-asszociáció

Mivel egyes kórképek és a HLA-haplotípus között szoros összefüggés mutatható ki, ezért a HLA-antigének sejtfelszíni expresszió vizsgálatának klinikai jelentősége van. A napi gyakorlatban a limfociták HLA-B27 expressziójának a FACS analízise terjedt el leginkább, amit főként Morbus Bechterew (*spondylitis ankylopetica*) családi halmozódásában vizsgálnak.

5.5.2.5. Fertőzések nyomonkövetése

Napjainkra a nukleinsav kimutatáson alapuló módszerek a rutin mikrobiológiai diagnosztika részét képezik. Számos előnyük mellett (felgyorsítják a diagnosztikát, javítják a specifitást és lehetővé teszik olyan patogének azonosítását is, amelyek nem, vagy csak nagyon nehezen tenyésztethetők, pl. *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia trachomatis*, stb), nem szabad elfelejteni, hogy egyrészt a

nukleinsav kimutatása nem egyenértékű a szaporodni képes kórokozók jelenlétével, másrészt ezek a metodikák nem teszik elérhetővé a gazdaszervezet immunrendszerének gyors monitorozását! Éppen ennek az űrnek a pótlása révén vált a mikrobiológiai diagnosztika hasznos eszközévé az áramlási citometria. A FCM legnagyobb előnye a nukleinsav detektáláson alapuló technikákkal szemben, a mikroorganizmusok egyedi, sejtszintű kimutatása. Gyorsasága révén – a minta laboratóriumba juttatását követő 2 órán belül eredményt adhat – kiemelt jelentőségre tehet szert a lassan növekvő mikrobák, a mycobacterium törzsek és a gombák kimutatásában. Mivel a megfelelő metodika (minta előkészítés) megválasztásával alkalmas a patogének pontos azonosítására, így különösen jól használható a kevert populációk okozta fertőzések diagnosztikájában. Nem utolsósorban lehetővé teszi a fertőzött szervezet immunrendszerének monitorozását (specifikus ellenanyagok kimutatása, citotoxikus immunválasz detektálása) és az antimikrobiális kezelés nyomon követését is.

Az áramlási citometria mikrobiológiai alkalmazási lehetőségei:

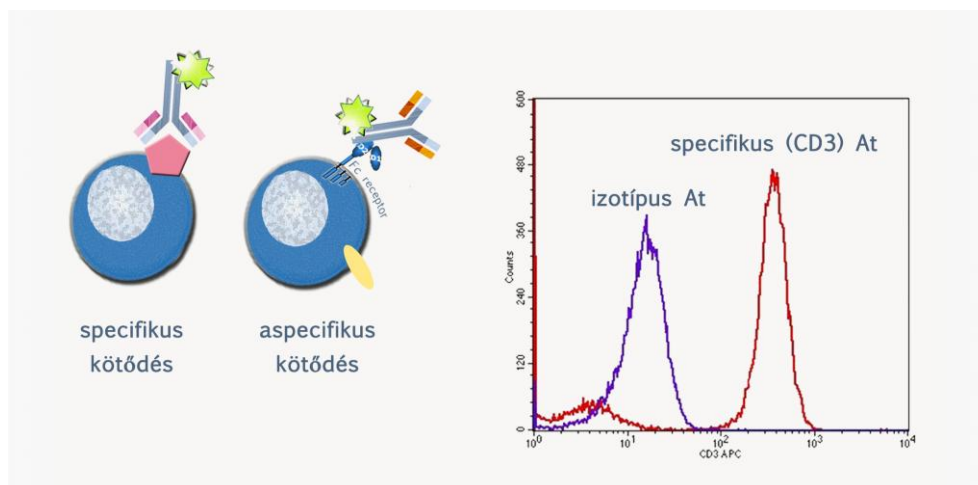
- Mikrobák azonosítása
 1. Heterogenitás vizsgálatok (fényszórás detektálása; specifikus fluorokrómok felhasználása; fluoreszcens Gram festés)
 2. Monoklonális ellenanyagok felhasználása a mikrobiológiai diagnosztikában: immunfenotipizálás
 3. Mikroorganizmusok és a gazdaszervezet kölcsönhatásainak vizsgálata
 4. Mikrobák azonosítása fluoreszcens festékekkel konjugált oligonukleotidok felhasználásával, ill. a nukleinsavak kimutatására alkalmas fluorokrómok segítségével
- Mikroorganizmusok élettani állapotának vizsgálata
 1. Életképesség vizsgálatok
 2. Mikrobák funkcionális vizsgálata (membránpotenciál mérés, enzimaktivitás meghatározás, stb.)
- Szerológiai vizsgálatok
- Antibiotikum érzékenység vizsgálatok
- Mikroorganizmusok szeparálása áramlási citométerrel („szortolás”)
- Immunstátusz monitorozás

ABSZOLÚT INDIKÁCIÓ	RELATIV INDIKÁCIÓ
Malignus hematológiai kórképek differenciál diagnosztikája	Autoimmun betegségek
MDR vizsgálat	Fertőzések
HIV fertőzés	HLA-asszociáció
Transzplantáció előkészítése és nyomon követése	Tumor prognosztika (DNS tartalom / sejtciklus)
Immunhiányos állapotok	Retikulocita szám meghatározás
PNH diagnosztika (CD55, CD59 expresszió)	Trombocita funkció vizsgálata

5.3. táblázat: Az áramlási citometria klinikai indikációs területei

5.6. Minőségellenőrzés (quality control)

Az áramlási citometriában szükséges minőségellenőrzésnek egyaránt ki kell terjednie a készülék (instrumentális QC) és a minta ill. a mintával kapcsolatos munkafolyamatok ellenőrzésére (biológiai QC). A készüléket érintő ellenőrző vizsgálatok között vannak napi és havi gyakorisággal elvégzendő műveletek. Ezek eredményei adnak felvilágosítást a műszer érzékenységről és stabilitásáról. Klinikai szempontból nagy jelentősége van a mintaelőkészítés validálásának. Immunfenotipizáláskor, a jelölésre használt ellenanyag a molekula az Fc részével is kötődhet a sejtekhez, amennyiben a vizsgált sejtek felszínén jelen vannak Fc receptorok (pl. granulocyták, NK sejtek, stb.). Ennek az aspecifikus kötődésnek a kimutatására **izotípus kontroll antitesteket** használnak. Az izotípus kontroll ellenanyag Fab része valamely, a vizsgált sejtben biztosan nem expresszálandó (általában egy másik faj antigénjét felismerő) molekulára specifikus, így a mintában lévő sejtekhez csak aspecifikusan, azaz az Fc részen keresztül képes kötődni. Ennek megfelelően az izotípus antitest jelölés után detektált fluoreszcencia felhasználható a „valódi” jelölés fluoreszcenciájának értékelésében (5.22. ábra).



5.22. ábra: Izotípus kontroll jelölés

5.7. Laboratóriumi normál értékek

A felnőtt egyének keringő limfocita alcsoportjainak laboratóriumi referencia tartományait az 5.4. táblázat tartalmazza.

	Limfocita	CD3+ T sejt	CD19+ B sejt	CD3+/CD4+ Th sejt	CD8+/CD4+ Tc sejt	CD4 : CD8	CD3-/CD56+ NK sejt
x1000/mikroliter	1,14-3,38	0,78-2,24	0,08-0,49	0,49-1,64	0,17-0,88	0,9-5,0	0,08-0,69
%		53-83	5-21	30-59	10-40		5-32

5.4. táblázat: Felnőttek keringő limfocita alcsoportjainak laboratóriumi referencia tartományai

6. IMMUNIZÁLÁS (BUZÁS EDIT)

Az immunterápiás eljárások során az immunrendszer működését mesterségesen módosítjuk.

Immunszuppresszióval elérhető:

- az autoimmun folyamatok gátlása (pl. methotrexát a sejtciklus S-fázisának gátlásával RA-ban gátolja a szinoviális sejtek szaporodását)
- az allergiás folyamatok gátlása (pl. glükokortikoidok allergiás reakcióban gátolják a gyulladásos citokinek termelődését)
- a transzplantációs tolerancia létrehozása (pl. ciklosporin gátolja az IL-2 termelést, ezáltal a T-sejt proliferációt).

Immunmodulációval elérhető:

- a TH1 / TH2 egyensúly eltolása autoimmun vagy allergiás kórképekben (pl. anti-TNF kezelés RA-ban)
- az ellenanyagválasz izotípus megoszlásának megváltoztatása allergiás kórképekben (pl. allergén specifikus deszenzitizálás).

Immunstimulációval elérhető:

- a tumorsejtek elleni válasz elősegítése (pl. melanómában IL-2 terápia segíti a tumor ellenes T-sejt szaporodást)
- a kórokozók elleni válasz elősegítése, a vakcinációval.

6.1. Immunizálás

6.1.1. Az immunizálás célja és gyakorlati kivitelezése

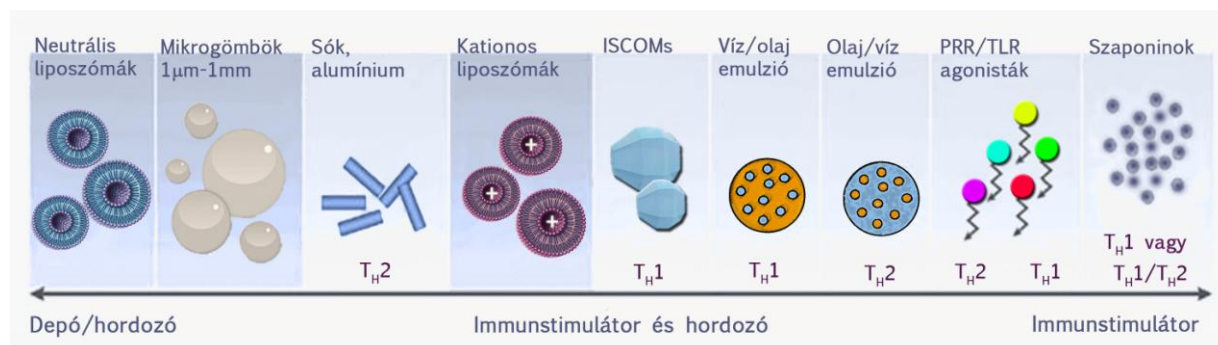
Fajidegen antigénekkal történő immunizálással hozhatjuk létre az *immunassay*-kben szekunder antitestként alkalmazott poliklonális ellenanyagokat. Ugyancsak **poliklonális** ellenanyagot állíthatunk elő, amennyiben birka vörösvértestekkel immunizálunk (pl. nyulat, sertést, stb.). A létrejött anti birka-vörösvértest antitesteket széles körben alkalmazhatjuk a komplement rendszer vizsgálatára.

A **monoklonális** antitestek előállításának is alapvető lépése az immunizálás. Elsősorban egereket alkalmazunk erre a célra. Amennyiben az immunizált szervezetből vett vérmintában (vérszérumban) magas titerben van jelen az immunizáló antigént felismerni képes antitest, úgy az immunizált egér lépéből izolált plazmasejteknek és egy egér lymphoma sejtvonalnak (Sp2/0) szomatikus fúziójával hozzuk létre a monoklonális antitesteket termelő **hibridómákat** (további részletet lásd a 8. fejezetben). Megfelelő genetikai hajlamot mutató rágcshálókban (elsősorban egerekben és patkányokban) antigénekkal történő immunizálással – pl. autoimmun – megbetegedések állatkísérletes modelljei indukálhatók. Ezek a modellek lehetőséget teremtenek arra, hogy standard és kontrollált körülmények között vizsgáljuk az adott betegségre jellemző pathomechanizmus.

Ilyen immunizálással indukált betegségmodellek pl. adjuváns arthritis (AA), kollagén által indukált arthritis (CIA), antigén által indukált arthritis (AA), proteoglikán által indukált arthritis (PGIA), glukóz 6 foszfát izomeráz arthritis (GPIA). A sclerosis multiplex széleskörben vizsgált modellje az experimentális allergiás encephalomyelitis (EAE).

Nagyon fontos alkalmazási területe az immunizálásnak a vakcinafejlesztés, annak is a preklinikai/állatkísérletes fázisa.

6.1.2. Az adjuvánsok, szerepük és formulázásuk



6.1. ábra: Adjuvánsok (Ref.2. alapján)

Az antigénbemutató sejteken különféle receptorokat vehetünk célba az immunizálás során alkalmazott adjuvánnal. Minden antigénbemutató sejtfeleség másféle receptorkészlettel rendelkezik, melyek egymás jelátviteli folyamatait is szabályozhatják sejten belüli párbeszéd (*crosstalk*) révén. A szintetikus mintázatfelismerő receptor agonisták pl. Pam3Cyws, MPL (monophosphoryl lipid) és LPS (lipopolysaccharide) analógok, PolyI-C, imidazoquinolinok, szintetikus oligonukleotidok, DAP (diaminopimelic acid), MDP (muramyl dipeptid) fontos komponensei az adjuvánsoknak. A sejt felszíni és endoszomális mintázatfelismerő receptorok célbavételével képesek a TH1 és/vagy TH2 immunválaszt elősegíteni. A citoszólban található NOD-like receptorok (NLR) és a RIG-like helikázok (RLHs) az intracelluláris baktérium- és víruseredetű jeleket képesek érzékelni. Bár az e receptorokon keresztül ható szintetikus agonisták fejlesztésével kapcsolatosan kevesebb eredmény áll rendelkezésünkre, bizonyos agonistákat pl. MDP már sikerrel alkalmaztak állatorvosi célokra. A C-típusú lektin receptorok (CLR) és a scavenger receptorok fokozzák az antigénkötést és prezentálást, így hozzájárulhatnak a tolerancia kialakulását elkerülő stimulációs hatásokhoz. Végül a TREM receptorok (triggering receptors expressed on myeloid cells) szintén szerepet játszanak a gyulladás kezdeti szakaszában, azonban ligandjaik egyelőre ismeretlenek.

Hagyományosan leggyakrabban a komplett Freund adjuvánst (CFA, Complete Freund Adjuvant) alkalmazzuk adjuvánsként, víz az olajban emulzió formájában alkalmazzuk. A CFA elölt, kiszárított mycobactériumot tartalmaz, általában *Mycobacterium tuberculosis*, ezzel szemben az úgynevezett Inkomplett Freund adjuváns (Incomplete Freund adjuvant, IFA) nem tartalmaz mycobacteriumot. A CFA emberben igen kifejezett immunogenitása miatt nem alkalmazható adjuvánsként.

Szintén gyakran alkalmazott adjuvánsok az alumínium foszfát és az alumínium hidroxid (Alum), melyeket humán vakcinákban is gyakran alkalmazunk. További adjuvánsok a liposzómák és az

ISCOM-ok (immunostimulating komplexek). Az ISCOM-ok 40 nm átmérőjű képletek, melyek spontán keletkeznek, amennyiben koleszterin, foszfolipideket és szaponinokat megfelelő arányban keverünk össze (6.1 ábra).

6.1.3. Az immunizálás hatékonyságát befolyásoló tényezők

Az immunizálás hatékonyságát számos módon fokozhatjuk:

1. Adjuváns alkalmazásával, mely egyrészt depóképzés révén biztosítja a fenntartott antigén felszabadulást. Másrészt a természetes immunitás mintázatfelismerő, vészjelző receptorainak ligandjat tartalmazó adjuvánsok fokozzák az immunizált szervezet antigénbemutató sejtjeinek MHC és kostimulációs molekula expresszióját, és ez által fokozzák az antigénbemutató hatékonyságát.
2. Az immunizálás hatékonysága növelhető azzal, hogy az antigén gazdaszervezetétől filogenetikailag távoli szervezetet immunizálunk, melyben várhatóan kisebb tolerancia figyelhető meg az immunizáló antigénnel szemben.
3. Növelhető az immunizálás hatása, ha az adott antigén szerkezeti és aminosav összetételbeli sajátosságai alapján (pl. várható MHC-kötődés alapján) prediktált „legerősebb” (immunodomináns) epitópokkal végezzük az immunizálást.
4. Optimális antigén dózist választunk.
5. Optimális immunizálási (oltási) módot választunk.

6.1.4. Antigének és epitópok funkcionális csoportosítása

Ismert, hogy a T sejtek rövid lineáris peptid epitópokat ismernek fel. Ezekkel szemben az antigének determinánsai közül a térszerkezeti elemek (konformációs epitópok) képezik az antitestek által felismert B sejt epitópok túlnyomó többségét, ezek az epitópok jellemző módon denaturáció során elvesznek. A B sejt epitópoknak csak kis hányada lineáris peptid epitóp. A fehérjetermészetű antigének denaturációját követően előfordulhatnak olyan antitestek, melyek csak az adott denaturált lineáris peptidszakaszt ismerik fel, a natív molekulával nem reagálnak. Keletkezhetnek továbbá olyan antitestek, melyek mind a natív, mind a denaturált lineáris peptidszakaszt felismerik.

Az antigének enzimhatásra bekövetkezett szerkezeti módosulása új epitópok kialakulását eredményezheti, enzimek hatására (pl. proteáz vagy glikozidáz hatásra) tehát **neoepitóp** struktúrák jöhetnek létre.

6.1.5. Az oltás módja

Az intravénás oltás egyenesen a lépbe, másodlagosan a nyirokcsomókba juttatja az antigént. Olajos emulziók esetében nagy az embolizáció veszélye, és nem képződik antigéndepó. Fokozott az esély tolerancia vagy anafilaxis kialakulására. Legfeljebb liposzómák és Alum esetében alkalmazható.

Gyakrabban alkalmazható emlékeztető (*booster*) oltásra adjuváns nélkül. Ekkor a memória sejteket aktiváljuk, melyek esetében nincs vagy kicsi az igény a kostimulációra.

Intradermális oltás: gyakran alkalmazzuk. Lassan szívódik fel az antigén a véráramba, azonban gyorsan elviszik a Langerhans sejtek a regionális nyirokcsomókba. Hátránya, hogy az oltás helye kifehélyesedhet.

Szubkután oltás: könnyű kivitelezhetősége miatt a talán leggyakrabban választott immunizálási út, mely révén nagy mennyiségű oltóanyagot juttathatunk be egyszerre. Az antigén lassan (elsősorban a nyirokutak révén) szívódik fel, a felszívódás természetesen függ az oltás helyének vérellátásától. Ez a választandó immunizálási mód, ha nagy az anafilaxis veszélye. Elvándorolhat az oltóanyag a bőr alatti térségben.

Intramuszkuláris oltás: gyors antigén felszívódáshoz vezet mind a véráramba, mind a nyirokutakba. Azonban a felszívódás függ az antigén méretétől. Megfelelő út kis molekulatömegű, potenciálisan irritáló hatású molekulák oltására, míg nagy molekulák valószínű módon elsősorban a *fasciák* mentén található nyirokutak révén szállítódnak el. Nagy mennyiség oltható be így, de hátrány az elhúzódó felszívódás a *fasciák* mentén, melynek gyulladás és esetlegesen idegek érintettsége lehet a következménye. Fő hátrány, hogy az oltás helye nem monitorozható.

Intraperitoneális oltás: rágcsálók oltásának gyakori útja. A nyirokutak révén gyorsan a nyirokcsomókba jut az antigén. Nagy mennyiségű, sokféle adjuváns oltható így. De *booster* oltásnál nagy az anafilaxis veszélye a vérpályába történő gyors felszívódás miatt.

Irodalom:

Mayer L, Shao L. Therapeutic potential of oral tolerance. *Nature Reviews Immunology* 4, 407-419, 2004.

Guy B. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nature Reviews Microbiology* 5, 505-517, 2007

7. VAKCINÁCIÓ

(HOLUB MARIANNA CSILLA)

A vakcináció lehet **terápiás** és **prevenciós** beavatkozás.

A **terápiában**, az oltóanyag a fertőzést, megbetegedést követően adandó:

→ **a fertőzést követően**

- **passzív immunizálás**

Az ellenanyagot, ami hiperimmunizált állatból vagy az adott antigénre immunizálódott, - pl. az adott fertőzésen átesett emberből származó kész antigénspecifikus IgG, azokban az esetekben alkalmazzuk, amikor nincs idő megvárni, hogy kialakuljon a saját adaptív immunválasz.

Előnye:

- gyors védettséget biztosít

Hátránya:

- a védettség átmeneti, mivel nincs memória válasz (az IgG fél életideje 7-23 nap),
- az ellenanyag eliminációja, neutralizációja rövid idő alatt bekövetkezhet,
- a nem saját ellenanyag hiperszenzitivitási reakciót, fajszerifikus immunválaszt válthat ki.

Indikáció:

- pl. kígyómarás esetén,
- pl. bizonyos esetekben járványos májgyulladásos beteg (Hepatitis A fertőzés) környezetében élőknel (pl. immunuszuprimált személyek, csecsemők),
 - pl. bizonyos esetekben tetanusz ellen (pl. nem kórházban született újszülöttek).

→ **megbetegedést követően**

- **dendritikus sejt vakcináció:** krónikus megbetegedéseknél pl. tumorvakcinák.
- idiotípus vakcináció: kizárólag B-sejtes tumorok esetében alkalmazható terápia
- **adaptív sejt-transzfer:** hisztokompatibilis donortól származó immunkompetens sejtek (csontvelői vagy tímuszból származó limfociták) bevitele,
pl. bizonyos tumoroknál; gyermekkori kongenitális sejtes immundeficiencia esetén.

A **prevenció** során, a **fertőzést megelőzően** módosítjuk az immunrendszer működését:

→ **aktív vakcinálás**

Cél:

- a specifikus antigén-felismerő készlet arányának növelése
- specifikus immunológiai memória létrehozása

A hatékony oltóanyag tulajdonságait a **7.1 táblázat** foglalja össze.

A HATÉKONY OLTÓANYAG TULAJDONSÁGAI

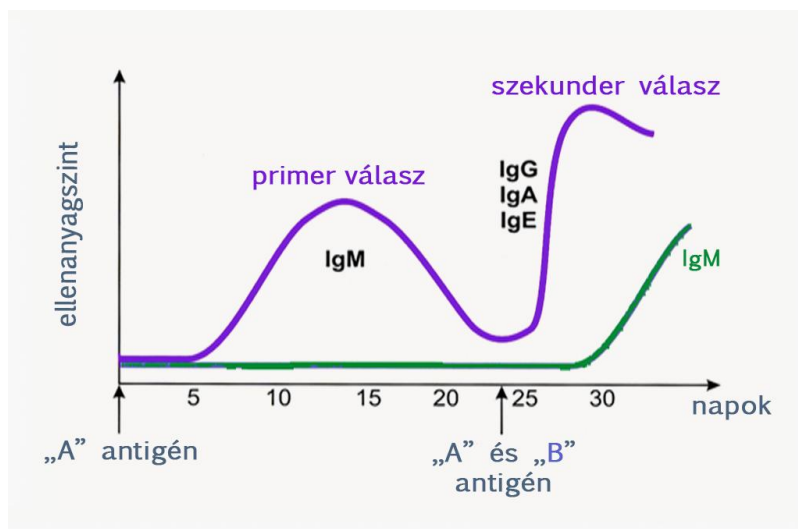
Biztonságos	Nem okozhat betegséget v. halált.
Protektív	Élő kórokozó által előidézett betegséggel szemben véd.
Hosszú távú védelem	Évekig tartó védettséget ad.
Serkenti a neutralizáló antitesteket	Bizonyos kórokozók (pl. poliovírus) olyan sejteket fertőz (pl. neuronok), amelyek nem pótolhatók. Neutralizáló antitest megelőzi ezeknek a sejteknek a megfertőződését.
Serkenti a protektív T-sejteket	Bizonyos kórokozók (pl. intracellulárisok) sejt-mediálta immunválasszal hatékonyabban eliminálódnak.
Gyakorlati szempontok	Biológiai stabilitás, könnyű bevitel, kevés mellékhatás, olcsó előállítás.

7.1. táblázat: A hatékony oltóanyag tulajdonságai.

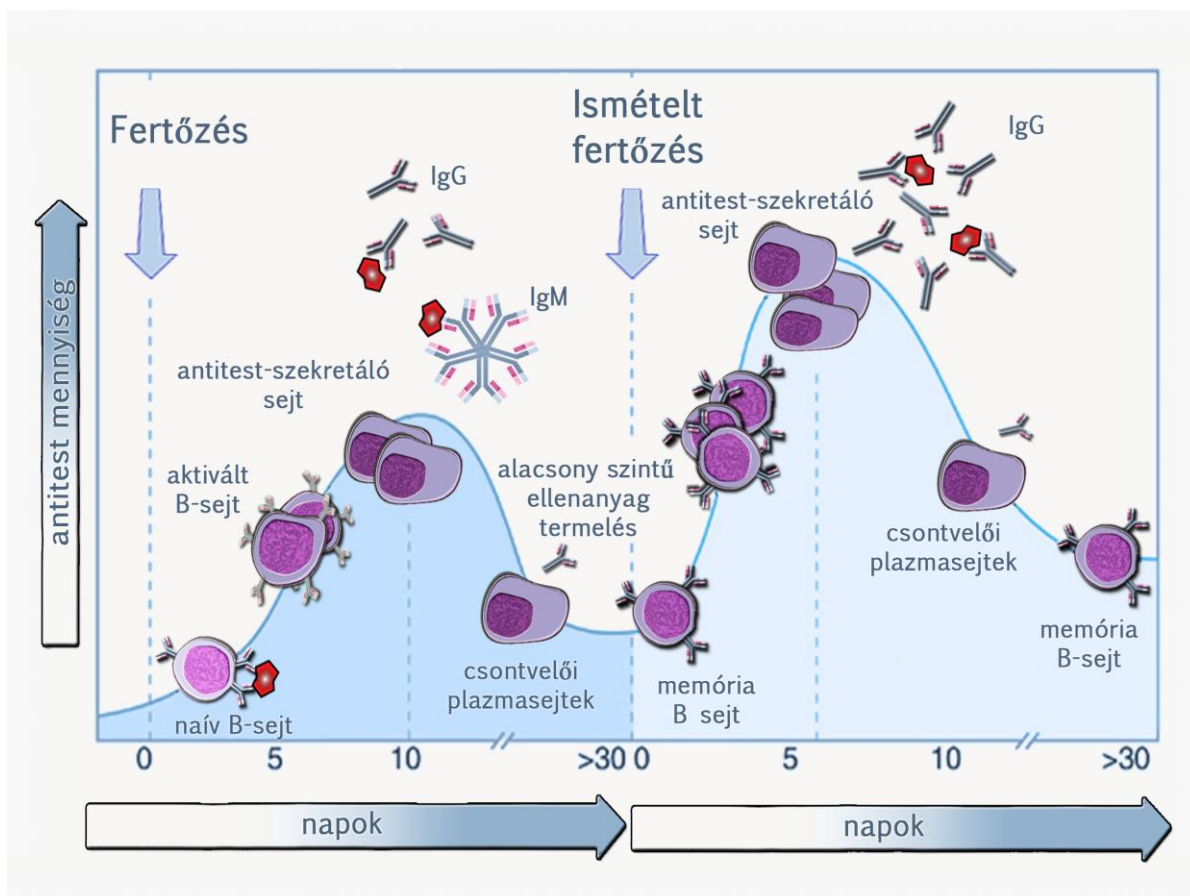
7.1. Aktív vakcinálás

7.1.1. Az aktív vakcináció jelentős részében elsődleges antitest választ vált ki az oltóanyag

Az elsődleges immunválasz kialakulásához, az antitesttermelés megindulásához, az immunizálást követően legalább 5-10 nap szükséges. Az immunválasz során adott mennyiségű, jellemzően az IgM osztályba tartozó antitestek termelődnek. Affinitásuk átlaga nem nagy, vannak köztük korán termelődő, az affinitásérésen még át nem esett plazmasejtek által termelt antitestek, az idő előrehaladtával aztán kialakulnak az antigénhez nagyobb affinitással kapcsolódó, az affinitásérésen átesett plazmasejtek által termelt antitestek is. Az immunizálás során aktivált B-sejtekből differenciálódó memória B-sejtek a biztosíték arra, hogy ha a valós fertőző mikroorganizmus kerül be a szervezetbe, arra már a másodlagos immunválasz alakul ki. Ennek során jóval hamarabb – 1-3 nap alatt – jönnek létre a legjellemzőbben IgG típusú antitestek. Ezek mennyisége és affinitása is jóval nagyobb, mint az elsődleges immunválasz során képződötték, mivel az elsődleges immunválasz során zajló affinitásérés után alakultak ki azok a memóriasejtek, amelyek most aktiválódtak. (7.1. és 7.2. ábra).



7.1 ábra: Az elsődleges és másodlagos immunválasz során termelődő immunglobulinok, a preventív vakcináció célja



7.2. ábra: Ugyanarra az antigénre kialakuló elsődleges és másodlagos B-sejtes immunválasz lefutása

	Elsődleges	Másodlagos
Immunizálás után	5-10 nap	1-3 nap
A válasz amplitudója	kisebb	nagyobb
Antitest izotípus	IgM >> IgG	Több IgG (bizonyos esetekben IgA, IgE)
Antitest affinitás	Kisebb átlag affinitás	Nagyobb átlag affinitás (affinitás érés)
Antitest variabilitás	Nagyobb variabilitás	Kisebb variabilitás

7.2. táblázat: Elsődleges és másodlagos antitest válasz összehasonlítása.

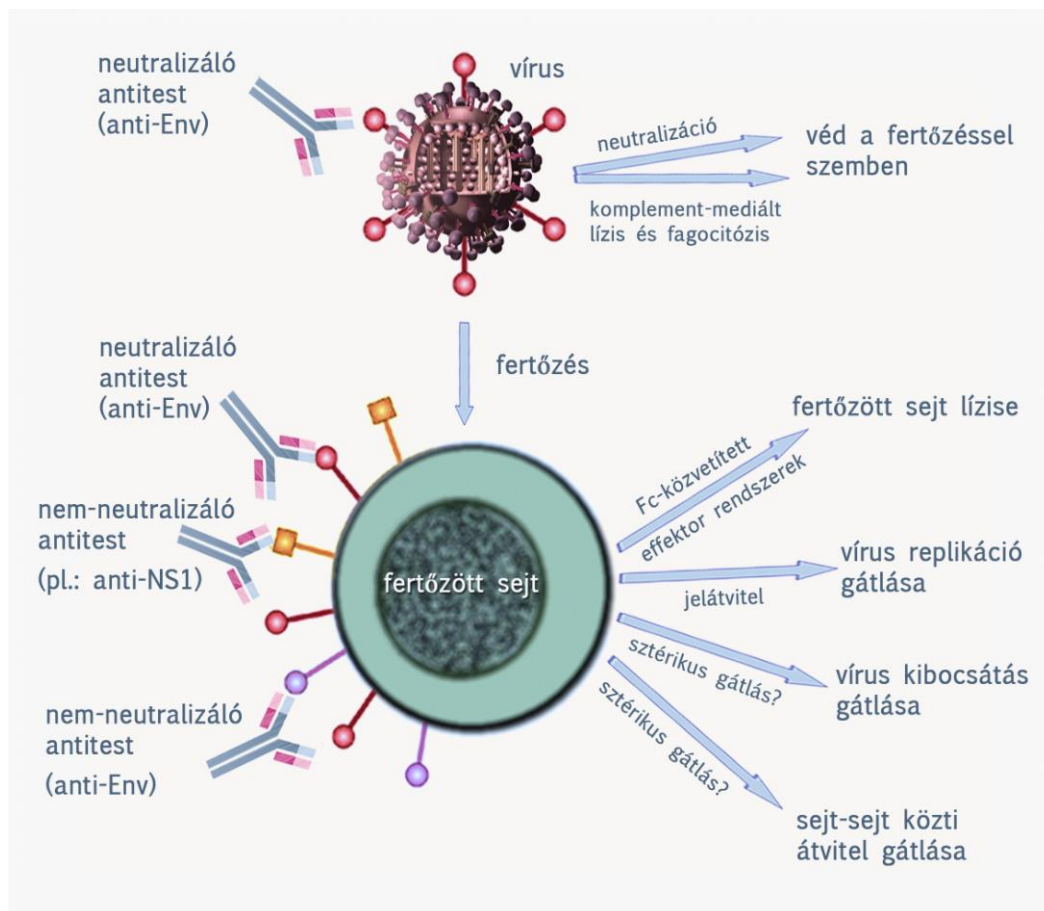
Az aktív vakcinációkor használt molekulák ugyanúgy antigének a szervezet számára, mint a valódi fertőző ágensek. A vakcinációkor használt molekulák epitópjai közül az u.n. **protektív epitóp** azonosítása/felhasználása a cél, mivel ez az a nagyon egyedi csak erre a molekulára specifikus molekuláris felszín, amihez az antitest kapcsolódik.

A vakcinációkor használt antigének lehetnek T-dependens (TD) vagy T-independens (TI) antigének. A T-dependens antigének miatt szükség van nemcsak az ellenanyagokat gyártó B-, hanem a specifikus effektor Th-sejt repertoír létrehozására is.

Mind a két esetben **specifikus memória** jön létre, ami az aktív vakcináció alapvető célja.

Azt az antitestet, amely a patogénhez való kapcsolódása révén meggátolja a patogén elterjedését a szervezetben, **neutralizáló antitestnek** hívjuk. A neutralizáló antitestek a kórokozók hatásait semlegesítik, pl. egy vírus gazdasejten való megtapadását előzik meg. A neutralizáló antitestek között is vannak olyanok, – ill. olyan **nem-neutralizáló antitestek** is vannak, – amelyek a vírushoz kötött sejthez tapadva azok

- eltávolítását teszik hatékonyabbá (pl. az FcR mediálta fagocitózis fokozásával.)
- meggátolják a vírusnak a gazdasejtben zajló replikációját (pl. a jelátviteli folyamatok gátlásával)
- meggátolják a vírusrészecskék gazdasejtből való kiszabadulását, illetve sejtről-sejtre való terjedését (pl. az expresszálandó vírusfehérjék sztérikus összekapcsolásával) (7.3. ábra).



7.3. ábra: Az antitestek antivirális hatásai

Az antigén stimulusra kialakuló elsődleges immunválasz során képződő specifikus antitestek megjelennek a szérumban, ezt nevezzük **szeropozitivitásnak**. A vakcináció hatásosságát is jelöli, ha a szérumban megjelenik a specifikus antitest, azaz az immunizált személy szeropozitív az oltóanyaggal bevitt antigénre. Az oltás előtt mért és az oltás után mért ellenanyagszint változás a **szerokonverzió**.

A hatékony oltóanyag azonban nem csupán kiváltja, hanem olyan mennyiségben váltja ki az antitesttermelést, hogy az hatékony védelmet biztosítson a megbetegedés ellen. Ezt nevezzük **szeroprotekciónak**. Az oltás után mért antitestek hatékony védelmet adó szintje oltóanyagoként

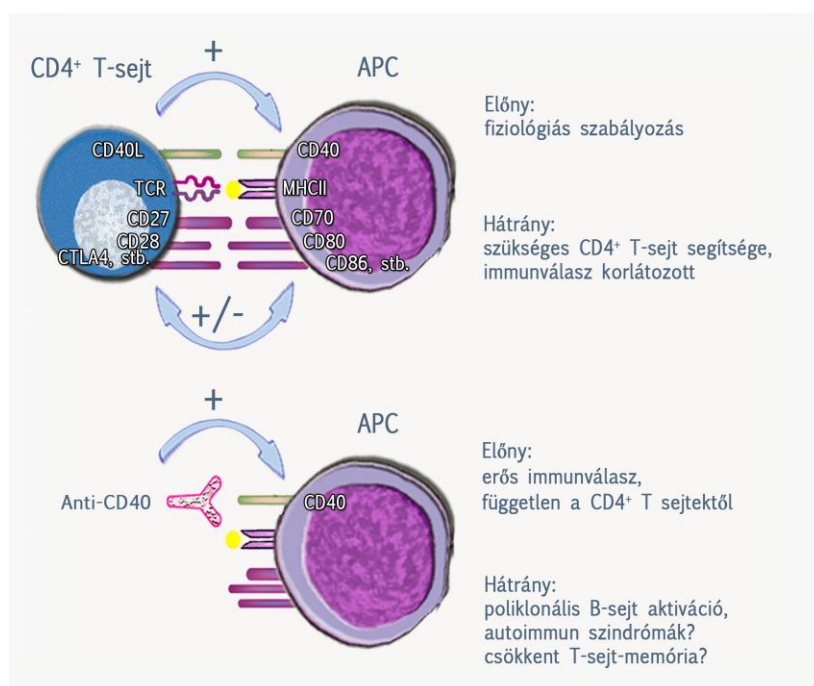
(antigénenként) különbözik: PI. Hepatitis A esetében 20 mIU/ml; Hepatitis B esetében 10 mIU/ml.
(mIU/ml = milli-international units per milliliter)

7.1.1.1. A T-sejtes memória kialakulása előfeltétele a hatékony T-dependens B-sejt válasznak.

Mesterségesen kiváltható T-independens B-sejt válasz:

A T-sejt – B-sejt kapcsolatban esszenciális szerepet tölt be a **CD40-CD40L** kölcsönhatás.

Az egyik ígéretes vakcina-fejlesztési stratégia **mesterséges CD40 ellenes antitest** használatával szimulálja a T-sejtek felől érkező kostimulációt. Így a B-sejt plazmasejtté való differenciálódása időben nem függ a T-sejtek aktiválódásától (T-independens), így sokkal hamarabb alakul ki a B-sejt válasz. Kontraindikációja az eljárásnak, hogy poliklonális B-sejt aktivációhoz, extrém esetben a T-sejtes memória teljes eltűnéséhez vezethet. (7.4. ábra)



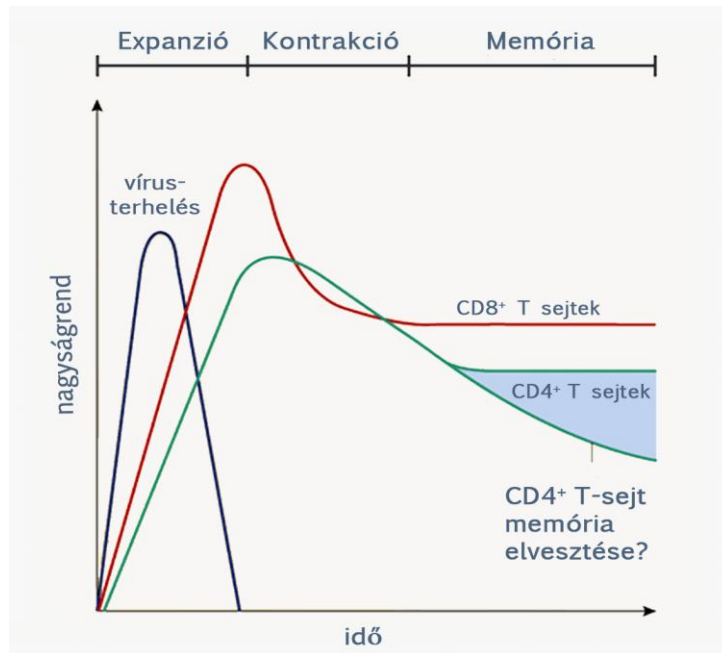
7.4. ábra: A CD40 szerepe a TD B-sejt kostimulációban, és a mesterséges CD40 elleni antitest hatás előnyei és hátrányai

7.1.2. Az antitest választ kiváltó vakcináció mellett bizonyos esetekben a sejt-mediálta immunválasz kialakítása a cél

A T-sejtes válasz három fázisa:

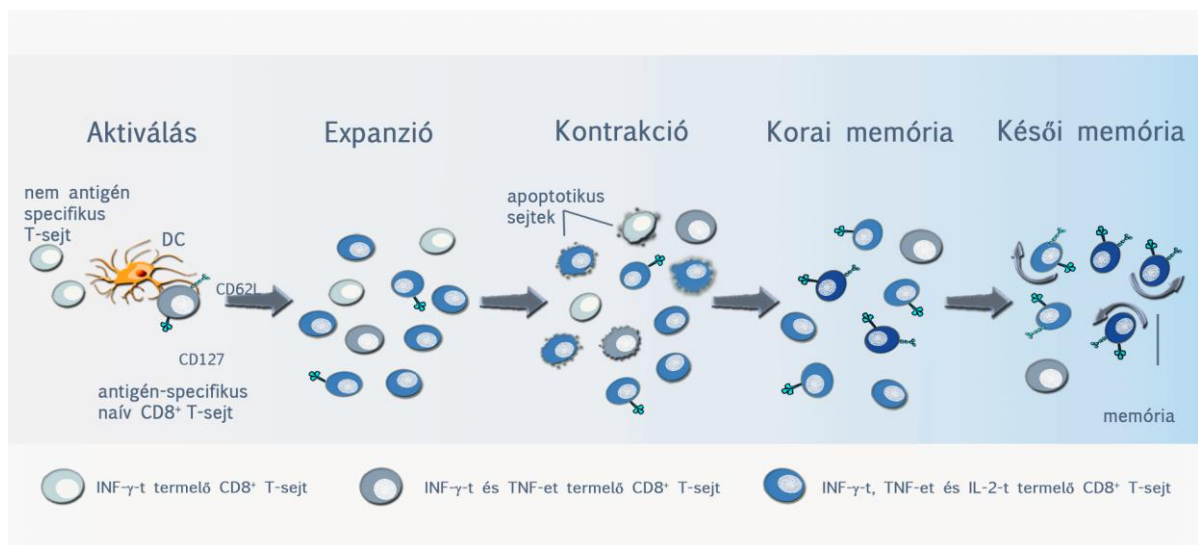
- klonális expanzió az antigén jelenlétében,
- az antigén eltávolítása utáni kontrakció (apoptózissal),
- fennmaradó memória.

A CD8⁺ sejtek a CD4⁺ sejtektől némiképp eltérően viselkednek ebben a három fázisban. Egyrészt a CD4⁺ T-sejt válasz magnitúdója jellemzően alacsonyabb, mint a CD8⁺ válaszé, másrészt a kontrakciós fázis is kevésbé kifejezett, mint a CD8⁺ sejtek esetében. Feltételezhető, hogy a CD4⁺ memória T-sejtek száma az idő előrehaladtával lassan csökken. (7.5. ábra).



7.5. ábra: CD8+ és CD4+ T-sejtes antivirális válasz fázisai

CD8+ sejtek esetében a három, időben egymást követő fázis a következőképpen alakul. (7.6. ábra)



7.6. ábra: CD8+ T- sejt válasz szakaszai

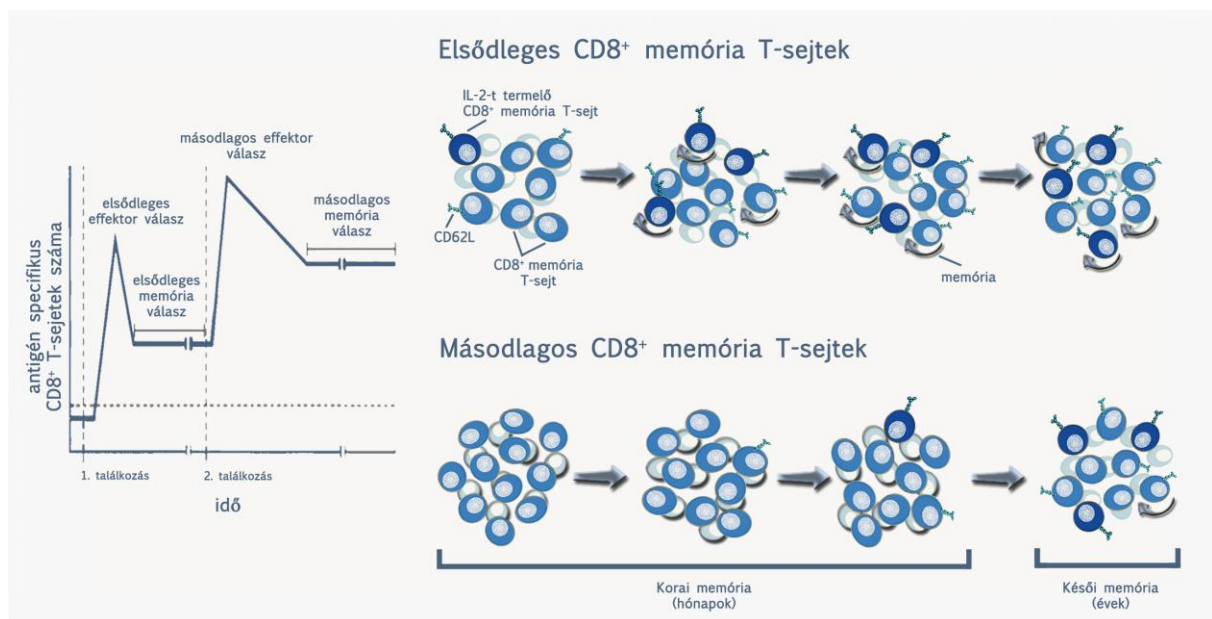
1. A vakcinációt (vagy fertőzést) követően a dendritikus sejtek közreműködésével lezajlik az aktiváció. Ez akár 2 órával az antigénstimulus után bekövetkezik. (CD4+ T sejtek esetében hosszabb idő múlva – min. 6 óra -, és nagyobb antigén-koncentrációnak kell jelen lennie. A CD4+ sejtek a kostimulációra is érzékenyebbek.)
2. Az **expanzió** során kialakul az elsődleges immunválasz. A sejtek az aktivációt követő 24 óra elteltével 6-8 óránként osztódnak (ez a CD4+ sejtek esetében lassabb ütemben zajlik.) Funkcionálisan különböző elsődleges Tc effektorsejtek alakulnak ki: legtöbbször IFN-gamma termelő sejt, vagy TNF-termelő citolitikus sejt.
3. A **kontrakció** során az elsődleges CD8+ T-sejtek 90-95 %-a apoptózissal elpusztul.

4. Az apoptózist elkerülő sejtek képezik a korai **elsődleges CD8+ memóriasejt** repertoirt. A memóriasejtek száma ezáltal függ az effektorsejtek számától. Minnél több effektorsejt alakult ki, annál több (5-10%-uk) memóriasejt jön létre. Sejt felszínükön a naív CD8+ sejtekre jellemző molekulák expresszálnak, és IFN-gamma mellett (ugyanazon sejtek) TNF-alfát is termelnek.
5. Az IFN-gamma és TNF-alfa mellett IL-2-t is termelő memória T-sejtek önmegújulásra képesek, a **hosszú távú CD8+ memória** sejtek nagyobb részét ezek teszik ki. Önmegújító képességük adja a magyarázatát annak, hogy miért az antigén eltávolítása utáni 2-3 napban találhatók meg legnagyobb számban egy adott patogénre specifikus CD8+ memóriasejtek.

A T sejtek száma az antitestszinthez hasonlóan változik az elsődleges és a másodlagos immunválasz során. Az elsődleges immunválaszban szereplő effektor T-sejtek száma kevesebb, mint a másodlagos immunválaszban kialakulóké. A memória T-sejtek száma is hasonlóképpen a B-memória sejtekéhez az elsődleges immunválasz után kevesebb, mint a másodlagos immunválasz után.

Az ismételt – emlékeztető vakcinációkor (a másodlagos immunválasz során) a T-sejtek kontrakciós fázisa elhúzódik, a másodlagos memóriasejtek nagyobb számban alakulnak ki, mint az elsődleges immunválaszkor, de csökkent önmegújuló képességgel (IL-2 termelő) rendelkeznek.

A másodlagos immunválaszt követően évek alatt kialakuló hosszú távú memóriasejtek között jóval nagyobb arányban vannak önmegújuló képességű CD8+ késői memória T-sejtek (7.7. ábra).



7.7. ábra: Elsődleges – másodlagos CD8+ T-sejt memória kinetikája

7.1.2.1. A T-memóriasejtek típusai

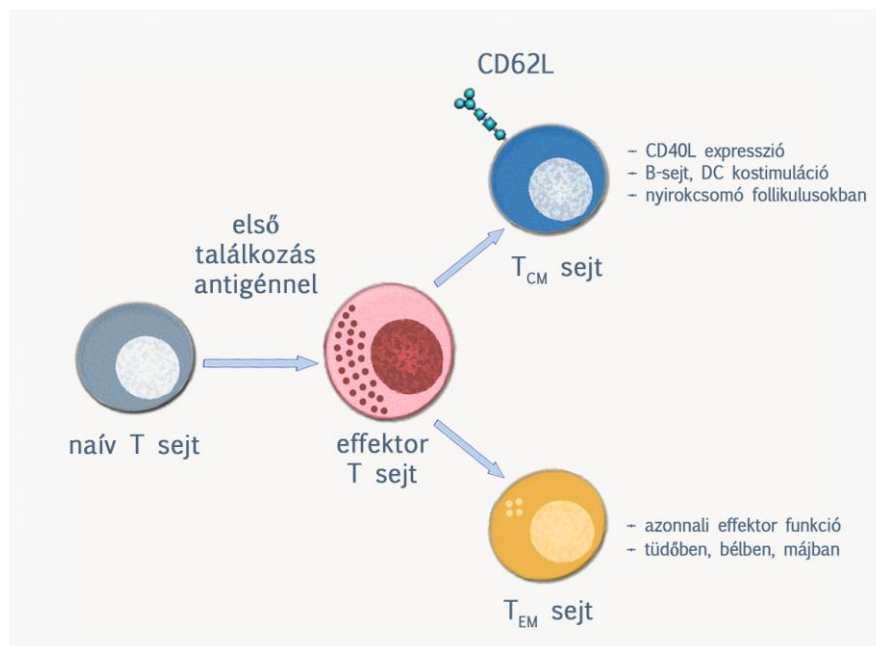
Az elsődleges immunválasz során kialakuló effektor T-sejtekből kétféle memóriasejt differenciálódik, amelyeket funkciójuk illetve a felszínükön expresszálnak homing receptoraik alapján különböztetnek meg (7.8. ábra)

➤ **T_{CM}: centrális memória T-sejt**

- Főleg CD4+ follikuláris Th.
- Sejtfelszínén expresszáldó molekulái (pl. a naív T-sejteken is jelenlévő CCR7, és CD62L/szelektin) lehetővé teszik a HEV-en át történő migrációt a másodlagos nyirokszervekbe – így a T_{CM} a nyirokcsomóban, mandulákban, lépben, (és vérben keringve) található meg.
- A naív T-sejteknél szenzitívebb az antigénekre.
- A naív T-sejteknél kevésbé kostimuláció dependens.
- A naív T-sejteknél erősebben expresszálja a CD40L-t (ez mint kostimulációs feedback hat a B-sejtekre, dendritikus sejtekre).
- Antigenstimulusra főleg IL-2-t termel, ezzel saját magát megújítja, ill. IFN-gamma vagy IL-4 termelő effektor sejté alakul.

➤ **T_{EM}: effektor memória T-sejt**

- Lehet CD4+ Th1, CD4+ Th2, CD8+ Tc (felszíni kemokinreceptoraik alapján különíthetők el).
- Felszínén olyan kemokinreceptorok, adhéziós molekulák vannak, amelyek elsősorban nem a HEV-en át zajló másodlagos nyirokszervekbe irányuló vándorlást, hanem a gyulladt szövetekbe irányuló vándorlást segítik. Így a TEM a tüdőben, májban, bélrendszerben és ugyancsak a lépben (ill. keringve a vérben) található.
- Antigenstimulusra gyorsan, órákon belül reagál és a megfelelő effektor T-sejtté alakul: IFNgammát, vagy IL-4-et, vagy perforint/granzimot termel.



7.8. ábra: Centrális memória Th (T_{CM}) és effektor memória Th (T_{EM}) kialakulásának feltételezett módja, előfordulása és legfontosabb funkcionális jellemzői

Miután a memória T-sejtek kialakulása legfőképpen az elsődleges stimulustól függ, és mivel az egyszer aktivált sejtek programozva folytatják az expansziós és kontrakciós fázist, illetve a memóriasejtek kialakulása programozva folyik, **az oltási naptárban az egy oltásra vonatkozó megadott intervallumokat** minimumként kell felfogni, amelyek nem csökkenthetők, de meghosszabbításuk általában nem zavarja az immunválasz kialakulását. Ez egyben azt is jelenti, hogy ha az immunizálási program bármely okból hosszabb időre megszakad, az oltást nem kell újra

kezdeni, hanem folytatni kell. A másodlagos memória T-sejtek minden esetben ugyanolyan nagy számban jönnek létre.

Az oltási ellenjavallatok között szerepel a lázas állapot. Akut lázas betegségben oltani tilos, a lázas betegség gyógyulása után az oltás elvégezhető. Ez egyrészt azzal magyarázható, hogy az oltási reakciók közt gyakran szerepel lázas állapot, ami a szervezetet tovább terheli, másrészt az eredendő lázas állapot elfedheti az oltóanyag mellékhatásait.

Ugyanakkor az oltás hatásosságára is befolyással van, mivel **az akut gyulladás szabályozza a CD8+ T-sejtek memóriasejté alakulását.**

Akut fertőzés esetén gyulladásos citokinek kapnak szerepet az aktivációban részt vevő dendritikus sejtek érett antigénbemutató sejtekké történő átalakulásában. Mind vírusos, mind intracelluláris bakteriális fertőzés esetén az expansziós fázisban létrejött effektor CD8+ T-sejtek a kontrakciós fázisban átadják helyüket a memória sejteknek, de bizonyos számban még jelen vannak a szervezetben.

Ha a vakcinációkor egyéb fertőzés miatt gyulladás áll fenn, a folyamatos stimulus miatt nagyobb arányban maradnak fenn effektor T-sejtek. Prolifrációs rátájuk magas, a vakcina antigénre specifikus T-sejtek aránya a populációban kihígul, viszont az effektor CD8+ sejtek citolitikus hatásainak következményei terhelik a szervezetet. A memóriasejtek száma ezzel szemben alacsony, a gyulladásos (nem homeosztatikus) citokin környezetben funkcionálisan károsodnak, pl. nem képesek önmegújításra – apoptózis rátájuk magas.

7.2. Életkorfüggő oltási stratégiák a B-sejt repertoár életkor függő különbözősége miatt

Különböző okok miatt, mind a csecsemő szervezete, mind az idős (65 év feletti) szervezet gyenge immunválaszt alakít ki az új, idegen antigénekre, tehát a vakcinákra is. Ezért mindkét korcsoportban olyan vakcinákat kell fejleszteni, ami növeli a neutralizáló antitestmennyiséget.

Csecsemőkorban a csontvelő nagy számban hoz létre eltérő specificitású naiv B-sejteket. Az életkor előrehaladtával a B-sejt képződés sebessége csökken, a csontvelőben zsírlerakódások jönnek létre, kevesebb teret hagyva a B-sejt képződésnek. A tér funkcionálisan is csökken, a nagyobb számban előforduló memóriasejtek, és a monoklonális IgG-t termelő plazmasejtek miatt. Ezért az életkor előrehaladtával az új antigénekre bekövetkező B-sejt válaszképesség is csökken.

Mivel az IgG féléletideje 21-30 nap, a csecsemők anyai eredetű védettsége (a placentán átjutó anyai IgG) a születés után gyorsan csökken, saját B-sejt repertoárunk fejletlensége miatt gyengébb immunválaszt adnak a fertőzésekre. Jellemzően csecsemőkori fertőzés a Hib, a rotavirus, a Salmonella, ami ha későbbi életkorban éri az embert, nem okoz (csak extrém esetekben) halált. Mivel csecsemőkorban szoptatáskor az anyatejjel az IgG mellett átjutó IgA osztályú anyai antitestek is védenek a fertőző antigének ellen, az anyatejes táplálás biztosítja a fertőzés elleni védelmet, mintegy passzívan immunizálja a csecsemő szervezetét. Evolúciósan ez lehet a magyarázata annak, miért nem ugyanolyan hatékony a csecsemő immunválasza, mint a felnőtt szervezeté.

Időskorban az új antigének mellett olyan fertőzések is problémát okoznak, amiken már átesett a szervezet, időskorban a tünetek mégis sokkal súlyosabbak, számos olyan fertőzés okoz halált, amely a fiatalabb felnőtt szervezet számára nem veszélyes, pl. influenza.

7.2.1. Miért okoz a vakcináció problémákat csecsemőkorban?

Egyrészt a csecsemőkori másodlagos nyirokszervekben nagyon kevés marginális zóna B-sejt (MZB) van, ami poliszacharid tartalmú TI – antigének (pl. Hib vakcina) jelenlétében plazmasejtté alakulhatna. A kostimulációs molekulák nem, vagy túl alacsony számban expresszálódnak a B-sejteken, a dendritikus sejt-T-sejt- B-sejt kölcsönhatás kisebb eséllyel lesz eredményes a TD- protein antigének (pl. kanyaró-morbilli vakcina) általi stimulust követően.

A folliculáris dendritikus sejtek éretlensége miatt a germinális centrumokban végbemenő affinitásérés, szomatikus hipermutáció, immunglobulin osztályváltás alacsonyabb határfokú, ennek következtében a B-sejtek jellemzően memóriasejtté differenciálódnak, nem plazmasejtté. Így az elsődleges immunválaszkor termelődő antitestmennyiség is alacsony marad.

A kevés plazmasejt kisebb eséllyel jut el a csontvelőbe, ott kevesebb, a differenciálódásához szükséges faktort termel, hogy hosszú életű plazmasejtté alakuljon.

Másrészt az anyai szervezetből származó antitestek hozzákötődhetnek a vakcina antigénekhez, így semlegesítik, mielőtt a gyermek immunrendszere találkozna velük.

Bár a nagy affinitású BCR-rel rendelkező B-sejtek plazmasejtté alakulása (így az antitesttermelés) limitált, a védettség magalapozását az alacsonyabb affinitású BCR-rel rendelkező B-sejtek memóriasejtté válása biztosíthatná. A csecsemőkorban kialakult memóriasejtek élete azonban – még nem tudni miért- nem élethosszig tartó. (Csecsemőkorukban Hepatitis B fertőzésen átesett személyekben felnőtt korukban nem lehetett kimutatni a védettséget.)

7.2.2. Oltási stratégiák csecsemők és idősek esetén

- A naív B-sejt aktivációt serkentő stratégia: a hatékonyság érdekében növelni kell a vakcina elérhetőségét pl. új adjuvánsok alkalmazásával; az immunmoduláció serkentésével: pl Hib vakcinációnál ma már nem a tiszta poliszacharidot tartalmazó vakcinát alkalmazzák, hanem diftéria fehérjéhez mint carrierhez kovalensen kapcsolt Hib kapszuláris poliszacharid tartalmú, ún. konjugált vakcinát.
- A naív B-sejtek másodlagos nyirokszervekbe vándorlását, a germinális centrumok kialakulásának esélyét serkentő stratégia: nagyobb antigén-dózissal, vagy vakcinadepot-val (pl. a Fluval-P vakcinában az alumínium foszfát gél olyan adjuváns, ami a vakcina fehérjét lassan szabadítja fel), vagy az alapimmunizációkor többszöri oltással lehet biztosítani a folyamatos antigénstimulust. Pl. a csecsemőkori Di-Per-Te vakcináció alapimmunizáláskor (elsődleges stimulus) is három egymást követő oltást jelent (I/a, I/b, I/c) 2, 3 és 4 hónapos korban.

- A B-sejt aktivációját serkentő stratégia: mind a nagyobb antigéndózis, mind a hatékonyabb adjuváns alkalmazása előnyös.
- A plazmasejtté differenciálódás serkentése szintén a hatékonyabb adjuvánsok alkalmazásával érhető el.
- Hogy a memóriasejtek válasza időskorban is előhívható legyen, azt felnőttkori ismétlőoltásokkal, ismételt alacsony dózisú antigénnel kell biztosítani: pl. a tetanuszoltást ajánlatos 10 évente ismételni.

7.3. A vakcinák típusai

Egész (teljes) vakcinák:

- élő, attenuált
- inaktivált
- élő, rekombináns

Alegység vakcina:

- protein
- szintetikus peptid
- DNS (RNS)

Ugyanarra a fertőző mikroorganizmusra különböző gyártók, különböző típusú vakcinákat fejleszthetnek ki. Erre jó példa a 2009-2010-es influenza szezonra kifejlesztett, engedélyezett H1N1 influenzavírus elleni oltóanyag.

Inaktivált (előlt) vírusokat tartalmazó teljes vírusvakcinák	Detergens kezeléssel feldarabolt, inaktivált vírus részecskéket tartalmazó hasított (split) vírusvakcinák.	Tisztított hemagglutinint és neuraminidázt tartalmazó subunit (felszíni antigén) vakcinák, amelyekből a többi vírus komponenst eltávolították (inaktivált).	Élő, legyengített (cold-adapted) vírus vakcinák, melyek gyengített (nem patogén) teljes vírust tartalmaznak
Baxter (EMEA), Omninvest + Al-foszfát adjuváns (Hungary), Cantacuzino (Románia)	8 gyártó Kínában, CSL (Ausztrália, USA) Sanofi Pasteur (US), Green Cross (Korea), GSK+ASO3 adjuváns (EMEA, Kanada)	Novartis (USA) Novartis + M59 adjuváns (EMEA)	Medimmune (USA) Microgen (Oroszország)

7.3. táblázat: Engedélyezett monovalens pandémiás influenza oltóanyagok a 2009-2010-es influenza szezonra WHO táblázata.

7.4. A vakcinafejlesztés irányai

1. Jelenlegi vakcinák tökéletesítése
2. Új vakcinák fejlesztése
3. Empirikus módszerek → biotechnológiai vakcinafejlesztés

Az új generációs vakcinák kifejlesztésénél mindig az immunogenitás növelése, és a toxicitás kiküszöbölése a fő cél.

Az immunogenitás növeléséhez tervezéskor nemcsak a megfelelő epitópot, hanem a megfelelő adjuvánst és a célbajutás módját is megfelelően kell kiválasztani

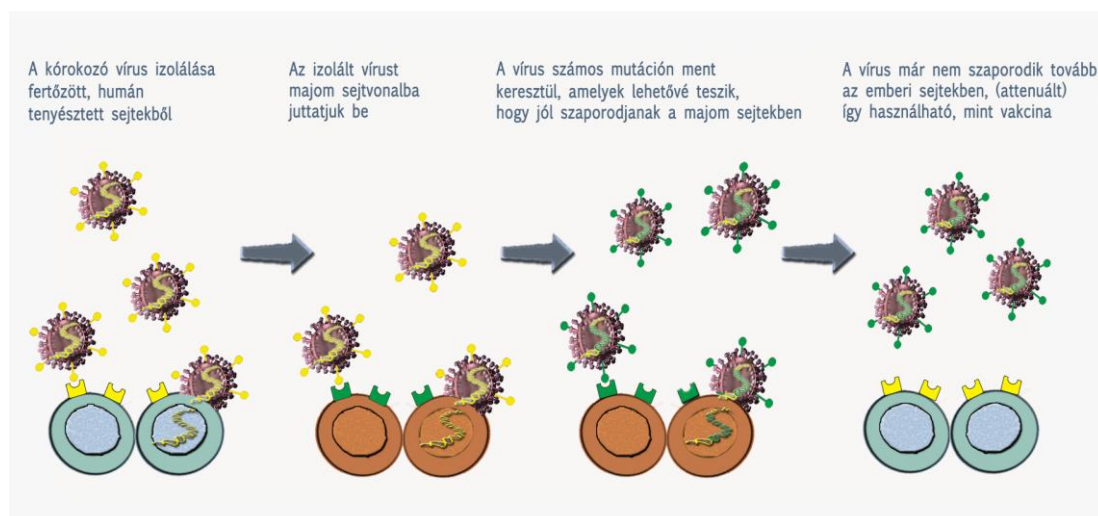
A toxicitás kiküszöböléséhez, vagyis hogy az újonnan fejlesztett oltóanyag biztonságos legyen, biztosítani kell, hogy:

- az alkalmazott adjuváns ne változtassa meg az oltóanyaggal elérni kívánt immunválaszt (TH1/TH2),
- ne idézzon elő autoimmunitást (molekuláris mimikri),
- ne legyen szennyezett (vírus, prion),
- ne épüljön be a genomba (onkogének aktiválása).

7.4.1. Jelenlegi vakcinák tökéletesítése

Élő, attenuált vakcinával élő, csökkentett virulenciájú kórokozóval szemben alakítunk ki védelmet. Ez lehet az eredeti kórokozó, aminek csökkentik a virulenciáját, vagy olyan, hozzá közeli rokonságot mutató mikroorganizmus, ami keresztreakció révén ad védettséget.

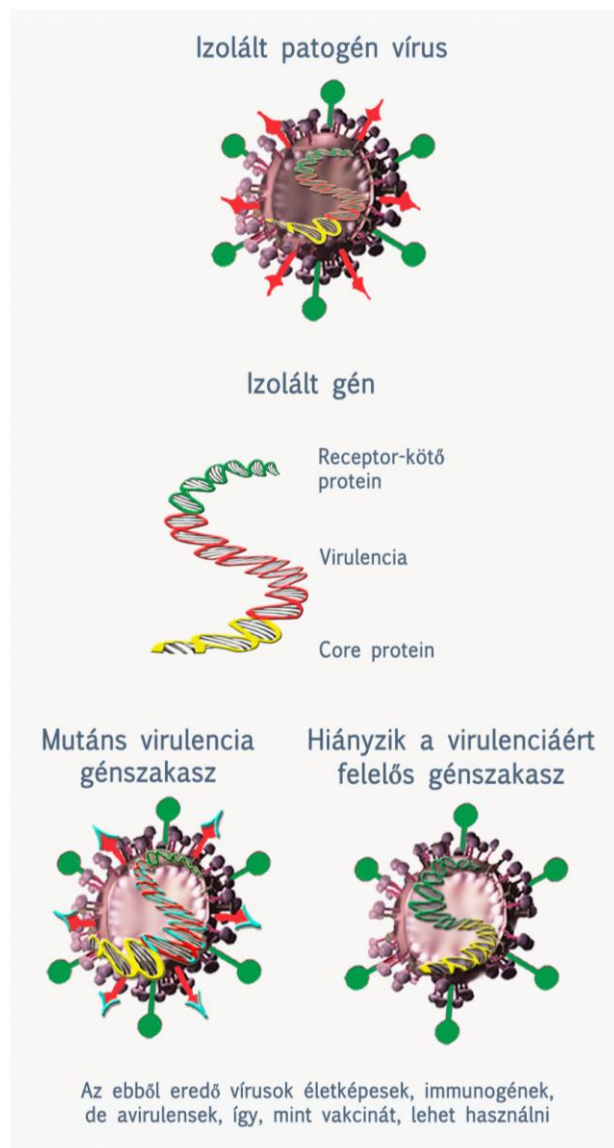
Pl. influenzaoltáshoz a vírusok legyengítését nem-emberi sejtekben való tenyésztés során érik el, hanem olyanban, ami eredetileg nem gazdaszervezete a vírusnak (pl. majom eredetű sejtek). A vírus mutációk sorával adaptálódik a másik gazdaszervezetben való szaporodáshoz, így elérhető olyan élő vírusváltozat, ami emberi sejtekben nem szaporodik. Ez lesz az oltóanyagban használt élő, attenuált kórokozó. Ez a vírus is fertőzi a gazdaszervezetet, de nem tud elszaporodni benne. Azzal azonban, hogy bekerült a szervezetbe az antigén, az immunrendszert mozgósítja (7.9. ábra)



7.9. ábra: Vírusok legyengítése nem emberi sejtekben való tenyésztéssel

Az attenuációt mesterséges mutagenezissel, géndelációval is el lehet érni. Mivel az influenzatörzsek évről évre mások, tervezett mutagenezissel – a várható leggyakoribb antigénepitóp-változat létrehozását célozva – változtatják az oltóanyagban található vírust (7.10. ábra). (Természetesen folyamatosan ellenőrizni kell, hogy egy újabb mutációval, rekombinációval nem nyeri-e vissza a virulenciáját.)

Jó példa az attenuált kórokozóval való védőoltásra, és az új vakcina fejlesztésekre való törekvésre a BCG vakcina. A *Bacillus Calmette-Guérin*/tuberkulózis elleni oltóanyag delációkkal módosított *Mycobacterium bovis* törzset tartalmaz, ami a közös epitópok miatt kiváltja az *M. tuberculosis* elleni immunválaszt is. A (pl. magyar) lakosság teljes oltottsága, elvileg teljes védettsége mellett a tuberkulózis egyre terjed. Miután összehasonlító genetikai vizsgálatokat végeztek a különböző BCG vakcinatörzsek és a *M. tuberculosis* törzsek közt, azt az eredményt kapták, hogy valószínűleg a laboratóriumi tenyésztés során kialakult adaptáció miatt olyan változások jöttek létre BCG vakcinatörzsekben, amelyek a gazdaszervezetben való szaporodási képesség csökkenésével jártak. Emiatt az oltáshoz használt attenuált kórokozó nem alakítja ki a megfelelő védelmet.



7.10. ábra: Teljes inaktivált, nem patogén mutánsok kifejlesztésének lehetséges módja

Subunit, alegység vakcina esetén a patogénnek csak egy specifikus komponensét tartalmazza az oltóanyag. Ez olyan molekula, vagy makromolekulás fragmentum, ami a protektív epitópot tartalmazza. Pl. influenza elleni oltóanyagok közt van, ami tisztított hemagglutinin és neuraminidáz tartalmaz (felszíni antigén) a többi vírus komponensét eltávolították.

Az alegység vakcinák hatékonysága növelésére jó példa a csecsemőkorban adott Hib (*Haemophilus influenzae* B okozta csecsemőkori meningitis, epiglottitis elleni oltóanyag) vakcinák új generációja. Az eleinte előállított a *H. influenzae* kapszuláris tisztított poliszacharidját tartalmazó oltóanyag nem bizonyult elég immunogénnek (lásd. Az immunrendszer életkori sajátosságaival foglalkozó bekezdésnél). A jelenlegi anti-Hib vakcinában a poliszacharid kovalensen egy hordozófehérjére van kötve. Ez a **konjugátum vakcina** egyesíti a TD és TI immunválaszt egyaránt kiváltó követelményeket. A *carrier* fehérje PRP-D (poliribozilribitol-diftéria) **toxoid** mozgósítja a specifikus T-sejteket, amelyek

citokintermelésükkel olyan mikrokörnyezetet teremtenek a Hib- poliszacharidot felismerő B-sejtek számára, hogy az immunválasz hatékony lesz. (A PRP-D toxoid egy exotoxin, aminek a toxicitását formaldehiddel megszüntették, az immunogenitása azonban megmaradt.)

7.4.2. Biotechnológiai vakcinafejlesztés

A rekombináns protein vakcinákat úgy hozzák létre, hogy a patogén mikroorganizmus jellemző részletét expresszáltatják legtöbbször élesztőekben. Ilyen a hepatitis B elleni jelenlegi vakcina is, ami az élesztőben termeltetett egyik vírus buroklejéjét tartalmazza.

Újabban a kutatások előtérbe került a növényi sejtekben, génmódosított növényekben történő expresszió, amivel akár a szájon át adható, „ehető vakcinát” lehet előállítani. Pl. a kolera toxin B-t burgonyában expresszáltatták, ami keringő és lokális antitest termelődést váltott ki az ezzel a transzgenikus burgonyával táplált egerekben.

Az új generációs vakcinák fejlesztésénél megcélzott **fokozott immunogenitás alapja a megfelelő epitóp, és a megfelelő adjuváns kiválasztása** is. A kísérleti stádiumban lévő **szintetikus peptid vakcináknál** a megfelelő T és B-sejt epitópok azonosítása/létrehozása képezik a vakcina alapját.

A vakcinák előállítása, a protektív T-sejt epitóp kiválasztása történhet hagyományos, vagy *in silico* módon.

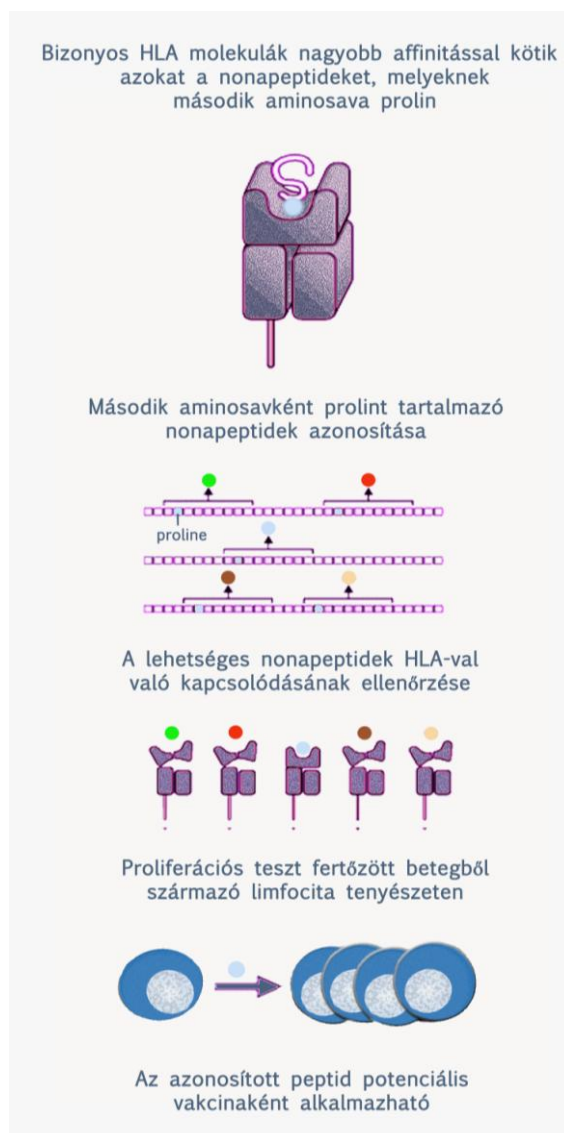
Hagyományos módon:

- laboratóriumban szaporítják, majd egyenként izolálják azokat az antigén komponenseket, melyek a vakcina fejlesztés alapjául szolgálnak,
- szisztematikusan megszintetizálják az átfedő peptid darabokat,
- tesztelik immunogenitásukat.

Reverz – in silico vakcinológia segítségével:

- a patogén ismertté vált genomjából indulnak ki;
- a genomális szekvencia bioinformatikai elemzése után kerül sor a kiválasztott szekvencia megklónozására (azaz élő sejt DNS-ébe integráltatják, majd a sejt osztódásával a szekvenciát is felszaporítják) és expresszáltatására (azaz a bevitt DNS alapján fehérjét termeltetnek),
- amit immunogenitási tesztek követnek.

7.11. ábra: A reverz – in silico immungenetika alkalmazása, mint a malária elleni védőoltás kifejlesztésének egyik lehetséges útja



Az epitóp predikció egy másik fejezet témája, ezért most röviden csak a malária elleni védőoltás kifejlesztésének egyik stratégiájával szemléltetjük (7.11. ábra).

Populációs vizsgálatok alapján bizonyos, hogy a HLA-B53 MHC változat asszociál a malária elleni védettséggel. A HLA-B53 olyan nonapeptidet köt, amelynél a 2. pozícióban prolin van. A malária kórokozójának peptidkönyvtárából számtalan peptidet lehet választani, amelyeknél a második helyen van prolin. Megszintetizálják a lehetséges peptideket, amelyeket aztán tesztelnek, hogy kötnek-e a HLA-B53-hoz. Ha igen, tesztelik, hogy maláriával fertőzött emberek T-sejtjein kiváltja-e a proliferációt. Ha igen, a peptid alkalmas oltóanyagnak. Mivel azonban csak a HLA-B53-hoz köt, ezért azoknál, akiknek nincs ilyen MHC-jük, hatástalan. Ezért nem elég egy, hanem több különböző, a populációban nagy gyakorisággal előforduló MHC-hoz kötő protektív T-sejt epitópot kell azonosítani és szintetizálni, majd ezek elegyéből készíteni oltóanyagot.

Másik megoldás az **epitóp affinitás növelés** (epitóp-enhancement).

MHC affinitás növelés: A populációban nagy gyakorisággal előforduló MHC molekulákról tudható, hogy az általuk kötött peptid melyik / milyen aminosavat kötik leginkább (horgonyzó aminosav). A vakcinációra alkalmas peptidet lehet úgy szintetizálni, hogy a fő horgonyzó aminosavat kicserélik (a leggyakoribb MHC-eknek megfelelően), míg a TCR felé néző aminosav az eredetinek megfelelően immunogén marad. A bemutatás hatékonysága ezzel nő, többféle MHC tudja a TCR-nek bemutatni.

TCR affinitás növelés: pl. Tumorkvakcinák kifejlesztésénél cél a tumor epitópot felismerő T-sejtek számának növelése. A peptid TCR felé eső aminosavainak módosításával elérhető, hogy egy speciális tumorspecifikus T-sejt populáció aktiválódjon. Az epitópok TCR felé néző aminosavainak különböző módosításaival az is elérhető, hogy több, kis és nagy affinitású T-sejt is aktiválódjon.

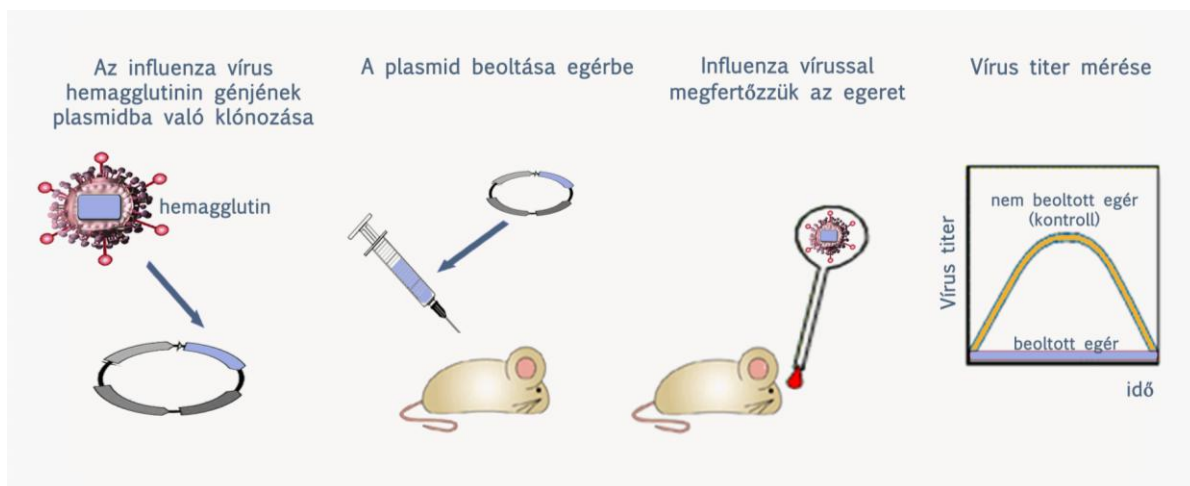
A vírus vakcina fejlesztés egyik kísérleti stratégiája szerint többféle vírustörzsre is jellemző aminosav mintázatot szintetizálnak egy peptiden belül (u.n. peptidkimérát hoznak létre), ezzel elérhető, hogy eltérő vírustörzsöket ugyanaz a speciális T-sejt-populáció ismerjen fel.

A szintetikus peptid(ek) a szervezetbe kerülve önmagában nem eléggé immunogén - csak MHC-n bemutatva vált ki T-sejt választ, ehhez be kell juttatni a sejtekbe. A probléma egyik megoldása pl. az un. ISCOM (immune stimulatory complex) alkalmazása. Ez egy, a liposzómához hasonló képződmény, itt azonban a lipid *carrierként* egy rétegben zárja közre a peptideket, amelyek sejtekbe jutása így membránfúzióval történik. A citoplazmába jutott peptidek aztán az endogén antigén feldolgozásnak megfelelően fejeződnek ki az MHC-n.

A DNS - vakcina génmanipulációval előállított rekombináns DNS.

Legegyszerűbb változata egy olyan bakteriális plazmid létrehozása, ami tartalmazza azt a gént, amelynek terméke kiváltja az immunválaszt. Ez a rekombináns plazmid DNS *in vivo* élő szervezetbe bejuttatva *in situ* expresszálódik a sejtek felszínén és antigénspecifikus választ vált ki. A nem metilált bakteriális DNS adjuvánsként szolgál. Számos előnye van, pl. könnyen előállítható nagy mennyiségű tiszta DNS, ami biztonságos, hiszen csak egy mikrobiális gént tartalmaz. (7.12 ábra)

Az egy gén módszer mellett kísérletek folynak az expressziós könyvtárral történő immunizálásra is, mikor egy genom fragmenseit hordozó plazmidkeverékekkel történik az immunizálás.



7.12. ábra: A protektív immunválasz kiváltása mikrobiális antigént tartalmazó DNS vakcinációt követően

Bár még humán szervezeten nem használják, állatkísérletekben a DNS vakcinát intramuszkulárisan oltják génpuska módszerrel. Ennek lényege, hogy nm-es nagyságú aranyrészecskék felszínére kötik a tisztított DNS-t, amelyet hélium segítségével lönek a bőrön át az izomba. A DNS mind a bőr, mind az izomsejtek sejtmagjába bejut.

7.4.3. Új vakcinák fejlesztése

A vakcináció során az antigén megfelelő célbajuttatása mindig kritikus pont.

Immunizálás dendritikus sejtekkel: A dendritikus sejtek felhasználása vakcinációra az egyik legbiztosabb módja az antigén célbajuttatásának.

A saját szervezetből származó monociták *in vitro* dendritikus sejté váló differenciáltatása után (lásd szövettenyésztés fejezet) az antigénpeptidekkel *ex vivo* feltöltött autológ dendritikus sejteket a szervezetbe oltják. Az antigénpeptiddel feltöltött dendritikus sejtek valós immunválaszt váltanak ki, viszont patogén hiányában nincs gyulladásos citokin környezet az aktiválódó T-sejtek körül. Ennek következtében az effektorok gyorsan eltűnnek, a memóriasejtek kialakulása erőteljesebb. A dendritikus sejtekkel való immunizálást főleg tumorvakcinák esetében fejlesztik, mivel a tumor ellen a hatékony celluláris immunválasz indukálása szükséges.

Idiotípus vakcináció: kizárólag B-sejtes tumorok esetében alkalmazható terápia, amelyben a vakcina alapja a malignus B-sejt BCR-e.

Mivel a B-sejt BCR-e minden klón esetében más idiotípusú, minden betegben más BCR-t hordozó B-sejt a malignitás eredője. Az eljárás így személyreszabott terápiát tesz lehetővé, mivel a beteg nyirokcsomójából eltávolított, az adott személyben malignussá vált specifikus B-sejtek adják a vakcina alapját. Ezekből a sejtekből - a hibridóma létrehozásával nagy vonalakban egyező módon – *ex vivo* szolubilis antitest szekréciót idéznek elő, amelyeket egy nagyon immunogén hordozóval konjugáltatva, visszaoltanak a betegbe. Az immunogén hordozómolekula aktív immunválaszt vált ki, melynek során a saját eredetű antitest antigénfelismerő régiójára, mint epitópra, specifikus B-sejtek is aktiválódnak, és gyakorlatilag autoantitesteket termelnek. Ezek az anti-idiotípus antitestek nagyon

specifikusan csak a malignus B-sejt klónok felszínén található BCR-rel kötődnek és megjelölve ezeket váltják ki az effektor immunválaszt.

Irodalom:

- Janeway CA. Immunobiology: the immune system in health and disease. New York: Garland Science, 2005.
- Burton DR. Antibodies, viruses and vaccines. *Nature Reviews Immunology* 2002 Sep;2(9):706-13.
- Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annual Review of Immunology*. 2004;22:745-63.
- Haanen JB, Schumacher TN. Vaccine leads to memory loss. *Nature Medicine*. 2007 Mar;13(3):248-50.
- Harty JT, Badovinac VP. Shaping and reshaping CD8+ T-cell memory. *Nature Reviews Immunology*. 2008 Feb;8(2):107-19.
- Siegrist CA, Aspinall R. B-cell responses to vaccination at the extremes of age. *Nature Reviews Immunology*. 2009 Mar;9(3):185-94.
- Berzofsky JA, Ahlers JD, Belyakov IM. Strategies for designing and optimizing new generation vaccines. *Nature Reviews Immunology*. 2001 Dec;1(3):209-19.
- Brosch R, Gordon SV, Garnier T, Eiglmeier K, Frigui W, Valenti P, Dos Santos S, Duthoy S, Lacroix C, Garcia-Pelayo C, Inwald JK, Golby P, Garcia JN, Hewinson RG, Behr MA, Quail MA, Churcher C, Barrell BG, Parkhill J, Cole ST. Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007 Mar 27;104(13):5596-601.
- Tacke PJ, de Vries IJ, Torensma R, Figdor CG. Dendritic-cell immunotherapy: from ex vivo loading to in vivo targeting. *Nature Reviews Immunology* 2007 Oct;7(10): 790-802
- <http://www.lymphomation.org>

8. SEJT TENYÉSZTÉS (TÓTH SÁRA)

8.1. A sejtenyésztés definíciója, típusai, formái

A szerv-, szövet- és sejtenyésztés olyan *in vitro* (= üvegben) technikák, amikor mesterséges, azaz laboratóriumi körülmények között tartjuk fenn és/vagy szaporítjuk az állati vagy növényi eredetű mintákat.

A továbbiakban az állati / humán mintákra vonatkozó tudnivalókat összegezzük.

A minta származhat egy műtét során, vagy közvetlenül a halál után eltávolított anyagból, vagy biopsziából.

- A **szervtenyésztés** valójában csak a szervet alkotó sejtek túlélésének biztosítása, legtöbbször a megfelelően kisméretű, embrionális szervek esetén alkalmazzák, itt korlátozott sejt szaporodás és differenciálódás is megfigyelhető.
- A **szövettenyésztés** során egy kisebb, a szervezetből eltávolított, szövetminta fenntartásáról, és sejteinek korlátozott szaporításáról van szó.
- A legáltalánosabban alkalmazott eljárás a **sejtenyésztés**, amikor egy szövetből (egészséges vagy tumoros) izolált sejteket tartanak fenn és szaporítanak.

A sejtenyésztés 3 típusa: a primer tenyészet, a sejt törzs és a sejtvonal.

- A **primer tenyészet** tulajdonképpen minden tenyésztés kezdete, ekkor közvetlenül a szervezetből származó minta sejteit szeparáljuk egymástól és az extracelluláris mátrixtól úgy, hogy csak lehetőleg egyféle sejt típus legyen jelen a tenyészetben. Amennyiben a körülmények megfelelőek, a sejtek nemcsak túlélnek, hanem szaporodnak és a sejt típusnak megfelelő fiziológiás jellemzőket is mutatják. Amennyiben a sejtek szaporodnak és tovább tenyészthetők, két lehetőség áll elő.
- Vagy ún. **sejt törzs** jön létre, amely korlátozott ideig tartható csak fenn (néhány hét, maximum néhány hónap), de a fiziológiás jellemzőket megtartja és a sejtek kromoszóma száma is normális, a fajra jellemző marad.
- Vagy **sejtvonal** jön létre, ami ún. transzformálódott sejtekből áll. Ezek általában *aneuploidok*, azaz kromoszómaszámuk eltér a fajra jellemzőtől, és halhatatlanok, vagyis korlátlan ideig (évekig, évtizedekig) fenntarthatók, s sem a fiziológiás illetve sem a szöveti jellemzők nem mind találhatóak meg. A **transzformáció** bekövetkezhet spontán az *in vitro* tenyésztés során, vagy már a primer tenyészet is eleve transzformálódott (pl. tumor) sejtekből indult. A legismertebb humán sejtvonal talán a HeLa, amelyet Henrietta Lacks cervikális adenocarcinoma sejteiből alapítottak 1951-ben.

Mind a sejt törzsek mind pedig a sejtvonalak sejteit 10 % krioprotektív anyagot (ez általában DMSO vagy glicerin) tartalmazó médiumban lefagyasztva, folyékony N₂-ben, -196 °C-n ún. **sejtbankok**ban

hosszú ideig tárolhatjuk. A nagy nemzetközi sejtbankok (www.atcc.org és www.hpacultures.org.uk) pedig annak a lehetőségét teremti meg, hogy ugyanazon a biológiai objektumon végezzenek el bizonyos kísérleteket, pl. gyógyszereszteléseket, különböző földrajzi helyen és időben.

A sejtenyészetek a kiindulási mintától függően lehetnek:

- vagy **monolayer (egysejtsoros)**
- vagy **szuszpenziós tenyészetek**

A **monolayer tenyészetek** esetében a sejtek szoros sejt-sejt és sejt-mátrix kapcsolatot igényelnek, azaz valamilyen aljzatot és mátrixot kell biztosítanunk e letapadásfüggő sejtek tenyésztéséhez.

A **szuszpenziós tenyészet** elsősorban a hemopoetikus sejtekre jellemző, amelyek sem mátrixot nem igényelnek, sem szoros sejt-sejt kapcsolat nem jellemzi őket. Ritkábban az erősen transzformált sejtek is fenntarthatók szuszpenzióban, mivel az ilyen sejtvonalak sejtjei már elvesztették a normális sejteket jellemző ún. **kontaktgátlást** (sűrűségfüggő szaporodás) is. A **kontaktgátlás** azt jelenti, hogy a normális, letapadásfüggő sejtek szaporodva előbb-utóbb elérik egymást, azaz egy sejt számos másik sejtrel fog érintkezni, ekkor ezen sejtek további szaporodása gátlódik, de egyéb funkcióik nem sérülnek. Ezzel szemben a transzformált sejtekre nem jellemző a kontaktgátlás, vagyis egymást elérve tovább osztódnak, így egymás tetejére növe több sejtsoros tenyészetet hozhatnak létre, sőt a legextrém esetben szuszpenzióba jutva is tovább szaporodnak.

8.2. A sejtenyésztés környezeti feltételei

A sejtek tenyésztéséhez – azaz működésüknek fenntartásához illetve szaporodásuk biztosításához – az élő szervezetben meglévő körülményeket kell a lehető legpontosabban utánozni. Azaz mind a *fizikai* (pl. hőmérséklet, CO₂ koncentráció) mind a *kémiai* (pl. kémhatás, a tápanyagok megfelelő koncentrációja) mind pedig a *biológiai* (pl. extracelluláris mátrix) paramétereknek az élő szervezetre jellemző értékeket kell elérni vagy ahhoz közelíteni (8.1. táblázat).

OLDOTT ANYAGOK	SEJTEK ÉS SEJTKÖLCSÖNHATÁSOK	MÁTRIX KÖLCSÖNHATÁSOK	FIZIKAI PARAMÉTEREK
Tápfolyadék Szérum Hormonok Növekedési faktork Letapadási faktork	Sejtkölcsönhatás: homológ = sejt denzitás, heterológ = együtt-tenyésztés (co-culture) Metabolitok és termékek autokrin és parakrin hatás Anyagcsere ráta	Tenyésztő felület pl. műanyag, üveg, membránok, mikrogyöngyök bevonat (coat) pl. kollagén, zselatin, feeder layer (tápláló sejtréteg) Matrigel, Biomatrix	Hőmérséklet pH (indikátor+puffer) Oxigén/széndioxid konc. Páratartalom Ozmolaritás Statikus vagy dinamikus tenyészet

8.1. táblázat: A sejtenyésztés környezeti feltételei.

Az állati sejtek tenyésztéséhez **folyékony** vagy ritkábban, elsősorban a hemopoetikus sejtek esetében, **fél-folyékony (szemi-szolid)** tenyésztő közeget, ún. **médiumot** használunk. Ezek **szintetikus médiumok**, azaz ismert az összetételük, és tartalmazzák a szükséges sokat,

aminosavakat, vitaminokat, szénhidrátokat, nukleotidokat. Az energiát biztosító szénhidrát leggyakrabban glukóz, ritkábban galaktóz vagy fruktóz. Az átlagos cukortartalom 1,0 g - 4,5 g/l. A magasabb cukortartalom általában a gyorsan proliferáló embrionális vagy tumorsejtekhez vagy a glukózt gyorsan metabolizáló, erős glikolitikus aktivitású sejtekhez szükséges. Ezen kívül valamilyen *puffer* (pl. NaHCO_3 vagy HEPES) és *indikátor* (leggyakrabban fenolvörös) is van bennük. Ez utóbbiak szerepe az anyagcsere nyomán bekövetkező pH változások mértékének tompítása, illetve nyomon követése. Az optimális pH 6,8-7,2 a legtöbb sejtenyészet számára.

Mivel a sejtek normális működéséhez bizonyos fehérjékre (pl. növekedési faktorok stb.) és lipidekre is szükség van ezeket is biztosítani kell, leggyakrabban állati szérum hozzáadásával. A legtöbb állati és emberi sejt számára megfelelő az 5-10 % **fötális borjúsavót (FBS) [fetal calf serumot (FCS)]** tartalmazó tápfolyadék. Azért nem humán savót használunk, mert ennek hozzáférhetősége korlátozott és biztonsági kockázata is nagyobb. Ezen túlmenően a fötális savó ellenanyagtartalma elenyésző, és hőinaktiválással a komplementrendszer aktiválódása is kiküszöbölhető. Mivel a savó pontos összetétele sarzsról sarzusra változhat, lévén egy nem szintetikus adalék, így a benne lévő növekedést serkentő és gátló faktorok aránya is eltérhet, ezért célszerű az egyes sarzsok mintáit a beszerzés előtt a kívánt sejtenyészeteken letesztelni. Bár a szérumot gondosan ellenőrzött, erre a célra tenyésztett nyájak egyedeiből nyerik és a mikrobiális (baktérium - mycoplasma is -, vírus, prion és gomba) kontamináció elkerülésére szigorúan ellenőrzik, a legkényesebb sejt kultúrákhoz olyan területről, pl. Dél-Amerikából származó savó ajánlott, ahol BSE soha nem fordul elő. Éppen ezek miatt a sajátságok / problémák miatt egyre intenzívebben kezdenek szintetikus – tehát ismert összetételű – savópótlókat használni, amelyeknek széleskörű elterjedését éppen igen magas árak hátráltatja. Sok esetben ún. *kondicionált médiumot* is használnak, ami nem más, mint egy sejtenyészetéről levett „használt” médium, amelybe az adott sejtek különféle, kémiaiilag akár még nem definiált, anyagot bocsátanak ki. Ezt akár ugyanakkor a sejt típusnak, akár egy másik sejt fajtának a minél sikeresebb tenyésztéséhez a friss, szintetikus tápfolyadék kiegészítőjeként alkalmazzák.

A sejtenyésztés során a sejtek felhasználják a rendelkezésre álló tápanyagokat, s ezzel egyidejűleg anyagcsere termékeiket is a tenyésztőközegbe bocsátják. Az emiatt „kimerült” tápfolyadékot általában 2-3 naponként el kell távolítani és frissel pótolni, ez a *tápfolyadékcseré*.

Mivel a fenti körülmények alkalmasak a prokarióta baktériumok számára is, ezért a kontamináció elkerülésére különös gondot kell fordítani. Vagyis **szigorúan steril környezet** (steril fülkék, ún. lamináris boxok, biztosított munkatér) és steril oldatok, eszközök szükségesek a sikeres tenyésztéshez.

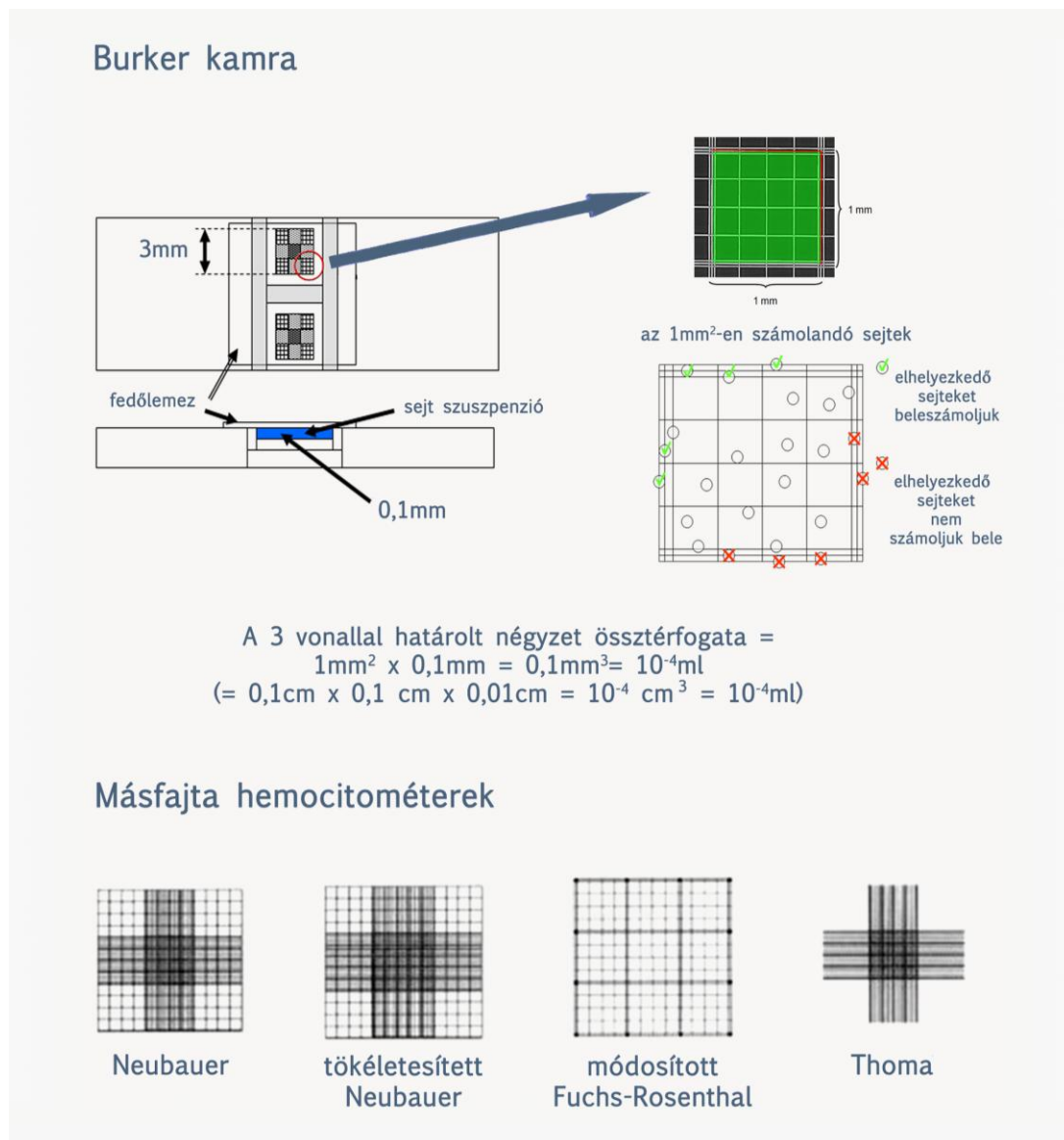
Ami a fizikai paramétereket illeti, a legtöbb sejt típus számára megfelelő a 37°C és az 5% CO_2 -ot tartalmazó 80-90% páratartalmú atmoszféra. Ez ún. CO_2 termosztátok révén biztosíthatjuk. Az O_2 koncentráció nem limitáló tényező, mert a légköri O_2 bőségesen elegendő a legtöbb sejt számára. Ugyanakkor a szervezetben előforduló, tehát a sejtek számára szükséges ~5% CO_2 koncentráció sokszorosa a légkörre jellemző (0,035%) koncentrációnak. Néhány esetben, pl. a molekuláris biológiában használatos bizonyos transzfekciós rendszereknél (kalcium-precipitáció) a szokásos 5%-nál alacsonyabb CO_2 koncentráció a kívánatos.

A sejtek tenyésztéséhez ma már egyszer használatos műanyag edényeket, pl. Petri-csészéket, flaskákat használunk. Ezek űrtartalma, felülete (a monolayer tenyészetek esetében) a kísérleti elrendezéstől függően változó lehet, az egészen kicsi, 200-800 µl-estől a több literes űrtartalmú sejtgyárákig. A kereskedelmileg kapható edények felülete oly módon előkezelt, hogy biztosítsa a legtöbb sejttypus számára kedvező adhezív felületet. Azonban bizonyos sejtek érzékenyek a megfelelő extracelluláris mátrix jelenlétére, ezért különböző mátrix komponensekkel (pl. kollagén, laminin, ornitin stb.) bevont tenyésztőedények is kaphatók. A jól proliferáló monolayerben növekvő sejtek esetében a felület is limitáló lehet, hiszen ez előbb-utóbb egyszerűen elfogy, így szükséges a tenyészetek megosztása, az ún. **passzálás vagy szubkultiválás**. Ez azt jelenti, hogy a sejteket enzimatikusan (pl. tripszinnel vagy tripszin-EDTA-val) el kell távolítani a felszínről. Némely primer sejt kultúra esetében, amely nem embrionális, hanem felnőtt szervezetből származó sejteket tartalmaz, a sejtek által termelt extracelluláris mátrix gazdag lehet kollagénben, ekkor a sejtek szubkultiválására olyan enzimkeveréket használunk, amely kollagenázt és esetleg DNázt is tartalmaz. Ez utóbbi az esetlegesen jelenlevő elpusztult sejtekből kiszabadult DNS lebontásához szükséges. Vannak olyan, általában gyorsan növekvő, pl. tumor eredetű sejttenyészetek is, amelyek passzálásához 0,02 %-os EDTA oldat használata, tehát egy egyszerű Ca^{2+} megkötés is megfelelő. A legérzékenyebb sejtekhez, illetve amikor kis mennyiségben előforduló sejt felszíni molekulák vizsgálata a cél, a fenti célokra választhatunk a kereskedelemben hozzáférhető, különböző nem enzimes rendszereket is. Amikor a sejtek leválnak a felszínről – erről mikroszkópos ellenőrzéssel győződünk meg –, a további emésztést leállítjuk. Ez történhet a meglehetősen drága, specifikus tripszin inhibitor alkalmazásával, vagy költségkímélőbbben az adott sejttypushoz használt fehérjetartalmú, azaz savós médiummal. Az ily módon szuszpenzióba került sejteket lecentrifugálva, majd a felülúszót elöntve megszabadulunk nemcsak a már feleslegessé vált enzimes keveréktől, de a sejttermeléstől is. Az üledékben lévő izolált sejtekhez friss médiumot adva újabb tenyészeteket indíthatunk.

8.3. A sejtszám változása és sejtszámlálás

A különböző kísérleti elrendezésekben fontos, hogy azonos számú sejtet helyezünk a párhuzamos tenyészetekbe, hiszen csak így nyerhetünk statisztikailag is értékelhető, megbízhatóan összehasonlítható eredményeket. Ehhez viszont meg kell számolnunk az adott sejtuszuszpenzióban lévő sejtek (akár eleve szuszpenzióban nőttek, akár a szubkultiválás során vittük szuszpenzióba az eredetileg monolayerben növekvő sejtjeinket) számát. Ez hagyományosan **hemocitóméterrel** történik, bár újabban különböző automatákat is használhatunk erre a célra. A hemocitóméterben megszámlált sejtszám alapján kikalkulálható (8.1. ábra) az 1 ml szuszpenzióban lévő sejtek száma. Mivel a tenyésztés szempontjából az összsejtszámnál fontosabb az élő sejtek száma, ezért elsősorban ezt kell meghatározni. Az élősejtek mennyiségének meghatározására leggyakrabban a tripánkék kizsorításos (exklúziós) módszert használják. 0,04%-os tripánkék oldattal festve a sejteket (1:10 a sejtuszuszpenzió-festék arány), csak a halott sejtek festődnek, mivel az élők sejtmembránján a festék nem jut keresztül. (Ebben az esetben az összsejtszám meghatározásához használt képletben még egy 10x faktor (a festék általi hígítás) is szerepel.)

Tehát az 1 ml-ben lévő sejtek száma = a hemocitóméter hármas vonallal határolt területén észlelt nem-kék sejtek száma $\times 10^4 \times 10$.

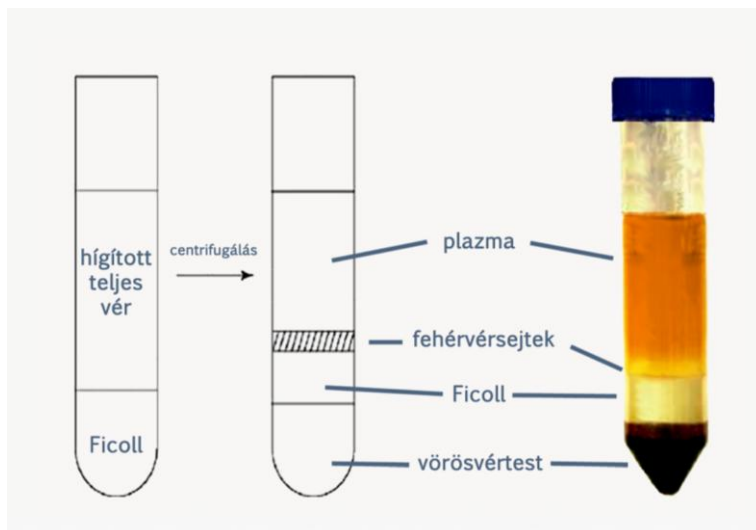


8.1. ábra: Hemocitóméterek

A hemocitóméterrel történő számlálás időigényesebb, több tapasztalatot igényel, és nagyobb teret enged az egyéni megítélésnek, hogy – pl. egy csomósodásra hajlamos sejtípus esetében – mit értékelünk, és egyáltalán el tudjuk-e különíteni a szóló sejteket a kisebb sejtcsoportoktól. Ugyanakkor az automata sejtszámlálók elég szigorú mérettartományban számolnak (pl. vezetőképesség vagy fényszórás alapján) és minden a megadottól eltérő nagyobb sejtet – pl. az osztódás anafázisában lévő elongálódott vagy mutáció miatt aneu- vagy poliploiddá vált sejtet – kiszűrnek, így egy esetleg heterogén sejtpopulációt homogénként kezelnek. Másrészt az automaták esetében nincs mód az adott sejtpopulációt esetleg jellemző morfológiai változások / eltérések megfigyelésére sem. Tehát a sejtszámlálás módszerét mindig az adott labor igényeinek, a személyzet tapasztaltságának, a használt sejtípusoknak (pl. a hemopoetikus sejtekből álló, szuszpenziós tenyészetek számlálása jobban automatizálható) és a kísérletek irányának megfelelően kell megválasztani.

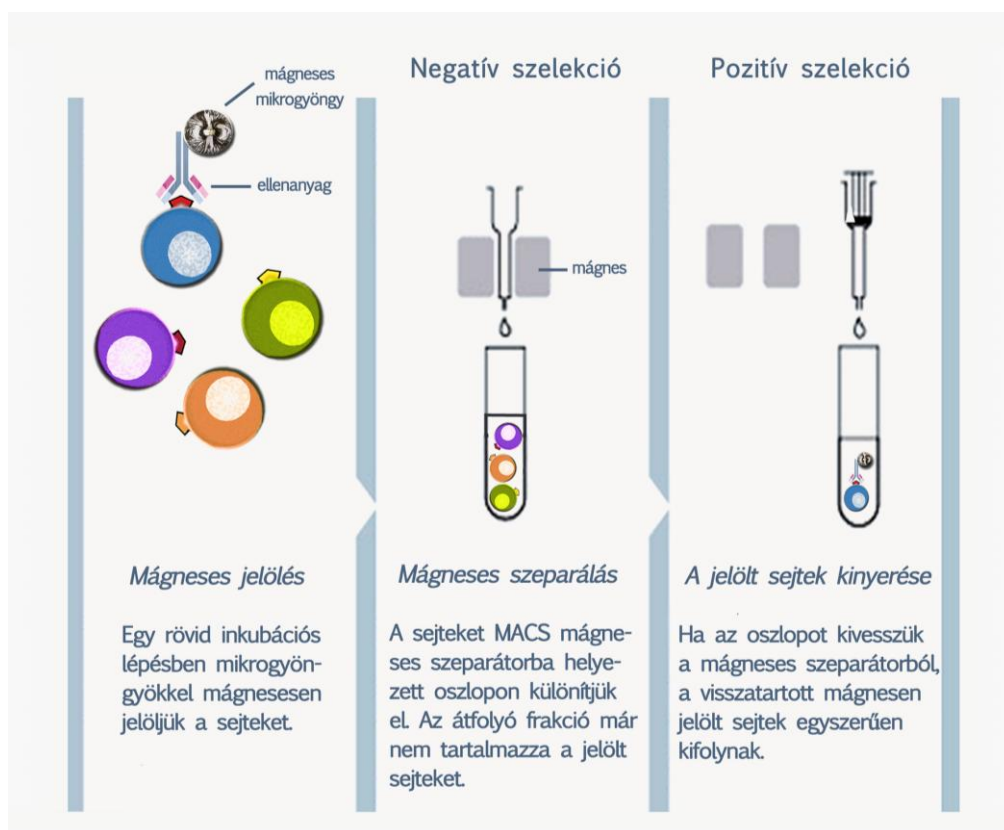
8.4. Sejtszeparálás és szelekció

Sokszor a kiindulási primer tenyészet még heterogén, hiszen az eredeti szövet is többféle sejtípust tartalmaz, viszont a vizsgálatokhoz csak egy meghatározott sejt-féleségre lenne szükség. Ehhez vagy az adott sejtípus valamilyen specifikus sejtfelszíni markere ellen termeltetett ellenanyagot használjuk fel, vagy a sejtípusok elkülönítése a méretük alapján sűrűséggradiens(en történő) centrifugálással történik. Ebben az esetben leggyakrabban FICOLL®-t, nagy molekulatömegű, elágazó, neutrális, vízdéköny poliszacharidok elegyét használnak a sűrűséggradiens létrehozására. (8.2. ábra)



8.2. ábra: FICOLL® sűrűséggradiens centrifugálás

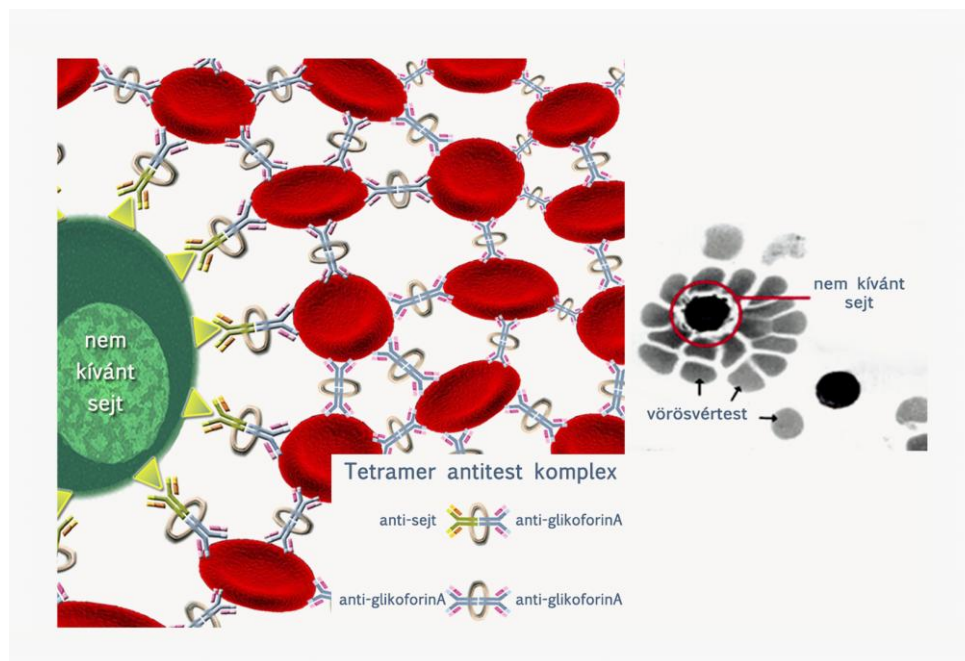
A leggyakoribb, ellenanyag felhasználásán alapuló eljárás ma a **MACS mikrogöngyös negatív vagy pozitív szelekciós** eljárás (8.3. ábra), amikor olyan ellenanyaggal jelölt mágneses részecskéket használnak, amelyek a sejtek sejtfelszíni markereihez kötődve azokat mágnesesen jelölik.



8.3. ábra: Mágneses sejtszeparálás

Ez a jelölés nem változtatja meg sem a jelölt sejt szerkezetét, sem a funkcióját, sem az aktivitását. *Negatív szelekció* esetén a minta sejtjeit MACS mágneses szeparátorba helyezett oszlopon különítjük el. Míg a mágnes által megkötött jelölt sejtekre a későbbekben nem lesz szükség, addig az átfolyó frakcióra, ami már nem tartalmazza a jelölt sejteket, igen. Ezzel tulajdonképpen megtisztítottuk a mintát a vizsgálatot zavaró, nem kívánatos sejtektől. A *pozitív szelekció* során a mágneses szeparátorba helyezett minta jelölt sejtjeire lesz szükség. Ilyenkor az átfolyó frakciót elöntjük, majd az oszlopot a szeparátorból kivesszük. Így a mágnes erőterén kívül a mágnesesen jelölt sejtek visszafolynak a cső aljára, ahonnan ez a dúsult frakció összegyűjthető és további vizsgálatokra felhasználható.

Ezen kívül csontvelői, illetve perifériás vérsejtek esetén a *rozettaképzés*en alapuló, szintén antitesteket felhasználó módszer is alkalmas a kívánt sejtípus elkülönítésére (8.4. ábra). Ekkor olyan specifikus tetramer ellenanyag komplexet használnak (pl. RosettaSep[®]), amely keresztkötéseket hoz létre a nem kívánt sejtek és a vörös vértetek között. Ezek a keresztkötött sejtekből álló csoportok rozettaként láthatóak a fénymikroszkópban, innen az eljárás neve. Az ezt követő sűrűséggradiens történő szeparálás után, a centrifugacső aljára leült rozetták felül, a gradiensüknek megfelelő pozícióból a kívánt sejtek a további vizsgálatok céljára összegyűjthetők. Hasonlóképpen a jelölt ellenanyagokat felhasználó FACS eljárás is alkalmas a kívánt sejtek elkülönítésére (lásd az 5. fejezetben).



8.4. ábra: Rosetta-képzés

Fehérvérsejtek esetében a különböző **limfociták szelektív felszaporítására is van mód**. Mivel a perifériás vérben lévő limfociták a sejtciklus G_0 fázisában vannak, így megfelelő indukáló szerrel (pl. ConA vagy LPS) csak a T- vagy csak a B-limfociták blasztosítása, tehát G_0 -ból G_1 fázisba vitele, s ezáltal felszaporítása is lehetséges (8.2. táblázat).

Mitogén	Célsejt
Konkanavalin A (ConA)	T-sejtek
Fitoheماغglutinin (PHA)	
Alkőrmös (<i>Pokeweed</i> , PWM)	T- és B-sejtek
Lipopoliszacharid (LPS)	B-sejtek

8.2. táblázat: Mitogének

Ez az eljárás bár hasonlít az antigén által kiváltott T-sejt proliferációhoz, *aspecifikus*, azaz ebben az esetben az összes T-sejt blasztosodik, nem csak az adott antigénre specifikusak. A limfociták növényi lektinnel (phytohaemagglutinin, PHA) történő blasztosítását használják fel a rutin kromoszómavizsgálatokhoz is, hiszen így viszonylag fájdalommentesen, egyszerű vérvétellel nyert perifériás vérből sok osztódó limfoblaszthoz lehet jutni már 48-72 óra tenyésztést követően is. Tehát a karyotipizáláshoz szükséges mennyiségű metafázis így hamar rendelkezésre áll.

Bizonyos csontvelő eredetű sejtpopulációk elkülönítésére alkalmas egyszerű eljárás az egyes sejttípusok eltérő sejtadhézióján alapul. Ebben az esetben a frissen izolált csontvelői monocita – makrofág populáció viszonylag gyorsan letapad a tenyésztő edény aljához, míg a limfociták, granulociták nem. Így néhány órás inkubáció után a tápfolyadék elöntésével megszabadulhatunk a le nem-tapadt sejtektől, s tovább tenésztethetjük a feldúsított makrofág frakciót.

8.5. A sejtenyészetek felhasználása

A szövetenyésztési módszerek jelentősége elsősorban abban van, hogy segítségükkel lehetővé válik az állatkísérletek egy részének, illetve az etikai, erkölcsi és törvényes okokból nem kivitelezhető emberkísérletek kiváltása. A kísérletek pontosan tervezhetőek és reprodukálhatóan kivitelezhetőek. Sokféle sejt- és szövettípus az egész szervezet bonyolult kölcsönhatásaiból kiszakítva hozzáférhető a legtöbb sejtfunkció vizsgálata számára, sőt a differenciált sejtek speciális életműködései is tanulmányozhatók rajtuk. Ugyanakkor ez egyben egyik korlátja is lehet az *in vitro* tenyésztési módszereknek, hiszen a sejtek viselkedését a szervezetben sok más sejt(típus) befolyásolja, ezért a kapott adatokat nem lehet egy az egyben az *in vivo* állapotokra vonatkoztatni. Ennek kiküszöbölésére egyre gyakrabban alkalmaznak ún. ko-kultivációs rendszereket, amikor különböző sejttípusokat egymástól térben - egy membrán inzerttel - elválasztva együtt tenésztethetünk, s így a sejtek, pl. szolubilis molekulák által közvetített, kölcsönhatása nyomon követhetővé válik.

További megfontolást igényel, hogy különösen a sejtvonalak hosszabb tenyésztési ideje után számottevő lehet a mutációk felhalmozódása, és szelekció is felléphet. Ma már elmondhatjuk, hogy a *sejtvonalak mintegy spontán evolválódhatnak az in vitro körülmények között*, tehát nem feltétlenül jelent *standard* rendszert ugyanannak a sejtvonalnak az alkalmazása. Ismeretes, hogy az egyes széles körben felhasznált sejtvonalak egy ún. **modális kromoszómaszámmal** rendelkeznek, amely a tenyésztetre jellemző kromoszómaszám, s el is térhet az adott faj kromoszómaszámától. Ez a szám CHO sejtvonal esetében 20 (holott a kínai hörcsögre jellemző kromoszóma szerelvény $2n = 22$, HeLa sejteknél pedig 56, ami távol áll a normális humán kromoszómaszámtól $2n = 46$).

Ezért újabban fokozott figyelmet fordítanak a primer sejtenyészetekre és a sejtörzsekre. Ma már egyre több sejtbank tárol és forgalmaz ilyen, tulajdonságaiban a normálshoz közelebb álló sejtet/sejttörzset.

8.5.1. Plating efficiencia meghatározása

A *plating efficiencia* (PE) egy olyan mérőszám, amely megadja, hogy egyetlen egy kiültetett (plated) sejtből hány sejtkolónia ered. A módszer kellő érzékenysége folytán alkalmas az egyes sejtípusok tápanyagigényének meghatározására, a különböző savó sarzsok alkalmasságának ellenőrzésére, vagy akár a citotoxicitás mérésére.

$PE = \frac{\text{a kolóniák száma}}{\text{a kiültetett sejtek száma}} \times 100.$

8.5.2. Sejtproliferáció/szaporodóképesség meghatározás

A sejtek proliferáló képességét elsősorban a tenyészetekhez hozzáadott különböző anyagok – citokinek, növekedési faktorok –, illetve kísérleti rendszerekben a tesztanyagokkal kapcsolatosan szokás ellenőrizni. A proliferáció illetve az ennek ellentétéként megjelenő citotoxicitás mérésére számos különböző eljárás kínálkozik.

Az eljárások lehetnek **direktek**, amikor közvetlenül mikroszkóppal, pl. hemocitóméterrel ellenőrizzük a sejtszám változását, vagy valamilyen automata sejtszámlálót használunk. Az eljárások másik csoportja az **indirekt** eljárásoké, amikor vagy egy radioaktív izotóp beépülését követjük, vagy amikor a sejt egy enzimjének metabolikus aktivitásváltozását követjük nyomon.

Az indirekt eljárások közül a legismertebb és egyben a legrégebbi a **timidin inkorporációs esszé**. Ebben az esetben radioaktív izotóppal jelölt H^3 -timidint használunk. Ekkor a timidin a sejt DNS-ének replikációjakor beépül az újonnan szintetizált DNS szálaiba, s így az inkorporáció mértéke arányos lesz a DNS replikációk, és ezzel az osztódások számával. A kezelt és kezeletlen sejtek sejtlizátumából szcintillációs, β -számlálóval meghatározva a radioaktivitás mértékét, következtethetünk a teszt anyagnak a sejtproliferációra gyakorolt hatására.

Mivel az utóbbi években egyre inkább törekednek a radioaktív anyagok nem-radioaktívval való kiváltására, ezért egyre több olyan proliferációs esszét fejlesztettek ki, amelyek más elven működnek. Ezek egyike az ún. 5-bróm-dezoxiuridin (**BrdU**) **inkorporáció**n alapuló vizsgálat. A BrdU egy timin analóg, amely az S-fázisban beépül a DNS-be, majd pedig egy jelölt anti-BrdU antitestet használva, immuncitokémiával kimutatható lesz – sejtlízis nélkül – a jelölt és jelöletlen sejtek aránya, s így a kezelés hatása. Újabban egy **fluorokrómmal** (5-etinilil-2-dezoxiuridin) **jelölt nukleozidot** használnak, így még ellenanyagra sincs szükség a proliferációs változások közvetlen nyomon követéséhez.

Ezzel szemben az indirekt proliferációs esszék másik nagy csoportja a mitokondriális enzimek aktivitásváltozását méri. Az ún. **MTT esszé** során a vízdékony MTT (egy tetrazolium só) molekula az élő sejtek mitokondriális enzimjeinek (dehidrogenázok) köszönhetően oldhatatlan lilásbarna formazánná alakul át. Ezt szolubilizálva, majd 570 nm-n fotometrálna megmérhetjük a formazán koncentrációját, ami arányos lesz az élő sejtek számával.

Azonban fontos észben tartani, hogy a metabolikus változásokon alapuló sejtszám meghatározásokat ajánlatos valamilyen direkt vagy bázisanalógon alapuló indirekt eljárással ellenőrizni, mert

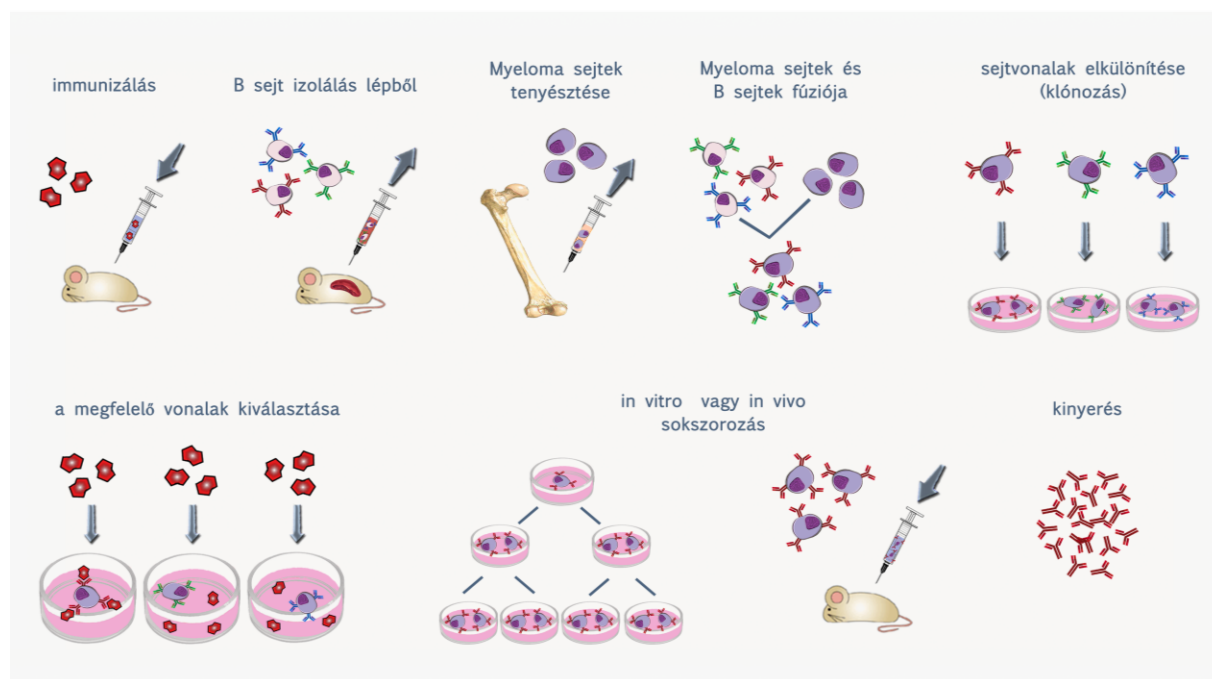
előfordulhat, hogy a tesztanyag közvetlenül a mitokondriális enzimre hatva a formazán mennyiségét anélkül csökkenti, hogy csökkentené a sejtek számát. Ugyanakkor azt is hangsúlyozni kell, hogy a sejtszám azért is csökkenhet, mert a tesztanyag egyszerűen toxikus, így a sejtszám csökkenése nem a proliferáció csökkenésének, hanem a sejtek halálának tudható be.

8.5.3. Citotoxicitás mérés

Bár a sejtproliferáció és a sejtpusztulás összetartozó jelenségek, a kísérletek céljától és a tesztanyagtól függően az esszék során vagy az élő sejtek száma a fontos, vagy például új tumorelles szerek vizsgálatakor a sejtek pusztulásának mértéke kerül az előtérbe. A fentebb említett sejtproliferációs eljárások egy részében ismert számú sejtől kiindulva egyidejűleg következtethetünk a proliferáló, tehát az élő sejtek számára és az elpusztultakéra is (pl. a plating efficiencia vagy az MTT esszé). A citotoxicitási vizsgálatok egy másik része a sejtmembrán integritásának ellenőrzésén alapul. Ilyen a sejtszámolás kapcsán korábban említett **tripánkék festés**, ahol csak a már nem ép membránú, tehát nem élő sejtek veszik fel a festéket, vagy ilyen az áramlási citometria kapcsán tárgyalt **propidium jodidos festés**, amely szintén csak a halott sejtek membránján jut keresztül. Más citotoxicitási módszerekkel olyan anyagok membránon keresztüli transzportját nézik, amelyek a sejten belül nem aktívak, de a sejtől kijutva igen vagy fordítva. Ilyen a laktó-dehidrogenáz, vagy az élő- illetve holt-sejt proteázok.

A legújabb módszerek közé tartozik a letapadó sejtek esetében az elektromos impedancia mérésén alapuló eljárás (pl. ECIS; lásd a 9. fejezetben), amikor a sejtek pusztulásának inkább a kinetikáját látjuk, mint pusztán a végeredményt, azaz az elpusztult, letapadni már nem tudó sejtek számának növekedéséből adódó impedancia csökkenést.

8.5.4. A monoklonális antitestek gyártása



8.5. ábra: A hibrid sejtek szelekciója

A szuszpenziós sejtenyészetek egyik kiemelkedő fontosságú felhasználási területe a **monoklonális ellenanyagok** előállítása. Ennek során a megfelelő antigénnel immunizált állat lépéből ellenanyag-termelő B-sejteket izolálnak, majd ezeket polietilén-glikol vagy Sendai vírus felhasználásával (sejtmembrán destabilizálók) fuzionáltatják korlátlan szaporodóképességű myelomasejtekkel (B-sejtvonal). Ezek a myelomasejtek önmagukban nem termelnek ellenanyagot az antigén ellen, és hiányzik belőlük vagy a HGPRT (hipoxantin-guanin-foszforibozil transzferáz) vagy a TK (timidin-kináz) enzim. A keletkezett hibrid sejtek egy része rendelkezni fog mind a korlátlan szaporodóképesség, mindpedig az ellenanyag-termelés képességével (**hibridóma**). Ezeket a hibrid sejteket egy ún. **HAT szelekciós** eljárás során (8.5. ábra) a nem-hibrid-sejtektől elkülönítve felszaporíthatjuk. A szelekciós eljárás során a sejteket hipoxantin-aminopterin-timidin (HAT) médiumba helyezzük. A szelekciós médiumban a hibridizációs partner sejtek kihalnak, mert

- 1) a lép eredetű B-sejtek csak korlátozott számú DNS replikációra (DNS szintézisre) képesek (primer sejt tenyészet).
- 2) a myeloma eredetű mutáns sejtekben nem működik a DNS szintézis alternatív útja, a TK vagy a HGPRT hiányának köszönhetően illetve az aminopterin gátolja a DNS szintézis klasszikus útját.

Így a HAT médiumban csak a hibrid sejtek élnek túl, mert ezek heterozigóták akár a HGPRT-re, akár a TK-ra nézve, s így képesek az alternatív DNS szintézisre, tehát a sejtproliferációra is.

Majd ezek közül a hibridóma sejtek közül egy-sejt-klónozással s az azt követő ELISA-val kiválaszthatjuk az egy antitest-kötőhelyre (*epitóp*) specifikus (*monospecifikus*) ellenanyagot termelőket, amelyek bioreaktorban való tömegtenyésztése lehetővé teszi a nagy mennyiségű monoklonális ellenanyag-gyártást.

8.6. Speciális tenyésztési típusok

Bár a legtöbb esetben a hagyományos Petri-csésze vagy sejtenyésztő flaska megfelel a kísérleti / vizsgálati céloknak, vannak olyan esetek, amikor egyetlen sejttípusból rendkívül nagyszámú sejtre van szükség. Ezekhez a tenyészet milyenségétől függően – letapadó vagy szuszpenziós – más-más költséghatékony eszközöket fejlesztettek ki. Ez azt jelenti, hogy viszonylag kevés tápfolyadék, szérum és egyéb adalék alkalmazása mellett lehet sok millió sejtet egyidejűleg fenntartani. A szuszpenziós kultúrák esetében ilyen az ún. *spinner flaska*, az adherens tenyészetekben pedig, az ún. *forgó palack* vagy *roller bottle*. Az előbbinél a palack belsejébe, a sejtsuszpenzióba nyúló forgó kar egyenletesen és folyamatosan keveri a sejteket és a tápfolyadékot, ezzel minden egyes sejt számára egyenletes tápanyag ellátottságot biztosítva. A második esetben a letapadó sejtek egy megfelelő nagy felületű hengeres tenyésztő edény belső felszínére tapadva viszonylag kis mennyiségű tápfolyadék filmréteg alatt növekednek. A palackot a berendezésbe helyezve az egyenletes forgás biztosítja, hogy a sejtek folyamatosan hozzájussanak a szükséges mennyiségű tápanyaghoz, és ugyanakkor ki se száradjanak. Így mindkét esetben a **felszaporítás** (*scale up*) nagyon kedvező sejt / tápfolyadék arány mellett lehetséges. Az ilyen sejtfelszaporítás speciális esete a ún. **mikrogyöngyökön** (Cytodex) való tenyésztés. Ilyenkor a tenyésztőfelület extrém megnövelését teszi lehetővé az adott mennyiségű tenyésztő médiumba helyezett gyöngy, amelyeket egy *spinner* flaskában mozgatva, hamarosan

teljesen benőhetnek a sejtek. Mivel a tápfolyadék áramlik, így a gyöngyfelületen növekvő sejtek egyenletesen vehetnek fel és adhatnak le anyagokat.

Hasonló elveken alapulnak a statikus és a dinamikus **sejtgyárok** is. Ez utóbbiak esetében a légzési gázok folyamatos cseréje is biztosított.

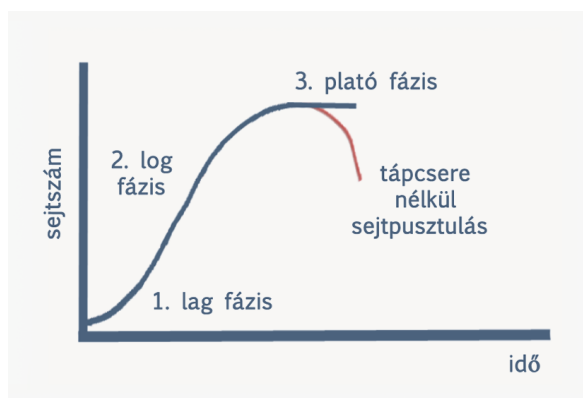
Bioreaktorokat használnak a nagy mennyiségű monoklonális ellenanyag előállítására, vagy genetikailag módosított eukarióta sejtek felszaporításával bizonyos rekombináns fehérjék, pl. inzulin, növekedési hormon termeltetésére. A gyógyászatban jelentős szerepe lehet, pl. a *májsejt-reaktoroknak*, amelyek dinamikus kultúrái szervdonor hiányában alkalmasak lehetnek a beteg vérének detoxikálására, és ezáltal életének meghosszabbítására a donor szerv megérkezéséig.

A **szemi-szolid médium**, egy metilcellulóz alapú fél-folyékony táp, amely nem engedi a sejtek aljzathoz tapadását, de biztosítja a tápanyagokat és utánozza a csontvelői környezetet, ezért általában a *hemopoetikus* őssejtek tenyésztéséhez használják.

A csontvelő őssejtekből kiindulva a megfelelő citokinekkal kiegészített fél-folyékony médiumban meghatározott sorrendben jelennek meg a differenciálódó hemopoetikus sejtek. Először az eritroid progenitorok, majd a CFU-GEMM granulocita, eritrocita, monocita, makrofág, azaz a *multipotens progenitorok* kolóniái jelennek meg, végül a fejlődési potenciák szűkülésével eljuthatunk az *unipotens*, már csak egyféle sejtípust, pl. makrofág vagy monocita tartalmazó sejt kolóniáig.

Embrionális őssejtek tenyésztése során egy másik speciális tenyésztési technikára van szükség. Ebben az esetben a sejteket egy növekedésben vagy besugárzással, vagy MMC (mitomycin C) kezeléssel gátolt másik sejtrétegre szélesztik. Az ily módon létrehozott ún. **tápláló sejtréteg** vagy **feeder layer**, az embrionális őssejtek differenciálatlan, tehát pluripotens állapotban tartásához szükséges faktorokat – citokinek, növekedési faktorok – termeli, anélkül, hogy túlnőné a szaporítani kívánt őssejtet. E rendszer legnagyobb problémáját az jelentette, hogy mind az egér, mind pedig a humán embrionális őssejteket egér fibroblaszt *feederen* tenyésztették. Az ebből adódó fajidegen kontamináció kockázata a humán embrionális őssejtek terápiás alkalmazásának egyik legnagyobb akadályát jelentette. Ezért ma már jól definiált szintetikus, extracelluláris mátrixot használnak az egér, tápláló sejtréteg helyett.

8.7. Szuszpenziós tenyészetek sejtjeinek vizsgálata

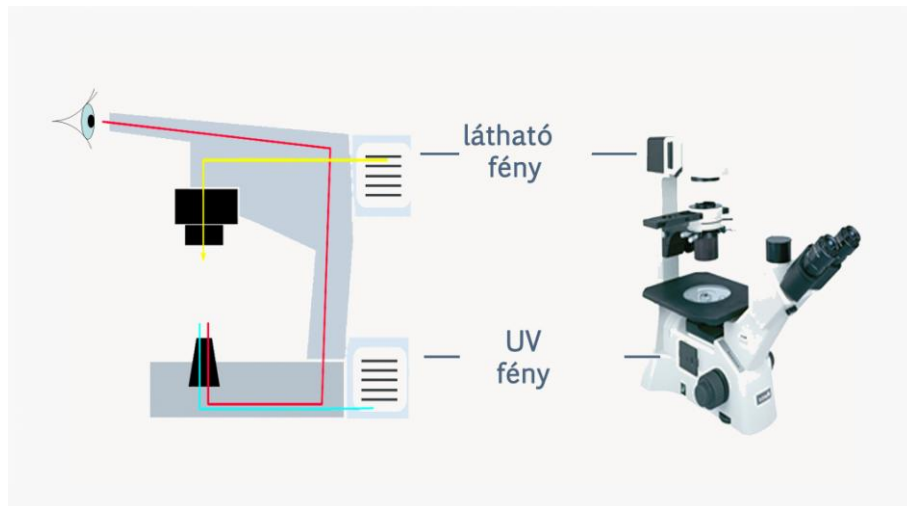


8.6. ábra: A sejtszám változása az idő függvényében

A sejtenyészetek vizsgálatára a legalkalmasabb időpont az ún. **log fázis** (8.6. ábra), amikor a sejtek száma exponenciálisan nő. Az ezt megelőző, a tenyészet indítását követő ún. **lag (vagy késlekedő) fázisban** a sejtek a szubkultiválást követően regenerálódnak, növekednek, majd proliferálni kezdenek.

A log fázist követő **plató fázisban**, a tápanyagok és adherens sejtek esetében a szabad felület fogytán a sejtek szaporodása lelassul, majd megáll, s a sejtszám egy rövidebb ideig konstans. Ha

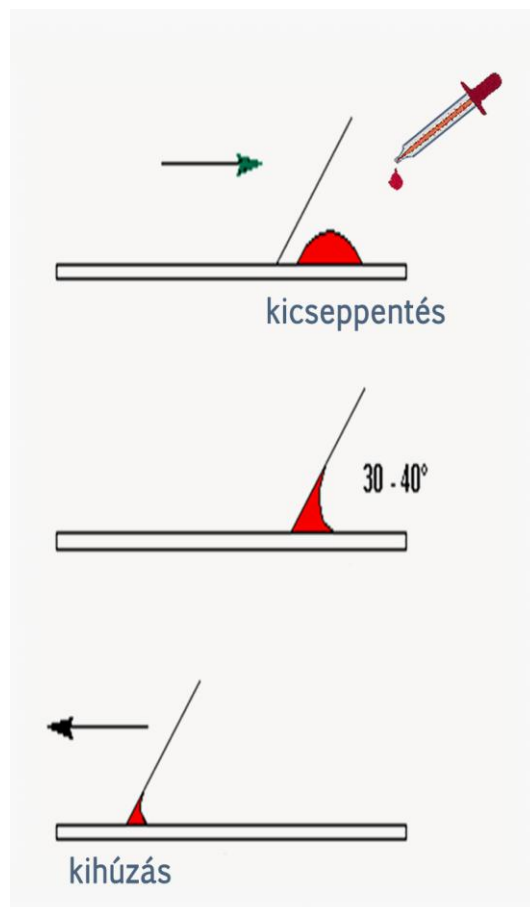
ekkor nem történik tápfolyadékcseré, illetve a sejteket nem osztják szét új tenyészetekre, akkor az utolsó ún. **pusztulási fázis**ba jutva a sejtek pusztulni kezdenek, és a sejtszám folyamatosan csökken. Az adherens sejteket fénymikroszkópban *in situ* vizsgálhatjuk immuncitokémiával és citológiai festésekkel. Az élő, adherens sejtenyészetek vizsgálatára az **inverz(fény)mikroszkópot** (8.7. ábra) és a **videomikroszkópiát** használják. Ezzel szemben a szuszpenzióban növő sejteket valamilyen technikával tárgylemezre kell vinni ahhoz, hogy fénymikroszkópban vizsgálhatóak legyenek. Ilyen eljárás a kenet, a vastagcsepp készítés és a citocentrifugálás.



8.7. ábra: Az inverz mikroszkóp elve

A **kenet** készítéskor (8.8. ábra) általában nagy sejtszámú sejtuszuszpenzióból indulnak ki, és ennek egy kis mennyiségű mintáját tárgylemezre cseppentve egy másik tárgylemezzel egysejtréteggé (monolayer) szélesztik. A **vastagcsepp** preparátum esetében a kiindulási sejtuszuszpenzió híg, s ennek kis térfogatát egyszerűen tárgylemezre cseppentik.

Citocentrifugálás során a kiindulási sejtuszuszpenzió sűrűségétől függően a kisebb vagy nagyobb térfogatú mintát egy speciális L-alakú tölcserkébe juttatják, amelyből az összes sejt a centrifugális erő hatására a mögé helyezett tárgylemez egy kb. 0,5cm átmérőjű foltjára jut. A fenti eljárások bármelyikével tárgylemezre vitt sejtek száradását majd fixálását követően, a preparátumok a kívánt módszer alkalmazása után mikroszkópban vizsgálhatók.



8.8. ábra: A sejtkenet készítés lépései

8.8. A sejtenyésztés alkalmazási lehetőségei

A sejtenyésztetek sejtjeit a legkülönbözőbb módokon vizsgálhatjuk (8.3. táblázat) a hagyományos fény- és elektronmikroszkópos technikák alkalmazásától a modern molekuláris biológiai módszerek felhasználásával végzett, pl. génexpressziós, vizsgálatokig. A sejtenyésztési módszerek tették lehetővé az embrionális, majd a felnőtt és végül az indukált pluripotens őssejtekkel végzett vizsgálatokat, a differenciálódott őssejtek, és általában véve a sejtenyésztés révén felszaporított, meghatározott típusú vagy éppen genetikailag módosított / korrigált sejtek pedig óriási távlatokat nyitottak a különböző emberi betegségek hagyományos vagy génterápiájában.

Környezeti kölcsönhatások
➤ Fertőzések (vírus, baktérium, parazita) ➤ Toxikológia ➤ Immunológia ➤ Karcinogenezis ➤ Xenobiotikumok biotranszformációja
Genetika
➤ Transzformáció ➤ Sejtfúzió ➤ Sejtciklus
Sejtbiológia
➤ Sejt-sejt és sejt-mátrix kölcsönhatások ➤ Génexpresszió ➤ Sejtproliferáció ➤ Differenciáció ➤ Sejt-migráció, -invázió
Intracelluláris aktivitás
➤ DNS transzkripció ➤ RNS metabolizmus ➤ Fehérjeszintézis ➤ Intermedierek anyagcsere
Biotechnológia / Tissue engineering
➤ Citokinek/növekedési faktorok, hormonok, ellenanyagok termeltetése ➤ Mesterséges szövetek

8.3. táblázat: A sejtenyésztés alkalmazási lehetőségei.

9. AZ IMMUNSEJTEK MIGRÁCIÓJA, HOMING ÉS GYULLADÁSOS EXTRAHAZÁRÁS

(KŐHIDAI LÁSZLÓ)

9.1. Bevezetés

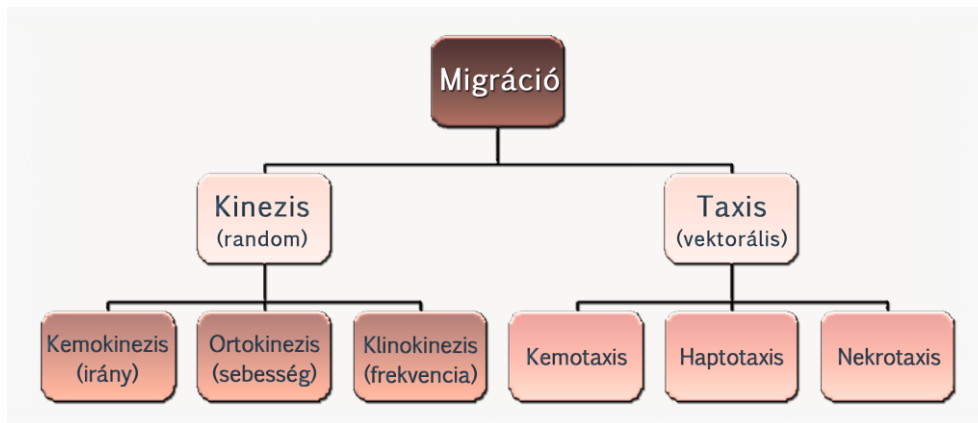
A sejtek migrációra való képessége mind egysejtűek, mind magasabb rendű szervezetek esetében alapvető fontosságú folyamat. A sejtek filogenezis korai szakaszában kialakult aktív helyváltoztató képessége járult hozzá már ahhoz is, hogy a primitív sejt szerződési fokán álló élőlények érzékenyen és hatásosan tudjanak különbséget tenni a környezetükben jelen lévő és számukra életfontosságú molekulák (pl. táplálék molekulák), illetve veszélyt jelentő toxikus ágensek között. A szignálszelekciós elmélet szerint a sejtmozgást kiváltó molekuláris szignálok érzékelésére képesek receptorok és intracelluláris jeltovábbító mechanizmusok is nagyban hozzájárultak ahhoz, hogy sejtjeink nem csupán érzékelni képesek a környezet káros, illetve kedvező jeleit, de intracelluláris hatásaik révén el is különülhettek az egyes válaszok kialakítására képes nagy jeltovábbító mechanizmusok. E folyamat révén – döntően a sejt migráció indukálhatósága révén -, szelektálódtak a sejtek intracelluláris biokémiai folyamataira speciális hatással lévő molekulák az egy szerű táplálék molekuláktól, s alakulhattak ki az olyan nagy jelmolekula családok (pl. hormonok, citokinek, lektinek), melyek biológiailag aktív hatásai nagyban meghatározzák az ember egészséges és kóros állapotának számos jellemző reakcióját.

A fentiekben vázolt és napjainkban már molekuláris hálózatok szervezettségi szintjén is értelmezett rendszer fontos elemeként tartják számon a sejt migrációt, mint olyan alapvető sejtélettani reakciót, mely alapvető élettani folyamatok (pl. megtermékenyítés, angiogenezis) irányító eleme éppúgy, mint ahogyan jelen van a kórtan és klinikum számos esszenciális folyamatában (gyulladások, tumorok áttétképzése, atheroszklerózis) és célpontja a terápia egyes formáinak is (szelektív gyógyszer-célbajuttatás).

Az alábbi rövid összefoglaló vázlatos áttekintést nyújt magáról a sejt migrációról, mint biológiai alapjelenségről, áttekinti annak legfontosabb immunológiai, kórtani és klinikai aspektusait, s egyben kísérletet tesz néhány módszer bemutatása révén a migráció laboratóriumi mérésének gyakorlatáról is képet adni.

9.2. A sejt migráció fő formái

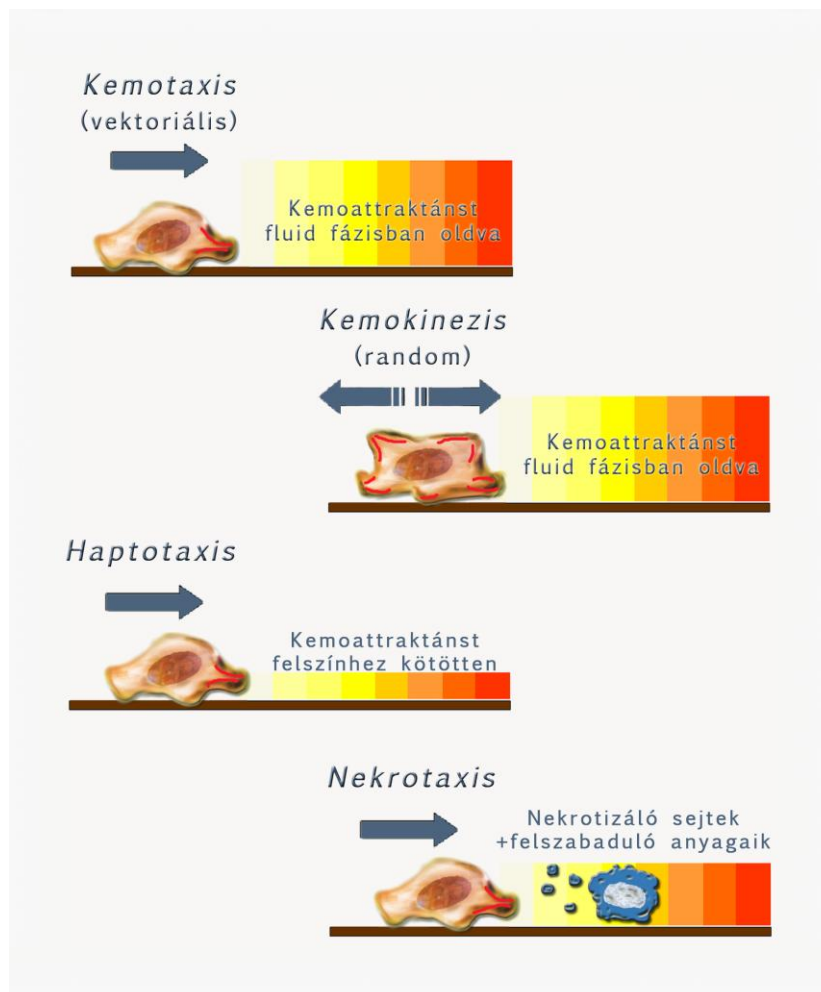
A sejtek migrációját számos módon osztályozhatjuk. Egyik leggyakoribb osztályozási elv szerint megkülönböztetünk (i) kineziseket melyek esetében a mozgás iránya nem függ a kiváltó inger koncentrációjától, tehát random és (ii) taxisokat, melyeknél a koncentráció-gradiens jelenléte meghatározó és az elmozdulás vektoriális jellegű. (9.1. ábra)



9.1. ábra: Sejmozgások főbb formái prokaryóta és eukaryóta sejtekben

Kinezisek esetében beszélünk továbbá a mozgás sebességéről (orto~), frekvenciájáról (klino~) és ad hoc irányról (kemo~) is.

Taxisok esetében a folyadéktérben oldott anyagok által kiváltott (kemotaxis) forma mellett, megkülönböztetjük a felszínhez kötött kialakuló gradiens által kiváltott mozgást (haptotaxis) és egyes elpusztuló sejtekből felszabaduló anyagok által indukált mozgásokat (nekrotaxis). (9.2. ábra)



9.2. ábra: Sejtek kémiai anyagok által kiváltott mozgásai

9.3. A kemotaxist kiváltó molekulák

Hatásuk alapján ezek az anyagok két fő csoportba oszthatók:

- (i) kemoattraktánsok azok, melyek hatására a sejtek a növekvő koncentráció-gradiens irányába mozdulnak el;
- (ii) kemorepellensek azok, melyek hatására a sejtek menekülnek, tehát a csökkenő koncentráció-gradiens irányába mozdulnak.

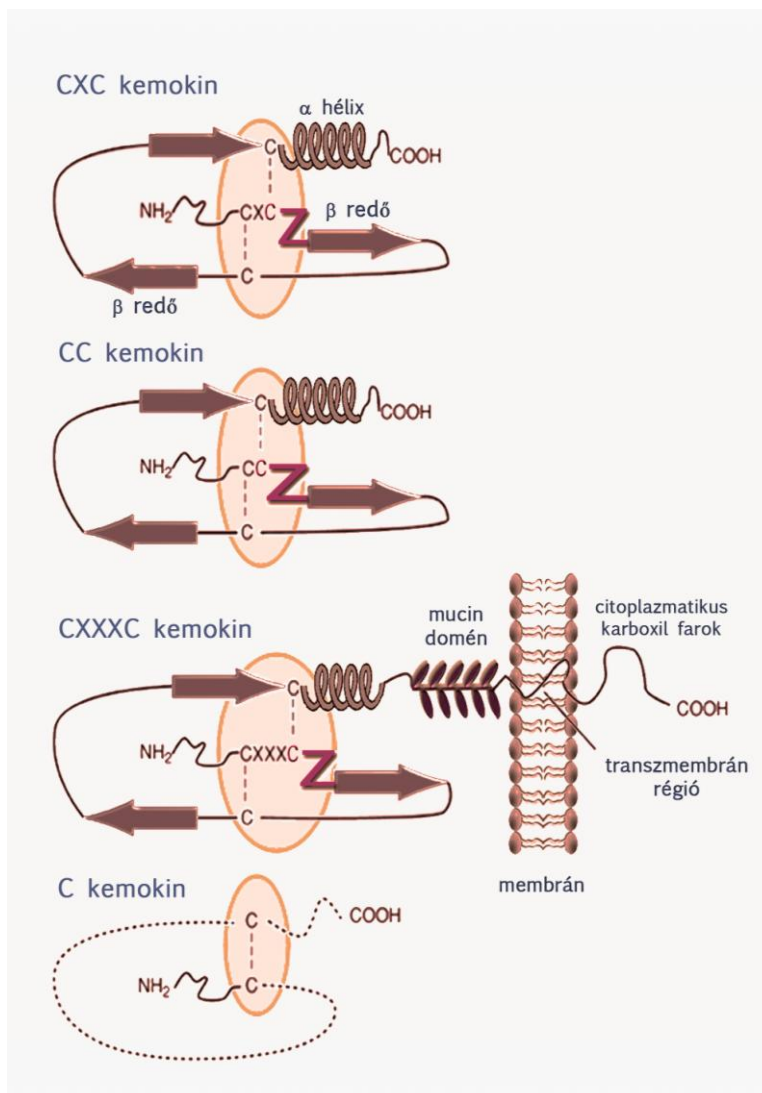
A kemotaxist kiváltó anyagok igen széles skálán mozognak. Egészen egyszerű ionok és viszonylag kis molekulák (pl. aminosavak) éppúgy hathatnak erős kemoattraktáns vagy repellens szerként, mint a viszonylag nagyméretűek (pl. kemokinek, szintetikus gyógyszerek)

A biológiában, illetve az élettan – kórtan – immunológia területén vizsgálva az egyes kemotaxist kiváltó anyagokat egyértelműen látható, hogy vannak ún. professzionális kemoattraktáns molekulák (pl. formil-Met-Leu-Phe, kemokinek, complement 5a).

Fentiek azonban nem zárják ki annak lehetőségét, hogy más molekulák, melyek elsődleges funkciója nem a kemotaxis indukciója, szintén kemoattraktánsok / kemorepellensek legyenek (pl. hormonok)

A kemokinek négy alosztályának besorolása a peptidek szerkezetét meghatározó egy, illetve két diszulfid híd elhelyezkedése, illetve a centrális ciszteinek közötti távolság alapján történik.

Funkció szempontjából különösen érdekes a CX3C csoport, mely tagja(i) a C-terminális hidrofób doménje révén a membránba is kihorgonyozódhat(nak) és ezáltal jó példáját adják a haptotaktikus migrációt indukáló ligandumoknak. (9.3. ábra)



9.3. ábra: Kemokinek osztályozásának molekulaszervezeti alapja

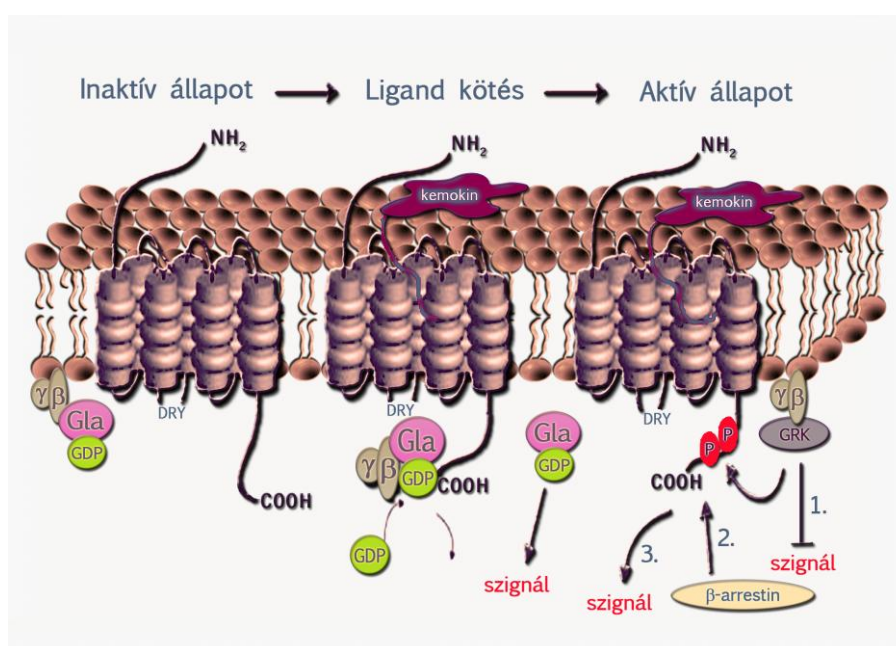
9.4. Kemotaxis receptorok

A kemotaxis kiváltásáért a törzsfa egyes szintjein más-más jellegzetes ligandum-membránreceptor interakciók szelektálódtak, mint a sejtek migrációját leghatásosabban kiváltani képes molekuláris szintű kapcsolatok. A prokaryóta sejtek esetében a már fentiekben is említett viszonylag egyszerű molekulákat (pl. egyszerű cukrok, aminosavak illetve ezek di- vagy trimerjei) kötni képes transzmembrán fehérjék (pl. aszparaginsav Tar-receptor) tekinthetők a leghatásosabban működő, motilitást befolyásoló kemotaxis receptornak. Szerkezetük négy jól elkülöníthető funkciót betöltő domainből tevődik össze: (i) az extracelluláris térbe nyúló, ligandumot kötő rész; (ii) az ún. „coiled coil” domain; (iii) a receptor aktiválódásáért és a szignáltovábbításért felelős metil-csoportokat kötő régió; valamint (iv) a citoplazmába nyúló és kemotaktikus proteinek poszforilációját kiváltó szignalizációs domain. Fontos észrevenni, hogy már e receptorok esetében is megfigyelhető a magasabb rendűek receptorainál gyakran leírt jelenség, mely a dimerizálódott receptor komplexek nagyobb aktivitását mutatja.

Magasabb rendűek, így az emberi szervezet számos sejtjének felszíni membránjában is megtalálhatók azok a kemotaxis receptorok, melyek a bakteriális fertőzések esetében a baktériumokból felszabaduló jellemző rövid formilált metionint tartalmazó peptidek (jellegzetesen formil-Met-Leu-Phe) kötésére képesek. E receptorok már a 7TM receptor-családba tartoznak, s ligand kötésükben a 2.-3., illetve 4.-5. transzmembrán domain közötti extracelluláris peptidhurok, illetve az 1. transzmembrán domain extracelluláris glikozilált szekvenciája játszik döntő szerepet.

A fentihez hasonló 7TM receptor köti a C5a peptidet, ennek esetében azonban az 1. és a 6.-7. domain közötti extracelluláris peptidhurok segíti a ligandum kötését.

A fenti két kemotaxis receptor intracelluláris szignalizációját a receptorok intracelluláris C terminális peptidlánca trimer G-proteinhez kötötten indítja, míg a sejten belüli jel továbbításban számos szignalizációs hálózat vesz részt (pl. PLC-PIP2-IP3-Ca²⁺; Ras/Raf-MEK1/MEK2-ERK1/ERK2; MEKK-MEK3-p38-MAPK)



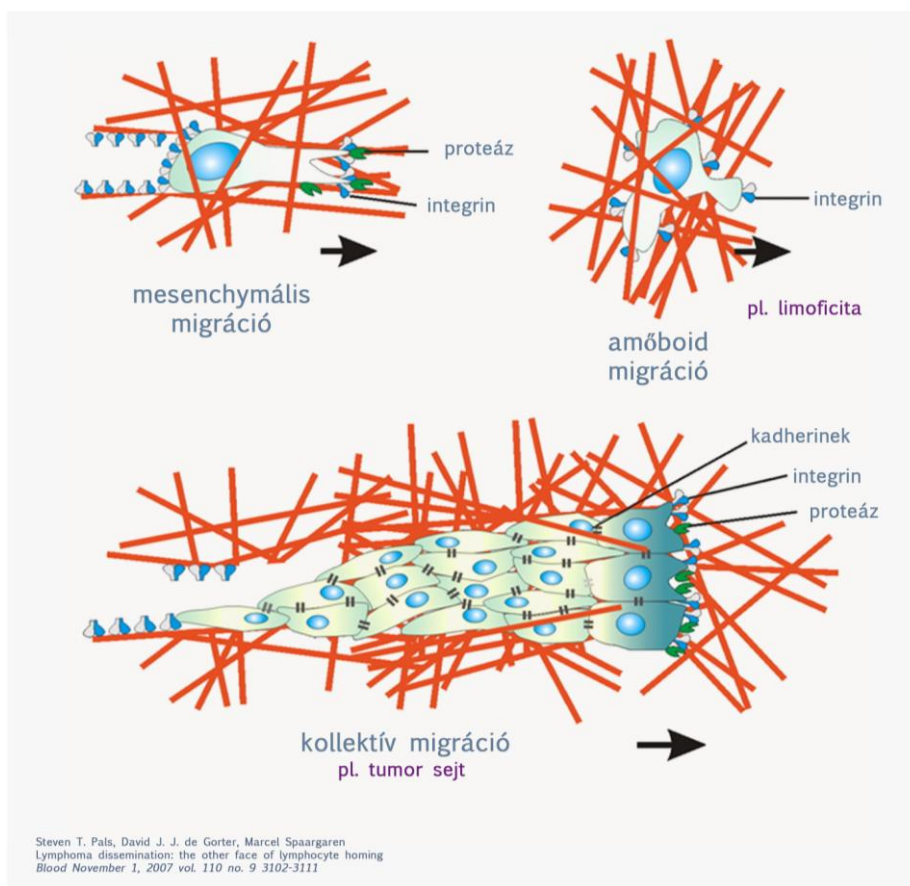
9.4. ábra: Kemokin receptorok jel továbbító mechanizmusai

A kemokin receptorok is a 7TM receptorok családjába tartoznak. A ligandum kötésében itt is fontos szerepet játszik a receptor N-terminálisan elhelyezkedő extracelluláris lánc, valamint a 2. extracelluláris hurokhoz való kötődés.

Az intracelluláris szignalizációt a trimer G-protein és a receptor 2. intracelluláris hurkán elhelyezkedő DRY szekvencia interakciója indítja be. A rendszer GTP általi aktiválásában a receptor intracellulárisan elhelyezkedő C-terminális láncvége játszik szerepet. E szakasznak foszforilációja béta arrestinnel történő kapcsolódást követően további szignál értékű jelet generál. (9.4. ábra)

Fenti interakciók mellett több kemokin esetében (pl. IL8) leírták, hogy a kemokin receptor közvetlen közelében a membrán extracelluláris felszínén elhelyezkedő GAG molekulák is fontos szerepet töltenek be a ligand-receptor komplex stabilizálásában.

9.5. Az emberi szervezet motilitást mutató sejtjei és mozgásformáik



9.5. ábra: Az emberi szervezet sejtjeire jellemző mozgásformák

A magasabb rendű szervezetek esetében számos sejt szerepel az egyes kemokinek célsejtjeinek listáján. Ezek közül élettani és klinikai szempontból is a legfontosabbak: a neutrofil granulocita, monocita, limfocita, eozinofil granulocita és az erek endotélje.

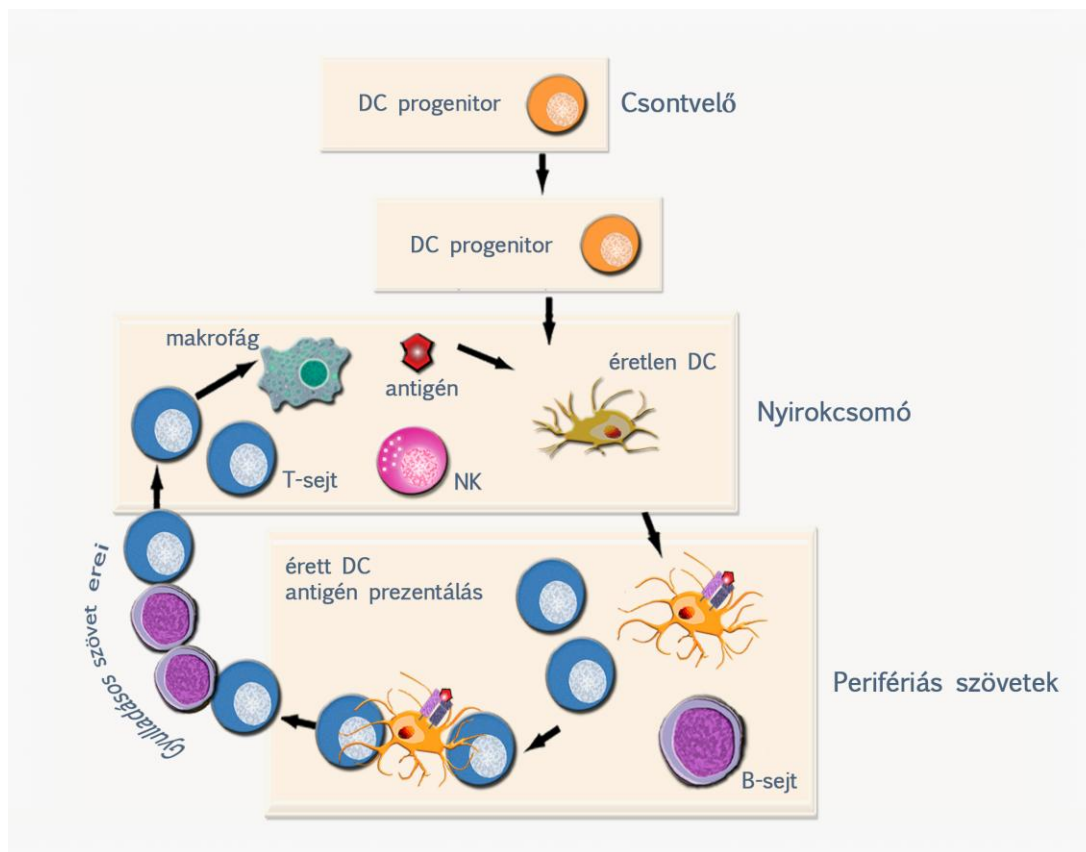
A magasabb rendűekben megfigyelhető fő migrációs mechanizmusok közül jól elkülöníthető az ún. mesenchymális forma, melyben a sejtek polarizálódását az integrinek általi kikötés és a sejtek által termelt extracellulárisan ható proteázok aktivitása határozza meg. Ettől eltérő a klasszikus amőboid

migráció, melyben a környezet vázelemeinek bontása nem játszik jelentős szerepet. Az utóbbi években leírt új mozgásforma az ú.n. kollektív migráció, melyben egymással sejtkapcsoló struktúrák által összetartott sejtcsoportok együttes menetelése figyelhető meg. Ez utóbbi eset figyelhető meg embrionális szövetek morfogenezise során (ld. endothél) és egyes daganatok növekedése esetében is. (9.5. ábra)

9.6. Sejtmotilitás és az immunválasz

Az immunrendszerben migrációt mutató számos sejtcsoport közül a limfociták és a dendritikus sejtek (DC) migrációjának példáin jól tanulmányozhatjuk a folyamat sokoldalúságát, sejtszintű szabályozásának összetettségét.

Ennek során nyomon követhető egyrészt a DC-progenitor-éretlen DC – érett antigén-prezentáló DC útja, mely a csontvelőből a nem-limfoid szövetek közbeiktatásával jut el az immunszervekhez. A 9.6. ábra jól mutatja azt a folyamatot, melynek fontos része az aktivált T sejtek migrációja és cirkulációja az egyes szervek között.



9.6. ábra: Limfociták és dendritikus sejtek fő migrációs útvonalai

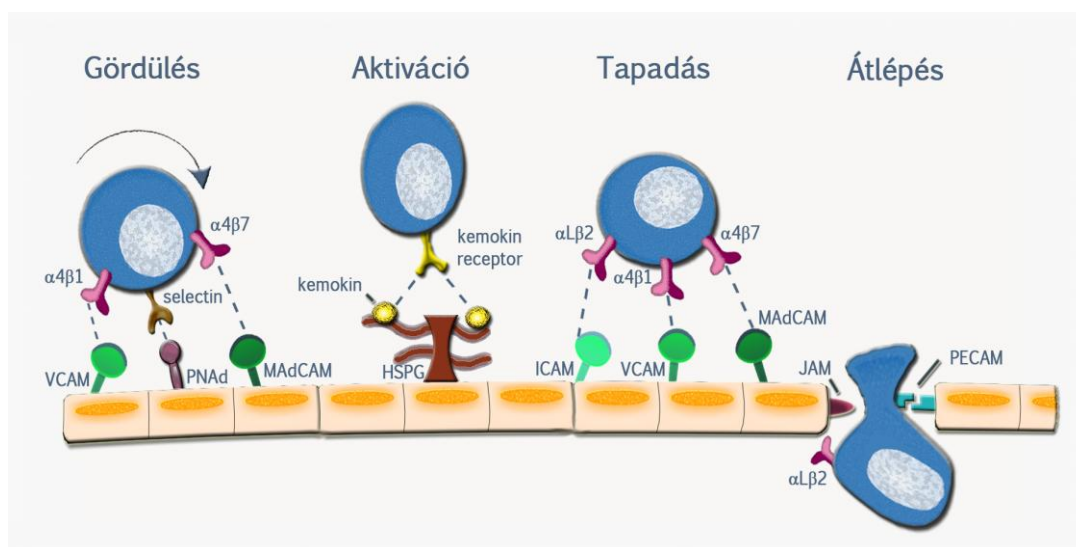
9.6.1. Limfociták transzendoteliális migrációja

A fentiekben vázolt folyamat az egyes szöveti terekben már sokkal árnyaltabb képet mutat. A migráció immunológiai/kórtani szempontból legfontosabb felszíneit az erek endotélje jelenti, ezen a hatalmas felszínen történik a perifériás szövetekben számos sejtpopuláció irányított migrációja (homing, gyulladásos folyamatok), melynek során egyes sejtpopulációk a lokálisan expresszált membrán

komponensek (pl. adhézíós molekulák) és fluid fázisban lévő indukáló faktorok (pl. kemokinek, bakteriális peptidek) hatására elhagyják az érrendszert vagy éppen oda térnek vissza.

A posztkapilláris venulákban a limfociták transzmigrációjakor az egyes fázisok kialakulását az alábbi molekuláris mechanizmusok teszik lehetővé (9.7. ábra):

1. **Rolling** - szelektin-szalomucin kapcsolat (vagy integrin alfa4béta1 és alfa4béta7)
2. **Aktiválás** – az endotél heparánszulfát proteoglikánjai (HSPG) által bemutatott kemokinek a kemokin receptorokkal kapcsolódnak, aktiválják a limfocitákat
3. **Adhézió** – az aktiválás eredményeként fokozott affinitású és aviditású integrinek jelennek meg a limfociták felszínén. Ezek az endotélben lévő ligandjaikkal (ICAM, VCAM stb.) kapcsolódnak mely az adhéziót szorossá teszi.
4. **Diapedesis** – a funkcionális adhézíós molekulákkal (JAM, PECAM-1=CD31) történő kapcsolódás az endotéllel közötti rések megnyílását és a limfociták transzmigrációját eredményezik.



9.7. ábra: Limfociták transzendoteliális migrációja

A limfociták migrációja erősen adhézíós molekulák, kemokinek és kemokin receptorok által szabályozott.

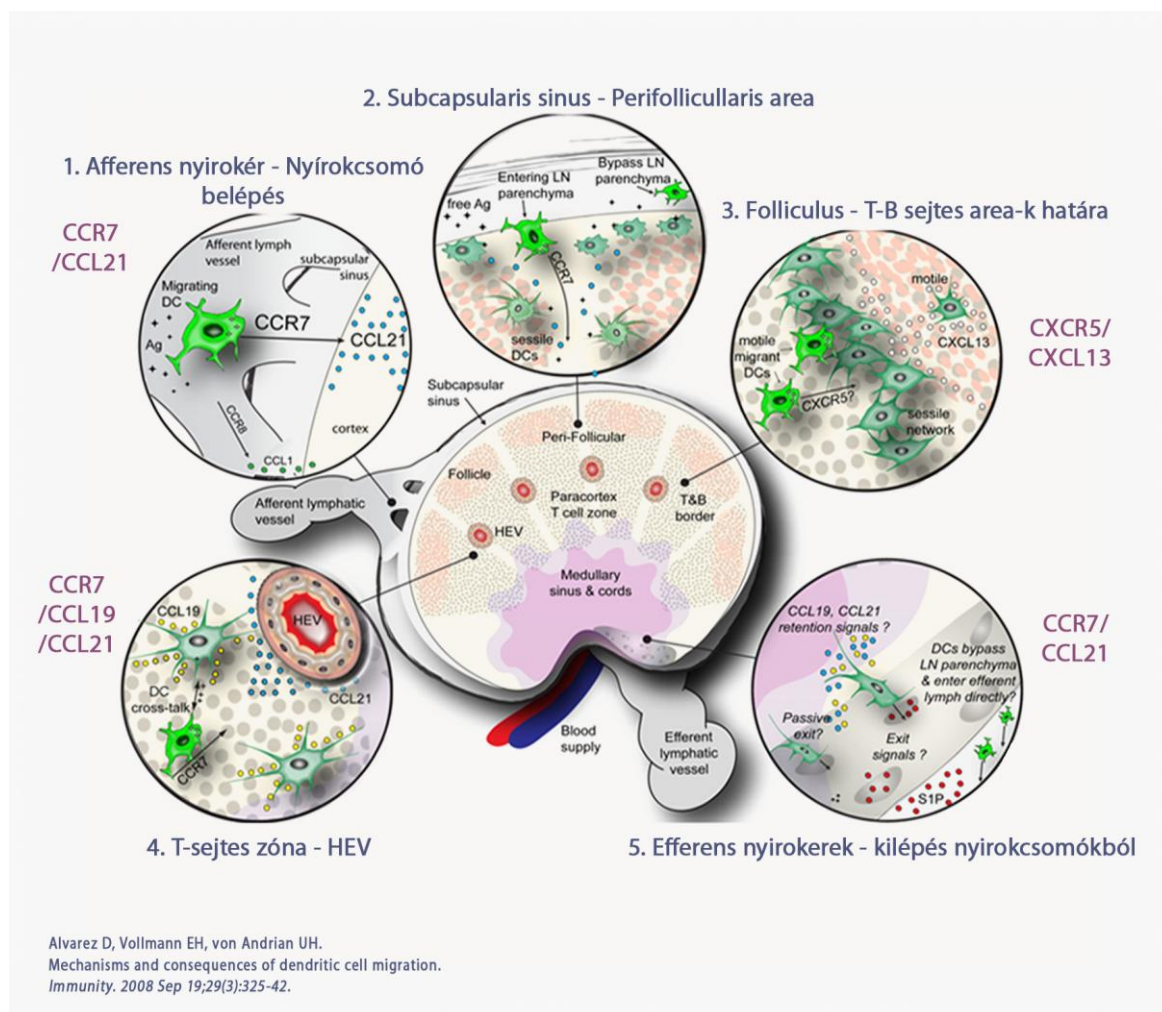
A naív T sejtek homingja és másodlagos immunszerveken keresztüli recirkulációja lehetséges, mivel integrin alfa4beta7-t (mucosa) és L-szelektint (nyirokcsomók) is expresszálnak. Az aktivált T sejtek gyulladás helyére történő migrációja számos receptor-ligandum páros kapcsolódását foglalja magába: szelektin-szalomucin, integrin alfa4beta1-VCAM-1, integrin alfa4beta1-CS-1, és CD44-hialuronsav. A T sejtekből kialakult memória sejtek esetében a megjelenő „homing signature” egy specifikus adhézíós és kemokin receptor profil, mely képessé teszi őket szelektív, szövetspecifikus migrációra.

A naív B sejtek ko-expresszálnak az L-szelektint és az alfa5béta7 integrint, mely képessé teszi őket arra, hogy a mucosába és a perifériás nyirokcsomókba egyaránt eljuthassanak. A Peyer plakkok germinális centrumaiban lezajló reakciók a memória B sejtek alfa4béta7 integrin expresszióját idézik elő. Ezek a sejtek azután IgA-t szecernáló plazmasejttekké differenciálódnak. A memória B sejtek döntő hányada azonban a nyirokcsomókból származik és IgG-t szecernáló plazmasejttekké

differentiálódik. Ezek a sejtek CXCR4-et, alfa4béta1 integrint és LFA-1-et expresszálnak, melyek a csontvelőbe történő hominghoz szükséges. A csontvelőben ezek a sejtek hosszú-életű plazmasejteké alakulnak.

9.6.2. Dendritikus sejtek migrációs útvonalai

A DC-k csontvelőből történő kiáramlásukat követően a vérkeringés útján érik el az egyes célszerveket/szöveteket. Ezek közül kiemelt jelentőségű a thymus, a nyirokcsomók, a lép valamint a bőr. Míg a plazmacitoid DC-ek mind a négy fő célszervbe jutnak, a thymus és a lép esetében ezek mellett konvencionális DC-ek (cDC), a nyirokcsomók és a bőr esetében prekursor DC-ek is megjelennek. Az egyes célszervekben eltérő receptor-ligandum kölcsönhatások biztosítják a DC-ek célba juttatását. Nyirokcsomók és thymus esetében kiemelt jelentőségű a VLA4-VCAM1 és a PSLG-1 – CD62 (E/P) kapcsolat, míg lép follikulusaiban a CXCR5-CXCL13, a fehér pulpa periarteriális limfatikus hüvelyében a CCR7-CCL19/CCL21 kölcsönhatások a legjellemzőbbek. A bőrben, illetve a gyulladásos folyamatok során a kapcsolatok hosszú sorát írták le, melyek közül a fentiekben már említett PSLG-1 – CD62 (E/P), CXCR1-fraktalkin, CCR6-CCL20 és CCR2-CCL2 a legjellemzőbbek. A nyirokcsomók és a bőr esetében is szép példákat találunk a sejtek migrációjának molekuláris szintű szabályozására (9.8. ábra).



9.8. ábra: Dendritikus sejtek nyirokcsomón belüli migrációja

Nyirokcsomó esetében a belépő afferens nyirokérből a subcapsularis szinusz terébe jutó DC-k kéreg állomány irányába történő migrációját a CCR7-CCL21 és a CCR8-CCL1 kemokin receptor-ikemokin párosok interakciója irányítja. Ezt követően a DC-k a perifollikuláris térbe jutnak majd innen a CXCR5-CXCL13 kemokin interakció hatására migrálnak a nyirokcsomó follikulusának T és B sejtes areájába. A T sejtes zónában elhelyezkedő CCR7 receptort expresszáló DC-ek CCL19-et kibocsátó sejtek, illetve a HEV-ek környezetében nagy koncentrációban megjelenő CCL21 hatására alakítanak ki a DC-kben gazdag réteget a HEV-ek körül. Az efferens nyirokerek környezetében az szfingozin 1-foszfát, mint kilépési szignál hat a DC-kre, míg az előbbieken már említett CCL19 és CCL21 mint visszatartó, retenciós szignálok hatnak.

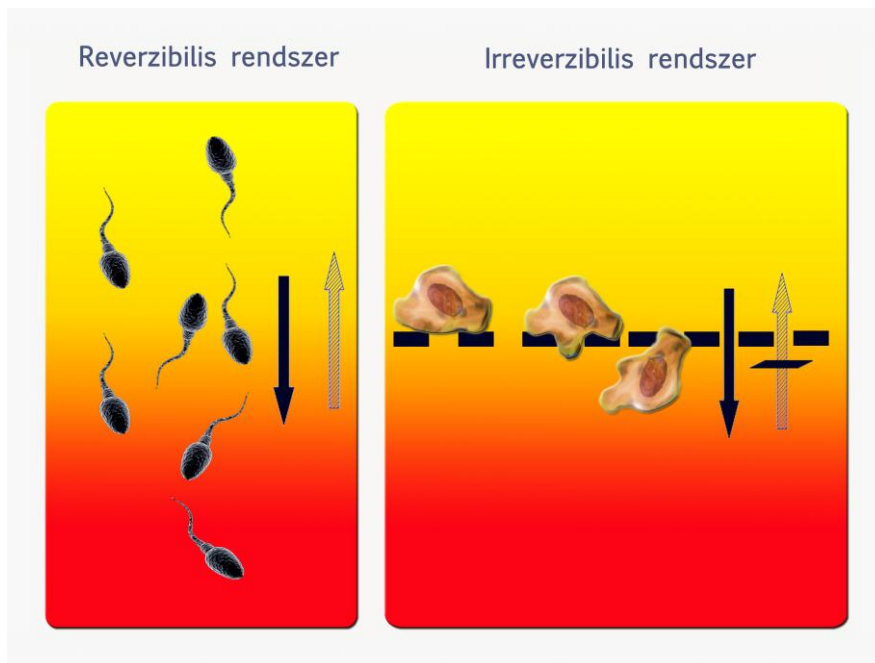
A bőr igen érdekes példáját adja az emberi szervezet esetében a sejtmigrációnak, mivel a testfelszínhez igen közeli hámrétegekben járórozó DC-ek is képesek viszonylag rövid időn belül a nyirokrendszer központi elemeiig eljutni, s ezáltal lehetőséget adnak mind kísérletes, mind terápiás beavatkozásokra.

A hámban elhelyezkedő DC-ek fiziológias állapotban is képesek a mikróbák által megtámadott sejtekből felszabaduló egyes anyagok (TNF α , IL-1 β , PAMP) detektálására, ezek mint migrációs szignál hatnak ezekre a sejtekre. Fenti folyamat részeként a DC-ek E-cadherin kötődéseit bontják, s ezáltal válnak a sejtek mobilizálhatóvá. A bőrből induló migráció következő lépése a bazális membrán, illetve az ehhez asszociálódó extracelluláris mátrix (ECM) elemeinek bontása, melyben mátrix metallo-proteinázok (MMP2, MMP9) vesznek részt. Ugyanakkor a sejtek frontális migrációs felszínén kemokin receptorok is megjelennek (CXCR4, CCR7, CCR8), melyek a megfelelő kemokinek (CXCL12, CCL21, CCL1) igen kis koncentrációinak érzékelése révén segítenek a migráció irányának megválasztásában. A bőr alatti kötőszöveti térbe érve a DC-ek az afferens nyirokerek endotéljéhez tapadnak, mely folyamatban a CCR7-CCL21, VLA-4 – VCAM-1, LFA-1-ICAM-1 mellett a fentiekben már említett szfingozin 1-foszfát szignál és az endotél promiszkuus kemokin receptora (D6) is szerepet játszanak. A folyamat befejező lépése a DC-ek internalizációja a nyirokérbe, melynek lumenében is a CCL21 segíti a vándorlást.

9.7. Sejtmotilitás (kemotaxis) mérésének módszerei

A sejtmozgás mérése – mint azt a fenti fejezetekben is láthattuk – számos immunológiai szempontból fontos sejtleletani állapot elemzésére adhat lehetőséget. A mérések során többek között mód van (i) eltérő sejtpopulációk elkülönítésére; (ii) egyes sejtcsoportok migrációs aktivitásának referencia ligandumok (pl. fMLF, IL-8) segítségével történő meghatározására; (iii) egyes testfolyadékok vagy azokból izolált anyagok kemotaktikus hatásainak elemzésére; (iv) új, gyógyászati szempontból fontos anyagok, gyógyszer-jelölt molekulák hatásvizsgálatára is. A megfelelő modell-sejtek, illetve a megfelelő vizsgálati technikák kiválasztása nagy körültekintést igényel, hiszen a rendelkezésre álló módszerek tárháza igen széles ugyan, azonban a jól megfogalmazott kérdésekre rendszerint csak néhány technika alkalmazásával kaphatjuk a legmegfelelőbb választ.

A 9.9. ábra a kemotaxis mérése esetén megkülönböztethető két alapvetően különböző rendszert mutatja, melyek a sejtek mozgástípusától – lásd 3 dimenzióban vagy 2 dimenzióban mozognak-e – függően alkalmazhatók.



9.9. ábra: Sejtmigráció mérésére alkalmas rendszerek fő típusai

Míg a reverzibilis rendszerben a sejtek egy szabad mozgástérben helyezkednek el és az előkísérletek során beállított inkubációs idő alapján határozzuk meg az optimális vizsgálati időt (egyébként nagy a visszaáramló sejtekre az esély), a filterrel elválasztott rendszerekben minimális a sejtek „visszavándorlásának” esélye. Ezekben a rendszerekben a koncentráció gradiens fennmaradása szabja meg meddig is folytatható a kísérlet, amennyiben már a koncentráció gradiens kiegyenlítődött, nem kemotaxist, hanem kemokinetikus aktivitást fogunk mérni.

A kemotaxist mutató sejtek aktivitását, a kemotaxis indukálhatóságát számos módszerrel mérhetjük. Az ezek által szolgáltatott információ mennyisége és a módszerek eredményessége azonban nem áll arányban. A legtöbb információt szolgáltató módszer (pl. Dunn-kamra) csak viszonylag kevés sejt mérését teszi lehetővé, míg a receptorkötés vizsgálatok, melyek 10^6 sejt felett mérnek, rendszerint csupán egy adatot szolgáltatnak.

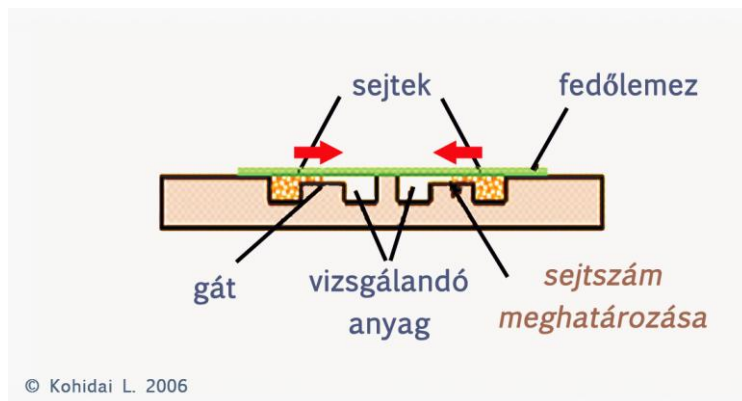
Fentiek is jelzik, hogy a leghatásosabbak a több paraméteres vizsgálatok, melyek számos módszert alkalmazva értékelik a vizsgált anyagot vagy a modell-sejt kemotaktikus válaszkészségét. Az alábbiakban csupán néhány jellemző technikai megközelítés ismertetésére szorítkozhatunk, s egyben felhívjuk a figyelmet a szakirodalom e téren megjelent összefoglaló munkáira.

9.7.1. Reverzibilis rendszerek

Az ebbe a módszertani csoportba sorolt vizsgálóeljárások módot adnak arra, hogy az álláb képződés révén, amöboid mozgással migráló vagy csillós / ostoros sejtek mozgását elemezzük.

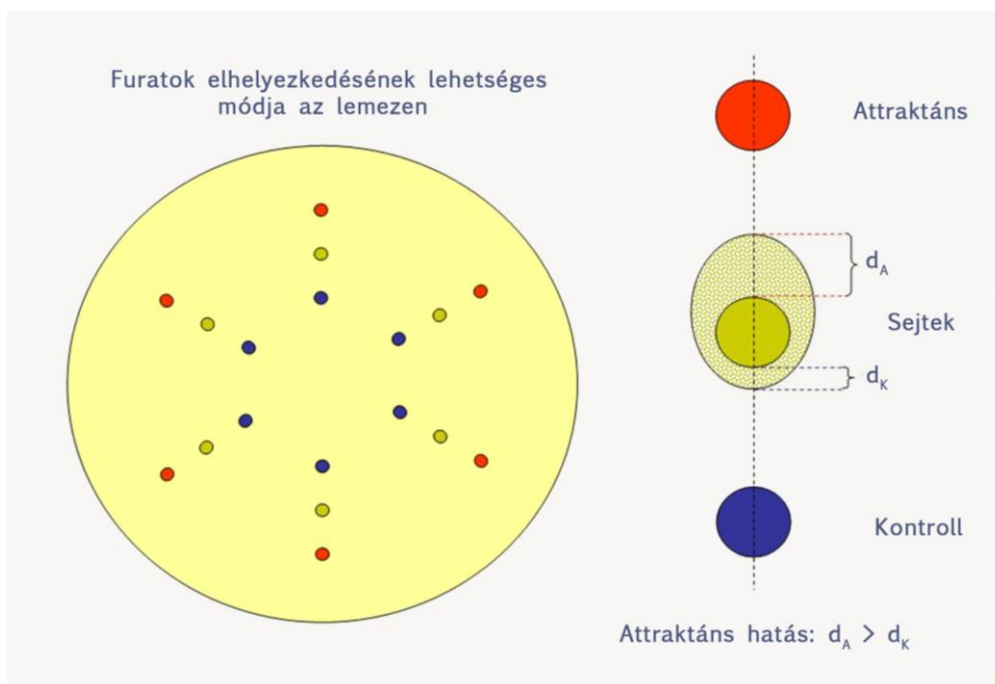
A szakirodalom által leghosszabban fennmaradó (kb. 24 óra) koncentráció gradiensű technika a 9.10.

ábrán bemutatott Dunn-kamra. Az ábra a két koncentrikus gyűrűszerű kamrából álló rendszer keresztmetszeti képét mutatja. A sejtek migrációja a fedőlemez alatt, a két kamra közötti gáton történik. Ezen a vékony folyadékfilmen alakul ki az a koncentráció gradiens mely a sejtek folyamatos, vektoriális mozgását képes fenntartani.



9.10. ábra: A Dunn-kamra szerkezeti vázlata és kiértékelésének elve

A sejtek felszínen történő elmozdulásának mérésére az egyik legrégebben alkalmazott technika a 9.11. ábrán bemutatott agar-lemezes eljárás. A módszer csupán egy a számos hasonló, különböző furatokat és csatornákat alkalmazó kemotaxis assay közül. Az agarlemeztes technika esetében egy olyan sejtes assay-ről van szó, melynek alapelve visszavezethető az immunológiában alkalmazott hasonló technikákra, ahol ellenanyag – antitest interakciók bemutatását és mérését végzik hasonló rendszerekben. A módszer kvalitatív jellege mellett a dA és dK távolságok mérésével kvantitatívva is tehető.

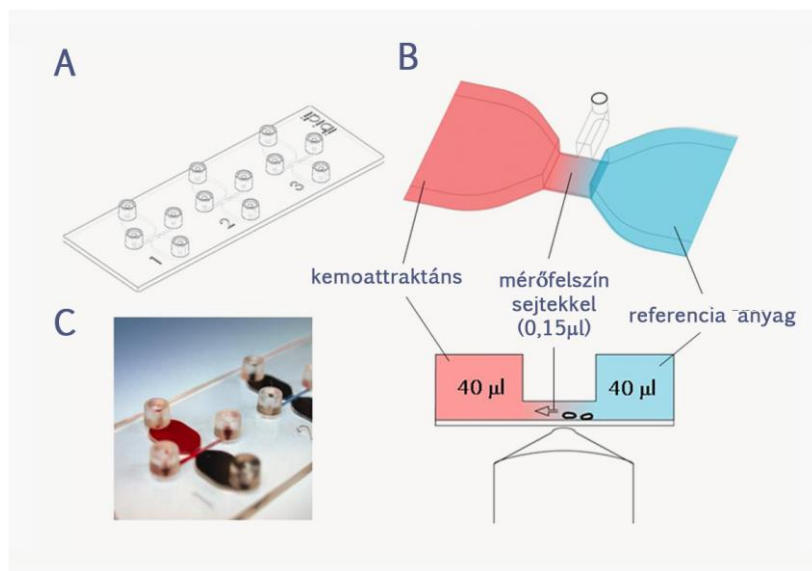


9.11. ábra: Sejtmigráció mérése 3-furatú, agar-lemezes technikával

A szabad folyadéktérben csillók vagy ostorok segítségével elmozduló sejtek migrációját igen gyakran mérik az ú.n. kapilláris technikák valamelyikével. Ezek esetében olyan vertikálisan elrendezett kétkamrájú vizsgálatokról van szó, melyeknél általában az alsó kamrában helyezkednek el a vizsgálni kívánt sejtek, míg ezek felett, a sejtes fázissal érintkező kapillárisban található a vizsgálandó anyag. A vizsgált anyag vonzó vagy taszító hatását a sejtekre a kapillárisban található sejtek számának

meghatározásával állapítják meg. A módszer pontossága nagyban növelhető mikroliteres pontosságú folyadéktartókat biztosító mikropipettákkal, melyek a rendszer kapillárisaiként alkalmazhatók.

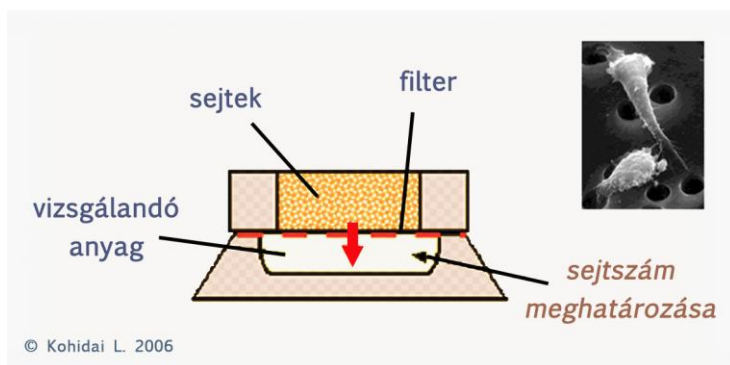
A reverzibilis rendszerek esetében egyre gyakrabban találkozunk gyári kiserelésekkel, melyek pontossága biztosítja a mérés eredményességét. Ilyen az utóbbi évek során megjelent két lemez is (ibidi GmbH, Németország), melyek a felszínhez kötöttek, illetve a szabad folyadéktérben migráló sejtek esetében is jól alkalmazhatók (9.12. ábra). A módszer lényege egy olyan csatorna és kamrarendszer kialakítása volt, melynek speciális fedőlemeze lehetővé teszi a sejtek gázcseréjét, s így zárt térben, de fiziológiás körülmények között vizsgálódhatunk. A sejtek egy csatorna feltöltése révén kerülnek a rendszerbe, míg annak két oldalán más-más karakterű anyagokkal telíthető terek helyezkednek el. Így a sejtek mozgását a vizsgálandó anyagok befolyásolják és 12-24 órás inkubációk során a csatorna két oldalán már jelentős sejtszámbeli eltérések alakulnak ki, melyet egyszerű sejtszámlálással, video-mikroszkopizálással és számítógépes sejtkövető eljárásokkal egyaránt kiértékelhetjük.



9.12. ábra: ibidi kemotaxis kamra szerkezete (A) és működésének elve (B, C)

9.7.2. Irreverzibilis rendszerek

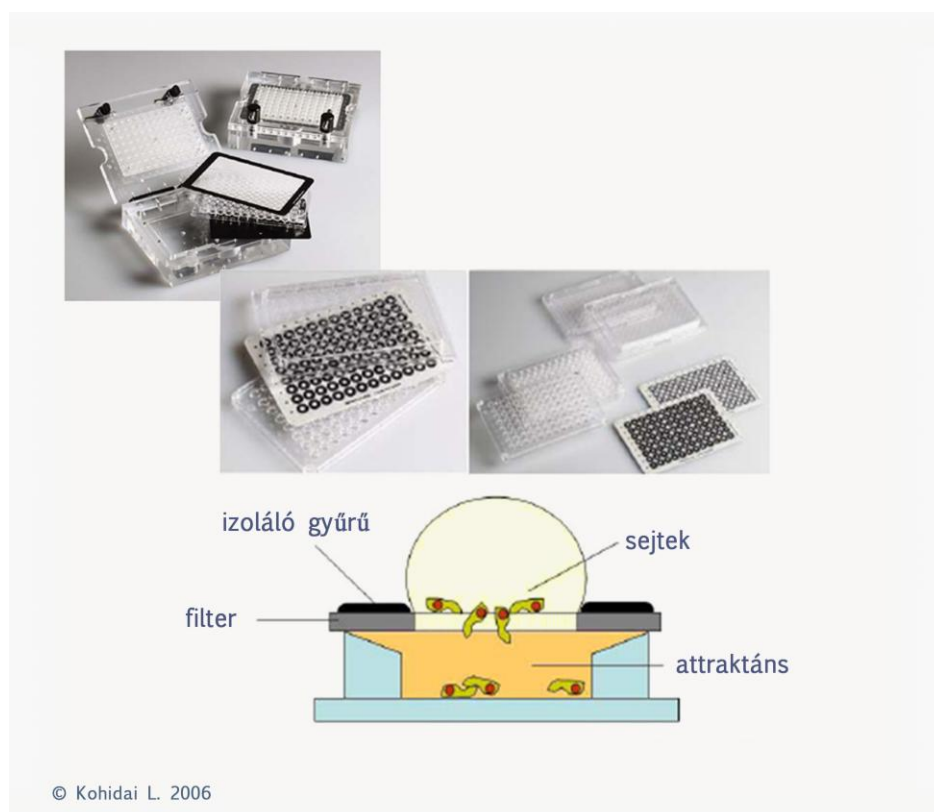
A Boyden-kamra (9.13. ábra) talán a legszélesebb körben alkalmazott kemotaxist mérő technika, melyet 1962-ben írt le Stephen Boyden. Elve egy két-kamrás rendszer, melyet a vizsgálandó sejtek számára csak aktív mozgással átjárható filter választ el. A sejtek a felső kamrában helyezkednek el, míg a vizsgált anyagot az alsó kamrába tesszük. Kellő inkubációs idő megválasztása esetén a sejtek a filter pórusaiban kialakuló koncentráció gradiens mentén az alsó kamrába vándorolnak. A kamra nem csak egyedi, de akár 96-kamrás lemezhez kapcsolódó kivitelben, ú.n. multiwell rendszerben is jól működik, s ezáltal lehetőséget ad a migrációs kísérletek során mindig megkövetelt nagyszámú párhuzamos vizsgálat elvégzésére. A sejtek migrációs választ egyszerű sejtszámlálással, egyes sejtekre specifikus enzimek kimutatásával (ld. MTT) vagy a sejtekben kimutatható ATP meghatározásával értékelhetjük ki. A módszer hátránya, hogy egy kamra csak egyetlen mérési pontnak felel meg, így megbízható eredményt csak sok kamra együttes alkalmazásakor kapunk.



9.13. ábra: A Boyden-kamra szerkezete és működésének elve – a jobb oldali képen filter pórusain migráló sejtek képével

A fentiekben bemutatott Boyden kamra hátrányait igyekezett kiküszöbölni a ú.n. transwell assay, melyben egyszerre 6-12-24-96 mérés is elvégezhető. Alapelve hasonló, itt is filter választ el egy sejtekkel telt felső és egy a vizsgáló anyaggal töltött alsó teret. A kiértékelés vagy az alsó térből, vagy magából az elválasztó filterből történik, az ebbe migrált sejtek ugyanis jól megfesthetők és ez a réteg, mint egy vastag szöveti metszet értékelhető ki. Hátránya a Boyden kamrával szemben, hogy igen nehéz a sejteket tartalmazó tér és a külső tér közötti folyadéknívó pontos beállítása. Szemmel alig vagy nem is látható eltérések olyan nem kívánt, átmeneti folyadékáramlásokat okozhatnak, melyek szennyezhetik a sejtes teret a vizsgált anyaggal, illetve megnehezítik a gradiens kialakulását.

A legújabban kifejlesztett Chemo Tx módszer (NeuroProbe, USA) egyesíti a Boyden kamra és a transwell rendszerek előnyös tulajdonságait (9.14. ábra). A légmentesen lezárt tér kiküszöböli a folyadékok közötti nem kívánt áramlásokat. A huzamosabb ideig használható kamra változat (ld. bal felső kép) mellett 2008 óta hozzáférhető az egyszer használatos változat is. A kiértékelés módja hasonló a Boyden-kamránál leírtakhoz.



9.14. ábra: Multiwell kemotaxis assay és Chemo Tx technika

9.7.3. In vivo technikák

Egész állat kísérletek során gyakran alkalmazzák a tumoros szövetből előállított ECM koncentrátumot, a Matrigelt, mint a migráló sejtek mozgásának útvonalat adó, a sejteket művi szövetként befogadó hálózatot. Ezt az anyagot használják az ún. korong-assay-k, melyekben filterekkel lezárt és Matrigellel és vizsgálati anyaggal töltött korongot implantálunk a kísérleti állatba. Több nap elteltével a korong kivétele után az abba migrált sejtek száma, illetve az egyes sejtpopulációk aránya is meghatározható. Az 9.1. táblázat a Matrigel ECM keverék felhasználhatósági korlátaira utal. Mint jól látható, ez számos növekedési faktort a biológiai hatások kiváltásához képest jelentős koncentrációban tartalmaz, s ez egyes vizsgálatok esetében kifejezetten hátrányos is lehet. Ennek felismerése vezetett a redukált mennyiségű növekedési faktorokat tartalmazó Matrigel-ek bevezetéséhez (GFR = growth factor reduced), bár mint látható ebben az esetben sem tekinthetők teljesen növekedési faktoroktól mentesnek a preparátumok, s ez érthető is, hiszen ezek adják a Matrigel nagy kemoattraktáns jellegét és biztosítják a bevándorolt sejtek esetében pl. az érképződés indukciójának humorális elemeit.

Növekedési faktor	Koncentráció Matrigel-ben	Koncentráció GFR Matrigel-ben
EGF	0.5-1.3 ng/ml	< 0.5 ng/ml
bFGF	< 0.1-0.2 pg/ml	n.d.
NGF	< 0.2 ng/ml	< 0.2 ng/ml
PDGF	5-48 pg/ml	< 5 pg/ml
IGF-1	11-24 ng/ml	5 ng/ml
TGF- β	1.7-4.7 ng/ml	1.7 ng/ml

GFR – növekedési faktor szint csökkentett; n.d. – nem detektálható

9.1. táblázat: Matrigel preparátumok növekedési faktor tartalma

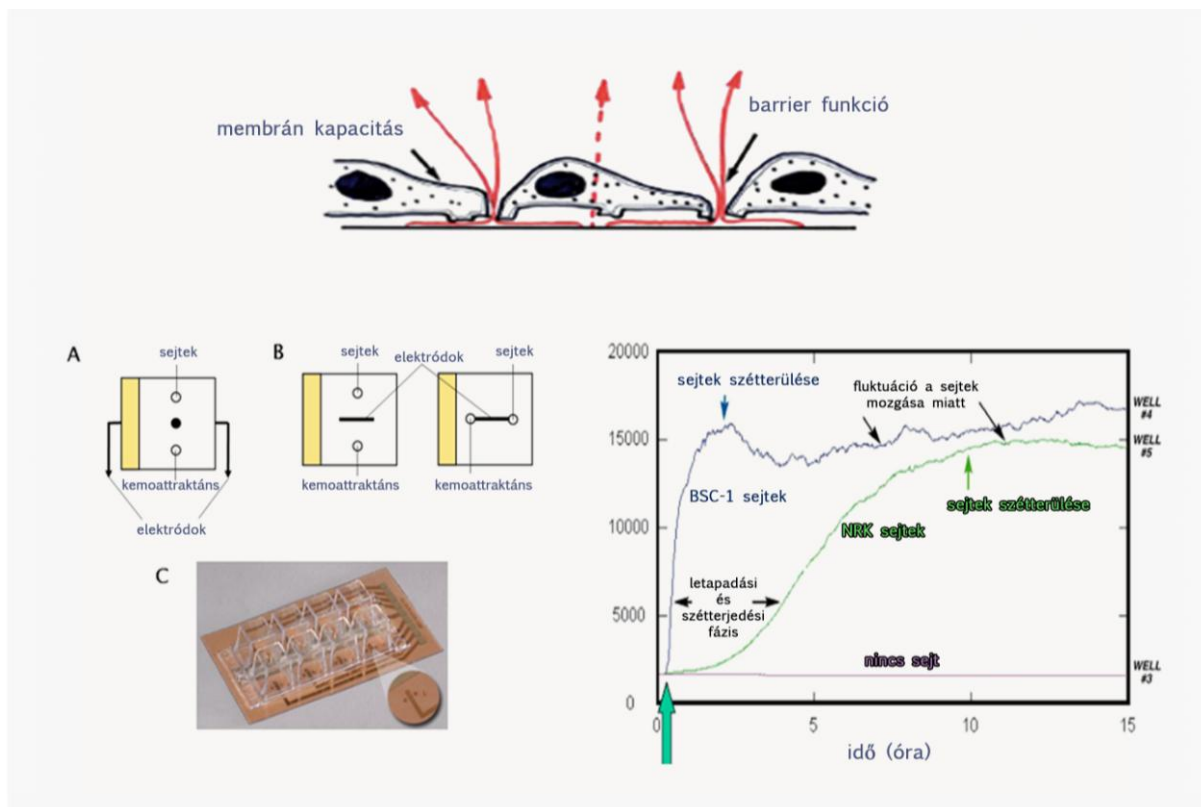
Az in vivo assay-k közé tartozik egy másik igen ötletes módszer is, mely Sephadex gyöngyöket juttat a kísérleti állat intraperitoneális terébe. A hashártya két lemeze közti térben e gyöngyök erős sejtmigrációt indukáló hatásuknál fogva sejtszorulatot idéznek elő. Amennyiben a Sephadex gyöngyök felszínéhez különböző anyagokat kötünk, az anyagok kemotaxis kiváltó hatása is elemezhető. A kiértékelés 6-48h elteltével a hasúri folyadék leszívásával történik. Ennek sejtszáma és sejtpopulációi jól vizsgálhatók.

A technikák e csoportjában tárgyaljuk a kemotaxis vizsgálatok egyébként külön fejezetét jelentő sebgyógyulási vagy 'wound healing' assay-eket. Ezekben leggyakrabban háms sejtekből kialakított konfluens rétegek „sértését” követően azt vizsgálják, hogy milyen gyorsan közeledik egymás felé a két sebzési felszín. A módszer kezdetleges és igen bizonytalanul kivitelezhető eljárása volt az, amikor pipették műanyag csúcsait alkalmazták a „seb” elkészítésére. Ennél lényegesen megbízhatóbb technikát dolgoztak ki olyan 24-48-96 tűvel ellátott platform kialakításával, mely egy jól kontrollált nyomás mellett elmozdulva egyszerre sérti akár 96 kamra alján a kialakított hámfelszíneket. A high throughput screening (HTS) technikák előtérbe kerülése a kétkamrás assay-khez hasonlóan itt is

megfigyelhető, mivel megfelelő erősségű áram rövid ideig alkalmazott impulzusa szintén képes sejtrégeken „sebeket” ejteni, ezek kiértékelésére az impedancia alapú mérések (ld. alább) alkalmazhatók.

9.7.4. Legújabb technikák

Az impedancia alapú mérések az Ivar Giaver Nobel-díjas fizikus által bevezetett módszerhez köthetők, mely a kemotaxis bevezető szakaszának számító sejtadhézió és maga a migráció vizsgálatára is egyaránt alkalmas. Alapelve szerint, váltakozó áramú áramkörbe kapcsolt mérő elektród esetében az annak felszínén kitapadó sejtek (mint jó szigetelő anyagok) fokozódó ohmikus ellenállást (R) és impedancia (Z) értéket eredményeznek. Ennek alapján jól mérhetővé válik egyes sejtek adhéziós képessége és annak indukálhatósága vagy gátlása is. A módszer a kitapadt sejtek esetében képes arra is, hogy az ellenállás értékeinek finom fluktuációját kövesse. Ennek háttérében a sejtek mikromozgásai (micromotion) állnak. A módszer egyik fő értéke még, hogy az egyes folyamatok valós idejű mérésben (real-time) követhetők akár több napon át is (9.15. ábra).



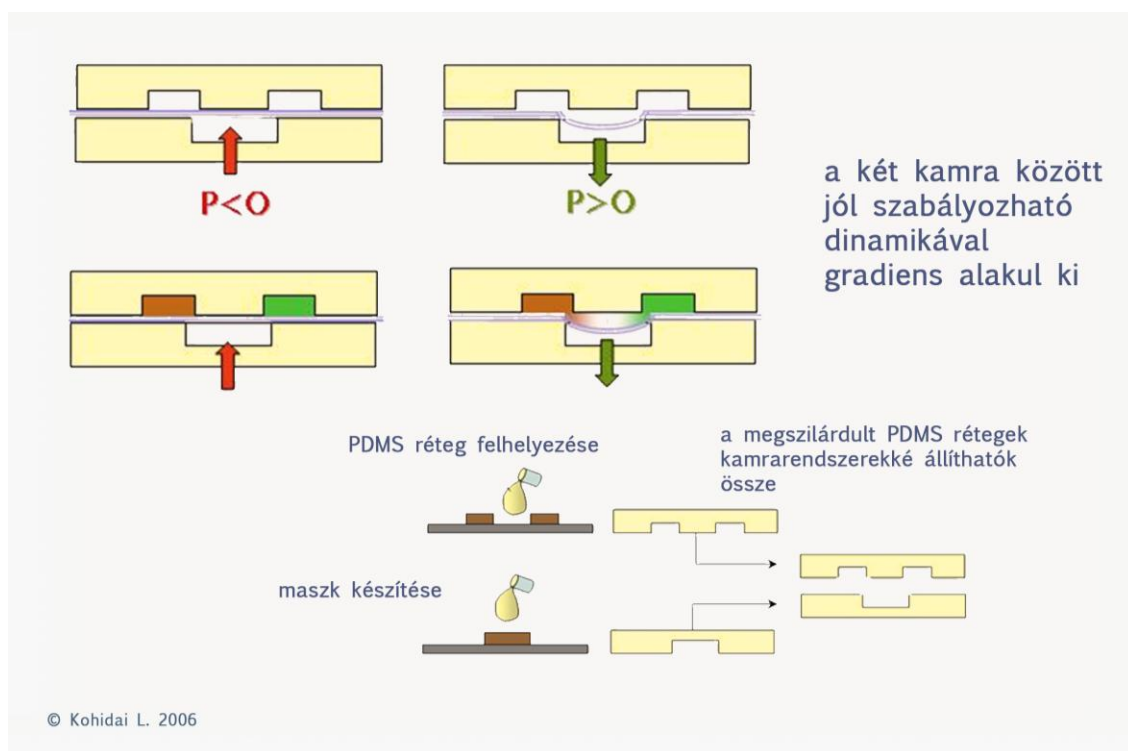
9.15. ábra: ECIS technika elvi alapjainak bemutatása. A módszer különbséget tesz az elektróda fedettség (sejtszám) és sejt-sejt kapcsolatok (barrier funkció) szempontjából is (felső panel); a mérések kis felületű mérő elektród felszínén történnek 8-16-96 kamrában (bal oldalt, alul); a technika segítségével jól elkülöníthetők a sejtek kitapadási dinamikájának eltérései és a kitapadást követően a sejtek egyedi mozgásai is (jobb oldalt alul)

A fenti módszer továbbfejlesztésével alakultak ki azok a Boyden kamra elvén működő HTS rendszerek (xCELLigence – Roche), melyekben a két kamrát elválasztó filtert elektródok hálózák be. Így a sejtek migrációjukkor elektromos jelet generálnak és a sok átvándorló sejt egyedi jelének

összege, mint a mért impedancia értékének emelkedése arányos lesz a pozitív választ adó sejtek számával.

Pont-szerű elektródokat alkalmazva a technika képes konfluens sejtrétegeken pontokban a sejtek eltávolítására (ld. sebgyógyulási vizsgálatok). Az ezt követő sejtmigráció, mely a felszabadult felszín irányába történik szintén jól követhető, tehát ezáltal a sebgyógyulási assay eddig legobjektívebb mérési eszközét sikerült kifejleszteni.

A kemotaxis végző sejtek vizsgálatának alapja a folyadéktérben egyenletes gradiensek kialakítása. Ennek a célnak az elérésében segítenek az új technika, a mikrofluidika eszközei, melyek polidimetilsziloxán (PDMS) felhasználásával, előre megtervezett csatornarendszerekben hígítják a vizsgálandó anyagokat. Ugyanez a PDMS technika képi az alapját a „lab-on-chip” rendszereknek is, melyek, mint ahogyan a név is utal erre, komplex laboratóriumi eljárások kivitelezését teszik lehetővé tárgylemez méretű vizsgáló-egységekben. A 9.16. ábrán bemutatott módszer egy olyan PDMS alapú rendszert mutat, melyben horizontális elrendezésben található két kamra, s ezeket egy nyomásviszonyokra érzékeny lemez választja el. A két kamra feltöltését követően, a lemezre gyakorolt szívóerő fokozásával állíthatjuk be az anyagok keveredésének mértékét és ezáltal a gradiens kialakulását. Ezt követően a középső – gradienst tartalmazó - vályúba helyezve a sejteket már jól vizsgálható azok koncentráció-függő migrációja. A 14. ábra alsó része a PDMS technika fő lépéseit is bemutatja, pl. a jelen esetben alkalmazott két profil hogyan önthető ki.

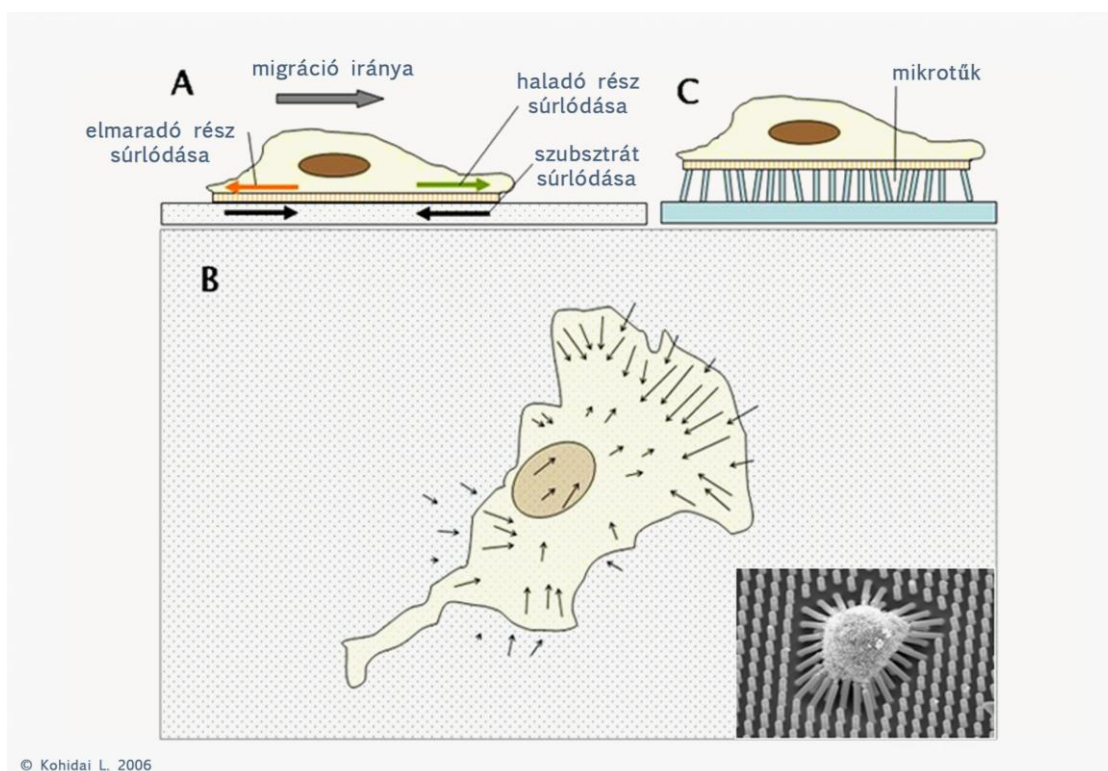


9.16. ábra: A PDMS technika segítségével kialakított kemotaxis karma.
Az egyes profilok kiöntésének menete (alul)

Az ú.n. intravitális mikroszkópia szintén jól alkalmazható migráló sejtek vizsgálatára. A módszer különösen alkalmas élő állat vagy viszonylag nagyobb szervrészlet fixáló és antikoaguláns szerek adása nélküli tanulmányozásakor. Az eljárás lelke maga az extrém gyors záradóval működő kamera,

melynek segítségével kifejezetten a vaszkuláris folyamatok, pl. sejtek érfalhoz történő adhézioja, érfalon keresztüli transzmigráció vizsgálható.

E fejezet végén egy olyan eljárást is bemutatunk, mely ma a mozgó sejtek elmozdulás-vizsgálatára használt egyik legérzékenyebb technika, a traction force microscopy (TFM) (9.17. ábra). Elvi alapját az amőboid mozgással migráló sejt és a kitapadási felszín között képződő erők képezik, tehát az, hogy a sejt a fokális kontaktusok révén az egyes kitapadási helyeken a mozgás során erőt fejt ki az alatta lévő rétegre. Az erők a mozgási felszínt borító mikrotűk sokaságával válnak mérhetővé – azok meghajlásának iránya az elmozdulás negatív vektorát, az elhajlás mértéke a kifejtett erő nagyságát mutatja. Utóbbi nagysága emberi fehérvérsejtek esetében a nN-os (nano Newton) skálán mozog.



9.17. ábra: A traction force microscopy alkalmazásakor a sejtmozgás során keletkező erők bemutatása (A); ezen erők jelentkezése egy sejt elmozdulásakor (B); a mérés alapjául szolgáló mikrotűk és a mozgó sejt kapcsolatának bemutatása (C)

9.7.5. Egyéb migrációvizsgálathoz kapcsolódó eljárás

A mozgó sejtek vizsgálata természetesen nem csupán magának a mozgásnak a vizsgálatát jelenti, hanem a receptorok és ligandumok molekuláris szintű kimutatását, illetve az azokért felelős gének expresszáldásának RNS szintű elemzését is. A módszer alapja, hogy a keresett RNS-t először antiszenz, jelölt párjával hibridizáljuk, majd olyan RN-ázt alkalmazunk, mely csak az egyszálú RNS-eket emészt. Az így kapott kétszálú, és jelölt molekulák jól elkülöníthetők a minta többi emésztetlen elemétől. A módszert alkalmazva számos kit-et állítottak össze, így piaci forgalomban van kemokinek és receptoraik mRNS-eit kimutató RPA-kit is.

9.8. Kérdések – Feladatok

Válaszoljon az alábbi kérdésekre!

- 1) Az emberi szervezet sejtjei a migráció milyen formáit képesek kialakítani?
- 2) Melyek tekinthetők az emberi szervezetben ható legjellemzőbb migrációt kiváltó molekula-csoportoknak?
- 3) Miben térnek el egymástól az egyes kemokin-csoportok?
- 4) Milyen szignalizációs mechanizmus jellemző a kemokin-receptorokra?
- 5) Mit nevezünk kollektív migrációnak?
- 6) A dendritikus sejtek nyirokcsomón belüli vándorlását milyen receptor-ligandum kölcsönhatások szabályozzák?
- 7) Mely migrációt vizsgáló technikák esetében adott a HTS kiértékelés lehetősége?
- 8) Vannak-e bakteriális peptidek érzékelésére alkalmas kemotaxis-receptorok az emberi szervezetben?
- 9) Mi az elvi alapja az ECIS technikának?
- 10) Mondjon egy példát a lab-on-chip alapú migrációmérésre!

Irodalom

- Alvarez D, Vollmann EH, von Andrian UH. Mechanisms and consequences of dendritic cell migration. *Immunity*. 2008 Sep 19;29(3): 325-42.
- Boyden S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *The Journal of Experimental Medicine* 1962 Mar 1;115: 453-66.
- Chu Y, Dietert RR. The chicken macrophage response to carbohydrate-based irritants: temporal changes in peritoneal cell populations. *Developmental and Comparative Immunology* 1968 Winter; 12(1): 109-19.
- Dembo M, YL Wang. Stresses at the cell-to-substrate interface during locomotion of fibroblasts. *Biophysical Journal* 1999 Apr; 76(4): 2307-16.
- Frevert CV, Wong VA, Goodman RB, Goodwin R, Martin TR. Rapid fluorescence-based measurement of neutrophil migration in vitro. *Journal of Immunological Methods* 1998 Apr 1;213(1): 41–52.
- Hadjout N, Xinyun Y, Knecht D, Lynes M. Automated real-time measurements of leukocyte chemotaxis. *Journal of Immunological Methods* 2007 Mar 30;320(1-2): 70-80.
- Kőhidai L, Lemberkovits É, Csaba G. Molecule dependent chemotactic responses of *Tetrahymena pyriformis* elicited by volatile oils. *Acta Protozoologica* 1995;34: 181-5.
- Kragh M, Hjarnaa P-JV, Bramm E, Kristjansen PEG, Rygaard J, Binderup L. In vivo chamber angiogenesis assay: an optimized Matrigel plug assay for fast assessment of anti-angiogenic activity. *International Journal of Oncology* 2003 Feb;22(2): 305-11.
- Leick V, Helle J. A quantitative assay for ciliate chemotaxis. *Analytical Biochemistry* 1983 Dec;135(2): 466-9.

- Neils CM, Tyree Z, Finlayson B, Folch A. Combinatorial Mixing of Microfluidic Streams. *Lab on a Chip* 2004 Aug; 4(4): 342-50.
- Nelson RD, Quie PG, Simmons RL. Chemotaxis under agarose: a new and simple method for measuring chemotaxis and spontaneous migration of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *Journal of Immunology* 1975 Dec;115(6): 1650-56.
- O'Hayre M, Salanga CL, Handel TM, Allen SJ. Chemokines and cancer: migration, intracellular signalling and intercellular communication in the microenvironment. *The Biochemical Journal* 2008 Feb 1;409(3): 635-49.
- Pals ST, de Gorter DJJ, Spaargaren M. Lymphoma dissemination: the other face of lymphocyte homing. *Blood* 2007 Nov 1;110(9): 3102-11.
- Repesh LA. A new in vitro assay for quantitating tumor cell invasion. *Invasion & Metastasis*. 1989;9(3): 192-208.
- Yarrow JC, Perlman ZE, Westwood NJ, Mitchison TJ. A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods. *BMC Biotechnology* 2004 Sep 9;4: 21.
- Zantl R, Rädler U, Horn E. Chemotaxis in μ -channels. *Imaging and Microscopy* 2006 Mar; 8(1): 30-2.
- Zicha D, Dunn GA, Brown AF. A new direct-viewing chemotaxis chamber. *Journal of Cell Science* 1991 Aug;99 (Pt 4): 769-75.
- Zinn K, DiMaio D, Maniatis T. Identification of two distinct regulatory regions adjacent to the human beta-interferon gene. *Cell*. 1983 Oct;34(3): 865-79.

<http://dendritic-cells-research.com/Dendritic%20Cells.html>

10. AUTOANTITESTEK VIZSGÁLÓ MÓDSZEREI, HLA TIPIZÁLÁS

(NAGY GYÖRGY, PÁL ZSUZSANNA)

10.1. Autoantitestek és azok vizsgáló eljárásai

10.1.1. Az autoantitestek keletkezése, jellemzői

A B-sejtek antitest diverzifikációs képessége hatékonyan véd a bennünket támadó számtalan patogénnel szemben. A B-sejt aktiváció folyamán az antitestek egyrészt egyre jobban tudják kötni az antigéneket a szomatikus hipermutáció révén, másrészt az izotípusváltás során keletkező IgG, IgA és IgE molekulák más-más effektor funkciókat kölcsönöznek a képződött antitesteknek. Ám a patogénnel szembeni hatékonyabb védelem veszélyeket is rejt magában, mivel a fenti diverzifikációs mechanizmusok révén az autoantitestek létrejöttét is maga után vonja.

Autoantitestek mindannyiunkban vannak. Azonban az emberek csupán 5%-ában alakul ki autoimmun megbetegedés. Ezek létrejötte ugyanis egy többtényezős folyamat, genetikai, környezeti, hormonális, és epigenetikai tényezők vesznek részt a betegségek kialakulásában. Az autoantitesteket két nagy csoportra oszthatjuk: természetes és patológiás autoantitestek. A természetes autoantitestek B1 sejtek (CD5+ és CD5-) által termelt polireaktív antitestek, melyek nagy mennyiségben fordulnak elő az emberi szérumban és vitális, konzervált fehérjék ellen termelődnek. A saját struktúrák védelmét szolgálják, az immunológiai homunculus felépítésében vesznek részt, továbbá elsődleges védelmi vonalat képeznek egyes patogének ellen. Általában IgM és IgA típusúak és nem, vagy csak korlátozott mértékben esnek át szomatikus hipermutáción. A B-1a sejtek az embrionális májból a peritoneális és pleura üregekbe kerülnek, itt a B-1a sejtek csak az elhalt sejtek pótlására, limitáltan osztódnak és folyamatos az antitest termelés.

A patológiás autoantitesteket a B2 sejtek termelik. Több bizonyíték is van arra, hogy ezek az antitestek lokálisan termelődnek. Rheumatoid arthritisben pl. a synoviális membránban, myasthenia gravisban a thymusban lehetnek ektópiás germinális centrumok. Sclerosis multiplex esetében intratecalisan IgG termelést lehet kimutatni gerincvízből. A patológiás autoantitestek nagy affinitásúak, IgG, IgA és IgM típusúak lehetnek, szintén magas koncentrációt érhetnek el a szérumban. Mivel képződésük és a célszerv károsodása között latencia telik el, illetve az általuk előidézett szervkárosodáshoz a szervet alkotó sejtek egy jelentős részének már el kell pusztulnia, hogy a funkciócsökkenés észrevehető legyen (pl. I. típusú diabetes mellitusban pancreas a β -sejtjei ellen termelődött antitestek esetén), így a szérumban korábban kimutathatóak lehetnek, mint ahogy az autoimmun betegség manifesztálódna. A patológiás autoantitestek kimutatásának előrejelző, prognosztikai szerepe lehet, de segíthet a kimutatásuk a betegség diagnosztizálásában, lefolyásának megítélésében, valamint a terápia hatékonyságának lemérésében is.

Az autoantitestek több lehetséges mechanizmus által jöhetnek létre. A fertőzések többféle módon is indukálhatják a képződésüket pl.

1. molekuláris mimikri által. Ilyen a *Campylobacter jejuni* fertőzést követően kialakuló polyneuropathia, a Guillane-Barre szindróma.
2. A fertőzések indukálhatják az MHCII fokozott expresszióját is, vagy a ko-stimuláló molekulák kifejeződését, melyek által az addig küszöb alatti antigén inger fokozódik, amely az addig nem reagáló Th sejteket aktiválja.
3. Egyes ágensek, pl. az Epstein-Barr vírus a B-sejtek polyclonalis aktivációját idézi elő, vagy a szuperantigének polyclonális T-sejt aktivációt okozhatnak.

Az antigén processzálas illetve prezentálás kóros volta is vezethet autoimmun kórképek kialakulásához pl. Bechterew-kór (lásd később). A myasthenia gravis a neuromuszkuláris junkció egy autoimmun betegsége, melyben a harántcsíkolt izom különböző komponensei ellen termelődnek ellenanyagok, ezek a neuromuszkuláris transzmissziót akadályozásával idézik elő a betegségre jellemző kóros izomgyengeséget. Ebben a betegségben a thymus szerepe kitüntetett. A fiatal betegek nagy részének thymus hyperplasiája van, az össz beteg populáció 8-10%-a thymomában szenved. A thymus hyperplasiás betegekben a nikotinerg AChR ellen történik szenzitizáció. A thymomás betegekben a thymusban zajló szelekciós mechanizmusok sérülnek és autoreaktív T-sejtek kerülnek ki a perifériára. A thymusbeli fejlődés károsodását egyetlen génhiba is előidézheti: az AIRE gén mutációja recesszív formában az APECED (autoimmun polyendocrinopathia, candidiasis, ectodermalis dysplasia) szindrómát okozza. Az apoptotikus sejtek elégtelen eltávolítása intracelluláris antigének felszabadulásával járhat, s pl. systemas lupus erythematosusban (SLE) anti-dsDNS antitestek képződéséhez vezethet. Szintén SLE-hez vezethetnek egyes gyógyszerek, pl. procainamid vagy hydralasin használata, melyek DNS metilázok kifejeződésének megváltoztatása által, a DNS metilációt befolyásolják, s így epigenetikai úton, egyes, a betegség patomechanizmusában résztvevő gének kifejeződését befolyásolják. A szekvesztrált antigének kiszabadulása is vezethet autoimmunitáshoz pl. sympathiás opthalmopathia.

Ugyanígy, a regulátoros T-sejtek helytelen működése is elősegítheti az autoimmun kórképek kialakulását. A jellegzetesen Treg-ekben expresszáldó Foxp3 génjének mutációja pl. autoimmun betegségek tünetegyütteséhez az IPEX (immundiszreguláció, polyendocrinopatia, enteropathia X-hez kötött) szindrómához vezet. Érdekes módon a B-sejtek antitest diverzifikálásában kulcsfontosságú molekulájának a AID-nak a mutációja nemcsak hyperIgM szindrómát okoz. AID gén kiütött egerekben az autoimmun betegségek kifejlődése is gyakoribb.

Az apoptozist elszenvedő sejtől több anyag kiszabadulhat, pl. coiled-coil konformációt tartalmazó fehérje struktúrák, melyek immunreakciót válthatnak ki. Az autoantitest termelődését kiváltó molekulák az idegen antigénhez hasonló módon működhetnek valószínűleg az éretlen dendritikus sejtek aktiválásán keresztül. Két autoantigén, a hisztidil-transzfer RNS szintetáz (ábrán His-RS) és az aszparaginil-transzfer RNS szintetáz (Asn-RS) a CC-kemokin receptor 5-ön illetve 3-on keresztül hatnak az éretlen dendritikus sejtekre, mely azok érését serkentheti feltehetően más citokinek és kemokinek közreműködésével. Az érett dendritikus sejtek mind T-sejt dependens, mind T-sejt

independens módon elősegítik az autoantitestek termelődését. (BAFF: B-cell activating factor, APRIL: a proliferation-inducing ligand)

10.1.2. Autoimmun betegségek jellemzői

Az autoimmun betegségek lehetnek szisztémásak és szerv specifikusak. Szisztémás autoimmun betegségek közül leggyakrabban fordulnak elő a Sjögren syndroma, a rheumatoid arthritis, illetve az SLE. A szerv specifikus autoimmun betegségek általában egy szervet károsítanak, pl a thyreoid stimuláló hormon receptor ellenes (anti-TSHR) antitestek a pajzsmirigyet, vagy például a nikotinerg acetil-kolin receptor (AChR) ellenes antitestek az izmot. A fenti két autoantitest példa arra is, hogy milyen mechanizmus által befolyásolhatják antitestek a szervek működését: míg az anti-TSH antitest stimulálja a TSH receptorokat ezzel autoimmun thyreoiditist hozva létre, addig az AChR ellenes antitestek gátolják az ACh receptorokon keresztül a jelátvitelt, ezzel gátolva a neuromuszkuláris transzmissziót. Függetlenül attól, hogy milyen izotípusúak a termelt autoantitestek, a károsítás mechanizmusa is más lehet. Az AChR ellenes antitestek IgG1 illetve IgG3 típusúak, melyek komplement aktiválásra képesek, de részt vehetnek az ADCC indukciójában és elősegítik a receptorok sejtekbe történő internalizációját is. A myasthenia gravis egy másik altípusában egy másik izom komponens, a muscle-specific kinase (MuSK) ellenes antitestek a jellemzőek, melyek az IgG4 osztályba tartoznak és egy posztranszlációs módosulás következtében nem aktiválnak komplementet. Itt a károsodás valószínűleg a MuSK fokozottabb lebomlására vezethető vissza.

Szisztémás autoimmun betegségben számos autoantitest lehet jelen, de autoantitestek fertőzésekben is létrejöhetnek, melyek a későbbiekben nem okoznak autoimmun betegséget.

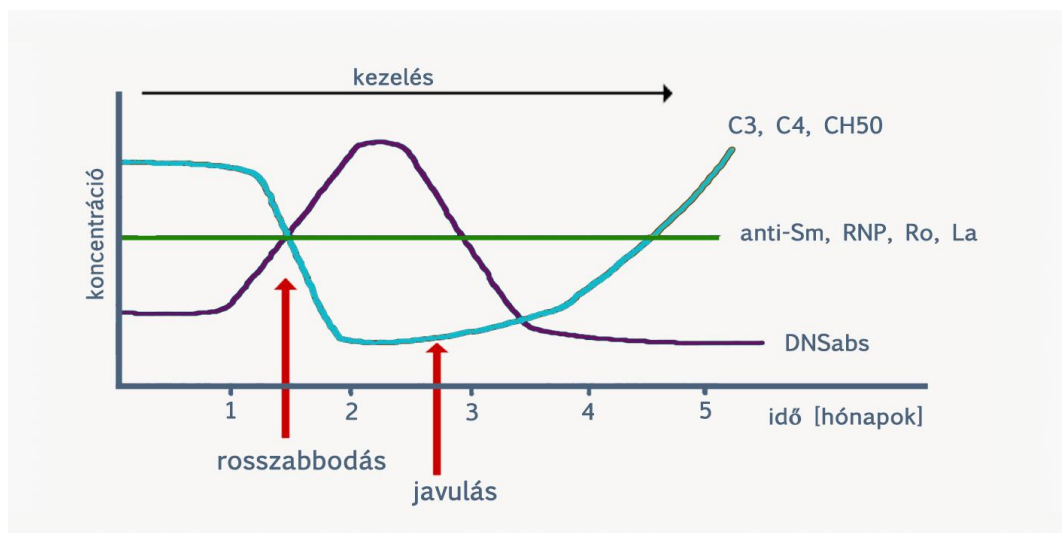
Amennyiben autoimmun betegségre van gyanú, a klinikai gyakorlatban az egyes betegségekben leggyakrabban előforduló autoantitestek meghatározását lehet kérni. Azonban az autoantitestek jelenléte nem feltétlenül specifikus egy autoimmun betegségre, a lelet pozitivitása mindig együtt értékelendő a klinikummal, minthogy ezt később látni fogjuk

Példaként a következőkben 2 szisztémás (SLE és RA) autoimmun betegségen keresztül mutatjuk be a különböző autoantitest kimutató eljárásokat, a szervspecifikus betegségeket megemlítyük, és kiemelten foglalkozunk a myasthenia gravis-szal.

10.1.2.1. A systemas lupus erythematosus (SLE)

Az SLE főként fiatal, 20 és 50 év közötti nők betegsége. Bár az autoimmun betegségek nagyrésze általában gyakrabban érintenek nőket, ebben az autoimmun betegségben a legmarkánsabb ez a jellegzetesség, ugyanis a nő: férfi arány 9:1. A prevalencia nőkben 1: 800-1000, de számuk emelkedik. Az SLE az immunkomplex betegségek prototípusa. Szervi érintettségtől függően változatos tünetek jelentkezhetnek pl. arthritis, pleura gyulladás és vizenyő, szívritmus zavar, láz, fáradékonyság, gyengeség, pillangó -arcpír, nephritis, vérszegénység, Raynaud fenomén, idegrendszeri tünetek, pl. vasculitis (ér gyulladás). Számos autoantitest termelődhet: pl. antinukleáris antitest (ANA), reumatoid faktor (RF), anti-C1q (komplement), vörösvértest ellenes antitest, kettős szálú DNS ellenes antitest (anti-ds-DNS) (10.1. ábra), valamint gyakori a cryoglobulinok jelenléte,

melyek immunoglobulinokból álló komplexek, melyek alacsony hőmérsékleten kicsapódnak a szérumból.



10.1. ábra: Laboratóriumi markerek az SLE lefolyásának megítélésére

10.1.2.2. Az ANA

Az ANA (antinukleáris antitest, régen ANF, azaz antinukleáris faktor) olyan antitestek gyűjtőneve, melyek a sejtmag különböző komponensei ellen irányulnak. Ezek az SLE-n túl számos más autoimmun és fertőzőes betegségben is megjelenhetnek. SLE-re jellemző lehet pl. anti-kromatin, anti-dsDNS (azaz kettősszalú DNS ellenes antitest), anti-hisztin, anti-Sm (=anti-Smith, snRNP fehérjék ellen). Systemás sclerosis (SSc) a bőr és egyes belső szervek sclerosisával járó szisztémás autoimmun kórkép, jellemző a betegségre az anti-Scl-70 (topoizomeráz 1 ellen) és az anti-centomer antitestek jelenléte. Szemszárazság és szájszárazság jellemző a Sjögren szindrómára, a betegségben gyakran találkozunk SS-A és SS-B antitestekkel. Ritka szisztémás autoimmun betegség a polymyositis, mely izomláz szerű fájdalommal, magas kreatinin kináz szinttel jár. Polymyositisben a betegek egy részében anti-Jo1 (hisztidin tRNS ligáz) antitestek mérhetőek a szérumból.

A fenti autoantitestek jelenlétét egyfelől indirekt immunfluoreszcenciával (IIF) mutathatjuk ki, illetve később, a különböző antitestek pontos titereit ELISA-val határozzák meg.

A HEP2 (epidermoid carcinoma, larynx, human, HeLa markers) sejtvonalon végzett immunfluoreszcencia az antinukleáris antitestek kimutatására a szűrésre alkalmas, ún. screening tesztek közé tartozik. A hígított vizsgálandó szérumot a sejtekhez adják, majd jelölt anti-humán IgG-vel mutatják ki a bekötött antitesteket. IIF vizsgálatnál meg kell adni a használt szérumhígítást, a festődés mintázatát (nukleoláris, granuláris, homogén, perifériás), illetve meg kell mondani pontosan melyik magkomponens ellen irányul az antitest. 1:40 szérumhígítás alatti pozitivitás normális, de a laborvizsgálat úgy van beállítva, hogy 1:160-as hígítás mellett a populáció 5%-a pozitív eredményt adjon (amennyiben valaki ilyen hígításban pozitív, de klinikai tünetei nincsenek és granuláris festődést látunk, valószínű a reakció álpozitív). Homogén magfestődést ad pl. az anti-dsDNS ellenes antitest SLE-ben, perifériás magfestődés jellemző pl. a hisztin-ellenes antitestek jelenléte esetén (SLE, szisztémás sclerosis), foltos vagy granuláris magfestődést látunk pl. a nukleáris riboproteinek ellen

irányuló antitestek jelenléte esetén (SLE, scleroderma, kevert kötőszöveti betegség, Sjögren), de egészséges emberekben is előfordulhatnak, illetve aspecifikusan, vírusfertőzések után. Nukleoláris magfestődés pl. a topoizomeráz ellenes antitestek jelenlétekor figyelhető meg pl. sclerodermában. IIF-et használhatnak még pl. szervi érintettség (vese vagy bőr) esetén immunkomplex kimutatására az adott szerv biopsziás anyagából.

Amennyiben a szűrővizsgálat pozitív, antigén specifikus vizsgálatokat kell végezni annak felderítésére, hogy az ANA gyűjtőfogalomba tartozó antitest sokaság közül melyik antitest valóban pozitív. Ezt pl. ELISA, immundiffúzió, Western-blot technikákkal határozzuk meg (ezekről már korábban volt szó a jegyzetben).

Az autoantitestek jelenléte nemcsak a diagnózishoz fontos, hanem egyes autoantitestek titerének változása a betegség aktivitásáról, a terápia hatékonyságáról is információt ad. Pl. ha az anti-dsDNA ellenes antitest titer csökken és ezzel együtt a szérum komplement szint emelkedik, akkor a betegség remisszióba kerül, a terápiánk hatékony. Más autoantitestek jelenléte, pl. a kromatin-ellenes antitest gyakrabban fordul elő lupus nephritisben, tehát a veseérintettséget prognosztizálja.

10.1.2.3. A cryoglobulinok és a cryoglobulinok kimutatása

A cryoglobulinok keringő immunoglobulinok, melyek 37 fok alatti hőmérsékleten precipitálódnak, felmelegítve ismét feloldódnak

Fontos megemlíteni, hogy a cryoglobulinok az autoimmunbetegségekre nem specifikusak, malignus haematológiai betegségekből illetve fertőzésekben pl. hepatitis C esetében is jelen lehetnek.

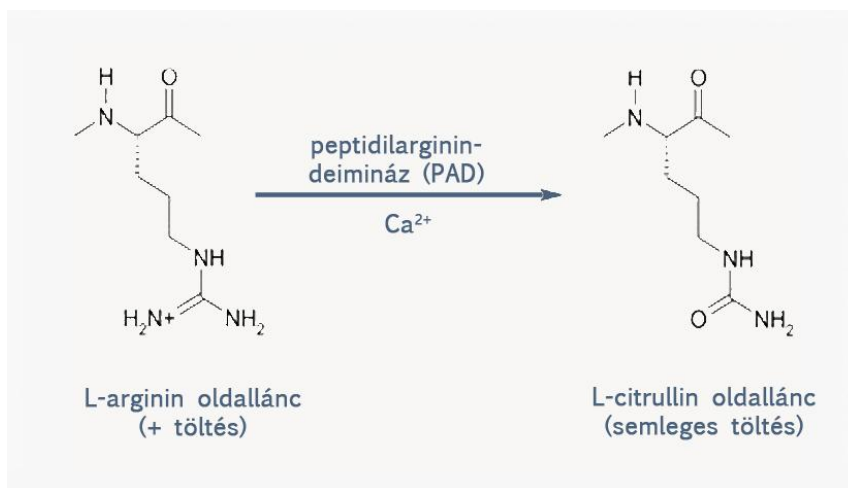
Több alcsoportjuk ismeretes: I. monoclonalis IgG, II polyclonalis IgG és monoclonalis IgM, III polyclonalis IgM rheumafaktor

A cryoglobulinok jelenlétének kimutatása régen körülményes és hosszú időt igénybevevő feladat volt. A vizsgálandó szérumot 37 °C-on szeparálták, majd 2–7 napig 4 °C –os hűtőben tartották. Ha precipitátum képződött, 4 °C-on centrifugálták, a felülúszót eltávolították és fiziológiás só oldattal pótolták. Ha 37 °C-on a precipitátum feloldódott, cryoglobulin volt

Ma már immunoelektroforézis vagy immunfixáció segítségével mutatják ki a jelenlétüket. Ezekkel a módszerekkel a cryoglobulin alosztályát is meg lehet határozni és a vizsgálat hossza is jóval rövidebb. Egyes autoantitestek jelenlétének az SLE-ben prediktív szerepe van, ugyanis a betegség első tüneteinek megjelenése előtt akár évekként is pozitívak lehetnek. Az anti-Ro (=SSA) akár 10 évvel, az anti-dsDNA antitest és az anti-Sm antitest a betegség megjelenése előtt évekként pozitív lehet.

10.1.2.4. Rheumatoid arthritis:

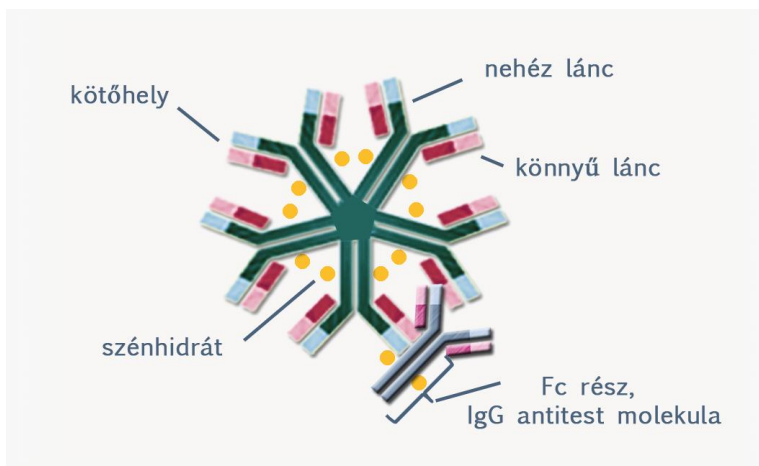
Az ízület destrukciójával járó ízületi és szinoviális membránt érintő autoimmun gyulladás. Az észak-amerikai és európai felnőtt lakosság körében prevalenciája 1:100. A betegség szisztémás, ízületen kívüli (ú.n. extraarticularis) manifesztációi is lehetnek, melyek leggyakrabban a betegségekre jellemző autoantitestekkel rendelkező, ún. szeropozitív betegekben figyelhetők meg. Szisztémás tünetek lehetnek pl. a pericarditis, tüdő fibrosis, száraz szem, polyneuropathia. Gyakori az ANA, RF és anti-ciklikus citrullinált peptid ellenes antitest (anti-CCP) jelenléte (10.2. ábra). Újabban a citrullinált vimentin és citrullinált alfa-enoláz ellen is kimutattak autoantitesteket RA-ban.



10.2. ábra: Citrullináció

A fenti felsorolásból kitűnik, hogy egyre több citrullinált fehérje epitop ellen találnak antitestet RA-ban. A citrullináció egy poszttranszlációs módosulás, citrullin specifikus tRNS nincs, így a polipeptidekbe sem tud citrullin aminosav beépülni. Az argininből keletkezik egy enzimatikus folyamat hatására, melyet a peptidil-arginil-deimináz (PAD) nevű enzim katalizál. Irodalmi adatok szerint citrullinált antigének patogenetikai tényzőként szerepelhetnek RA-ban. Ismert tény, hogy a dohányzás az RA rizikótényezője. Kísérletek kimutatták, hogy a dohányzás a citrullináció mértékét fokozza, ezzel érheti el rizikófokozó hatását.

Az anti-CCP antitest különösen korai RA-ban diagnosztikus értékű, de szintje a betegség aktivitásával nem korrelál. A reuma-faktor (RF) az Ig ellen termelődő antitest (10.3. ábra), az RAS betegek 80%-ában pozitív lehet, de nem specifikus RA-ra, egyéb autoimmun betegségben, illetve különböző fertőzésekben is emelkedett lehet az értéke. Az egészséges felnőttek 10%-ában lehet pozitív. Ha RA-ban az értéke magasabb, destruktívabb kórlefolást prognosztizál. A RF meghatározás módszerei:



10.3. ábra: A reuma-faktor (IgM) és kötődése az autoantigénjéhez (IgG)

1. Latex agglutinációs teszt: A vizsgálandó vérmintát humán antitesteket (IgG) tartalmazó latex gyöngyökkel keverik. Amennyiben RF jelen van a mintában, a gyöngyök agglutinálnak. Ezt a módszert szűrésre használják.
Ehhez hasonló volt a *Rose-Waaler* teszt, ahol nem latex gyöngyöket használnak, hanem birka vörösvértesteket.
2. Nephelometria (a jelenleg gyakrabban használt módszer, szenzitívebb a latex agglutinációnál): A vizsgált vérmintához humán IgG-t adnak. Ha a vérben RF jelen van, akkor

komplexek képződnek, amelyek a nephelométerben a lézerfényt másképp szórják, mintha nincsenek jelen. Minél több az RF és a képződött komplex annál jobban szórják a fényt, amit a készülék detektál.

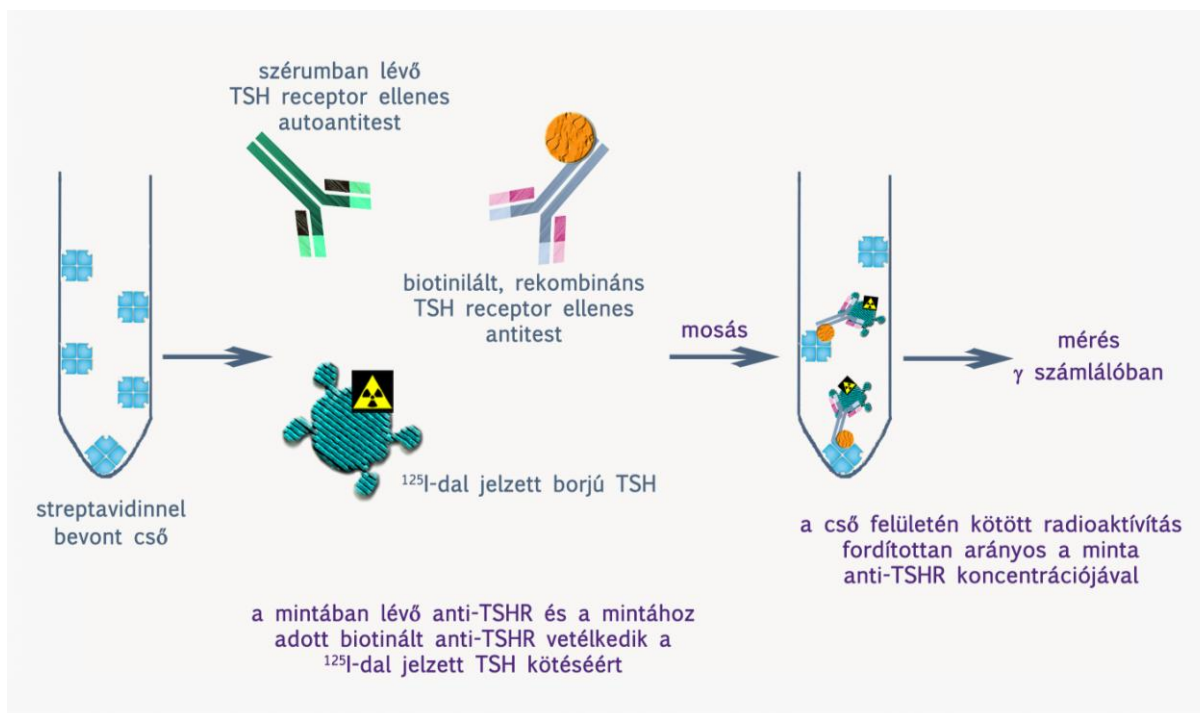
3. ELISA módszer

Az anti-CCP ellenes antitest a betegek 65%-ában fordul elő, de specificitása 95%. Anti-CCP antitesteket ELISA-val mutatják ki. RA-ban RF és anti-CCP antitest megjelenhet évekkal az első tünetek előtt.

10.1.2.5. Szerv specifikus autoimmun betegségek

Szerv specifikus autoimmun betegségek közé tartozik pl. az autoimmun thyreoiditis, a pemphigus vulgaris, vagy pl. az autoimmun myasthenia gravis.

A myasthenia gravisban az AChR ellenes antitestek találhatók meg a betegek 80%-ában. AChR ellenes antitestet radioreceptor assay-val mutatják ki (10.4. ábra). A vizsgálandó szérumhoz jelzett antigént adnak (általában ^{125}I alpha-bungarotoxinnal jelölt AchR-t). Amennyiben van AChR ellenes antitest a szérumban, ezek összekapcsolódnak, komplexet képeznek. Ezeket anti-humán IgG-vel precipitálják. A nem kötött antigén illetve szérum komponenseket kimossák, és a komplexben maradt, precipitált radioaktivitást gamma számlálóval mérik.



10.4. ábra: A radio-receptor immunesszé (RRA) elve

A Hashimoto thyreoiditisre jellemző thyreoperoxidáz ellenes antitestek meghatározása radio-immunassay-val történik a klinikai gyakorlatban (lásd korábbi fejezetek).

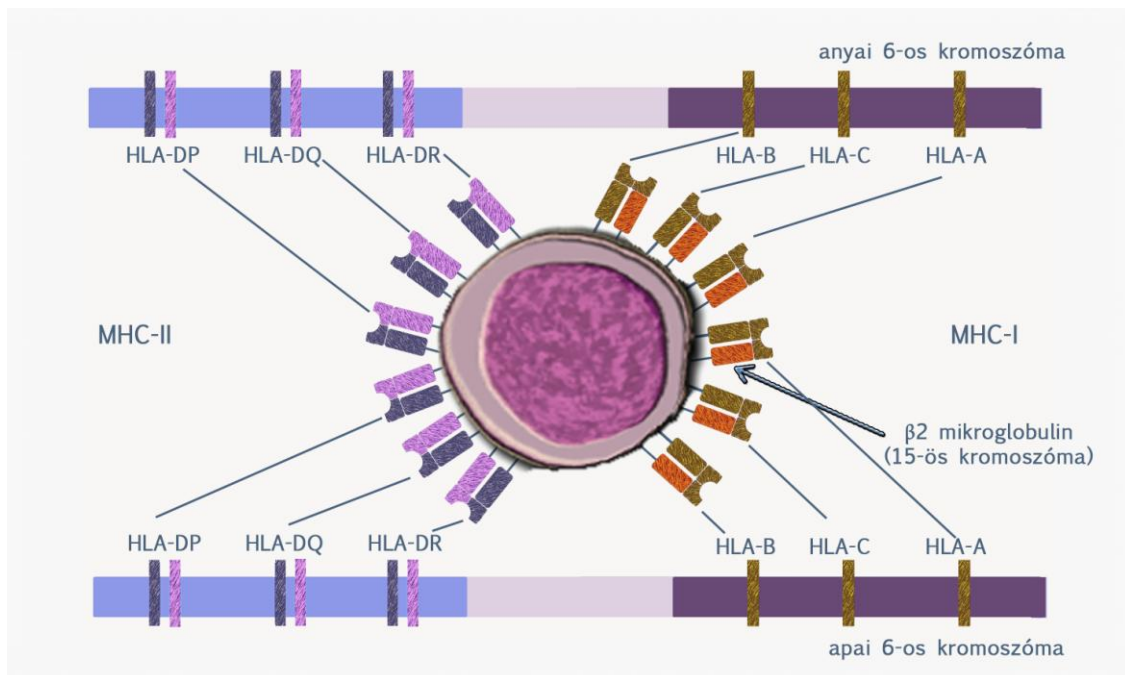
Napjainkban a humorális immunválasz komplexitásának jellemzésére az antigén array-k elterjedése jellemző. A módszer lényege, hogy egy adott autoimmun betegségben a potenciális epitópokat egy műanyag, vagy üveg lemezre hibridizálják. Az aspecifikus kötődést BSA-val való előinkubációval

gátolják. Ezután a lemezhez a beteg szérumát adják, majd mosást követően festékkel jelölt anti-humán IgG-vel vagy IgM-mel reagáltatják. A színeket egy array leolvasón olvassák be és elemzik. Így a betegségre jellemző több potenciális epitóppal szemben is vizsgálható a minta. Továbbá több betegségre jellemző potenciális epitóp vizsgálatával autoimmun betegségek egész sora vizsgálható. Olyan antigén array-k kidolgozása is folyamatban van, ahol nemcsak a szérumban található antitest jelenlétét, hanem komplement aktiváló hatása révén funkcióját is tudják majd mérni.

10.2. HLA tipizálás

Az MHC rendszer részét képezik. Az emberi HLA gének a 6. kromoszóma rövid karján találhatók meg. Az általuk kódolt fehérjék fő funkciója a „saját” és idegen fehérjék felismerésének szabályozása. Az MHC géneknek két nagy osztálya van (10.5. ábra):

- MHC I: HLA A, B, C gének tartoznak ide, minden magvas sejt felszínén expresszálnak beta2-mikroglobulinnal együtt (melynek génje a 15. kromoszómán található). A sejtben található saját peptideket mutatják be CD8+ T-sejteknek.
- MHC II: 5 nagy csoportja van, ebből az utolsó kettő nem szignifikáns: DR, DQ, DP, DM, DO. Antigén prezentáló sejtek felszínén expresszálnak, egy alfa és egy béta láncból állnak, mindkettőnek két-két doménje van. A béta -1 domén egy hipervariábilis régiót tartalmaz. CD4+ T helper sejteknek prezentál antigént és az általános immunválasz iniciálásában vesz részt.



10.5 ábra: Az MHC gének osztályozása

10.2.1. A HLA rendszer nomenklatúrája

A HLA rendszer nomenklatúrája a tipizáló módszerek fejlődésével változik, pontosabbá válik. Régebben a szerológiai tesztekkel használták, a technika fejlődésével ma már molekuláris metodikákat alkalmaznak (lásd később).

HLA-A: HLA- A lókuszt

HLA-A1: szerológiai definíált antigén. A szerológiai módszerek kis felbontású tipizálásra nem alkalmasak. A molekuláris módszerek elterjedésével lehetett egyre nagyobb felbontást elérni.

HLA-A1*: a csillag a molekuláris technikákkal meghatározott allélt jelenti.

HLA-A1*0101 –4 számjegy: jobb felbontású, szekvencia variációk az allélek között, melyek aminosav cserében nyilvánulnak meg

HLA-A1*010101-6 számjegyes felbontás: szekvencia variáció, mely aminosav cserét nem okoz.

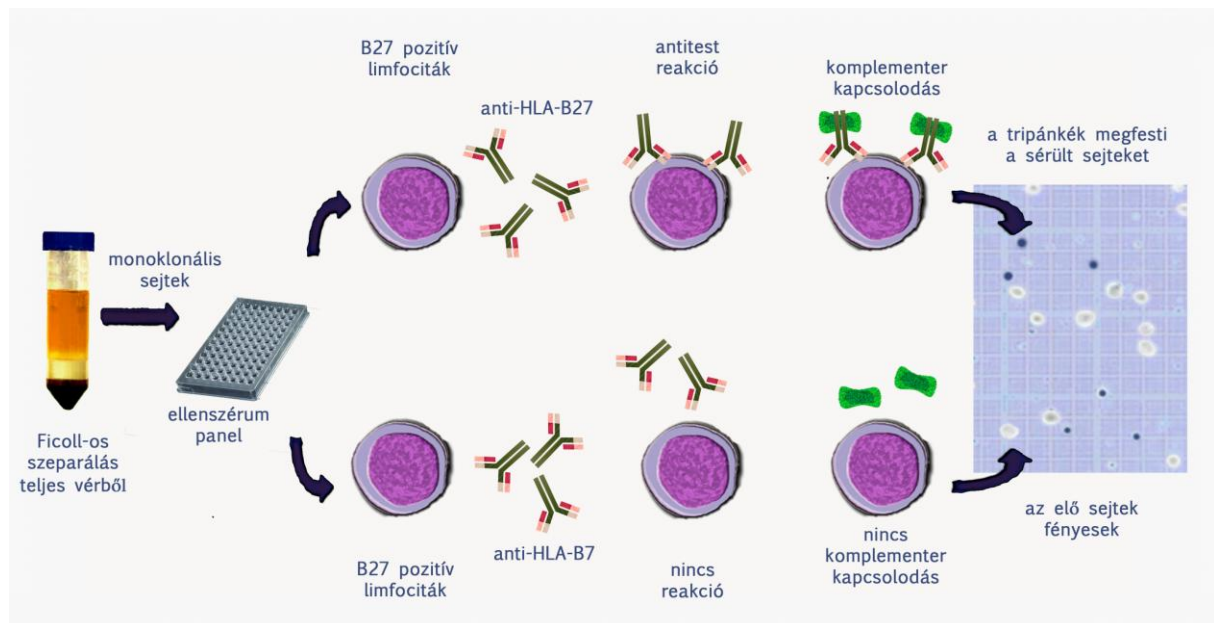
HLA-A1*01010101-8 számjegyes felbontás-szekvencia variáció az intronokban vagy szabályozó régiókban.

10.2.2. Tipizáló módszerek

10.2.2.1. Szerológiai

Régen ez volt a „gold standard”, mára helyüket a molekuláris módszerek veszik át.

- Komplement dependens citotoxicitás módszerét felhasználva. A betegből életképes limfocitákat nyerünk (Ficollózással). **Microlymphocitotoxicitási teszt:** A limfocitákat HLA ellenes antitesttel inkubáljuk pl. anti-HLA-DR. Amennyiben a limfocitán van HLA-DR, az antitest bekötődik. Majd valamilyen komplementeket tartalmazó anyagot, leggyakrabban nyúl savót, adunk a rendszerhez. A membránhoz kapcsolt antitest aktiválja a komplementet, az sejt lízist okoz és a membrán átjárhatóvá válik bizonyos festékek számára, pl. tripan-kék. A sejteket mikroszkóppal vizsgáljuk (10.6. ábra).

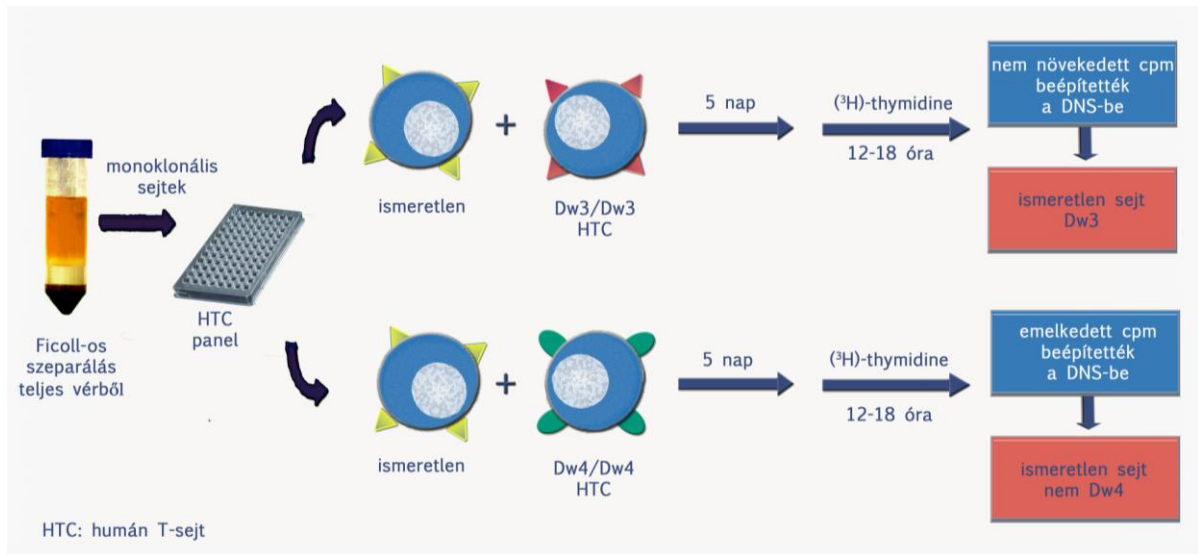


10.6. ábra: Mikrocitotoxicitási teszt (Terasaki)

Érvek a módszer mellett: olcsó, nem kell hozzá nagy apparátus. Ellen: nagy mennyiségű vér szükséges, élő limfocitákból kell kiindulni, ritka HLA típusokra nem mindig van megfelelő tipizáló antitest.

- **Kevert limfocita kultúra** (Mixed Lymphocyte Culture): Két egyén (pl. a beteg illetve egy laboratóriumban fenntartott, ismert, pl. HLA-Dw-t expresszáló) limfocitáit összekeverik egy Petri csészébe és pár napig együtt inkubálják őket sejtenyészetben. Amennyiben az ismeretlen (pl. a betegből származó) limfocita nem hordoz HLA-Dw-t, ami a teszt limfocitán megtalálható, akkor a limfocita stimulált állapotba kerül, proliferálni fog, melyet timidin inkorporáció alapján mérnek (10.7. ábra).

Csak MHCII meghatározására alkalmazzák, transzplantáció esetén helye van a klinikai gyakorlatban. Homogén tipizáló sejt populáció fenntartását igényli szövetenyésző laboratóriumokban. Izotópos vizsgálat.



1.7.ábra: Kevert limfocita kultúra (MLC)

10.2.2.2. Molekuláris metodikák

Jó minőségű genomiális DNS-ből kell kiindulni az összes alábbiakban felsorolt módszer esetén. Történetileg '80-as évek végén restrikciós fragment hossz polimorfizmus (RFLP), 90-es években PCR alapú módszerek elterjedése a jellemző.

- RFLP: A genetikai polimorfizmusról kvantitatív adatok nyerhetők a restrikciós fragmentumok hosszának elemzésével. A restrikciós enzimek a DNS-en belül meghatározott szekvenciájú 4-8 nukleotid nagyságú szakaszt ismernek fel, és a DNS szálát e szakasz meghatározott pontjánál hasítják. Ha két DNS molekula a hasítási szekvencián belül csak egy nukleotidban is különbözik, akkor az enzim ezen a szakaszon nem hasítja az egyik DNS-t, és a két DNS minta között különbség lesz a keletkező fragmentumok hosszában.
- PCR SSOP (Sequence Specific Oligonucleotide Probes): A specifikus oligonukleotid próbák egy nejlón membránhoz vannak kötve, ehhez adják hozzá a beteg jelölt DNS-ét. (részletesebben: A beteg DNS-ét PCR-rel amplifikálják biotinizált primer párral (ez lesz a jelölés), majd hibridizálják az oligonukleotid próbákat tartalmazó membránnal. A felesleg és aspecifikus kötődés lemosása után streptavidin-HRP enzimátikus reakciót végeznek).

Előny: kis mennyiségű vér, nem kell élő sejt, másnap is feldolgozható, sok minta tesztelhető egyszerre. Hátrány: jó minőségű DNS kell, ismerni kell a pontos szekvenciát.

- Szekvencia specifikus primerek: SSP: Mind HLA I és II osztályok meghatározására alkalmas. Az adott primer párok úgy vannak tervezve, hogy specifikus allélokat amplifikáljanak. A végterméket agaróz gélen futtatják, a különböző fragmensek méret alapján szétválnak. A méretet molekulásúly markerek segítségével határozzuk meg.
- Sequence Based Typing (SBT): PCR amplifikációt követően a bázis sorrend meghatározása szekvenálással, majd az eredmény összevetése a nagy adatbázisokban található szekvenciákkal. Ezekről a módszerekről részletesebben más tárgyak kereteiben tanulnak.

10.2.3. Szövet és szerv transzplantáció

A transzplantáció malignus hematológiai betegségek, végstádiumú vesebetegségekben, súlyos cardiomyopathiakban stb. valamikor az utolsó esély a beteg számára. Manapság egyre nagyobb számban egyre többféle szerv transzplantációjára van lehetőség pl. szaruhártyát, szívet, májat tüdőt, hasnyálmirigyet, vékonybeleket, csontvelőt, bőrt, inakat, vesét transzplantálnak. Az ideális az lenne, ha a beteg számára olyan donort találnánk, aki teljesen HLA identikus. Az egypetűjű ikrek közötti donációt, illetve bizonyos HLA identikus testvérpárokat leszámítva ez ritkán adatik meg. Bár a HLA azonosságra törekednek, a különböző szövetek esetén megengedhető, hogy egy-egy HLA különböző legyen (mismatch), úgy hogy a szövet illetve a beteg túlélése nem csökken szignifikánsan. Nagyon súlyos esetekben ez egy reális alternatíva lehet. Mivel a szülőktől a gyermekek a haplotípust öröklik, így transzplantáció esetén 25% az esély, hogy a testvér hasonló HLA konstellációval rendelkezik. Malignus hematológiai betegség esetén nem fontos a vércsoportegyezés, hiszen a recipiens eredeti csontvelőjét besugárzással elpusztítják és a kapott sejtek fogják a csontvelőt repopulálni. Mivel azonban a vércsoport antigéneket nemcsak a vörösvértestek, hanem az érfal endothel is expresszálhatja kis mértékben, ez ellen indulhatna graft-versus-host reakció. Így a beteg immunszuppresszív kezelést kap még a beültetést követően. A vese transzplantáció esetén mind a HLA I, mind a HLA II gének szerepe fontos a vércsoport antigén mellett, de kiemelt szerepe van a HLA-DR tökéletes egyezésének. A súlyos GVHD kialakulásának valószínűsége annál nagyobb, minél több HLA mismatch van a donor és recipiens között.

10.2.4. Rheumatoid arthritis genetikai és HLA asszociációja

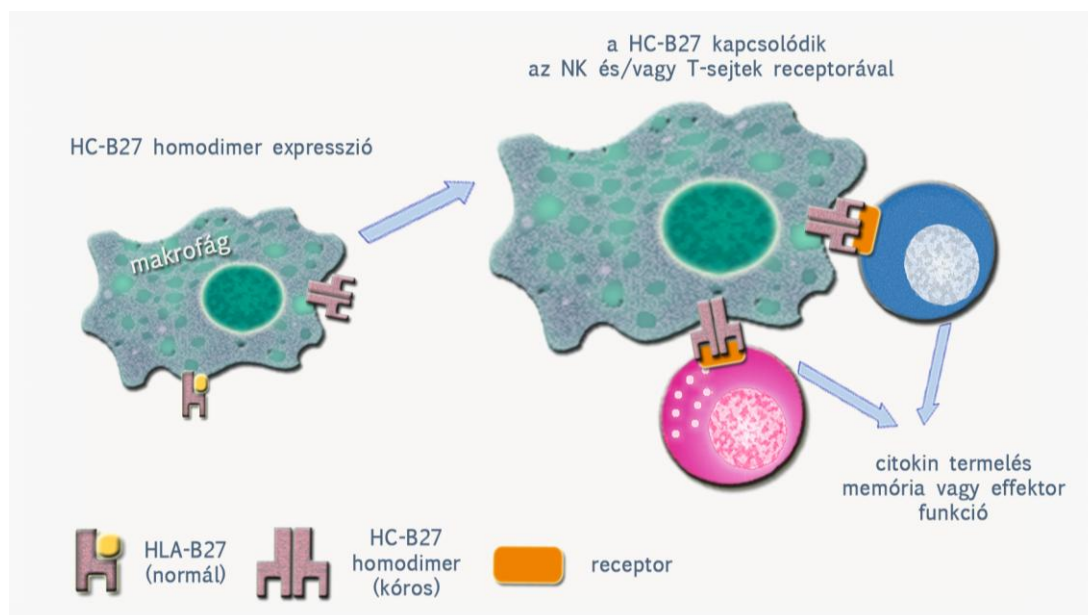
Rheumatoid arthritisben erős a HLA asszociáció, a betegek akár 30%-a is HLADRB1 pozitív lehet. Ma ez az ismert legerősebb genetikai asszociáció RA esetén, bár a genom szintű asszociációs vizsgálatok (genome wide association study azaz GWAS) érájában egyre több gén válik ismertté, ami szintén szerepet játszik ebben a betegségben. Azonban a HLA-DRB1 allél asszociál azonos mértékben RA-val: a DR β 1 lánc harmadik hipervariábilis régiójában a 70-74 aminosavak szekvenciái (QKRAA vagy QRRAA) azonosak az RA-val asszociáló HLA-DRB1*01 és HLADRB1*04 allélek között. Ezt a szuszeptabilitási lókuszt hívják „shared epitope”-nak. Ismertek azonban egyéb gén polimorfizmusok is, melyek rheumatoid arthritisre hajlamosítanak pl. a protein tirozin foszfatáz non-receptor 22 (PTPN22, T sejt receptor szignalizációs út komponense) és a Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA-4, T-helper sejteken expresszálódik, aktivációt gátló jeleket közvetít). Mindkét gén polimorfizmusai több autoimmun betegséggel is asszociálnak.

Érdekesképpen a HLAB27 önmagában is hajlamosít az anti-CCP pozitív RA kialakulására, és additívan hat a dohányzással, mint rizikófaktorral. Míg pl. a PTPN22 egyes polimorfizmusai önmagukban is predisponálnak RA-ra.

10.2.5. Spondylitis ankylopoetica (SPA, Bechterew-kór)

Gyulladásos betegség, mely az axiális ízületek (gerinc) lassú és fájdalmas elcsontosodásával, a gerinc mozgásainak beszűkülésével jár, rokkantsághoz vezet. Jellemző a betegségre a sacroiliacalis ízület progresszív gyulladása, melynek jellegzetes radiológiai képe alapvető a betegség diagnózisában. Családi halmazódást mutat, nagyon jellegzetes a HLA-asszociáció (HLA-B27), a kaukázusi betegek 90%-a HLA-B27 pozitív, de autoantitestek nem jellemzőek. A betegség prevalenciája 0.25-0.5%. Általában 40 év alatti férfiakat érint a betegség (férfiakban a betegség hétszer gyakoribb, mint nőkben). A betegek derékfájdalomra panaszkodnak, mely pihenéskor vagy általában reggel, ébredés után kifejezettebb, mozgásra enyhül. Az inak és ízületek elmeszesedése hosszú folyamat. A betegségre jellemző lehet még egyéb inak és ízületek fájdalma, aorta billentyű elégtelenség, iritis (szívárványhártya-gyulladás).

A HLA-B27 funkcióját, illetve, hogy mi okozza a betegséggel való asszociációját, egérmodelleken vizsgálták, és kiderült, hogy a HLA B27 transzgén patkány, tehát az, ami több HLAB27-et hordoz, SPA szerű betegségre hajlamos. Ha ugyanezt a patkánymodellt keresztezik egy olyan patkánytörzsszel, mely nem hordozza az MHCI másik jelentős komponensét, a beta2 mikroglobulint, a patkány akkor is arthritises lesz. Ha a HLA B27 transzgén patkányokban depletálják a CD8+ T sejteket, akkor sem gyógyulnak meg. Ebből következik, hogy a betegség kialakulásában nem a citotoxikus T-sejtek aktivációjának van szerepe, illetve, hogy a HLA-B27 beta2 mikroglobulin nélkül is expresszáldik, és betegséget okozhat (10.8. ábra).



10.8. ábra: A HLA-B27 megváltozott expressziója az SPA kialakulásában (McMichael and Bowness *Arthritis Res* 2002 4:S153 alapján)

A HLA több, más betegéggel is erősen összefügg. Ilyen pl. az inzulin dependens diabetes mellitus (IDDM), vagy a már korábban is tárgyalt RA és *Bechterew*-kór. *Myasthenia gravis*ban a fiatalkori, anti-AChR pozitívítással járó esetek eltérnek pl. a anti-MuSK pozitív esetekétől, mely más mechanizmust feltételez a két betegség kialakulásáról. A *narcolepsia* egy ideggyógyászati betegség, mely hirtelen REM fázisokkal jár, ami miatt a beteg a legváratlanabb körülmények között kontrollálhatatlanul elalszik, jellemzi az ébredési bénulás, azaz felkelés után percekig nem tud megmozdulni és a kataplexia, azaz a stressz hatására provokált hirtelen izomtónus veszteség illetve a hipnagóg hallucinációk (a REM fázisban, az álmokban (illetve az álom-ébrenlét határán, elalvás előtt=hipnagóg) tapasztalt extrém módon életszerű érzécsalódás (hallucináció)). A betegség etiológiája ismeretlen, de találtak orexin ellenes antitesteket ezekben a betegekben, ami valamilyen immunológiai mechanizmust feltételez. Azonban nemcsak autoimmun betegségekben fontos a HLA rendszer, hanem a korábban már említett szövet- és szerv-transzplantációban, és apasági vizsgálatokban is.

11. AZ IMMUNRENDSZER TÚLMŰKÖDÉSE I.: ALLERGIA

(HOLUB MARIANNA CSILLA)

A túlérzékenységi reakciókat Gell és Coombs négyféle csoportba sorolta a mechanizmus, a keletkező effektor molekulák, a résztvevő sejtek és a folyamat kialakulásának időtartama szerint. A mai klinikai gyakorlat – ahogy ez a jegyzet is – általában ezt a felosztást használja, de ahogy a túlérzékenységi reakciók kiváltó okait és molekuláris mechanizmusait egyre inkább megismerjük, ez a kategorizálás változhat. Például angol – nem amerikai – szakirodalomban gyakran találkozhatunk 5. típusú túlérzékenységgel, ami a klasszikus felosztásban a 2. típusú túlérzékenységi reakciók közé van besorolva.

A 11.1 táblázat foglalja össze a Gell és Coombs felosztása szerinti négy túlérzékenységi típust.

Típus	Reakció	Időzítés
I. allergia- anafilaxis	IgE mediált antigén-antitest reakció.	> 30 perc
II. citotoxikus	Sejtfelszínhez kötött antigénekhez, vagy szöveti antigénhez specifikusan kötődő IgG ellenanyagok.	Órák
III. immunkomplex	Keringő antigén-antitest komplexek rakódnak le a szövetekben.	Órák
IV. sejt-mediálta (késői)	T-sejtes válasz az antigénre	1-3 nap

11. 1. táblázat: A túlérzékenységi reakciók négy típusa

A négy típusnál az emelkedő számozással megegyező módon egyre hosszabb idő alatt alakulnak ki az allergén expozíció utáni tünetek, az I. típust azonnali, a IV. típust késői túlérzékenységi reakciónak nevezzük. A klinikai tünetek súlyossága fordítottan arányos a számozással, azaz az azonnali reakció kiváltotta tünetek percek alatt akár halálhoz is vezethetnek. Ezért az orvosnak nagyon rövid ideje van a tünetek kezelésére, mérséklésére.

11.1. Az allergiás reakció kialakulása

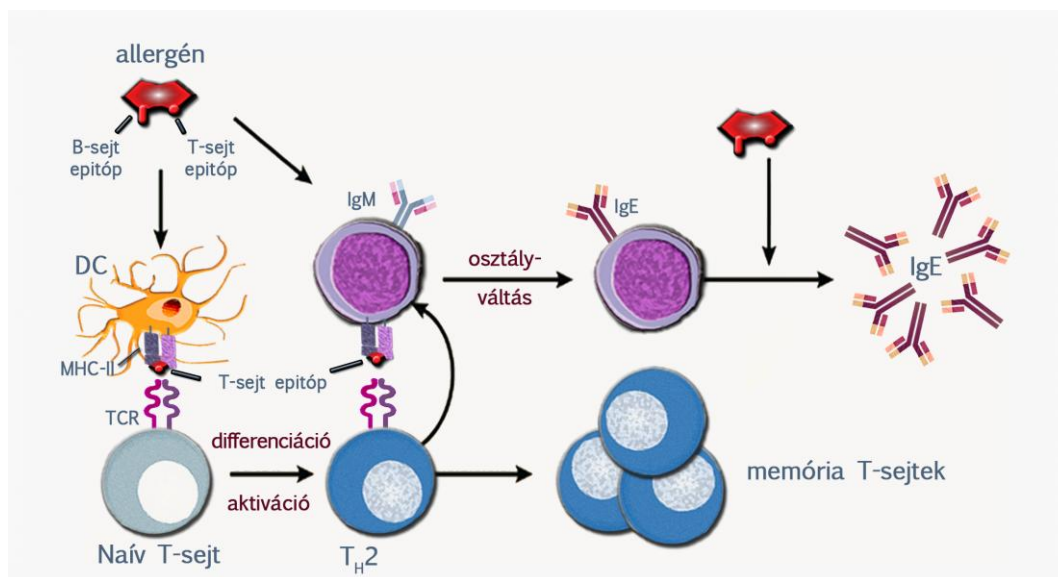
Az allergén legfontosabb biológiai hatása, hogy IgE mediálta Th2 típusú immunválaszt vált ki, s ezzel általánosságban gyulladásos reakciót okoz.

1. fázis: **szenzitivizáció:** (genetikailag prediszpozícionált egyénben) (11. 1. ábra)

Az allergénre leginkább jellemző paraméterek a következők:

- nagyon kis mennyiségben is kiváltja a reakciót (pl. a parlagfű pollenjéből elegendő 1µg/év)
- nem feldolgozott, intakt molekula

- általában kis molekulású, szolubilis molekula, amely kiszáradt formában nagyon stabil lehet. Ilyen a poratka ürülékének leggyakoribb allergén komponense a 15 kD súlyú *Der p1*. (Nevét a háziporlatka latin nevéből – *Dermatophagoides species* kapta.)
- a szervezettel való érintkezés/belépés helye leggyakrabban a nyálkahártya felszíne (pl. légzőhám), ahol a nyálkahártyafelszínre kerülő kiszáradt allergén is jól oldódóvá válik. Vannak allergének, amelyek enzimatisukkal növelik a belépés esélyét. A már említett poratka ürülék *Der p1* allergén komponense cisztein-szerin proteáz aktivitással bír, ami a tüdő epitelsejtek közti *tight junction* kapcsolatok membránkomponenseinek (okkludin, klaudin) elbontásával növeli a bronchiális permeabilitást, az allergének könnyű bejutását a szubepiteliális zónába, a dendritikus sejtekhez.



11.1. ábra: Az allergiás reakció szenzitizációs fázisa

Az allergének nemcsak a szervezetbe való könnyebb bejutást, hanem az antigén felvételt, az antigén prezentációt, és a T sejt aktivációt is elősegíthetik. A háziporlatka allergén *Der p1* proteolitikus tulajdonsága révén az epitelsejtek PAR-2 (*protease activated receptor 2*) molekulájára hatva pro-inflammatorikus citokinek szecernálását váltja ki (IL-6, IL-8, GM-CSF). Ez a mikrokörnyezet kedvez a gyulladásos folyamat kiváltásának. A háziporlatka ürülék az allergén mellett tartalmaz olyan adjuvánsként szolgáló molekulákat, amelyek megkönnyítik a dendritikus sejtek általi felvételt. Ilyen a bakteriális DNS, az endotoxin. Amennyiben a TLR-4-hez kötött endotoxin van túlsúlyban, úgy az a Th2 típusú, amennyiben a TLR-9-hez kötő hipometilált DNS van túlsúlyban, az a Th1 választ segíti elő. Tehát az allergén elősegítheti a dendritikus sejtek (vagy más APC), és az allergénnek megfelelő BCR-ű (IgM-típusú) B-sejt általi felvételét is.

Az APC és B-sejt által felvett és feldolgozott allergén megfelelő Th2 sejteknek bemutatva (TCR felismeri) IL-4 és IL-13 termeléshez vezet.

Az IL-4 és IL-13 az allergénre specifikus B-sejtek környezetében immunglobulin osztályváltáshoz vezet: IgE antitest termelődik. Az IgE kötődhet nagy affinitású receptorához (FcεRI), ami a hízósejtek, a bazofilek, eozinofilek és a dendritikus sejtek felszínén, vagy kis affinitású receptorához (FcεRII), ami

a B-sejteken található. Ez utóbbi mintegy kostimulációs autokrin hatásként serkenti tovább az IgE termelést.

A *Der p1* amellet, hogy hat az epitél sejtekre, közvetlenül szerepet játszik a B és T sejt aktivációban is (a B sejteken található CD23, illetve a T-sejteken jelen lévő CD25 proteolitikus hasításával.)

Bizonyos allergének, így a *Der p1* is képesek IgE-től függetlenül a hízósejt és bazofil granulociták IL-4, IL-13 termelését is kiváltani.

2. fázis: Azonnali reakció:

Az allergénre specifikus IgE memória B-sejtek és memória T-sejtek (kostimulációhoz kell) vannak a szervezetben. Ezek aktiválódása vezet az allergénnel való ismételt találkozáskor nagy mennyiségű IgE- termeléséhez (11. 2. ábra)

Az azonnali reakciót azonban a hízósejten már jelenlévő IgE-ket keresztköti allergének váltják ki. A degranuláció következtében preformált (pl. hisztamin) és újonnan szintetizált (pl. leukotriének) mediátorok szabadulnak fel a hízósejtekből, amelyek lokálisan hatnak a környező szövetekre. A mediátorok legfontosabb hatásai, hogy:

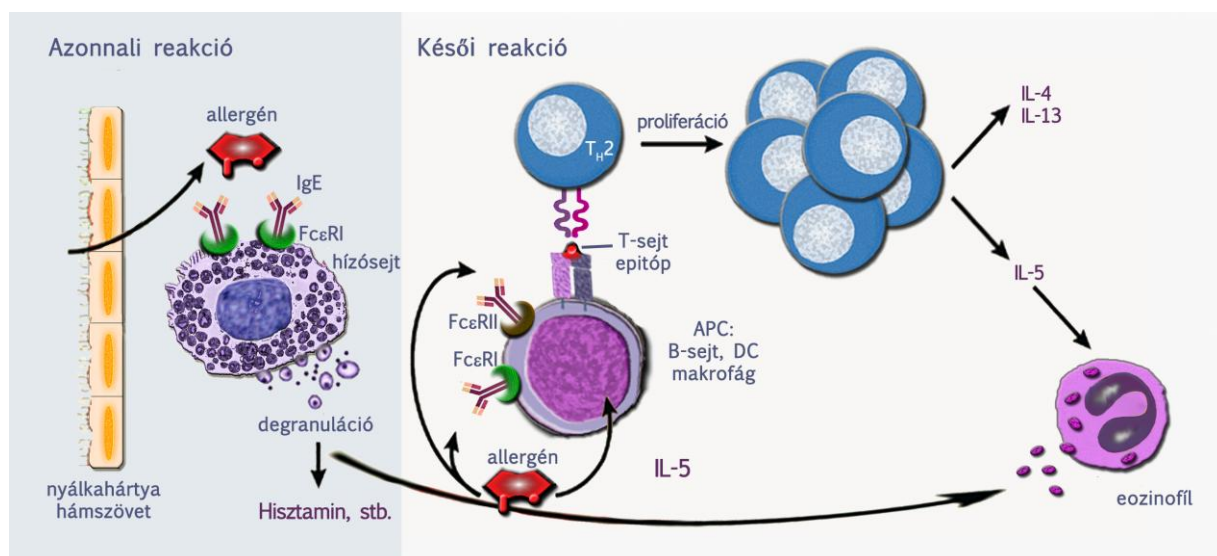
- az érfal permeabilitását növelik
- kiváltják a simaizom összehúzódást
- fokozzák a nyálkatermelődést
- gyulladásos sejteket vonzanak az allergénexpozíció helyére.

3. fázis: Késői reakció:

A késői reakció az allergén bekerülését követően órák múlva (2-24 óra) alakul ki (11. 2. ábra).

Egyrészt a hízósejtek az allergén hatására a lipoxigenáz, ciklooxygenáz útvonal aktiválásával és megváltozott génexpresszióval is válaszolnak, ami lipidmediátorok és újabb Th2 citokinek termeléséhez, felszabadulásához vezet, amik a folyamat fenntartásáért felelősek.

Másrészt az allergénspecifikus Th sejtekből és hízósejtekből felszabaduló IL-5 az eozinofileket aktiválva (melyek felszínén az allergén specifikus IgE-t FcεR köti), eozinofiliát alakíthat ki. Az eozinofil granulociták további proinflammatorikus mediátorokat - leukotriének, kationos fehérjék, eozinofil peroxidáz, eozinofil neurotoxin, és további IL-13-at, IL-5-öt termelnek.



11. 2. ábra: Az allergiás reakció effektor fázisa

11.1.1. Az allergia tünetei

Az allergén típusa és a szervezetbe való bekerülése megszabja az allergiás válasz lefolyását, amit a 11.2. táblázat összegez.

SZINDRÓMA	GYAKORI ALLERGÉNEK	A BELÉPÉS HELYE, MÓDJA	VÁLASZ
akut urtikária (csalánkiütés)	rovarcsípés, latex	bőrre kerülve	a véráram, érateresztő képesség lokális fokozódása
étel allergia	földimogyoró, halak, kagyló tej, tojás	szájon át	hányás, hasmenés, pruritisz (viszketés), urtikária (csalánkiütés), ritkán anafilaxis
allergiás rinitisz (szénanátha)	pollen, házi atka ürülék	levegővel érintkező nyálkahártyafelszínen át	orr nyálkahártya ödéma, orr nyálkahártya irritáció: viszketés, orrfolyás; allergiás konjunktivitisz
allergiás asztma	állatszőr, pollen, házi atka ürülék	belégzéssel	légutak szűkülete, fokozott nyálkaképződés, légutak gyulladása, <i>dyspnea</i> (ziháló légvétel), köhögés
szisztémás anafilaxis	gyógyszerek, állati mérgek, földi mogyoró	intravénásan vagy közvetlenül a szájnyálkahártyán át történő felszívódással	a véráram, érateresztő képesség szisztémás fokozódása, tracheális okklúzió (elzáródás), keringés összeomlása, kóma, halál

11.2. táblázat: Allergia típusok

11.1.2. Az allergiás tünetegyüttes kialakulásáért felelős anyagok

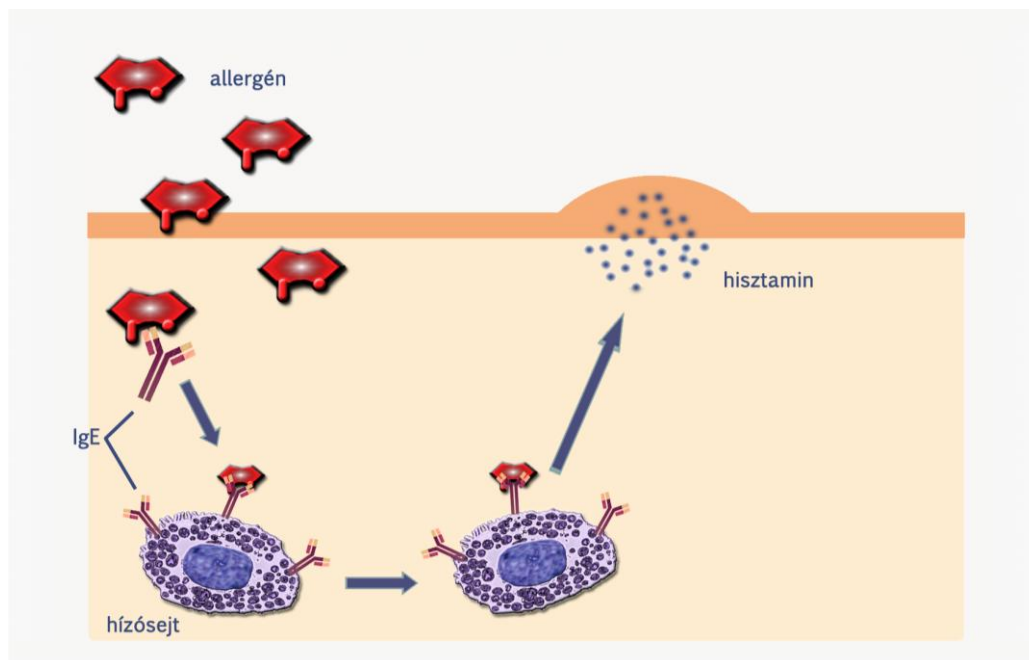
A hízósejt degranulálódás hatása függ a szöveti környezettől:

- Az emésztőrendszerben a megnövekedett emésztőnedv szekréció és perisztaltika eredményeként hányás, hasmenés, haspuffadás, hasi görcsök kísérik.
- A légutakban a légutak átmérőjének csökkenése, megnövekedett nyákszekréció, ennek eredményeként köhögés, mellkasi szorítóérzés, sípoló légzés, ziháló légvétel kíséri.
- A vérerekre hatva megnövekszik a vérátáramlás és az érpermeabilitás, ennek következtében szöveti ödéma, gyulladás jön létre, az antigénszállítás a nyirokcsomókba hatékonyabbá válik.

A különböző szöveti környezetben bekövetkező változásokra jó példa az urtikária és az angioedema. Mindkettő ugyanúgy alakul ki, azaz viszkető, kivörösödött foltok jelennek meg átmenetileg, ezek szélei nem éles határral emelkednek ki a környezetükből. Az urtikária a dermisz ödémája, míg az angioedema a szubkután szövet ödémája (11. 3. ábra).

A vérbe jutó allergének hatására anafilaxia alakul ki, aminek során két vagy több szervrendszer is érintett:

- A kapilláris permeabilitás megnő, ödéma alakul ki, a szövetek (pl. a nyelv) megduzzadnak, a vérnyomás csökken, a szövetek oxigenizációja csökken, anafilaxiás sokk, eszméletvesztés alakul ki.
- Légúti simaizom kontrakció következtében bronchokonstrikció, nehéz légzés, sípoló légzés kíséri.
- A belek simaizom kontrakciója miatt hányás, hasmenés kíséri.



11.3. ábra: A csalánkiütés (urtikária) kialakulása: a hisztamin okozta megnövekedett érpermeabilitás következtében alakul ki a dermisz ödémája.

11.1.2.1. A hízósejtből felszabaduló anyagok

- enzimek:
pl. triptáz, kimáz, amelyek hatására a kötőszövet átrendeződik, a bronchus-tágító peptidok lebontása miatt bronchospasmus alakul ki.
- toxikus mediátorok:

pl. hisztamin, hatására megnő az érpermeabilitás, nő a simaizom kontrakció, viszketést okoz a bőrben;

pl. heparin, ami alvadásgátló.

- citokinek:

pl. IL-4, IL-13, amik Th2 stimuláló hatásúak;

pl. IL-5, ami az eozinofil granulocitákat stimulálja;

pl. TNF alfa, ami az endotéliumra és számos immunsejtre hatva gyulladásserkentő hatású.

- kemokinek:

pl. CCL3, ami monocitákat, makrofágokat, neutrofileket vonz.

- lipid mediátorok:

pl. leukotriének amelyek hatására szintén nő a simaizomkontrakció, az érpermeabilitás, és a nyálkaszekréció;

pl. PAF (platelet activating factor), ami leukocitákat vonz, emellett a neutrofileket, eozinofileket, és a vérlemezkéket aktiválja.

11.1.2.2. Receptorok

Az allergiás reakció során felszabaduló anyagok hatásukat receptoraikon át fejtik ki, sokszor egymás hatását erősítve.

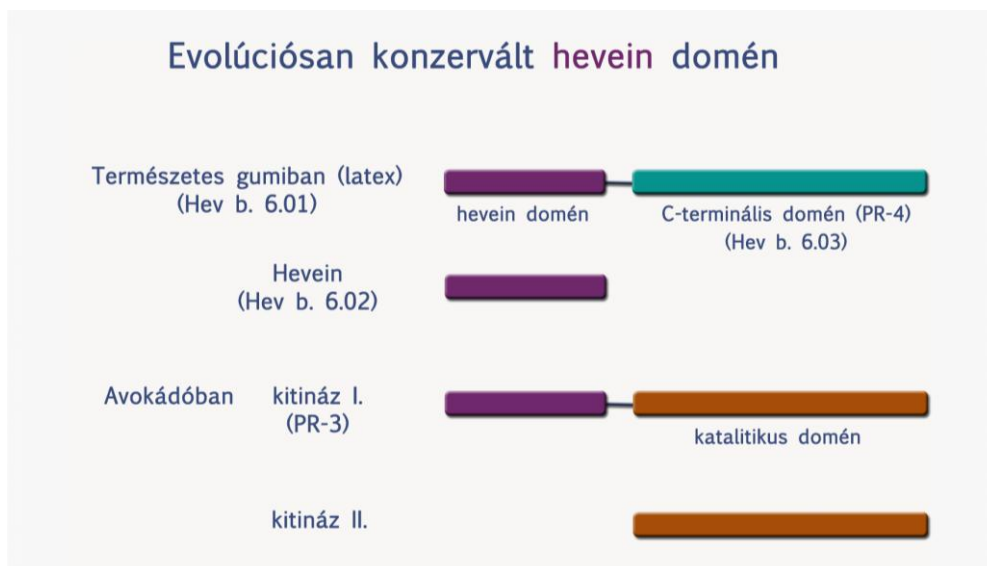
A hisztamin receptorai a bőrben, gasztrointesztinális rendszerben, szívben, érrendszerben, tüdő simaizmain, csontvelői sejteken, lépsejteken, perifériás érzőidegsejteken egyaránt megtalálhatók. Az allergiás reakcióban a hisztamin 3 féle receptora is szerepet játszik:

- a H1 receptoron át: az érpermeabilitás fokozódása, vazodilatáció, szaporább szívverés, a hörgők és az emésztőrendszer simaizomkontrakciója a legfőbb hatás.
- a H2 receptoron át: az érpermeabilitás fokozódása, a gyomorsavtermelés fokozódása, légzőrendszeri nyálkatermelés fokozódása a legfőbb hatás.
- a H4 receptoron át: bőrviszketés, eozinofilek és hízósejtek toborzása a legfőbb hatás.

(A központi idegrendszeri lokalizációjú H3 receptor nem játszik szerepet az allergiás reakcióban.)

A lipid mediátorok (prostaglandin és leukotrién) allergiás reakcióban a bőrben, a tüdő simaizomsejtjein, és az érrendszerben megtalálható receptoraikon át fejtik ki hatásukat. Ennek legsúlyosabb, a reakció során kialakuló következménye a tüdő simaizmainak összehúzódása, de a lipidmediátorok – a hisztamin mellett - az érpermeabilitás fokozása révén a csalánkiütés kialakulásában is szerepet játszanak.

11.1.3. Allergiás keresztreakció



11. 4. ábra: Példa élelmiszer és nem élelmiszer allergének közti keresztreakcióra: ugyanaz a hevein domén található a zöldségek I. osztályú kitinázában és a természetes gumiban.

Az immunrendszer nem tesz különbséget, és allergiás reakciót ad különböző, de molekulárisan hasonló antigénekre. A leggyakoribb keresztreakciók latex és gyümölcs, illetve pollen és gyümölcs közt alakulnak ki.

Néhány példa:

Bükkfa pollen – alma, körte, őszibarack, mogyoró, dió, földimogyoró, zeller

Fűfélék pollenje – narancs, görögdinnye, paradicsom, földimogyoró

Latex – banán, avokádó, kivi, gesztenye, papaja, füge (11. 4. ábra).

Az élelmiszer-allergiások 70 %-a keresztreakció miatt mutat orális allergiás szindrómát.

Az elsődleges élelmiszerallergiában a szenzitizáló és az allergiás reakciót kiváltó allergén ugyanaz.

Az allergén szájon át kerül be a szervezetbe, élelmiszer allergénként szenzitizál, majd további expozíciókor orális illetve szisztémás anafilaxiás reakciót vált ki.

Másodlagos élelmiszerallergiában a szenzitizáló és az allergiás reakciót kiváltó allergén különbözik. A szenzitizáló allergén nem élelmiszer, inhalációval, vagy bőrön át kerül be a szervezetbe. A szájon át bekerülő molekulárisan hasonló nem-szenzitizáló élelmiszer allergén keresztreakció révén viszont kiváltja az allergiás reakciót. Ilyen gyakori másodlagos élelmiszerallergiát kiváltó anyag az egészségügyi dolgozóknál környezeti tényezőként jelenlévő, természetes gumiban található latex (az orvosi gumikesztyű leggyakoribb anyaga). A latex allergénje, a kitin kötő tulajdonságú *hevein* domén, megtalálható számos gyümölcs - például az avokádó -, I. osztályú kitináz enzimjében is. Az ilyen evolúciósan konzervatív allergiát kiváltó molekulákat pánallergénnek nevezik.

11.1.4. Élelmiszer intolerancia és élelmiszer allergia

Az élelmiszerek gyakran váltanak ki allergiás reakciót, de nagyon hasonló tünetekkel jár az élelmiszer intolerancia is. Az élelmiszer intolerancia nem azonos az élelmiszer allergiával.

1. Túlérzékenység, ha az immunrendszer szerepet kap a reakcióban:

- A valódi élelmiszer túlérzékenységi reakciók többnyire IgE mediálta hízósejt degranulációval járó események. Az I. típusú élelmiszerallergia, ahogy azt előzőleg láttuk, lehet elsődleges, vagy másodlagos.

- Van azonban nem IgE, hanem T-sejt mediálta élelmiszer túlérzékenység is (glutén szenzitív cöliákia). Lásd később a IV. típusú hiperszenzitivitás c. fejezet alatt.

2. Intolerancia, ha az immunrendszer nem játszik szerepet a reakcióban:

- A nem immunrendszer mediálta élelmiszer túlérzékenység lehet anafilaktoid reakciót kiváltó, szintén hízósejt degranulációval járó pszeudoallergia. Lásd következő bekezdés.

- Az élelmiszer intolerancia hízósejt degranuláció nélkül is kialakulhat.

Egy példa erre a tejérzékenység. Amíg a tejallergia csecsemőkorban alakul ki, és oka a tehéntej fehérjéje (kazein) által kiváltott kóros reakció, a tejérzékenység oka a tejcukor (laktóz) lebontási képesség életkor előre haladtával való csökkenése/eltűnése. A felnőttkori laktóz lebontó képesség hiányának hátterében a laktáz (tejcukorbontó) enzim génjének szabályozó régiójában található genetikai polimorfizmus áll.

11.1.5. Anafilaktoid reakció / Pszeudoallergia

Az immunrendszer pszeudoallergiában gyakorlatilag kimarad a tünetek keletkezéséből, mert a kiváltó anyag direkt, IgE-független módon is képes hízósejt- vagy bazofil degranulációt, vagy membrán-felszakadást előidézni, s ezáltal hisztamin kiáramlást produkálni. A reakciót így már az első találkozáskor kiváltja az antigén. Az alábbi táblázat foglalja össze, hogy melyek a leggyakoribb anafilaxiás illetve anafilaktoid reakciót kiváltó anyagok.

Anafilaxiás / allergiás / IgE-mediált	Anafilaktoid direkt hízósejt szekréció / pszeudoallergia
• Élelmiszer (mogyoró, tengeri ételek) • Gyógyszerek (pl. beta-laktam antibiotikumok) • Rovarcspés (méh, darázs, hangya) • Latex	• Gyógyszerek (pl. NSAID, aszpirin) • CT/MR kontrasztanyag • Fizikai faktoriok (mozgás, meleg, hideg) • Magas hisztamintartalmú ételek • vörösbort • bakteriális hisztidinbontás (halmérgezés – magas hisztidintartalmú halak nem megfelelő tárolása után)

11.3. táblázat: Anafilaxiát és anafilaktoid reakciót kiváltó leggyakoribb anyagok

11.1.5.1. Gyógyszer kiváltotta pszeudoallergia

Orvosi szempontból magas kockázati tényezőnek számítanak e tekintetben a CT és MRI vizsgálatok. Az intravénásan bevitt kontrasztanyag ugyanis a páciensek 10 %-ában okoz anafilaktoid reakciót. A mechanizmus még nem ismert, hogyan, feltételezhetően a kontrasztanyag ionos összetétele, ozmotoxicitása, kemotoxicitása befolyásolja a sejtmembránok, így a hízósejtmembrán stabilitását.

Ritkábban nem szteroid gyulladásgátló gyógyszerek (pl. Ibuprofen), és acetilszalicilsav (pl. Aspirin) is okozhatnak anafilaktoid reakciót. Feltételezések szerint ennek molekuláris alapja, hogy ezek a gyógyszerek a COX-1 enzim gátlásával a prosztaglandin szintézist felfüggesztve, a lipoxigenáz

mediálta leukotrién szintézis felé tolják el az arachidonsav metabolizmust. Ennek következtében az antiinflammatorikus prosztaglandin mennyiség (PGE₂) csökken, a proinflammatorikus leukotriénszintézis (LT-A₄, -B₄, -C₄, -D₄) nő. Az ilyen gyógyszerekhez kémiaiailg igen hasonló szintetikus ételfestékek (pl. Tartrazin/E102) is ugyanezt a hatást válthatják ki.

11.1.5.2. Élelmiszer kiváltotta pszeudoallergia

Pszeudoallergiát okozhat magas hisztamintartalmú élelmiszer (pl. vörösbor). Normális körülmények közt a hisztamint a szervezet aminoszázok segítségével lebontja. Az élelmiszerrel bevitt hisztamin metabolizmusában szerepet játszó enzim a DAO (diaminoxidáz), legnagyobb mennyiségben a vékonybélben expresszálódik. Az extracelluláris környezetben lévő hisztamint képes semlegesíteni, meggátolja a hisztamin transzceptilális felszívódását. Azoknak, akiknek a DAO enzim-aktivitása csökkent, vagy hiányzik szervezetükből az enzim, az élelmiszerrel bevitt hisztamin bekerül a keringésbe, ahol ugyanolyan hatást fejt ki, mint az endogén módon felszabaduló hisztamin. A DAO csökkent aktivitása, vagy elégtelen mennyisége lehet veleszületett enzimdeficiencia, vagy lehet gasztrointesztinális betegség (pl. Crohn betegség) eredménye, aminek során az enterociták kevés DAO-t termelnek. Ritkán DAO blokkoló gyógyszerek (pl. cefalosporin antibiotikumok), vagy élelmiszerek (pl. ugyancsak a vörösbor) felelősek a csökkent hisztaminbontó képességért. A genetikailag meghatározott DAO működési hiány miatt kialakuló **hisztaminérzékenység** gyakorlatilag metabolikus betegség, kimutatták, hogy bizonyos SNP-k a DAO génjében korrelálnak gasztrointesztinális megbetegedések előfordulásával.

(A keringésbe jutó, majd a sejtek által felvett hisztamint a metabolizmusban szerepet játszó másik, intracelluláris enzim, a HNMT (hisztamin-N-metiltranszferáz) bontja. A HNMT a májban található meg legnagyobb mennyiségben.)

Bizonyos élelmiszereknek a nem megfelelő tárolása után lesz olyan magas hisztamintartalma, hogy az egyébként normális DAO aktivitású egyéneknél is hisztaminmérgezést okoz. Leggyakoribb példa erre a halmérgezés – ami nem tévesztendő össze a halakban és tengeri állatokban található fehérjék elleni valódi allergiával, bár a klinikai tünetek, amiket kiváltanak, egyeznek. Halmérgezéskor a magas hisztidintartalmú halakon elszaporodó baktériumok dekarboxilálják a hisztidint, amiből hisztamin keletkezik. (A már keletkezett hisztamint se főzéssel, se fagyasztással, se füstöléssel nem lehet később semlegesíteni/eltávolítani.)

Bizonyos alacsony hisztamintartalmú élelmiszerek is (pl. citrusfélék, eper) is kiválthatják az anafilaktoid reakciót -még nem tisztázott módon-, a duodenális hízósejtek membránjának destabilizálásával, ami a hízósejtek tömeges degranulációját okozza.

Gyakorlati, klinikai szempontból lényeges, hogy azoknál a pácienseknél, akiknél fennáll a hisztamin-érzékenység, CT és MRI kontrasztanyagot nem, vagy ha elkerülhetetlen, csak megfelelő antihisztamin kezelés után szabad alkalmazni.

11.1.5.3. Fizikai faktorok és érzelmi stressz által kiváltott pszeudoallergia

Pszeudoallergiát okozhatnak fizikai faktorok mozgás, meleg, hideg, valamint stressz is. Minden esetben a hízósejtek degranulációja áll a háttérben, de a pontos kiváltó mechanizmus még nem ismert. A tünetek sosem olyan súlyosak, mint a gyógyszerek vagy élelmiszer kiváltotta, nyálkahártyán át ható faktorok esetében. Leginkább csak csalánkiütés formájában jelennek meg a tünetek.

A mozgás által kiváltott u. n. kolinerg urtikária a test hőszabályozási válaszával összefüggésben alakul ki. Az elnevezés tapasztalati tényezőn alapul, mivel ezeknél a pácienseknél acetilkolin injekció ugyancsak kiváltja a csalánkiütést. Ugyanakkor nem tudni, hogy az acetilkolinnak mi a szerepe a tünetek kialakulásában.

Hidegallergiát kiválthat bármilyen hideg fizikai közeggel való érintkezés: hideg időjárás mellett a légkondicionálás, hideg élelmiszer/ital fogyasztása, hideg vízben úszás, még a hideg verejték is. A mechanizmus, hogy miért destabilizálódik a hízósejt membránja, még nem feltárt. A melegallergiát ellenkezőképpen 43°C feletti közeggel való érintkezés váltja ki, ugyancsak ismeretlen módon.

Nagyon ritkán fordul elő az érzelmi stressz, lelki nyomás miatt kialakuló pszeudoallergia.

11.1.6. Napallergia

A napsugárzás által kiváltott urtikáriával azért érdemes külön bekezdésként foglalkozni, mert bár fizikai faktor váltja ki, IgE-mediálta hízósejt degranulációt okoz. Az u.n. fotoallergének széles spektrumba tartoznak (290-800 nm), s attól függően, hogy jellemzően melyik hullámhosszba tartozó váltja ki a reakciót, különböztetik meg altípusait.

11.2. Az allergia diagnózisa

A diagnosztikus tesztek egyrészt a hízósejt degranulációja során felszabaduló anyagokat, másrészt az allergénre specifikus IgE antitesteket mutatják ki.

Az IgE független pszeudoallergiát a hízósejt degranulációja során felszabaduló anyagok – pl. az emelkedett hisztaminszint - kimutatásával egyidejűleg a szérum DAO szint mérésével lehet kimutatni.

A mai klinikai gyakorlatban a következő allergiatesztek a leggyakoribbak:

1. szérum triptáz szint mérése
2. vizelet hisztamin szint mérése (azért nem a szérumban lévő mérlik, mert a szérumban a hisztamin féléletideje – percek –, túl rövid)
3. **bőrpróba / Prick teszt:** intradermális antigén felvitel után in vivo méri a hízósejt degranuláció mértékét a szenibilizált személy bőrén.

Az antigén felvitelt régebben injekciós tűvel végezték, ma már számtalan felviteli mód létezik. Leggyakrabban az antigén kivonatba mártott Morrow-Brown tűt (Prick lándzsa) használják, de van, ahol a beteg bőrét egy többfejes, eszközzel karcolják meg, egyszerre, paralel víve fel több antigénkivonatot. (Multi-teszt módszer: <http://www.lincolndiagnostics.com/>)

Az antigéneket tartalmazó kivonat mellett negatív kontrollként PBS-t, pozitív kontrollként meghatározott mennyiségű hisztamint tartalmazó oldatot is tartalmaz egy-egy allergén-szet. Az általános bőrpróbatesztek 20 különböző általános allergén kivonatát tartalmazzák (regionális

pollenek, macska-/kutyaszőr, atkakeverék, penészgomba, tej, tojás, toll), de vannak speciális allergéntesztek is. (<http://www.frank-diagn.hu/main.php?mi=allergen&kod=LOFA>)

15 perccel a felvitel után kell leolvasni a reakciót, ennyi idő alatt a hízósejtek degranulálódása lokális duzzanat kialakulásához vezet. A teszt pozitívnak akkor tekinthető, ha a duzzanat átmérője meghaladja a 3 mm-t. Az alábbi táblázat mutatja, hogy mi alapján jelölik a reakciót egy kereszttől négy kereszttig.

+++ = pozitív kontrollal megegyező átmérő
++++ = átmérő nagyobb a pozitív kontrollnál
++ = átmérő a pozitív kontroll 2/3-a
+ = átmérő a pozitív kontroll 1/3-a

Vannak allergiák, amit csak ezzel a módszerrel lehet kimutatni (pl. napallergia), viszont az IgE független anafilaktoid hatású anyagok is adják a reakciót.

A páciens szérumból az **allergénspecifikus IgE jelenlétét** többféle módszerrel is ki lehet mutatni:

4. **RAST** (RadioAllergoSorbent Test): in vitro allergén specifikus IgE mérés.

Az allergének egy pálcán papírkorongokra vannak kötve.

- Az allergéneket tartalmazó pálcát belemerítik a páciens vérmintájába, így az inkubációs idő alatt a specifikus IgE-k hozzákötődnek az allergénhez.
- A nem specifikusan kötődő antitesteket kimossák.
- A pálcát ezután radioaktív anti-IgE antitestet tartalmazó oldatban inkubálják.
- A nem specifikusan kötődő antitesteket kimossák.
- A pálcát leolvassák - gamma számlálóval határozzák meg az értékeket.

A bőrpróbával szemben előnye, hogy nem terheli e beteget a reakció, valamint egyszerre jóval több antigént is lehet tesztelni. A gyógyszerallergiákat leggyakrabban ezzel a módszerrel mutatják ki.

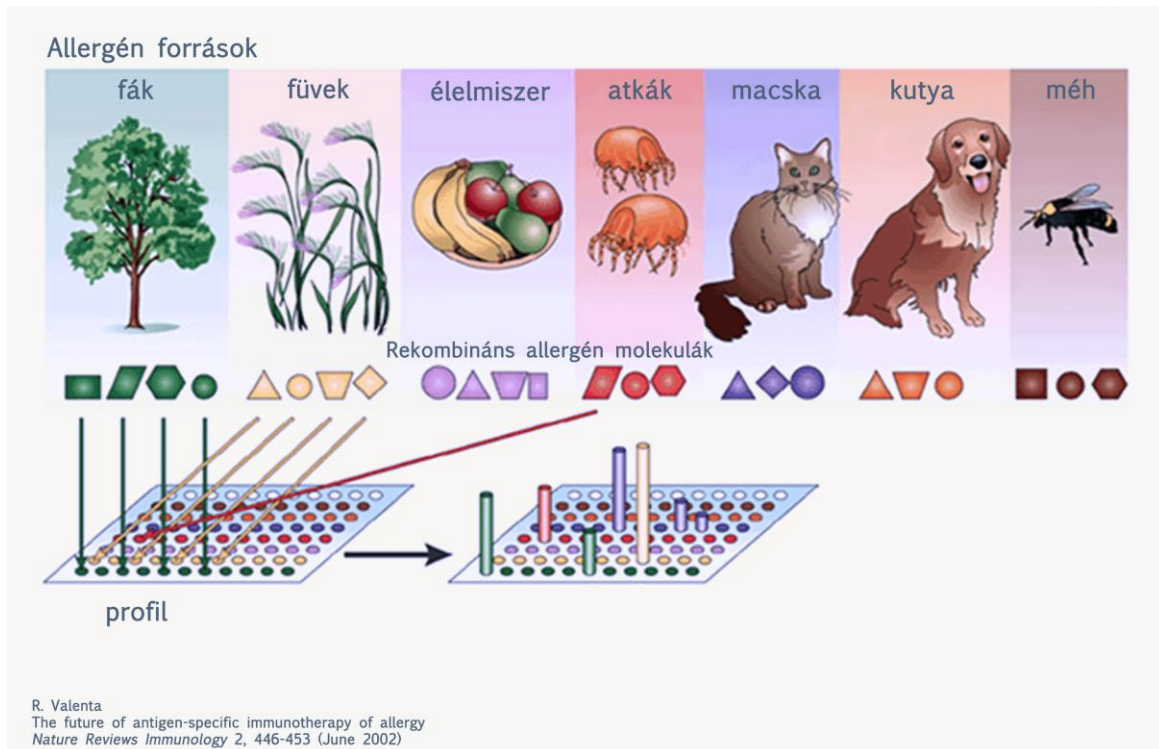
5. **Laterális immunkromatográfia**: in vitro allergén specifikus IgE mérés

A módszert már az Antitest-antigén kölcsönhatáson alapuló módszerek fejezetben (2. fejezet) tárgyaltuk. Itt a szolubilis detektormolekula az allergén, ez köt hozzá a páciens specifikus IgE-jéhez, majd együtt vándorolnak. Egy második, helyhez kötött IgE specifikus antitest megfogja a vándorló komplexet, egyúttal színreakció jön létre, ami szemmel látható elszíneződést okoz a membránon (megjelenik egy csík).

6. A RAST teszt módosított változata az **allergén specifikus sandwich immunoassay**. A módszert már a 2. fejezetben tárgyaltuk. Jelen esetben is szilárd felszínre kötött antigének a vizsgálni kívánt allergének, amihez hozzákötnek a beteg szérumban található IgE-k. Ezeket a már ismert módon másodlagos antitesttel detektálják. A másodlagos antitest enzimmel jelölt, színreakciót ad.

7. **Allergén microarray**: Molekuláris klónozással előállíthatók rekombináns allergének, melyek azokat az epitópokat tartalmazzák, amelyek a leginkább jellemzőek egy-egy allergénre. Ezeket multi-allergén tesztrendszerekben lehet használni, ilyen az allergén microarray. Egy üveglapra nyomtatják, azaz kötik, a szolubilizált allergénepitópokat, inkubálják a páciens szérum IgE-ivel, majd fluoreszcensen jelölt anti-humán IgE-vel detektálják. A fluoreszcencia intenzitást leolvasva egy szoftver értékeli ki az adatokat. Előnye, hogy egy vizsgálattal mutatják ki az allergiás páciens

„allergén profilját”, amelynek során az is meghatározható, hogy egy allergén melyik epitópja váltja ki leginkább a reakciót. (11.5. ábra)



11. 5. ábra: Allergén profil kimutatása allergén microarray-vel

8. **Immuno RCA** (rolling circle DNA amplification): A páciens szilárd fázison lévő allergénhez kötő szérum IgE-jét egy oligonukleotid szállal konjugált antitest ismeri fel. Az oligonukleotid szálhoz hozzáadnak egy komplementer cirkuláris DNS-t, majd DNS polimeráz és nukleotidok jelenlétében DNS amplifikáció,- gyakorlatilag PCR-, zajlik le. Ennek eredménye több száz, folytonos szálát alkotó DNS szakasz-ismétlődés, amelyhez a reakció végén fluoreszcensen jelölt komplementer próbák kapcsolódnak, ezt detektáljuk.

11.3. Az allergia terápiája:

A páciens lehet oligo- vagy poliszzenzitizált, azaz csak egy vagy kevés, illetve sok különféle allergénre érzékeny.

Oligoszzenzitizált páciensnél az allergén kerülése, az allergén-specifikus illetve az antitest-immunterápia, poliszzenzitizált páciensnél a tünetek megszüntetését célzó gyógyszeres terápia vezet célra.

11.3.1. Gyógyszeres terápia

A gyógyszeres terápia a hízósejtek degranulációját, a felszabadult anyagok hatását gátolja, illetve a már kialakult tüneteket fordítja vissza. (11.6. ábra) A tünetek súlyosságától függően, megfelelő protokoll szerint különböző gyógyszereket kell adni a páciensnek.

- Adrenalin: az egyetlen olyan fiziológiai antagonistázó hatóanyag, ami a hisztaminnal ellentétes folyamatokat indítva el szünteti meg a tüneteket. Anafilaxiás reakciókor az első adandó gyógyszer.

Alfa receptor agonistaként összehúzza az ereket, ezáltal megszünteti az értágulatot, csökkenti az ödémát, gátolja a viszketést.

Beta receptoron át relaxálja a simaizmokat - tágítja a légutakat, megszűnik a gasztrointesztinális görcs; növeli a szívizom-összehúzódás erejét - gyorsabban ver a szív, emelkedik a vérnyomás; a hízósejtek sejtmembránjának hisztamin-permeabilitása csökken - meggátolja a hisztamin és leukotrién kibocsátást, csökkenti a gyulladásos választ.

Mivel a már keringésbe került hisztamin sejtekhez kötődését nem gátolja, viszont a sejtek hisztaminra adott válaszával ellentétes választ vált ki, folyamatosan kell adni (10-15 percenként), amíg a hisztamin hatása tarthat.

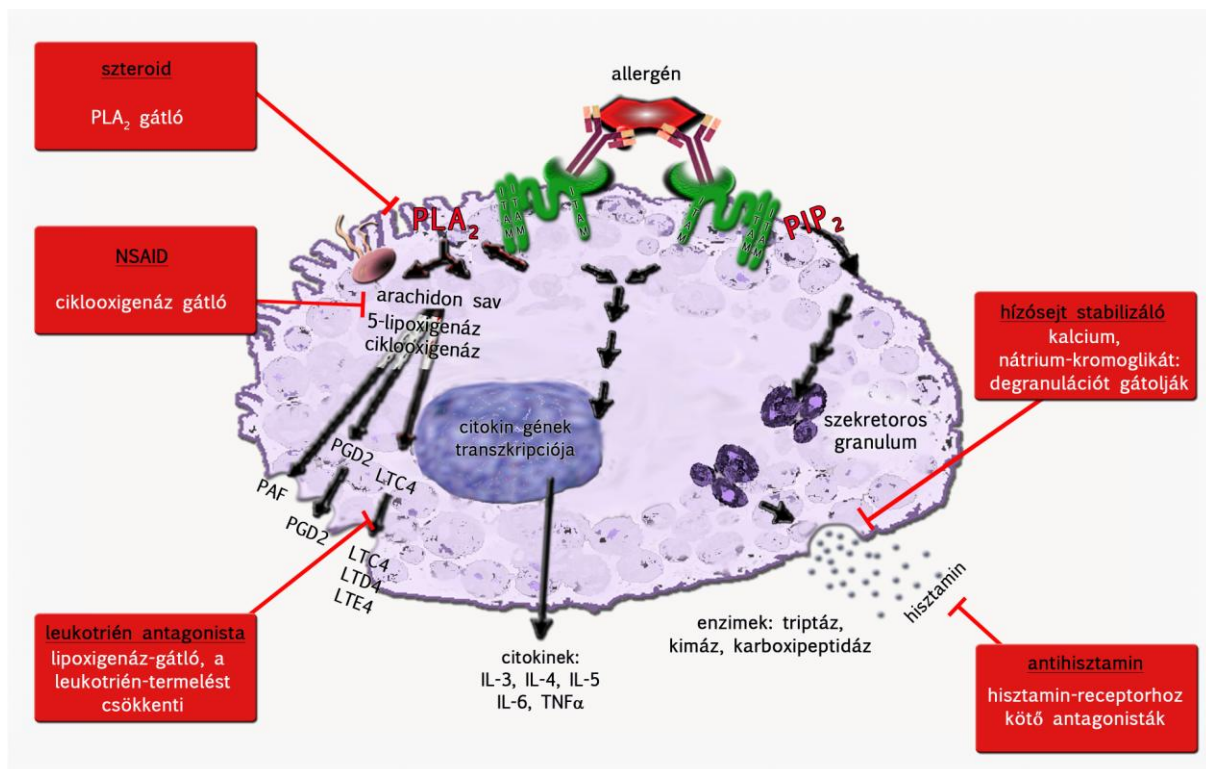
Nagyon alacsony vérnyomásnál, vagy ha a beteg állapota rosszabbodik, intravénásan adják minden 10-20 percben.

- Antihisztaminok: hisztamin receptorokhoz kötődő farmakológiai antagonisták, amik gátolják a hisztamin receptorhoz kötését, s ezzel az általa kiváltott folyamatok kialakulását. A már bekövetkezett hisztamin-mediálta reakciókat nem szüntetik meg, ezért anafilaxiás reakciókor adrenalin után kell adni.
- Glükokortikoidok: általános immunszuppresszánsok és gyulladásgátlók (függetlenül a gyulladás okától.) Gátolják a gyulladásos citokinek termelődését: IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IFN- γ . Gátolják a leukociták/ gyulladásos sejtek kemotaxisát, adhézíóját, érpályából szövetekbe vándorlását, a fagocitózist.

Hatásuk molekuláris háttere:

1. gyulladásos citokin gének expressziójának gátlása.
2. a természetes immunrendszer sejtjeinek annexin-1 (lipocortin-1) expresszióját és kibocsátását serkentik. Az annexin parakrin és autokrin úton is hat. Foszfolipáz-A2 (PLA₂) gátlóként gátolja az eikozanoid szintézist, azaz megszünteti a prosztaglandin és leukotrién termelődést.

- Kalcium és nátrium-kromoglikát: hízósejt membránstabilizálók, gátolják a degranulációt.
- leukotrién antagonisták: lipoxigenáz-gátló, a leukotrién-termelést csökkenti



11.6. ábra: Az allergia gyógyszeres kezelése: A különböző gyógyszerek szerepe a hízósejt degranulációs gátlásában / felszabadult anyagok hatásának gátlásában. Az adrenalin hatásai nincsenek az ábrán feltüntetve (lásd szöveg)

11.3.2. Immunterápia: (hiposzenzitizálás/deszenszitizálás)

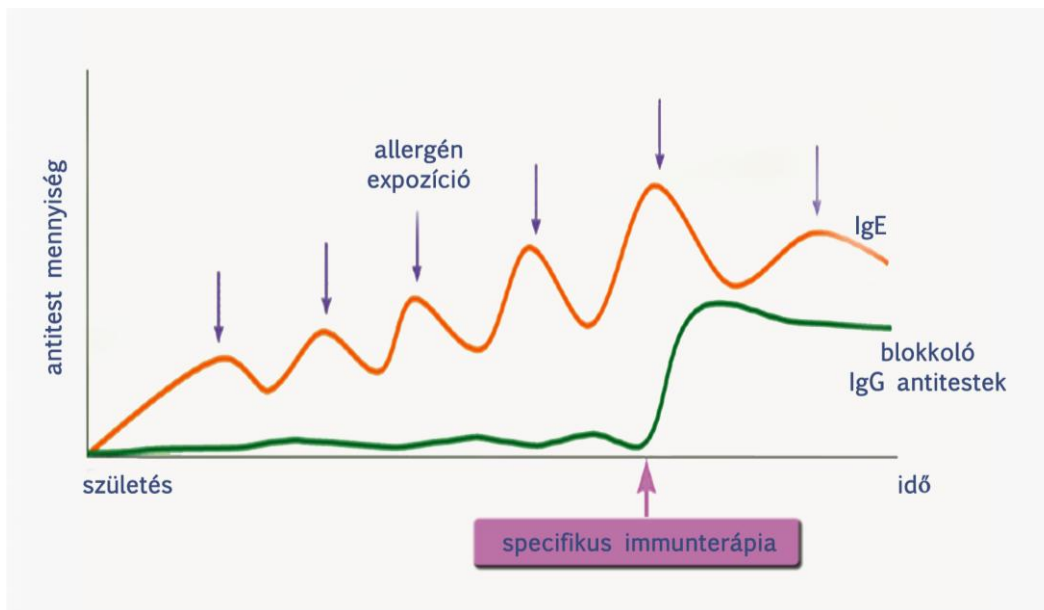
- allergén specifikus immunterápia:

Akkor indokolt, ha egy-két allergénre érzékeny a páciens.

Az eljárás során leginkább hígított allergénnel szubkután oltanak, majd minden újabb oltással növelik az allergénkoncentrációt 12 héten át. Utána évekig (min. 3 év) havonta a legmagasabb allergéndózist adják fenntartó kezelésként. Mindig kórházi felügyelet alatt végzik a terápiát, az esetlegesen kialakuló anafilaxiás veszély miatt.

A terápia során megváltozik mind a celluláris, mind a humorális immunválasz, tolerancia alakul ki. Mivel hígított allergént juttatnak be a szervezetbe, nem azt az adagot, ami a legerősebb reakciót váltja ki, gyulladásos szignál hiányában az allergénepítőppal találkozó dendritikus sejtek nem válnak teljesen érettekké. A dózis növelésével az immunrendszer T sejtjeinek aránya megváltozik. A részlegesen érett dendritikus sejtek kostimulációs molekulái tolerogén kölcsönhatásba lépnek a nyirokcsomói T-sejtekkel. Ennek következtében nő a funkcionális (periférián kialakuló) IL-10 és TGF-beta termelő Treg sejtek (Tr1) száma (a Th2 szám csökken). Emellett, az emelkedő antigéndózisra a monociták, makrofágok, B-sejtek IL-10 termelése is nő. A fenti citokinek gátolják az effektor T-sejteket, a gyulladásos reakciókat, s ugyanakkor az immunglobulin osztályváltást az IgA, IgG felé tolják el. Ezek versengenek az IgE-vel az allergénkötésért, így csökken az IgE mediálta azonnali hízósejt és későbbi eozinofil- reakció.

Folynak klinikai próbálkozások szublingvális immunterápiára is, amikor szájon át juttatják be az allergént. Az eljárás bizonyítottan biztonságosabb a szubkután módszernél, nem okoz anafilaxiás reakciót. Felnőtteknél hatékonysága az eddigi eredmények szerint azonban elmarad a szubkutánétól. Csecsemőkori tejallergiában viszont sikerrel alkalmazzák. A gyermekek nagy hányada 7 éves korára „kinövi” az ételallergiákat (tej, eper...), mivel a folyamatos kis dózisú allergén jelenléte segít a természetes tolerancia kialakulását. Mivel a csecsemők immunrendszere éretlen, a szájon át egyre nagyobb dózisban adott tehéntej fehérjéjére a várt természetesen is kialakuló tolerancia kialakulását segítik elő, ami a szubkután eljárással megegyező módon alakul ki (11.7. ábra).



11. 7. ábra: Allergén specifikus deszenzitizálás: a szenzitizáló allergén ismételt adása az allergén specifikus IgG termelődésének fokozódását eredményezi, ami az IgE-vel verseng az allergén kötésért (blokkoló antitest).

- profilaktikus vakcináció: A jövő immunterápiája. Csecsemőkorban hipoallergén allergénepítőppal IgG specifikus immunglobulin-termelést lehet kiváltani, ezzel megelőzhető a szenzitizáció és az IgE specifikus reakció. Így az IgE szint végig alacsony marad a természetes allergén jelenlétében is.
- Antitest terápia: monoklonális IgE specifikus antitest kezelés: a keringő IgE-hez, vagy az allergiában szerepet játszó citokinekhez kötve akadályozza meg a reakció kialakulását. Anti IgE-t csak a legsúlyosabb kortikoszteroidokra nem reagáló allergiás asztmásoknál alkalmazzák, a citokinellenes antitest-terápia jelenleg még kísérleti stádiumban van.

11.4. Feladatok

11.4.1. Allergiás reakció

- 1) Mikor zajlik le a szenzitizáció?
- 2) Miért tünetei az azonnali allergiás reakciónak a következők: arc ödémája, torokszorítás, hányás?

- 3) Hogyan definiálja az anafilaxiás reakciót?
- 4) Miért kap az anafilaxiás tüneteket mutató páciens adrenalint?
- 5) Miért kap az anafilaxiás tüneteket mutató páciens glükokortikoidot?
- 6) Miért kap az anafilaxiás tüneteket mutató páciens antihisztamint?
- 7) Miért ismétlődhet meg az allergiás reakció órákkal az allergénnel való találkozás után?

11.4.2. Diagnózis

- 8) Mire utal a szérum triptáz és vizelet hisztamin emelkedett értéke?

11.4.3. Terápia

- 9) Miért jó, hogy emelkedik a páciens allergén-specifikus IgG szérum szintje deszenzitizálást követően?

Irodalom:

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology. Saunders, 2011.

Pawankar R, Holgate ST, Rosenwasser LJ. Allergy Frontiers: Epigenetics, Allergens and Risk Factors. Springer, 2009.

Valenta R. The future of antigen-specific immunotherapy of allergy. *Nature Reviews Immunology* 2002 Jun;2(6): 446-53.

Vigh-Conrad KA, Conrad DF, Preuss D. A protein allergen microarray detects specific IgE to pollen surface, cytoplasmic, and commercial allergen extracts. *PLoS One* 2010 Apr 16;5(4): e10174

Holgate ST, Polosa R. Treatment strategies for allergy and asthma. *Nature Reviews Immunology* 2008 Mar;8(3): 218-30.

12. AZ IMMUNRENDSZER TÚLMŰKÖDÉSE II.: II-IV-ES TÍPUSÚ TÚLÉRZÉKENYSÉGI REAKCIÓK

(HOLUB MARIANNA CSILLA)

A II. és III. típusú túlérzékenységi reakciók szintén antitest-antigén kölcsönhatáson alapulnak. Az antigén és antitest által formált immunkomplexek azonban a két folyamatban különbözőképpen alakulnak ki. A II. típus esetében az antitestek a sejtek (szövetek) felszínén fixált antigénekhez kötnek, a III. típus esetében az antigén szolubilis, így a kialakuló immunkomplexek a keringésben sejtektől függetlenül, szabadon keringenek.

12.1. II. típusú túlérzékenység

Az immunkomplexeket sejtfelszíni vagy szöveti antigének, és a hozzájuk specifikusan kötődő IgG ellenanyagok alkotják. Az antigének lehetnek extrinsic, a szervezetbe kívülről bekerülő, idegen, de a saját sejtekre rákötődő antigének, vagy a sejtek felszínén megjelenő saját, intrinsic antigének. Az antitest rákötődése következtében többféle mechanizmus is kialakul:

- az antigént kifejező, antitesttel borított sejtek érzékenyebbé válnak a komplement függő lízissel, az antitest mediálta celluláris citotoxicitással (ADCC) és/vagy az antitesttel való opsonizációt követő fagocitózissal szemben. Ezek az effektor mechanizmusok a sejt pusztulásához vezetnek.
- a szöveti sejteken kifejeződő antigének antitesttel borítva frusztrált fagocitózist váltanak ki, amely során a fagocita sejtekből lítikus enzimek szabadulnak ki. Ennek során nemcsak az adott sejt, hanem a környezetében lévő sejtek egyaránt károsodnak, azaz szövetkárosodás alakul ki.
- Bizonyos esetekben az ellenanyag gátolhatja, vagy stimulálhatja az antigént kifejező sejt funkcióját (pl. acetilkolin-receptor blokkoló autoantitestek Myasthenia gravisban (MG) nem „engedik” az acetilkolin receptorhoz való kapcsolódását). Ilyenkor is felléphet direkt szövetkárosodás. (MG-ben például a posztzinaptikus véglemez komplement mediálta pusztulása acetilkolin-receptor vesztéssel jár, ami a depolarizáció elégtelenségéhez vezet).

12.1.1. Extrinsic antigén által kiváltott II. túlérzékenység (példák)

12.1.1.1. Újszülöttek haemolitikus anémiája

Vörösvértestek szétesésével járó állapot újszülöttekben. A terhesség során a magzatból az anya vérébe a méhlepényen keresztül olyan vörösvértestek kerülhetnek be, amelyekben az apától örökölt antigének vannak, és így az anya szervezete számára testidegenek. Az anya szervezete ezekkel az antigénekkel szemben antitesteket termel, amelyek a méhlepényen átjutva károsítják a magzat vörösvértesteit, és a magzat haemolitikus betegségéhez vezetnek. A termelődő antitestek az első magzatra nincsenek hatással, csak az ezt követő magzatok fejlődését befolyásolhatják. (Hasonló folyamat játszódhat le akkor is, ha a terhes nő testidegen antigént tartalmazó vérátömlesztésben

részesül. A természetesen meglévő vércsoport ellenanyagok, vagy a korábbi vérátömlesztést követően kialakult antitestek már az első magzatot is károsíthatják.)

Leggyakoribb oka az anyai-magzati Rh összeférhetetlenség. Az Rh vércsoportot a D antigént kódoló RHD gén és az RHCE gén együttesen alakítja ki. A leggyakoribb Rh+ kaukázoid vércsoport az DCE (D+), míg az Rh- (D-) az dce.

Ritkábban ABO vércsoport összeférhetetlenség, és Kell antigén (CD238) összeférhetetlenség is lehet oka a magzati hemolízisnek, a tünetek enyhébbek, és nem súlyosbodnak a többedik terhességnél.

A hemolízis tüneteként megjelenő újszülöttkori sárgaság a vörösvértestek széteséséből adódó bilirubin felhalmozódásnak köszönhető. A máj nem képes lépést tartani a bilirubin epébe való kiválasztásával, ez okozza a bőr sárgás elszíneződését. (A bilirubin magas szintje agykárosodást, süketiséget is okozhat). A fototerápia, amiben az ilyen újszülötteket részesítik, a bilirubin lebomlását segíti elő.

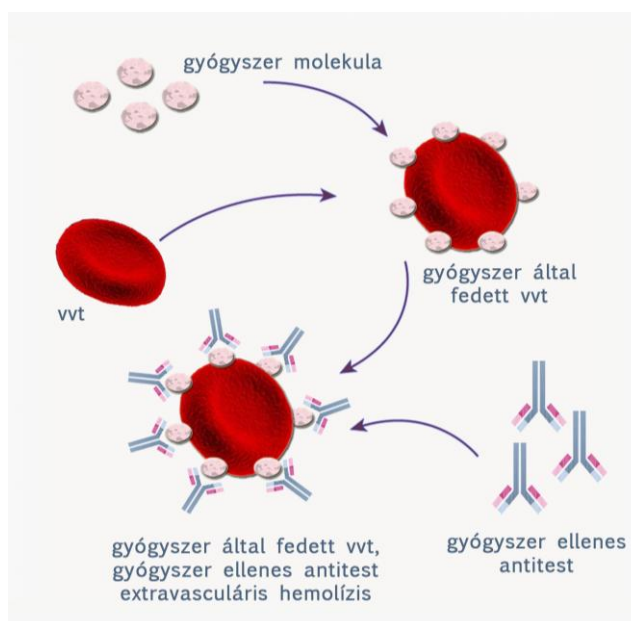
12.1.1.2. Szervátültetéskor fellépő II. típusú túlérzékenység

U.n. transzfúziós reakció alakul ki, ha a donor és a recipiens ABO vércsoportja nem egyezik. Hiperakut allograft kilökődést a donor allogén HLA-ja, mint antigén, váltja ki.

12.1.1.3. Gyógyszer által kiváltott II. típusú túlérzékenység

Gyógyszer által kiváltott II. típusú túlérzékenységi reakciók során a vér alakos elemeire kötődő gyógyszer-molekulák okozzák a keringő sejtek károsodását.

- Haemolitikus anémia: a gyógyszer, ami a vörösvértestekhez köt, jellemzően penicillin származék (tetraciklin, eritromicin).
- Trombocitopénia: a gyógyszer, ami a vérlemezékhez köt, jellemzően kininszármazék.
- Agranulocitózis: a gyógyszer, ami a granulocitákhoz köt, jellemzően pirazonon származék (aminophenazon, noraminophenazon) (12. 1. ábra).



12.1. ábra: Példa gyógyszer által kiváltott II. típusú túlérzékenységi reakcióra

12.1.2. Intrinsic antigén – Autoantitest komplex kialakulása következtében kiváltott betegségek (példák)

12.1.2.1. Goodpasture szindróma

Itt az antitest az u.n. Goodpasture antigénhez köt (ami a IV. típusú kollagén alfa3 láncának egyik doménje), ami a vesében a glomerulusok bazális membránján, a tüdőben az alveolusokon fejeződik ki, így ezek a szervek károsodnak.

12.1.2.2. Myasthaenia gravis (MG)

Az acetilkolin-receptor elleni **gátló autoantitest** a neuromuszkuláris kapcsolatokban kifejeződő posztzinaptikus membránreceptorhoz kötődik, ezzel az ingerületvezetést blokkolja. Mivel a betegség sok esetben thymus neoplasiával, vagy hyperplasiával jár együtt, feltételezhető hogy az autoantitestek kialakulásának oka egy, az acetilkolin receptorral homológ fehérje tumoros szövetekre jellemző túlzott jelenléte a thymuszban. Az erre szenzitizálódó nagy számban létrejövő tumorspecifikus helper T-sejtek segítik a nagy affinitású IgG-t termelő plazmasejtek kialakulását. A feltételezést alátámasztja, hogy mikor a terápia során a betegekből eltávolították a thymuszt, és sejtjeit szuszpendálva in vitro tenyésztették, anti-acetilkolin receptor antitestek spontán szintézise volt megfigyelhető. Az MG anyák esetében 1:8 arányban születnek átmenetileg (2-3 hétig tartó) MG tüneteket mutató újszülöttek, ami az autoantitest placentán való átjutására utal.

12.1.2.3. Basedow-kór

A TSH-receptor elleni serkentő autoantitest a TSH-t mimikálja, ezzel a pajzsmirigyet túlzott működésre készíti, ami hyperthyreosist okoz. A serkentő autoantitestek terhességben a placentán átkerülve az újszülött neonatalis hyperthyreosisához vezethetnek. Ezért különösen fontos a terhesség alatt az ilyen anyák hormon és antitestszintjének követése.

12.1.3. Diagnózis

1. Sejteket fedő antitestek kimutatása (az újszülött/ szervátültetett vagy transzfundált beteg/ gyógyszerelt beteg/ autoimmun beteg szervezetében)

Agglutinációs direkt vizsgálattal:

- Coombs teszt vagy DAT (direct antiglobulin test):

Az antitesttel fedett sejtek a Coombs reagenssel reagálva agglutinálódnak. (A Coombs reagens kecske szérum, ami anti-humán IgG/IgM/C3 antitestet tartalmaz).

- Mikro-oszlop teszt:

Az antitesttel fedett sejteket rávisszük az oszlopban egy magas denzitású médiumra, ezen átcentrifugázva kapcsolódnak a médiumban lévő anti-humán IgG/IgM/C3 antitestekkel. A következő centrifugációs lépésnél az oszlop alján lévő gélen csak a nem agglutinált sejtek tudnak átjutni. Ha a sejtek antitesttel fedettek, és agglutinálódtak, fennmaradnak a géloszlop tetején.

2. A szérumban szabadon keringő antitestek kimutatása (terhes anya/ szervátültetésre váró recipiens/ gyógyszerelendő beteg szervezetében)

Agglutinációs indirekt vizsgálattal:

- Indirekt Coombs teszt:

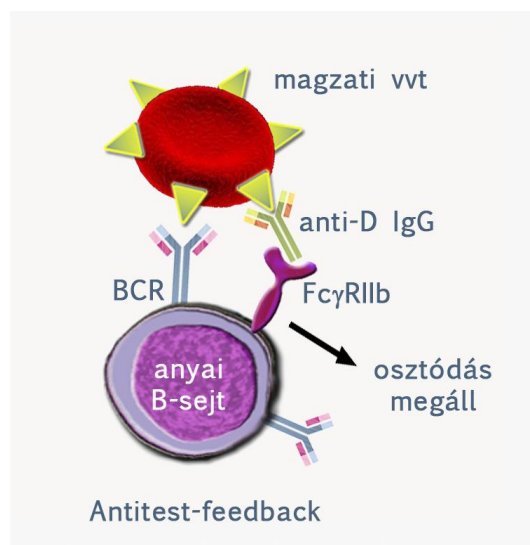
A szérumhoz, amiben az antitest található hozzáadják az Rh+/ donor/ beteg vérért, aztán a Coombs reagenst. A szérumban lévő antitest jelenlétét az agglutináció jelzi.

12.1.4. Terápia

Az elsődleges cél, az antitest antigénhez való kapcsolódásának megakadályozása. Két példával illusztráljuk, milyen immunológiai alapú beavatkozás szünteti meg a tüneteket.

1. Rh inkompatibilitás esetén esetében profilaktikus anti-D IgG-t (Rh-immunglobulint) adnak az Rh- anyának intramuszkuláris injekció formájában, 72 órán belül az első gyermek születése, vagy esetleges spontán vagy művi abortusz után. A következő terhesség megfelelő szakában szintén elvégzendő a profilaxis. Az anyai lépbe kerülő magzati vvt-k így a mesterségesen bevitt antitesttel lesznek fedettek, amely:

- elősegíti a magzati vvt-k fagocitózissal való eltávolítását, így nem kerülnek kapcsolatba az anya D antigén specifikus B-sejtjeivel.
- amennyiben mégis találkoznak a specifikus anyai B-sejtekkel, az epitópokat fedik a mesterségesen bevitt antitestek, így az anyai antitestek nem férnek hozzájuk.
- amennyiben mégis kapcsolatba kerülnek az anyai B-sejtek az epitóppal, a vvt-k felszínén már ott lévő mesterségesen bevitt antitestek negatív feedback-kel megakadályozzák a B-sejt osztódást. (12.2. ábra).



12.2. ábra: Az anti-D immunglobulin negatív kostimulációs hatása

2. serkentő és gátló autoantitestek okozta betegségekben az okokat (autoantitestek képződését) megszüntetni egyelőre nem/részlegesen tudjuk csak.

A gátló autoantitest jelenlétében kialakuló Myasthenia gravisos betegeknél az okok megszüntetése bizonyos esetekben a tímusz eltávolításával érhető el, más esetekben a saját acetilkolin életidejének növelésével, kolineszteráz inhibitorok adásával kezelhetők a tünetek. A betegség súlyos fellángolásakor plazmaferezissel távolítják el, vagy intravénásan adva gátló antitesttel gátolják az acetilkolin receptor elleni antitesteket. Természetesen más, nem immunológiai alapú gyógyszeres terápia is használatos a tünetek mérséklésére.

12.2. III. típusú hiperszenzitivitás

Az immunkomplexek antigénjei lehetnek exogének – pl. gyógyszerek, kórokozó eredetűek –, vagy endogének, mint pl. a DNS szisztémás lupus erythematosusban (SLE). Az antigének mennyisége általában meghaladja a rá specifikus antitestek mennyiségét.

Az alacsony affinitású antitest kedvez az immunkomplex betegség kialakulásának: rossz hatásfokú az eliminációhoz, ez kedvez a termelődésének, a keringésben maradásának és immunkomplex formáló képességének.

A kialakuló immunkomplexek mérete is befolyásolja a betegség kialakulását. A nagyobb immunkomplexeket a fagociták jobb hatásfokkal kebelezik be, távolítják el a keringésből, mint a kisebbeket.

A szövetkárosító immunkomplexek:

- a vérben képződnek, majd a keringésből kilépve, később az erek falában lerakódnak. A kationos antigéneket tartalmazó immunkomplexek nagyobb aviditással kötnek az erek falában és a vese glomerulusaiban található negatív töltésű membrana basalisához. A lerakódás mértéke függ az immunkomplexek méretétől (kisebbek tovább vannak a keringésben, nagyobb eséllyel rakódnak le), összetételétől is. Ezt nem az antigén, hanem az antitest szabja meg. A legtipikusabb, a szövetkárosítást leghatékonyabban előidéző antitest az IgG, néha IgM, legritkábban IgA is található a komplexekben.
- In situ, az antigénlokálizáció helyén alakulnak ki.

A lerakódott immunkomplexek gyulladásos folyamatot indítanak el. Az immunkomplexek aktiválják a komplement rendszert (gyulladásos sejtek kemotaxisa, toborzása fokozódik), a neutrofil és bazofil granulocitákat (FcγRIII-on át) és a trombocitákat. A vérlemezkék és bazofil granulociták által kibocsájtott vazoaktív aminok az érfalak permeabilitását növelik, a lerakódott immunkomplexekhez vándorló neutrofilek frusztrált fagocitózissal károsítják az immunkomplex környezetében lévő sejteket, szövetet. A szövetkárosodás mechanizmusa független a lerakódás helyétől.

A szövetkárosodás következménye függ a lerakódás helyétől. Az előfordulási gyakoriság szerint leginkább a bőrt, kevésbé a vesét, a gasztrointesztinális rendszert, az ízületeket, legkevésbé a központi idegrendszert érintik a lerakódások. Az érfalban lerakódó immunkomplex esetén vasculitis, a vese glomerulusainak bazálmembránjában lerakódók esetén glomerulonephritis, az ízületek szinoviális membránjában lerakódóknál arthritis alakul ki.

Példabetegségek:

- Arthus reakció – bőrben alakul ki, jellemzően IgG-vel létrejött komplexek miatt.
- Henoch–Schönlein purpura (vérzés) – bőrt, vesét érinti, IgA-val létrejött komplexek miatt.
- Fertőző betegségeket követően, mikor a patogén nem eliminálódik - pl. torokgyulladás után poszt streptococcalis glomerulonephritis vagy endocarditis
- SLE – krónikus, szisztémás autoimmun megbetegedés, ami a vesét, ízületeket, bőrt és a szív hajszálereit, valamint a serosus felszíneket egyaránt érinti.
- Akut szérum betegség – szisztémás, IgG-vel létrejött komplexek miatt kialakuló vasculitis, glomerulonephritis, arthritis.

12.2.1. Lokális III. hiperszenzitivitásra jellemző példabetegség

Farmertüdő – a megbetegedés gyakori mezőgazdasági munkát végző, takarmánnyal napi rendszerességgel találkozó emberek közt, innen származik az elnevezés.

Az antigén jellemzően a bepenészedett szénából származó baktérium – *Thermoactinomyces* –, ami belélegezve kerül a szervezetbe. Az I. típusú hiperszenzitivitástól eltérően nagy mennyiségben található meg a páciens környezetében.

A betegség tünetei: (lokális) gyulladásos tünetek, ebben az esetben a tüdő gyulladása (pneumonitis).

Az immunológiai diagnózishoz a baktérium elleni antitest, ill. a baktérium antigén kimutatására alkalmas tesztek használatosak:

- immundiffúzió: precipitációs teszt
- komplement fixáció
- latex agglutináció

12.2.2. Akut szisztémás III. hyperszenzitivitásra példabetegség

Szérumbetegség:

A kiváltó antigén lehet gyógyszer, pl. penicillin.

A tünetek 7-10 nappal az antigén expozíció után alakulnak ki: vasculitis, glomerulonephritis, arthritis.

Az immunológiai diagnózis az előzőekkel egyező (lásd lokális II. típusú hyperszenzitivitás)

12.2.3. Krónikus szisztémás III. hyperszenzitivitásra példabetegség

Az **SLE** esetében az antigén endogén nukleáris antigén. Ez a betegség a 10. fejezetben került tárgyalásra.

Mivel az I., a II. és a III. típusú túlérzékenység kialakulásánál egyaránt antitestek játszanak szerepet, és sok esetben ugyanaz az antigén is lehet kiváltó ok (pl. penicillin), fontos ismerni a főbb különbségeket. Ezeket a 12.1 táblázat tünteti fel.

III. típusú gyógyszer okozta szérumbetegség	I. típusú gyógyszerallergia	II. típusú gyógyszer okozta anémia
Penicillin	Penicillin	Penicillin
↓	↓	↓
Penicillin-protein	Penicillin-protein	Penicillin-vvt
↓	↓	↓
IgG	IgE	IgM, IgG
↓	↓	↓
IgG immunkomplex a keringésben	IgE-Hízósejt	Komplement
↓	↓	↓
Lerakódás és szövetkárosítás	Szisztémás	Vvt. lízis

12.1. táblázat: I-III. típusú túlérzékenység

12.2.4. Terápia

A lokális és akut megbetegedéseknél a kiváltó anyag kerülése vezet leginkább célra. Emellett a gyulladás gyógyszeres gátlása mellett, súlyos esetekben a plazmaferezist, mint a keringő immunkomplexek eltávolításának módját alkalmazzák. Krónikus esetekben (pl. SLE) immunológiai terápiaként az 6. fejezet keretein belül tárgyalt módon B-sejt blokkoló antitesteket és a B-sejt kostimulációjában szerepet játszó molekulákat (pl. CD40L) blokkoló antitesteket alkalmaznak, amivel lecsökkenthető a B-sejtek, ezen belül az autoantitestek termeléséért felelős B-sejtek száma. Korai és preklinikai kipróbálás alatt állnak olyan terápiák is, amelyek a tolerancia kialakítását célozzák az ismert antigének ellen.

12.3. IV. típusú hiperszenzitivitás – késői típusú túlérzékenység

Késői típusú, mert 12 óránál hosszabb idő, de akár hetek is kellenek a tünetek kialakulásához.

Az antigén nem antitestekkel kapcsolódik, hanem **sejtes immunválaszt vált ki**: a reakció CD4+, CD8+ T-sejtek, makrofágok és bazofil granulociták közreműködésével alakul ki.

A szenzitizációban a CD4+ Th1 sejtek játszanak antigén felismerésükkel szerepet. Az antigén expozíció helyén általuk kibocsátott citokinek (IFN-gamma, IL-2, TNF-beta, TNF-alfa, GM-CSF, IL-3) a makrofágok és citotoxikus T-sejtek akkumulációját és aktivációját váltják ki, amelyek a lokális szöveti károsodást okozzák.

Az alábbi táblázat a IV. típusú túlérzékenység három altípusának jellegzetességeit foglalja össze.

SZINDRÓMA	ANTIGÉN	KÖVETKEZMÉNY
Késői típusú túlérzékenység (szoros értelemben vett DTH)	Fehérjék: Rovar fehérje Mikobakteriális fehérje (tuberkulin, lepromin)	Lokális bőrduzzanat: Eritéma (bőrpír) Induráció (megkeményedő bőrfelület) Sejtes beszűrődés Dermatitis
Kontakt túlérzékenység	Haptének: Pentadeka-katekol (mérges szömörce anyaga) parafeniléndiamin Kis fém ionok: Nikkel, króm	Lokális bőr reakció: Eritéma Sejtes beszűrődés Hólyagok Intra-epidermális gócok
Glutén szenzitív enteropátia = Cöliákia = lisztérzékenység	Gliadin (gabonafehérje)	A vékonybél mikrobolyhok atrofíája Alultápláltság Hasnyálmirigy exokrin szekréciója károsodik

12.2. táblázat: A IV. típusú túlérzékenység altípusai

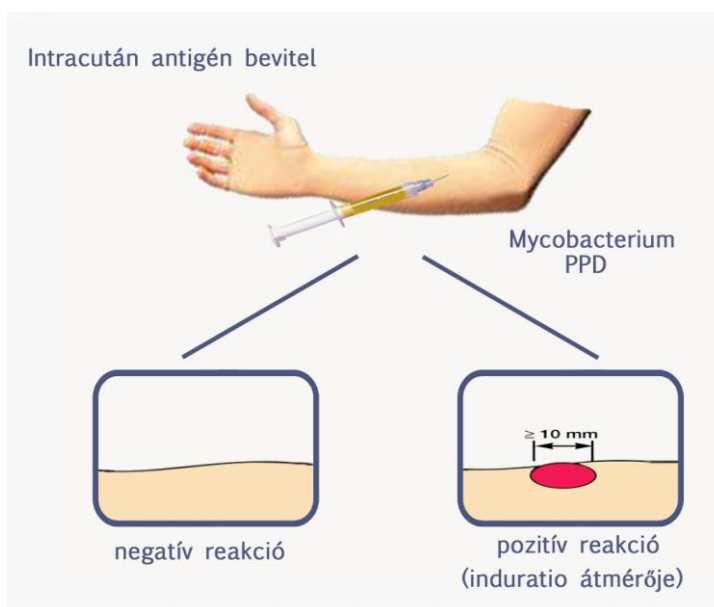
12.3.1. Késői típusú túlérzékenység bőrteszt

Ezeket a bőrteszteket a klinikumban arra alkalmazzák, hogy kimutassák a már lezajlott, vagy aktuális fertőző betegségeket, az általuk bejuttatott antigéneket. Ha a szervezet már találkozott a fertőző ágenssel, akkor a T-sejtes memória révén intenzív bőrreakciót ad a kórokozóra jellemző antigénre. (A vizsgálattal azt nem lehet pontosan eldönteni, az illető aktuálisan szenved-e a betegségben, vagy már átesett rajta és védettsége van). A bőrtesztnél felhasznált anyag lehet a tuberculin – TBC kimutatásra (Mantoux próba), a lepromin - lepra kimutatásra, a histoplasmin – Histoplasma capsulatum nevű gombafaj okozta megbetegedés – főként tüdőfertőzés kimutatására, vagy a candidin – Candida gombafertőzés kimutatására.

Diagnosztikai példa: Tuberkulin próba / Mantoux próba (12.3. ábra)

A TBC fertőzés ill. Magyarországon a BCG védőoltás eredményességének kimutatására alkalmas.

A vizsgálat során a bőrbe (intracutan) juttatnak injekciós tűvel egy speciális, a tuberkulózist okozó *Mycobacter tuberculosis* (TBC) baktériumból készített, nem kórokozó kivonatot. Ez lehet OT= old tuberkulin, a baktérium in vitro tenyésztési médium koncentrátuma, amiben *M. tuberculosis* tenyésztettek, vagy gyakrabban purified protein derivative (PPD), szintén a tenyésztési médiumból precipitálva. Az immunsejtek az injekció helyén duzzanatot hoznak létre és gyulladásos elváltozást okoznak, mely attól függően, hogy az illető egészséges, aktuálisan beteg-e vagy korábban volt tuberkulózisos, különböző méretű lehet. A gyulladásos elváltozás csak napok múlva éri el a legnagyobb kiterjedését, ezért az eredményt rendszerint 3-5 nap múlva olvassák le. Ha valakinél a fertőzés már korábban létrejött, a szervezet érzékenyebb a kórokozó ellen és hevesebben reagál az abból készített kivonatra (T-sejtes memória). Az egészségesek bőrén az induráció (megkeményedett bőrkiemelkedés) az 5 mm-es átmérőt nem haladja meg, fertőzés esetén azonban (10mm) meghaladja. A bőrpír önmagában nem számít.



12.3. ábra: Tuberkulin / Mantoux próba

12.3.2. Kontakt túlérzékenység / kontakt dermatitisz

Kontakt túlérzékenység / kontakt dermatitisz során haptének – olyan kis molekulák, amik önmagukban nem váltanak ki immunválaszt - kapcsolódnak hozzá a saját fehérjékhez.

A leggyakoribb kontakt dermatitist kiváltó anyagok lehetnek

- fémek, pl. a bőr cserzésekor használt kobalt, a bizsukban lévő nikkel,
- növényi olajok, pl. a mérges szömörceben megtalálható urushiol (pentadeka-katekol)
- szintetikus anyagok pl. a színintenzitást növelő parafeniléndiamin (szintén PPD-nek rövidítik, de nem tévesztendő össze a purified protein derivative-val) kozmetikai, ruha és szőrme festékekben.

A dendritikus sejtek ezeket felveszik és bemutatják CD4+ és CD8+ T-sejteknek, amelyek haptén-peptid specifikus effektor T-sejtekként a nyirokcsomókból a bőrbe vándorolnak. A következő expozíciókor a haptén-peptidek a lokális, bőrben lévő effektor T-sejteknek bemutatva váltják ki a T-sejtek aktivációját, és a lokális effektor hatásokat.

Diagnosztikai példa: Epikután bőrteszt (Patch-teszt) kontakt dermatitiszre

Epikután bőrtesztnél a hát bőrére a leggyakoribb allergénekkal átitatott tapaszt ragasztanak, amit 48 óra múlva levesznek. A reakció eredményének leolvasását 96 óra (4. nap-6. nap) múlva is megismétlik.

A leggyakrabban használt diagnosztikai standard sorokban a leggyakoribb kontakt dermatitist okozó anyagok (33 allergén) vannak. Léteznek speciális tapaszok is: a fogászati sor - fogászatban használt anyagokra (15 allergén alapsor, + 8 allergén kiegészítő sor), egy másik a fémallergia kimutatására (24 allergénnel a teljes sorozat) alkalmas, de gyógyszerekből, élelmiszerekből, fertőtlenítőkből, festékekből, illatanyagokból stb. származó mintát tartalmazó sorok is léteznek. A gyárilag forgalmazott sorokat u.n. finn chamber formában hozzák forgalomba. A leolvasásnál a bőrpírt és a helyi duzzanatot egyaránt figyelembe kell venni.

12.3.3. Glutén szenzitív enteropátia

A túlérzékenység kialakulásáért egy 33 aminosavból álló peptid felelős, ami a gluténból alakul ki. A glutén (sikér) a búza, az árpa, a rozs és a zab magjában található gliadinból és gluteninből álló fehérjekeverék.

A gliadin az emésztéskor egy 33 aminosavas peptidre hasad, ami képes kötődni a szöveti transzglutamináz (tTG: tissue transglutaminase) nevű enzimhez. A tTG deamidálja a gliadinpeptidet, negatív töltést biztosítva neki. Bizonyos HLA-molekulák, a lamina propria antigénprezentáló sejtjein expresszálódva ezeket a negatív töltésű gliadinpeptideket tudják bemutatni a T-sejteknek. Azoknál az egyéneknél, akik ilyen HLA-haplotípussal rendelkeznek (ilyen a DQ2 vagy DQ8, amiket a HLA-DQA1 és HLA-DQB1 allélok kódolnak), a glutén reaktív T-sejtek aktiválódnak, citokineket pl. IFN gammát termelnek, s ezzel gyulladásos folyamatot indítanak el a bélben (cöliákia). A gyulladásos folyamatok során a gyulladt bélterületen található plazmasejtek antitesteket és autoantitesteket kezdenek el termelni.

A felmerülő cöliákia diagnózisához először szerológiai vizsgálatokat végeznek el (természetesen a diagnózis felállításához egyéb vizsgálatok is szükségesek, pl. vékonybél-biopszia szövetmintavétellel a gyulladásos – boholyatrófiás állapot igazolására).

A glutén szenzitív enteropátia diagnózisában használatos szerológiai, cöliákia-specifikus ellenanyag-vizsgálat:

A tesztek a vérsérumban lévő IgA vagy IgG típusú antitestek kimutatását célozzák:

- gliadin-ellenes (AGA)
- deamidált gliadin peptid antitest (a-DGP)

A gliadinra adott immunválasz során keletkezett antitestek kimutatása azért is fontos, hogy a betegséget el lehessen különíteni a glutén beviteltől teljesen független, de ugyancsak bélboholy-atrófiával járó egyéb betegségektől

- endomysium-ellenes (EMA)

Az endomysium a vékonybél finom izomrostjait körülvevő kötőszöveti fehérje. Az anti-endomysium antitesteket a bélfalak folyamatos károsodására válaszként termeli a szervezet. (Az EMA antitestek kimutatását a vékonybélből nyert szövetmintán is elvégezhetik)

- transzglutamináz-ellenes. (a-tTG)

A (saját) transzglutamináz a hozzá kapcsolódó (idegen) gliadinpeptiddel hálózatos szerkezetet alkot, az így keletkező autoantigén nagyon stabil szerkezetű.

Az anti-tTG és anti-EMA antitestek ugyanazt a szövetkárosodást jelzik.

Az antitestek koncentrációja a vérben, arányban áll a betegség súlyosságával, és jól lehet belőle a következtetni a betegség lefolyására.

Az IgA vizsgálatok specifikusabbak (helyi mucosális plazmasejtek termelik), az IgG változatot az IgA vizsgálat kiegészítéseként szokták végezni.

12.3.4. Terápia

A leghatékonyabb terápia itt is, mint eddig is, a kiváltó anyagok, pl. fémekkel való érintkezés elkerülése, vagy a gluténmentes diéta. A gyulladást csökkentő gyógyszeres terápia mellett az immunológiai terápia, mint a T-sejtes válasz gátlása immunszuppresszív szerekkel (ciklosporin) is használatos. Emellett évről évre újabb anyagokat fejlesztenek ki a T-sejtes válasz gátlására, melyek például a B7 kostimulációs molekula blokkolásával, vagy az IL-2 receptor blokkolásával fejtik ki hatásukat. A patogén T-sejtek toleranciájának kialakítása a legújabb terápiás cél, de klinikai eredmények ezzel kapcsolatban még nincsenek.

13. IMMUNOLÓGIAI TERÁPIÁK

(NAGY GYÖRGY, PÁLLINGER ÉVA, PÁL ZSUZSANNA)

A gyógyítás célja a betegségek megelőzése és kezelése, a kezelés célja pedig a betegség okának megszüntetése. Az orvostudomány több évezredes történetében számos kezelési módszert alkalmaztak, amelyek közös vonása a „*primum nil nocere*”, azaz, a sohasem ártani elve volt.

Habár a gyógyszerkutatók törekvése a mellékhatás-mentes gyógyszerek kifejlesztésére irányul, még napjainkban sem büszkélkedhetünk ilyenekkel. Úgy tűnik, a hatás és a mellékhatás egymástól elválaszthatatlanok. A kezelés célja persze minden esetben az, hogy a választott terápia hatása megelőzze a mellékhatásokat.

A molekuláris genetika robbanásszerű fejlődése (1990 és 2003 között, a *Human Genome Project* eredményeként ismertté vált a teljes humán genom) lehetővé tette a betegségek patomechanizmusának molekuláris szintű feltérképezését és új terápiás célpontok felfedezését. A molekuláris „ujjlenyomatok” felhasználásával megalkotott gyógyszereken alapul a célzott molekuláris terápia és a személyre szabott gyógyítás.

A teljes humán genom-szekvencia feltérképezése a gyógyszertervezés mellett a gyógyszer kipróbálás és bevezetés folyamatát, ill. a terápiás hatékonyság nyomon követését is forradalmasította.

13.1. Alapfogalmak

Immunterápia (= bioterápia, biológiai terápia)

Az immunológiai terápiák a szervezet saját immunrendszerének működését befolyásoló kezelési módok. Céljuk az immunválasz módosítása (normalizálás, stimuláció, szuppresszió, stb.) annak érdekében, hogy a szervezet önmaga, hatékonyan tudja felvenni a harcot a betegséggel szemben.

Biológiai választ módosító szerek (*biological response modifiers = BRMs*)

A biológiai választ módosító szerek olyan molekulák, amelyek az egészséges szervezetben is szintetizálódnak, habár élettani koncentrációjuk általában nagyon alacsony. Hatékonyan aktiválják a szervezet válaszreakcióit a fertőzések és a patológiás folyamatok elleni védekezés során. Terápiás felhasználásukat az teszi lehetővé, hogy modern laboratóriumi módszerekkel nagy mennyiségben állíthatók elő.

Nanotechnológia az orvostudományban

A nanotechnológia atomi szintű (100 nm alatti mérettartomány), irányított építkezést jelent. A nanomedicina 2 területre fókuszál: a gyógyszeres terápiára és a képalkotó eljárások fejlesztésére. A nanotechnológia terápiás alkalmazásának legfőbb célja a meglévő gyógyszerek hatásfokának növelése, amit a hatóanyag felszívódás és leadás javítása (csökkenthető a dózis) és a szöveteloszlási sajátságok optimalizálása révén (célzott célba juttatás) kíván megvalósítani. Lehetséges előnyei között tarthatjuk számon az oldékonysági és stabilitási problémák kiküszöbölését, a korábban

nehézkessé teszi a beviteli utak kiaknázását (inhalációs és intranazális útvonalak) és a terápiás beavatkozások individualizálását.

A nano-gyógyszerek közös jellemzője, a multimodularitás és a multifunkcionalitás. A multimodularitás azt jelenti, hogy a nano-gyógyszerek legkisebb, vízzoldékony eleme több, egymástól független funkciót ellátó modulból áll. A gyógyító funkcióért a hordozó egység felszínéhez kötött, vagy a belsejében szállított, hagyományos gyógyszermolekula felelős. A kiegészítő modulok segítik a felszívódást, a metabolizmust, javítják a szöveteloszlást és biztosítják a specifikus célbajuttatást. A nanorészecskék felszerelhetők jeladó csoportokkal is (pl. fluoreszkáló csoporttal), így nyomon követhetők az általuk előidézett változások.

A technológia pl. forradalmasíthatja a neuropszichiátriai kórképek gyógyítását, hiszen lehetővé teszi a gyógyszerek vér-agy gáton történő áthatolását, ami alapvető feltétele a sikeres gyógyszeres terápiának.

Biológiai gyógyszerek (biológikumok)

Biológiai gyógyszerek néven különítik el azokat a terápiás szereket, amelyek hatóanyagai biológiai forrásból származnak (pl. rekombináns DNS technológia -*Genetic engineering*-, „biológiai üzemek”), vagy valamilyen biológiai mintából vonták ki őket. Leggyakrabban makromolekulák, főként fehérjék.

13.2. Célzott molekuláris terápia (CMT, *targeted molecular therapy*, *targeted therapy*)

A célzott molekuláris terápia a sejtek azon struktúrái és mechanizmusai ellen irányul, amelyek főként patológiás állapotban fejeződnek ki, azonban a fiziológiásan működő sejtekre nem jellemzők. Ezáltal, szemben a hagyományos gyógyszereléssel, a célzott molekuláris terápia elsősorban a célsejteket (*target*) támadja, de az egészséges sejteket nem veszélyezteti. Ez a mellékhatások spektrumának szűkülését és a kezelés hatékonyságának fokozódását eredményezi.

A CMT fogalmát leggyakrabban a daganatterápiákra vonatkoztatják. A CMT hatása a tumorsejtek növekedése szempontjából esszenciális molekuláris útvonalak gátlása, ill. akadályozása révén valósul meg, szemben a hagyományos kemoterápiás szerekekkel, amelyek a nagy osztódási képességű sejteket is elpusztítják.

A CMT eszköztárát 2 fő csoportba lehet sorolni: 1) kis molekulák (*small molecules*) és 2) monoklonális ellenanyagok. A kis molekulák (<500 dalton) nagy affinitással tudnak fehérjékhez, nukleinsavakhoz vagy poliszacharidokhoz kötődni. Kötődésük megváltoztatja a célmolekulák aktivitását vagy funkcióját. A kis molekulásúly lehetővé teszi számukra a gyors átjutást a plazmamembránon, ezért intracellulárisan is kifejthetik hatásukat. (A monoklonális ellenanyagok terápiás jelentőségét a 3.2.1. fejezetben részletezzük).

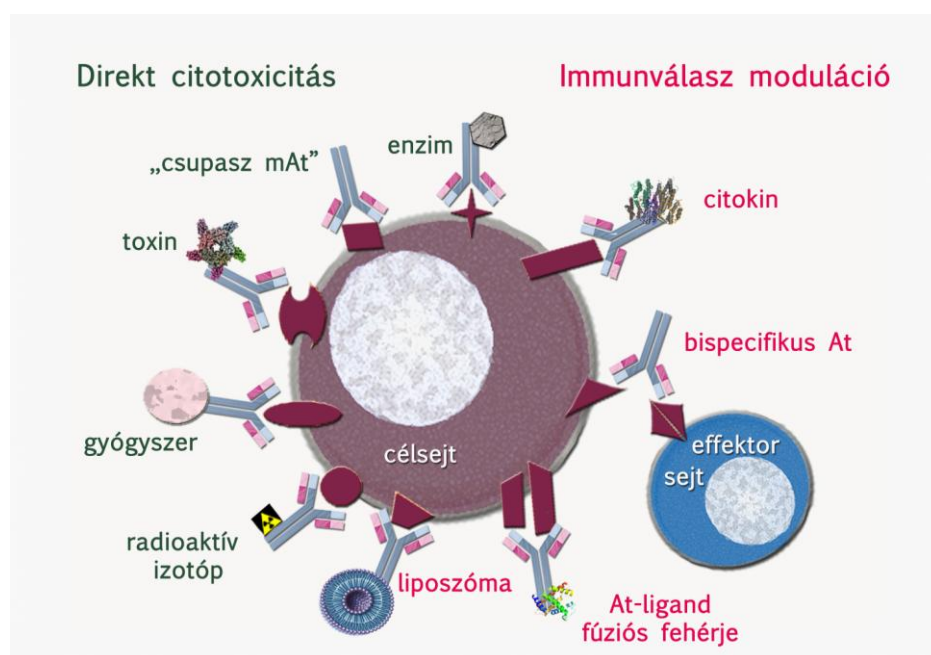
13.2.1. Irányított célbajuttatás

A napjainkban használt gyógyszerek többsége a véráramon keresztül érkezik el arra a helyre, ahol a hatását ki kell fejtenie. Ez azt jelenti, hogy egyrészt a szükséges hatás eléréséhez nagy koncentrációban kell bejuttatni őket a szervezetbe, hiszen a véráramban felhígulnak, másrészt

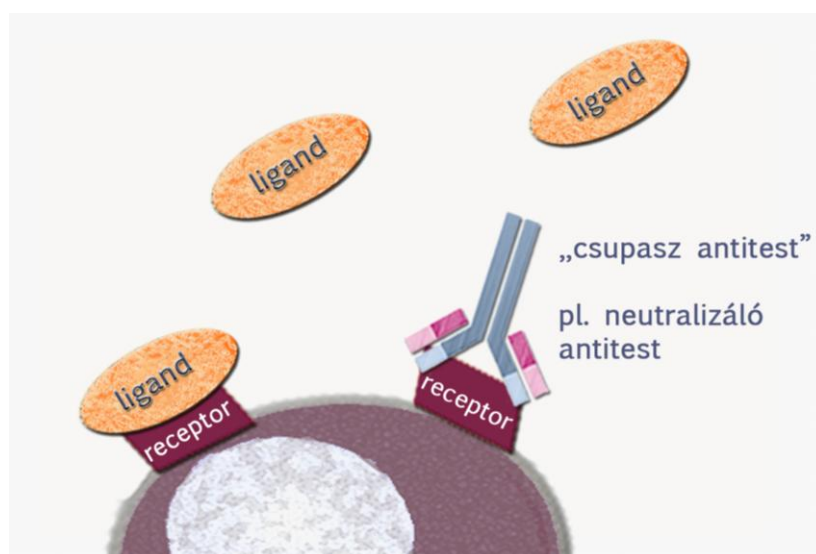
nemcsak ott fejtik ki a hatásukat, ahová szánták őket. Megfogalmazódott tehát a specifikus célbajuttatás igénye. Az elgondolás szerint a „jelzéssel” ellátott hatóanyagok a jelzőanyag révén ismerik fel a célsejteket, specifikusan csak hozzájuk kötődnek, így a szállított gyógyszer hatása lokalizálható. Ezzel csökkenthető a bevitt dózis, optimalizálódik a szöveti eloszlás és drasztikusan csökkennek a mellékhatások.

13.2.1.1. Célbajuttatás monoklonális ellenanyagokkal

A gyógyszerekkel, radioaktív részecskékkel vagy toxinokkal konjugált monoklonális ellenanyagok gyakorlatilag szállítóeszköznek (*homing device*) tekinthetők, amelyek a terápiás szereket közvetlenül a kívánt hatás helyére juttatják. Előnyük, hogy jelentősen megnövelik a terápiás hatékonyságot és csökkentik az egészséges sejtek gyógyszer okozta károsodását. Mellékhatásaik elsősorban a monoklonális ellenanyaghoz kötött hatóanyagok fajtájától függ (13.1-2. ábra).

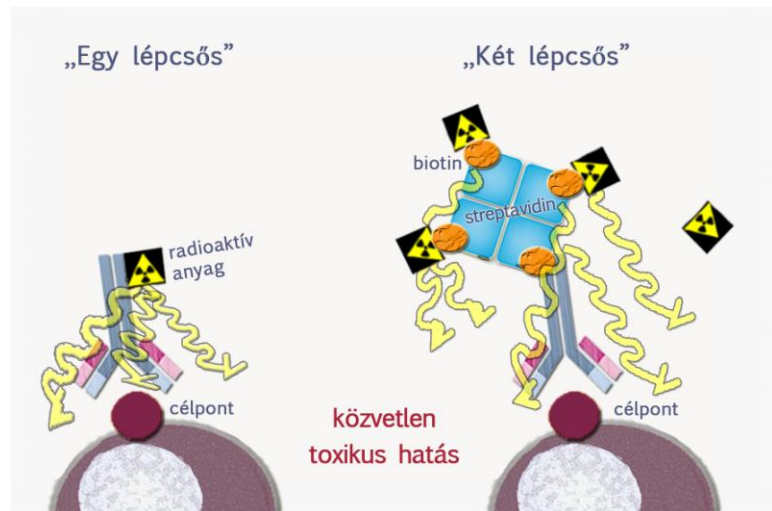


13.1. ábra:
Célbajuttatás
monoklonális
ellenanyagokkal



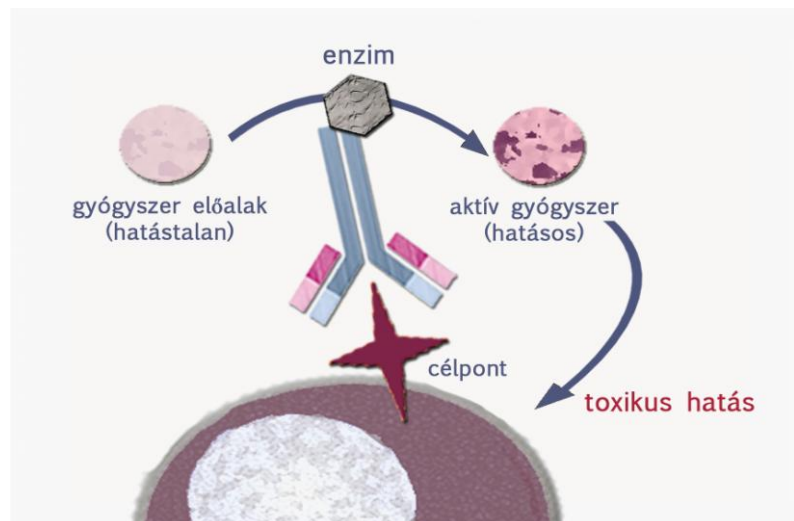
13.2. ábra: A
neutralizáló antitest
lehetséges
hatásmechanizmusa:
kompetíció a liganddal

A konjugált monoklonális ellenanyagok által közvetített kezelési módokat a célba juttatandó anyag típusa alapján osztályozzák. A radioaktív részecskékkel konjugált monoklonális antitest-kezelés a radioimmun-terápia (pl. Ibritumomab tiuxetan, Tositumomab) (13.3. ábra),

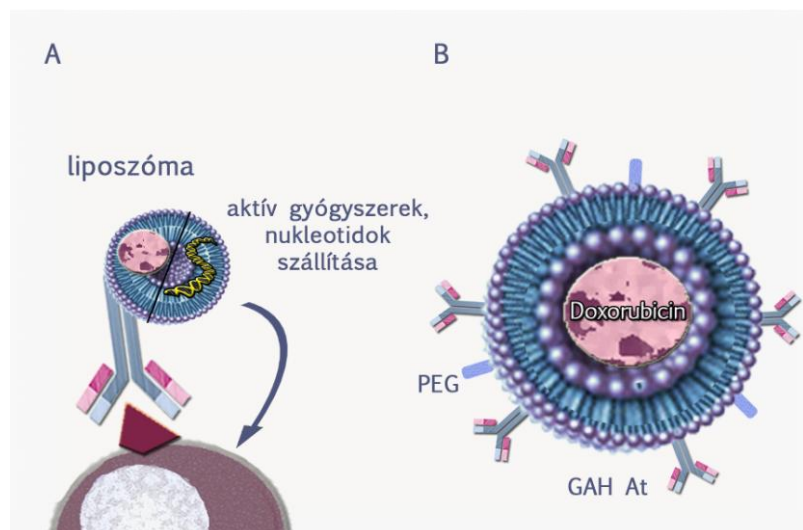


13.3. ábra: A radioimmunoterápia elve radioaktív

a kemoterápiás szerekkel konjugált monoklonális ellenanyagokkal végzett kezelés a kemo-immun terápia (jelenleg még kísérleti fázisban van) (13.4-5. ábra), illetve a bakteriális (diphtheria toxin, pseudomonas exotoxin) vagy növényi (ricin A, saporin) toxinokkal konjugált ellenanyagokkal végzett kezelés az immuntoxin terápia (pl. gemtuzumab ozogamicin, BL22).



13.4. ábra: Az immuntoxin terápia elve



13.5. ábra: Liposzomális gyógyszer-célbajuttatás

13.2.1.2. Célbajuttatás peptidekkel

Mivel a gyógyszerek célpontjai leggyakrabban a citoplazmában, vagy a sejtmagban elhelyezkedő molekulák, a célzott terápia megtervezésének kulcskérdése a hatóanyag sejtekbe történő bejuttatása. A sejt-permeábilis peptidok (*cell penetrating peptides* = CPPs) felfedezése lehetővé teszi gyógyszerek és más, pl. jelző anyagok átjuttatását a nagyon specifikus szelektivitású sejtmembránokon. A CPP orvosi alkalmazásának 2 kiemelt területe van: a képzőanyag és a molekuláris radioterápia. Napjaink kutatásai a szövet-specifikus CPP-konstrukciók kifejlesztésére irányulnak (pl. szövet-specifikus enzimekkel aktiválható CPP kifejlesztése, stb.)

13.2.1.3. Kemotaktikus célbajuttatás (*chemotactic drug targeting*)

Az immunológiai alapú terápia speciális formája a kezelni kívánt célsejtek mozgatása, odacsalogtatása a terápiás szer közelébe. A kezelésben használt konjugátumok a következő részekből állnak: 1) hordozó (*carrier*), amely egyben az internalizációt is meghatározza, 2) a kemotaktikusan aktív ligand, amely a célsejtre hat (a célsejteket csalogatja, vagy éppen a nem kívánatos sejteket eltaszítja) 3) a célba juttatni kívánt gyógyszer, és 4) a gyógyszert a hordozóhoz kapcsoló szekvencia (*spacer*).

13.3. Immunterápia

Az immunológiai terápiákat többféleképpen csoportosíthatjuk. Aszerint, hogy a kezelés mennyire támaszkodik a szervezet saját immunrendszerének működésére, megkülönböztethetünk aktív és passzív immunterápiákat, a kiváltott hatás alapján pedig beszélhetünk immunstimulációról és immunszuppresszióról. Mind az aktív, mind a passzív immunterápia megvalósulhat stimuláció és szuppresszió formájában.

13.3.1. Aktív immunterápia

Az aktív immunterápiák olyan beavatkozások, amelyek a gazdaszervezet saját immunrendszerét „vetik be” a betegségek ellen, így a szervezet az alkalmazott kezelés segítségével önmaga, aktívan harcol a gyógyulás érdekében. Aktív immunterápiát lehet kialakítani valamely célmolekula (*target*) elleni immunválasz indukciójával (pl. vakcinálás), az immunválasz hatékonyságának növelésével (pl. az antigénbemutatás fokozásával), de akár az immunválaszt szabályozó mechanizmusok kontrollálásával, gátlásával is (pl. tolerancia indukció).

Aktív immunterápiát leggyakrabban akut és krónikus fertőző betegségek, ill. egyes krónikus megbetegedések (pl. daganatok) kezelése során alkalmazzuk.

13.3.2. Preventív (profilaktikus) vakcinák

Az akut, életet veszélyeztető fertőzések elleni védekezésben előlt vagy legyengített (*attenuált*) kórokozókat tartalmazó preventív vakcinákat alkalmaznak. Elsősorban az olyan vírusfertőzések

megelőzésében van jelentőségük, amelyek után hosszú távú immunológiai védetség marad vissza (pl. fekete himlő, veszettség, tífusz, kolera, HBV, diftéria, tetanusz, stb.). A preventív vakcinákat egészséges szervezetbe juttatják be, a betegség kialakulásának megelőzésére. Ezek a konvencionális, a fertőző ágenssel történő találkozás előtt adott, profilaktikus vakcinák nagyon hatékonyan csökkentik a morbiditást és az incidenciát. Létezik azonban egy kivétel a preventív vakcinák között, a veszettség elleni oltás, amelyet a vírusfertőzés után kell alkalmazni.

A krónikus betegségek elleni küzdelemben kevésbé hatékony az aktív immunizáció. Napjainkban főként azokra a kórképekre fókuszálnak a gyógyszerfejlesztések során, amelyek hátterében vírusfertőzés mutatható ki: pl. májrák (HBV, HCV), méhnyakrák (HPV), Burkitt limfóma és Hodgkin kór (EBV), T sejt leukémia és limfóma (HTLV-1), stb. Ezeket, a többségében daganatok kialakulásának megelőzésére használt vakcinákat (*cancer preventive vaccines*) meg kell különböztetni a betegség fennállásakor alkalmazott, ún. terápiás vakcináktól (*cancer treatment vaccines*).

13.3.3. Terápiás vakcinák

Terápiás vakcinák kifejlesztésének célja a lassú, krónikus lefolyású megbetegedések hatékonyabb gyógyítása (pl. daganatok, autoimmun betegségek, AIDS, tuberculosis, malaria, stb.). A terápiás vakcinák arra készítetik a beteg szervezetet, hogy terápiás ellenanyagokat termeljen, így a betegség súlyossága csökkenjen. A terápiás vakcinák gyakorta ugyanazokat a célmolekulákat mutatják be az immunrendszernek, mint amelyeket a passzív immunterápiában a monoklonális antitestek megcélznak. A terápiás vakcinák kifejlesztésének legnagyobb problémáját az jelenti, hogy adjuváns adása nélkül kell a kívánt hatást (kellő mértékű immunválaszt) elérni.

A napjainkban alkalmazott egyik terápiás vakcinával pl. hatékonyan befolyásolják a subokban zajló *sclerosis multiplex* lefolyását. Ez a készítmény egy, a bázikus mielinproteinrel hasonlóságot mutató szintetikus kopolimert, a glatiramer-acetátot (TEVA: *Copaxone*) tartalmazza. Habár hatásmechanizmusa még nem teljesen ismert, feltételezik, hogy részben a Th1/Th2 egyensúly regulatórikus Th2 irányba történő eltolásával gátolja a gyulladást, ill. glatiramer-acetátra specifikus szuppresszor T sejteket indukál.

13.3.3.1. A vakcinák hatékonyságának növelése

13.3.3.1.1. Adjuvánsok

A vakcina-fejlesztés kulcskérdése, hogy az alkalmazott antigének milyen mértékű és időtartamú ellenanyag választ képesek kiváltani. Az ideális természetesen az lenne, ha életfogytig tartó védetség alakulna ki. Mivel azonban a vakcinákban használt természetes vagy rekombináns fehérjék immunogenitása gyakorta alacsony, a vakcinációt különféle immunválaszt fokozó szerrel együttesen alkalmazzák. A humorális és celluláris immunválasz fokozásának egyik lehetséges módja az adjuvánsok használata. Leggyakrabban alumínium-hidroxidot vagy alumínium-foszfátot használnak, de alkalmasak a feladatra az olaj-víz emulziók is. Habár az adjuvánsok hatásmechanizmusa még napjainkban sem teljesen ismert, valószínűsíthető, hogy lassítják az antigén felszabadulását (depóhatás), így az immunkompetens sejtek számára történő antigén-bemutatás elhúzódik, és az immunválasz fokozódik. Az is igazolást nyert, hogy az adjuvánsok az immunrendszer működését nem

antigén-specifikus módon stimulálják. Ebből kiindulva sikerült kimutatni, hogy hatásukban jelentős szerepe van a mieloid sejtek TLR receptorokon keresztül történő stimulációjának. Jelen ismereteink szerint a 2-es és a 4-es típusú TLR receptorokon keresztül történő stimuláció hatására fokozódik a TNF- α szekréció, az iNOS expresszió és az APC-k (DC-k és Mf-k) vándorlása. A TNF- α szekréció növekedése fokozza a tumorban újonnan képződött erek citotoxikus szerekkel szembeni permeabilitását is, így felerősítve azok hatásukat. Az iNOS expresszió fokozódása miatt megnő a NO termelés, a NO pedig apoptózist indukál a kemoterápia rezisztens tumorsejtekben. A DC-k és a Mf-k vándorlási képességének fokozódása elősegíti az antigén prezentációt a tumorszövetben, közvetve tehát a tumor-specifikus citotoxikus T sejt választ. Klinikai megfigyelés szerint a parenterális TLR2/4 agonista kezelés javítja azoknak a daganatos betegeknek a túlélését, akiknek a kemoterápiás kezelés ellenére visszaesésük (relapszus) volt. Részben ennek a felismerése eredményezte az olyan nanopartikulum-alapú vakcinák kifejlesztését is, amelyek TLR4 és TLR7 ligandot tartalmaznak. Ezek a tapasztalatok szerint nagyfokú és élethosszig tartó neutralizáló ellenanyagválaszt indukálnak. Napjainkban egyre nagyobb érdeklődés kíséri a liposzómák adjuvánsként történő alkalmazását is.

13.3.3.1.2. Az APC funkció fokozása

A tumor-ellenes vakcinák hatásfoka növelhető oly módon is, ha az antigén-bemutató sejtek (APC), pl. a dendritikus sejtek működését fokozzák. Erre többféle lehetőség kínálkozik, pl. serkenthető a DC-k növekedése és differenciálódása (pl. növekedési / aktivációs faktorok hozzáadásával), növelhető a DC indukálta T sejt aktivitás (pl. a stimulációs és kostimulációs útvonalak indukációjával; a gátló útvonalak blokkolásával), fokozható az antigén-bemutató képességük (pl. a DC-k feltöltése szintetikus peptidekkel; virális ill. tumor antigének transzdukciója; tumorsejtekkel történő fúzió). Az ennek következtében kialakuló hatékonyabb tumor-antigén bemutatás hatékonyabbá teszi a tumor-ellenes immunválaszt.

13.3.3.1.3. A citotoxikus T sejtek működésének fokozása

A tumor-asszociált antigénekre (TAA) specifikus citotoxikus T sejtek működésének fokozásával is növelhető a terápia hatékonysága. Alapvetően kétféle stratégia létezik a tumorsejtek elleni celluláris immunválasz növelésére: 1) a T sejt receptoron (TCR) keresztül történő stimuláció és 2) a kostimuláció fokozása. A TCR-on keresztül történő aktivációt a legmegfelelőbb antigén-struktúra kiválasztásával lehet elérni. Ez nem könnyű feladat, hiszen a tumorok gazdaszervezet elleni védekezésének része éppen az is, hogy antigénjeik csak alacsony hatékonyságú immunválaszt indukálnak. Ennek kiküszöbölését célozta meg egy új tudományág, az epitóp tervezés (*epitope engineering*).

13.3.3.2. Citokinek az aktív immunterápiában

A citokinek az immunválasz szabályozása révén potenciális terápiás szernek tekinthetők számos kórképben, pl. a daganatok kezelésében. Hatásmechanizmusuk sokféle: fokozhatják a tumor-ellenes immunválaszt, de közvetlen hatással lehetnek magukra a daganatsejtekre is. Pl. a TNF és az IFN az MHC expresszió fokozásával növeli a tumorsejtek „láthatóságát”, azaz az immunrendszer általi

felismerésüket. Mások, mint a TNF és a TRAIL direkt tumorsejt pusztító hatással rendelkeznek. Az IL-2, az IL-4, az IFN- β és az IL-12 fokozza a citotoxikus T sejtek aktivitását és proliferációját, stb.

A citokineket felhasználják az adoptív immunterápiákban is.

13.3.3.3. Tolerancia indukció

Az immunológiai tolerancia antigén által előidézett fajlagos válaszképtelenség. Habár fiziológiásan a „saját struktúrák” indukálják, kialakulhat idegen antigénekkal szemben is (egyes baktériumok és vírusok, pl. a *Mycobacterium leprae*, tolerancia indukcióval védekezik a gazdaszervezet immunrendszerével szemben). Tolerancia indukciót elsőként transzplantáció után, az idegen szövetek elleni immunválasz védelmében alkalmaztak. Napjainkban egyre több, az immunrendszer hiperreaktivitásával járó kórképének (pl. autoimmun betegségek, allergia) kezelésében is bevezették. Az immunológiai tolerancia terápiás indukciójára többféle lehetőség van: 1) T sejt depléción monoklonális ellenanyagokkal (pl. anti-CD3), 2) kostimuláció gátlása (anti-CTLA-4), 3) szolubilis antigén adagolás, 4) a citolitikus T limfociták és az NK sejtek aktivitásának gátlása szolubilis HLA-I adásával, 5) kevert kimérizmus kialakítása, 6) regulatórikus T sejt indukció.

13.3.3.4. Sejt-alapú immunterápiák

A tumor-ellenes immunválasz sejtes és molekuláris mechanizmusainak ismerete olyan terápiás próbálkozásokat indított el, amelyek a daganat környezetében levő immunsejtek működését változtatják meg. Hatásmechanizmusuk szerint ezek, az ún. sejt-alapú immunterápiák 3 csoportba sorolhatók: 1) a tumor ellenes effektor választ serkentése, 2) bispecifikus antitestek alkalmazása, 3) a daganatok lokális védelmi mechanizmusának, a tumor indukálta immuntoleranciának a gátlása.

13.3.3.4.1. A tumor ellenes effektor választ serkentése

Az adoptív transzfer, a DNS-vakcináció és a DC vakcináció során valamilyen módon a tumor ellenes effektor választ serkentik. Adoptív transzfer esetében a beteg T limfocitáit izolálják, majd *in vitro* körülmények között aktiválják, ill. módosítják. Az *in vitro* T sejt aktiváció leggyakrabban alkalmazott módja a tumor antigénnel és egyidejű IL-2 kezeléssel kiváltott aktiváció. A T sejtek módosításának másik, elvi lehetősége, a daganatsejtre specifikus TCR-ral történő transzfekció. Mindkét esetben az *in vitro* aktivált, ill. módosított, vagyis a tumor ellen érzékenyített T sejteket transzfúzióval juttatják vissza a betegbe.

A DNS vakcináció során a hibás gént izolálják, plazmidba ültetik és így juttatják be a beteg szervezetébe.

DC vakcináció során a beteg egyén perifériás véréből monocitákat, a daganatából pedig tumorsejteket izolálnak. A monocitákból *in vitro* körülmények között, citokin koktél jelenlétében (IL-4, GM-CSF) dendritikus sejteket differenciáltatják. A dendritikus sejteket továbbra is *in vitro* körülmények között a beteg saját tumorából kivont tumor-antigénekkal stimulálják, így hozva létre érett, antigén prezentáló dendritikus sejteket. Ezeket, az immunrendszer stimulációjára alkalmas sejteket transzfúzióval juttatják vissza a szervezetbe. Mind az adoptív transzfer, a DNS-vakcináció és a DC vakcináció létező terápiás lehetőség, de alkalmazásuk eltörpül a daganatok monoklonális antitest terápiája mellett.

13.3.3.4.2. *Bispecifikus antitestek alkalmazása*

A bispecifikus antitesteket olyan, enzimatis módszerrel hasított monoklonális ellenanyagok Fab régióinak összekapcsolásával állítják elő, amelyek egyik része a célsejtet (pl. tumorsejtet), a másik része az eliminációt végző effektor sejtet ismeri fel specifikusan. Ez praktikus annyit jelent, hogy a bispecifikus ellenanyag fizikai közelségbe hozza az elpusztítandó és a pusztítást végző sejteket, vagyis elősegíti az effektor sejtek hatékony működését.

13.3.3.4.3. *A tumor indukálta immuntolerancia a gátlása*

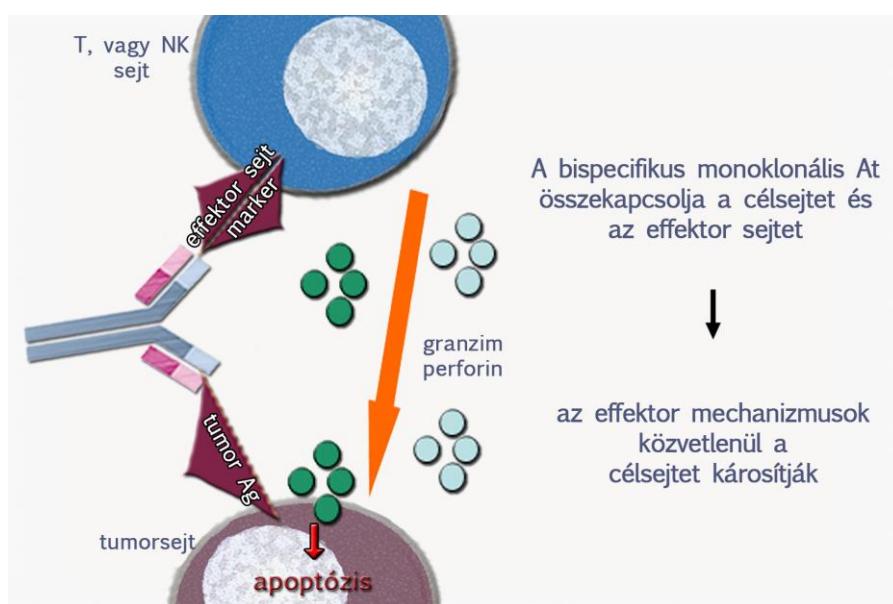
A lokális immuntolerancia megváltoztatását célzó kezelések irányulhatnak a daganatsejtek immunológiai felismerésére (pl. a tumorsejteken expresszáldó antigének módosítása az immunogenitás fokozása érdekében), vagy a tumor környezetében levő limfociták működését gátló mechanizmusok kikapcsolására (pl. Treg gátlás, CTLA4 gátlás).

13.4. Passzív immunoterápia

A passzív immunterápia során az immunrendszer laboratóriumi körülmények között szintetizált alkotóelemeit, leggyakrabban monoklonális ellenanyagokat használnak fel a kezelésre. A passzív immunterápia nem stimulálja a gazdaszervezet immunrendszerét annak érdekében, hogy aktívan harcolni tudjon a fennálló betegség ellen.

13.4.1. Monoklonális ellenanyagok a terápiában

A monoklonális ellenanyagok a szervezetben termelődő antitestekkel azonos módon fejtik ki hatásukat. Ezek, az ún. „csupasz” antitestek felhasználhatók az immunválasz gátlására és serkentésére is. A terápiás hatékonyság fokozására a monoklonális antitesteket gyakorta módosítják. A módosítás általában konjugáció, vagyis toxinok, radioaktív izotópok (magas dózisú α és β sugárzók), gyógyszerek, vagy az immunválaszt moduláló anyagok (pl. citokinek) hozzákötése az ellenanyaghoz. Egy különleges technikai megoldás a bispecifikus antitestek előállítása. (13.6. ábra)



13.6. ábra: A bispecifikus antitestek hatásmechanizmusa

13.4.1.1. A monoklonális ellenanyagok előállítása

A monoklonális ellenanyagok előállítása: „antitesttermelő gyárak”

A monoklonális ellenanyagok előállítását a hibridoma technika kifejlesztése tette lehetővé. A hibridoma technika, az 1970-es évek legnagyobb biotechnológiai felfedezése, Georges J.F. Köhler és César Milstein nevéhez fűződik. Munkájukat 1984-ben a “Fiziológia és orvostudomány” szakterületén Nobel díjjal jutalmazták. A technika kialakítása egy olyan álom beteljesülése, ami lehetővé teszi előre meghatározott specifitású monoklonális antitestek ipari méretű előállítását.

A hibridomákat immunizált laboratóriumi egér lépéből izolált aktív B limfociták és hosszú élettartamú, immortalizált daganatsejtek (mieloma sejt) mesterséges fúziójával állítják elő. Mivel genetikai állományuk a fúzióban résztvevő 2 sejt genetikai állományának keveréke, ezért rendelkeznek mindkét „szülő-sejt” tulajdonságaival. A tumorsejttől a normál sejtnövekedés szabályait felrúgó, folyamatos osztódási képességet, a B limfocitától pedig a specifikus immunglobulin termelő képességet öröklök. A hibridomák által termelt antitestek valamennyi tulajdonságukban (specifitás, izotípus) megegyeznek a fúzióhoz használt aktív B sejtek által termelt ellenanyagokkal. Antigén felismerő képességüket az immunizáláshoz használt antigén determináns határozza meg.

A sejtek fúzióját leggyakrabban polietilén-glikollal (PEG) idézik elő, habár ma már elterjedtek az elektromos- ill. mágneses tér létrehozásával indukált fúziók is. A PEG erős dipólus tulajdonsága révén megbontja a sejtek vízburkát, így elősegíti az egymás közelében lévő sejtek membránjai közti kölcsönhatást és a membrán fúzió kialakulását. A fúzió indukció után optimális esetben is csak 1-2% lesz a kívánt hibridomák aránya, ezért a sejt kultúrát a nem fuzionált sejtektől és az azonos sejtek fúziójából származó hibridektől meg kell tisztítani.

A szelekcióval kiválasztott hibridomák ellenanyag termelésének ellenőrzése (ELISA, FACS) után a sejteket klónozzák, majd felszaporítják.

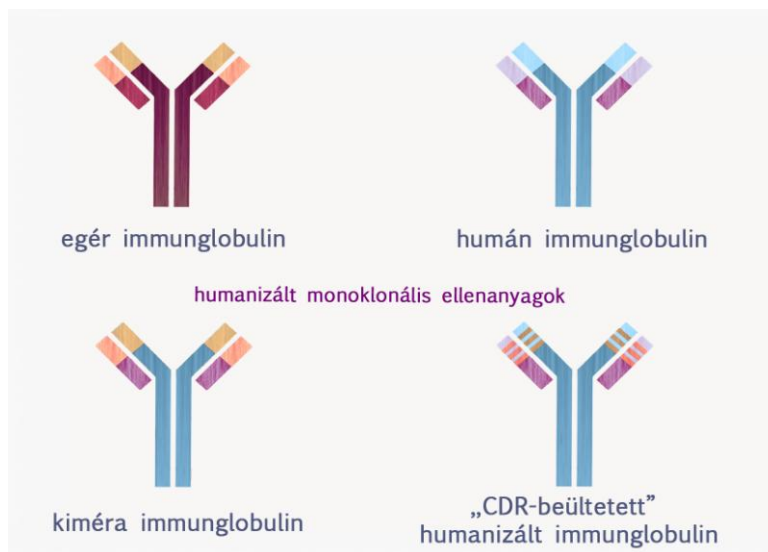
Nagy mennyiségű monoklonális ellenanyag előállítására alkalmas „antitesttermelő gyárakat” többféle módon lehet létrehozni: 1) a hibridoma sejtek in vitro körülmények között történő szaporításával, 2) fermentor tenyészetek kialakításával, 3) a hibridoma sejtek kísérleti egérbe történő oltásával. Az első két megoldás során a keletkezett antitestek a sejtenyészet felülúszójából, a harmadik esetben az egér hasüregi folyadékából (aszцитесз) nyerhetők ki (Lásd 8. fejezetben).

A génszűrés szerepe a monoklonális ellenanyagok előállításában

A génszűrés olyan biotechnológiai eljárás, melynek során a biológiai információt hordozó DNS molekulát megváltoztatják, pl. idegen DNS-darabot kapcsolnak hozzá. A változtatás természetesen a DNS információ tartalmának átkódolását, következésképp a végtermék, pl. a kódolt fehérje megváltozását is jelenti.

Génszűrészi módszerekkel sikerült a humán ellenanyagokkal 90%-os azonosságot mutató humanizált antitesteket (kimérákat) előállítani, amelyek terápiás céllal a szervezetbe juttatva már nem váltanak ki hiperreaktív választ és amelyek eliminációja megközelíti a szervezetben termelődő saját immunglobulinok kinetikáját. A kimérák olyan humán immunglobulinok, melyekben az antigén megkötésére szolgáló variábilis régiót, vagy a komplementaritásért felelős CDR régiót cserélték ki. További fejlődési lehetőséget jelenthet olyan transzgenikus állatmodellek kifejlesztése, amelyek

alkalmasak a humán immunglobulinokkal teljes mértékben megegyező antitestek termelésére (13.7. ábra).



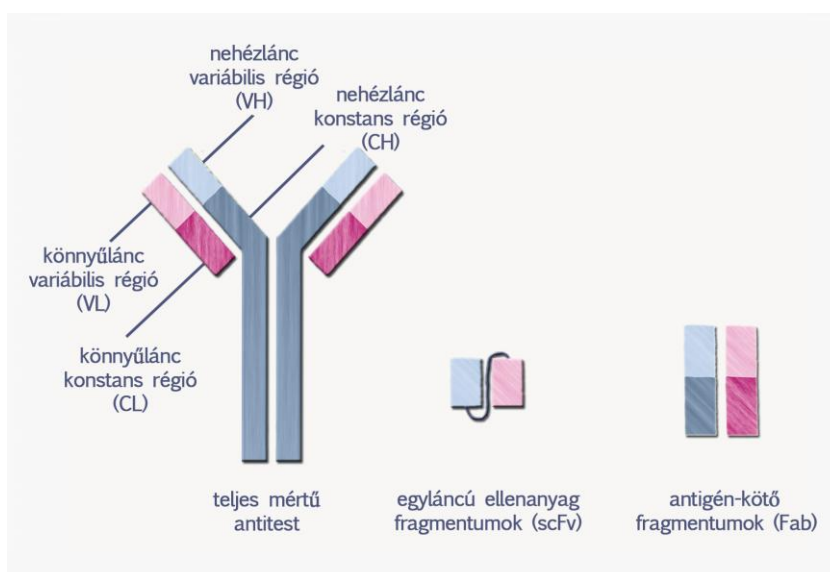
13.7. ábra:

Génszerkesztéssel módosított immunglobulinok nevezéktana (végződés): egér immunglobulin – ...omab, humán immunglobulin – ...umab, kiméra immunglobulin – ...ximab, humanizált immunglobulin – ...zumab

13.4.1.2. A monoklonális antitest terápia veszélyei

Mivel a monoklonális ellenanyagok gyártása kezdetben egyet jelentett az egér monoklonális antitestek gyártásával, a rutinszerű alkalmazhatóságig számos akadállyal kellett megküzdeni. Az egér monoklonálisok immunválaszt váltottak ki az emberi szervezetben, ami rövidtávon az életet veszélyeztető akut hiperreaktivitás (anaphylaxis shock), hosszútávon - az immunológiai memória kialakulása miatt (az egér immunglobulinokat felismerő humán ellenanyagok - HAMA - termelése) - az ismételt beadás utáni gyors, akár a terápiás hatást megelőző eliminációban nyilvánult meg. A mellékhatások felszámolása és a gyógyító hatás fokozása érdekében szükségessé vált a humanizált monoklonális ellenanyagok előállításának kifejlesztése, amit génszerkesztési módszerekkel végeznek. További lehetőség az életidő megrövidül (13.8. ábra).

ellenanyag fragmentumok terápiás felhasználása. Ezekben az esetekben a hatóanyag az antigént felismerő Fab régió. A konstans (Fc) rész hiánya csökkenti az Fc receptoron keresztül történő nem specifikus kötődést. A fragmentumok kis mérete javítja a penetráló képességet, ugyanakkor a gyorsabb elimináció miatt az



13.8. ábra: Monoklonális ellenanyag fragmentumok

13.4.1.3. Monoklonális antitestek a gyógyításban

13.4.1.3.1. Terápiás antitestek a reumatológiában

Monoklonális antitestek használata a napi gyakorlatban is elterjedt. Az onkológia mellett a reumatológiai betegek ellátásában alkalmazzák főként a terápiás antitesteket.

A tumor necrosis alfa (TNF) alapvető szerepet játszik számos gyulladásos reumatológiai betegségekben. TNF proinflammatorikus citokin, számos úton fokozza a szövetekben, synovialis térben zajló gyulladást.

13.4.1.3.1.1 Rheumatoid arthritis patomechanizmusa, proinflammatorikus citokinek szerepe a betegség patogenezisében

A rheumatoid arthritis (RA) szisztémás autoimmun kórkép, elsősorban a kezek és lábak ízületeinek fájdalmával, duzzanatával jár, mely többnyire szimmetrikusan alakul ki. A kéz és láb kisízületek mellett gyakran érintett ízületek: csukló, könyök és térd. RA-ben az érintett ízületekben a gyulladás miatti fokozott osteoclast aktivitás erosiok kialakulásához vezet, amely jól látható az érintett ízületekről készült MR felvételen. A betegség az érintett ízületek destrukciójához vezethet, ma is a rheumatoid arthritis a munkaképesség csökkenés egyik leggyakoribb oka. Az ízületi érintettség mellett továbbá a tartósan fennálló gyulladás jelentős cardiovasculáris rizikóval is jár. Érdekes módon a gerincet megkíméli a betegség, kivéve az atlantoaxialis ízületet, ahol a proliferáló gyulladásos szövet gerincvelő kompressziót is okozhat. A betegek 60-70 százaléka nő, a betegség 30-40 éves korban jelentkezik leggyakrabban. Jellemző, hogy a betegek a kezek reggeli merevségére panaszkodnak, melynek időtartama arányos a betegség aktivitásának mértékével. A betegség aktív stádiumában többnyire gyorsult a vvt. süllyedés és magasabb a CRP szint. Jellemző a betegségre a magas rheumatoid faktor szint és a citrullinált proteinek ellen termelődő (anti CCP) antitestek magas szintje is (lásd az autoantitestekről szóló fejezetet is). A dohányzás jelentős rizikót jelent RA-re. RA patomechanizmusában legfontosabb proinflammatorikus citokinek: IL-1, IL-6, IL-17, IL-18, IL-33, TNF. Antiinflammatorikus citokinek: IL-10; IL-35.

13.4.1.3.1.2 TNF központi szerepe RA-ben

A TNF legfontosabb fiziológiás szerepe, hogy segíti a szervezet védekezését a legkülönbözőbb fertőzések ellen, továbbá gátolja a tumorok növekedését is. William B. Coley New Yorkban dolgozó sebész a 1890 körül megfigyelte, hogy súlyos nem operálható tumorokban szenvedő néhány beteg nagyobb eséllyel gyógyult meg akkor, ha súlyos fertőzésen is átestek betegségük során. Ezért ő maga fecskendezett egyes tumoros betegekbe baktériumokat, amennyiben a beteg a fertőzést túlélte, javult a tumor túlélésének az esélye is. A fertőzések által kiváltott erőteljes immunválasz, így a TNF termelés segítheti a tumoros betegségből a gyógyulást, ezért lehetett a súlyos fertőzést túlélő betegeknek jobb gyógyhajlama a tumort illetően. 1985-ben jöttek rá, hogy a tumoros betegekből izolált cachektin és a TNF azonos. Gyulladásos autoimmun betegségekben is fokozott a TNF termelődés, tumoros betegségek és fertőzések mellett. A RA kezelésében az 1990-as évek végéig főként a szteroidok, nemszteroid gyulladáscsökkentők és citosztatikumok használata terjedt el. Az első kísérleteket egy ezektől eltérő új módszerrel, citokinek antitestekkel történő blokkolása irányába az

1980-as évek végén történtek. Marc Feldmann és Sir Ravinder Maini professzorok azt figyelték meg, hogy RA-es betegek térdprothesis műtét során eltávolított synoviális mintái folyamatosan, napokon át jelentős mennyiségű IL-1-et termelnek. Az IL-1 az eróziók kialakulásában alapvető citokin. Feldmann és Maini professzor az eddig használt gyulladáscsökkentő gyógyszerek helyett citokinek elleni poliklonális antitestekkel próbálták meg csökkenteni az IL-1 termelést. A kipróbált antitestek közül a TNF blokkolás bizonyult a leghatékonyabbnak, TNF blokkoló antitest igen hatékonyan gátolta a RA-es betegek synoviális mintáinak IL-1 termelését. Ez volt az első kísérlet, ami a TNF blokkolásra mint potenciális terápiás lehetőségre hívta fel a kutatók figyelmét. Később, humán gyógyszervizsgálatok is alátámasztották a TNF blokkoló kiváló hatékonyságát a gyulladás csökkentésére és a radiológiai progresszió csökkentésére RA-ben. A TNF blokkolás ma világszerte igen elterjedt a RA kezelésében. Londonban, a Kennedy Intézetben dolgozó kutatók Marc Feldmann és Sir Ravinder Maini úttörő munkát végzett a TNF blokkolás kifejlesztésében. Munkájukért 2003 Albert Lasker Díjat kaptak.

13.4.1.3.1.3 Jelenleg elérhető TNF blokkoló gyógyszerek

Magyarországon is törzskönyvezett TNF blokkoló gyógyszerek: 1: részben egér, részben humán monoklonális antitest infliximab infúzió, 2: teljesen humán, subcutan injekció formájában alkalmazható monoklonális antitest adaluminab, 3: polietilén glikollal konjugált monoklonális antitest (sc. injekció) certolizumab pegol, 4: humán monoklonális sc. antitest golimumab, 5: anti TNF antitest él immunglobulin fúziós protein etanercept (sc. alkalmazható). Magyarországon jelenleg közel 3000 RA-es beteg kap TNF blokkoló kezelést. A jelenleg érvényes szakmai ajánlások szerint azok a betegek kaphatnak Magyarországon TNF blokkoló kezelést, akiknél a klasszikus betegségmódosító gyógyszerek (pl. methotrexat) nem kellően hatékonyak.

13.4.1.3.1.4 TNF blokkoló gyógyszerek mellékhatásai

A TNF blokkolás legfontosabb mellékhatása, hogy fertőzésekre hajlamosít. Gyakorlatilag mindenféle bakteriális, vírusos és gombás fertőzés esélye nő TNF blokkolás során. A leggyakrabban felső légúti fertőzésekkel találkozunk. Legnagyobb jelentősége a TBC fertőzésnek van, TNF blokkolás során gyakrabban fordul elő TBC fertőzés, főként az extrapulmonális forma gyakoribb. Ezért a TNF blokkoló kezelésben részesülő betegek folyamatos pulmonológiai ellenőrzés alatt állnak. A TNF blokkolás részben a gamma interferon (IFN gamma) termelés gátlásán keresztül hajlamosít TBC-re. Az IFN gamma alapvető szerepet játszik a granuloma képződésben, csökkent IFN gamma kezelés mellett károsodott a granuloma képződés, mely a szervezet TBC elleni védekezését gátolja. A TBC rizikó becslésére használható a tuberculin teszt. Ennek során a vizsgálandó személy alkarjának volaris részére intracutan tuberculint fecskendeznek (5 egység steril, tisztított, TBC baktériumokból származó antigén). 48-72 óra múlva az induratio mértékéből (késői típusú hyperszenzitivitás) következtetünk esetleges fennálló TBC fertőzésre. Fontos, hogy elsősorban nem az erythema, hanem az induratio informatív ennél a tesztnél. A módszer kifejlesztése Robert Koch és Charles Mantoux nevéhez fűződik. Tuberculin teszt negativitása esetén is fennállhat TBC fertőzés és pozitív teszt sem jelent feltétlenül fennálló fertőzést.

13.4.1.3.1.5 TNF blokkolás spondylitis ankylopoeticában

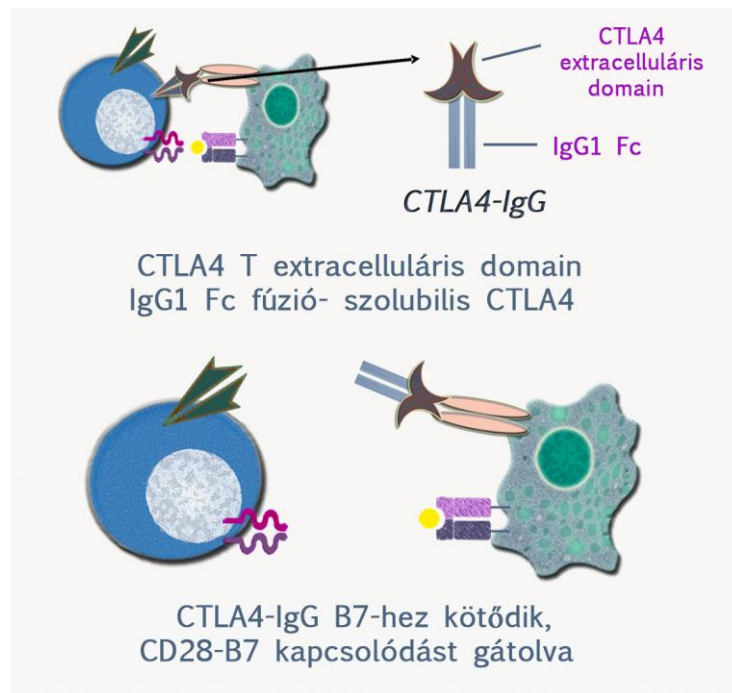
A spondylitis ankylopoetica (SPA) főként a gerincet, csípőt és vállakat érintő gyulladásos reumatológiai betegség. Jelentkezhet önállóan, vagy pikkelysömörrel (psoriasis), gyulladásos bélbetegségekkel együtt is. Jellemző a betegségre a csigolyák fokozatos elcsontosodása, kezdetben a csigolyák között csonthidak alakulnak ki (syndesmophyta), majd a csigolyák fokozatosan összezsontosodhatnak, ez RTG felvételen jellegzetes bambusznádgerincként ábrázolódik. Korai és specifikus jele a betegségnek a sacroiliacalis ízületek gyulladása, RTG felvételen ez ízületi rés szűkülétként látható. Korai gyulladás RTG felvételen nem látható, de MR vizsgálat mutatja a sacroiliacalis ízületben zajló gyulladást a betegség kezdetén is. A TNF alapvető szerepet játszik az SPA patomechanizmusában, TNF blokkolás RA-hoz hasonlóan SPA-ban is a napi rutinban alkalmazott módszer. TNF blokkolás RA és SPA mellett törzskönyvezett a psoriasis, colitis ulcerosa, Crohn betegség, juvenilis arthritis kezelésében is.

13.4.1.3.1.6 B limfocita depléción anti CD-20 monoklonális antitesttel

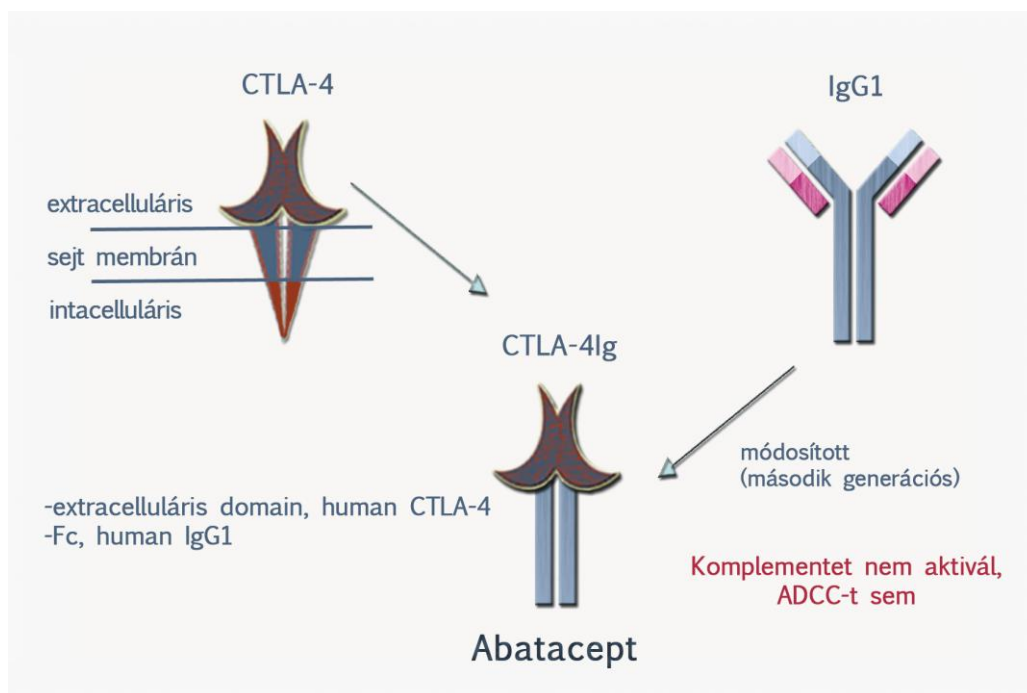
A B limfociták központi szerepet játszanak RA-ben. B sejtek hatékony antigénprezentáló sejtek, citokineket termelnek. A B sejtek által termelt rheumatoid faktor és anti-CCP antitestek prognosztikus faktorok, de szintjük nem korrelál a betegség aktivitásával. A CD20 pozitív B sejtek deplécióna kiváló terápiás lehetőség rheumatoid arthritisben. A anti-CD20 elleni monoklonális antitest (részben egér, részben human, intravénás) hatására a CD20 pozitív sejtek depletálódnak. Ez antitest függő sejt mediált citolízis, komplement aktiváció vagy az antitest által indukált apoptózis útján történik. A CD20 B sejtek ismételt megjelenése néhány hónapot vesz igénybe, RA-ben 6 havonta alkalmazzák a rituximab kezelést. CD20 nem található meg a korai B sejt fejlődési alakokon és a plazmasejteken, így az immunglobulin szintek csak kis mértékben csökkennek rituximab kezelés mellett. A TNF blokkoláshoz hasonlóan a rituximab kezelésnek is a legfontosabb potenciális mellékhatása, hogy hajlamosít különböző fertőzésekre.

13.4.1.3.1.7 T limfocita aktiváció gátlása RA-ben CTLA-4 immunglobulin fúziós protein alkalmazásával

A T limfociták szerepe is fontos a RA-ben. T limfocita aktiváció során az antigén prezentáló sejt (APC) által prezentált peptid MHC komplex összekapcsolódik a T sejt receptorral. Ezen kívül kosimulációs szignál is szükséges a T sejt aktivációhoz, ennek során a T sejt CD28 kapcsolódik az APC CD80/CD86 receptorhoz. Jelentős mértékű T sejt aktiváció esetén a T sejtek CTLA4 proteint expresszálnak. A szabályozó T sejtek ugyanakkor folyamatosan expresszálnak CTLA4-et. A CTLA4 is a CD80/CD86 receptorral kapcsolódik össze, de gátolja a T sejt aktivációt (ellentétben a fent említett CD28 stimuláló hatásával). A CTLA4 így a túlzott aktivációt előzi meg, a CTLA4 lényegesen nagyobb affinitással kötődik a CD80/CD86-hoz, mint a CD28, így a CD28-at leszoríthatja. CTLA4 immunglobulin fúziós protein (abatacept) kötődik a CD80/CD86-hoz, így lefoglalva a CD28 kötőhelyét és gátolva a T sejt aktivációt (13.9-10. ábra). Az abatacept RA-ban törzskönyvezett gyógyszer (infúzió), legfontosabb mellékhatása, a rituximabhoz és a TNF blokkolókhöz hasonlóan, hogy hajlamosítanak fertőzésekre.



13.9. ábra: A T limfocita aktiváció gátlása RA-ben CTLA-4 immunglobulin fúziós protein alkalmazásával



13.10. ábra: A CTLA4-Ig fúziós protein szerkezete

14. AZ INFORMATIKA NÉHÁNY IMMUNOLÓGIAI ALKALMAZÁSA (BUZÁS EDIT)

A fejezet elsősorban szemléletet kíván adni, az immunológiai vonatkozású bioinformatikai és Internet alkalmazások körét szeretné bemutatni.

Az immunológia szakirodalom a www.ncbi.nlm.nih.gov webhelyen kereshető legegyszerűbben. A National Center for Biotechnology Information (NCBI) a számítógépes információfeldolgozás orvosi biológiai kutatási jelentőségének felismerése nyomán jött létre 1988-ban az USA kormánya által támogatott National Institutes of Health (NIH) keretén belül, a National Library of Medicine (NLM) részlegeként. Az NCBI többek között adatbázisokat hoz létre, tart fenn és koordinálja bizonyos adatbázisokhoz és szoftverekhez való hozzáférhetőséget. Standard adatbázisok révén teszi lehetővé az adatok elhelyezését és a felhasználók közötti adatcserét.

Az NCBI webcímén a lap tetején található „Search” lenyíló ablakban válasszuk ki a **PubMed** adatbázist, mely a publikált orvos-biológiai közlemények adatbázisa. Az előbbi alatt található széles ablakba gépeljük a keresett kifejezést vagy kifejezéseket, melynek előfordulását keressük az adatbázisban. Ha az „immunity” szóra keresünk, közel 30 000 találatot kapunk. Ha rákattintunk az első talált közlemény **címére**, a megnyíló új oldalon találjuk az adott közlemény kivonatát (**absztraktját**) is, és az oldal jobb felső sarkában megjelenő ikonokra kattintva (pl. „Free PubMed article in PubMed Central” vagy „Royal Society Publishing full text available”) letölthetjük a közleményt. Természetesen még nem minden közlemény érhető még el ilyen módon, sok esetben a közlemény absztraktját tudjuk csak elolvasni.

Amennyiben az **immunológia folyóiratokról** szeretnénk információhoz jutni, [ezen a linken](#) érhetjük el az immunológiai tárgyú folyóiratok listáját. A folyóirat nevére rákattintva közvetlenül beléphetünk az illető folyóirat honlapjára.

Arra is van lehetőség, hogy metaadatbázisokat keressünk fel (pl. az immunológiai tárgyú [BioMed Central](#) adatbázisát). Ezen a webcímen olyan adatbázisokat érhetünk el, mint például a [dbMinor \(Minor Histocompatibility Knowledge Database\)](#) vagy a [Defensins Knowledgebase](#). Az utóbbi adatbázis linkjére kattintva számos defensinokkal kapcsolatos információ elérhető; nyomunk követhető például a témakör szakirodalmának évről évre való bővülése. Hasonlóképpen a Minor Histocompatibility Antigen Database adatbázisba lépve alapvető információkhoz juthatunk az egyes minor hisztokompatibilitási antigénekkal kapcsolatosan.

Számos **allergén adatbázis** is elérhető az Interneten keresztül, lásd a *14.1. táblázatban*.

Allergén adatbázisok	URL cím
SDAP	http://fermi.utmb.edu/SDAP/
IUIS	http://www.allergen.org/
AllergenOnline, University of Nebraska–Lincoln	http://www.allergenonline.org/index.shtml

14.1. táblázat: Allergén adatbázisok

Az immunológia vizsgálatok igen fontos *in vivo* rendszerei a genetikailag módosított egértörzsek, melyekben egy-egy gén kiütése vagy transzgenikus expressziója lehetőséget teremt bizonyos molekulák szerepének vizsgálatára. A genetikailag módosított egértörzsek adatbázisának webcímére (<http://www.knockoutmouse.org/>) rákattintva kiválaszthatjuk például a beta 2 mikroglobulin knockout (ko) egereket. A béta 2 mikroglobulin ismert módon az MHC I és CD1 molekulák alfa láncához kapcsolódik. Genetikai hiánya a funkcióképes MHCI hiányát és a CD4-, CD8+ citotoxikus T sejtek deficienciáját eredményezi.

A gyakorlatban igen jól alkalmazható adatbázis a kereskedelmi forgalomban levő antitestek adatbázisa: <http://www.antibodyresource.com/>. A linkre kattintva nem csak azoknak a cégeknek a honlapját és antitest választékát érhetjük el, melyek katalógusukban különböző enzimekkel vagy festékekkel konjugált vagy konjugátlan antitesteket forgalmaznak, hanem elérhetjük mindazon cégeket is, melyek úgynevezett „custom antibody” szolgáltatást is kínálnak. Ez utóbbi cégek arra vállalkoznak, hogy olyan molekulákkal szemben állítanak elő antitesteket a megrendelő kívánságára, melyekkel szemben még nincs kereskedelmi forgalomban antitest. Vállalják, hogy bioinformatikai építő predikciós eszközök felhasználásával kiválasztják az adott fehérjére specifikus, várhatóan legerősebb antigenitású szekvenciát, mely alapján szintetikus peptid haptént készítenek, s az ezzel immunizált állatok felhasználásával állítanak elő szolgáltatásként poliklonális vagy monoklonális ellenanyagot. Arra is lehetőséget kínálnak, hogy a megrendelő kívánsága szerint rekombináns fehérje antigént expresszálnak az immunizálás céljára, illetőleg, hogy DNS immunizációt végeznek antitestek előállítására céljából. Mint látható, csaknem 200 ilyen, megrendelésre történő antitest előállítást vállaló (custom antibody service-t nyújtó) cég kínálja szolgáltatását a felhasználóknak. Amennyiben nem a „Custom antibody suppliers” címen elérhető cégek köréből választunk, hanem a „Catalog antibody suppliers” címre kattintunk, ismét igen nagy számú cég választéka áll rendelkezésünkre. Ha közülük pl. az „AbCam” cég nevére kattintunk, mintegy 40 000 tétel közül választhatunk, melyek a cég honlapján témakörök szerinti csoportosításban olvashatók. Nem csak primer és szekunder antitestek és izotípus kontroll antitestek szerezhetők be, hanem például Custom Antibody Array-k. Ez utóbbi esetén a megrendelő választhatja ki a cég által forgalmazott antitestekből azokat az immunoglobulinokat, melyekből array-t állítanak elő, és a megrendelő által vizsgálatra küldött különböző vizsgálati mintákból ($>1 \times 10^6$ sejtől, mely $>100 \mu\text{g}$ fehérje extraktumot eredményez, vagy $>10 \text{ mg}$ szövetmintából, >20 mikroliter sérumból vagy $>100 \mu\text{g}$ kivont fehérjéből) szolgáltatásként el is végzik az antitest array vizsgálatot.

Az **IMGT**-t (THE INTERNATIONAL IMMUNOGENETICS INFORMATION SYSTEM®) 1989-ben hozta létre Marie-Paule Lefranc mint az immunoglobulinok, T sejt receptorok, major histocompatibility complex molekulák, az immunoglobulin szupercsalád és az MHC szupercsalád fehérjeinek integráns informatikai rendszerét. Az IMGT adatbázisai, webforrásai és on-line szolgáltatásai rendkívül sokféle igényt kielégítenek.

Az [IMGT immunoglobulin szerkezeti adatbázisban](#) egy-egy konkrét monoklonális antitest könnyű láncának variábilis régiójában vizsgálhatjuk a CDR régiókat. Pl. a 17B, 3D6 vagy 9E nevű monoklonális antitestek esetén megtalálhatjuk a színes betűkkel jelzett CDR1, CDR2 és CDR3 régiók

aminosav szekvenciáját. A zárójelben található számok, pl. (27-38) a CDR régiók kiterjedését mutatják, tehát, hogy pl. a maximális esetben 27-től 38. aminosavig terjedő 11 aminosavas CDR1 szakaszon helyezkedik el az adott antitest CDR1 régiója, amely aminosav sorrendje pl. az ESVSSD lehet, és ebben az esetben jól látható, hogy a CDR1 régió hossza mindössze 6 aminosav. Ugyanezen oldalon lejjebb azt látjuk, hogy más antitestek esetén ez a szakasz hosszabb is lehet.

Az [alábbi linket](#) követve, az oldalt lefelé gördítve láthatjuk egy antitest molekula gyöngysorszerű (Collier-de-Perles) kétdimenziós modelljét sematikusán ábrázolva. A színes „gyöngyszemek” a CDR régióknak megfelelő aminosavakat jelölik.

A modell feletti világoskék téglalap ablakaiba írva megváltoztathatjuk pl. a CDR3 régió aminosavak számában megadott hosszát (CDR3 length), és a draw gombra kattintva újrarajzoltathatjuk a modellt.

Az **Immunepitope adatbázis (IEDB)** a kísérletesen igazolt és jellemzett B és T sejt epitópok, MHC-kötődési és MHC ligand elúciós kísérletek eredményeit tartalmazza. Nem csak az adaptív immunrendszer sejtjei által felismert molekuláris struktúrákat találhatjuk meg itt, hanem azokat a kísérleti körülményeket is, melyek között az adatokat nyerték. Megtalálhatók ebben az adatbázisban az emberi, a nem humán főemlős, rágcsáló, sertés, macska és egyéb vizsgált szervezetek immunrendszere által felismert epitópok. Négy év alatt 180 978 kísérlet adatait elemezték elsődlegesen a publikált irodalom alapján, mely ~99%-át jelenti a nyilvánosan elérhető adatoknak, e mellett 129 186 kísérlet adatait a kutatók közvetlenül küldték az adatbázisnak.

Számos predikciós eszközt is kínál az IEDB, így T sejt epitóp predikciós, B sejt epitóp predikciós és epitóp elemzési eszközöket. Ez utóbbi esetében populációs gyakoriságot, epitóp konzerváltsági vizsgálatot, epitóp klaszter analízist és homológia keresési lehetőséget kínál.

Az **MBIM** (Microbiology and Immunology resources) linkjére kattintva elérhetők többek között a CD antigénekre (cluster of differentiation) vonatkozó információk a CD1-től a CD247 molekuláig. A **University of Pittsburgh és UPMC** metaadatbázisában ugyancsak megtaláljuk igen sok immunológiai vonatkozású adatbázis vagy predikciós server elérhetőségét, (pl. EVALLER, mely a fehérjék potenciális allergén voltát prediktálja), vagy pl. itt található az elérhetősége az IIDB-nek (The Innate Immune Database-nek).

A továbbiakban egy konkrét példán keresztül szemléltetjük az antigenitás vizsgálatának lehetőségeit. Ha arra vagyunk kíváncsiak, hogy mely antigének jönnek szóba, mint a rheumatoid arthritis lehetséges autoantigénjei, akkor kereshetünk erre vonatkozóan publikált adatokat a **PubMed** adatbázisban. Ha a keresőablakba beírjuk, hogy „candidate autoantigens early rheumatoid arthritis”, akkor a szabadon elérhető közleményként találjuk a következő cikket:

Candidate autoantigens identified by mass spectrometry in early rheumatoid arthritis are chaperones and citrullinated glycolytic enzymes. Goëb V, Thomas-L'Otellier M, Daveau R, Charlionet R, Fardellone P, Le Loët X, Tron F, Gilbert D, Vittecoq O. Arthritis Res Ther. 2009;11(2):R38. Epub 2009 Mar 10. ([link](#))

A címre rákattintva elérjük a cikk absztraktját, melyben a korai rheumatoid arthritisben tömegspektrometriával azonosított autoantigének között ott találjuk az alfa enolázt. Ha szeretnénk

bővebb információhoz jutni az alfa enolázzal kapcsolatban, nem kell mást tennünk, mint hogy rákattintunk ugyanitt, az NCBI honlapján keresztül elérhető [Protein adatbázis](#) linkjére a keresőablakban (protein). Ha itt az alfa enoláz nevét beírjuk az alsó keresőablakba, akkor meglehetősen nagyszámú találatot kapunk, ezek közül válasszuk ki a Homo Sapiens faj alfa enoláz molekuláját, és kattintsunk rá. A megnyílt oldalon találjuk az „alpha enolase” gén lókuszt, a molekulát alkotó aminosavak számát (366), a molekulával kapcsolatos néhány alapvető közlemény specifikációját (cím, szerzők, folyóirat, év, kötet, oldalszám és linkjét). Továbbá itt olvasható a molekula domén-szerkezetére vonatkozóan rendelkezésre álló információ (pl. az úgynevezett "substrate binding pocket" vagy a "metal binding site" elhelyezkedése, végül pedig a molekula teljes aminosav sorrendje).

Kíváncsiak vagyunk arra, hogy mennyire konzervált ez a fehérje, vannak-e hasonló mikrobiális szekvenciák, melyek révén molekuláris mimikri mechanizmussal autoimmunitás triggerelhet az alfa enoláz molekula. A kérdés vizsgálatához még mindig az [NCBI](#) nyitó oldalán maradván a képernyő jobb oldalán található „Popular resources” oszlopból kattintsunk a **BLAST** szóra. A BLAST a „Basic Local Alignment Search Tool” szavak kezdőbetűiből képzett szó, amely lehetővé teszi a bázis- vagy aminosavsorrend alapján történő szekvencia keresést és illesztést. A [BLAST](#) oldalán válasszuk a „Basic Blast” opción belül a „**Protein blast**” lehetőséget. A megjelenő ablakba „Enter query sequence” másoljuk be copy-paste segítségével a teljes oldal aminosav sorrendet a korábbiakban megnyitott <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAB88178.1> weboldalról. A szekvencia 60 aminosavat tüntet fel soronként, a sor eleji számozás sem zavarja a BLAST keresést, tehát a sor eleji számokkal együtt bemásolhatjuk a teljes szekvenciát. A lap alján található BLAST gombra kattintva elindíthatjuk a szekvencia keresést. Rövid idő elteltével megjelenik a képernyőn a keresés eredménye. A keresés eredményének a képernyő közepén, keretben található a grafikus kijelzése: az egymás alatti folytonos piros vonalak nagy száma arra utal, hogy igen sok teljes szekvencia egyezés fordul elő, tehát erősen konzervált lehet az alfa enoláz aminosav sorrendje.

Kereshetünk hasonló szekvenciákat abban a reményben, hogy hasonló aminosav sorrend előfordulhat fertőző ágensekben, melyek molekuláris mimikri révén játszhatnak esetleges szerepet az autoimmun folyamatok elindításában. Az alfa enoláz aminosav sorrendjét bemásoljuk tehát az ablakba, elindítjuk a BLAST keresést. Mint említettük, nagyszámú 100%-os egyezést tapasztalunk, de nincs köztük prokarióta szekvencia. Ha az alfa enolázzal szembeni immunválaszt szeretnénk tanulmányozni, és nem áll rendelkezésre tisztított vagy rekombináns fehérje, szintetikus peptidekkel szemben is vizsgálhatjuk a T sejt választ. Mely peptidszekvenciákat vizsgáljuk? Erre úgy kaphatunk választ, hogy belépünk pl. a [CBS](#) (Center of Biological Sequence Analysis, Denmark) honlapjára. Válasszuk a [Prediction Servers](#) funkciót, és pl. [NetMHCII](#) serveren végezhetünk epitóp predikciót. Bemásolhatjuk az ablakba a szekvenciát, kiválaszthatunk bizonyos HLA allélelket, és beállíthatjuk a peptid epitóp hosszát. A program sorra veszi a lehetséges peptideket, és megjósolja az adott HLA-hoz való kapcsolódás affinitását (strong binder, weak binder). A NetMHCII 2.2 Server a HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP molekulákhoz való peptid kötődét prediktálja mesterséges neuronhálózati elven működő

predikciós módszerrel. A peptid kötődés jósolható 14 HLA-DR allélre (ezzel lefedve a 9 ismert úgynevezett HLA-DR szupertípust), valamint 6 HLA-DQ és 6 HLA-DP allére. A predikciós értékek nM IC50 (a maximális gátló koncentráció 50%-a) értékben vannak kifejezve, és a hierarchikus sorrendbe rendezés mellett „erősen” és „gyengén kötődő” (strong binder, SB vagy weak binder, WB) peptid jelzéssel vannak ellátva.

Másoljuk be copy-paste utasítással az [alábbi oldalról](#) az alfa enoláz teljes aminosav szekvenciáját a NetMHCII 2.2 oldalán található, erre kijelölt ablakba, és válasszuk pl. a lehetőségek közül a HLA-DRB1*0404 allélt, mely erősen asszociál a rheumatoid arthritisszel. Kattintsunk a „sort by affinity” utasítás melletti kis négyzetre, és a „submit” gombra való kattintással küldjük el a feladatot a CBS szerverére. A predikció eredményét lista formájában kapjuk meg, a 15 aminosavas, tehát MHC II molekulához kötődni képes peptideket affinitás alapján látjuk sorrendbe rendezve. Megfigyelhető, hogy a predikció mindössze 5 erősen kötődni képes (SB) peptidet azonosított az alfa enoláz molekulán belül. Közülük első helyen szerepel a 43-as aminosav pozícióban kezdődő EVILPVPAFNIVINGG peptid, amely a predikció szerint az adott HLA molekulához a legerősebben kötődik. A peptid epitóp „core epitope” részlete a VPAFNIVING peptid, az a legrövidebb szekvencia, melyre elengedhetetlenül szükség van a peptid felismeréséhez, a „core epitope” N és C terminális részén található úgynevezett „flanking” régiókba eső aminosavak jelenléte vagy milyensége nem elengedhetetlen feltétele a peptidfelismerésnek.

Kiválasztottuk tehát az EVILPVPAFNIVINGG peptidet. Hasonlóképpen elvégezhetjük a HLA kötődési predikciót egyéb HLA allélekre, pl. a HLA-DRB1*0101-re, amely esetben szintén a fenti peptidet kapjuk, mint legerősebben kötődő részletét az alfa enoláznak.

A következő kérdés, hogy hogyan léphetünk tovább ennek az információnak a birtokában?

Meglátogathatjuk például a <http://www.peptideresource.com/custom-peptide.html> weboldalt, amelyen keresztül elérhetők a megrendelésre szintetikus peptideket előállító cégek.

A megrendelésre készített alfa enoláz peptidek mellett rendelhetünk kontroll peptideket is a cégtől: pl. azonos hosszú, azonos aminosav összetételű, de random aminosav sorrendű, vagy egy más, irreleváns fehérjéből származó peptidet. Az elkészült szintetikus peptideket *in vitro* tesztelhetjük: a beteg illetőleg kontroll személyek véréből izolált fehérvérsejtekhez adva vizsgálhatjuk, indukálna-e a betegekben specifikus módon T sejt proliferációt vagy citokin szekréciót. Ebben az esetben a beteg vérsejtjei (pl. monocitái, dendritikus sejtjei) prezentálják az antigént a T sejtek számára.

Alternatíva lehet, hogy MHC tetramert (négy MHC molekula, pl. a HLA DRB1*0101 komplexét) rendeljük meg egy cégtől, mely olyan konstrukciót állít elő, melyben a 4 HLA molekula a peptidkötő zsebében az általunk megadott szekvenciájú peptidet tartalmazza, és egyben fluoreszcensen jelölt. A HLA tetramerhez kötődő T sejtek a perifériás vérben egyszerűen kimutathatók, ha a tetramer piros fluoreszcens festékkel van jelölve, és párhuzamosan a T sejtek azonosítására pl. a zöld fluoreszcens festékkel (pl. FITC-cel) jelölt anti-CD3 antitestet alkalmazunk.

Ha nem az alfa enolázzal szembeni T sejt, hanem a B sejt válasz érdekel bennünket, akkor végezhetünk **B sejt epitóp predikciót** is pl. az [alábbi weboldalon](#). A B sejt epitóp predikció számos

szekvencia vizsgálat konszenzusos eredményén alapul, így pl. az antigenitás, a hidrofobicitás és hidrofilitás vizsgálatának, az egyes molekuláris régiók flexibilitásának, a szekunder szerkezetnek, a β csavar szerkezetnek, és a fehérje fizikokémiai paramétereinek figyelembe vételén alapul. Kétféle B sejt epitópot ismerünk, lineáris és konformációs epitópokat. Mennyiben az adott fehérje 3D szerkezete ismert, úgy lehetőség nyílik a lehetséges B sejt epitóp azonosítására pl. felület expozíció alapján. Ilyen esetben megjeleníthető a prediktált epitópok 3D szerkezete. A lineáris B sejt epitópok predikciójának elvégzését szolgáltatásként vállalja a megrendelő számára a fenti cég. A predikciójuk által azonosított epitópnak megfelelő szintetikus peptidekkel illetően azok indifferens fehérjével (pl. KLH) vagy biotinnal konjugált formájával történő immunizálást követően pl. ELISA rendszerben vizsgálhatjuk a B sejt epitópokkal szembeni immunreaktivitást.

Arra is van mód, hogy bioinformatikai eszközökkel szimuláljuk az immunrendszeri működéseket (pl. vírusfertőzés, AIDS). Az [Immugrid](#) honlapján keresztül végezhetünk pl. vírus, daganat, atherosclerosis és leíró modellek szimulációjának lehetősége közül választhatunk.

A vírusfertőzések közül az influenza, a HIV és az EBV fertőzés szimulálható. A tumor szimuláció esetében daganatnövekedési szimuláció és emlőkarcinoma szimuláció végezhető.

Ha pl. a leíró modellekt választjuk, és ezen belül is a szimuláció típusaként kiválasztjuk a „lymph node WITHOUT infection” lehetőséget, majd a „view results” gombra kattintunk, nyomon követhetjük, hogy a szimuláció eredményeképpen hogyan változik a nyirokcsomó. A különböző panelek azt jelzik, hogy a dendritikus sejtek (DCs), B sejtek és TH sejtek száma hogyan változik az idő függvényében. Az AG a szolubilis antigének beoltásának, illetőleg a dendritikus sejtek antigénnel való feltöltésének idejét mutatja. Amint az antigén eléri a nyirokcsomót, a limfocita sűrűség megnő a B és T sejt beáramlás megnövekedésének következtében. A legtöbb antigént a dendritikus sejtek és B sejtek veszik fel, amint az az antigénbemutató sejtek számának hirtelen megnövekedéséből is látható. A DC-k hirtelen TH sejtek proliferációját indukálják (szaggatott vonal a TH panelben), míg a B sejtek számának növekedése késleltetett (szaggatott vonal a B panelben) a miatt, hogy T sejtek kostimulációra várnak. Míg új antigéneket detektál, az immunrendszer aktív marad: az össz limfocita szám monoton módon növekszik 5x-ére, és a sejtek osztódásban maradnak, hogy erősítsék a rendelkezésre álló antigén-specifikus T sejt poolt (lásd a hosszú szaggatott vonalat a B és TH panelekben).

Az immunológia tantárgy keretébe a félév során említett számos betegségnek (pl. CGD, asthma bronchiale, APECED syndroma) a leírása, genetikai hátterének összefoglalása az **OMIM** adatbázisban található, s mindez átvizet a II. félévben oktatott genetika/genomika tantárgy felé. Az OMIM adatbázis az [NCBI](#) weblapján keresztül érhető el, a jobb oldalon olvasható „popular resources” közül válasszuk ki az [OMIM](#)-ot (Online Mendelian Inheritance in Man). itt nem csak betegségekre kereshetünk, hanem ugyanitt arra vonatkozó információt is szerezhethetünk, hogy egy adott molekula (illetve annak génje) mely humán betegségekkel mutat asszociációt. Így korábbi példánknál maradván, ha beírjuk a kereső ablakba az alfa enoláz kereső szavakat, számos más információ között pl. azt is olvashatjuk, hogy a fenti molekula, mint a Hashimoto encephalopathia egyik lehetséges autoantigénje is szóba került, de genetikai polimorfizmusainak autoimmun megbetegedésekkel való asszociációjára nincs adat.

FOGALOMTÁR

(BUZÁS EDIT)

α/β T sejt	T limfocita, mely α/β T sejt receptor láncokat hordoz a felszínén. A T sejtek túlnyomó többsége α/β T sejt.
AIDS, Acquired immune deficiency syndrome A-CCP antitest	A humán immunodeficiencia vírus (HIV) által közvetített megbetegedés Anti-ciklikus citrullinált peptid antitest: szintetikus ciklikus citrullinált peptiddel reagáló antitest, melynek emelkedett szintje jellemző a reumatoid arthritisben szenvedő betegek jelentős részére
ACPA	Anti-citrullinált protein antitest, melynek emelkedett szérumszintje reumatoid arthritisre jellemző
ACR kritériumok	Amerikai Reumatológiai Kollégium (ACR) klasszifikációs kritériumrendszere autoimmun megbetegedések egységes diagnosztizálására
Adaptív immunitás	Antitestek vagy T sejtek által közvetített immunválasz
ADCC	Antibody- Dependent Cell- Mediated Citotoxicity, antitestfüggő sejtes citotoxicitási reakció, melynek alapját II-es típusú túlérzékenységi reakció képi
Adjuváns	Immunizálás során az oltóanyaghoz adott anyag, mely fokozza a beoltott antigénnel szembeni immunválaszt (pl. komplett Freund adjuváns vagy Alumín).
Adoptív immunitás	Immunizált szervezetből származó sejtekkel nem immunizált szervezetbe átvitt immunitás
A-dsDNS	Anti-kettősszalú DNS antitest (anti-double stranded DNA)
Affinitás	Molekulák közti kötőerő (pl. egy antigén és egy antitest között). Asszociációs konstanssal, mint egyensúlyi állandóval jellemezhető (K_a).
Affinitáskromatográfia	Antigén izolálási módszer, mely antigén-antitest kölcsönhatáson alapul.
Ag	rövidítés: antigén
Agglutináció	Antigének aggregációs reakciója antitestek hatására (pl. vörösvértestek, baktériumok esetében).
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
Aktív immunitás	Antigénnek a szervezetbe jutása következtében kialakuló immunitás
Akut fázis fehérjék	Szérumfehérjék, melyek szintje fertőzés vagy gyulladás során megnő (pl. C reaktív protein)
Allergén	Allergiát kiváltó anyag (pl. penész)

Allergia	Allergének által kiváltott, hízósejt és bazofil granulocita degranulációval járó, IgE által közvetített, I-es típusú túlérzékenységi reakción alapuló kórfolyamat.
Allogén	Fajon belül más egyedtől származó antigén
Allograft	Átültetett szövet/szerv, mely egy adott faj genetikailag nem azonos tagjaitól származik
Alternatív komplement aktiválás	A komplement aktiváció legősibb útja, mely során aktiváló felszíni kölcsönhatások enzimreakciók sorát triggerelik, s ez által a komplement rendszer aktiválódásához vezetnek.
ANA Anafilatoxin	Antinukleáris antitest, sejtmagkomponensekkel reagáló autoantitest A komplement rendszer aktiválódása közben keletkezett peptidek (C3a és C5a), melyek hízósejt degranulációt és gyulladásos sejt kemotaxist közvetítenek
ANCA	Anti-neutrofil citoplazma antitest, autoimmun megbetegedésekre jellemző (pl. vasculitisekben előforduló), többnyire IgG típusú, anti-neutrofil granulocita citoplazma antigénekkkel reagáló autoantitest. pANCA: perinukleáris festődést adó ANCA; cANCA: granuláris citoplazmatikus festődést adó ANCA
Anergia	Antigénnel szembeni válaszképtelenség
anti-ENA	Anti-extractable nuclear antigen, antinukleáris autoantitest
Antigén	Immunválaszt kiváltani képes anyag
Antigén determináns	Az antigén azon részlete, mely specifikus immunválaszt indukál, más néven epitóp
Antigénbemutató sejt (APC)	T limfocitáknak antigén eredetű peptideket sejtfelszíni MHC II molekulák segítségével bemutató sejtek (dendritikus sejtek, makrofágok, B sejtek)
Antihisztamin	Hisztamin antagonist, mely legtöbbször a hisztaminnak receptorához való kötődését gátolja.
anti-Jo1	Antinukleáris antitest, mely hisztidin t RNS ligázzal reagál (pl. polymyositisben, dermatomyositisben)
Anti-LA/SSB Antinukleáris antitest	Antinukleáris autoantitest (pl. Sjögren szindrómában) Autoantitestek, melyek magkomponensekkel (általában nukleoproteinekkal) reagálnak
anti-Sm (Smith antigén)	Antinukleáris antitest, mely az snRNP-k core proteinjével reagál
Anti-SSA	Másnéven anti-Ro, vagy anti-SSA/Ro vagy anti Ro/SSA. Antinukleáris autoantitest, mely számos autoimmun megbetegedésben kimutatható (pl. SLE)
Antisérum	Humán vagy állati eredetű vérsérum, mely egy vagy több antigénre specifikus antitesteket tartalmaz
Antitest	Antigénekhez specifikusan kötődni képes immunglobulin molekula
Antitoxin	Szolubilis toxinokat neutralizálni képes antitestek

APC	Antigén prezentáló sejt
APS	Antifoszfolipid szindróma (más néven ALPS), autoimmun tünetegyüttes
ASLT	Rövidítés: antistreptolysin O teszt
Atópia	Allergiás hiperszenzitivitásra való prediszpozíció
Autoantitest	Saját antigénnel reagáló antitest
Autograft	Azonos személy szervezetén belül egyik helyről másikra átültetett szövet
Aviditás	Több kötőhellyel rendelkező antigén és a több kötőhellyel rendelkező antitest közötti együttes kötőerő
Autoimmun megbetegedés	Saját antigénekkal szembeni reaktivitás következtében kialakuló megbetegedés
Avidin	Tojásfehérjében előforduló glikoprotein, mely igen nagy affinitással köti a biotint
BAL	Bronchoalveolar lavage, bronchoscope során a végzett bronchoalveoláris öblítés, mely során diagnosztikus célból kis mennyiségű folyadékot juttatunk a tüdőbe, majd eltávolítjuk
BALT	Bronchial- Associated Lymphoid Tissue, szekunder immunszerv
B limfociták	Limfociták, melyek sejtfelszíni immunglobulinokat expresszálnak, és az antitestválasz kialakításáért felelősek
BCG	Bacillus Calmette Guérin – tuberculosissal szembeni vakcina hatóanyaga. Attenuált <i>Mycobacterium tuberculosis var. bovis</i> törzs
Bence-Jones proteinek (BJ proteinek)	Myeloma multiplexben szenvedő betegek vizeletében található immunoglobulin könnyű láncok
Blaszt sejtek	Citológiában a prekursor sejtek (részlegesen differenciált, többnyire unipotens sejtek) elnevezésére használt kifejezés.
Blasztos transzformáció	Antigén vagy mitogén jelenlétében bekövetkező, morfológiai és biokémiai változások sora, mely aktivált T és B sejtekre jellemző
Booster	Antigén ismételt, a primer szenzibilizálódást hónapokkal-évekkel követő szervezetbe juttatása
BSA	Bovine Serum Albumin, szarvasmarha szérum albumin
C régió	Constans régió, az immunoglobulin molekula C terminális része
Capping	Sejtfelszíni molekulák (pl. antigének vagy receptorok) klaszterképződése a sejt felszínének kis területén
Carcinoembryonic antigen	Magzati korban és tumorokban expresszáldó antigének.
CD	Cluster of Differentiation. A CD molekulák fehérvérsejt felszíni molekulák, melyeket monoklonális antitestek segítségével azonosítottak
Celluláris immunitás	T sejtek és makrofágok által közvetített immunválasz

CFU	Colony Forming Unit, kolóniaképző egység
CH50 unit	az a szérumhígítás, mely antitesttel fedett vörösvértestek 50 %-át lizálja standard hemolitikus komplement assay-ben
Concanavalin A, ConA	Növényi lektin, mely mitogénként aspecifikus módon elsősorban a T sejteket stimulál
CTL	citotoxikus T limfocita
Citokinek	Szolubilis polipeptidek, melyek sejtek közötti kölcsönhatásokat közvetítenek, és sejtfunkciókat szabályozhatnak.
Citotoxikus T sejt	CD8+ T sejt, mely képes más sejtek elpusztítására
Coombs teszt	Vörösvértest felszíni antigénekhez kötődni képes/kötődő IgG típusú antitestek kimutatására szolgáló módszer (indirekt és direkt)
CRP	C reaktív protein, akutfázisfehérje
DAS	A rheumatoid arthritis klinikai aktivitásának jellemzésére alkalmazott Disease Activity Score
D-dimer	Fibrin degradációs termék, mely a véralvadék fibrinolízist követő degradációját követően jön létre. Nevét onnan kapta, hogy két, keresztkötött D fragmenst tartalmaz.
Delayed - type Hypersensitivity	Késői típusú túlérzékenység, IV-es típusú, T sejtek által közvetített túlérzékenységi reakció, melynek kialakulásához általában 2-3 nap szükséges
Dendritikus sejt	Heterogén, nyúlványos sejtípus, mely részben az antigének felvételében, részben MHC és kostimulációs molekulák expressziója révén naiv T sejteknek történő antigénbemutatásban játszik kitüntetett szerepet
Degranuláció	Citoplazmában tárolt granulumok kiürülése
Diapedesis	Gyulladás során sejtek érfalon keresztül történő szövetekbe való kilépése
Disseminated intravascular coagulation (DIC)	A véralvadási kaskád érrendszeren belüli aktiválódása, mely súlyos poszttranszfúziós szövődmény lehet.
Dysgammaglobulinemia	Kóros gammaglobulin termelés, általában szelektív immunglobulin deficiencia
EIA	Enzyme immunoassay (szolid fázisú assay, egyik igen elterjedt altípusa az ELISA)
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay, 96 lyukú polisztirol plate-en végzett igen elterjedt assay
Endotoxinok	Gram-negatív baktériumok sejtfalának patogén lipopolysaccharid komponensei
Eosinophilia	A vérben emelkedett eosinophil sejtszám (pl. parazita fertőzés vagy allergia esetén)

Epitope	Antigén determináns
Epstein - Barr vírus (EBV)	Humán herpeszvírus, a Burkitt lymphoma és a mononucleosis okozója
Erythema	Gyulladás során jelentkező vörösség a bőrön
Exotoxinok	Szolubilis toxinféhrjék, melyeket általában Gram-pozitív baktériumok termelnek (pl. botulinum toxin)
Exudatum	Gyulladás során termelődő extracelluláris folyadék, melyfehrjéket és sejtörmeléket tartalmaz
Fab fragmentum	A részlegesen emésztett immunglobulin molekula monovalens antigénkötő fragmentuma. Könnyű láncból és a nehéz lánc N-terminális részéből áll.
FACS	Fluorescence activated cell sorter, áramlási citométer
Fc receptor	Az antitest molekulák Fc régióját specifikusan kötni képes sejtfelszíni receptor
FITC	Fluorescein isothiocyanate- zöld színű fluoreszcens festék
Fluorescens antitest	Antitest, melyhez fluoreszcens festéket (pl. FITC-et) kötöttünk kémiai úton
Freund's adjuváns	Olajból vagy olajból és hővel előlt <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ből álló adjuváns (inkomplett és komplett Freund adjuvánsok)
$\gamma\delta$ T sejtek	T limfociták, melyek γ és δ T sejt receptor láncokat expresszálnak
GALT	Gut-associated lymphoid tissue, szekunder immunszerv
Gamma globulinok	Szérumproteinek csoportja, melyek elektroforézis során a katód felé vándorol, és többségében szérum immunglobulinokból áll
Gammopathiák	Gamma globulinszintek kóros eltérései
Germinatív centrum	A nyirokcsomók és lép azon területei, ahol a B sejtek osztódása és differenciálódása zajlik
Graft-versus-host reakció	Szövetátültetés során jelentkező reakció, mely során az átültetett T sejtek felismerik és megtámadják a recipiens szervezetet
Gut-associated lymphoid tissue	Tápcstorna nyálkahártyájával asszociált nyirokszövet, szekunder nyirokszerv, részei pl. Peyer's plakkok, appendix vermiformis és a nyálkahártya szoliter tüszői
H-2 komplex	Egér MHC. az egér 17-es kromoszómán helyezkedik el, alrégiói: K, I és D
Haptén	Kis molekula, melyönmagában nem vált ki immunválaszt, hacsak nem kapcsoljuk egy immunogén hordozó (karrier) molekulához.
Helper T cells	A T sejtek azon típusa, mely fő funkciója más T sejtek, B sejtek és makrofágok működésének támogatása.
Hemagglutináció	Vörösvértestek agglutinációja

Hemagglutinin	Bármely molekula (pl. antitest), mely vörösvértestek agglutinációját idézi elő.
Hemolizin	Bármely anyag, mely vörösvértestek lízisét idézi elő (többnyire ellenanyag)
High endothelial venule (HEV).	Postcapillaris venula, melyet speciális köbös endothel sejtek bélelnek. A keringő immunsejtek ezen erek falán át lépnek ki a szekunder immunszervekbe és szövetekbe.
Hisztamin	Biogén amin, mely bazofilek és hízósejtek granulumaiban tárolódik. Gyulladásos mediátor és immunregulátor.
Histiocyta	szöveti makrofág
HIV	Human Immunodeficiencia Virus, lentivírus, az AIDS okozója.
HLA	Human Leukocyte Antigen – az emberi MHC elnevezése.
Humorális immunitás	Testfolyadékokban oldott molekulák (elsősorban) antitestek által közvetített immunitás.
Hibridóma	Egy malignus partnersejt (általában myeloma sejt) és egy normál antitesttermelő sejt szomatikus fúziójából létrejött immortalizált, egyetlen antitestféléseget termelő sejt
Hiperszenzitivitás	Gyulladásos folyamat, melyet egy önmagában ártalmatlan antigénnel szembeni immunfolyamat okoz
Hipervariábilis régiók	Az immunoglobulin vagy TCR molekula azon részlete, ahol a legnagyobb aminosavszekvencia változékonyság figyelhető meg.
Hypogammaglobulinemia	Olyan immundeficiencia, melyben valamennyi immunoglobulin osztály alacsony mennyiségben van jelen a keringésben.
Ia antigén	Egér MHC II antigén
ICAM	Intercellular adhesion molecule, adhézíós molekula, az immunoglobulin szupercsalád tagja
Idiotípus	Az antitest molekulák és T sejt receptorok hipervariábilis szakaszai által létrehozott egyedi, adott molekulára jellemző antigéndeterminánsok, melyekkel szemben anti-idiotípus immunválasz alakulhat ki
Idiotípus hálózat	Idiotípusok közötti reakciók sorozata, az anti-idiotípiás antitestek és az anti-anti-idiotípiás antitestek, stb. Az immunválasz szabályozásában vesznek részt.
Immundeficiencia	Csökkent immunműködéssel járó állapot.
Immunelektroforézis	Elektroforézissel fehérjekeverék elemeire bontása, majd immunodiffúzió segítségével egyes fehérjék azonosítása
Immunogén	Bármely anyag, mely immunválaszt indukál.
Immunoglobulin	Antitest, glikoprotein, mely az IgG, IgM, IgA, IgD és IgE osztály valamelyikébe sorolható

Immunfenotipizálás	Az immunrendszer sejtjei által expresszált antigének kimutatása (pl. áramlási citometriával)
Immunprivilegizált hely	A szervezet azon helyei, ahonnan a beültetett szövet nem, vagy csak nagyon lassan lökődik ki (pl. elülső szemcsarnok, központi idegrendszer)
Immunfluoreszcencia	Immunológiai vizsgálat, melyben fluoreszcens festékekkel konjugált antitestet alkalmazunk
Immunszuppresszió	Az immunválasz gátlása vagy megszüntetése (pl. gyógyszerekkel)
Interleukin (IL)	Fehérvérsejtek által termelt citokin
Isograft	Genetikailag azonos személyek között átültetett szerv vagy szövet
Izotípus	Az immunglobulin osztály vagy alosztály szinonim elnevezése
Incidencia	Az a kockázat, hogy egy adott idő alatt hány új eset (betegség) jelentkezik egy populáción belül
J lánc	Rövid glikopeptid, mely az IgM és IgA molekulákban a monomer immunglobulinokat kapcsolja össze
Kachectin	A Tumor Nekrózis Faktor (TNF) korábbi elnevezése
Karrier	Immunogén makromolekula, melyhez haptént kötünk, és ezáltal azzal szemben is immunválaszt tudunk kialakítani
Kationos peptidek	Antimikrobiális, pozitívan töltött peptidek
Kemotaxis	Sejtek vándorlása kemotaktikus hatású anyag növekvő koncentrációjának irányába
Keresztreakció	Egy adott antigénre specifikus antitestnek vagy T sejtnak egy további antigénnel való reakciója, mely epitópok hasonlósága miatt jöhet létre.
Klasszikus komplement aktiváció	Antigén-antitest komplex által triggerelt enzimreakció sorozat, mely révén a komplementrendszer aktiválódik
Komplement fixációs (CF) teszt	Egy adott antigénnel reagáló antitestek kimutatására alkalmas assay
Komplement rendszer	Szérum proteinek összessége, melyek enzimkaskádként egymást aktiválva patogének lízisét, opszonizációját eredményezik, és gyulladások keltő hatásúak
Kupffer sejt	A májsinusoidok makrofágja
Langerhans sejt	A bőr hámsejtjei között található dendritikus sejt
Lektin	Szénhidrátkötő fehérje (pl. ConA)
Leukopenia	A vérben található fehérvérsejtszám kórosan alacsony volta
Light chain (L chain)	Könnyű lánc, az immunglobulin molekula kisebb polipeptid lánc típusa, mely kappa vagy lambda típusú lehet

Lipopolysaccharid (LPS)	Gram-negatív baktérium endotoxinja
Lymphadenopathia Lymphocytopenia	Nyirokcsomók kóros, többnyire megnagyobbodással járó elváltozása A limfociták számának kórosan alacsony száma. Átmeneti lymphocytopenia közelmúltbeli infekció vagy kemoterápia hatására jöhet létre.
Lymphokine-activated killer cells (LAK) sejt	Citotoxikus és NK sejtek, melyek <i>in vitro</i> IL-2 hatására aktiválódtak
Lupus antikoaguláns	Más néven lupus antitest, LA vagy lupus inhibitor: plazmamembrán foszfolipidekkel és fehérjékkel reagáló antitest, mely pro-trombotikus hatású.
Makrofág	Monocyta eredetű nagy, fagocita sejt a szövetekben.
Major histocompatibility complex (MHC)	Polimorf génkomplex az emberi 6. kromoszóma rövid karján, mely olyan sejtfelszíni molekulákat kódol, amelyek a különböző egyedek közti átültetett szövetek kilökődéséért felelősek.
MALT	Mucosal Associated Lymphoid Tissue, szekunder immunszerv
Mantoux próba	Tuberculin intradermális oltásával végzett bőrpróba, mely <i>Mycobacteriális</i> antigénekkal szembeni T sejttes immunitás megítélését teszi lehetővé
Membrane attack complex (MAC)	Multikomponens komplement komplex, mely a target sejt felszínén alakul ki, pórust képez és lízist okoz
Memória sejt	Hosszú életidejű T vagy B limfocita, mely antigénnel való találkozást követően alakul ki (a primer immunválasz során). Belőlük kiindulva a szekunder immunválasz gyorsabban alakul ki.
Mitogén	Bármely anyag, mely nyugvó sejtek proliferációját indukálja.
Monoklonális antitest	Egyetlen B sejtől/plazmasejtől kiindulva, tumor partnersejttel végzett szomatikus sejtfüzió révén létrehozott hibridóma terméke.
Monocita	Nagy, keringő fagocita sejt, a szöveti makrofágok prekursora.
Monokinek	Makrofágok és monociták által termelt citokinek
Mononukleáris fagocita rendszer	A monocitákból és a belőlük differenciálódott makrofágokból álló rendszer
Morbiditás	Azon személyek száma, akik adott számú személy közül megkapják a szóban forgó betegséget
Mortalitás	Egy adott betegségre vonatkozó halálozási arányszám a megbetegedési esetek számához viszonyítva
Myeloma	Plazmasejt tumor
Myeloma protein	Myeloma sejt által termelt immunglobulin
Natural killer sejt (NK)	Non-T, non-B limfocita, mely képes vírusfertőzött és tumorsejtek elpusztítására

Nehéz lánc (heavy chain, H chain)	Az immunglobulin molekula két lánc típusa közül a nagyobb. Az immunglobulin molekula két azonos nehézláncát diszulfid hidak kötik össze egymással
NK	Rövidítés Natural killer cell, természetes ölősejt
Nude egér	Mutáns egértörzs, mely thymus hiányos és szőrtelen
Opportunista patogén	Alacsony virulenciájú mikroorganizmus, mely egészségeseket nem betegít meg, azonban csökkent immunvédekezésű személyekben betegséget okozhat
Opszonizáció	A fagocitálható antigén (pl. baktérium) antitesttel vagy komplementtel való fedése, mely elősegíti a fagocitózist
Paracortex	A nyirokcsomó cortex és medulla régióinak határán található T sejt terület
Paratóp	Az immunglobulin antigénköti helye, mely komplementer az epitóppal
Passzív agglutináció	Partikulák agglutinációja, melyet a felületükön található antigénnel szembeni antitestek idéznek elő.
Passzív immunizáció	Egy adott szervezetnek más szervezetről származó antitestek vagy immunsejtek átvitelével történő immunizációja
Perforin	T-sejtek és NK sejtek által termelt molekula, mely polimerizálódva és target sejtek membránjába süllyedve pórusokat hoznak létre a sejtmembránban
Phytohemagglutinin (PHA)	Növényi eredetű lektin, mely mitogén hatású
Plazmasejt	Végdifferenciált B-sejt, mely nagy mennyiségben képes szolubilis antitestet termelni
Poliklonális gammopathia	A szérumban nagy mennyiségű immunglobulin előfordulása. Ezek az antitestek sok különböző specifikus, különböző klón termékei
Polimorfonukleáris leukocita	Fehérvérsejt granuláris citoplazmával, mely lehet neutrofil, bazofil és eozinofil sejt
PPD	Purified Protein Derivative, a tuberculin szinonimája. A PPD olyan precipitátum, melyet sterilizált és betöményített kultúrák szűrletéből hoznak létre
Prevalencia	Egy populáción belül egy adott betegségben szenvedő összes eset gyakorisága
Primer immundeficiencia	Öröklött immundeficiencia
Primer immunszervek	A limfociták érésének helye, a thymus és a vörös csontvelő
Primer immunválasz	Az antigénnel való első találkozáskor kialakuló immunválasz
PCT (procalcitonin) teszt	A procalcitonin a Ca ²⁺ homeosztázis szabályozásában kitüntetett szerepet játszó kalcitonin prekursora, melynek szintje bakteriális fertőzésekkel járó proinflammatorikus hatásra jellegzetesen megnő, miközben vírusfertőzés vagy nem fertőzőes gyulladás esetén szintje nem változik jelentős mértékben.

Prediktív érték	Diagnosztikus tesztekben azok aránya, akiket a vizsgálat pozitív eredménye helyesen diagnosztizált
Prediktív marker Prognosztikus érték	Mely önállóan képes megjósolni pl. egy adott terápiára adott választ Mely képes önállóan megjósolni a klinikai lefolyást
Radioallergo sorbent test (RAST)	Radioimmunoassay, mellyel egy adott antigénnel reagáló IgE mérhető
Radioimmunoassay (RIA)	Antigén-antitest kölcsönhatáson alapuló módszer, melyben radioaktívan jelzett molekula felhasználására kerül sor.
Radioimmunosorbent test (RIST)	Szolid fázisú radioimmunoassay, mellyel igen kis mennyiségű IgE is detektálható
Raynaud jelenség	A kéz- illetőleg lábujjakon epizodikusan jelentkező, vasospasmussal járó elfehéredés, melyet pl. hideg provokáció (vagy esetenként emocionális stressz) vált ki.
Reagin	Allergológusok által használt elnevezése az IgE molekulának
Rejekció	Átültetett szövetek vagy szervek kilökődése humorális és/vagy celluláris immunreakciók következtében
Reticuloendothelialis systema (RES)	Fagocita sejtekből álló hálózat, melynek legfontosabb tagjai a makrofágok
SLEDAI	Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index
Specifitás	Diagnosztikus teszt esetén azt mutatja meg, hogy a vizsgált egészséges minták hány %-a bizonyul negatívnak
Szekunder rejekció	Allograft felgyorsult rejekciója már immunizált recipiens esetében.
Szekunder immunszervek	A B és T sejtek antigénnel való találkozási helye, ahol aktiválódásuk, proliferációjuk és differenciálódásuk zajlik antigén hatására.(pl. lép vagy nyirokcsomók).
Szenzitivitás	Diagnosztikus teszt esetén azt mutatja meg, hogy a betegek hány %-a bizonyult a teszt során pozitívnak
Szenzitizáció	Immunválasz antigénnel történő indukciója
Szerologia	Antitestek kimutatása és mérése
Szérumbetegség	III-as típusú túlérzékenységi reakció, mely idegen szérum szervezetbe juttatását követően alakul ki annak következtében, hogy immunkomplexek jönnek létre a véráramban, melyek gyulladásos reakciót alakítanak ki. Nagy dózisú idegen savóval (pl. lósavóval) végzett terápia után jelentkezethet.
SRBC	Sheep Red Blood Cells (birka vörösvértest)
Splenomegalia	Lépmegnagyobbodás, mely pl. hemolyticus anaemiával, portális hypertensioval, leukémiával és lymphomával társulhat.
Systemic lupus erithematosus (SLE)	Szisztémás autoimmun megbetegedés, szisztémás lupus erythematosus

T sejt	Thymusban érő, T sejt receptort hordozó limfocita típus
T-dependens antigén	Olyan antigén, amellyel szembeni antitesttermeléshez T helper sejtek által termelt citokinekre van szükség
T-independens antigén	Olyan antigén, mely esetében az antitesttermelés T helper sejtek által termelt citokinek hiányában is végbemegy. Az ily módon termelt antitestek többnyire IgM típusúak.
Titer	Annak a legnagyobb hígításnak a reciproka, mely mellett még mérhető az immunreaktivitás
TNF blokkoló	Monoklonális antitestekkel (pl. Infliximab) illetőleg receptor fúziós fehérjével (pl. Etanercept) végzett TNF gátlás, melyet biológiai terápiaként számos autoimmun megbetegedésben (pl. reumatoid arthritisben) alkalmaznak
Tolerancia	Csökkent vagy hiányzó immunválaszképesség egy adott antigénre
Tuberculin	A <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , a <i>M. bovis</i> vagy a <i>M. avium</i> kivonata (protein frakciója), melyet bőrpróbában alkalmaznak
Vakcináció	Antigénnek/vakcinának a bevitele annak érdekében, hogy protektív immunitást hozzunk létre egy adott fertőző ágenssel szemben
Variábilis régió	Az B sejt receptor (immunglobulin) és a T sejt receptor azon része, melynek aminosav sorrendje molekulánként változik
Vasculitis	Az erek falát érintő heterogén gyulladásos megbetegedések összefoglaló neve
We (Westergren)	A vörösvértest süllyedés mértéke
Xenograft	Idegen fajtól származó transzplantátum

RÖVIDÍTÉSEK

7TM receptorok:	7 transzmembrán domainből álló membránreceptor-család
AChR:	Acetilolin receptor
ADC:	Analog-to-Digital Converter (analóg digitális átalakító)
ADCC:	Antibody-dependent, cell-mediated cytotoxicity
AID:	Aktiváció indukált citidin deamináz
AIRE:	Autoimmune regulator
ANA:	Antinukleáris antitest
APC:	Antigén prezentáló sejt (antigen presenting cell)
APECED:	Autoimmun polyendocrinopathia, candidiasis, ectodermalis dysplasia
APRIL:	A proliferation-inducing ligand
BAFF:	B-cell activating factor
BALT:	Bronchus-associated lymphoid tissue
BCR:	B-sejt receptor
BrdU:	5-bróm-2'-dezoxiuridin (timidin-analóg)
BSE:	Bovine spongiform encephalitis =szarvasmarha szivacsos agyvelőgyulladás
CALLA:	Common Acute Lymphocytic Leukemia Antigen (közös akut limfoid leukémia antigén)
CBA:	Cytometric Bead Array (mikrogyöngy-alapú detektáló rendszer)
CCL19:	Macrophage inflammatory protein-3-beta (MIP-3-beta)
CCL2:	Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1)
CCL20:	Macrophage inflammatory protein-3 (MIP-3-alpha)
CCL21:	Secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC)
CCP:	Ciklikus citrullinált peptid
CD:	Cluster of differentiation
CD62:	Selectin
CFU-GEMM:	Colony forming unit - granulocita, eritrocita, monocita, makrofág
CHO:	Chinese hamster ovary =kínai hörcsög ovárium sejtvonal)
CMT:	Célzott molekuláris terápia
ConA:	Concanavalin A
CPPs:	Cell penetrating peptides, sejt-permeábilis peptidek
CXCL12:	Stromal cell-derived factor-1 (SDF)
CXCL13: B	Lymphocyte chemoattractant (BLC)
DC:	Dendritikus sejt (dendritic cell)
DMSO:	Dimetil-szulfoxid
DNS:	Dezoxiribonukleinsav

EALT:	Eye-associated lymphoid tissues: Conjunctiva [CALT], Lacrimal Duct [LDALT] associated lymphoid tissues)
ECIS:	Electric cell-substrate impedance sensing
EDTA:	Etilén-diamin-tetraecetsav
EdU:	Etinil dezoxiuridin (timidin-analóg)
ELISA:	Enzyme-linked immunoassay
ER:	Endoplazmás retikulum
ERK:	Extracellular-signal-regulated kinase
Fab:	Az immunglobulin molekula variábilis régiója
FACS:	Fluorescence-activated cell sorting
FALS:	Forward angle light scatter (előreszórás)
Fc:	Az immunglobulin molekula konstans régiója
FCM:	Flow cytometry (áramlási citometria)
fMLF/fMLP:	Formil Met-Leu-Phe
FRET:	Fluorescence resonance energy transfer (fluoreszcencia energiatranszfer)
FS / FSC:	Forward scatter (előreszórás)
GAG:	Glucose amino glycane
GALT:	Gut-associated lymphoid tissue
GFP:	Green Fluorescent Protein (Zöld Fluoreszkáló Fehérje)
gfp:	Zöld Fluoreszkáló Fehérjét kódoló gén
HAMA:	Human anti-mouse antibodies
HAT:	Hipoxantin-aminopterin-timidin
HEPES:	Hidroxi-etilpiperazin-szulfonsav
HGPRT:	Hipoxantin-guanin-foszforibozil-transzferáz
HIV:	Human Immunodeficiency Virus (emberi immunhiányt előidéző vírus)
HLA:	Humán leukocita antigén
HUGO:	Human Genome Organization
ICAM:	Intercellular adhesion molecule (CD54)
Ig:	Immunoglobulin
IL-1b:	Interleukin 1 beta
iNOS:	Indukálható nitrogénoxid szintáz
IP3:	Inozitol tris-phosphate
IPEX:	Immun dysreguláció, polyendocrinopathia, enteropathia, X-hez kötött
ITP:	Immun trombocitopenia
JAM:	Junctional adhesion molecule
LAD:	Leukocita adhéziós deficiencia
LALT:	Larynx-associated lymphoid tissue
LFA-1:	Lymphocyte functionassociated antigen (CD11a/CD18)
LPS:	Lipo-poliszacharid

MAC:	Membrane attack complex
MACS:	Magnetic-activated cell sorting = mágneses sejtszeparálás
MAPK:	Mitogen-activated protein (MAP) kinase
MDR:	Multidrug rezisztencia
MEK:	MAP kinase kinase
MEK3:	MAP kinase kinase3
MEKK:	MAP kinase kinase kinase
MG:	Myasthenia gravis
MRD:	Minimal residual disease (maradék leukémia)
MTT:	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid
MuSK:	Muscle specific kinase
MV:	Mikrovezikula
NALT:	Nose-associated lymphoid tissue
NK sejt:	Natural killer sejt (természetes ölősejt)
NO:	Nitrogénoxid
PAMP:	Patogén-asszociált molekuláris mintázat (pathogen-associated molecular patterns)
PECAM-1:	Platelet endothelial cell adhesion molecule (CD31)
PHA:	Phytohaemagglutinin
PI:	Propidium jodid
PIP2:	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PLC:	Phospholipase C
PMT:	Photomultiplier tube (fotoelektronsokszorozó)
PRR:	Mintázat-felismerő receptorok (pattern recognition receptors)
PSLG-1:	P-selectin glycoprotein ligand-1 (CD162)
QC:	Quality control (minőségellenőrzés)
RA:	Rheumatoid arthritis
RALS:	Right angle light scatter (oldalszórás)
RF:	Reuma faktor
RFLP:	Restrikciós fragment hossz polimorfizmus
RN-áz:	Ribonukleáz
RNS:	Ribonukleinsav
ROI:	Reaktív oxigén intermediér
SALT:	Skin-associated lymphoid tissue
SEREX:	Serological identification of recombinantly expressed clones
SLE:	Systemas lupus erythematosus
SNP:	Single nucleotide polymorphism
SPA:	Spondylitis ankylopoetica
SS / SSC:	Side scatter (oldalszórás)
TCR:	T-sejt receptor

TLR:	Toll like receptor
TNF α :	Tumor necrosis factor α
TSH:	Thyreoidea stimuláló hormon
TUNEL:	Terminal DeoxynucleotideTransferase dUTP Nick End Labeling
VALT:	Vascular-associated lymphoid tissue
VCAM:	Vascular cell adhesion molecule (CD106)
VLA4:	Very late antigen-4 = integrin α 4 β 1 (CD49d/CD29)