



ARTHUS-REAKCIÓ VIZSGÁLATA KVANTITATÍV IN VIVO KÉPALKOTÓ ELJÁRÁSSAL

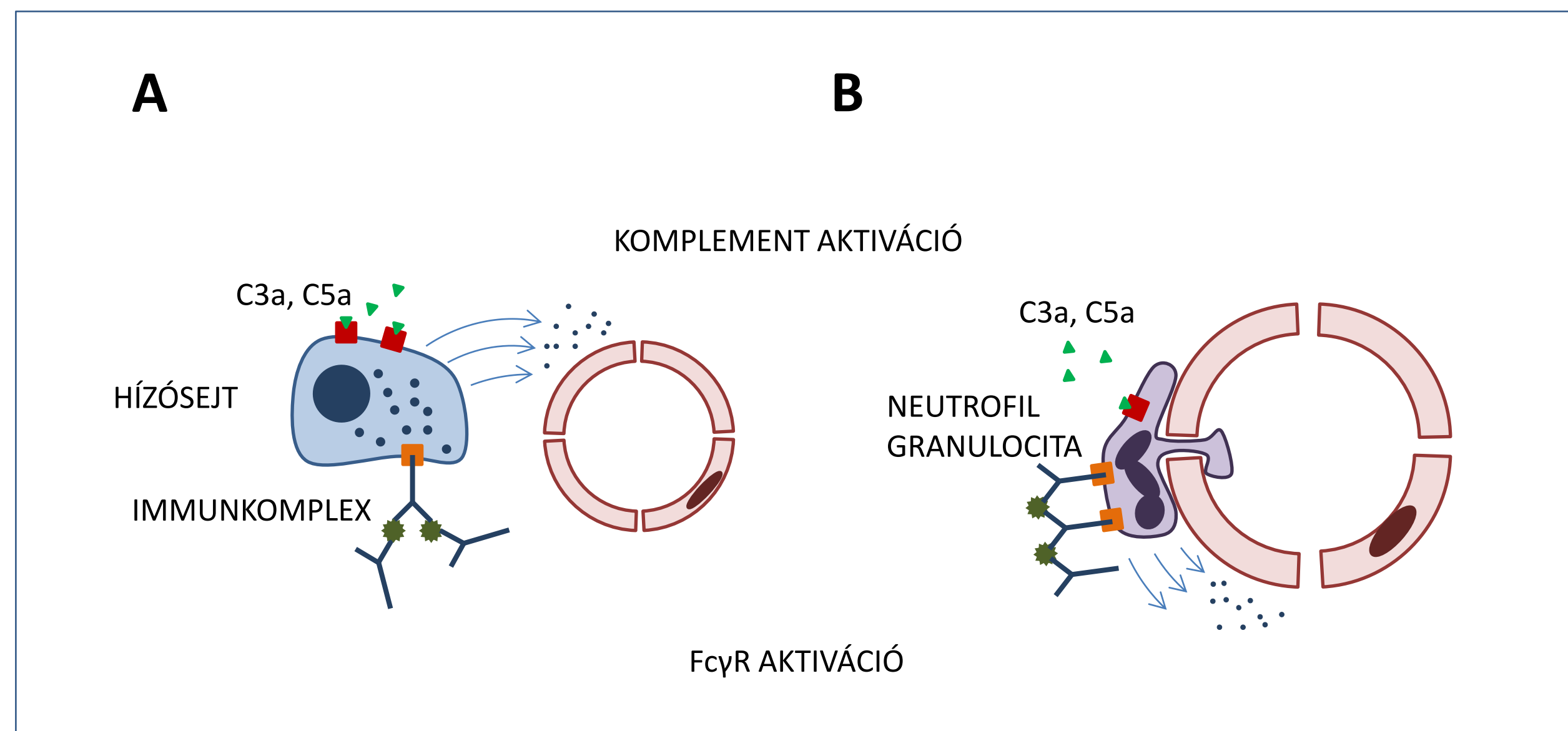
Balázs Bálint¹, Jakus Zoltán¹, Futosi Krisztina¹, Szigeti Krisztián², Máthé Domokos³, Mócsai Attila¹

¹Semmelweis Egyetem Élettani Intézet, Budapest; ²Semmelweis Egyetem Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet, Budapest; ³Mediso Kft., Budapest

BEVEZETÉS

Az antigén-antitest komplexek (immunkomplexek) kulcsfontosságú szerepet játszanak számos gyulladásos folyamat kialakulásában, és részt vesznek különböző gyulladásos betegségek létrejöttében, mint például a reumatoid arthritis és a glomerulonephritis. Az immunkomplex-mediált betegségek egyik általánosan elterjedt *in vivo* modellrendszere a lokalizált III. típusú túlérzékenységi reakciók közé tartozó Arthus-reakció, melynek során a lokálisan kialakuló immunkomplexek gyulladást, ezáltal az érfal-permeabilitás következményes fokozódását

eredményezik. A folyamatot leggyakrabban szisztémásan beadott Evans-kék festék helyi felszaporodásának meghatározásával vizsgálják. Ennek a módszernek hátránya azonban, hogy nehezen kvantifikálható, illetve nem alkalmas egyazon állatban a reakció kinetikájának vizsgálatára. Célunk a reverz passzív Arthus-reakcióra épülő, jól kvantifikálható, egyazon egyedben *in vivo* kinetikai mérésekre is alkalmas mérési módszer kidolgozása volt.



1. ábra: Az Arthus-reakció. A lokálisan kialakuló immunkomplexek FcγR-on keresztül aktiválják a hízósejteket (A), továbbá komplement aktivációt hoznak létre. A hízósejtek degranulációjának hatására fokozódik az érfal-permeabilitás, ami a komplement rendszer tagjainak kemotaktikus hatásával együtt neutrofil granulociták kilépését eredményezik az érpályából (B). A neutrofilek szintén aktiválódnak FcγR-on és komplementreceptoron keresztül, ami tovább fokozza a gyulladásos folyamatot.

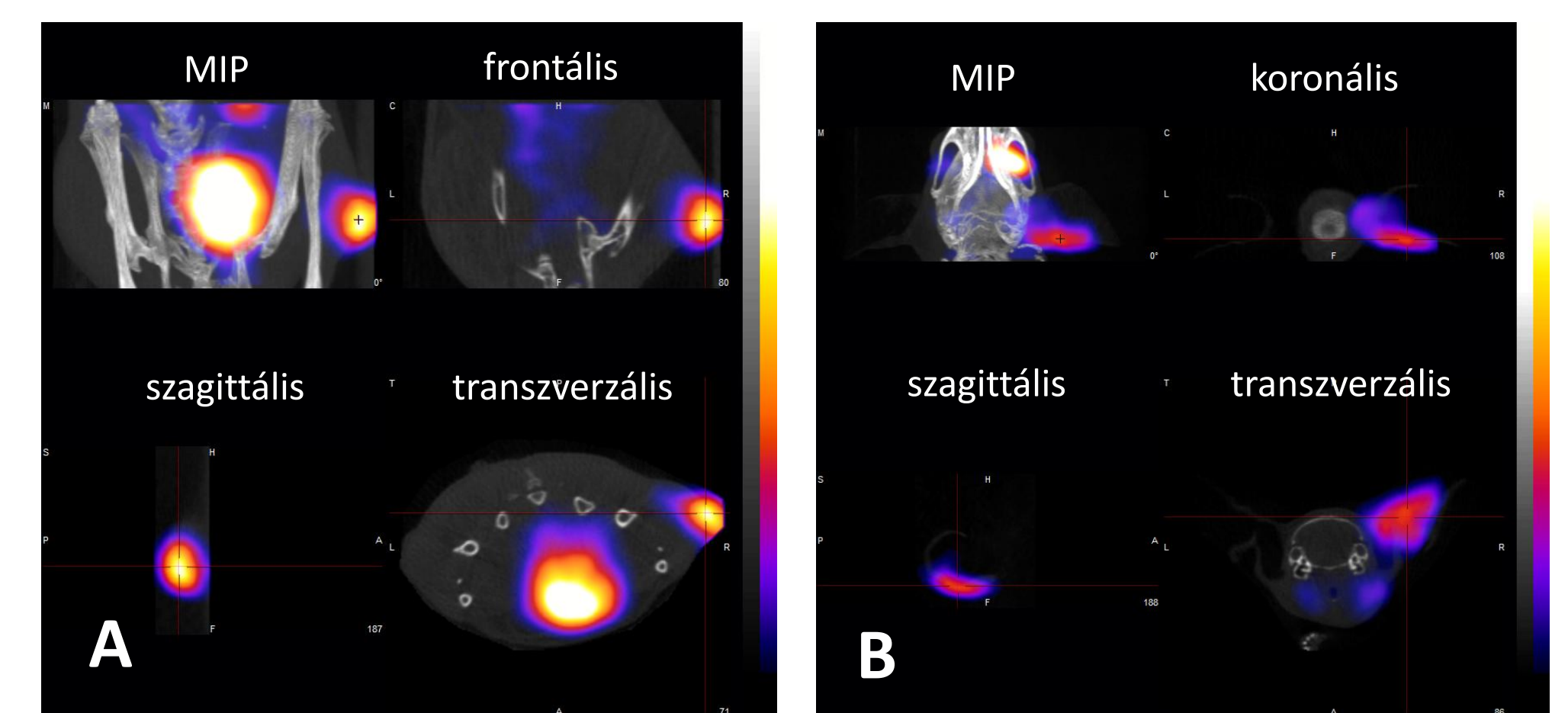


2. ábra: Arthus-reakció vizsgálata Evans-kék festékkel. Ovalbumin intravénás beadását követően a jobb fülbe anti-ovalbumin antitestet, a bal fülbe kontrollként nyúlserumot fecskendeztünk. Két órával a kezelés után intravénásan Evans-kék festéket adtunk, ennek érpályából való kilépése jelzi a gyulladás létrejöttét helyét.

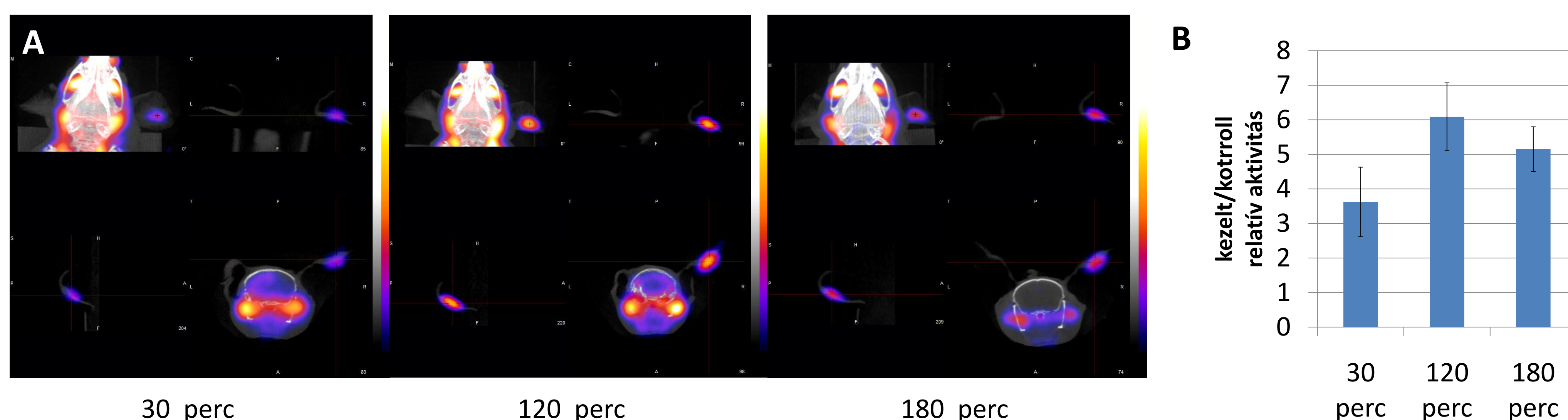
Méréseinket NanoSPECT-CT segítségével végeztük, az Evans kék festéket γ-sugárzó radiofarmakonnal helyettesítve. A humán diagnosztikában leggyakrabban használatos ^{99m}Tc jelölt molekulák közül a metilén-difoszfónátot (MDP) és dietilén-triamin-pentaecetsavat (DTPA) és humán-szérumalbumint (HSA) használtunk kísérleteinkben.

A mérések kiértékeléséhez az egerek kezelt bőrfelületében levő aktivitás értékeit határoztuk meg. A kiértékelés alapját a kontroll területhez képest a kezelt területben megjelenő relatív aktivitás fokozódás adja (ezáltal elhanyagolhatóvá válik az izotóp bomlása és ürülése, és az állat tömege).

Az általunk kipróbált humán diagnosztikában ismert radiofarmakonok közül (^{99m}Tc jelölt-, MDP, DTPA, HSA) az Arthus reakció vizsgálatára a ^{99m}Tc-jelölt HSA bizonyult a legalkalmasabbnak. Az esetleges álpozitív eredmény elkerülése érdekében a ^{99m}Tc-jelölt HSA-t csupán az érfal átjárhatóságának vizsgálatára használtuk, a gyulladásos folyamatot a szisztémásan adott ovalbumin, majd lokálisan bőr alá juttatott anti-ovalbumin által képzett immunkomplexek segítségével váltottuk ki (3. ábra). A különböző anatómiai helyek közül (fül, hát, comb) az állat fül bőrén kiválasztott gyulladás felelt meg leginkább a kvantifikálhatóság kívánalmainak. A kezelt (anti-ovalbuminnal) fül mellett a másik fül kontrollként (nem-immun nyúlserumot kapott) szolgált. A folyamat kinetikájának jellemzéséhez több különböző időzítéssel végeztünk méréseket. Első körben az állatok két órával a kezelés után kaptak izotópot, majd ezután 30 perc, 2 óra és 3 óra elteltével történt a scannelés (4. ábra). Ezek után a kezelés és az izotóp beadása közti időt optimalizáltuk 0, 2, 4, 6 és 24 órás várakozásokkal (5. ábra). A legnagyobb relatív aktivitás fokozódás a két fül között akkor jelent meg, mikor az indukció-izotóp beadás között 2 óra telt el, illetve ha az izotóp beadása és a mérés indítása között szintén 2 óra eltolódás történt.



3. ábra: Arthus reakció ^{99m}Tc-HSA antigén alkalmazásával. A kísérlet során maga a ^{99m}Tc-HSA volt a reakciót kiváltó antigén. A kísérletek során az egerek combbőrre (A) és fülre (B) fecskendeztünk jobb oldalra anti-HSA antitestet, bal oldalra PBS-t, kontrollként. Mindkét felvételen megjelenik egy nagy aktivitású góc az antitesttel történő kezelés helyén, azonban nem zárható ki, hogy az antigén-antitest kapcsolódás révén gyulladás kialakulása nélkül is lokális aktivitás fokozódás jött létre. MIP: maximum intensity projection



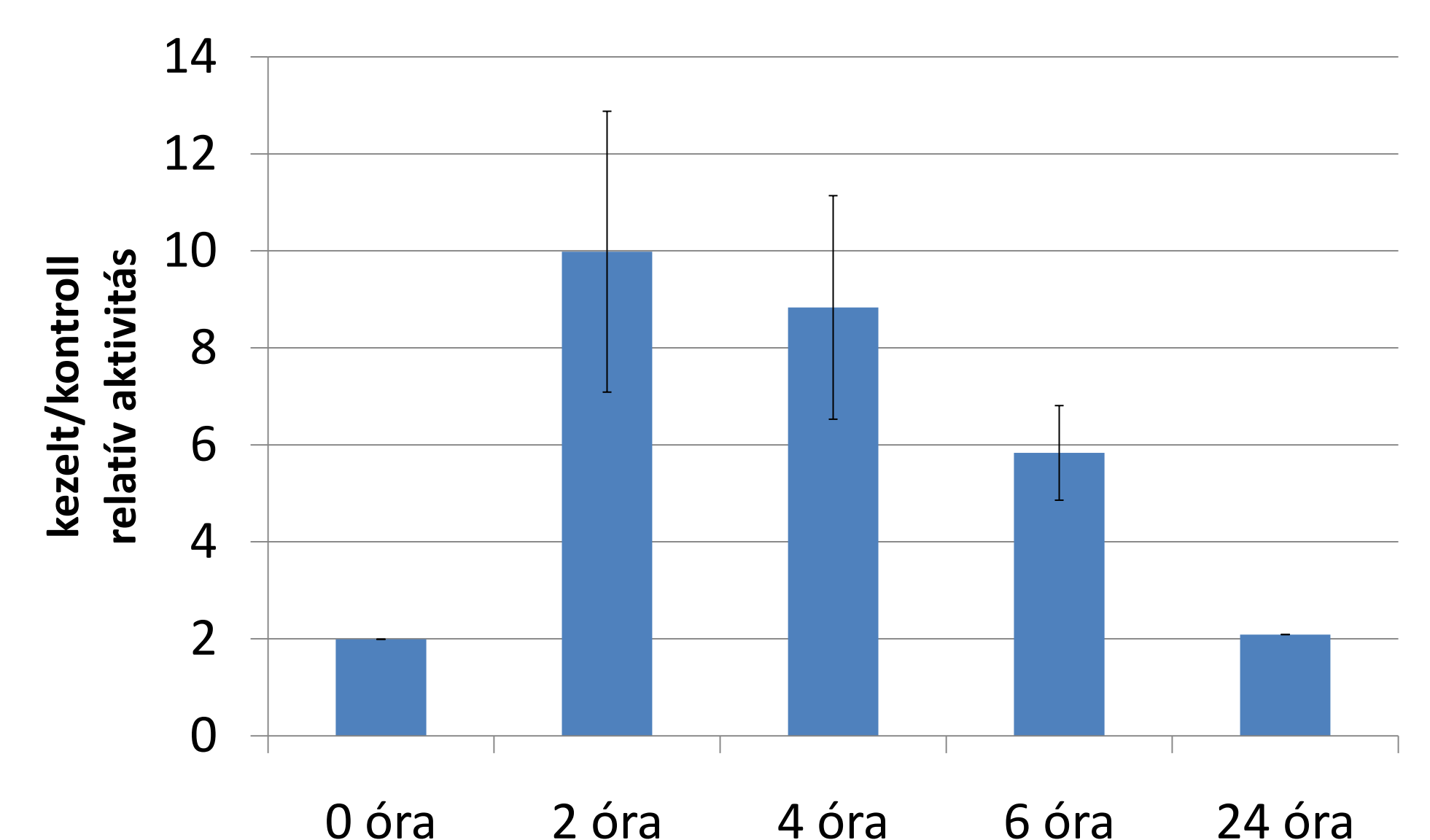
4. ábra: Jobb/bal fül relatív intenzitása az izotóp beadásától eltelt idő függvényében. A kinetikai méréshez három egeret egyszerre mértünk le három különböző időpontban (30, 120, 180 perc). Kezelés: intravénásan ovalbumin; jobb fülbe nyúl anti-OVA antitest, bal fülbe nem-immun nyúlserum fecskendezése. (A) Reprezentatív SPECT-CT felvétel egy állatról a megjelölt időpontokban. (B) Átlagos relatív intenzitások, feltüntetve az átlag szórása (SEM).

KONKLÚZIÓ

Kísérleteink során kidolgoztunk egy olyan mérési rendszert, melyben SPECT-CT alkalmazásával a reverz passzív Arthus reakció egyazon egyedben időben nyomon követhetővé és kvantifikálható vált. A továbbiakban a módszert alkalmasnak tekintjük különböző transzgenikus egértörzsek vizsgálatára, illetve gyulladáságtóló vegyületek tesztelésére.



Köszönet: Horváth Ildikónak
(SE Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet)



5. ábra: Arthus reakció intenzitása a kezeléstől eltelt idő függvényében. Minden mérésnél a felhasznált antigén OVA volt, jobb fül anti-OVA antitesttel, a bal fül nyúlserummal kezelt. Az állatok a kezelés után a fenti időpontokban kapták a ^{99m}Tc-HSA-t, majd ezután 2 órával történt a scannelés.

Referenciák:

- [1] Sylvestre D, Clynes R et al. Immunoglobulin G-mediated inflammatory responses develop normally in complement-deficient mice. J Exp Med. 1996 Dec 1;184(6):2385-92.
[2] Hazenbos WL et al. Impaired IgG-dependent anaphylaxis and Arthus reaction in Fc gamma RIII (CD16) deficient mice. Immunity. 1996 Aug;5(2):181-8.