

Prealbumin epitópok haptén-hordozó szerepének vizsgálata limfocita transzformációs tesztben a gyógyszerallergia igazolására

Husz Sándor

A KUTATÁS CÉLJA, A MUNKATERVBEN VÁLLALT KUTATÁSI PROGRAM ISMERTETÉSE

A gyógyszerallergia napjaink egyik legnagyobb problémájává kezd válni és ez a jövőben csak fokozódni fog. Jóformán alig van betegség, amelyet ne kezelnének gyógyszeresen, így a gyógyszer okozta nem várt reakciók igen fontos orvosi teendőt igényelnek. A gyógyszer mellékhatások kb. 5-15%-a allergiás mechanizmus következtében alakul ki. Klinikánkon évente 200-300 beteget kezelünk súlyos, gyógyszer okozta bőrtünetek, ritkábban anafilaxiás reakció miatt. Az ambuláns betegforgalomban is meglehetősen gyakoriak a gyógyszer okozta bőrtünetek, amelyeket járóbeteg rendelés keretei között oldunk meg. Mindezek alapján érthető az igény az egyes egyéneknél allergiát kiváltó gyógyszerek pontos érzékeny meghatározására.

Gyógyszerallergián csak az immunológiai mechanizmusok következtében kialakuló tüneteket értjük. Jól ismert, hogy a gyógyszerallergiát kiváltó immunpatológiai mechanizmusok nem egységesek, egyaránt előfordulnak I. korai típusú (IgE mediált), II. cytotoxikus reakció III. immunkomplex mediált vasculitis, IV. sejtközvetített reakciók. Annak ellenére, hogy a gyógyszerérzékenység patomechanizmusa ennyire heterogén, feltételezhető, hogy minden esetben a beteg szervezetében érzékenyített limfociták vannak. Ezért a gyógyszerérzékenység kimutatására alkalmazható *in vitro* eljárás lehet az antigén hatására jelentkező limfocita proliferáció mérése.

A gyógyszerallergiák laboratóriumi diagnózisára klinikánkon kialakult hosszú évek tapasztalata alapján legmegbízhatóbb a limfocita transzformációs teszt (LTT). A módszer lényege, hogy a beteg perifériás véréből szeparált limfociták tenyésztésében az érzékenységet okozó gyógyszer jelenlétében a sejtek blasztos átalakulása következik be, és a DNS szintézis fokozódása mérhető a ³H-timidin beépülésével, vagy újabban a sejt proliferáció mértékét jelző MTT kolorimetrikus módszerrel. A teszt érzékenysége 70 % körül van. A pozitív eredmény kétségtelenül jelzi, hogy az adott gyógyszer okozta az allergiás reakciót, a negatív eredmény viszont nem zárhatja teljesen a gyógyszerérzékenységet, mivel előfordul, hogy a gyógyszer metabolitja okozza az allergiás túlérzékenységet. Klinikánk munkatársai az eltelt 30 év alatt összesen 10 024 betegnél 24 644 gyógyszerrel végeztek LTT tesztet.

Korábbi vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy gyógyszer okozta Lyell-syndromás esetekben szérum-prealbumin hiány, illetve igen alacsony szérum prealbumin szint figyelhető meg. Azt is megfigyeltük, hogy gyógyszerallergiás és allergiás kontakt dermatitiszes betegekben jelentősen csökken a szérum-prealbumin szintje. Egyéb lehetőségek mellett (májkárosodás, negatív akut fázis reaktáns, stb.) felvetődött a prealbumin esetleges haptén hordozó szerepe is. További vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy a fenti betegségekben emelkedett a prealbumint hordozó limfociták száma (antigénhordozó limfociták); a prealbumin és a feltételezett antigén eluálható volt a limfociták membránjáról, és az eluátummal a betegek limfocitái specifikusan transzformálhatóak voltak. Ezek az adatok arra utaltak, hogy a szervezetben egy fontos karrierhordozó fehérje nagy valószínűséggel a prealbumin.

Ezért korábbi OTKA témánkban célul tűztük ki az LTT vizsgálat specificitásának növelését oly módon, hogy gyógyszereket kapcsoltunk humán prealbuminhoz (OTKA 1991-1994). Sajnos a beszerezhető tiszta humán prealbumin rendkívül drága volt, így csak nagyon kevés esetben tudtuk elvégezni az LTT-t, összehasonlítva prealbuminhoz kapcsolt gyógyszerrel és csak a gyógyszerrel. Megállapítottuk, hogy bizonyos gyakori gyógyszerallergiát okozó szerek (penicillin, sulfonamid, amidazophenum, novamidazophenum) esetében ezen gyógyszerekhez kötött prealbuminnal végzett vizsgálatokban olyan egyéneknél is ki tudtuk mutatni a gyógyszerérzékenységet, amikor csak a gyógyszerrel ez nem sikerült.

Az elmúlt években a molekuláris biológiai és a bioinformatikai módszerek robbanásszerű fejlődése lehetővé tette, hogy megismerjük a humán fehérjék többségének szerkezetét és biotechnológiai eljárásokkal ezen fehérjék, ill. biológiai szempontból fontos epitópjai előállíthatók. Ezen eredmények birtokában célul tűztük ki, hogy korábbi munkánkat folytatva megvizsgáljuk a prealbumin egyes szerkezeti elemeinek haptén hordozó szerepét és különböző gyógyszerekhez kapcsolva nagyszámú betegben meghatározzuk azokat a kombinációkat, melyek segítségével az LTT teszt hatékonysága növelhető.

A SZERZŐDÉSben VÁLLALTAKTÓL VALÓ ELTÉRÉS OKAI

A szerződésben vállaltak mellett a munkahipotézisünket nem igazán alátámasztó eredmények hatására a kutatási szakasz második fázisában nagyobb hangsúlyt fektettünk a gyógyszer érzékeny betegek gyógyszer jelenlétében osztódó limfociták szubpopulációinak és aktivációs markereinek jellemzésére.

A TÁRGYKÖRBE KIDOLGOZOTT ELMÉLETEK, MÓDSZEREK, ELJÁRÁSOK ÉS AZ ELÉRT EREDMÉNYEK

Célkitűzés I.

A prealbumin feltételezett haptén hordozó szerepéhez alkalmas peptid szakasz kiválasztása, szintézise, gyógyszerekhez való kapcsolása és a konjugátumok tesztelése gyógyszer-allergiában szenvedő betegeknél.

Módszerek

1. A humán prealbumin fehérje számítógépes analízise és potenciálisan immunogén hosszabb fragmensének kiválasztása.

A humán prealbumin szekvenciájának analízisével kiválasztottunk egy 31 aminosavból álló immunogén szakaszt (CPLMVKVLDAVRGSPAINVAVHVFRKAADDT), a továbbiakban CPDT, majd szilárd fázisú peptidszintézissel előállítottuk azt. Ennek során optimalizáltuk a szintézis módszert a fenti szekvencia nagyobb mennyiségben történő előállítására. A terméket HPLC-vel izoláltuk és szerkezetét spektroszkópiai módszerrel bizonyítottuk.

2. A hapténként felhasználandó gyógyszermolekulák kiválasztása és kapcsolásuk a CPDT prealbumin peptidhez.

Hapténként részben klinikai tapasztalatok, részben kémiai ismeretek alapján négy, viszonylag gyakran allergénként szereplő hatóanyagot választottunk ki. Ezek az Acetil-szalicilsav (Aspirin), a Penicillin, az Antipirin és a Superseptyl.

Elsőnek két, szabad karboxil csoporttal rendelkező gyógyszermolekula kapcsolására került sor (acetil-szalicilsav, azaz aszpirin. ill. penicillin). A kapcsolás DMF és pH 7 puffer elegyében, vízzeloldható karbodiimidiummal (EDACxHCl) történt, majd dialízissel és liofilizálással izoláltuk a terméket. A konjugáció minkét esetben sikeres volt, a kapott termékekkel megkezdődtek a biológiai vizsgálatok. A következőkben a két, szabad aminocsoporttal rendelkező gyógyszermolekula (Superseptyl vagy Sulfamidinium, 4-amino-N-(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)-benzenesulfonamide ill 4-amino antipyrine) kapcsolása történt meg a peptidhez más kapcsolási stratégiákkal.

Klinikai vizsgálatok

Jól meghatározott klinikai tünetekkel rendelkező gyógyszerallergiában szenvedő betegek és egészséges személyek perifériás véréből limfocitákat szeparáltunk, majd LTT vizsgálatot végeztünk a peptid-gyógyszer konjugátumokkal és egyenként teszteltük azok hatékonyságát a hagyományos, csak gyógyszer alapú vizsgálatokhoz képest. Az LTT vizsgálatot a klinikánkon módosított MTT assay alapján végeztük. Pozitív kontrollként minden esetben fitohemagglutinin (PHA) stimulációt alkalmaztunk (10 µg/ml) és a gyógyszer által okozott

proliferaáció növekedést a gyógyszermentes kultúrákhoz viszonyítottuk. Pozitívnak ítéltünk egy LTT vizsgálatot, ha gyógyszer-indukált és a negatív limfocita kultúrák proliferációjának hányadosa $>1,5$. A hatóanyagok alkalmazott optimális koncentrációját citotoxikus assay segítségével határoztuk meg. Ennek alapján az Acetil-szalicilsavat 38 $\mu\text{g/ml}$ és 3,8 $\mu\text{m/ml}$ végkoncentrációban, a Penicillint 57 $\mu\text{g/ml}$ és 5,7 $\mu\text{g/ml}$, az Antipirint 100 $\mu\text{g/ml}$ és 10 $\mu\text{g/ml}$, a Superseptyl pedig 65 $\mu\text{g/ml}$ és 6,5 $\mu\text{g/ml}$ végkoncentrációban alkalmaztuk. Eredményeinket az 1. táblázatban foglaltuk össze.

Eredmények és megbeszélés

1. táblázat

Gyógyszer	Vizsgált betegek száma	Mindkettőre pozitív betegek száma	Csak az adott gyógyszerre pozitív betegek száma	Csak a prealbumin peptid + gyógyszer konjugátumra pozitív betegek száma
Acetilszalicilsav	38	25	3	2
Penicillin	32	24	4	4
Aminoantipirin	28	19	5	2
Superseptyl	21	14	4	2

Az eredeti gyógyszer és a gyógyszer-prealbumin peptid konjugátumok alkalmazhatósága gyógyszerérzékenység kimutatására LTT vizsgálattal gyógyszerallergiás betegekben.

Korai eredményeink azt mutatták, hogy a prealbuminhoz kötött, allergénként gyanúba keveredett hatóanyagok esetében, néhány esetben pozitív eredményt tudunk kimutatni a csak gyógyszerből kivont hatóanyaggal szemben. Kezdeti vizsgálatainkban 17 betegnél, akiknél az anamnézisben Penicillin allergia lehetősége felmerült, elvégeztük a vizsgálatot Penicillinnel és Penicillin-CPDT-vel. A Penicillin injekcióból kioldott hatóanyaggal szemben két betegnél kaptunk pozitív eredményt, míg a Penicillin CPDT-t alkalmazva három betegnél sikerült igazolni az érzékenységet. Acetil-szalicilsavval és acetilszalicilsav-CPDT-vel 15 beteget vizsgáltunk, ezek közül egy betegnél sikerül igazolni a gyógyszer érzékenységet mind a két alkalmazott hatóanyaggal. Nagyobb betegszámmal és korábban már bizonyítottan gyógyszerallergiás betegeknél elvégzett vizsgálataink azonban sajnos nem igazolták munkahipotézisünket. Esetenként előfordult, hogy a gyógyszer-peptid konjugátummal végzett vizsgálat eredménye pozitív lett a csak a gyógyszerrel végzett vizsgálattal szemben, de konzekvens különbséget nem találtunk a gyógyszer-prealbumin peptid (CPDT) javára.

Célkitűzés II.

Továbbiakban megvizsgáltuk, hogy gyógyszer érzékeny betegeknél a hatóanyag hogyan befolyásolja a limfocita szubpopulációk alakulását és a B limfociták felszíni immunglobulin (IgD, IgM, IgG) kifejeződését.

Betegek

A betegek klinikai adatait a 2. táblázatban tüntettük fel. A vizsgálat időpontjában a betegek tünetmentesek voltak. Az egészséges kontrollok nem mutattak érzékenységi reakciót az adott gyógyszerekre.

2. táblázat

	Beteg 1 A.A.	Beteg 2 Cs.I.	Beteg 3 Sz.I.	Beteg 4 K.J.
Nem/életkor	Nő/40	Nő/65	Nő/63	Nő/74
Érzékenyítő gyógyszer	Sulfamethoxazole	Penicillin	Famotidine	Trimetazidine
Klinikai tünetek a gyógyszer szedésekor	Quincke oedema	Nem ismertek	Dermatitis	Testszerte vörös viszkető papulák, plakkok
LTT vizsgálat	+	+	+	+
Gyógyszer bevétele óta eltelt idő	25 év	5 év	2 hónap	2 év

Módszerek

A betegektől vett vérből fehérvérsejteket izoláltunk (Ficoll-Paque, AmershamBiosciences, Uppsala, Sweden) majd PBS pufferben történő mosás után a frissen izolált sejtek egy részét az alábbi fluoresceinnel jelölt monoklonális ellenanyagokkal inkubáltuk (30 perc, 4°C): anti-human CD19-PE (Dako Cytomation, Denmark), anti-human IgD-FITC, anti-human IgG-APC, anti-human IgM-APC, egér IgG2 α -FITC, egér IgG1-APC, patkány IgG1-PE (valamennyi BD Pharmingen, CA, USA). A sejtek másik részét 72 óráig aktiváltuk 100 μ g/ μ l koncentrációban azzal az adott gyógyszerrel, amelyre az adott beteg érzékeny volt. Az aktiválás után a sejteket az előzőekben felsorolt jelölt antitestekkel áramlási citometriai vizsgálatokhoz megfestettük. A kontrol egyénektől származó sejteket specifikus allergénnel nem aktiváltuk. A vizsgálni kívánt B limfocitákat a sejt felszíni CD19 expressziójuk alapján áramlási citometria segítségével azonosítottuk, majd a CD19+ B limfociták felszínén kifejeződő IgD, IgG és IgM molekulák expresszióját határoztuk meg.

Eredmények és megbeszélés

Az áramlási citometriai vizsgálatok eredményeit a 3. táblázatban részletezzük. A CD19+ B limfocitákat kikapuztuk, majd meghatároztuk az IgD, IgM és IgG pozitív sejtek %-os arányát. Az 1. ábra a gyógyszerallergiás betegek esetén az IgD, IgM és IgG pozitív sejtek %-os arányát mutatja a CD19+ B limfocita populációban frissen szeparált sejteken, valamint gyógyszeraktiválást követően. Eredményeink azt mutatják, hogy a frissen izolált B limfociták felszínén mindhárom immunglobulin expressziója nagyfokú variabilitást mutat a gyógyszerallergiás betegek és a kontroll egyének esetén is. Aktiválást követően a különböző immunglobulinok sejt felszíni kifejeződése szintén individuálisan változik minden vizsgált egyén esetén. Mivel a betegek egy részénél csökkent, másoknál emelkedett a különböző immunglobulinokat expresszáló sejtek aránya, így az esetszám további növelését tervezzük.

3. táblázat

Felszíni immunglobulint (IgD, IgM, IgG) hordozó CD19+ sejtek arányának változása gyógyszerérzékeny betegek limfocita tenyészetében az érzékenyítő gyógyszer hatására

Kontroll csoport

<u>1. kontroll</u>	Nem aktivált	Aktivált	<u>2. kontroll</u>	Nem aktivált	Aktivált
IgD+ (%)	59,90	70,2	IgD+ (%)	62,19	58,68
IgM+ (%)	59,08	74,2	IgM+ (%)	43,82	30,26
IgG+ (%)	19,30	13,10	IgG+ (%)	19,83	37,50

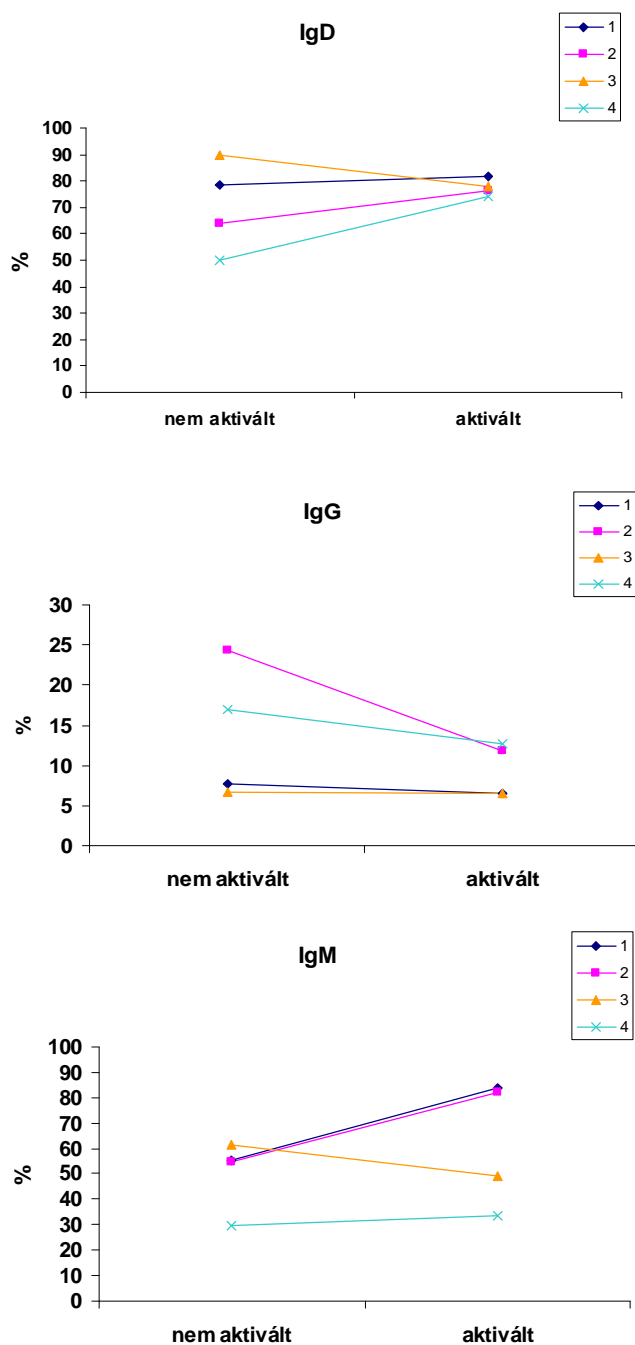
Allergiás betegek

<u>1. beteg</u>	Nem aktivált	Aktivált	<u>2. beteg</u>	Nem aktivált	Aktivált
IgD+ (%)	78,58	81,75	IgD+ (%)	64,14	76,59
IgM+ (%)	55,20	83,61	IgM+ (%)	54,77	82,25
IgG+ (%)	7,70	6,53	IgG+ (%)	24,35	11,86

<u>3. beteg</u>	Nem aktivált	Aktivált	<u>4. beteg</u>	Nem aktivált	Aktivált
IgD+ (%)	89,77	77,9	IgD+ (%)	50,08	74,21
IgM+ (%)	61,63	49,15	IgM+ (%)	29,44	33,7
IgG+ (%)	6,7	6,48	IgG+ (%)	16,96	12,65

Ezen eredményeinkből messzemenő következtetést nem kívánunk még levonni az alacsony esetszám miatt, de a változások konzekvensen megjelentek, így érdemesnek tartjuk a vizsgálatok folytatását.

1. ábra



A gyógyszerallergiás betegeknel (egyenként külön színnel jelölve) az IgD, IgM és IgG pozitív sejtek %-os arányának változása a CD19+ B limfocita populációban frissen szeparált sejteken, valamint a gyógyszeraktiválást követően.

Célkitűzés III.

Gyógyszer-specifikus limfociták gén expressziós mintázatának és citokin produkciójának vizsgálata

Gyógyszer-specifikus T sejtek a legtöbb gyógyszer-indukálta túlérzékenységi reakciókban előfordulnak. Ezen sejtek részt vehetnek a gyulladásos reakciók kialakításában, illetve közvetlenül bőrreakciók kiváltásában. A gyógyszerek a limfocitákat vagy haptén-protein komplex formájában vagy közvetlen a T sejt receptorhoz való direkt kötődéssel aktiválják.

Közismert tény, hogy az adott gyógyszerre érzékeny egyéneknél a gyógyszer minimális bevitele súlyos reakciót vált ki még évekkel a kezdeti hiperszenzitivitási reakció után is. Ez azt jelzi, hogy a gyógyszer érzékeny egyéneknél egy állandó repertoárja van a gyógyszer-specifikus limfocitáknak, amelyeket az adott szer aktiválni képes.

Végső soron minden allergiás reakció az allergén-specifikus T limfociták jelenlétén múlik. Mivel a gyógyszerérzékenységben szenvedő betegek esetében kevéssé ismertek a gyógyszer-specifikus limfociták fenotípus sajátosságai, felszíni tulajdonságaik és a gyógyszerre bekövetkező gén-expressziós mintázat változásai, ezért célul tűztük ki ezen jellemzők vizsgálatát 4 klinikailag jól definiált, ismert gyógyszerre érzékeny betegünkönél 2 egészséges egyénhez viszonyítva. A human TH1-TH2-TH3 RT² ProfilerTM PCR Array segítségével 84 gén expresszióját vizsgáltuk, amelyek a CD4+ helper T limfociták TH1-TH2-TH3 típusaival vannak kapcsolatban. Szerepelnek benne TH1, TH2 és TH3 reprezentatív citokinek és receptoraik génjei, emellett ezen citokinek kifejeződésének regulációjában szerepet játszó transzkripció faktorok és a CD4+ limfociták egyéb markerei. Megtalálhatók továbbá immunaktivációban, az antimikrobiális humorális válaszban szerepet játszó gének.

A tanulmányozott gének komplex listáját a 4. táblázat tartalmazza (12. oldal).

Módszerek

A gyógyszerek és az alkalmazott koncentrációk:

A gyógyszerek nem toxikus koncentrációit alkalmaztuk az *in vitro* indukciós vizsgálatokhoz. Az alkalmazott gyógyszereket az alábbi koncentrációkban használtuk:

Sulfamethoxazole: 30 µg/ml és 3 µg/ml; Aceclofenac. 100 µg/ml és 10 µg/ml; Penicillin: 50 µg/ml és 5 µg/ml; Famotidine: 100 µg/ml és 10 µg/ml; Trimetazidine: 100 µg/ml és 10 µg/ml.

Betegek

A betegek klinikai adatai a 2. táblázatban szerepelnek. A vizsgálat időpontjában a betegek tünetmentesek voltak. Az egészséges kontrollok nem mutattak érzékenységi reakciót az adott gyógyszerekre.

Limfocita transzformációs teszt (LTT)

96 lyukú plate-ken dolgoztunk. 100 µl limfocita tenyésztő médiumban felvett mononukleáris sejt szuszpenziót használtunk, amelyet Ficoll grádiensen szeparáltunk és a sejtszám 2×10^6 /ml-re lett beállítva. 4-6 paralelt készítettünk minden mintából. A negatív kontroll csak sejteket tartalmazott, limfocita tenyésztő médiumban. A pozitív kontrollhoz a tenyésztő folyadék fitohemagglutinint (PHA) is tartalmazott 10 µg/ml koncentrációban. A gyógyszerhígításokat a fentebb leírt hígítási séma szerint a limfocita tenyésztő médiumban készítettük el. A negatív kontrollhoz 100 µl médiumot mértünk, a pozitív kontrollhoz 100 µl PHA-t tartalmazó médiumot, a többi lyukhoz pedig a kért gyógyszerhígításokat, szintén 100 µl térfogatban. 72 óráig inkubáltuk a plate-ket 37°C-os 5% CO₂-t tartalmazó termosztátban, majd leállítottuk a kultúrákat. A sejt proliferáció mérésére az MTT vizsgálatot alkalmaztuk.

Mintagyűjtés génexpressziós és citokin szekréción vizsgálatokhoz

A génexpressziós vizsgálatokhoz a szeparált limfocitákat (2×10^6 sejt/ml) 24-lyukú plate-ben inkubáltuk a gyógyszert tartalmazó, ill. nem tartalmazó tápfolyadékban. 72 h eltelte után a sejtfelülűsűkből mintát vettünk citokin vizsgálatokhoz, majd a sejteket PBS-el mostuk és a sejttöledékhez adtunk 1 ml RNS-stabilizáló Trizol reagenst. Felhasználásig a sejtfelülűsűket és az RNS izoláláshoz vett mintákat -70 C°-on tároltuk.

Mivel a gén expressziós array 12 vizsgálatot tett lehetővé számunkra, a következő mintákat válogattuk ki: 2 egészséges kontroll frissen szeparált limfocitái (C1 és C2) és Sulphamethoxazole-lal indukált limfocitái (C1A és C2A), a négy kiválasztott beteg frissen szeparált limfocitái (B1, B2, B3 és B4), valamint az adott érzékenyítő gyógyszerrel indukált limfociták (B1A, B2A, B3A, B4A).

RNS izolálás és RT-PCR array

Az RNS izolálás Trizol reagenssel történt a gyári protokoll alapján (Invitrogen). Az izolált RNS-t tovább tisztítottuk SV Total RNA Isolation System (Promega) felhasználásával. Az RNS koncentrációt BioRad fotométerrel mértük és az egyes mintákból kinyert RNS összmenyisége 0,5-2 µg között változott. Mintánként 100 ng RNS-t írtunk át cDNS-é az RT²

PCR Array First Strand kit (SuperArray Bioscience Corporation) segítségével. A TH1-TH2-TH3 génexpressziós vizsgálatokhoz Human RT² RNA QC PCR Array-t (SuperArray Bioscience Corporation) használtunk az ajánlott SuperArray RT² Real-TimeTM SYBR Green PCR Master Mix-szel. A kit 12 minta vizsgálatára adott lehetőséget. Minden minta esetében sor került a kérdéses 84 gén mellett 5 háztartási gén vizsgálatára, az RT hatékonyságának, az esetleges genomi DNS szennyeződésnek és a PCR minőségének tesztelésére. A Real-Time PCR futtatásokat iCycler (BioRad) készülékkel végeztük. Az eredmények értékelése a SuperArray Bioscience Corporation honlapján ajánlott és letölthető RT² Profiler PCR Array Data Analysis software segítségével történt.

A fehérvérsejt aktiválást követően összegyűjtött és lefagyasztott felülúszókból különböző TH1 és TH2 citokinek ELISA módszerrel történő vizsgálatát tervezzük elvégezni. Az ehhez szükséges ELISA kitéket beszereztük, a vizsgálati protokollokat beállítottuk. A későbbiekben vizsgálni kívánt citokinek a következők: IL-4, IL-5, IL-10, GM-CSF, IFN- γ . (mindegyik BD Pharmingen).

Eredmények és megbeszélés

A vizsgálatban jól dokumentált gyógyszerérzékenységben szenvedő betegek vettek részt. Mind a négy beteg esetében a gyógyszerérzékenységet bizonyította pozitív és specifikus *in vitro* T sejt reaktivitás a kérdéses gyógyszerre LTT módszerrel. A betegek a vizsgálat időpontjában tünetmentesek voltak és a gyógyszer bevétele, valamint a klinikai tünetek óta 2 hónap - 25 év telt el.

A SuperArray vizsgálat szigorú validitási feltételeinek sajnos a C2 és C2A minták nem tettek eleget, így az értékelésből kizárásra kerültek, így csak a C1 és C1A minták szolgálhattak kontrollként. A részletes eredményeket az 5. táblázatban foglaltuk össze. Minden egyes minta génexpressziós vizsgálati eredményei először 5 háztartási génre lettek normalizálva a letölthető RT² Profiler PCR Array Data Analysis software segítségével. Ezután páronkénti összehasonlítás történt, az aktivált minták génkifejeződési mintázatait vetettük egybe ugyanazon személyek nem indukált mintáival. Az 5. táblázatban szereplő értékek az indukált/nem indukált limfocita kultúrák ún. „küszöb ciklus” értékeinek hányadosát tartalmazzák génenként bemutatva. Amennyiben ez az érték 2-nél nagyobb, az adott gén kifejeződésének fokozódását, ha 1-nél kisebb a kifejeződés csökkenését jelentheti. Az 5. táblázatban külön megjelöltük a TH1 citokinek és rokon gének, a TH2 citokinek és rokon gének valamint a CD4⁺ T sejt markerek csoportjait.

Az eredményekből látható, hogy az egészséges kontroll limfocitáihoz képest mind a 4 beteg esetében az érzékenyítő gyógyszer hatására sokkal több vizsgált gén kifejeződésének változása következett be, elsősorban pozitív irányban. Az is megállapítható, hogy a TH1 és TH2 típusú válaszok egyaránt indukálódnak a gyógyszerallergiás betegeknél, bár egyénekenként különböző kifejeződési mintázatot mutattak. Eredményeinket kiegészítik majd a limfocita tényezetek felülúszójából végzett citokin ELISA vizsgálatok (IL-4, IL-5, IL-10, GM-CSF, IFN- γ).

Vizsgálataink megerősítik azt a vélekedést, hogy a gyógyszerallergia mind klinikai megjelenésében és lefolyásában, mind immunológiai mechanizmusaiban heterogén kórkép, a TH1 és TH2 típusú válaszok keverednek. Saját gén expressziós adatainkat szeretnénk részletesebben tovább elemezni.

KOMMENTÁR

A gyógyszerallergia diagnosztikája, annak megbízhatósága az utóbbi 30 évben lényegesen nem változott, nem fejlődött. Ezért kívántuk a prealbumin antigenikus epitópjával jelölt gyógyszerek szerepét megvizsgálni, hogy fokozza-e az LTT vizsgálat szenzitivitását. Sajnos eredményeink ezt nem igazolták, bár nagyobb számú betegeken végzett vizsgálat nehézségekbe ütközött a vizitdíj bevezetése miatt. (Nem tudtunk biztosan gyógyszer érzékeny betegeket visszarendelni és újra tesztelni.) Ezért a fennmaradó időben és az anyagi lehetőségeinktől függően a patomechanizmus irányában történtek vizsgálatok biztosan gyógyszer érzékeny egyének esetében.

Ezek az eredmények megerősítik a gyógyszerallergia immunológiai heterogenitását. A modern módszerekkel nyert adatok a citokin markerek és a megváltozott expressziójú gének a gyógyszerallergia patomechanizmusának újabb irányait jelölik ki. A vizsgálatok komplettálása után eredményeinket közlemény formájában kívánjuk közreadni.

Összefoglalva megállapítható, hogy az előző eredményeink és feltételezéseink alapján elvégzett kísérleti sorozat nem igazolta, hogy a prealbumin antigenikus peptidjéhez kapcsolt gyógyszer növelné az LTT eredményességét. Csak néhány olyan eset volt, ahol az antigenikus epitóphoz kapcsolt gyógyszer adott pozitívítást ellentétben a csak gyógyszerrel végzett LTT-vel.

A patomechanizmus irányában modern módszerekkel végzett kutatások sok új eredményt hoztak és ezek a későbbiekben folytatásra alkalmasak.

4. táblázat

A TH1-TH2-TH3 SuperArray segítségével vizsgálható gének (a táblázatban a gének ismert rövidítései szerepelnek).

IL17A A01	CCL11 A02	CCL5 A03	CCL7 A04	CCR2 A05	CCR3 A06	CCR4 A07	CCR5 A08	CD28 A09	CD4 A10	CD40LG A11	IL23A A12
CD80 B01	CD86 B02	CEBPB B03	CREBBP B04	CSF2 B05	CTLA4 B06	CXCR3 B07	FASLG B08	GATA3 B09	GFI1 B10	GLMN B11	GPR44 B12
HAVCR2 C01	ICOS C02	IFNG C03	IGSF6 C04	IL10 C05	IL12B C06	IL12RB2 C07	IL13 C08	IL13RA1 C09	IL15 C10	IL18 C11	IL18R1 C12
IL1R1 D01	IL1R2 D02	IL2 D03	IL2RA D04	IL4 D05	IL4R D06	IL5 D07	IL6 D08	IL6R D09	IL7 D10	IL9 D11	INHA D12
INHBA E01	IRF1 E02	IRF4 E03	JAK1 E04	JAK2 E05	LAG3 E06	LAT E07	MAF E08	MAP2K7 E09	MAPK8 E10	NFATC1 E11	NFATC2 E12
NFATC2IP F01	PCGF2 F02	PTPRC F03	SFTPD F04	SOCS1 F05	SOCS2 F06	SOCS5 F07	SPP1 F08	STAT1 F09	STAT4 F10	STAT6 F11	TBX21 F12
TFCP2 G01	TGFB3 G02	TLR4 G03	TLR6 G04	TMED1 G05	TNF G06	CD27 G07	TNFRSF8 G08	TNFRSF9 G09	TNFSF4 G10	TYK2 G11	YY1 G12
B2M H01	HPRT1 H02	RPL13A H03	GAPDH H04	ACTB H05	HGDC H06	RTC H07	RTC H08	RTC H09	PPC H10	PPC H11	PPC H12

H01 – H05 háztartási gének

H01- Beta-2-microglobulin

H02 - Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (Lesch-Nyhan syndrome)

H03 - Ribosomal protein L13a

H04 - Glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase

H05 - Actin, beta

H06 - Human Genomic DNA Contamination

H07-H08-H09 - Reverse Transcription Control

H10-H11-H12 - Positive PCR Control

Symbol	Well	Kontroll Fold diff.	Beteg 1 Fold diff.	Beteg 2 Fold diff.	Beteg 3 Fold diff.	Beteg 4 Fold diff.	A megváltozott expressziójú gén funkciója
IL17A	A01	1,58	2,43	1,16	0,86	0,95	
CCL11 (eotaxin)	A02	0,49	0,43	1,01	2,99	1,01	eosinofil sejtek migrációja, allergiás folyamatok beindítása
CCL5 (RANTES)	A03	1,58	0,02	0,77	0,80	0,72	kemoattraktáns a monociták, memória T sejtek számára
CCL7 (MCP-3)	A04	0,91	0,86	4,35	178,53	10,70	kemoattraktáns a monociták, aktivált T sejtek számára
CCR2 (MCP R)	A05	1,47	0,33	2,17	1,49	0,62	MCP-1 receptora
CCR3 (eotaxin R)	A06	0,52	0,33	1,01	2,11	0,88	eosinofil sejtek aktivációja
CCR4	A07	1,82	0,49	1,01	0,57	0,58	
CCR5	A08	0,52	0,33	1,01	2,11	0,82	
CD28	A09	0,52	0,33	1,01	2,11	0,82	T sejteken costimulator molekula, aktivációhoz szükséges
CD4	A10	1,95	1,60	0,72	0,40	0,54	CD4 felszíni marker
CD40LG	A11	0,91	0,33	0,44	0,57	1,01	B sejtek működését szabályzó T sejt faktor
CD69	A12	1,20	1,84	0,88	0,57	1,77	
CD80	B01	0,52	0,33	2,17	2,43	0,82	Costimulator molekula, aktivációhoz szükséges (CD28-CD80)
CD86	B02	1,20	1,06	0,22	0,99	0,82	
CEBPB	B03	1,95	1,84	1,16	2,11	2,17	Transzkripciós faktor IIL-6 gén rezponzív elemje
CREBBP	B04	0,91	0,46	1,89	0,80	0,95	
CSF2 (GM- CSF)	B05	0,52	0,33	1,43	3,94	0,82	növekedési faktor
CTLA4	B06	0,49	0,75	1,16	0,57	1,01	
CXCR3	B07	1,28	0,65	0,33	0,75	0,58	kemokin receptor
FASLG	B08	0,52	0,33	0,58	1,13	0,41	
GATA3	B09	0,52	0,43	0,33	1,06	0,58	
GFI1	B10	2,75	1,30	0,82	1,21	0,88	
GLMN	B11	1,82	0,57	0,77	1,13	0,88	
GPR44	B12	0,52	0,33	0,95	0,61	0,82	
HAVCR2	C01	1,28	1,13	1,43	0,37	0,51	
ICOS	C02	1,28	0,65	1,43	0,99	1,65	

Symbol	Well	Kontroll	Beteg 1	Beteg 2	Beteg 3	Beteg 4	A megváltozott expressziójú gén funkciója
		Fold diff.	Fold diff.	Fold diff.	Fold diff.	Fold diff.	
IFNG	C03	0,56	1,06	7,06	2,11	0,82	Interferon-gamma
IGSF6	C04	1,12	2,11	0,88	0,80	3,07	immunglobulin superfamily member 6; antigénkötés
IL10	C05	0,52	0,33	1,01	0,30	0,88	
IL12B	C06	0,52	0,33	1,01	2,11	0,82	Interleukin 12
IL12RB2	C07	0,52	0,33	1,01	2,11	0,82	Interleukin 12 receptor része; IFN-gamma upregulálja
IL13	C08	0,49	0,33	0,77	5,58	0,62	Interleukin 13
IL13RA1	C09	1,38	1,39	1,34	0,49	1,01	
IL15	C10	0,52	0,33	1,01	2,11	0,82	Interleukin 15
IL18	C11	0,52	0,33	0,58	0,53	0,95	
IL18R1	C12	1,20	0,57	0,67	0,92	0,88	
IL1R1	D01	0,52	0,33	1,43	1,39	1,43	
IL1R2	D02	0,52	0,33	1,01	2,43	1,65	Interleukin 1 receptor
IL2	D03	0,52	0,40	1,43	1,13	0,82	
IL2RA	D04	0,34	0,53	0,67	1,13	1,34	
IL4	D05	0,52	0,33	1,01	2,11	0,82	Interleukin 4
IL4R	D06	0,91	2,60	1,01	0,99	0,82	Interleukin 4 receptor
IL5	D07	0,52	0,33	1,01	2,11	0,82	Interleukin 5
IL6	D08	1,95	3,20	3,07	4,23	1,77	Interleukin 6
IL6R	D09	0,91	1,21	1,09	0,65	0,54	
IL7	D10	1,69	1,72	0,95	0,37	1,01	Interleukin 7
IL9	D11	0,52	0,33	1,01	2,11	0,82	Interleukin 9
INHBA	E01	0,60	1,49	0,33	11,96	0,95	Inhibin β
IRF1	E02	1,20	1,49	0,77	0,53	0,67	
IRF4	E03	2,39	1,72	0,88	1,13	0,62	
JAK1	E04	1,28	1,39	0,95	0,80	1,54	
JAK2	E05	0,52	0,33	1,34	0,61	0,88	
LAG3	E06	0,64	0,75	1,01	0,75	0,44	
LAT	E07	1,58	1,13	0,02	1,21	0,95	T sejtek aktivációs faktora
MAF	E08	1,20	0,86	1,01	0,70	0,82	
MAP2K7	E09	0,52	0,40	1,01	0,70	0,82	

Symbol	Well	Kontroll	Beteg 1	Beteg 2	Beteg 3	Beteg 4	A megváltozott expressziójú gén funkciója
		Fold diff.	Fold diff.	Fold diff.	Fold diff.	Fold diff.	
MAPK8	E10	0,40	0,86	2,33	0,92	0,88	MAP kináz; szignalizációs folyamatok
NFATC1	E11	0,74	1,13	0,82	0,80	1,01	
NFATC2	E12	1,95	0,92	0,67	0,75	0,82	
NFATC2IP	F01	2,57	0,99	1,01	1,21	1,43	
PCGF2	F02	0,56	0,25	6,15	2,79	2,50	transzkripció repressor; citokinek negatív regulátora
PTPRC	F03	1,12	1,30	1,25	1,13	1,25	
SFTPD	F04	0,52	0,33	1,01	2,11	0,82	Surfactant, tüdő-asszociált protein D
SOCS1	F05	1,12	1,21	0,58	1,13	0,54	
SOCS2	F06	0,52	0,33	1,01	2,11	1,09	Citokin szignalizációs szuppresszor
SOCS5	F07	0,52	0,33	0,95	0,99	1,77	
SPP1	F08	0,69	0,33	0,01	0,92	0,38	Korai T limfocita aktivációs marker
STAT1	F09	1,20	1,06	0,77	0,25	0,72	Transzkripció faktor
STAT4	F10	0,69	0,33	0,88	0,57	0,88	
STAT6	F11	0,04	0,99	0,77	0,65	1,16	IL-4 mediálta válaszokba központi szerepet játszik
TBX21	F12	1,95	1,60	0,88	1,06	0,77	
TFCP2	G01	0,52	0,75	1,01	0,75	0,77	
TGFB3	G02	0,40	0,30	1,43	1,72	0,82	
TLR4	G03	0,52	0,33	1,01	1,13	0,72	
TLR6	G04	0,42	0,40	1,34	0,99	1,01	
TMED1	G05	0,52	0,80	2,87	0,92	1,01	Aktivált Th2 sejteken fejeződik ki
TNF	G06	1,28	1,72	0,82	0,43	0,62	tumor nekrozis faktor
TNFRSF7	G07	0,52	0,33	1,01	1,13	0,82	
TNFRSF8	G08	0,52	0,49	1,25	0,75	0,82	



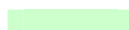
A génexpresszió növekedése



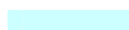
A gén downregulációja



TH1 citokinek és rokon gének



TH2 citokinek és rokon gének



CD4+ T sejt markerek