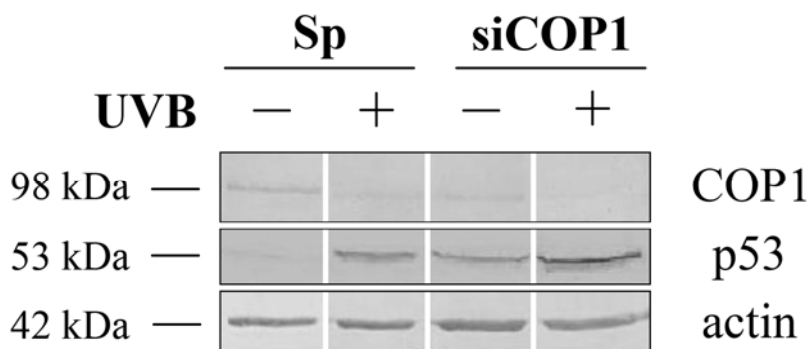


ZÁRÓBESZÁMOLÓ

1. Az UV fény molekuláris hatásmechanizmusának vizsgálata, a COP1 szerepének megállapítása az UV fény hatásában (in vitro vizsgálatok, molekuláris szint)

Célkitűzésünk volt a COP1 gén szerepének tisztázása az UV fény által indukált folyamatokban keratinocitákban. Human sejt kultúrák különböző hullámhosszú UV irradáció utáni génextpressziós mintázat változása arra engedett következtetni, hogy az UVB indukálja a legszélesebb génextpresszió változást, illetve az UVB besugárzás hatására megfigyelhető a p53 overexpressziója bizonyos sejt típusokban, ezért az UVB fényt alkalmaztuk további vizsgálataink során. A bevezető kísérletek során normál keratinocitákban vizsgáltuk a COP1 és p53 RNS és fehérje szintjét stresszmentes körülmények között, valamint UVB besugárzás hatására. Az UVB-indukció a COP1 RNS és fehérje csökkenését váltotta ki, míg a p53 expressziója a már korábban is ismert módon mind RNS, mind fehérje szinten nőtt.

Ezek után olyan transzgénikus sejt vonalakat hoztunk létre, amelyekben a COP1 gén csendesítve volt. A csendesítéshez kétféle konstrukciót terveztünk, melyeket az SV40 vektorok családjába tartozó pSUPER vektorba klónoztuk, kontrollként az üres vektort használtuk. A konstrukciók keratinocitákba juttatásához nukleofekciót alkalmaztunk, mivel a hagyományos transzfekciós módszerek (JET PEI, FuGene) primer keratinociták esetében kevésbé bizonyultak effektívnek az előzetes kísérletek alapján. A két alkalmazott COP1-csendesítő konstrukció közül a transzfekció után csak az egyik konstrukciót tartalmazó keratinocita vonalban detektáltunk COP1 szint csökkenést mind RNS, mind fehérje szinten az üres vektort tartalmazó sejtekhez viszonyítva, így a továbbiakban csak ezzel a sejtcsoporttal dolgoztunk. Ezen sejtcsoportokban a p53 fehérje szintje magasabb volt, mint a kontroll sejtekben (1. ábra).



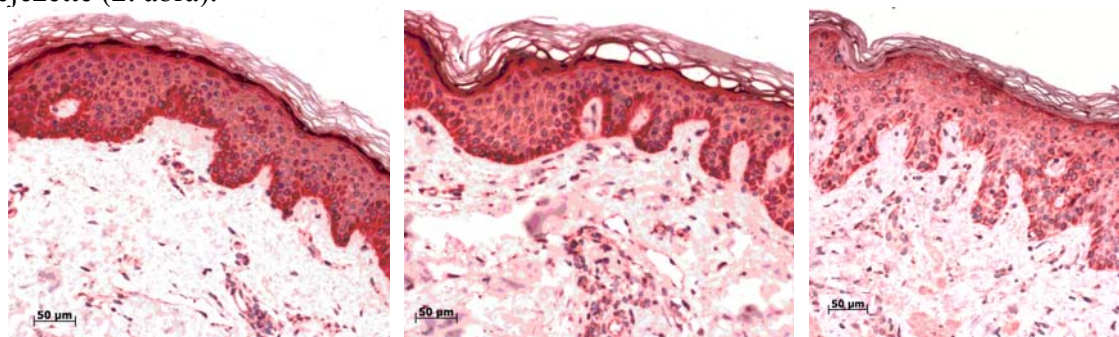
1. ábra

A munka második fázisában a nukleofektált keratinociták UVB fényvel történő besugárzását végeztük. A sejteket emelkedő dózisú (10, 20, 40, 60 mJ/cm²) UVB fényvel irradáltuk. A besugárzás után izolált mintákban a COP1-csendesített sejtekben a COP1 RNS és fehérje további csökkenését észleltük, míg a p53 fehérje a dózissal párhuzamosan nőtt. Vizsgálataink alapján kijelenthetjük, hogy a COP1 hiányában a p53 fehérje szintje megnő, ami a COP1 p53 reguláló szerepét valószínűsíti keratinocitákban is. Mivel UVB besugárzás hatására a p53 fehérje további növekedését tudtuk előidézni, ez feltehetően megnöveli a keratinociták apoptotikus hajlamát, azonban ennek tisztázására további vizsgálatok szükségesek.

Szintén kitűzött cél volt a COP1 lentivirális csendesítése keratinocitákban. A PTE Immunológiai és Biotechnológiai Intézetével közös kooperációban bicasette lentivirális vektor előállítás történt, mely kétféle vektort jelentett, egy HIV vektort: EF1-GFP / H1-

COP1 shRNA, mely a csendesítő kontstrukciót tartalmazta, valamint egy kontroll vektort: HIV vektor EF1-GFP. A közös munka során az első fázisban az EF1-GFP / H1-COP1 shRNA plazmid létrehozása és a lentivirális vektorok termelését végeztük, a termelt lentivirális vektorok magas titerrel és teljes biológiai funkcionalitással rendelkeztek. A második fázisban humán primer keratinociták transzfekciója történt, valamint egy ízben HaCaT sejtek transzfekciója is. A transzfekció hatékonyságát 2-3 nappal a transzfekció után vizsgáltuk, ez alapján megállapítható volt, hogy a sikeresen transzfektált sejtekben a konstrukciót tartalmazó keratinociták aránya 50-60% körül volt primer keratinociták esetében, míg HaCaT sejteknél ezt nem sikerült 1% fölé növelni. A későbbiekben a tenyésztés során a konstrukciót tartalmazó keratinociták arányát sem tudtuk növelni, a transzfektált sejtek nagyon csekély osztódási potenciált mutattak, az RNS és fehérjeszintű vizsgálatokhoz szükséges mennyiségű sejt nem állt rendelkezésünkre.

A továbbiakban két alapvető célt tűztünk ki. Egyik feladatunk a COP1 detektálása volt normál humán bőrből vett szövetmintákon, valamint ezzel párhuzamosan differenciált keratinocitákban. A normál humán bőrből vett mintákat mind immunhisztokémiai, mind immunfluoreszcens festéssel is vizsgáltuk. Ezek alapján megállapítottuk, hogy a COP1 fehérje jelentős mennyiségben kifejeződik az emberi bőrben, elsősorban a bazális sejtrétegben és a granuláris rétegben, a festődés mindkét rétegben nagyrészt citoplazmikus. Ezt követően vizsgáltuk a COP1 fehérje kifejeződését UVB-besugarazott humán bőrben. Ezen kísérletekhez 308 nm-es excimer lézert alkalmaztunk, besugárzásos a minimális erythema dózis kétszeresét alkalmaztuk, és a besugárzást követően 24 és 48 órával vettük le a mintákat. Mind az immunhisztokémiai, mind az immunfluoreszcens metszeteken megállapítható volt, hogy a COP1 szintje az UVB fény hatására a bazális és a granuláris rétegben is jelentősen csökken, és ez a csökkenés már a 24 órás mintákban is jól látható a kontroll besugárzatlan mintához képest, azonban a 48 órás mintákban válik igazán kifejezetté (2. ábra).

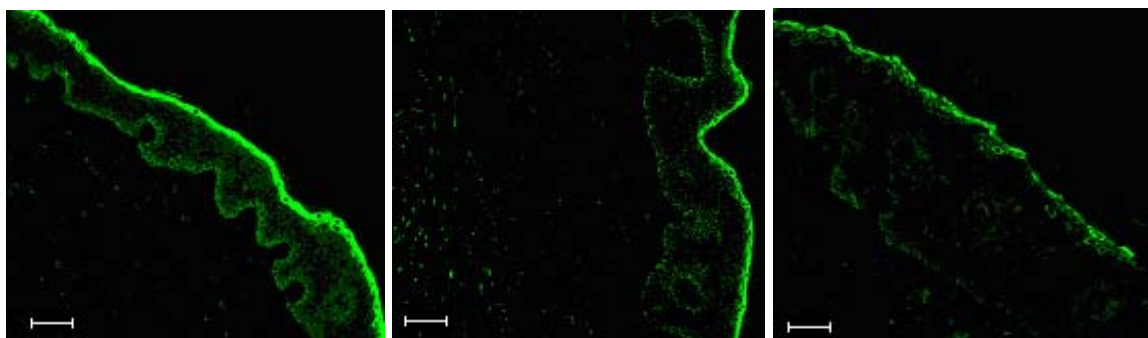


Control

24 hs

48 hs

after UVB irradiation



Control

24 hs

48 hs

after UVB irradiation

2. ábra

A humán bőr modellezéséhez differenciáltatott sejtvonalat használtunk, és ezekben a különböző mértékű differenciációt mutató sejtekben detektáltuk a COP1 mRNS és fehérje szintjét. A differenciáció kontrolljához az involucrin fehérjét választottuk, melynek szintje a differenciációval párhuzamosan növekszik, a 8 és 10 napos mintákban már extrém magas szintet mutat. Eredményeink a mind a COP1 mRNS, mind a COP1 fehérje fokozatos csökkenését mutatták a differenciáció előrehaladtával.

Másik fő célunk a COP1 fehérjével kapcsolatban álló, és az UVB által kiváltott sejten belüli mechanizmusokban résztvevő fehérjék feltérképezése volt. Ezen belül külön hangsúlyt fektettünk az aryl-hydrocarbon receptor által mediált útvonalakra, ezen belül a COX2 és CYP1A1 fehérjére. A COP1 fehérjével esetleg kapcsolatban álló, az UVB jelátvitelben résztvevő fehérjék közül a COX2 és CYP1A1 változását detektáltuk mRNS és fehérje szinten. A COX2 és CYP1A1 mRNS expressziója többszörösére nő UVB besugárzást követően rövid időn belül, a kifejeződésük 9 és 12 óra között éri el a maximumát, ezután csökkenni kezd. Mindkét fehérje jelentős mértékben indukálódik UVB hatására, amely hasonlóan az mRNS változásához rövid időn belül bekövetkezik, 12 óránál éri el a maximumát mindkét esetben, azonban a CYP1A1 ezután rapidan csökkenni kezd, míg a COX2 szintje még a 24 órás mintákban is magasabb. A fenti fehérjék szöveti szintű detektálása során a CYP1A1 festődését nem sikerült kivitelezni humán bőrben, azonban a COX2 festődése jól lokalizálható volt immunhisztokémiával a suprabasalis rétegekben, ezen észlelésünk egybevág a korábban leközölt irodalmi adatokkal.

A több évet átívelő vizsgálataink összesítéseként megállapíthatjuk, hogy a COP1 az UVB jelátviteli út része humán keratinocitákban, a keratinociták differenciációs-proliferációs állapota befolyással van a fehérje szintjére. A fentiek alapján terveink között szerepel a COP1 detektálása különböző hámeredetű tumorokban, melyek kialakulásában az UVB-irradiációnak és a sejtek differenciációs-proliferációs zavarának is fontos szerepe van.

2. Az UV fény immunológiai hatásának vizsgálata (szöveti szint)

2.1. UV irradiáció hatásának vizsgálata a bőr és a nyálkahártya gyulladásos megbetegedéseiben (psoriasis, rhinitis allergica)

Az UVB fény jól ismert hatékony a pikkelysömör kezelésében. Korábbi vizsgálataink során igazoltuk, hogy a 308 nm xenon chlorid excimer lézer különösen előnyösen alkalmazható nem nagy kiterjedésű plakkos psoriasis kezelésére. Az excimer lézerrel végzett kezelést ma már a psoriasis kezeléséről szóló szakmai protokollok is tartalmazzák. A technológia fejlődése azonban lehetővé tette egy 313 nm + 3 nm hullámhosszú emittáló fényterápiás készülék kifejlesztését, melynek klinikai hatékonyságát vizsgáltuk. Eredményeink szerint az UVB-LED kezelés hatékonyan csökkenti a betegek klinikai tüneteit, és ez a technológia egy új utat nyithat psoriasisos betegek kezelésében (Kemény és mtsai, *Br J Dermatol*, 2010). Eredményeink szerint humán keratinocitákban az ABCC4 és az ABCG2 transzporterek keratinocitákban sejtproliferáció függően kifejeződnek (Bebes és mtsai, *Arch Derm Res*, 2012), és az ABCG2 gátlásával a fotodinamias terápia hatékonysága növelhető (Bebes és mtsai, *J Photochem Photobiol B: Biol*, 2011).

A különböző hullámhosszú UV fény (BB-UVB, NB-UVB, 308 nm excimer lézer) apoptózist indukáló és DNS károsodást indukáló hatását biotechnológiai úton előállított, mesterséges bőrön és légúti hámon (EpiDerm és EpiAirway szöveten) vizsgáltuk. Eredményeink szerint a bőr és a légúti hám UV válasza nem különbözik egymástól, hasonló DNS károsodás alakul ki és a repair mechanizmusok dinamikája is megegyezik a két hám

(Mitchell és mtsai, *J Cell Mol Med.* 2010). A nazális nyálkahártya NB-UVB fényvel történő besugárzása a mélyebben elhelyezkedő sejtekben nagyobb mértékű apoptózist okoz, mint a BB-UVB fény. Vizsgálati eredményeink szerint az UV fény által kiváltott p53 expresszió fokozódás egy endocannabinoid, a palmitoiletanolamin (PEA) előkezeléssel mérsékelhető.

Humán klinikai vizsgálatainkban korábban megmutattuk, hogy az intranazális fototerápia (rhinofototerápia) hatékonyan csökkenti az allergiás rhinitisben szenvedő betegek tüneteit (Koreck és mtsai, *JACI*, 2005). Jelen kutatás során megállapítottuk, hogy a rhinophototerápia a fexofenadine hidrokloridnál hatékonyabban csökkenti szezonális rhinitis allergiában szenvedő betegek klinikai tüneteit (Garaczi és mtsai, *Photochemistry and Photobiology*, 2011). Megállapítottuk azt is, hogy a FOXP3 rs3761548 polimorfizmus egy protektív genetikai faktor a rhinitis allergica kialakulása szempontjából (Fodor és mtsai, *Human Immunol*, 2011).

Az UV fény immunológiai hatásait allergiás rhinitisben szenvedő betegek orrnyálkahártya mintáiban vizsgáltuk. A betegektől rhinofototerápia (a fototerápia spektruma: UVA+ UVB+ látható fény) előtt valamint 2 hetes kezelés után az orrnyálkahártyából kaparékot vettünk rhinoprobe segítségével. A kezelésekre bekövetkező génszintű citokin változásokat real-time PCR segítségével vizsgáltuk, melyeket a következő primerekkel végeztük el: 18S (belső kontroll), IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, GM-CSF. Az orrnyálkahártya mintákban mérhető citokin szintek a fototerápia megkezdése előtt is igen nagy variabilitást mutattak az egyes betegek között. Eredményeink szerint nem találtunk szignifikáns változást egyik vizsgált citokin esetén sem 2 hetes rhinofototerápiás kezelést követően. A rhinophototerápia intranasalis polipokra kifejtett hatását *in vivo* és *in vitro* is vizsgáltuk. Eredményeink szerint az NB-UVB kezelés szignifikánsan javítja az intranasalis poliposisban szenvedő betegek klinikai tüneteit (Bella és mtsai, *J Photochem Photobiol B: Biol*, 2010). Műtét során eltávolított polipok *ex vivo* UVB irradiálása arra utal, hogy az UVB fény apoptosist indukál az epithelsejtekben, és a polipokban lévő gyulladásozó sejtekben (Zsíros és mtsai, *Allergy /suppl/ abstract* 2010).

2.2. UV irradiáció hatásának vizsgálata az allergén által kiváltott specifikus immuntoleranciára

A munkánk során a sublingualis immunterápia (SLIT) és sublingualisan alkalmazott fényterápia kombinált hatását (Foto-SIT) hasonlítottuk össze a sublingualis immunterápia hatékonyságával allergiás rhinitisben szenvedő betegek esetén. A vizsgálatunkba 2007 tavaszán összesen 20, 18-50 év közötti rhinitis allergiában szenvedő, igazoltan parlagnő allergiás beteget vontunk be. A beválasztott betegeket 2 kezelési csoportba randomizáltuk, az egyik csoport (Foto-SIT csoport) SLIT immunterápiában (Pangramin SLIT®, ragweed, Alk-Abello) és kombinált sublingualis fototerápiában (Rhinolight®) részesült. A kontroll csoport (SIT csoport) a SLIT immunterápia mellett sublingualis placebo fénykezelést (hatékony fény spektrumot nem tartalmazó, úgynevezett „sham” fénykezelést) kapott. A parlagnő virágzása idején 2007. augusztus-szeptember és 2008. augusztus-szeptember hónapokban a betegek sem SLIT immunterápiát sem sublingualis fényterápiát nem kaptak. Ezen időszakokban az allergiás tünetek értékelése betegnapló kitöltésével történt. Az esetlegesen jelentkező mellékhatásokat a betegek a naplóban leírták, valamint a vizsgálatban résztvevő orvosok ezeket értékelték és a betegek adatlapjában rögzítették.

A vizsgálatba bevont 20 beteg közül 5 beteget zártunk ki. Az első beteget a protokolltól való eltérés miatt (nem megengedett gyógyszer bevétele), a másodikat tavaszi füvek, valamint gabona pollen virágzása okozta kifejezett szénanáthás panaszok miatt, a harmadik beteget fogászati kezelések miatt, a negyedik beteget terhesség miatt zártuk ki a vizsgálatból. Egy beteget tartós külföldi távollét miatt zártunk ki a további vizsgálatból. A

sublingualis fototerápia a betegek mindegyike számára jól tolerálható volt, a kezelésekkel összefüggő mellékhatás nem jelentkezett.

Az immunterápia hatékonyságának monitorozása, valamint a szabályozó Treg sejtek vizsgálata céljából minden betegről a parlagfű szezon közben 2007-ben és 2008-ban egy-egy alkalommal vérmintákat vettünk, melyekből fehérvérsejteket izoláltunk. A sejteket 72 óráig parlagfű (ambrosia) antigénnel (Amb a 1.3, Biomay AG, Austria) aktiváltuk, majd a felülúszókat -20°C -ra lefagyasztva tároltuk. Az aktivált lymphocyták felülúszójából a különböző citokinek fehérjeszintű meghatározását ELISA módszerrel végeztük.

A betegek klinikai tüneteinek a mérése 4 héten keresztül betegnapló segítségével történt, melyben minden nap az esti órákban kellett a tünetek erősségét, valamint a megengedett gyógyszer bevitelét feljegyezni. A mért paraméterek a következők voltak: tüszögés, orrfolyás, orrviszketés, orrdugulás, szájpadviszketés és a szemtünetek. A szénanáthára jellemző nazális tüneteket együttesen (totál nazális score = TNS) is értékeltük (orrdugulás, orrfolyás, orrviszketés és tüszögés értékek összege). A betegek az egyes tünetek súlyosságát 0-5-ig értékelték (0: nincs tünete, 5: folyamatosan jelen lévő, az életminőséget jelentősen rontó tünet). A vizsgálati idő alatt követtük a parlagfű pollenszámot, mely ez idő alatt folyamatosan a határérték többszöröse volt a Dél-alföldi régióban. Az adatok statisztikai kiértékeléséhez Repeated Measures ANOVA analízist használtunk. Az igazoltan parlagfű allergiás betegek ebben az első szezonban mindkét csoportban kifejezett szénanáthás tünetekről panaszkodtak és a tünetek intenzitása egyik csoportban sem csökkent szignifikánsan a parlagfű szezon alatt.

Az immunterápia hatékonyságát *in vitro* módszerekkel is követtük. A vérmintákból fehérvérsejteket izoláltunk, majd a sejteket parlagfű allergénnel (ambrosia) aktiváltuk. Az aktiválás végén nyert felülúszó mintákat -20°C -ra lefagyasztva tároltuk. A sejtek egy részét aktiválás nélkül, tenyésztésre alkalmas mediumban inkubáltuk 3 napig. Az így nyert felülúszókat (nem aktivált) kontroll mintaként használtuk. A lefagyasztott felülúszókból későbbiekben ELISA módszer segítségével a következő citokinek meghatározása történt: IL-4, IL-5, IL-10, $\text{IFN}\gamma$ és GM-CSF (Foto-SIT csoport: $n=9$; kontroll SIT csoport: $n=9$ minden vizsgált citokin esetén). A statisztikai kiértékeléshez kétmintás *t* próbát alkalmaztunk. Az IL-4 citokin szintje nem volt kimutatható aktiválást követően sem a Foto-SIT csoportban, sem a kontroll SIT csoportban. Az IL-5 citokin szintje ambrosia aktiválást követően szignifikánsan emelkedett a nem aktivált mintákhoz képest mind a Foto-SIT csoportban, mind pedig a kontroll SIT csoportban. Az eredmény jól mutatja, hogy az *in vitro* ambrosia aktiválás sikeres volt, ugyanakkor mindkét csoport betegeinél a szénanáthára jellemző magas IL-5 szinteket találtuk. Nem volt kimutatható emelkedés ambrosia aktiválást követően az IL-10, $\text{IFN}\gamma$ valamint a GM-CSF szintekben sem a Foto-SIT csoport sem a kontroll SIT csoport esetében.

A második szezonban (2008. augusztus-szeptember) a betegek klinikai tüneteinek mérése az előzőekben részletezett módon történt. A parlagfű pollenszám figyelembe vételével ebben a szezonban is 4 héten keresztül a kértük a betegektől a betegnaplók kitöltését.

Eredményeink szerint nem találtunk szignifikáns különbséget a két vizsgált csoport között a következő paraméterekben: tüszögés, orrfolyás, orrviszketés és szemtünetek ($P>0,05$). A SIT csoportban az orrdugulás mértéke szignifikánsan kisebb volt a Foto-SIT csoporthoz képest ($P<0,05$). A szájpadviszketés mértéke a Foto-SIT csoportban volt enyhébb a kontroll csoporthoz képest ($P<0,05$). A SIT terápia mellett a betegek valamivel több megengedett antihisztamint (levocetirizine) szedtek.

Összefoglalva, a Foto-SIT a betegek számára jól tolerálható kezelési módnak bizonyult. A klinikai vizsgálat során a kezeléssel összefüggésbe hozható mellékhatást nem tapasztaltunk. Az eredmények azonban azt mutatják, hogy a sublinguális fototerápia nem javítja szignifikánsan a sublingualis immunterápia hatékonyságát (Garaczi és mtsai, MAKIT XXXVII. Kongresszusa, Balatonalmádi 2009).