

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

A VELESZÜLETETT IMMUNVÁLASZ ELEMEINEK VIZSGÁLATA ATOPIÁS DERMATITISBEN

Nagy Georgina

Témavezető: Prof. Dr. Szegedi Andrea



DEBRECENI EGYETEM

**PETRÁNYI GYULA KLINIKAI IMMUNOLÓGIAI ÉS ALLERGOLÓGIAI DOKTORI
ISKOLA**

Debrecen, 2017

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	4
1. BEVEZETÉS.....	7
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	8
2.1. Atopiás dermatitis fő klinikai jellemzői.....	8
2.2. A betegség kialakulásában szerepet játszó tényezők.....	9
2.2.1. Genetikai tényezők.....	9
2.2.2. Környezeti faktorok	12
2.3. Az atopiás dermatitis patogenezise	13
2.3.1. A fizikokémiai bőr barrier jellemzői és szerepe AD-ben	14
2.3.2. Az immunológiai bőr barrier (veleszületett immunválasz) sejtjeinek jelentősége AD-ben	16
2.3.2.1. Keratinociták, IL-16	17
2.3.2.2. Dendritikus sejtek szerepe AD-ben.....	20
2.3.2.3. Az iNKT sejtek szerepe AD-ben	24
2.3.3. A szerzett immunrendszer szerepe AD-ben.....	26
3. CÉLKITŰZÉSEK	27
4. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK	29
4.1. Az IL-16 szerepének vizsgálata AD-ben.....	29
Betegek	29
Laboratóriumi módszerek.....	29
Eozinofil sejtszám meghatározás.....	29
Enzim-kapcsolt immunszorbens vizsgálat (ELISA)	30
Statisztikai analízis	30
4.2. Az mDC-k szerepének vizsgálata AD-ben.....	30
Betegek	30
Sejt szeparálás és tenyésztés.....	31
Sejtfelszíni jelölés és citoplazmatikus citokin festés	31
Lézer pásztázó cytometria	32
Statisztikai analízis	33
4.3. Az iNKT sejtek szerepének vizsgálata AD-ben.....	33
Betegek	33
Perifériás vér mononukleáris sejt (PBMC) izoláció.....	34
Az iNKT és CD4/CD8 iNKT sejtek számának és gyakoriságának meghatározása áramlási citometriával	34
Az iNKT sejtek és CD4/CD8 alcsoportjainak funkcionális vizsgálata intracelluláris citokin analízissel	34

<i>Statistikai analízis</i>	35
5. EREDMÉNYEK	36
5.1. IL-16 szerepének vizsgálata AD-ben	36
<i>Szérum IL-16 szintek AD-s betegekben, egészséges és psoriasisos kontrollokban</i>	36
<i>Összefüggés a szérum IL-16 és az AD súlyosságát jelző paraméterek között (SCORAD, a szérum totál IgE és az eozinofil sejtszám)</i>	36
<i>Összefüggés az IL-16 és a betegek szenzitizáltsága között</i>	39
5.2. Az mDC-k szerepének vizsgálata AD-ben	41
<i>Az AD-s betegek mDC-inek morfológiai és fenotípusos jellemzői</i>	41
<i>Az AD-s betegek és kontrollok nem stimulált mDC sejtjeinek citokin profilja</i>	43
<i>Az atopiás bőrhöz hasonló körülmények hatása az mDC-k T sejt polarizáló citokin termelésére</i>	44
5.3. Az iNKT sejtek szerepének vizsgálata AD-ben	45
<i>A totál iNKT sejtek százalékos aránya és száma AD-s betegekben</i>	45
<i>Az iNKT sejtek alcsoport analízise AD-s betegekben</i>	47
<i>Az iNKT sejtek funkcionális vizsgálata AD-ben</i>	48
6. MEGBESZÉLÉS	50
7. ÖSSZEFOGLALÁS	57
8. IRODALOMJEGYZÉK	60
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	78
10. FÜGGELÉK	80

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AD	atopiás dermatitis
AMP	antimikrobiális peptid
APC	allophycocyanin
BDCA	vér dendritikus sejt antigén
CCL	kemokin (C-C motívum) ligand
CCR	kemokin (C-C motívum) receptor
CD	differenciációs klaszter (Cluster of Differentiation)
CFS	carboxyfluorescein succinimidyl
CLA	bőr (cutan) lymphocyta-asszociált antigén
CXC	kemokin (CXC motívum)
CXCL	kemokin (CXC motívum) ligand
DAMP	veszély-asszociált molekuláris mintázat
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DC	dendritikus sejt (dendritic cell)
dDC	dermális dendritikus sejt
DI	DNS index
DNS	deoxyribonukleinsav
DN	dupla negatív
DP	dupla pozitív
EDC	epidermális differenciációs komplexnek
ELISA	enzim-kapcsolt immunszorbens vizsgálat
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FBS	fötális borjú szérum
FcεRI	immunglobulin E receptor I. típus
FITC	fluorescein isothiocyanate
FLG	filaggrin
FOXP3	forkhead box P3
FSC	forward scatter
α-Gal-Cer	α-galactosylceramid
GM-CSF	granulocyta-makrofág kolónia stimuláló faktor
hBD	human-β-defensin
HC	nem atopiás önként jelentkező

HLA	humán leukocita antigen
IC	intracelluláris
IDEC	inflammatórikus dendritikus epidermális sejt
IFN	interferon
Ig	immunglobulin
IL	interleukin
INV	involukrin
Io	ionomycin
iNKT	invariáns natural killer T sejt
IQR	interkvartilis terjedelem
LEKTI	lymphoepitheliális Kazal-típusú tripszin inhibitor
LC	Langerhans sejt
LDH	laktát dehidrogenáz
LL37	katelicidin
LOR	lorikrin
LSC	lézer pásztázó cytometria
mAb	monoklonális antitest
mDC	myeloid dendritikus sejt
MHC	major hisztokompatibilitási komplex
mRNS	messenger ribonukleinsav
NKT	natural killer T sejt
NLR	nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor
NOD	nukleotidkötő oligomerizációs domén
PAMP	patogén-asszociált molekuláris mintázat
PBMC	perifériás vér mononukleáris sejt
PBS	foszfát puffer oldat
pDC	plasmacitoid dendritikus sejt
PE	phycoerythrin
PI	foszfatidilinozitol
PMA	phorbol-12-myristate 13-acetate
PMT	fényelektromos sokszorozó (photomultiplier tube)
PRR	mintázatfelismerő receptor (pattern recognition receptor)
RNáz	ribonukleáz
RT	szobahőmérséklet (room temperature)

SCORAD	atopiás dermatitis pontozása (Scoring Atopic Dermatitis)
SEB	staphylococcus enterotoxin B
SEM	standard hiba - standard error of mean
SSC	sidescatter
TCR	T sejt receptor
TEWL	transzepidermális vízvesztés (transepidermal water loss)
TGF	transzformáló növekedési faktor (transforming growth factor)
Th	T segítő (T helper)
TLR	Toll-szerű receptor (Toll-like receptor)
TNF	tumor nekrosis faktor
Treg	természetes regulatív T
TSLP	thymus stromális lymphopoietin (thymic stromal lymphopoietin)

1. BEVEZETÉS

Az atopiás dermatitis (AD) egy krónikus, nem fertőző, gyulladásos bőrbetegség, lefolyása hullámzó jellegű. A tünetek nagyobb gyakorisággal jelennek meg azoknál a gyermekeknél, ahol a családban korábban már előfordult AD. Kialakulásában azonban a genetikai háttér mellett nagyon fontos szerepe van a környezeti kockázati faktoroknak.

A betegség patogenezise komplex, számos kutatás témájaként szerepel, de még mindig sok a tisztázatlan vagy ellentmondásos terület. Az AD patogenezisének 3 fő szereplője a bőr barrier károsodása, valamint az adaptív (szerzett) és az innate (veleszületett) immunválasz eltérései. Az AD kialakulására vonatkozóan alapvetően két hipotézis létezik, egy immunológiai (inside-out) és egy bőr barrier (outside-in) hipotézis. Az immunológiai elmélet szerint a betegség primer oka olyan immunológiai diszreguláció, mely a T sejtek egyensúly eltolódását eredményezi, emiatt bőrgyulladás és következményes bőr barrier károsodás alakul ki. Az outside-in teória szerint először barrier károsodás jön létre és ez vezet immun-mediált gyulladásához. Az irodalmi adatok azt mutatják, hogy a két elmélet összefüggésben van egymással, nem létezik egyik a másik nélkül. Az is ismert, hogy az innate immunválasz elemei, leginkább a keratinociták jelenthetik a hidat a két elmélet között, mivel nem csupán a bőr fizikokémiai barrierjének építőelemei, hanem a bőr immunológiai barrierjének is. Amennyiben genetikai vagy szerzett okból károsodik a keratinociták fizikokémiai barrierben betöltött szerepe, ez immunológiai működésükben megnyilvánuló eltéréseket is eredményez. A veleszületett immunválasz más képviselői [dendritikus sejt (DC), invariáns natural killer T sejt (iNKT) stb.] is számos károsodást mutatnak AD-ben, mely eltérések részben okai, részben következményei a bőr fizikokémiai barrierjében mutatkozó károsodásoknak vagy a szerzett immunválaszban tapasztalt eltéréseknek és ez a 3 rendszer egymást erősítve egy olyan circulus vitiosus hoz létre, mely fenntartja az AD-ra jellemző súlyos bőrgyulladást.

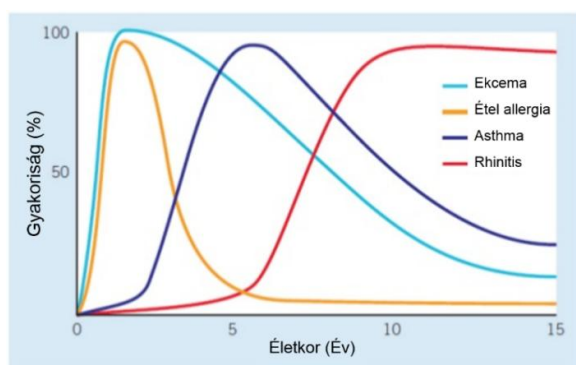
Saját kutatásaink során elsősorban a veleszületett immunválasz egyes sejtjeinek (keratinocita, DC, iNKT sejt) szerepét tanulmányoztuk AD-ben szenvedő betegekben. Dolgozatom első része az interleukin (IL)-16, mint lehetséges biomarker szerepének tanulmányozása során kapott eredményeinket foglalja össze, a második rész a vérből izolált DC-kel, míg a harmadik rész az iNKT sejtekkel végzett kutatásaink eredményeit mutatja be.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Atopiás dermatitis fő klinikai jellemzői

Az atopiás dermatitis (AD) egy krónikus, gyulladásos bőrbetegség, melynek előfordulási gyakorisága 1950 és 2000 között gyorsan emelkedett. A nyugati országokban 15% feletti a gyermekek esetén és 1-3% a felnőtt populációban ¹⁻⁴. Bizonyos, fejlett gazdasági szinten élő országokban ugyanakkor mára ez az emelkedés megállt, sőt néhány országban az AD előfordulása csökkenést is mutat (Nagy Britannia, Új-Zéland) ⁵. A fejlődő régiókban továbbra is az emelkedő tendencia jellemző ⁶. Az AD általában gyermekkorban alakul ki, de felnőttkorban is kezdődhet. A betegek mintegy 50%-nál 1 éves kor előtt jelennek meg az első tünetek, és az AD-s gyerekek többségénél (mintegy 95%) már 5 éves kor előtt tapasztalható az első bőrtünet. A gyermekkorban kialakult betegség az érintettek 75%-ánál felnőttkorra spontán megszűnik, de a felnőttkorban továbbra is tünetes betegek száma is magas ^{5,7}.

Míg a korai életkorban manifesztálódó, súlyos bőrtünetekkel járó AD-s betegek 50-75%-a szenzitizált egy vagy több allergénnel (étel, házipor atka, állatszőrök) szemben, addig az enyhe formákra ritkábban jellemző a betegek szenzitizáltsága, vagyis korán sem igaz az, hogy valamennyi AD-s betegnek lenne IgE mediált azonnali típusú allergiás szenzitizációja (atopiája). Ebből látszik, hogy a kórkép elnevezése sem megfelelő, de jelenleg ennél jobb nomenklatura nem ismert, ezt elfogadja a teljes bőrgyógyászati és allergológiai-immunológiai társadalom. A betegség gyakran társul más atopiás betegségekkel meghatározott időrendi sorban (ételallergia, asthma bronchiale, allergiás rhinitis), ez az úgynevezett „atopiás menetelés” jelensége ⁸ (1. ábra).



1. ábra: Az atopiás menetelésben résztvevő betegségek életkorok szerinti megjelenése

A tünetek nagyobb gyakorisággal jelennek meg azoknál a gyermekeknél, ahol a családban korábban már előfordult AD. Kialakulásában azonban a genetikai háttér mellett nagyon fontos szerepe van a környezeti kockázati faktoroknak. Bizonyos felmérések a genetikai és az exogén faktorok szerepvállalását a betegség kialakításában 50-50%-ra teszik.

Az atopás bőrön akut és krónikus léziók figyelhetők meg, melyek hyperaemiás beszűrt papulákból, plakkokból, erosiókból állnak. Csecsemőknél az arc és a végtagok feszítő felszínének, gyermekeknél a hajlító felszínnek, felnőtteknél pedig a törzsnek és a tenyértalpnak az érintettsége jellemző elsősorban. A bőr szinte mindig erősen száraz, a gyulladásos területek pedig viszketnek, gyakori a felülfertőződés. Az akut léziók szövettani képen intercelluláris oedema, perivascularis limfocita infiltráció és parakeratózis figyelhető meg. A krónikus bőrléziókra hiperkeratózis, epidermális acanthosis és jelentős mértékű T sejt infiltráció jellemző.

Mivel a betegség igen gyakori, korai gyermekkorban alakul ki és hosszan fennáll, és tünete az erős viszketés, akár fájdalom, ezért jelentősen befolyásolja az életminőséget. Ugyancsak problémát jelent, hogy jelen tudásunk szerint oki terápiát kevés esetben tudunk adni. Nagyon fontos tehát a témával foglalkozó kutatások folytatása, melyek segíthetik a háttérben álló okok feltérképezését és hatékony terápiás módszerek fejlesztését.

2.2. A betegség kialakulásában szerepet játszó tényezők

2.2.1. Genetikai tényezők

A genetikai faktorok lehetséges szerepét a betegség kialakulásában már régóta intenzíven vizsgálták az AD családon belüli halmozódása miatt. Már az 1900-as évek elején készültek feljegyzések arról, hogy a betegek 50%-ánál más családtag is mutatja ugyanazokat a tüneteket. Manapság a betegek mintegy 70%-ánál figyelhető meg pozitív családi háttér. Azt is megfigyelték, hogy azoknál a gyermekeknél, ahol a szülők AD-ben szenvednek, nagyobb gyakorisággal manifesztálódik a betegség, mint azoknál a gyermekeknél, akiknek a szülei asztmában vagy allergiás rhinitisben szenvednek. Ebből arra következtettek, hogy az AD kialakulásában atopiától független gének is szerepet játszanak ⁹. Ikertanulmányok szintén bizonyították a genetikai háttér fontosságát, monoizigóta ikrek esetén a betegség kialakulásának gyakorisága 75%, ha az egyik testvér érintett, míg dizigóta ikerpárok esetén ez a szám 30% ¹⁰. Az utóbbi időszak genomikai vizsgálatai 19, az AD kialakulásában nagy valószínűséggel szerepet játszó lókuszt azonosítottak, bár az egyes gének egyénenként eltérően hatnak az AD fenotípusos megjelenésére. Jól ismert, hogy azok a gének, melyek az

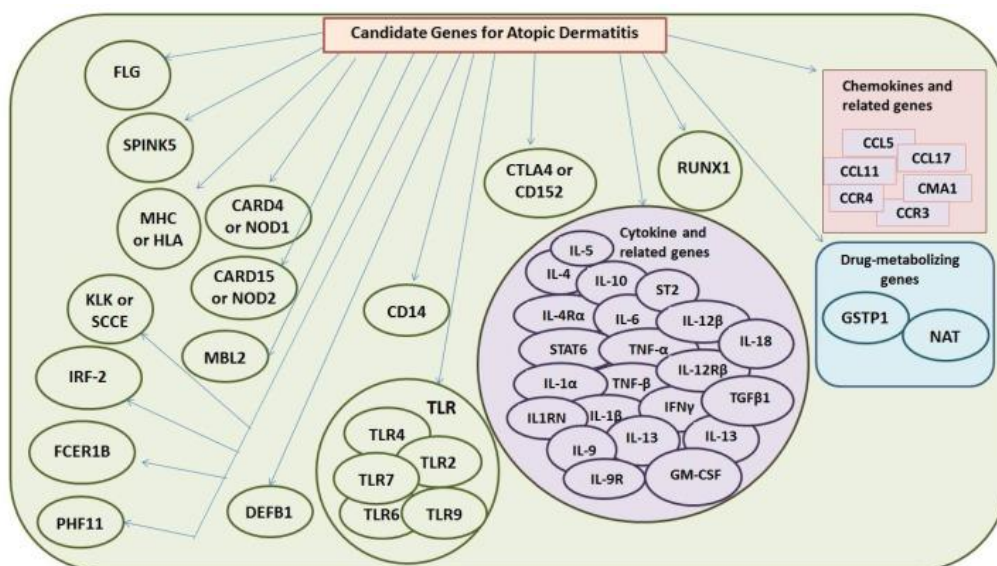
epidermisz strukturális eltéréseihez és az immunrendszer diszregulációjához kapcsolódnak, fontos szerepet töltenek be az AD etiológiájában ¹¹. A több eltérő populáción elvégzett teljes genom elemzésének (GWAS) eredményeként számos kandidátus, az AD-hez kapcsolható régiót azonosítottak ¹², azonban az irodalmi adatokból ismert, hogy a betegséggel összefüggésbe hozható génváltozatok eltérőek lehetnek az egyes populációkban.

Jól ismert, hogy a filaggrin gén (*FLG*) mutációi (a két leggyakoribb az R501X és a 2282del4) a jelenleg ismert legfontosabb predisponáló faktorok az AD kialakulásában. A filaggrin homozigóta null mutációja a betegeknek csak kis százalékát érinti, sokkal gyakoribb a heterozigóta mutáció, amikor csökkent a filaggrin mennyiség. A *FLG* gén, mely egyike az S100-füziós proteineknek (*SFTP*) kódoló géneknek, az 1q21 kromoszómán helyezkedik el abban a régióban, melyet epidermális differenciációs komplexnek (EDC) neveztek el. Az itt található gének többek között a következő fehérjéket kódolják: profilaggrin, melyből hasítódik később 10-12 filaggrin fehérje (*FLG*), hornerin, FLG2, repetin, cornulin, trichohyalin ¹³. Ezek a gének az EDC-n belül nagyon közel helyezkednek el egymáshoz, mind struktúrájukban, mind funkciójukban nagyon hasonlítanak, és kimutatták, hogy bármely *SFTP* génnek az exon 3 null mutációja csökkent vagy hiányzó fehérje produkcióhoz vezet ^{14,15}. A *FLG* fehérje a stratum corneum és granulosum struktúrféhrjéjeként segíti a keratin filamentumok összekapcsolását, biztosítja az intakt bőr barrier hidratáltságát, de fontos feladata van a fényvédelem terén is.

Egy másik, az AD kialakulásával kapcsolható fontos gén a Kazal-típusú szerin proteáz inhibitor 5 (*SPINK5*) gén az 5q32 kromoszómán található, egy AD-hez kapcsolt régió belül, az általa kódolt lymphoepitheliális Kazal-típusú tripszin inhibitor (LEKTI) nevű szerin proteáz inhibitor az epiteliális és mucosális felszínen és a thymusban expresszálódik. A szerin proteáz enzimek és inhibitoraik fontos szerepet játszanak a bőr barrier homeosztázisában, a stratum corneum hámlásában, a lipid barrier és a szaruboríték (cornified envelope) fenntartásában. A LEKTI részt vesz a keratinociták differenciációjának proteolízis általi szabályozásában, a normál epitélium kialakításában és a normál bőr permeabilitásának fenntartásában ¹². Egy mostanában megjelent tanulmány kimutatta, hogy a LEKTI E420K-s variációjának megléte kockázati tényező AD-ben, mivel növeli a keratinociták citokin expresszióját, illetve a *SPINK5* mutáció áll a ritka Comel-Netherton szindróma hátterében, melynek bőrtünetei hasonlóak AD-hez ^{16,17}.

A veleszületett immunválasz komponenseiként a keratinociták által termelt antimikrobiális peptidek (AMP) kritikus szerepet játszanak a patogének eltávolításában és a funkcióképes

epidermális barrier fenntartásában. Ilyen fehérjék pl. a β -defenzinek (hBD -1,2,3), cathelicidinek, psoriasin és a ribonukleáz (RNáz)^{18,19}.



2. ábra: Az AD genetikai hátterének vizsgálata során nyilvánvalóvá vált, hogy elsősorban a bőr barrier, a szerzett és a veleszületett immunválaszi funkciókat kódoló gének mutatnak eltérést (Forrás: Al-Shobaili HA et al. Molecular Genetic of Atopic dermatitis: An Update. Int J Health Sci (Qassim). 2016 Jan;10(1):96-120.)

Az innate immunválasz a mintázat felismerő receptorok (PRR) aktivációjával indul, mely receptorok szerepe az, hogy bizonyos patogén ligandok kötődésekor megfelelő immunválasz generálódjon, a szervezet védett legyen az adott kórokozóval szemben. A PRR-ek, mint a Toll-like receptorok (TLR) és a nucleotide binding oligomerization domain like receptorok (NLR), valamint az AMP-k mutációi is fontos szerepet játszanak az AD kialakításban és fenntartásában a bőrfertőzésekre való fogékonyság által^{20,21}. Az innate immunválasz további génjeinek, a *CARD4* (caspase recruitment domain 4, *NOD1*), *CARD15* (*NOD2*), *CD14*, mannóz-kötő lektin (*MBL2*), *TLR2*, *TLR4*, *TLR6*, *TLR9*, *DEFB1* (human β -defensin 1) gének polimorfizmusait szintén összefüggésbe hozták a betegséggel bizonyos populációkban.

Az adaptív immunválaszhoz kapcsolt gének közé tartoznak: az *IL-4*, *IL-4Rα*, *STAT6*, *IL-10*, *IL-6*, tumor nekrosis faktor (*TNF*) α , *TNFβ*, *IL-1α*, interferon (*IFN*) γ , *IL-1β*, *IL-5*, *IL-12β*, *IL-12Rβ*, *IL-13*, *IL-18*, transzformáló növekedési faktor (*TGF*) β 1, granulocita-makrofág kolónia stimuláló faktor (*GM-CSF*), *IL-9*, *IL-9R*, valamint a kemokin gének (*CXC*, *CC* – gyulladásos kemokinek, *CC*, *CX3C*- immun kemokinek). Ezen gének polimorfizmusai és az AD között szintén találtak összefüggést az egyes populációkat vizsgálva¹². A major

hisztokompatibilitási komplex (MHC) vagy humán leukocita antigén (HLA) gének szerepét ugyancsak vizsgálták AD-ben, bizonyos populációkban találtak összefüggést a betegség és az egyes variánsok között ²².

Összesítve megállapítható, hogy az AD kialakulásával kapcsolatba hozható génmutációk vagy polimorfizmusok elsősorban olyan géneket érintenek, melyek az innate vagy adaptív immunválaszban, illetve az epidermális barrier felépítésében fontos fehérjéket kódolnak (2. ábra).

2.2.2. Környezeti faktorok

Az AD egy olyan multifaktoriális, poligénesen öröklődő megbetegedés, melynek manifesztációjában a fentebb ismertetett genetikai háttér mellett nagyon fontos szerepe van a környezeti hatásoknak is, többek között az allergéneknek (allergiás szenzitizáció), irritánsoknak (fokozottan érzékeny, intoleráns bőr), fertőzéseknek (fokozott hajlam bőrfertőzésekre), fizikai faktoroknak (vakarás, napfény, hideg-meleg, páratartalom) és a pszichés stressznek.

Régóta ismert, hogy AD-ben szenvedők egy részére 2 éves kor alatt jellemző az élelmiszerekkel, később pedig a légúti allergénekkal (háziporlatka, lisztatka, virágpor és állati szőrök) szembeni I. típusú azonnali allergiás reakció. Ezeket a betegeket extrinzik típusú AD-s betegeknek nevezzük, náluk magas össz IgE szint és allergén-specifikus IgE mutatható ki. Az intrinzik AD-ben szenvedő betegeknél bár a klinikai tünetek megegyeznek az extrinzik AD tüneteivel, nem mutatható ki fokozott I. típusú allergiára való hajlam, nincs kapcsolatos légúti allergia, normál a szérum IgE szintje, nem detektálható specifikus IgE és a bőrtesztok is negatívak ^{23,24}. Ez is mutatja tehát, hogy az I-es típusú szenzitizáció, bár szerepet játszhat a bőrgyulladás kialakulásában, de az ekzémás bőrtünetek kialakulásáért elsősorban az allergén specifikus T limfociták bőrbe történő vándorlása és az általuk elindított gyulladás folyamata felelős.

Az allergének mellett a detergenseknek, szappanoknak, kémiai vagy fizikai irritáló anyagoknak is szerepe van az AD tüneteinek megjelenésében vagy súlyosbodásában, ezek elsősorban a bőr barrier károsítása útján hatnak. Sok tanulmány foglalkozik a bőrre jellemző fertőzések káros hatásaival AD-ben. Ismert, hogy a klinikailag fertőzést nem mutató betegek esetében is 90%-ban kitenyészthető *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) az ekzémás bőrterületről, valamint az, hogy antibiotikum kezelés ilyen esetekben is jelentős klinikai javulást eredményez ^{25,26}. A *S. aureus* által termelt toxinok a gyulladt, károsodott bőr felszínén átjutva szuperantigén hatásuk révén aktiválni képesek a makrofágokat, T sejteket és

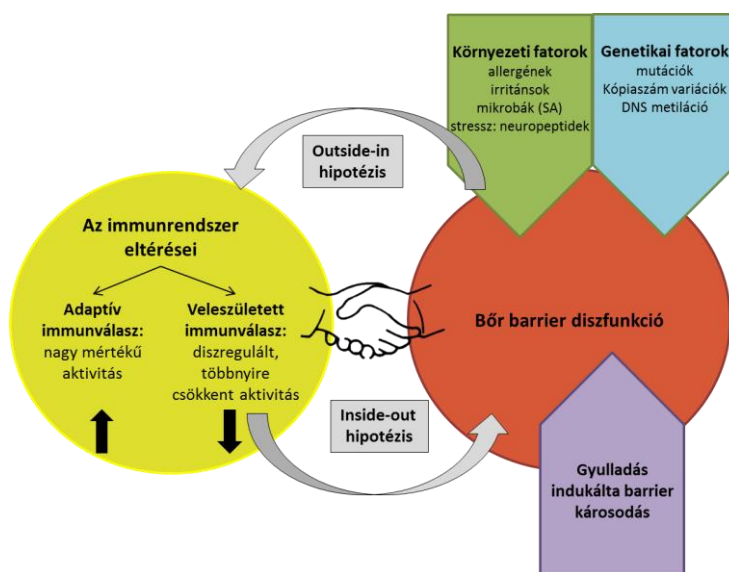
a Langerhans sejteket. A makrofágok által termelt IL-1 és TNF- α fokozza a gyulladást, hatására E-selectin expresszió indul meg a vaszkuláris endotel sejteken és ez elősegíti a cutan lymphocytá-asszociált antigén (CLA)+ limfociták bőrbe történő bevándorlását²⁷. Ugyancsak több vizsgálat kimutatta, hogy AD-ben a *Staphylococcus* toxinok ellen specifikus IgE termelés indul el. Ezen betegekben a bazofilok felszínére kötődő IgE-toxin komplex kapcsolódását követően hisztamin felszabadulás mutatható ki. A toxin specifikus IgE szintje összefüggést mutat, az AD súlyosságával²⁸. A környezeti antigénekre specifikus IgE termelés mellett AD-ben saját autoantigének ellen is kimutatható antitesttermelés. Elsősorban a gyulladás következtében károsodott keratinocitákból kiszabaduló citoplazmatikus fehérjék ellen IgE típusú antitestek képződnek, mely autoantitestek szintén hozzájárulnak a gyulladás további fenntartásához²⁹.

Nemrégiben megjelent tanulmányok felhívják a figyelmet a stressz kiemelkedő szerepére a betegség kialakulásában, és hangsúlyozzák a pszichológiai faktorok és az ideg- illetve immunrendszer elemei közötti kapcsolat jelentőségét. Stressz faktorok jelenlétében az eozinofil sejtszám és az IgE expresszió is növekszik. Tovább hangsúlyozza a stressz szerepét a betegség kialakításában és fenntartásában, hogy a különböző feszültségoldó módszereket alkalmazó terápiák (pszichológiai terápia, relaxáció, autológ tréning stb.) a klinikai tünetek nagymértékű javulásához vezetnek^{2,30}.

2.3. Az atopiás dermatitis patogenezise

Az elmúlt évek kutatásai nyomán jelentősen gyarapodott tudásunk a betegség patomechanizmusát illetően. Alapvetően két hipotézis létezik az AD kialakulására vonatkozóan, egy immunológia (inside-out) és egy bőr barrier (outside-in) hipotézis^{5,31}. Az immunológiai elmélet szerint a betegség primer oka olyan immunológiai diszreguláció, mely a T sejtek, különösen a helper T sejtek (Th1, 2, 17 és 22) és a regulatórikus T sejtek egyensúly eltolódását eredményezi³². Akut AD-ben elsősorban a Th2/Th22 sejtek áramlanak a bőrbe, melynek következtében emelkedik az IL-4, -5, -13 interleukinek expressziója, bőrgyulladás alakul ki. Ennek hatására következményes bőr barrier károsodás, további gyulladást okozó sejt beáramlás (eozinofil, makrofág, hízósejt), gátolt Th1 sejt differenciáció és fokozott IgE termelés jön létre³³. Ezen elmélet szerint elsődleges az immunrendszer károsodása és következményes a bőr barrier eltérés.

A bőr barrier hipotézis szerint elsődleges lépés a bőr barrier károsodása, mely lehet genetikai vagy szerzett károsodás. Jó példa erre a filaggrin gén mutációja, mely a betegek 30-40 %-ánál kimutatható. Az *FLG* mutációk miatt kevesebb filaggrin termelődik. Hiányában a bőr barrier károsodik, növekszik a transzepidermális vízvesztés. A károsodott barrieren több allergén jut át, valamint gyulladásos citokin termelés indul el a keratinocitákból. Ezek közül legfontosabb a thymic stromal lymphopoetin (TSLP), mely a dendritikus sejteket aktiválja és Th2 típusú polarizáló képességgel ruházza fel. Megindul a Th2 típusú sejtek bevándorlása, következményes egyéb gyulladásos sejt megjelenéssel együtt ³⁴. Az outside-in teória szerint tehát először barrier károsodás jön létre és ez vezet immun-mediált gyulladásához. Feltehetően mindkét elmélet igaz, egyik betegnél az egyik útvonal, másikonál a másik dominál, így ez a két elmélet kiegészíti egymást, nem létezik egyik a másik nélkül. A kialakult klinikai tünet tehát az immun-mediált gyulladás és a barrier károsodás egymást erősítő és fenntartó ördögi körének eredménye.



3. ábra: Az AD patomechanizmusának áttekintése

2.3.1. A fizikokémiai bőr barrier jellemzői és szerepe AD-ben

Egy intakt epidermális barrierrel a bőr a szervezet számára fizikai és kémiai gátat is biztosít. A bőr fizikokémiai barrierje nem a teljes epidermiszt jelenti, hanem a stratum corneum alsó és a stratum granulosum felső néhány sejtsorát. Fő alkotóelemei a sejtek

(keratinociták, korneociták), a közöttük elhelyezkedő lipid állomány és a sejteket összekapcsoló elemek (desmosómák, korneodesmosómák, tight junction). A stratum corneumban a korneocitákat még egy úgynevezett szaruboríték is körülveszi, egy lipideket és proteineket tartalmazó keresztkapcsolt erős, de rugalmas mátrix, mely minimalizálja a vízvesztést és megvédi a szervezetet az allergénekkal és mikrobiológiai ágensekkel szemben. Normál bőrben a fizikokémiai barrier képződése során az egyik legfontosabb első lépés, amikor a profilaggrint szerin proteázok defoszforilálják és hasítják, és felszabadul több filaggrin molekula. A filaggrin fő feladata a keratin keresztkötése, és a keratinociták, korneociták lapos alakjának kialakítása. A filaggrinnak további szerepe, hogy degradációja révén fő forrása az ún. természetes nedvesítő faktoroknak (Natural Moisturizing Factors – NMF) ³⁵. Bomlástermékei fontos szerepet játszanak a stratum corneum savasításában, és antimikrobiális hatást is kifejtenek. A korneocitákat összekötő korneodesmosómák is kiemelt szerepet játszanak a fizikokémiai barrierműködésben. A stratum granulosumban a keratinocitákat a tight junctionok kapcsolják össze, melyek nem csupán a fizikokémiai barrieret erősítik, hanem az immunológiai barrierben is szerephez jutnak, mivel ez az a réteg, ameddig egészséges bőrben a Langerhans sejtek nyúlványai eljutnak. Sérült barriernél a Langerhans sejtek ezen rétegen túl is kiterjesztik dendritjeiket, így fokozottan tudják észlelni a külvilágból a bőrt érő ingereket.

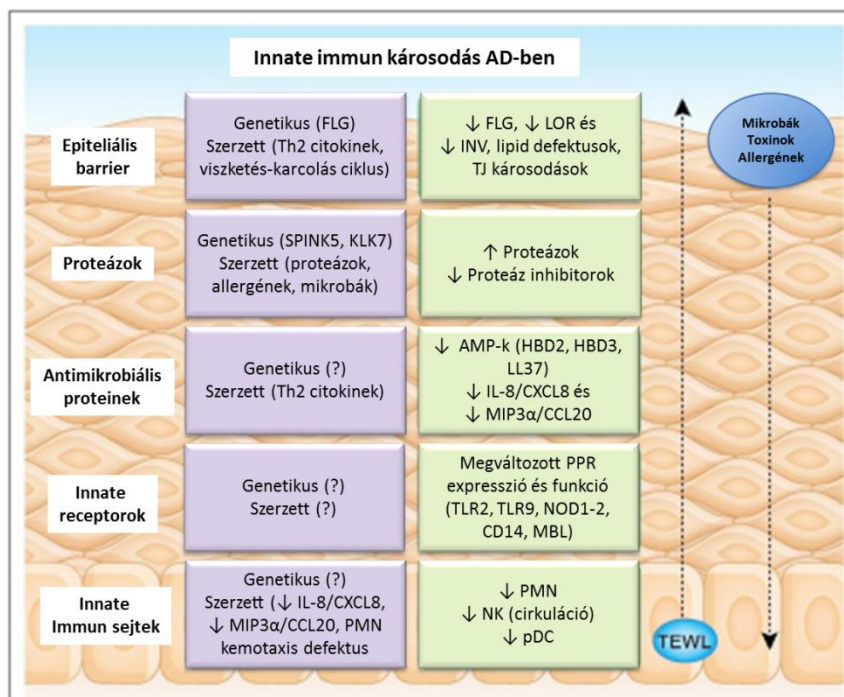
AD-ben a fentebb leírt barrier valamennyi eleme sérülhet mind a sejtek, mind a kapcsoló elemek vagy sejtközüti állomány károsodhat, melynek következtében a bőr barrier gyenge, sérülékeny. Részletesebben megvizsgálva az AD-s bőrre jellemző a filaggrin károsodása következtében kialakuló megnövekedett transzepidermális vízvesztés (TEWL), a stratum corneum csökkent hidratációja és a keratinociták terminális differenciációjának zavara, melynek hatására csökken a ceramidok, a filaggrin és az AMP-k szintje ^{36,37}. Ezzel egyidejűleg emelkedik a proteáz aktivitás [endogén (keratinocita és hízósejt eredetű) és exogén (környezeti allergének, *S. aureus*) proteázok] és proinflammatorikus citokinek szabadulnak fel, mely a bőr barrier összeomlásához vezet. AD-ben a csökkent filaggrin metabolitok jelenléte a bőr pH értékének emelkedéséhez és a szerin proteázok megnövekedett aktivitásához vezet ³⁸. AD-ben a fizikokémiai barrier másik fontos károsodása a tight junction-ket érinti. Nem léziós epitel mintákon, génexpressziós vizsgálatokban kimutatták, hogy az AD-s betegeknél kiugróan alacsony a tight junction proteinek (claudin-1, claudin-23) szintje, így a stratum corneum alatt közvetlenül elhelyezkedő, adhézis proteinek által alkotott komplex is károsodott ³⁹. További vizsgálatok kimutatták, hogy inverz korreláció áll fenn a claudin-1 és a Th2 polaritás markerei között (totál eozinofil szám, szérum totál IgE) ³⁸.

AD-ben a barrier károsodása olyan betegeknél is megfigyelhető, akik nem hordoznak a barrier funkciót érintő mutációt, polimorfizmust vagy „copy-number variation”-t. Az epidermális barrier károsodásában a genetikai okokon túl szerzett faktorok is szerepet játszanak (elsősorban detergensek, szappanok túlzott használata, a bőr pH eltéréseit okozó anyagok), melyek a barrier valamennyi elemének funkcionális zavarát kiválthatják.

2.3.2. Az immunológiai bőr barrier (veleszületett immunválasz) sejtjeinek jelentősége AD-ben

A fizikokémiai bőr barrier legfontosabb alkotói tehát, mint láttuk, a keratinociták, a közöttük elhelyezkedő lipid-fehérje mátrix és az őket összekapcsoló desmosomák és tight junctionok. A keratinociták azonban nem csupán a bőr fizikokémiai barrierjének építőelemei, hanem a bőr immunológiai barrierjének is, elsősorban a veleszületett immunválasznak. Amennyiben genetikai vagy szerzett okból károsodik a keratinociták fizikokémiai barrierben betöltött szerepe, ez immunológiai működésükben megnyilvánuló eltéréseket is eredményez.

A veleszületett immunválasz más képviselői (DC, iNKT stb.) is számos károsodást mutatnak AD-ben (4. ábra), mely eltérések részben okai, részben következményei a bőr fizikokémiai barrierjében mutatkozó károsodásoknak vagy a szerzett immunválaszban tapasztalt eltéréseknek és ez a 3 rendszer egymást erősítve egy olyan circulus vitiosus hoz létre, mely fenntartja az AD-ra jellemző súlyos bőrgyulladást. A közöttük kimutatható szoros kapcsolat rámutat ugyanakkor a bőr fizikokémiai barrierjének és immunológiai barrierjének szoros összefüggéseire is. Saját kutatásaim során elsősorban a veleszületett immunválasz adott sejtjeinek (keratinocita, DC, iNKT sejt) szerepét tanulmányoztam AD-ben szenvedő betegeknél.



4. ábra: Az innate immunrendszer és a fizikokémiai barrier eltérései AD-ben (Forrás: De Benedetto A et al. Atopic dermatitis: a disease caused by innate immune defects? J.Invest.Dermatol. 2009;129(1):14-30.)

2.3.2.1. Keratinociták, IL-16

Az elmúlt évtizedek kutatási eredményei bebizonyították, hogy a keratinociták szerepe nem merül ki a bőr fizikokémiai barrierjének kialakításában, hanem ezek a sejtek aktív szerepet játszanak az innate immunválasz indukálásában, a bőr immunológiai barrierjének működésében is. Toll-like receptoraik és egyéb patogén asszociált molekuláris mintázat (PAMP) és endogén veszély-asszociált molekuláris mintázat (DAMP) felismerő receptoraik [pl. NLR gén család által kódolt fehérjék] révén képesek különbséget tenni a patogén és nem patogén jelek között ⁴⁰. A keratinocitákon a TLR aktiváció egy predomináns Th1 típusú immunválaszt indukál, mely I. típusú interferon (IFN) termeléssel társul ⁴¹. Az NLR indukció eredményeképpen más típusú proinflammatorikus jelátviteli útvonalak kapcsolnak be. A keratinociták szintén fontos szerepet játszanak az AMP termelésben (β -defensinek, cathelicidinek). A bőr fertőzése során a keratinociták AMP termelését növelik a T sejt citokinek, különösen az IL-17A és az IL-22 ^{42,43}. A keratinociták citokineket és kemokineket is expresszálnak, tehát úgy is képesek az immunrendszert modulálni, hogy immunsejteket aktiválnak és toboroznak a bőrbe. Leírták ezen sejtek antigén prezentáló képességét is az MHCII expresszióra alapozva, bár úgy tűnik, hogy kevésbé vesznek részt a T sejtek

polarizációjában, sokkal inkább a már korábban antigénnel találkozott T sejtek toborzásában és aktiválásában van szerepük⁴⁰.

A keratinociták szerepe kiemelten fontos az AD kialakulásában, mind a betegség iniciálásában, mind a tünetek fenntartásában. Legismertebb szerepük a TSLP nevű proinflammatorikus citokin termelése, mely normál bőrben nem detektálható, ugyanakkor mind az akut, mind a krónikus AD-s bőr léziókban nagy mennyiségben jelenik meg, és leginkább a teljesen differenciált keratinocitákhoz köthető⁴⁴. Az éretlen CD11c⁺ DC-k a TSLP hatására éretté válnak, Th2 típusú polarizációt idéznek elő naiv T sejtekben, illetve olyan kemokineket (kemokin (C-C motívum) ligand (CCL)17, CCL22) termelnek, melyek a kemokin (C-C motívum) receptor (CCR)4 receptorhoz kötődve Th2 citokineket termelő sejteket toboroznak a bőrbe. A TSLP hatást gyakorol a hízósejtekre és NKT sejtekre is. Az iNKT sejtek TSLP receptort expresszálnak és a ligand kötődésére IL-4 és -13 termeléssel reagálnak⁴⁵. A TSLP mellett a keratinociták számos citokint képesek termelni, ilyenek: az IL-1, IL-6, IL-10, IL-18, GM-CSF és a tumor necrosis factor α (TNF α)⁴⁶, valamint az IL-16, melyről kevés ismeretünk van AD-ben.

Az IL-16 fehérjét először 1982-ben azonosították, limfocita kemoattraktáns faktorként (LCF) írták le⁴⁷. A humán IL-16 gén 7 exonból és 6 intronból áll, és a teljes prekursor IL-16 molekulát kódolja. Számos fajban elvégezték az IL-16 gén szekvenálását és azt találták, hogy ez a gén nagyon konzervatív valamennyi vizsgált fajban, sőt nemcsak maga a gén konzervatív, hanem a kötő kapcsolata a CD4 receptorral is. Ebből arra következtettek, hogy az IL-16/CD4 kapcsolatnak alapvető szerepe kell legyen a sejt immunválasz szabályozásában⁴⁸.

Az IL-16 egy prekursor molekulaként generálódik, majd a sejt aktivációt követően hasad egy promolekulára és egy szekretált, érett komponensre. Más prekursor molekulákkal ellentétben az IL-16-nak mindkét komponense biológiailag aktív. Limfocitákban a pro-IL-16, N-terminális domén transzkripcionális represszorként funkcionál, így szabályozó szerepet tölt be a sejtciklus folyamatában. Az érett, C-terminális domén a CD4 ligandjaként szekretálódik, fontos kemoattraktáns, növekedési faktor és differenciációs faktor a gyulladásos folyamatokban részt vevő hematopoietikus sejtek számára.

Az N-terminális pro-IL-16 szerkezetére jellemző, hogy egy CcN motívumot és 2 PDZ domént tartalmaz. A C-terminális érett IL-16 a kaszpáz 3 által jön létre, és egy PDZ domént és CD4 kötő domént tartalmaz. A hasítás után a pro-IL-16 a sejtmagba kerül, ahol egy nukleáris chaperon (heat shock cognate protein 70 – HSC70) köti, és így az Skp2 transzkripciója represszálódik. Az érett IL-16 valószínűleg a PDZ doménje által

sokszorozódik, és szekretálódik, mely folyamat részleteiben még nem ismert. A nyugalmi CD8⁺ T sejtek tartalmazzák az IL-16 mRNS-t, a prekursor IL-16-ot és az aktivált kaszpáz 3 enzimet, mely utóbbi lehasítja az érett fehérjét. Az érett IL-16 sokszorozódik és szekréción vezikulumokban tárolódik, ahonnan mitogén és antigén stimulus hatására felszabadul. Hasonló mechanizmus jellemző az eozinofilekre (GM-CSF stimulus) és a hízósejtekre (phorbol-12-myristate 13-acetate (PMA) C5a stimulus). Ezzel szemben a CD4⁺ T sejtek inaktív kaszpáz-3 enzimet expresszálnak, így érett IL-16 hasításához és szekrécijához az antigén stimulus mellett a kaszpáz-3 enzim aktivációja is szükséges. Ez jellemző a fibroblasztokra (IL-1 β , TGF β stimulus) és a DC-kre (IL-4, GM-CSF stimulus) is ⁴⁸.

Az IL-16 citokint epitél sejtek, hízósejtek, limfociták, makrofágok, synoviális fibroblasztok, eozinofil sejtek és keratinociták termelik ⁴⁹⁻⁵³, ugyanakkor megfigyelték, hogy a CD4⁺ és CD8⁺ sejtek is képesek IL-16 termelésre antigén vagy mitogén aktivációt követően. Az IL-16 expresszió elsősorban olyan gyulladásos folyamatokhoz köthető, mint: az asthma, rheumatoid arthritis, szisztémás lupus erythematosus, colitis, atopiás dermatitis, és a sclerosis multiplex.

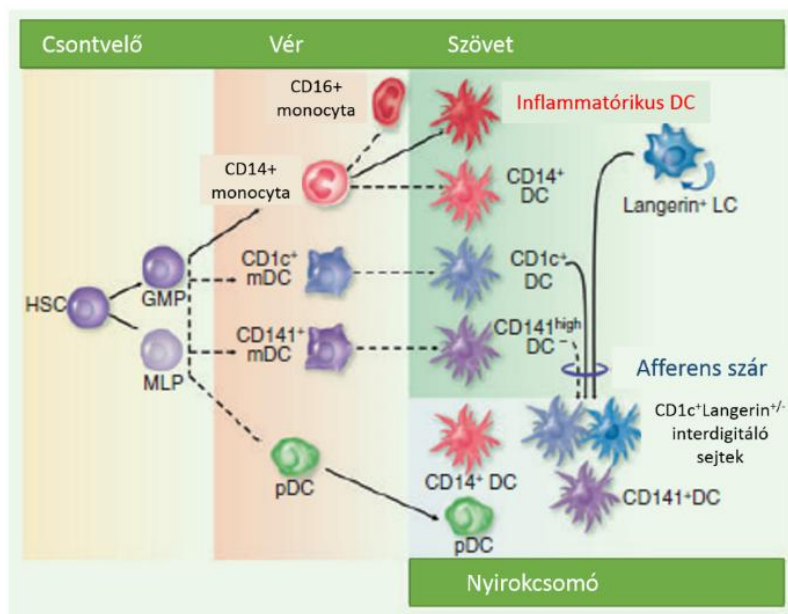
Az IL-16-ot elsőként a CD4⁺ T sejtek kemoattraktáns faktoraként írták le, később kimutatták, hogy az IL-16 valamennyi CD4⁺ perifériális immunsejt számára kemoattraktáns, ilyenek a monocyták, eozinofilek és dendritikus sejtek ⁵⁴⁻⁵⁷. A CD4⁺ T sejtek közül pedig leginkább Th1 és Treg sejt migrációt indukál, sőt képes direkt módon forkhead box P3 (FOXP3) expressziót indukálni, ezáltal emelni az indukálható Treg populáció mértékét ⁵⁸. Szerepet játszik az IL-2 receptor (CD25, CD122) upregulációjában, mely bizonyos T sejt típusok (pl. Treg, transformált, malignus T sejtek) IL-2 és IL-15 jelenlétében való proliferációjához vezet ⁵⁸⁻⁶⁰. Továbbá HLA-DR upregulációt indukál, ezáltal facilitálja a T sejtek antigén felismerését ⁵⁷.

AD-ben kimutatták, hogy az IL-16 szintje emelkedett és bizonyos kutatók munkája alapján felmerült, hogy szérumszintje jól korrelál a betegség aktivitásával és súlyosságával. Azonban nem minden kutatás tudta ezt alátámasztani és nem állt rendelkezésünkre adat arra vonatkozóan sem, hogy van-e összefüggés az allergiás szenzitizáció mértéke és az IL-16 szintje között.

2.3.2.2. *Dendritikus sejtek szerepe AD-ben*

A DC-k a természetes immunválasz fontos szereplői, és hidat képeznek a természetes és az adaptív immunrendszer között. A DC-k az antigén prezentáció révén képesek iniciálni az adaptív immunválaszt, de képesek meghatározni annak irányultságát is. Az adott DC-re jellemző antigént kötő PRR-k minősége, az expresszált kostimuláló molekulák és az érés során termelt citokinek határozzák meg a kialakuló immunogén Th válasz típusát (Th1/Th2) és minőségét vagy adott körülmények között a tolerancia biztosítását^{61,62}. A vérben a myeloid DC-knek (mDC) 2 fő típusát különítjük el. Az egyik típus a CD1c⁺vér dendritikus sejt antigén (BDCA)1⁺ mDC, mely koexpresszál CD11c és CD11b markereket, míg a másik a CD141⁺BDCA3⁺ mDC, mely CD11b negatív és kisebb mértékben expresszál CD11c-t és C-type lectin domain family 9 member A (CLEC9A)-t a sejtfelszínén.^{63,64} A myeloid DC-k mindkét típusa negatív CD14-re és CD16-ra, így különíthetők el a monocita populációtól. A bőrben megkülönböztetünk alap állapotban (steady state) és gyulladásakor megjelenő DC típusokat. Alap állapotban az epidermiszben találhatóak a Langerhans sejtek (LC), míg a dermiszben detektálhatóak a rezidens dermális myeloid DC-k valamint a plazmocitoid DC-k (pDC). Ugyanakkor gyulladásakor a LC-k és a rezidens DC-k mellett megjelennek az inflammatórikus dendritikus epidermális sejtek (IDEC) és a myeloid dermális inflammatórikus DC-k. A dermális DC-knek (dDC) 3 fő csoportját különbözteti meg az irodalom: a CD1a⁺/CD1a⁻CD1c⁺CD14⁻ DC-eket, a CD14⁺ DC-eket és a CD141^{hi}CD14⁻ DC-eket⁶⁵.

A LC-k a bőr őrszem sejtjei, mely köszönhető az elhelyezkedésüknek és a kinyúló dendritjeiknek. Az LC-k jellemző sejtfelszíni markerei: CD11c, CD32, CD45, FcεR1, nagy mennyiségben expresszált CD1a, CD207/Langerin, E-cadherin, EpCAM, HLA-DR, CD80, CD86, CD40 és csak erre a sejt típusra jellemző Birbeck granulumok jelenléte⁶³. Alapállapotban az LC-k folyamatosan pótlódnak a rezidens prekursor készletből, míg gyulladásban a forrást a vér prekursorok jelentik^{66,67}. Az LC-k képesek Th1, Th2, Th17 és Th22 irányba polarizálni, de a nyirokcsomókba vándorolt LC-k leginkább Th2 irányt indukálnak, kemokinek termelése révén fokozzák a naív T sejtek és az IDEC sejtek migrációját az epidermiszbe^{63,68,69}.



5. ábra: Denritikus sejtek típusai a különböző szövetekben. (Forrás: Collin M et al. Human dendritic cell subsets. Immunology. 2013;140(1):22-30).

A $CD1a^+CD1c^+CD14^-$ dermális DC-k koexpresszálják még $CD11c$ -t, $HLA-DR$ -t és $CD45$ -t. Megfelelő stimulus jelenlétében nagy mennyiségben expresszálják $CD80$ -at és $CD86$ -ot, $CD4^+$ és $CD8^+$ T sejteket is képesek indukálni, leginkább Th2 és Th22 irányba polarizálnak. A monociták mellett a vérben keringő DC-kről is azt tartják, hogy ők a bőrben vagy egyéb szövetekben jelen levő DC-k prekurzorai lehetnek^{64,70}, gyakran pre-DC-ként is hivatkoznak rájuk. Az elmúlt időszak in vitro differenciációs és gén expresszió kutatásai rávilágítottak arra, hogy a $CD1c^+$ vérben keringő DC-k és a $CD1c^+$ szöveti DC-k között prekurzor progenikus kapcsolat áll fenn⁷¹. A $CD141^+$ DC-k nagyon kis gyakorisággal fordulnak elő a szövetekben és a vérben, in situ vizsgálatuk nagyon nehéz. Ismert azonban, hogy a $CLEC9$ markerük révén képesek felvenni az elhalt vagy nekrotizáló sejteket⁶⁴.

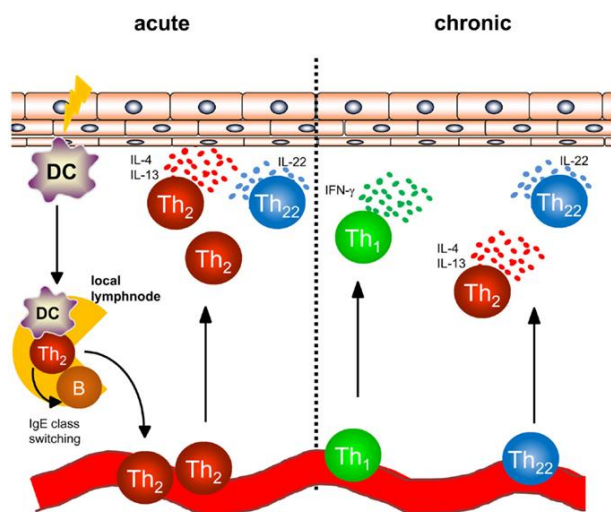
A $CD14^+$ dermális DC-k sejtfelszíni molekulái a $CD1c$ és $CD163$. Szoros kapcsolatban állnak a vérben keringő monocitákkal, mely monocita eredetre utal, mégsem keverendők össze a monocita eredetű vagy az inflammatórikus DC-kel, mely utóbbiak csak gyulladásban jelennek meg és proinflammatórikus fenotípus jellemzi őket. Alacsony mértékben expresszálják $CD80$ -at és $CD86$ -ot, bár képesek antigén felvételre és $IL-10$ termelésük révén képesek Treg sejteket indukálni.

A myeloid eredetű DC-k mellett az elmúlt évtizedekben kerültek az érdeklődés középpontjába az úgynevezett plazmacitoid DC-k, melyek onnan kapták a nevüket, hogy

inaktív állapotban plazmasejt szerű morfológiát mutatnak. Egészséges bőrben nem detektálhatóak, csak a gyulladás helyén jelennek meg. A perifériás vérben és a nyirokcsomókban egészséges szervezetben is jelen vannak. A pDC-k felszínükön CD123 (IL-3R), CD303 (BDCA-2) és CD304 (BDCA-4) molekulákat expresszálnak és megtalálhatóak mind a vérben, mind a nyirokcsomókban. Legjellemzőbb képességük, hogy virális fertőzésekben nagyon gyorsan képesek 1-es típusú IFN-kat nagy mennyiségben szekretálni. Stimuláció nélkül a pDC-k tolerogének, T sejt anergiát indukálnak és Treg irányban polarizálnak. Stimulációt követően azonban elnyerik DC tulajdonságaikat, HLA-DR és kostimuláló molekulák upregulációjával képesek a T sejtek aktivációjára ^{72,73}.

AD-ben a gyulladt bőrben mind a T sejtek, mind a DC-k száma emelkedett, különösen azon DC-k száma, melyek CD11c és CD1a pozitívak. A léziós bőrben a LC-k mellett megjelennek az IDEC sejtek, melyeknek nagy része a dermiszben is megtalálható, így gyakran myeloid inflammatórikus DC-kként is hivatkoznak rájuk. Az IDEC sejtek fenotípusos analízise során kimutatták, hogy ezek a sejtek a következő sejtfelszíni markereket expresszálják: CD1a⁺, CD1b^{dim}, CD1c^{dim}, CD11b^{bright}, CD11c⁺, CD23^{dim}, CD32^{dim}, CD36^{bright}, CD206^{bright}, CD209⁺, FcεRI^{bright}, IgE⁺, HLA-DR^{bright} ⁶³.

AD-s bőrben mind a LC-k, mind az IDEC sejtek nagy mennyiségben expresszálnak FcεR1-et, ugyanakkor nagyon alacsony a CD32/FcγRII pozitivitás, ami csak az AD-s betegekben volt detektálható, más gyulladásos bőrbetegségben nem ⁷⁴. Az AD akut fázisában a szervezetbe a nyálkahártyákon, vagy a bőrön át bejutó antigének hatására képződő IgE molekula kötődik a bőrben elhelyezkedő LC FcεRI-hez, melynek hatására a sejtek CCL2-t, (monocita kemoattraktáns protein 1-t (MCP1)), IL-16-ot és valószínűleg CXCL8-at szekretálnak ⁷⁵. Ennek hatására monociták, eozinofilek, az IDEC sejtek előalakjai és T sejtek vándorolnak a gyulladás helyére. A károsodott barrierű bőrön át ismételt bejutó antigént már a felszíni IgE molekulával felszerelt LC várja, a kötődés következtében a sejt aktiválódik és vagy helyileg, vagy a környező nyirokcsomóba vándorolva prezentálja az antigént az antigén specifikus T sejteknek, Th2 irányú polarizációt generálva. Az LC-k felszínén nagy mennyiségben található a TSLP receptor, melynek ligandját nagy mennyiségben szekretálják a keratinociták. A TSLP kötődésének következtében az LC-k éretté válnak, aktiválódnak és a következő kemokineket termelik: CXCL8, CCL17, CCL22, CCL24 és IL-15. Ezek az ágensek hozzájárulnak a Th2 bőrbe való kivándorlásához, ahol aktiválják őket a TSLP-indukálta LC-k ⁷⁶.



6. ábra: A léziós bőr T sejt összetétele akut és krónikus fázisban (Biedermann, Front. Immunol., 13 July 2015)

A subakut és krónikus fázisban a Th2 és Th22 dominancia mellett a Th1 irányú polarizáció is jellemzővé válik. Ebben az IDEC sejteknek van nagy szerepe, ők felelősek a krónikus léziók fenntartásáért. Az antigén aktivációt követően az IDEC sejtek CCL3-at, IL-1-et, IL-16-ot, IL12p70-et termelnek, az utóbbi kettőnek van szerepe a Th1 irányú polarizációban ^{63,75}.

AD-ben az epidermiszben részletesen feltárt mDC-k mellett a dermális DC-k szerepe is kiemelkedően fontosnak tűnik. AD-ben méginkább jellemző, hogy a pre-DC-k nemcsak a dDC-k, hanem a bőr gyulladásos DC-k előalakjai is lehetnek. A dermiszben a dDC-k mellett a gyulladás folyamán megjelennek az ún. inflammatórikus dDC-k is, melyek a sejtfelszíni $\text{Fc}\epsilon\text{RI}^+\text{Fc}\epsilon\text{RII}^+\text{CD207}^+\text{CD206}^+\text{CD1b}^+\text{CD1a}^+$ expresszió alapján azonosíthatóak. Jellemző, hogy ezen sejtek CCR7-et expresszálnak a felszínükön, tehát képesek a környező nyirokcsomókba kivándorolni, ugyanakkor CCL17 és CCL18 termelésük révén hozzájárulnak az atopiás bőrre jellemző Th2 dominancia kialakulásában. Az általuk termelt citokinek (IL-5, IL-13, IL-6, $\text{TNF}\alpha$) olyan szöveti mikrokörnyezetet teremtenek, mely szintén részt vesz a betegségre jellemző Th2/Th22 egyensúlyeltolódás fenntartásában ^{77,78}.

Jelen tudásunk szerint a pDC-knek nem ismert szerepük az AD patogenezisében, hiszen gyakorlatilag hiányoznak a bőr léziókból. Ugyanakkor a vérben keringő pDC-k AD-ben expresszálnak $\text{Fc}\epsilon\text{R1}$ -et, aktivációjuk hatására emelkedik az IL-10 és csökken az $\text{IFN}\alpha$ termelés, mely növeli a betegek vírusos fertőzésekre való fogékonyságát.

AD-ben 2 féle túlérzékenységi reakció figyelhető meg, az I-es típusú hiperszenzitivitási reakciók kialakulása magas szérumszintű IgE szinttel és gyakori allergén specifikus IgE termeléssel jár. Az ekzemás bőrtünetek kialakulásáért a IV-es típusú hiperszenzitivitási reakción alapuló gyulladásos folyamatok felelősek, melynek során allergén specifikus T limfociták vándorolnak a bőrbe. A két túlérzékenységi reakciók között a kapcsolatot a bőrben elhelyezkedő DC-k képezik, hiszen felszíni IgE kötő receptoraik révén képesek az allergének megkötésére és T sejtek felé történő prezentációjára.

A kutatások azt sugallják, hogy a DC-k jelentősége nem csupán abban van, hogy direkt módon aktiválják a naiv T sejteket, hanem abban is, hogy citokin és kemokin termelésük révén egy olyan mikrokörnyezetet teremtenek, mely polarizálja és tovább stimulálja a bőrbe kivándorló T limfocitákat. Fontos felismernünk azt is, hogy a DC-k funkcióját nagyban befolyásolja az őket ért szöveti stimulus mennyisége és minősége.

Bár a bőrbe kivándorló Th sejtek típusai és a bőrben található DC-k jól ismertek AD-ben, arra vonatkozóan kevés adat áll rendelkezésre, hogy a dermális DC-k hol és mikor nyelik el T sejt polarizáló képességüket, illetve ezen sejtek éréseiről, vérben található esetleges előalakjairól nagyon kevés az adat.

2.3.2.3. *Az iNKT sejtek szerepe AD-ben*

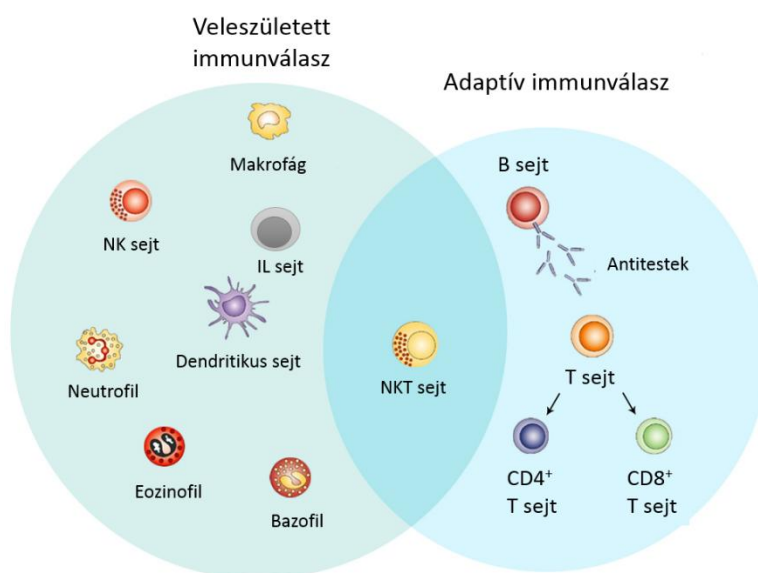
Az NKT sejtek a T sejteknek egy alcsoportját képezik. A T sejtekkel közös tulajdonságuk, hogy rendelkeznek T sejt receptorral (TCR), mely egy átrendeződött $V\alpha 24$ - $J\alpha 18$ α láncból és egy $V\beta 11$ tartalmú β láncból épül fel^{79,80}. Ez a receptor elkülöníti őket az NK sejtektől, bár az NKT sejtek is CD161 pozitívak és az NK sejtekhez hasonlóan az NKT sejtek is képesek citotoxikus granulumokat expresszálni (perforin, granzyme)⁸¹.

Ugyanakkor a T sejtektől és Treg sejtektől is különböznek, mivel az NKT sejtek TCR receptoraik nem képesek az MHCI és II molekulák által prezentált peptid antigéneket kötni, csak a CD1d molekula által közvetített glikolipideket ismerik fel. Újabb adatok szerint az aktiváló antigéneket 2 csoportra lehet osztani: ceramid alapú glikolipidek (glikoszfinbolipidek) és glicerol alapú lipidek (membrán foszfolipidek).

Az NKT sejtek kialakulása a thymusban történik, az MHC kapcsolt T sejtekkel közös prekursorból. Az NKT sejtek a $CD4^+CD8^+$ dupla pozitív T sejt csoportból differenciálódnak, elkülöníthetők $CD4^+$ vagy $CD8^+$ egyszerűen pozitív populációk és dupla negatív sejtek^{82,83}. Ezen túl az NKT sejteknek két típusát különítjük el, a $V\alpha 14^+$ NKT sejtek alkotják az I-es típusú, invariáns NKT (iNKT) sejtek csoportját, mely csoporton belül elkülöníthetők a $CD4^+$, $CD8^+$ és a $CD4^-CD8^-$ (dupla negatív, DN) iNKT sejtek. A másik csoportba a $V\alpha 14^-$

TCR-t expresszáló, II-es típusú NKT sejtek tartoznak, melyek jellemzője, hogy nem ismerik fel az α -Gal-Cer-CD1d komplexet⁸⁴. Emberekben, a perifériás vérben az iNKT sejtek száma 0,01-1% között van, és nagy egyedi varianciát mutat⁸⁵⁻⁸⁷. Az elmúlt évek vizsgálatai azt mutatják, hogy összefüggés van a nemek és az iNKT sejtek gyakorisága között. Nőkben magasabb a keringő iNKT sejtek száma a férfiakhoz képest valószínűleg a nemi hormonok hatása miatt⁸⁸.

Az iNKT sejtek TCR-einek általános ligandja egy szintetikus glikolipid, az α -galactosylceramid (α -Gal-Cer)⁸⁹. A kutatások legfrissebb eredményei alapján az iNKT sejtek azonosítására a CD161 marker helyett az α -GalCer-CD1d kapcsolat detektálása javasolt.



7. ábra: NKT sejtek hidat képeznek a veleszületett és az adaptív immunválasz között

Az iNKT sejtek a α -Gal-Cer mellett számos más, a CD1d által közvetített ligand felismerésére képesek: szintetikus ligandok (α GalCer, OHC, C20:2, C-glikozid, β GalCer (C12)), bakteriális felismerés (α -glukuronozilceramid (GSL-1), α -galakturonozilceramid (GS-1'), foszfatidilinozitol mannozid (PIM)), endogén felismerés (izoglobotrihexozilceramid (iGb3), dizialogangliosid (GD3), foszfatidilinozitol (PI)) hatására aktiválódnak a sejtek. Mindemellett ahhoz, hogy a sejtek aktivációja teljes legyen, szükség van citokin stimulációra is, a TCR szignál és a citokinek együttes jelenléte szükséges a megfelelő sejtindukcióhoz. A legjobban tanulmányozott citokin mediátor az IL-12, de az iNKT sejtek felszínén TSLP, IL-18, IL-23 és IL-25 receptort is azonosítottak⁸⁹. Az aktiváció hatására az iNKT sejtek gyors citokin

termeléssel válaszolnak, ilyen citokinek az IFN γ , tumor necrosis faktor (TNF), IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17, IL-21 és GM-CSF⁸⁹⁻⁹¹. Az eddigi adatok alapján elmondható, hogy az iNKT sejteknek kulcsszerepük van az innate és az adaptív immunválasz összehangolásában fertőzések esetén, autoimmun betegségekben, allergiában és tumoros megbetegedésekben⁹²⁻⁹⁴. Összességében tehát kijelenthető, hogy fő funkciójuk a citotoxikus képesség mellett a gyulladásos és tolerogén választ indukáló citokinek termelése.

Ugyanakkor kevés az ismeretünk az iNKT sejtek AD-ben betöltött szerepéről. A vérben keringő és a léziós bőrben azonosítható iNKT sejtek számára vonatkozó adatok ellentmondásosak az irodalomban, a funkcionális vizsgálatok száma pedig kevés. Mivel az jól ismert, hogy az iNKT sejtek képesek a veleszületett és az adaptív immunválasz között kapcsolatot képezni, az AD kialakulásának korai fázisában akár jó terápiás célpontok is lehetnek. Ehhez azonban további vizsgálatok szükségesek, hogy minél jobban feltérképezhessük ezen sejtek AD-ben betöltött pontos szerepét.

2.3.3. A szerzett immunrendszer szerepe AD-ben

A bőr fizikokémiai barrierjének károsodásai és a veleszületett immunrendszer eltérései mellett a szerzett immunrendszer diszfunkciója az AD kialakulásának harmadik fő eleme. Erre leginkább jellemző a Th2 és Th22 típusú sejtek jelentős számbeli és funkcionális dominanciája mind a betegek vérében, mind pedig a lézionális bőrben. Ez a dominancia jellemzi az AD akut fázisát és a krónikus szakban még fokozottabban figyelhető meg. A Th1 típusú sejtek akut szakban nem jelennek meg a bőrben, de krónikus fázisban kisebb populációjuk infiltrálja a betegek bőrét. A Th17 sejtek bőrben való megjelenéséről nem egységesek a kutatási adatok AD-ben. A helper típusú effektor T sejtek mellett a betegségre jellemző a Treg sejtek funkcionális károsodása, bár a sejtek számában nem mutatkozik csökkenés. Mivel kutatócsoportunk több tagja is foglalkozik és foglalkozott az adaptív immunrendszer eltéréseivel AD-ben, (lásd Dr. Aleksza Magdolna és Dr. Gáspár Krisztián PhD téziseit) itt most erre részletesen nem térek ki⁹⁵⁻⁹⁷.

3. CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során az AD patogenezisében szerepet játszó veleszületett immunválasz 3 fontos elemének vizsgálatát, ezek szerepének jobb megértését tűztük ki célul. Vizsgálataink első részében az IL-16 citokin, mint lehetséges biomarker szerepét tanulmányoztuk, majd a vérben keringő mDC-k és iNKT sejtek fenotípusos és funkcionális elemzését végeztük el.

3.1. Az IL-16 szerepének vizsgálata AD-ben

Bár az irodalomból már ismert volt, hogy az IL-16 szérumszintje összefüggést mutat az AD súlyosságával, arra vonatkozóan nem állt rendelkezésre adat, hogy milyen kapcsolat van az IL-16 és az allergiás szenzitizáció között. Céljainkat az alábbiak szerint határoztuk meg:

1. van-e eltérés az AD-s betegek szérumszintjében az egészséges kontrollokhoz és psoriasisos betegekhez viszonyítva,
2. a szérumszint mutat-e összefüggést a betegség súlyosságát jelző laboratóriumi paraméterekkel (Scoring Atopic Dermatitis (SCORAD), totál IgE, eozinofil sejtszám),
3. kimutatható-e összefüggés az IL-16 szintje és az allergiás szenzitizáció mértéke között,
4. a szérumszint totál IgE-vel összehasonlítva használható-e az IL-16 a betegség súlyosságát, és a szenzitizáció mértékét jól jelző biomarkerként?

3.2. A vérben keringő mDC-k szerepének vizsgálata AD-ben

A bőrben található DC-k kulcsszerepet játszanak az atopiás bőrgyulladás kialakításában és fenntartásában, továbbá ismert az is, hogy a bőrben jelenlévő DC-k „előalakjai” a perifériás vérben keringenek. Arra voltunk kíváncsiak, hogy a keringő mDC-k AD-ben milyen fenotípusos és funkcionális eltéréseket mutatnak az egészséges kontrollokhoz képest:

1. van-e különbség az AD-s betegek mDC-inek sejtmag morfológiájában illetve aktiváltsági állapotában a kontrollokhoz képest,
2. milyen citokin expressziós profil jellemzi a perifériás vérből szeparált mDC-ket stimulus hiányában, illetve egy az AD-s bőrre jellemző mikrokörnyezet (Staphylococcus enterotoxin B (SEB), TSLP stimulus) jelenlétében,
3. arra is kerestük a választ, hogy hol és mikor nyerik el az mDC-k a T sejt polarizáló képességüket?

3.3. Az iNKT sejtek szerepének vizsgálata AD-ben

Az iNKT sejtek nagy mennyiségben képesek mind Th1 és Th2 típusú citokineket termelni, ami arra enged következtetni, hogy ezek a sejtek szerepet játszhatnak az AD patogenezisében. Azonban kevés és ellentmondásos adat áll rendelkezésünkre az iNKT sejtek számáról és funkciójáról AD-ben, ezért a következő kérdéseket tettük fel:

1. az iNKT sejtek gyakorisága és abszolút száma mutat-e eltérést a betegekben a kontrollokhoz képest,
2. ha az iNKT sejteket a sejtfelszíni markereik (CD4, CD8) alapján alcsoportokra bontjuk, van-e eltérés a gyakoriságban és abszolút számban a betegek és a kontrollok között,
3. az IFN γ és IL-4 termelés alapján van-e funkcionális különbség az egyes alcsoportokban AD-s betegek és kontrollok között?

4. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Az IL-16 szerepének vizsgálata AD-ben

Betegek

A vizsgálatban összesen 85 AD-s beteg vett részt (46 férfi, 39 nő, átlag életkor 18,6 év, tartomány 7–49 év). Valamennyi beteg megfelelt a Hanifin és Rajka által felállított diagnosztikai feltételeknek ⁹⁸. A tanulmányt a Debreceni Egyetem Etikai Bizottsága is jóváhagyta. A betegség súlyosságát a SCORAD indexel jellemeztük: az átlag SCORAD 32 volt (8–56 között). A vizsgálatba bevont betegek nem részesültek orális glükokortikoszteroid vagy más szisztémás immunmoduláns kezelésben a vizsgálatot megelőző 4 hétben. Szintén nem kaptak antihisztamint vagy topikális kortikoszteroidot a vérvételt megelőző 5 napban. Valamennyi AD-s betegnél meghatároztuk a szérum IL-16 szintet, a szérum totál IgE-t és az eozinofil sejtszámot. Továbbá 48 AD-s betegnél mértük az allergén specifikus IgE szintet és végeztünk Prick tesztet. A specifikus IgE alapján az AD-s betegeket 2 csoportra osztottuk: 1. csoportban (nem szenzitizált, n=13) nem volt detektálható specifikus IgE, míg a 2. csoportban (szenzitizált, n= 35) 1 vagy több specifikus IgE volt kimutatható. A Prick tesztet egy standardizált protokoll szerint végeztük el. 32 különböző aeroallergént (köztük perenniális és szezonális allergéneket [házi poratka (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*), nyírfa pollen, macskaszőr, fűfélék (*Phleum pratense*)] és étel allergént teszteltünk. A Prick teszt eredményei alapján szintén két csoportot állítottunk fel. Az A csoportba (n=24) a nem szenzitizált, Prick teszt negatív betegek kerültek, míg a B csoport (n=24) volt a szenzitizált, Prick teszt pozitív betegek csoportja. Kontrollként 36 korban összeillő egészséges önkéntes és 20 psoriasisos beteg vérmintáit használtuk. A kontroll betegek krónikus plakk típusú psoriasisban szenvedtek (átlag életkor 28,2 év, Psoriasis Area Severity Index (PASI) 15,2) és nem kezelték őket lokális vagy szisztémás immunmoduláns szerekkel.

Laboratóriumi módszerek

Eozinofil sejtszám meghatározás

A teljes vérben az eozinofil sejtek arányát és abszolút számát egy Advia 120 típusú hematológiai analizátorral (Siemens, Deerfield, Ill., USA) határoztuk meg a betegek rutin klinikai kivizsgálásának részeként. A készülék az eozinofil sejteket azok „scatter” tulajdonságai és a myeloperoxidáz pozitivitásuk alapján azonosította.

Enzim-kapcsolt immunszorbens vizsgálat (ELISA)

A minták szérum IL-16 szintjét szolid fázisú szendvics ELISA (ELISA; Biosource International Inc., Camarillo, Calif., USA) módszerrel végeztük a gyártó utasításai alapján. A vérmintákban ugyancsak vizsgáltuk a szérum totál IgE szintjét valamint a gyakori étel és aeroallergénekre specifikus IgE szintjét. A totál IgE szérum szintjét szolid fázisú szendvics ELISA (Adaltis Italia S.p.A., Bologna, Italy) módszerrel mértük a gyártó utasításai alapján. Minden mérést duplikátumokban végeztünk. A specifikus IgE szérum szintjét az ALLERgen Systems kit felhasználásával mértük, mely mérés egy immunoenzim capture rendszeren alapul (Adaltis Italia S.p.A.).

Statisztikai analízis

A statisztikai elemzéseket SPSS 15.0 software segítségével végeztük. Nonparametrikus Mann-Whitney és Kruskal-Wallis tesztet alkalmaztunk az AD-s betegek, az egészséges egyének és a psoriasisos kontrollok adatainak összehasonlításához az alcsoport analízis során. A nonparametrikus Spearman rank korrelációs tesztet használtuk szérum totál IgE és szérum IL-16 szintek; a szérum totál IgE és eozinofil szintek, valamint a SCORAD értékek és a szérum IL-16 vagy szérum totál IgE szintek összehasonlításához. A $p < 0,05$ értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. Az adatokat átlag $\pm$ standard deviáció formában ábráztuk.

4.2. Az mDC-k szerepének vizsgálata AD-ben

Betegek

A vizsgálatban 11 AD-s beteg és 8 korban megegyező egészséges önkéntes vett részt (1. táblázat, 42. oldal). Valamennyi AD-s beteg eleget tett a Hanifin és Rajka által felállított diagnosztikai kritériumoknak ⁹⁸. A Helsinkai deklaráció irányelveinek megfelelően a résztvevők beleegyező nyilatkozatot írtak alá, és a vizsgálatot jóváhagyta a Debreceni Egyetem Etikai Bizottsága. A betegség aktivitását a szubjektív SCORAD indexel határoztuk meg, a szenzitivitás mértékét pedig a totál IgE szint alapján állapítottuk meg (1. táblázat). Valamennyi betegnél kizártuk a Hiper IgE szindrómát a HIES klinikai score használatával ⁹⁹. A vizsgálatban részt vevő betegeknek súlyos bőrtünetei voltak, és a vizsgálatot megelőző 4 hétben nem részesültek orális glükokortikoid vagy egyéb szisztémás immunmoduláns kezelésben. Szintén nem használtak antihisztamint és topikális kortikoszteroidot a vérvételt megelőző 5 napban.

Sejt szeparálás és tenyésztés

Az AD-s betegek és kontrollok perifériás véréből Ficoll Paque Plus (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) gradiens centrifugálással nyertük ki a mononukleáris sejteket (PBMC). Ezt követően a myeloid DC-ket CD1c (BDCA-1)+ Dendritic Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) használatával izoláltuk a gyártó leírása alapján. Röviden a CD19+ B sejtek deplécióját követően pozitív szelekcióval különítettük el a CD1c (BDCA-1)+ sejteket. A tiszta mDC sejtpopulációt aztán 10% főtális borjú szérummal (FBS)-sel (Lonza Group Ltd, Basel, Switzerland) és antibiotikummal (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) kiegészített RPMI- 1640 mediumban (Miltenyi Biotec GmbH) tenyésztettük 48 órán át, 30 ng/ml TSLP (eBioscience Inc., San Diego, CA, USA) és 100 ng/ml SEB (Sigma-Aldrich CO, St Louis, MO, USA) jelenlétében (stimulált) vagy ezen ágensek hiányában (nem stimulált).

Sejtfelszíni jelölés és citoplazmatikus citokin festés

Olyan mDC-k által termelt citokin/kemokin kombinációkat vizsgáltunk, melyeknek jól meghatározott szerepe van a Th altípusok különböző irányú differenciációjában. Ilyenek az IL-12, mely Th1 irányú polarizációt indukál; az IL-2, IL-4 és CCL17, melyek Th2 irányba polarizálnak; az IL-6 és TNF α , melyek Th22 polarizációt indukálnak; a TGF β 1, IL-23 és IL-6, melyek Th17 irányban polarizálnak; és a TGF β 1 és IL-10, melyek Treg polarizációt indukálnak. A stimulált és nem stimulált sejteket a citokin festést megelőzően, a tenyésztés utolsó 6 órájában 3 μ g/ml brefeldin A oldattal kezeltük, hogy megakadályozzuk a citokin szekréciót. Az inkubációt követően a sejteket összegyűjtöttük, FACS pufferrel (phosphate-buffered saline oldat 1% bovine serum albuminnal kiegészítve) mostuk és a citokin/kemokin kombinációknak megfelelő számú csövekbe adagoltuk szét. A sejteket először a sejtfelszíni marker specifikus antitestekkel jelöltük: anti-CD1c-allophycocyanin (APC) (L161, BioLegend, San Diego, CA, USA), anti-CD83- fluorescein isothiocyanate (FITC) (HB15e, BD, Franklin Lakes, NJ, USA) és anti-CD86-phycoerythrinnel (PE) (IT2.2, BioLegend). A mintákat 30 percig 4°C-on sötétben inkubáltuk. A jelölt sejteket FACS pufferrel mostuk és 100 μ l of IC Fixation Buffer (eBioscience) oldattal fixáltuk 20 percig sötétben, szobahőmérsékleten (RT). Ezután a sejteket 1x Permeabilisation Buffer (eBioscience) oldattal mostuk, és egy centrifugálást követően a pelletet 100 μ l of 1x Permeabilisation Buffer oldatban vettük fel. Ezt követően a sejteket a következő intracelluláris cytokine-specifikus antitest kombinációkkal festettük: anti-IL-10-PE (JES3-19F1), anti-IL-2-PerCP-Cy5.5 (MQ1-

17H12), anti-IL-4-PerCP-Cy5.5 (MP4-25D2), anti-IL-6-FITC (MAb11), anti-TNF α -PerCP-Cy5.5 (MQ2-13A5) (BioLegend), anti-IL-23p19-PE (23dcdp, eBioscience), anti-IL-12(p40/p70)-FITC (C11.5, BD), anti-TGF β 1- carboxyfluorescein succinimidyl (CFS) (9016) és anti-CCL17/TARC-PE (54015) (R&D Systems, Minneapolis, MN USA). A mintákat 20 percig inkubáltuk sötétben, szobahőmérsékleten és mostuk 1x Permeabilisation Buffer oldattal, majd FACS pufferrel. A centrifugálást követően a pelleteket 30 μ l FACS pufferben vettük fel, és az ibidi μ -Slide VI (ibidi GmbH, Martinstried, Germany) lemez megfelelő csatornájába töltöttük. Tárolás előtt a csatornába további 150 μ l FACS puffert töltöttünk, majd mérés előtt 3 μ g/ml 4',6-diamidino-2-phenylindole-t (DAPI) (Sigma-Aldrich) adtunk a sejtekhez, és 20 percig szobahőn inkubáltunk. Mivel méréseink során nem észleltünk szignifikáns eltérést a festett sejtek fluoreszcencia intenzitásában Fc receptor blokkoló (FcR Blocking Reagent, Miltenyi Biotec GmbH) jelenlétében vagy hiányában, így a festetlen sejteket tekintettük negatív kontrollnak.

Lézer pásztázó cytometria

Ahhoz hogy kis sejtszámú mintán tudjunk multiparametrikus cytometriás adatelemzést végezni, az iCys Research Imaging Cytometert és a hozzá tartozó software-t alkalmaztuk (iNovator Application Development Toolkit and iBrowser Data Integration Software, Compucyte Corporation, Westwood, MA, USA). A különböző fluorofórokkal konjugált antitestek egyenkénti gerjesztéséhez a következő lézereket alkalmaztuk „multi-track” módban: egy 405 nm-es viola dióda lézert a DAPI-hoz, egy 488 nm-es kék argon-ion lézert a FITC, CFS, PE és PerCP-Cy5.5 festékekhez, valamint egy 633 nm-es vörös hélium-neon lézert az APC-hez. A pásztázott terület 6x 12x 1024x 768x 0,06125 μ m² volt mintánként (6x12 darab szken-terület, 1024x768 pixel szken-területenként, 0,25 μ m x 0,245 μ m méret pixelenként), a képeket a cytometer egy Olympus 40x objektíven (0,75 NA) és fényelektromos sokszorozó csöveken (PMT) csöveken keresztül gyűjtötte be. A megfelelő emissziós filterek használatával a PMT-k az adott fluoreszcens csatornából származó adatokat detektálták; pl.: a DAPI-t 463 $\pm$ 20 nm-en, a FITC –et és CFS-t 530 $\pm$ 15 nm-en, a PE-t 580 $\pm$ 15 nm-en, míg a PerCP-Cy5.5-t és APC-t 675 $\pm$ 25 nm-en detektáltuk. A sejteket külön azonosítottuk, függetlenül a citokin termelésre vonatkozó jelektől, amennyiben a sejtek membránjára vonatkozó „scatter” jelek és a nucleust jelölő DAPI intenzitások együttesen meghaladták az előre beállított határértéket. Valamennyi fluorokróm fluoreszcencia intenzitását és az egyéb sejtes tulajdonságokat a meghatározott kontúron belül detektáltuk és képek valamint citometriai adatok formájában prezentáltuk. A következő paramétereket

elemeztük: az „integrált”, mely egy adott esemény pixel intenzitásainak összege, és a jelölt fehérje sejten belüli szintjéről nyújt információt; a „max pixel”, mely az adott esemény legmagasabb pixel értéke, és a jelölt protein sejten belüli legmagasabb koncentrációját mutatja; az „area-t” (terület), mely a kontúrral körülvett terület μm^2 -ben megadva. Ezekből a paraméterekből következtethetünk a citokin termelésre, a sejt és a sejtmag méretére, a sejtciklus adott fázisára (a DNS tartalom alapján) és a DNS kondenzációjára. A DNS index arra utal, hogy hányszor nagyobb a DNS tartalma a sejtnél a G0/G1 fázisú diploid sejt DNS tartalmához képest. A sejtciklus G0/G1 fázisában a sejtek DI értéke 1. A DNS kondenzáció mértékét a DAPI fluoreszcencia intenzitás max pixel értékeiből számoltuk ki¹⁰⁰. A nem releváns események kizárásához egy több lépéses kapuzási metodikát dolgoztunk ki. Először az összetapadt sejteket és a sejttörmeléket zártuk ki a sejt „area” és CD1c pozitivitás alapján, és ezt a szűrést megerősítette a sejtek vizuális azonosítása. Az mDC-k differenciációs állapotára a DNS kondenzáció mértékéből következtettünk. Végül a citokin termelést és a sejtfelszíni markerek elemzését legalább 1000 kapuzott sejt egyenkénti és csoportos elemzésével vizsgáltuk statisztikai szoftverek (GraphPad Prism és Microsoft Excel) használatával. A kompenzációs mátrixot az iCys és a BD ajánlása alapján végeztük el BD CompBeads Set Anti-Mouse Ig, κ polystyren mikrogöngyök segítségével (BD Biosciences).

Statisztikai analízis

Az adataink normál eloszlást mutattak, a szignifikáns eltérések detektálásához Student féle kétmintás t próbát használtunk a GraphPad Prism version 5 (GraphPad, San Diego, CA, USA) szoftver segítségével. Az adatokat átlag $\pm$ standard hiba (SEM) formájában adtuk meg. A p értékeket akkor tekintettük statisztikailag szignifikánsnak, ha azok kevesebb mint 0,05 (*) vagy 0,025-nek (**) adódtak.

4.3. Az iNKT sejtek szerepének vizsgálata AD-ben

Betegek

A vizsgálatba 41 AD-s beteget (16 nő és 25 férfi, átlag életkor $18,59 \pm 8,9$ év) és 16 egészséges, nem atopiás önként jelentkezőt (HC) (11 nő és 5 férfi, átlag életkor $18,9 \pm 5,9$ év) vontunk be. Az AD-s betegek megfeleltek a Hanifin és Rajka által felállított diagnosztikai kritériumoknak⁹⁸. Valamennyi résztvevő aláírta a beleegyező nyilatkozatot a Helsinki deklaráció irányelveinek megfelelően. A betegség súlyosságát a SCORAD indexel határoztuk meg. Az átlag objektív SCORAD $26,7 \pm 13,1$ volt. A szubjektív SCORAD-t is figyelembe

véve, az átlag SCORAD 41.2 ± 14.6 . A szérumban totál IgE medián értéke 584.3 kU/L volt (251.3–1245.0 kU/L között), míg a szérumban laktát dehidrogenáz (LDH) mediánja 475 U/L volt (268.1–732.4 U/L között), referencia érték: 230–460 U/L. A betegek a vizsgálatot megelőző 4 hétben nem kaptak orális glükokortikoszteroid vagy más szisztémás immunmoduláns kezelést, és a vérvételt megelőző 5 napban nem használtak antihisztamint vagy topikális kortikoszteroidot.

Perifériás vér mononukleáris sejt (PBMC) izoláció

A heparinnal alvadésgátolt vérmintákat Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) oldatra rétegeztük és centrifugáltuk $700 \times g$ 30 percig, majd a mononukleáris sejtréteget összegyűjtöttük.

Az iNKT és CD4/CD8 iNKT sejtek számának és gyakoriságának meghatározása áramlási citometriával

Az iNKT sejtek számát áramlási citometriával határoztuk meg 41 AD-s beteg izolált PBMC mintáiból anti-CD3 és 6B11 (a T sejt receptor $V\alpha 24$ láncának CDR3 loopjára specifikus) monoklonális antitestek (mAb) használatával. A jelölést megelőzően a sejteket (1×10^6) $100 \mu\text{g/mL}$ tisztított humán IgG-vel (Sigma) inkubáltuk 20 percig jégen, hogy megakadályozzuk a nem specifikus Fc receptor kötődést. A festő pufferrel (foszfát puffer oldat (PBS), 5% főtális borjú szérum és 1% borjú szérum albumin, Sigma) történő 2 mosást követően, a sejteket anti-CD3-FITC-cel, 6B11-PE (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA), anti-CD4-PE-Texas Red-del (ECD) és anti-CD8-PE-Cyanine7-tel (PC7) (Immunotech, Marseille, France) jelöltük 45 percig jégen. A festést követően a sejteket mostuk és mértük négy színű áramlási citometria módszerrel egy Beckman Coulter FC500 áramlási citométeren CXP szoftverrel. Valamennyi jelöléses kísérletnél használtunk izotípus kontrollt. Az abszolút szám meghatározásához a kétplatformos módszert alkalmaztuk a limfocita számot felhasználva.

Az iNKT sejtek és CD4/CD8 alcsoportjainak funkcionális vizsgálata intracelluláris citokin analízissel

10 AD-s beteg és 10 HC PBMC mintáit elemeztük. Az iNKT sejtek és CD4/CD8 alcsoportjainak intracelluláris citokin szintjeit ötszínű áramlási citometria módszerrel határoztuk meg. A PBMC mintákat 25 ng/mL PMA-val és $1 \mu\text{g/mL}$ ionomycinnel (Io) stimuláltuk $10 \mu\text{g/mL}$ Golgistop Brefeldin A (Sigma) jelenlétében. Ezt követően a sejteket

mostuk és elvégeztük a sejtfelszíni jelölést anti-CD3 (FITC-konjugált az IL-4-APC jelöléshez és APC-konjugált az IFN γ -FITC festéshez, BD Pharmingen), anti-6B11, anti-CD4 és anti-CD8 antitestekkel. A sejtek fixálását követően elvégeztük a permeabilizálást IntraprepTM permeabilizációs reagenssel (Immunotech) a gyártó utasításai szerint, majd az intracelluláris citokinek jelöléséhez a sejteket anti-IFN γ -FITC vagy anti-IL-4-APC mAb-kel (BD Pharmingen) inkubáltuk 30 percig. A mintákat kétszer mostuk festő pufferrel és a sejteket egy Beckman Coulter FC500 típusú áramlási citométerrel mértük és CXP szoftver segítségével elemeztük. Minden mintában legalább 300 000 sejtet számoltunk le. Izotípus kontrollt minden mérésnél alkalmaztunk. A PMA/Io stimulációra adott specifikus sejtválaszt úgy határoztuk meg, hogy a nem stimulált minták pozitív eseményeinek százalékát kivontuk a stimulált minták pozitív eseményeiből. Az eredményeket a citokin pozitív sejtek net százalékában adtuk meg.

Statisztikai analízis

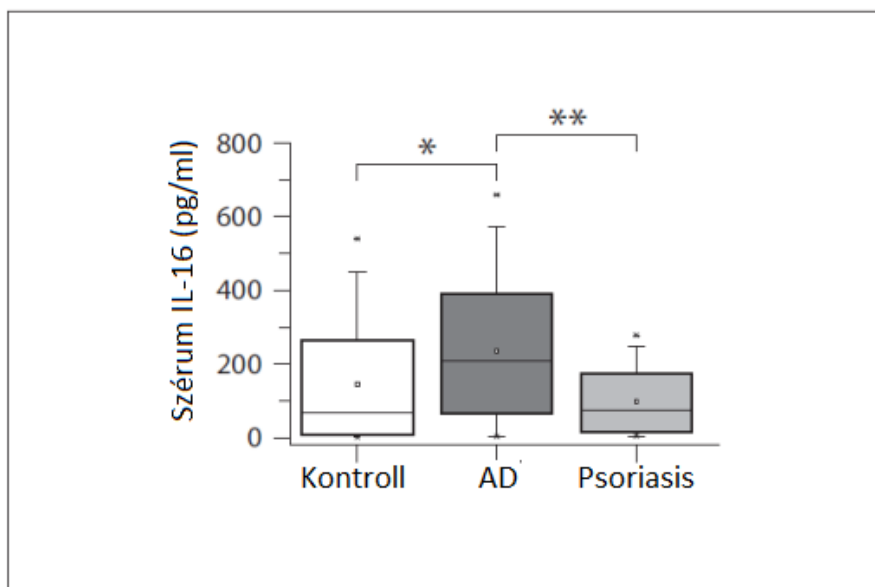
Az eredményeket mediánban, IQR-ben (interkvartilis terjedelem (IQR 25–75 percentilis), és range-ben (5–95 percentilis) adtuk meg. A statisztikai elemzést SigmaPot v. 11.0 szoftver segítségével végeztük (SyStat Software Inc, USA). Nem parametrikus Mann–Whitney rank-sum tesztet vagy Student féle t próbát alkalmaztunk. A korrelációs elemzéseket Spearman's rank tesztel végeztük el. A 0,05-nél alacsonyabb p értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

5. EREDMÉNYEK

5.1. IL-16 szerepének vizsgálata AD-ben

Szérum IL-16 szintek AD-s betegekben, egészséges és psoriasisos kontrollokban

A szérum IL-16 szinteket összehasonlítottuk AD-s és psoriasisos betegekben, valamint egészséges kontrollokból származó mintákban. Az atopiás minták szérum IL-16 szintje szignifikánsan magasabbnak adódott (median 206,8 pg/ml; minimum 1,4 pg/ml; maximum 839,4 pg/ml) az egészséges kontrollokhoz (median 62,8 pg/ml; minimum 1,7 pg/ml; maximum 540,1 pg/ml) és psoriasisos betegekhez (median 69,45 pg/ml; minimum 3,1 pg/ml; maximum 277,9 pg/ml) ($p = 0,013$ and $p = 0,005$) viszonyítva.

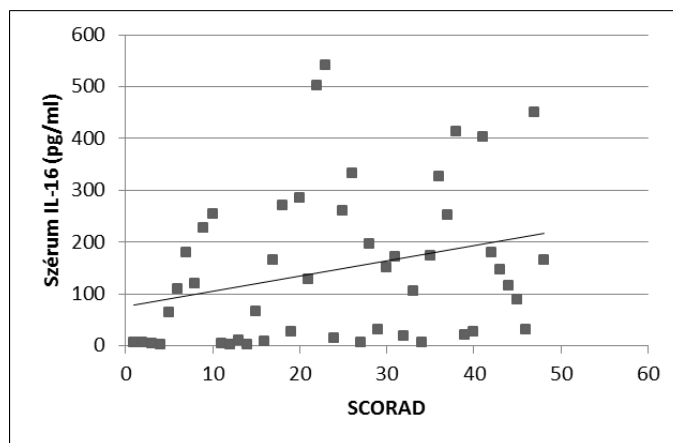


8. ábra: Szérum IL-16 szint AD-s betegekben (n=85) összehasonlítva az egészséges kontroll (n=36) és psoriasisos mintákkal (n=20). A szignifikáns különbségeket csillag jelöli (* $<0,05$; ** $<0,025$).

Összefüggés a szérum IL-16 és az AD súlyosságát jelző paraméterek között (SCORAD, a szérum totál IgE és az eozinofil sejtszám)

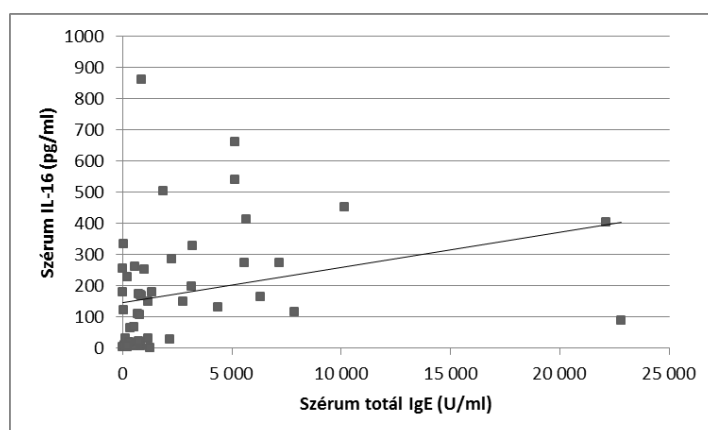
Az AD-s betegek tüneteinek súlyosságát jól jelző klinikai index a SCORAD index. Laboratóriumi paraméterek közül, az extrinzik AD-s betegeknel rendszerint a súlyossággal jól korrelál a szérum totál IgE és eozinofil sejtszámának értéke.

A teljes vizsgált beteg populáció (n=85) bevonásával vizsgáltuk a szérumszintű IL-16 kapcsolatát a betegség súlyosságát jelző paraméterekkel (SCORAD index, szérumszintű totál IgE, abszolút eozinofil sejtszám). A SCORAD index esetében nem volt összefüggés a szérumszintű IL-16 és a SCORAD között, bár az r érték 0,27-nek adódott, ami nagyon közel van a szignifikancia érték határához.



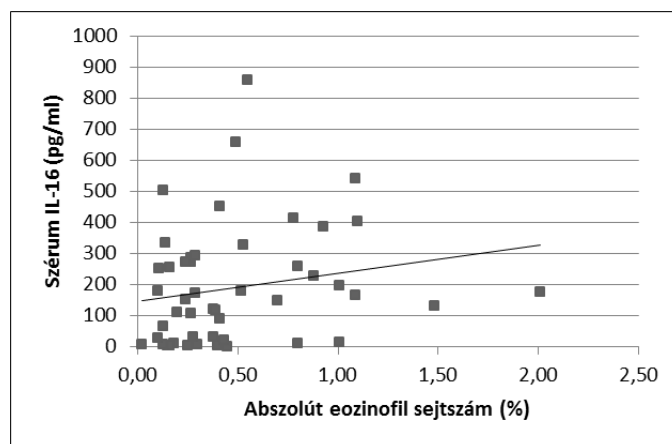
9. ábra: Összefüggés a szérumszintű IL-16 és a SCORAD index között AD-ben. A vizsgált betegek száma $n=85$, a nonparametrikus Spearman rank korrelációs tesztet használtuk a korreláció mértékének megállapításához, r értéke 0,27.

Ugyanakkor szignifikáns összefüggést találtunk a szérumszintű IL-16 és a szérumszintű totál IgE szintek között ($r=0,425$; $p=0,002$).



10. ábra: Összefüggés a szérumszintű IL-16 és a szérumszintű totál IgE között AD-ben.

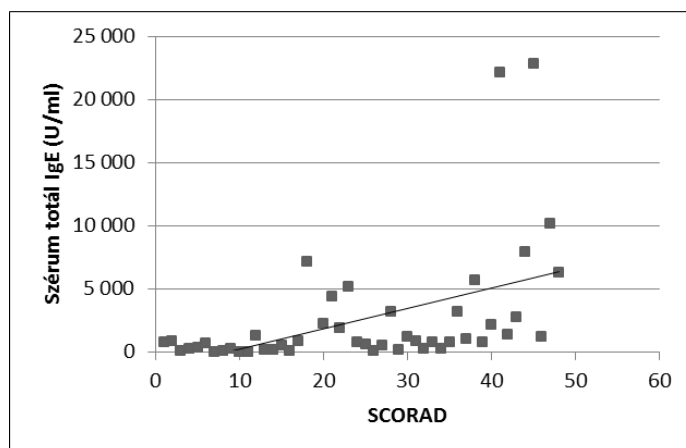
Nem volt kimutatható összefüggés a szérumban IL-16 és az abszolút eozinofil sejtszám között ($r=0,218$, $p=0,150$).



11. ábra: Összefüggés a szérumban IL-16 és az abszolút eozinofil sejtszám között.

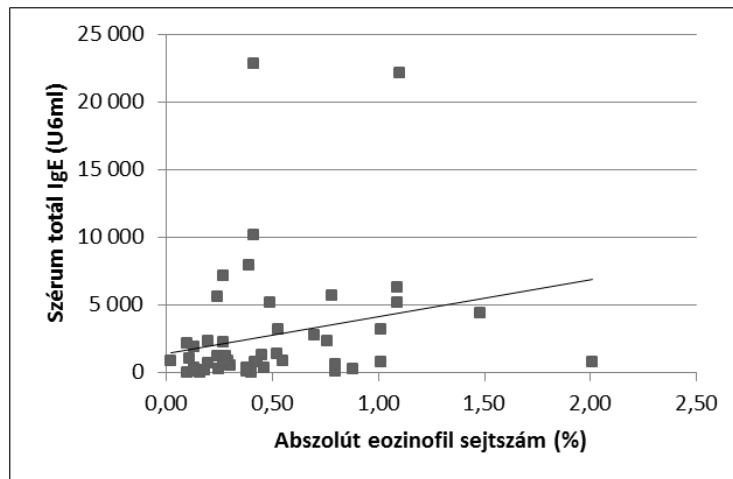
Az eredmények azt mutatják, hogy az IL-16 a súlyossági paraméterekkel csak kisfokú összefüggést mutat.

Ezzel szemben pozitív korrelációt találtunk a szérumban totál IgE és a SCORAD érték ($r=0,444$; $p=0,091$) között.



12. ábra: Összefüggés a szérumban totál IgE és a SCORAD index között.

Szignifikáns összefüggést találtunk a szérumban totál IgE és az eozinofil sejtek száma között ($r=0,364$; $p=0,007$).

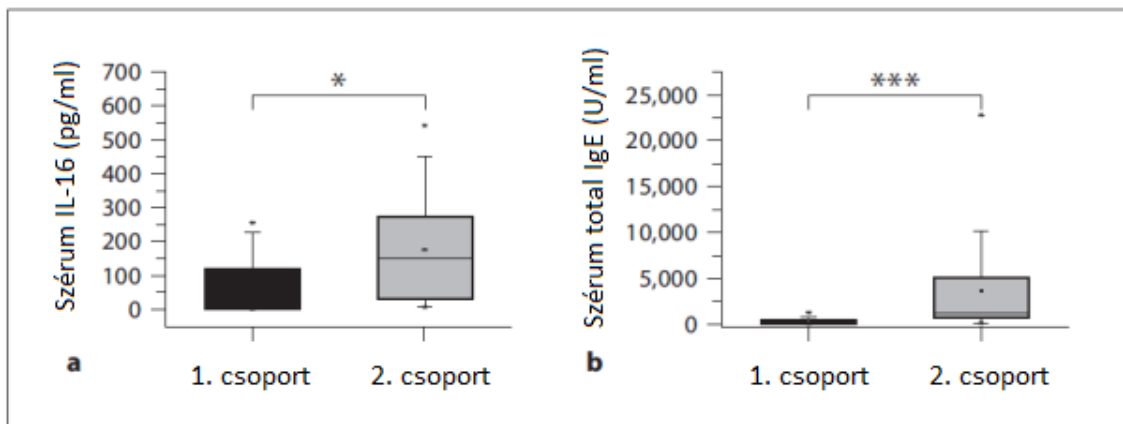


13. ábra: Összefüggés a szérum totál IgE és az abszolút eozinofil sejtszám között.

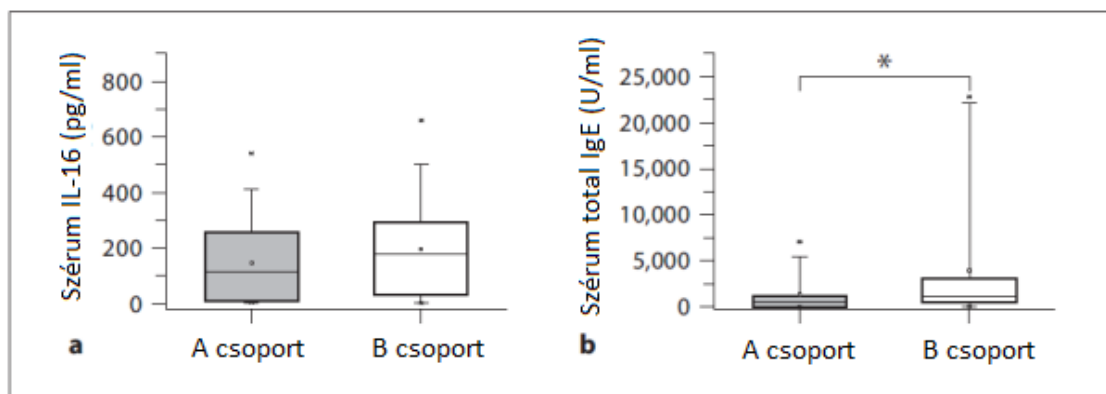
Az eredményeink azt mutatják, hogy a szérum totál IgE jobban jelzi a betegség súlyosságát, mint az IL-16.

Összefüggés az IL-16 és a betegek szenzitizáltsága között

A betegek allergiás szenzitizáltságát 2 módszer szerint vizsgáltuk, részben Prick bőrtesztel, részben IgE szérum szint vizsgálattal. A specifikus IgE (1. és 2. csoport) és a Prick teszt (A és B csoport) eredményei alapján az AD-s betegeket két csoportba osztottuk, így szenzitizált (2. és B csoport) és nem szenzitizált (1. és A csoport) alcsoportokat képeztünk. A szérum IL-16 és a szérum totál IgE szintjét tovább elemeztük az alcsoportokon belül. A szérum IL-16 szintje szignifikánsan emelkedett volt a 2. csoportban az 1. csoporthoz viszonyítva (1. csoport: median 10,5 pg/ml; minimum 1,4 pg/ml; maximum 255,0 pg/ml; 2. csoport: median 149,9 pg/ml; minimum 5,4 pg/ml; maximum 540,4 pg/ml; $p = 0,038$). Nem volt azonban szignifikáns eltérés az A és B csoportok között (A csoport: median 112,25 pg/ml; minimum 2,6 pg/ml; maximum 540,4 pg/ml; B csoport: median 172,25 pg/ml; minimum 1,4 pg/ml; maximum 659,3 pg/ml). A szérum totál IgE szint mindkét szenzitizált csoportban szignifikánsan emelkedett volt a nem szenzitizált csoportokhoz képest [1. csoport: median 185,0 U/ml; minimum 1,3 U/ml; maximum 1279,0 U/ml; 2. csoport: median 1160,0 U/ml; minimum 50,8 U/ml; maximum 22,791 U/ml; $p = 0,0001$; A csoport: median 606,2 U/ml; minimum 1,3 U/ml maximum 7170 U/ml; B csoport: median 1158,5 U/ml; minimum 50,8 U/ml; maximum 22,791 U/ml; $p = 0,021$].



14. ábra: Szérum IL-16 és szérum totál IgE szintek a specifikus IgE által meghatározott szenzitizált (2. csoport, n=35) alcsoportban a nem szenzitizált (1. csoport, n=13) alcsoportéhoz képest. A szignifikáns különbségeket csillag jelöli (*<0,05; ***<0,001).



15. ábra: Szérum IL-16 és szérum totál IgE szintek a Prick teszt negatív (B alcsoport, n=24) és Prick teszt pozitív (A alcsoport, n=24) alcsoportokban. A szignifikáns különbséget csillag jelöli (* <0,05).

Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a szérum IL-16 bizonyos körülmények között ugyan mutat összefüggést a beteg súlyosságával és a szenzitizáltság mértékével, mégsem tűnik olyan megbízható markernek a betegség állapotának előrejelzésében, mint a szérum totál IgE szintje.

5.2. Az mDC-k szerepének vizsgálata AD-ben

1. táblázat: Az AD-s betegek klinikai adatai

	Nem atopiás önként jelentkező (HC) (n=8)	Atopic dermatitis betegek (AD) (n=11)	P érték
Kor (év)	24±3,71	19,8 ±5,44	NS
Nem			
Nő	5 (62,5%)	5 (45,4%)	-
Férfi	3 (37,5%)	6 (54,6%)	-
A betegség kialakulása			
2 éves kor előtt	-	4 (36,4%)	-
2 éves kor után	-	7 (63,6%)	-
SCORAD	-	52±9	-
Serum totál IgE (KU/L) (Ref.: >87 KU/L – >9 év)	-	2002,2±1984,5	-
LDH (U/L) (Ref.: 135-220 U/L)	<220 U/L	480,3±138,1	-
Eozinofil szám (G/L) (Ref.: 0,01-0,6 G/L)	<0,6 G/L	1,16±1,4	-
Asthma, allergiás rhinitis	-	7 (63.6%)	-

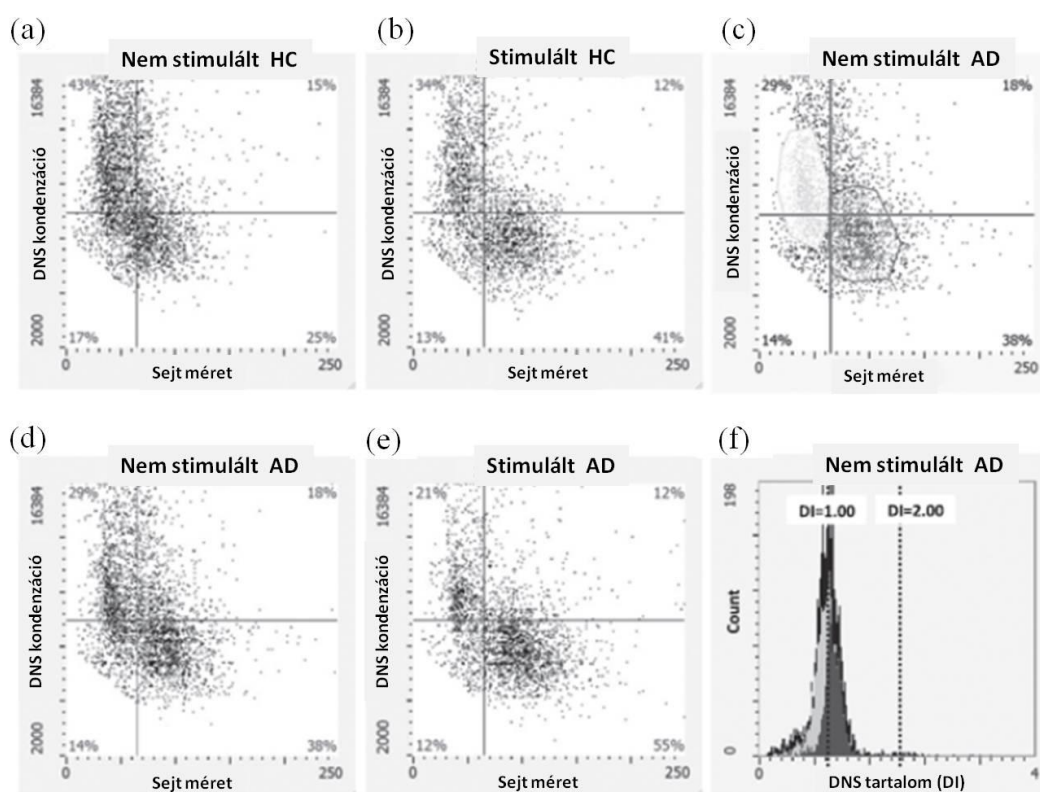
Az AD-s betegek mDC-inek morfológiai és fenotípusos jellemzői

Az AD-s betegek perifériás véréből izolált mDC-ken a sejtfelszíni és citoplazmatikus citokin festéssel párhuzamosan sejtmag morfológiai vizsgálatot is végeztünk DAPI festéssel. Mind stimuláció nélkül, mind stimuláció után az atopiás betegeknél jellemzően nagyobb mennyiségben figyeltünk meg aktívabb, nagyobb méretű, dekonzenzált sejtmaggal rendelkező sejteket, mint az egészséges egyéneknél. Ezeket a sejteket az alacsony DAPI intenzitás alapján azonosítottuk (16. ábra, a és d plot). Alapvetően a megfigyelt citokin profilok is csak ezekhez a dekonzenzált sejtmaggal rendelkező sejtekhez voltak kapcsolhatók (16/c ábra, sötétszürke populáció). Stimuláció hiányában az aktivációs markerek esetében nem volt kimutatható különbség az AD-s betegek és a kontroll egyének között. A stimulációt követően az AD-s betegek sejtjeinél szignifikánsan emelkedett a CD83 és CD86 érési és kostimulációs markerek expressziója, és további kromatin dekonzenzációt detektáltunk a nem stimulált sejtekhez képest, míg az egészséges kontrollok között nem volt szignifikáns

emelkedés (2. táblázat, 16/b és e ábra). Annak ellenére, hogy ezek a sejtmagi eltérések nagy valószínűséggel megnövekedett transzkripciós aktivitásra utalnak, az atópiás donorokból és a kontrollokból származó valamennyi mDC a sejtciklus G0/G1 fázisában maradt. (16/f ábra).

2. táblázat: Érés és aktivációs markerek

	HC (n=8)	HC (n=8)	P	AD (n=11)	AD (n=11)	P érték
	Nem stimulált	Stimulált		Nem stimulált	Stimulált	P
CD86 (% pozitív sejt)	63,5±4,7	72,3±3,5	NS	36,5±8,3*	70,5±3,0*	*0,0153
CD83 (%)	42,5±3,9	48,3±11,4	NS	46,5±9,8**	75,8±2,6**	**0,0286



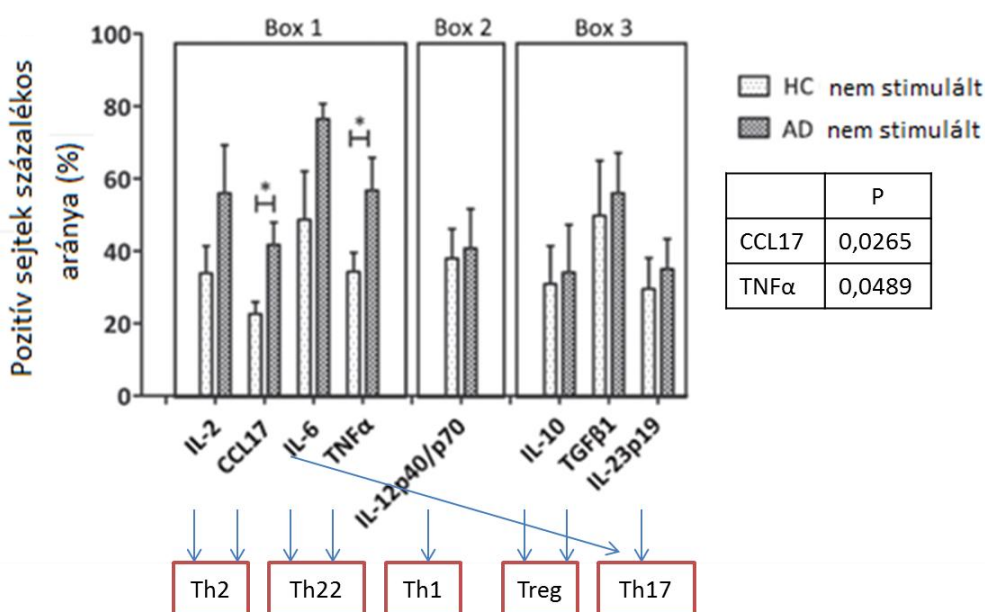
16. ábra: A sejtmag morfológia elemzése a DAPI fluoreszcencia intenzitása alapján stimulált és nem stimulált AD-s mintákban (b, e) és kontrollokból (a, d).

(c, f) A DNS tartalom meghatározása a sejtmag fluoreszcencia integrálja alapján (DNS index, DI). Az egyes sejtek DNS tartalmát a G0/G1 fázisban lévő sejtek DNS tartalmával normalizáltuk. A DNS kondenzáció mértékét egy elfogadott lézer pásztázó citometria (LSC) módszerrel segítségével ítéltük meg, a magi DAPI fluoreszcencia max pixel intenzitása alapján. Az mDC aktiváció nem igényelt sejtosztódást: a nem stimulált, kis sejtek DI-je (világosszürke, g1 kapu, a felső baloldali c panelen) 1-nek adódott (f panelen jelöltük); a nem stimulált, nagy mDC-k DI-je (sötét szürke, g2 kapu, jobb alsó rész a c panelen) 1,21 volt (f panel). Egyetlen mDC sem volt G2/M fázisban (DI = 2). A kontrollokból

(n=8) és az AD-s betegek (n=11) adatait átlag $\pm$ SEM értékben adtuk meg. Az egy és két-paraméteres hisztogram plotok egy kiválasztott beteg és egy kontroll egyén adatait mutatják.

Az AD-s betegek és kontrollok nem stimulált mDC sejtjeinek citokin profilja

A DC-k által termelt citokineket ismert T sejt polarizáló tulajdonságaik alapján csoportosítottuk. Box 1: IL-2, CCL7, IL-6 és TNF α , melyek Th2 és Th22 polarizációt indukálnak; Box 2: IL-12p40/p70, mely Th1 irányba polarizál; és Box 3: IL-10, TGF β 1 és IL-23p19, melyek Th17 és Treg irányt indukálnak. Stimuláció hiányában az AD-s betegek CD1c (BDCA-1)⁺ mDC-i képesek voltak valamennyi általunk vizsgált T sejt polarizáló citokin termelésére, kivéve az IL-4-et. Az egészséges kontrollokkal összehasonlítva az atopiás mDC-k esetén nagyobb mennyiségű IL-2, CCL17, IL-6 és TNF α expressziót detektáltunk (17. ábra, a, box1). A CCL17 és a TNF α esetén a különbség statisztikailag szignifikánsnak adódott. Az IL-12p40/p70 (17. ábra Box2), IL-10, TGF β 1 és IL-23p19 (17. ábra a/Box3) esetén nem volt különbség a két vizsgált stimulálatlan csoport között. Az eredmények alapján elmondható, hogy a 3 boxos felosztás az expressziós mintázat szempontjából is megfelelő volt.

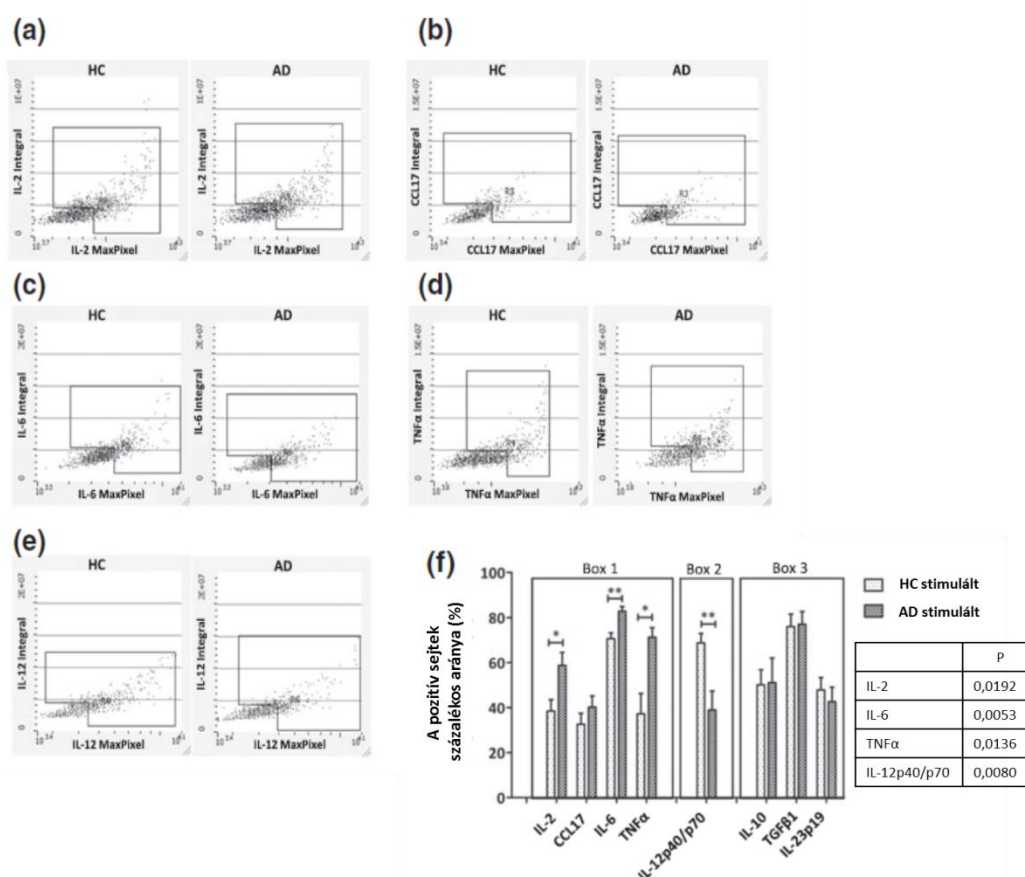


17. ábra: AD-s betegekből (n=11) és egészséges kontrollokból (n=8) származó stimulálatlan mDC-k intracelluláris citokin termelése. Az eltérések elemzéséhez Student féle kétmintás t próbát használtunk. Az adatokat átlag $\pm$ SEM formájában adtuk meg. A szignifikáns különbséget csillag jelöli (* <0,05).

Az atopiás bőrhöz hasonló körülmények hatása az mDC-k T sejt polarizáló citokin termelésére

Ebben a kísérletben az volt a célunk, hogy megvizsgáljuk, vajon az „éretlen” mDC-kre miként hat az, ha egy, az atopiás bőrre jellemző mikrokörnyezetbe (SEB- és TSLP együttes jelenléte) helyezzük őket. A stimulációt követően szintén 3 citokin termelési mintázatot figyeltünk meg az AD-s betegek sejtjeinél a kontrollokhöz viszonyítva. Elsőként azt tapasztaltuk, hogy a korábban emelkedettnek talált Th2/Th22 polarizáló citokinek szintjei (IL-2, CCL17, IL-6, TNF- α) tovább emelkedtek, és a különbségek statisztikailag szignifikánsnak adódtak, kivéve a CCL17 esetén, mikor az AD-s betegek és a kontrollok adatait összevetettük (18. ábra a-d, f/Box1). Másodszor, az AD-s betegek mDC-inek IL-12p40/p70 termelő képessége, mely Th1 irányú polarizációra utal, szignifikánsan csökkent az egészséges kontroll sejtekéhez képest (18. ábra e, f/Box2). Harmadszor, az IL-10, TGF β 1 és IL-23p19 expressziós szintjeiben nem tapasztaltunk különbséget a beteg és egészséges sejtek között (18. ábra f/Box3).

IL-4 expressziót nem detektáltunk egyik vizsgált csoportban, egyik tenyésztési körülmény esetén sem.

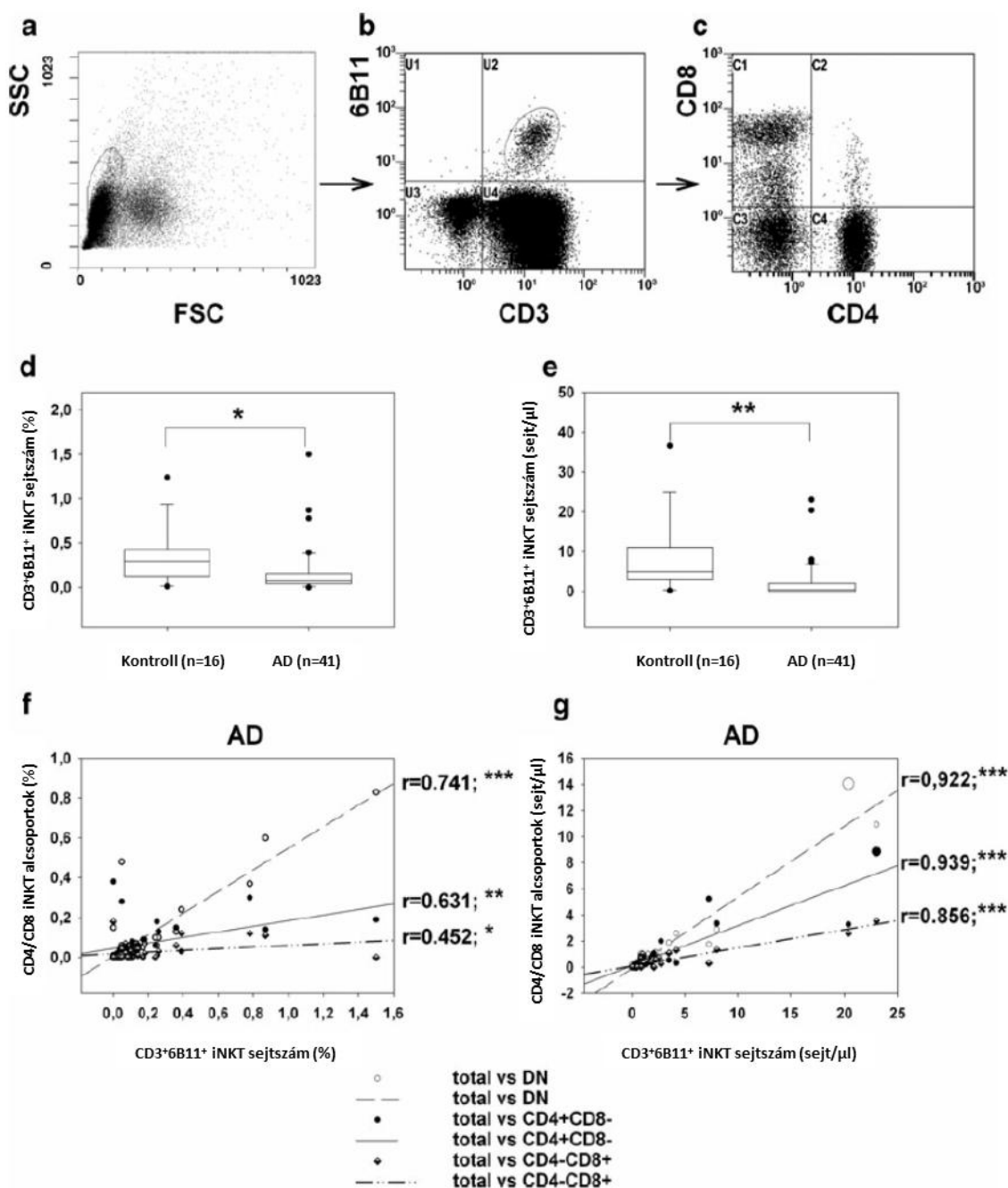


18. ábra: (a–e) SEB- és TSLP-stimulált mDC-k intracelluláris citokin termelése AD-s betegekben és kontrollokban. A vizsgált citokinek/kemokinek fluoreszcencia intenzitást ábrázoló scattergram-jei stimulált AD-s mintákban a kontroll sejtek intenzitásához viszonyítva. A sejt fehérjetartalmát (y tengely) az integrál intenzitás alapján határoztuk meg, mely egy adott sejt esemény pixel intenzitásainak összege. A jelölt protein sejten belüli legmagasabb koncentrációját az x tengelyen feltüntetett max pixel mutatja, mely az adott esemény legmagasabb pixel értéke. (f) Oszlopdiaagram az intracelluláris citokinek/kemokinek változásairól SEB és TSLP stimulációt követően AD-s mintákban és a kontrollokban. A kétparaméteres plotok egy kiválasztott AD-s mintát és egy kontroll mintát reprezentálnak. Az eltérések detektálásához Student félé kétmintás t próbát használtunk. Az adatokat átlag $\pm$ SEM formájában adtuk meg. A p értékeket akkor tekintettük statisztikailag szignifikánsnak, ha azok kevesebb, mint 0,05 (*) vagy 0,025-nek (**) adódtak.

5.3. Az iNKT sejtek szerepének vizsgálata AD-ben

A totál iNKT sejtek százalékos aránya és száma AD-s betegekben

Az atopiás betegek és egészséges kontrollok perifériás véréből nyert PBMC mintákban a CD3+6B11+ sejteket azonosítottuk a keringő iNKT sejtekként. Az áramlási citometriás kapuzási stratégiát a 19. ábrán az a-c panelek mutatják. A CD3+6B11+ iNKT sejtek száma szignifikáns csökkenést ($p=0,003$) mutatott az AD-s betegekben (0,07%; IQR 0,040–0,155%) a kontrollokhoz képest (0,295%; IQR 0,125–0,430%) (19/d ábra). Emellett a keringő iNKT sejtek számának medián értéke szintén szignifikánsan csökkent ($p<0,001$) az atopiás betegekben (0,394 sejt per mikroliter; IQR 0–2,029 sejt per mikroliter) a kontrollokhoz képest (4,921 sejt per mikroliter; IQR 2,856–11,076 sejt per mikroliter) (19/e ábra). Mivel a T sejtek számának eltérései érinthetik az iNKT sejtek számát is, meghatároztuk a CD3+ T sejtek, CD4+, CD8+ T sejt csoportok százalékos arányát valamint a CD4/CD8 arányt mind az AD-s betegek, mind a kontrollok PBMC mintáiban. Ebben az összehasonlításban az AD-s minták nem különböztek szignifikánsan a kontroll mintáktól (nincs ábrázolva). Nem találtunk összefüggést az iNKT sejtek százalékos aránya és száma valamint a betegek kora, neme, a betegség súlyossága (SCORAD index alapján) vagy a totál IgE és LDH szintek között.



19. ábra: iNKT sejtek és alcsoportok áramlási citometrás analízise AD-s betegekben és egészséges kontrollokban. A PBMC mintákat festettük anti-CD3-FITC és 6B11-PE mAb-kel. (a) A kikapuzott limfociták a forward scatter (FSC) – sidescatter (SSC) dot ploton. (b) A limfocita populáción belül a CD3⁺6B11⁺ dupla-pozitív sejtek az iNKT sejtek. (c) Az iNKT sejtek fenotípus elemzését CD4/CD8 festéssel, anti-CD4-ECD és anti-CD8-PC7 mAb-k használatával végeztük el. (d) Az iNKT sejtek százalékos aránya ($p=0,003$) és (e) abszolút száma ($p<0,001$) szignifikánsan csökkent AD-s betegekben ($n=41$) a kontrollokhoz képest ($n=16$). Az eredményeket medián, IQR, és range értékekkel ábrázoltuk (5th és 95th percentilis). A szignifikancia értékeket Mann–Whitney U teszt segítségével számoltuk ki. (f és g) A CD4/CD8 iNKT alcsoportok (y-tengely) korrelációt mutatnak a totál iNKT sejtek (x-tengely) csökkenésével mind a százalékos arányra (f), mind az abszolút számra nézve (g). A

legerősebb korreláció a totál iNKT sejtek és a DN (dupla negatív) alcsoport között volt. A Spearman korreláció szignifikáns, ha $p < 0,05$, kivéve DP (dupla pozitív) iNKT sejtek százalékos arányát. $*p < 0,05$; $**p < 0,001$; $***p < 0,0001$. A korrelációs koefficiens (r) értékei az iNKT alcsoportok százalékos arányát/abszolút számát illetően $r_{DN}=0,741/0,929$; $r_{CD4+CD8-}=0,631/0,922$; $r_{CD4-CD8+}=0,452/0,856$; $r_{DP}=n.s./0,392$.

Az iNKT sejtek alcsoport analízise AD-s betegekben

A CD3/6B11 dupla-pozitív totál iNKT sejtek között 4 iNKT alcsoportot azonosítottunk a CD4 és CD8 expresszió alapján (19/c ábra). Eredményeink azt mutatták, hogy a CD4-alcsoport (DN és CD4–CD8+) százalékos aránya szignifikánsan csökkent AD-ben ($p=0,016$ a DN; $p=0,03$ a CD4–CD8+ csoportban) a kontrollokhoz képest. Az abszolút szám esetében az eredmények még kifejezettebb csökkenést mutattak az atopiás betegek CD4/CD8 iNKT alcsoportjaiban a kontrollokhoz viszonyítva ($p < 0,001$ minden esetben). Az eredmények részleteit az 5. táblázatban foglaltuk össze. Pozitív korrelációt találtunk a totál iNKT sejtek gyakorisága és az alcsoportok gyakorisága között AD-ben ($p < 0,01$ minden esetben) kivéve a DP iNKT sejteket (19/f ábra), és ezek az összefüggések még kifejezettebbek voltak ($p < 0,001$), ha az abszolút számot vizsgáltuk (19/g ábra). Az iNKT alcsoportok százalékos arányainak korrelációs koefficiensei: $r_{DN}=0,741$; $r_{CD4+CD8-}=0,631$; $r_{CD4-CD8+}=0,452$; and $r_{DP}=n.s.$, az abszolút számok r értékei: $r_{DN}=0,929$; $r_{CD4+CD8-}=0,922$; $r_{CD4-CD8+}=0,856$; and $r_{DP}=0,392$. Mindkét vizsgált paraméter tekintetében a legerősebb összefüggést a totál iNKT és a DN iNKT alcsoport értékeinél tapasztaltuk.

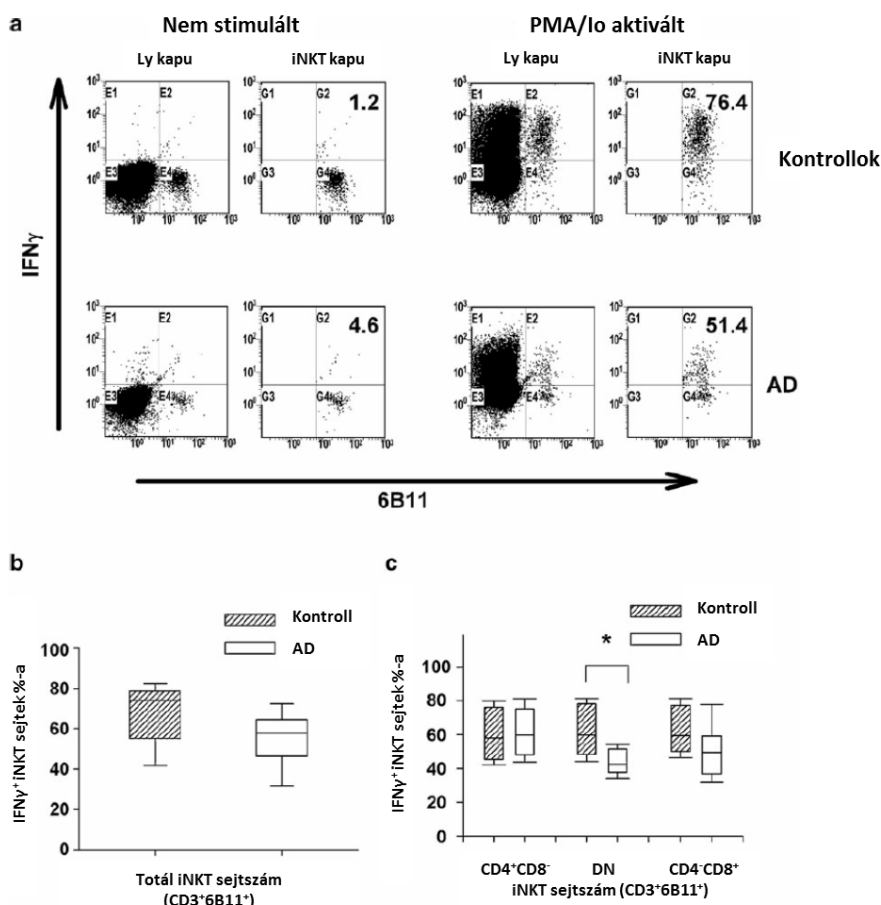
3. táblázat: iNKT sejtek és iNKT alcsoportok AD-ben.

iNKT alcsoport	Gyakoriság (%)					Abszolút sejtszám (sejt/ μ l)				
	AD		Kontroll		p érték	AD		Kontroll		p érték
	Medián	IQR	Medián	IQR		Medián	IQR	Medián	IQR	
Totál	0,070	0,040-0,155	0,295	0,125-0,430	0,003	0,394	0-2,029	4,921	2,156-11,076	<0,001
CD4+CD8-	0,030	0,020-0,085	0,090	0,020-0,150	0,090	0,181	0-0,722	2,120	0,875-3,508	<0,001
DN	0,030	0,010-0,070	0,090	0,060-0,190	0,016	0,163	0-0,943	1,533	0,892-5,111	<0,010
CD4-CD8+	0,010	0-0,035	0,070	0,020-0,100	0,030	0	0-0,495	1,330	0,632-1,882	<0,001
DP	0	0-0,015	0,010	0,008-0,020	0,052	0	0-0	0,325	0-0,444	<0,001

Az iNKT sejtek százalékos arányának és abszolút számának medián és IQR értékei. Az AD-s betegek szám $n=41$, kontrollok száma $n=16$. Nem parametrikus Mann–Whitney rank-sum tesztet vagy Student féle t próbát alkalmaztunk a különbségek elemzéséhez. A 0,05-nél alacsonyabb p értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

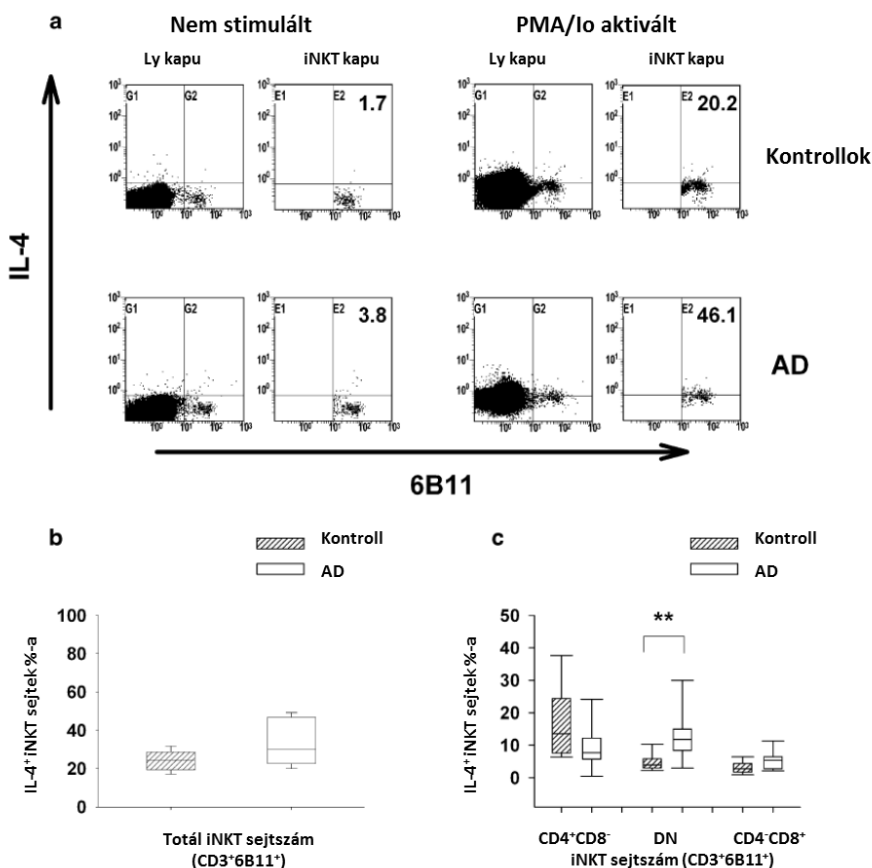
Az iNKT sejtek funkcionális vizsgálata AD-ben

Az iNKT sejtek AD-ben mutatott effektor funkciójának vizsgálatához meghatároztuk a totál iNKT sejtek és az alcsoportok intracelluláris IFN γ és IL-4 tartalmát. Amikor összehasonlítottuk 10 AD-s beteg és 10 kontroll adatait, azt találtuk, hogy az intracelluláris IFN γ expresszió csökkent (20/a, b ábra), míg az IL-4 expresszió emelkedett az AD-s betegek totál iNKT sejtjeiben a kontrollokhoz képest (21/a, b. ábra), bár ezek az eltérések nem érték el a statisztikai szignifikancia határát. Ezután meghatároztuk az iNKT sejtek alcsoportjainak funkcionális tulajdonságait. A DN iNKT alcsoport esetén szignifikánsan alacsonyabb IFN γ szinteket ($p < 0,05$; 20/c ábra) mértünk és szignifikánsan magasabb intracelluláris IL-4 értékeket detektáltunk ($p < 0,01$; 21/c ábra). A másik 3 alcsoportot illetően nem találtunk szignifikáns eltéréseket a mért citokinek esetében AD-s betegek és kontrollok között.



20. ábra: Az iNKT sejtek intracelluláris IFN γ expressziója. (a) A limfocita kapukat és az iNKT kapukat ábrázoló scatter plotok AD-s betegek és kontrollok nem stimulált és PMA/Io aktivált mintáin. (b) Az intracelluláris IFN γ -pozitív sejtek százalékos aránya csökkent a totál CD3⁺6B11⁺ iNKT sejtcsoportban AD-ben a kontrollokhoz képest. (c) Az intracelluláris IFN γ százalékos aránya a CD4⁺CD8⁻, DN (CD4⁻CD8⁻), és a CD4⁻CD8⁺ iNKT alcsoportokban AD betegekben a kontrollokhoz

viszonyítva. A DN iNKT csoportban az eltérés szignifikáns volt ($p < 0.05$; Mann–Whitney U test). Az IFN γ -pozitív sejtek net százalékos arányát úgy határoztuk meg, hogy a nem stimulált minták pozitív eseményeit kivontuk az aktivált minták pozitív eseményeiből.



21. ábra: Az intracelluláris IL-4 expresszió az iNKT sejtekben. (a) A limfocita kapukat és az iNKT kapukat ábrázoló scatter plotok AD-s betegek és kontrollok nem stimulált és PMA/Io aktivált mintáin. (b) Az intracelluláris IL-4 pozitív sejtek százalékos aránya emelkedett a totál CD3⁺6B11⁺ iNKT sejtcsoportban AD-ben a kontrollokhöz képest. (c) Az intracelluláris IL-4 százalékos aránya a CD4⁺CD8⁻, DN (CD4⁻CD8⁻), és a CD4⁻CD8⁺iNKT alcsoportokban AD betegekben a kontrollokhöz viszonyítva. A DN iNKT csoportban az eltérés szignifikáns volt ($p < 0.05$; Mann–Whitney U test). Az IL-4 pozitív sejtek net százalékos arányát úgy határoztuk meg, hogy a nem stimulált minták pozitív eseményeit kivontuk az aktivált minták pozitív eseményeiből.

6. MEGBESZÉLÉS

Az AD az egyik leggyakoribb krónikus gyulladásos bőrbetegség, melynek komplex patogenezisében a károsodott bőr barrier és veleszületett immunválasz mellett a túlaktivált szerzett immunválasznak van kritikus szerepe. A betegség kialakulása és fejlődése során a fent felsorolt rendszerek egymást is jelentősen befolyásolják, egy ördögi körként súlyosbítva az eltérések, károsodások és funkcionális zavarok sorát, mely egyre súlyosabb klinikailag is látható gyulladást eredményez. Jelen kutatásaink a három rendszerből elsősorban a veleszületett immunválasz eltéréseinek tanulmányozására irányultak. Ennek is három fő elemét szerettem volna elemezni. Elsőként az IL-16 szerepét tanulmányoztuk, melyet számos innate immunválaszi sejt termel, majd a DC-k és az iNKT sejtek számbeli és funkcionális eltéréseit vizsgáltuk AD-s betegek perifériás vérében.

IL-16 szintézisre számos innate sejttípus képes, mint az eozinofilek, hízósejtek, a légutakban található epitél sejtek, dendritikus sejtek és a keratinociták, de T és B limfociták is termelhetik ¹⁰¹⁻¹⁰⁷. Egyik legfőbb hatása, hogy kemoattraktánsként hat valamennyi CD4-et expresszáló perifériás T limfocitára, de monocitákra és dendritikus sejtekre is ^{57,108,109}. Emellett az IL-16 pro-inflammatórikus citokintermelést indukál ¹⁰¹. Több adat is utal rá, hogy AD-ben patofiziológiai szerepe lehet a bőrgyulladás kialakulásában, hiszen AD-ben az allergén aktivált Langerhans sejtek IL-16-ot termelnek, melynek szerepe lehet a DC-k, T sejtek és eozinofil sejtek toborzásában és aktiválásában, így hozva létre egy lehetséges kapcsolatot az IgE-mediált, I-es típusú, azonnali immunválasz és a T sejt, késői típusú immunválasz között, mely immunválaszok AD-ben kiemelt szerepet játszanak ¹⁰⁹. AD-ben kimutatták, azt is, hogy az egyik mechanizmus, mely a betegség progressziójához vezet, az az eozinofil sejtek allergén indukált IL-16 termelése, mely további IL-4 termelő eozinofil sejtek megjelenéséhez vezet ^{107,110,111}. Mind akut, mind krónikus bőr léziókban kimutatták, hogy az epidermális keratinociták és a dermális T sejtek IL-16 mRNS expressziója megemelkedett ¹⁰⁷. Az IL-16 mRNS⁺ sejtek száma szignifikánsan magasabbnak mutatkozott az akut léziókban a krónikus léziókhoz viszonyítva, és korrelált a CD4⁺ sejtek számával mind az epidermiszben, mind a dermiszben, alátámasztva, hogy az IL-16-nak mind az atopiás bőrgyulladás kialakításában, mind annak fenntartásában kiemelkedő szerepe van ¹⁰⁸. Az IL-16 és az AD súlyossága közötti kapcsolatot számos klinikai vizsgálat bizonyítja ^{108,112}, ezért a szérumban IL-16 szint megfelelő markernek tűnhet a betegség aktivitásának mérésére. Ugyanakkor a szérumban IL-16 szint és az allergiás szenzitizáció mértéke közötti kapcsolatot AD-ben korábban még nem írták le.

Vizsgálatainkban az volt a cél, hogy megvizsgáljuk ennek az AD-ben kevésbé ismert, kevésbé alkalmazott biomarkernek az értékét és gyakorlati hasznát. Célunk volt meghatározni a szérumban IL-16 szintjét AD-s betegek és egészséges kontrollok perifériás vérében, és elemezni a lehetséges korrelációt a szérumban IL-16 és számos, a betegség súlyosságát és az allergiás szenzitizáció mértékét jelző marker között. Tudnunk kell, hogy az AD diagnosztikája mai napig csak klinikai és anamnestikus adatokon alapul, nincs olyan megbízható laboratóriumi, szövettani vagy képalkotó diagnosztikai marker, melyet a betegeknél hatékonyan lehetne alkalmazni.

Tanulmányunkban első lépésben kimutattuk, hogy AD-s betegekben a szérumban IL-16 szint szignifikánsan magasabbnak adódott az egészséges kontrollokhoz viszonyítva. Sőt szignifikáns különbség volt az AD-s betegek és a psoriasisos betegek között is. Eredményeink összecsengenek Masuda és munkacsoportja¹¹⁰ eredményeivel, mivel ők is azt találták, hogy az AD-s betegek szérumban IL-16 szintje szignifikánsan magasabb a psoriasisban mért értékekhez képest. Ők arra a következtetésre jutottak, hogy a kifejezettebb monocita/makrofág infiltráció az atopiás betegek dermiszében az egyik lehetséges oka a magasabb szérumban IL-16 szintnek. Ezen túl a Th1/Th2 egyensúly közötti különbség a két betegségben szintén hozzájárulhat az eltérő szérumban IL-16 szintekhez¹¹⁰.

AD-ben széles körben vizsgálták a magas szérumban IL-16 szint és a különböző klinikai és laboratóriumi paraméterek közötti összefüggéseket. Bár az IL-16 általában jól korrelál a betegség súlyosságát jelző SCORAD indexszel^{108,110,112}, az egyéb laboratóriumi paraméterekkel való összefüggésekről kapott eredmények ellentmondásosak az irodalomban. Frezzolini és munkacsoportja¹¹² nem talált összefüggést a szérumban totál IgE és a szérumban IL-16 szintek között, míg Masudák¹¹⁰ pozitív korrelációt mutattak ki az IgE és az IL-16 között, valamint az IL-16 és az AD-s erupciós index között.

Saját vizsgálatainkban, amikor a szérumban IL-16 szint és a súlyossági paraméterek közötti összefüggést vizsgáltuk, gyenge korrelációt állapítottunk meg a szérumban IL-16 szint és a SCORAD index között, bár az r koefficiens értéke 0,27-nek adódott, ami nagyon közel van a statisztikai határértékhez. Ezt az eredményt az esetszám emelése valószínűleg pozitív irányban módosította volna. Szignifikáns korrelációt találtunk a szérumban IL-16 és a szérumban totál IgE szintek között, míg a szérumban IL-16 szint és az eozinofil sejtszám között nem volt detektálható összefüggés. A betegek tüneteinek súlyosságát a SCORAD index jól tudja jelezni, az IgE szint és az eozinofil sejtszám ennél sokkal gyengébb jelzője a betegség súlyosságának. A szérumban totál IgE vizsgálata során megállapítottuk, hogy pozitív, bár nem

szignifikáns korreláció áll fent a szérumban totál IgE és a SCORAD index között, ugyanakkor szignifikáns összefüggést detektáltunk a szérumban totál IgE és az eozinofil sejtszám között.

Miután a betegség súlyosságát úgy tűnt, hogy az IL-16 szint nem tudja megfelelően jelezni, megvizsgáltuk, hogy a betegek allergiás szenzitizáltságát képes-e jelezni. Specifikus IgE méréssel és Prick teszttel határoztuk meg az allergiás szenzitizáció mértékét, és ez alapján az AD-s betegeket szenzitizált és nem szenzitizált alcsoportokra osztottuk. Az alcsoportokban tovább elemeztük a szérumban IL-16 és a szérumban totál IgE szinteket. Eredményeink szerint a szérumban IL-16 szintje szignifikánsan emelkedett volt a szenzitizált alcsoportban a nem szenzitizált csoporthoz képest, de csak abban az esetben, ha a szenzitizációt a specifikus IgE-vel határoztuk meg. Amikor a Prick teszt alapján alkotott két csoportban vizsgáltuk a szérumban IL-16 szinteket, nem találtunk eltérést a szenzitizált és nem szenzitizált alcsoportok között. A szérumban totál IgE szintje mindkét módszerrel mért szenzitizált alcsoportban szignifikánsan emelkedett volt a nem szenzitizált alcsoportokhoz képest. Eredményeink azt mutatják, hogy bár a szérumban IL-16 mutat összefüggést az allergiás szenzitizáció mértékével, ez a kapcsolat nem olyan erős, mint ahogyan a szérumban totál IgE esetében láttuk.

A szérumban IL-16-hoz viszonyítva a szérumban totál IgE szintek jobban korrelálnak azokkal a markerekkel, melyek az atopia aktivitását (SCORAD, eozinofil sejtszám) és az allergiás szenzitizáció mértékét jelzik. Az a tény, hogy a totál IgE szérumban szintje pontosabb markere a betegség aktivitásának és a szenzitizáció mértékének valószínűleg azzal magyarázható, hogy az IL-16 szerepe az AD patogenezisében igen összetett. Az IL-16 a gyulladás kialakításában és fenntartásában nem csupán, mint proinflammatorikus citokin és kemoattraktánsveszt részt, hanem immunregulátorként is. AD-ben leírták, hogy az IL-16 gátló hatást is gyakorol az IgE termelésre, emellett az IL-16 stimuláció a CD25⁺ citotoxikus T-lymphocytákkal asszociált protein 4 (CTLA-4)⁺FOXP3⁺ T sejtek megemelkedett migrációjához vezet, valamint képes az autológ T sejtek proliferációját és Th2 típusú citokin termelését szuppresszálni^{58,102}.

Összefoglalva, kimutattuk, hogy bár a szérumban IL-16 szint mutat némi összefüggést a szenzitizáció mértékével AD-ben, úgy tűnik, hogy a szérumban totál IgE-hez képest kevésbé alkalmas marker a betegség súlyosságának és az allergiás szenzitizáció mértékének jelzésére. A korábbi tanulmányok leírták, hogy AD-s betegek perifériás vérében mind a CD4⁺, mind a CD8⁺ T sejtek Th1 típusú citokin termelése károsodott és a Th2/Th22 típusú citokinek dominálnak. Akut bőr léziókban a korábban leírt Th2 dominancia mellett a Th22 sejtek jelenlétét is leírták, mely T sejt eloszlás a krónikus léziókban is fennmarad. Ugyanakkor a bőrben ezzel egy időben megfigyelhető a Th1 típusú sejtek infiltrációja is¹¹³. Ezen jellegzetes T sejt megoszlásért a DC-k felelősek. A DC-k azonban nem csupán a T sejt polarizáló

képességükkel, hanem saját jelentős proinflammatorikus citokin termelésükkel is hozzájárulnak az AD-s bőrben zajló gyulladás létrejöttéhez. A DC-k érése és funkciója, vagyis T sejt alcsoportokat differenciáló és citokin termelő képessége alapvetően függ DC szöveti mikrokörnyezettől. Ennek a szöveti mikrokörnyezetnek AD-ben fontos eleme a *Staphylococcus aureus* kolonizáció, mely a betegek 80-100%-ára jellemző és korrelál a betegség súlyosságával ²⁸. A SEB superantigénként viselkedik, képes penetrálni az epidermiszbe és a dermiszbe, ami poliklonális T sejt aktivációhoz és professzionális illetve nem professzionális antigénprezentáló sejtek (APC) indukálásához vezet. A SEB jelenlétében tenyésztett humán DC-k Th2 polarizációt indukálnak, valamint a SEB serkenti a CD4⁺ T sejtek IL-22 szekrécióját ^{28,114,115}. A szöveti környezet egy másik karakterisztikus vonása mind az akut, mind a krónikus ADs bőrben, hogy a keratinociták fokozottan termelnek TSLP-t, köszönhetően a diszfunkcionális barrierek és a proinflammatorikus citokinek jelenlétének ⁷⁷. A TSLP stimuláció fő hatása, hogy Th2 immunválaszt vált ki és hozzájárul az APC-k túléléséhez és éréséhez ^{76,116}. Az utóbbi évek kutatásai megerősítették, hogy a monocyták mellett a vér CD1c⁺ DC-k is lehetnek a szöveti CD1c⁺ DC-k előalakjai (preDCk). AD-ben sok adat ismert a bőrben elhelyezkedő DC-kről, de vérben keringő előalakjaikról igen kevés.

Tanulmányunknak ebben a részében célunk volt, hogy feltérképezzük a perifériás vérben keringő mDC-k citokin expressziós profilját AD-s betegekben és egészséges kontrollokban de novo. Arra voltunk kíváncsiak, hogy már a vérben látható-e a DC-k Th2/Th22 polarizáló képessége, vagy csak később, a bőrben nyerik el ezt a tulajdonságukat. További célkitűzésünk volt, hogy megvizsgáljuk az AD-s bőrre jellemző mikrokörnyezet hatását az mDC-k T sejt polarizáló képességére atopiás mintákban és kontroll mintákban egyaránt.

Eredményeink alapján a következő három következtetést vontuk le: Az atopiás betegek nem stimulált, keringő mDC-i képesek az összes általunk vizsgált T sejt (Th1, 2, 17, 22) polarizáló citokin termelésére hasonlóan a kontroll sejtekhez, bár az atopiás mDC-k a Th2 (IL-2, CCL17) és Th22 (IL-6, TNF α) irányba polarizáló citokineket már a keringésben is nagyobb mennyiségben expresszálták a nem atopiás mDC-khez képest, sőt a CCL17 és a TNF α esetében a különbségek szignifikánsnak adódtak. Azt is megfigyeltük, hogy az atopiás mDC-k nagy százalékban tartalmaztak dekonzenzált sejtmagot az egészséges egyénekhez képest, és általában elmondható, hogy a citokin termelésben megfigyelt változások is ezekhez a megnagyobbodott, dekonzenzált kromatin tartalmú sejtekhez voltak köthetőek. Ez alapján mi úgy gondoljuk, hogy ezek a sejtek ún. „preaktivált” állapotban vannak.

Másodszor, tanulmányunkban kimutattuk, hogy az AD-s betegekből származó és a kontroll mDC-k eltérően reagálnak a specifikus, AD-s bőrre jellemző szöveti mikrokörnyezetre. Amikor az mDC-ket SEB és TSLP jelenlétében tenyésztettük, mellyel egy AD-re jellemző szöveti környezetet modelleztünk, az atopiás mintákban a Th2- és Th22-polarizáló citokinek szintjeinek emelkedése statisztikailag szignifikánssá vált az egészséges kontrollokhoz viszonyítva. Fujita és munkatársai ¹¹⁷ szintén megerősítették a frissen izolált bőr eredetű rezidens és inflammatórikus DC-k pluripotens Th-sejt (Th1, Th2, Th17, Th22)-polarizáló kapacitását, és kiemelték, hogy a betegség-specifikus Th sejt alcsoportok megjelenését a bőrben elsődlegesen a krónikus gyulladásra jellemző szöveti környezet határozza meg. Egy hasonló kísérleti rendszerben, Reefer és munkacsoportja ¹¹⁸ kimutatta, hogy a DC-T sejt kokultúrákban TSLP, allergén vagy SEB stimuláció hatására az AD-s mintákban a Th2-típusú citokinek jellemzőek, bár ebben a tanulmányban nem vizsgálták a Th22 citokin expressziót. Kísérleteinkben továbbá megfigyeltük, hogy a nem stimulált mDC-k mind az AD-s mintákban, mind a kontrollokban képesek Th1 irányban polarizálni, azonban ez a képesség az atopiás mDC-k esetén károsodik stimulációt követően. Hasonlóan a mi eredményeinkhez, Lebre és munkatársai ¹¹⁹ azt találták, hogy a CD1c⁺ DC-k funkciója károsodott AD-ben, mivel ezen sejtek nem képesek Th1 immunválaszt indukálni, még erőteljes Th1 stimulus jelenlétében sem. Nehéz azonban összehasonlítani eredményeinket más munkacsoportokéval, mivel a mDC-k citokintermelésének mérése eltérő módszerrel történt. A legtöbb korábbi tanulmányban in vitro kokultúrákat alkalmaztak, ahol együtt tenyésztettek különböző vér- vagy bőrereditű DC-ket naiv T sejtekkel és a polarizált sejtek alcsoportjait a T sejtek citokintermelése alapján azonosították, vagy monocita eredetű DC-ket vizsgáltak ^{117,120}. Ezek az eredmények a T sejtek elköteleződésének irányát adják meg, a „hol” és „mikor” kérdésekre a pontos választ csak a DC-k és a szöveti környezet adhatná meg.

Az mDC-kel való kísérletezés nehézsége, hogy nagyon kis számban fordulnak elő a vérben, mégis e vizsgálatok eredményei talán jobban reflektálnak a fiziológiás feltételekre. Ebből kiindulva, kísérleteinket frissen izolált perifériás vér eredetű CD1c (BDCA-1)⁺ mDC-ken végeztük tárgylemez-alapú citometria segítségével. Ez a technika lehetővé teszi a kis sejtszámú minták statisztikailag értékelhető elemzését. Így egy 5-színű jelöléssel meg tudtuk határozni az intracelluláris citokin mintázatot egy mintán belül, és információt kaptunk a sejtek aktivációs állapotáról is a sejtmag morfológia alapján. Harmadik megállapításunk az volt, hogy az LSC egy hasznos eszköz az mDC direkt funkcionális vizsgálatára in vitro. Mivel az mDC-k alacsony számban fordulnak elő a perifériás vérben, és limitált a rendelkezésre álló vérmennyiség, különösen gyermekkorban, ezért kihívás ezeknek a sejteknek a direkt

funkcionális vizsgálata a betegekben. Tudomásunk szerint, mi vizsgáltuk először direkt módon a keringő mDC-k intracelluláris citokin profilját és aktivációját AD-s betegekben egy multiparaméteres lézer pásztázó citométer használatával. Ezzel a tárgylemez alapú technikával lehetővé válik kis sejtszámú minták (10^5 vagy kevesebb) vizsgálata statisztikailag releváns eredményekkel.

Mivel az mDC-k bőr immunrendszerében fontos és komplex szerepet töltenek be, számos terápiás fejlesztés célsejtjei. Korábban kimutatták, hogy az AD kezelése topikális szerekkel, kalcineurin inhibitorokkal és kortikoszteroidokkal az inflammatorikus epidermális sejtek számának csökkenéséhez vezet és a Langerhans sejtek éretlen állapotban maradnak, így képesek regulátoros T sejteket indukálni ^{121,122}. Ezért nagyon fontos olyan módszereket kidolgozni, melyek alkalmasak az újonnan kifejlesztett terápiák direkt hatásának vizsgálatára DC-ken.

Bár számos bizonyíték van az iNKT sejtek autoimmun betegségekből és fertőzésekben betöltött szerepéről, kevés adat van ezen sejtek eloszlásáról és funkciójáról atopiás betegségekből. Humán asztmában az iNKT sejtek szerepére vonatkozó adatok ellentmondásosak, mivel néhány kutató szerint az iNKT sejtek alacsony számban vannak jelen az asztmás egyének légútjaiban, míg mások ennek az ellenkezőjét állítják ^{123,124}. Az iNKT sejtek nagy mennyiségben képesek Th1 és Th2 citokineket termelni stimulációt követően, mely arra utal, hogy szerepet játszhatnak más atopiás betegségek patogenezisében is, pl.: AD-ben. Eddig kevés és ellentmondó adat van az iNKT sejtek szerepéről AD-ben; az ellentmondásos eredmények a sejtek azonosítására használt különböző metodikák eltérő érzékenységből és specificitásából adódhatnak. Jelenleg a CD1d multimereket vagy az invariáns TCR α lánc specifikus 6B11 monoklonális antitesteket tartják a legmegfelelőbb markereknek az iNKT sejtek flow citometriás azonosítására ^{87,90,125}.

Tanulmányunk célja az volt, hogy megállapítsuk, vajon a perifériás iNKT sejtek és különböző alcsoportjaik gyakorisága és abszolút száma mutat-e eltérést AD-ben a perifériás vérben; továbbá, hogy az effektor funkciójukat is megvizsgáljuk a sejtek intracelluláris IL-4 és IFN γ termelését detektálva.

A jelen vizsgálatban anti-CD3/6B11 mAb kombinációt használtunk az iNKT sejtek azonosítására, és kimutattuk, hogy ezen sejtek százalékos aránya és száma szignifikánsan csökken az AD-s betegek perifériás vérében az egészséges kontrollokhoz viszonyítva. A mi vizsgálatainkban az iNKT sejtek száma a kontrollokban magasabbnak adódott, mint a más csoportok által közölt adatok. Nálunk az egészséges egyének átlagéletkora 18 év volt, ezért úgy gondoljuk, hogy a kontroll populáció fiatal kora magyarázat lehet az iNKT sejtek

emelkedett számára ^{126,127}. Másrészt a magas egyéni variancia az iNKT sejtek gyakoriságában szintén magyarázat lehet ^{128,129}. Nem találtunk eltérést a totál T sejtek és a CD4/CD8 alcsoportok számában AD-ben, ezért az iNKT sejtek csökkent gyakorisága nem a T sejt populációk eltéréseiből adódott. Az eredményeinkkel összhangban 4 korábbi publikáció közölt adatokat az iNKT sejtek csökkent számáról AD-ben, és 2 csoport találta emelkedettnek ezen sejtek számát ^{45,129-133}. Ezek az ellentmondásos eredmények arra utalnak, hogy további vizsgálatok szükségesek, mivel nemcsak az alkalmazott módszerek különbözősége okozhat eltérő iNKT számadatokat, de a kiválasztott betegek (extrinzik-intrinzik AD, enyhe-középsúlyos-súlyos AD) közötti eltérések is. Fontos hangsúlyozni, hogy a fent említett tanulmányok közül csak egy alkalmazta ugyanazt a módszert, mint mi.

Az iNKT sejtek CD4/CD8 alcsoportjainak fenotípusos elemzésével párhuzamosan azt vizsgáltuk, hogy melyik alcsoport a fő oka a csökkent iNKT sejtszámnak AD-ben. Az egészséges kontrollokban azt találtuk, hogy a $CD4^+CD8^-$ és a dupla negatív (DN) a leggyakoribb iNKT alcsoport, és a két típus egyforma arányban fordul elő; a $CD8^+CD4^-$ iNKT sejtek közepes arányban találhatók meg, míg a dupla pozitív (DP) sejtek fordultak elő a legkisebb számban. Montoya és munkatársai egészséges kontrollokban hasonló eloszlásokat közöltek az iNKT alcsoportokat vizsgálva, ugyanakkor olyan tanulmányok is készültek, ahol az alcsoportok eltérő gyakoriságban fordultak elő ^{87,134,135}. AD-s betegek perifériás vérében a legnagyobb eltérést a DN iNKT alcsoport esetén figyeltük meg. Bár AD-ben minden iNKT alcsoport csökkent számban fordult elő, csak a $CD4^-$ (DN and $CD4^-CD8^+$) iNKT alcsoportok értékei voltak szignifikánsan alacsonyabbak. A legerősebb pozitív korrelációt a DN iNKT és a totál iNKT sejtek között találtuk. Ezek az eredmények összecsengenek a korábbi tanulmányok eredményeivel. Takahashi és munkacsoportja vizsgálataiban a $CD4^-CD8^+$ és a DN iNKT alcsoportok száma csökkenő tendenciát mutatott, míg Oishiék nagymértékű csökkenést detektáltak a DN iNKT alcsoport számát vizsgálva asztmás és AD-s betegekben ^{130,132}. Ezen eredményekkel szemben néhány kutatócsoport szignifikánsan csökkent $CD4^+$ iNKT összetételt talált az AD-s betegek perifériás vérében ¹³⁶. A fent felsorolt ellentmondó eredmények oka ismeretlen, de egyrészt adódhat az eltérő betegcsoport választásból, másrészt az eltérő kapuzási technikából, mellyel a $CD4^+$ és $CD8^+$ iNKT alcsoportok el lettek választva, nevezetesen, hogy a kis mértékben pozitív sejteket is kapuzták-e.

Az iNKT alcsoportok elkülönítése azért nagyon fontos, mert a különböző alcsoportok eltérő funkcióval rendelkezhetnek ^{90,137,138}; továbbá a különböző alcsoportok közötti keresztszabályozás nagyban befolyásolja a saját és idegen antigénekre adott immunválaszt ¹³⁹.

Egészséges egyénekben a keringő CD4⁺ iNKT sejtek mind Th1, mind Th2 citokineket (IFN γ , IL-4, és IL-13) képesek termelni, míg a DN iNKT alcsoport sejtjei főleg Th1 citokineket (IFN γ , TNF α) expresszálnak^{90,140}. A patogének eliminációját és a tumor rezekciót általában a Th1-es immunválaszhoz kötik, míg az iNKT sejtek által közvetített Th2 válaszok közé a tolerogén mechanizmusok tartoznak¹⁴¹. Mivel az iNKT sejtekre vagy éppen az alcsoportok sejt számára vonatkozó adatok funkcionális vizsgálatok nélkül hiányosak, így intracelluláris IFN γ és IL-4 citokin méréseket is végeztünk. Az össz IFN γ expressziója csökkent, míg az IL-4 termelést emelkedettnek adódott AD-ben az egészséges kontrollokhoz viszonyítva, bár ezek az eltérések nem voltak szignifikánsak. Másrészt, ezek a funkcionális eltérések szignifikánsnak adódtak, ha a DN alcsoportot vizsgáltuk. A DN iNKT sejtek AD-ben szignifikánsan kevesebb IFN γ -t és szignifikánsan több IL-4-t termeltek a kontrollokhoz viszonyítva. Legjobb tudomásunk szerint, ez az első közlemény, mely kimutatta, hogy a DN iNKT sejtek citokintermelése eltér AD-s betegekben. Az iNKT sejtek csökkent számára és eltérő funkciójára vonatkozó eredményeink jó összhangban vannak a korábbi tanulmányokkal, melyek azt találták, hogy az atopiás betegek emelkedett plazma IL-18 szintje korrelál az iNKT sejtek csökkent számával és diszfunkciójával¹³⁶. Lind és munkatársai azt találták, hogy a megemelkedett plazma IL-18 gátolja az iNKT sejteket, és hogy ez a diszreguláció szerepet játszhat az AD patogenezisében.

Az továbbra is megválaszolandó kérdés, hogy a totál iNKT sejtek vagy az alcsoportok számának és citokin expressziójának eltérései elsődleges patogenetikus faktorok az AD kialakulásában vagy a betegség a perifériás vérben megemelkedő Th2 típusú citokinek következménye. Az iNKT sejtek csökkent száma és eltérő citokin termelése a továbbiakban vezethet a károsodott immunregulátoros kapacitásukhoz, mely hozzájárul az AD-re jellemző karakterisztikus citokin milió és a krónikus gyulladás kialakulásához.

Összefoglalva, AD-ben az iNKT sejtek szignifikánsan eltérő száma és citokin termelése arra utal, hogy ezeknek a sejteknek fontos szerepe lehet a betegség patogenezisében.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Jelenleg számos bizonyíték van arra vonatkozóan, hogy AD-ben a veleszületett immunválasz több komponense is károsodott, például az antimikrobiális peptidtermelés csökkenése, a Toll-like receptorok alacsonyabb expressziója, az epiteliális barrier károsodása és az innate immunsejtek csökkent megjelenése a bőrben.

Munkánk első részében az innate immunválasz egyik kulcsmolekulájának, az IL-16-nak, mint lehetséges biomarkernek a szerepét tanulmányoztuk AD-ben. Eredményeink szerint a betegek szérumában az egészségesekhez és a psoriasisos betegekhez képest a szérum IL-16 szint szignifikánsan magasabbnak adódott. Amikor az IL-16 szint és a súlyossági paraméterek (SCORAD, totál IgE, eozinofil sejtszám) közötti összefüggést vizsgáltuk, úgy tűnt, hogy az IL-16 szint nem tudja megfelelően jellemezni a betegség aktivitását, ezért megvizsgáltuk, hogy a betegek allergiás szenzitizáltságát képes-e jelezni. Azt találtuk, hogy bár a szérum IL-16 mutat összefüggést az allergiás szenzitizáció mértékével, kevésbé alkalmas marker a betegség súlyosságának és az allergiás szenzitizáció mértékének jelzésére.

A DC-kel végzett kísérleteink eredményei alapján három következtetést vontunk le: Az atopiás betegek nem stimulált, keringő mDC-i képesek az összes általunk vizsgált T sejt (Th1, 2, 17, 22) polarizáló citokin termelésére, azonban a jellegzetes Th2/Th22 polarizáló képesség már ekkor felismerhető és a sejtek egy csoportja pre-aktivált állapotban van a vérben. Egy AD-re jellemző szöveti környezetben az atopiás mintákban a Th2/Th22 polarizáló képesség tovább fokozódott, a Th1 polarizáló képesség károsodott. Harmadik megállapításunk az volt, hogy az általunk használt LSC egy hasznos eszköz az mDC direkt funkcionális vizsgálatára in vitro.

Az iNKT sejtekkel végzett kutatásaink alapján megállapítottuk, hogy ezen sejtek százalékos aránya és száma szignifikánsan csökken az AD-s betegek perifériás vérében az egészséges kontrollokhoz viszonyítva. Az iNKT sejtek CD4/CD8 alcsoportjainak fenotípusos elemzésével kimutattuk, hogy a $CD4^+CD8^+$ és a DN a leggyakoribb iNKT alcsoport. Ezen sejtek funkcionális vizsgálata alapján megállapítottuk, hogy az iNKT sejtek össz IFN γ termelése csökkent, míg az össz IL-4 termelése emelkedett AD-ben a kontrollokhoz viszonyítva, ugyanakkor ezek a funkcionális eltérések csak akkor adódtak szignifikánsnak, amikor a DN alcsoportot vizsgáltuk.

Jelen vizsgálataink tehát hangsúlyozzák, hogy a veleszületett immunválasz kifejezetten károsodott AD-ben, melyről korábban azt gondolták, hogy főleg az adaptív immunválasz elemei befolyásolják.

SUMMARY

Nowadays many evidences exist related to the fact that in AD, several components of the innate immune system are damaged, for example decrease of the production of AMPs, less expression of TLRs, epithelial barrier dysfunction, decreased presence of innate immune cells in the skin.

The first part of our work we investigated the role of IL-16 – one of the key molecule of the innate immune system, as a possible biomarker in AD. We demonstrated significantly higher serum IL-16 levels in AD patients compared to those in healthy controls and in psoriatic patients. When we studied the association between high serum IL-16 levels and different severity parameters of the disease we found that IL-16 is not suitable for characterize the activity of AD, therefore we investigated whether it can indicate the allergic sensitisation of the patients. We demonstrated that although serum IL-16 levels showed some correlation with the degree of sensitization in patients with AD, it is less accurate marker of disease activity and sensitivity.

Based on the results from DC experiments we made three conclusions: first, unstimulated, circulating mDCs from AD patients seem to have the ability to produce all the investigated Th-cell-polarising cytokines, similar to control cells, but the Th2/Th22 polarizing capacity seems to be over activated even in the blood. We suggest that these cells are in a preactivated state. Second, when mDCs were cultured in a model of an AD tissue microenvironment, Th2- and Th22-polarising cytokines became statistically significant in cells from atopic patients relative to those from healthy controls. Third, we would like to emphasise that LSC is a useful technique to monitor mDC functions in vitro.

According to our results with iNKT cells we were able to show that both the percentage and the number of iNKT cells were significantly decreased in the peripheral blood of patients with AD compared with HCs. Using phenotypic analysis of the CD4/CD8 subsets of iNKTcells, we found CD4⁺CD8⁺ and DN subpopulations of iNKTcells were the most frequent subpopulations. After the functional analysis of iNKT cells we have found that the overall IFN γ production by iNKT cells was decreased, whereas the IL-4 production was increased in AD patients; however, these alterations were not significant. On the other hand, these functional alterations were significant when the DN subgroup was investigated.

The present work emphasizes the possible role of innate immune system in AD which was considered as a disease primarily influenced by the element of the adaptive immune system.

8. IRODALOMJEGYZÉK

1. Nutten S. Atopic dermatitis: Global epidemiology and risk factors. *Ann Nutr Metab.* 2015;66 Suppl 1:8-16.
2. Suarez AL, Feramisco JD, Koo J, Steinhoff M. Psychoneuroimmunology of psychological stress and atopic dermatitis: Pathophysiologic and therapeutic updates. *Acta Derm Venereol.* 2012;92(1):7-15.
3. De Benedetto A, Agnihothri R, McGirt LY, Bankova LG, Beck LA. Atopic dermatitis: A disease caused by innate immune defects? *J Invest Dermatol.* 2009;129(1):14-30.
4. Leung DY, Bieber T. Atopic dermatitis. *Lancet.* 2003;361(9352):151-160.
5. Thomsen SF. Atopic dermatitis: Natural history, diagnosis, and treatment. *ISRN Allergy.* 2014;2014:354250.
6. Bieber T. Atopic dermatitis. *Ann Dermatol.* 2010;22(2):125-137.
7. Williams HC. Clinical practice. atopic dermatitis. *N Engl J Med.* 2005;352(22):2314-2324.
8. Spergel JM. From atopic dermatitis to asthma: The atopic march. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2010;105(2):99-106; quiz 107-9, 117.
9. Dold S, Wjst M, von Mutius E, Reitmeir P, Stiepel E. Genetic risk for asthma, allergic rhinitis, and atopic dermatitis. *Arch Dis Child.* 1992;67(8):1018-1022.
10. Thomsen SF, Ulrik CS, Kyvik KO, et al. Importance of genetic factors in the etiology of atopic dermatitis: A twin study. *Allergy Asthma Proc.* 2007;28(5):535-539.

11. Fiset PO, Leung DY, Hamid Q. Immunopathology of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118(1):287-290.
12. Al-Shobaili HA, Ahmed AA, Alnomair N, Alobead ZA, Rasheed Z. Molecular genetic of atopic dermatitis: An update. *Int J Health Sci (Qassim)*. 2016;10(1):96-120.
13. Henry J, Toulza E, Hsu CY, et al. Update on the epidermal differentiation complex. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2012;17:1517-1532.
14. Brown SJ, McLean WH. One remarkable molecule: Filaggrin. *J Invest Dermatol*. 2012;132(3 Pt 2):751-762.
15. Marenholz I, Rivera VA, Esparza-Gordillo J, et al. Association screening in the epidermal differentiation complex (EDC) identifies an SPRR3 repeat number variant as a risk factor for eczema. *J Invest Dermatol*. 2011;131(8):1644-1649.
16. Fortugno P, Furio L, Teson M, et al. The 420K LEKTI variant alters LEKTI proteolytic activation and results in protease deregulation: Implications for atopic dermatitis. *Hum Mol Genet*. 2012;21(19):4187-4200.
17. Renner ED, Hartl D, Rylaarsdam S, et al. Comel-netherton syndrome defined as primary immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(3):536-543.
18. Braff MH, Di Nardo A, Gallo RL. Keratinocytes store the antimicrobial peptide cathelicidin in lamellar bodies. *J Invest Dermatol*. 2005;124(2):394-400.
19. Wollenberg A, Rawer HC, Schaubert J. Innate immunity in atopic dermatitis. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2011;41(3):272-281.

20. Levin J, Fallon Friedlander S, Del Rosso JQ. Atopic dermatitis and the stratum corneum: Part 3: The immune system in atopic dermatitis. *J Clin Aesthet Dermatol*. 2013;6(12):37-44.
21. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2001;1(2):135-145.
22. Lee HJ, Ha SJ, Han H, Kim JW. Distribution of HLA-A, B alleles and polymorphisms of TAP and LMP genes in Korean patients with atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy*. 2001;31(12):1867-1874.
23. Novak N, Bieber T, Leung DY. Immune mechanisms leading to atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;112(6 Suppl):S128-39.
24. Tokura Y. Extrinsic and intrinsic types of atopic dermatitis. *J Dermatol Sci*. 2010;58(1):1-7.
25. Leung DY. Infection in atopic dermatitis. *Curr Opin Pediatr*. 2003;15(4):399-404.
26. Ong PY, Leung DY. The infectious aspects of atopic dermatitis. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2010;30(3):309-321.
27. de Vries IJ, Langeveld-Wildschut EG, van Reijssen FC, et al. Adhesion molecule expression on skin endothelia in atopic dermatitis: Effects of TNF-alpha and IL-4. *J Allergy Clin Immunol*. 1998;102(3):461-468.
28. Breuer K, Kapp A, Werfel T. Bacterial infections and atopic dermatitis. *Allergy*. 2001;56(11):1034-1041.
29. Valenta R, Seiberler S, Natter S, et al. Autoallergy: A pathogenetic factor in atopic dermatitis? *J Allergy Clin Immunol*. 2000;105(3):432-437.

30. Oszukowska M, Michalak I, Gutfreund K, et al. Role of primary and secondary prevention in atopic dermatitis. *Postepy Dermatol Alergol*. 2015;32(6):409-420.
31. Elias PM, Hatano Y, Williams ML. Basis for the barrier abnormality in atopic dermatitis: Outside-inside-outside pathogenic mechanisms. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;121(6):1337-1343.
32. Eyerich K, Novak N. Immunology of atopic eczema: Overcoming the Th1/Th2 paradigm. *Allergy*. 2013;68(8):974-982.
33. Gittler JK, Shemer A, Suarez-Farinas M, et al. Progressive activation of T(H)2/T(H)22 cytokines and selective epidermal proteins characterizes acute and chronic atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;130(6):1344-1354.
34. De Benedetto A, Kubo A, Beck LA. Skin barrier disruption: A requirement for allergen sensitization? *J Invest Dermatol*. 2012;132(3 Pt 2):949-963.
35. Rawlings AV, Matts PJ. Stratum corneum moisturization at the molecular level: An update in relation to the dry skin cycle. *J Invest Dermatol*. 2005;124(6):1099-1110.
36. Cork MJ, Danby SG, Vasilopoulos Y, et al. Epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*. 2009;129(8):1892-1908.
37. Guttman-Yassky E, Nogales KE, Krueger JG. Contrasting pathogenesis of atopic dermatitis and psoriasis--part I: Clinical and pathologic concepts. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127(5):1110-1118.
38. Leung DY. New insights into atopic dermatitis: Role of skin barrier and immune dysregulation. *Allergol Int*. 2013;62(2):151-161.

39. De Benedetto A, Rafaels NM, McGirt LY, et al. Tight junction defects in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127(3):773-86.e1-7.
40. Nestle FO, Di Meglio P, Qin JZ, Nickoloff BJ. Skin immune sentinels in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(10):679-691.
41. Miller LS, Modlin RL. Human keratinocyte toll-like receptors promote distinct immune responses. *J Invest Dermatol*. 2007;127(2):262-263.
42. Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, et al. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med*. 2006;203(10):2271-2279.
43. Kolls JK, McCray PB, Jr, Chan YR. Cytokine-mediated regulation of antimicrobial proteins. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(11):829-835.
44. Soumelis V, Liu YJ. Human thymic stromal lymphopoietin: A novel epithelial cell-derived cytokine and a potential key player in the induction of allergic inflammation. *Springer Semin Immunopathol*. 2004;25(3-4):325-333.
45. Wu WH, Park CO, Oh SH, et al. Thymic stromal lymphopoietin-activated invariant natural killer T cells trigger an innate allergic immune response in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;126(2):290-9, 299.e1-4.
46. Albanesi C, Scarponi C, Giustizieri ML, Girolomoni G. Keratinocytes in inflammatory skin diseases. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2005;4(3):329-334.
47. Cruikshank W, Center DM. Modulation of lymphocyte migration by human lymphokines. II. purification of a lymphotactic factor (LCF). *J Immunol*. 1982;128(6):2569-2574.

48. Richmond J, Tuzova M, Cruikshank W, Center D. Regulation of cellular processes by interleukin-16 in homeostasis and cancer. *J Cell Physiol.* 2014;229(2):139-147.
49. Lim KG, Wan HC, Bozza PT, et al. Human eosinophils elaborate the lymphocyte chemoattractants. IL-16 (lymphocyte chemoattractant factor) and RANTES. *J Immunol.* 1996;156(7):2566-2570.
50. Rumsaeng V, Cruikshank WW, Foster B, et al. Human mast cells produce the CD4+ T lymphocyte chemoattractant factor, IL-16. *J Immunol.* 1997;159(6):2904-2910.
51. Kaser A, Dunzendorfer S, Offner FA, et al. A role for IL-16 in the cross-talk between dendritic cells and T cells. *J Immunol.* 1999;163(6):3232-3238.
52. Sciaky D, Brazer W, Center DM, Cruikshank WW, Smith TJ. Cultured human fibroblasts express constitutive IL-16 mRNA: Cytokine induction of active IL-16 protein synthesis through a caspase-3-dependent mechanism. *J Immunol.* 2000;164(7):3806-3814.
53. Little FF, Cruikshank WW, Center DM. Il-9 stimulates release of chemotactic factors from human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001;25(3):347-352.
54. Rand TH, Cruikshank WW, Center DM, Weller PF. CD4-mediated stimulation of human eosinophils: Lymphocyte chemoattractant factor and other CD4-binding ligands elicit eosinophil migration. *J Exp Med.* 1991;173(6):1521-1528.
55. Qi JC, Wang J, Mandadi S, et al. Human and mouse mast cells use the tetraspanin CD9 as an alternate interleukin-16 receptor. *Blood.* 2006;107(1):135-142.
56. Kaser A, Dunzendorfer S, Offner FA, et al. A role for IL-16 in the cross-talk between dendritic cells and T cells. *J Immunol.* 1999;163(6):3232-3238.

57. Cruikshank WW, Berman JS, Theodore AC, Bernardo J, Center DM. Lymphokine activation of T4⁺ T lymphocytes and monocytes. *J Immunol*. 1987;138(11):3817-3823.
58. McFadden C, Morgan R, Rahangdale S, et al. Preferential migration of T regulatory cells induced by IL-16. *J Immunol*. 2007;179(10):6439-6445.
59. Parada NA, Center DM, Kornfeld H, et al. Synergistic activation of CD4⁺ T cells by IL-16 and IL-2. *J Immunol*. 1998;160(5):2115-2120.
60. Wilson KC, Center DM, Cruikshank WW. The effect of interleukin-16 and its precursor on T lymphocyte activation and growth. *Growth Factors*. 2004;22(2):97-104.
61. Pulendran B, Artis D. New paradigms in type 2 immunity. *Science*. 2012;337(6093):431-435.
62. Gogolak P, Rethi B, Hajas G, Rajnavolgyi E. Targeting dendritic cells for priming cellular immune responses. *J Mol Recognit*. 2003;16(5):299-317.
63. Boltjes A, van Wijk F. Human dendritic cell functional specialization in steady-state and inflammation. *Front Immunol*. 2014;5:131.
64. Collin M, McGovern N, Haniffa M. Human dendritic cell subsets. *Immunology*. 2013;140(1):22-30.
65. Haniffa M, Gunawan M, Jardine L. Human skin dendritic cells in health and disease. *J Dermatol Sci*. 2015;77(2):85-92.
66. Ginhoux F, Tacke F, Angeli V, et al. Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nat Immunol*. 2006;7(3):265-273.

67. Merad M, Manz MG, Karsunky H, et al. Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nat Immunol.* 2002;3(12):1135-1141.
68. Segura E, Valladeau-Guilemond J, Donnadieu MH, Sastre-Garau X, Soumelis V, Amigorena S. Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes. *J Exp Med.* 2012;209(4):653-660.
69. Klechevsky E. Human dendritic cells - stars in the skin. *Eur J Immunol.* 2013;43(12):3147-3155.
70. Liu K, Nussenzweig MC. Origin and development of dendritic cells. *Immunol Rev.* 2010;234(1):45-54.
71. Haniffa M, Shin A, Bigley V, et al. Human tissues contain CD141^{hi} cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103⁺ nonlymphoid dendritic cells. *Immunity.* 2012;37(1):60-73.
72. Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, et al. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med.* 1999;5(8):919-923.
73. Mathan TS, Figdor CG, Buschow SI. Human plasmacytoid dendritic cells: From molecules to intercellular communication network. *Front Immunol.* 2013;4:372.
74. Wollenberg A, Wen S, Bieber T. Phenotyping of epidermal dendritic cells: Clinical applications of a flow cytometric micromethod. *Cytometry.* 1999;37(2):147-155.
75. Novak N, Valenta R, Bohle B, et al. FcεRI engagement of langerhans cell-like dendritic cells and inflammatory dendritic epidermal cell-like dendritic cells induces

- chemotactic signals and different T-cell phenotypes in vitro. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;113(5):949-957.
76. Soumelis V, Reche PA, Kanzler H, et al. Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat Immunol.* 2002;3(7):673-680.
77. Novak N. An update on the role of human dendritic cells in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;129(4):879-886.
78. Zaba LC, Krueger JG, Lowes MA. Resident and "inflammatory" dendritic cells in human skin. *J Invest Dermatol.* 2009;129(2):302-308.
79. Porcelli S, Yockey CE, Brenner MB, Balk SP. Analysis of T cell antigen receptor (TCR) expression by human peripheral blood CD4-8- alpha/beta T cells demonstrates preferential use of several V beta genes and an invariant TCR alpha chain. *J Exp Med.* 1993;178(1):1-16.
80. Dellabona P, Padovan E, Casorati G, Brockhaus M, Lanzavecchia A. An invariant V alpha 24-J alpha Q/V beta 11 T cell receptor is expressed in all individuals by clonally expanded CD4-8- T cells. *J Exp Med.* 1994;180(3):1171-1176.
81. McCarthy C, Shepherd D, Fleire S, et al. The length of lipids bound to human CD1d molecules modulates the affinity of NKT cell TCR and the threshold of NKT cell activation. *J Exp Med.* 2007;204(5):1131-1144.
82. Godfrey DI, Hammond KJ, Poulton LD, Smyth MJ, Baxter AG. NKT cells: Facts, functions and fallacies. *Immunol Today.* 2000;21(11):573-583.
83. Exley M, Garcia J, Balk SP, Porcelli S. Requirements for CD1d recognition by human invariant Valpha24+ CD4-CD8- T cells. *J Exp Med.* 1997;186(1):109-120.

84. Balato A, Unutmaz D, Gaspari AA. Natural killer T cells: An unconventional T-cell subset with diverse effector and regulatory functions. *J Invest Dermatol*. 2009;129(7):1628-1642.
85. Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:297-336.
86. Esteban LM, Tsoutsman T, Jordan MA, et al. Genetic control of NKT cell numbers maps to major diabetes and lupus loci. *J Immunol*. 2003;171(6):2873-2878.
87. Montoya CJ, Pollard D, Martinson J, et al. Characterization of human invariant natural killer T subsets in health and disease using a novel invariant natural killer T cell-clonotypic monoclonal antibody, 6B11. *Immunology*. 2007;122(1):1-14.
88. Sandberg JK, Bhardwaj N, Nixon DF. Dominant effector memory characteristics, capacity for dynamic adaptive expansion, and sex bias in the innate Valpha24 NKT cell compartment. *Eur J Immunol*. 2003;33(3):588-596.
89. Brennan PJ, Brigl M, Brenner MB. Invariant natural killer T cells: An innate activation scheme linked to diverse effector functions. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(2):101-117.
90. Gumperz JE, Miyake S, Yamamura T, Brenner MB. Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. *J Exp Med*. 2002;195(5):625-636.
91. Coquet JM, Chakravarti S, Kyriakopoulos K, et al. Diverse cytokine production by NKT cell subsets and identification of an IL-17-producing CD4-NK1.1- NKT cell population. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(32):11287-11292.

92. Van Kaer L, Parekh VV, Wu L. Invariant natural killer T cells: Bridging innate and adaptive immunity. *Cell Tissue Res.* 2011;343(1):43-55.
93. Sumida T, Sakamoto A, Murata H, et al. Selective reduction of T cells bearing invariant V alpha 24J alpha Q antigen receptor in patients with systemic sclerosis. *J Exp Med.* 1995;182(4):1163-1168.
94. Godo M, Sessler T, Hamar P. Role of invariant natural killer T (iNKT) cells in systemic lupus erythematosus. *Curr Med Chem.* 2008;15(18):1778-1787.
95. Gaspar K, Kukova G, Bunemann E, et al. The chemokine receptor CCR3 participates in tissue remodeling during atopic skin inflammation. *J Dermatol Sci.* 2013;71(1):12-21.
96. Gaspar K, Barath S, Nagy G, et al. Regulatory T-cell subsets with acquired functional impairment: Important indicators of disease severity in atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol.* 2015;95(2):151-155.
97. Aleksza M, Lukacs A, Antal-Szalmas P, Hunyadi J, Szegedi A. Increased frequency of intracellular interleukin (IL)-13 and IL-10, but not IL-4, expressing CD4+ and CD8+ peripheral T cells of patients with atopic dermatitis. *Br J Dermatol.* 2002;147(6):1135-1141.
98. Hanifin JM. Diagnostic criteria for atopic dermatitis: Consider the context. *Arch Dermatol.* 1999;135(12):1551.
99. Grimbacher B, Schaffer AA, Holland SM, et al. Genetic linkage of hyper-IgE syndrome to chromosome 4. *Am J Hum Genet.* 1999;65(3):735-744.

100. Zhao H, Traganos F, Darzynkiewicz Z. Kinetics of the UV-induced DNA damage response in relation to cell cycle phase. correlation with DNA replication. *Cytometry A*. 2010;77(3):285-293.
101. Deng JM, Shi HZ. Interleukin-16 in asthma. *Chin Med J (Engl)*. 2006;119(12):1017-1025.
102. Trudelle A, El Bassam S, Pinsonneault S, Mazer B, Laberge S. Interleukin-16 inhibits immunoglobulin e production by B lymphocytes. *Int Arch Allergy Immunol*. 2007;143(2):109-118.
103. Lackner A, Raggam RB, Stammberger H, et al. The role of interleukin-16 in eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2007;264(8):887-893.
104. Laberge S, Pinsonneault S, Ernst P, et al. Phenotype of IL-16-producing cells in bronchial mucosa: Evidence for the human eosinophil and mast cell as cellular sources of IL-16 in asthma. *Int Arch Allergy Immunol*. 1999;119(2):120-125.
105. Reich K, Hugo S, Middel P, Blaschke V, Heine A, Neumann C. The maturation-dependent production of interleukin-16 is impaired in monocyte-derived dendritic cells from atopic dermatitis patients but is restored by inflammatory cytokines TNF-alpha and IL-1beta. *Exp Dermatol*. 2004;13(12):740-747.
106. Frezzolini A, Cianchini G, Ruffelli M, Cadoni S, Puddu P, De Pita O. Interleukin-16 expression and release in bullous pemphigoid. *Clin Exp Immunol*. 2004;137(3):595-600.
107. Laberge S, Ghaffar O, Boguniewicz M, Center DM, Leung DY, Hamid Q. Association of increased CD4+ T-cell infiltration with increased IL-16 gene expression in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 1998;102(4 Pt 1):645-650.

108. Angelova-Fischer I, Hipler UC, Bauer A, et al. Significance of interleukin-16, macrophage-derived chemokine, eosinophil cationic protein and soluble E-selectin in reflecting disease activity of atopic dermatitis--from laboratory parameters to clinical scores. *Br J Dermatol*. 2006;154(6):1112-1117.
109. Reich K, Heine A, Hugo S, et al. Engagement of the fc epsilon RI stimulates the production of IL-16 in langerhans cell-like dendritic cells. *J Immunol*. 2001;167(11):6321-6329.
110. Masuda K, Katoh N, Okuda F, Kishimoto S. Increased levels of serum interleukin-16 in adult type atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol*. 2003;83(4):249-253.
111. Karaki M, Dobashi H, Kobayashi R, Tokuda M, Ishida T, Mori N. Expression of interleukin-16 in allergic rhinitis. *Int Arch Allergy Immunol*. 2005;138(1):67-72.
112. Frezzolini A, Paradisi M, Zaffiro A, et al. Circulating interleukin 16 (IL-16) in children with atopic/eczema dermatitis syndrome (AEDS): A novel serological marker of disease activity. *Allergy*. 2002;57(9):815-820.
113. Nograles KE, Zaba LC, Shemer A, et al. IL-22-producing "T22" T cells account for upregulated IL-22 in atopic dermatitis despite reduced IL-17-producing TH17 T cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;123(6):1244-52.e2.
114. Mandron M, Aries MF, Brehm RD, et al. Human dendritic cells conditioned with staphylococcus aureus enterotoxin B promote TH2 cell polarization. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117(5):1141-1147.

115. Niebuhr M, Scharonow H, Gathmann M, Mamerow D, Werfel T. Staphylococcal exotoxins are strong inducers of IL-22: A potential role in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;126(6):1176-83.e4.
116. Ebner S, Nguyen VA, Forstner M, et al. Thymic stromal lymphopoietin converts human epidermal langerhans cells into antigen-presenting cells that induce proallergic T cells. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;119(4):982-990.
117. Fujita H, Shemer A, Suarez-Farinas M, et al. Lesional dendritic cells in patients with chronic atopic dermatitis and psoriasis exhibit parallel ability to activate T-cell subsets. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;128(3):574-82.e1-12.
118. Reefer AJ, Hulse KE, Lannigan JA, et al. Flow cytometry imaging identifies rare T(H)2 cells expressing thymic stromal lymphopoietin receptor in a "proallergic" milieu. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;126(5):1049-58, 1058.e1-10.
119. Lebre MC, van Capel TM, Bos JD, Knol EF, Kapsenberg ML, de Jong EC. Aberrant function of peripheral blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells in atopic dermatitis patients. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;122(5):969-976.e5.
120. Aiba S, Manome H, Yoshino Y, Tagami H. Alteration in the production of IL-10 and IL-12 and aberrant expression of CD23, CD83 and CD86 by monocytes or monocyte-derived dendritic cells from atopic dermatitis patients. *Exp Dermatol.* 2003;12(1):86-95.
121. Kwiek B, Peng WM, Allam JP, Langner A, Bieber T, Novak N. Tacrolimus and TGF-beta act synergistically on the generation of langerhans cells. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;122(1):126-32, 132.e1.

122. Stary G, Klein I, Bauer W, et al. Glucocorticosteroids modify langerhans cells to produce TGF-beta and expand regulatory T cells. *J Immunol.* 2011;186(1):103-112.
123. Akbari O, Faul JL, Hoyte EG, et al. CD4+ invariant T-cell-receptor+ natural killer T cells in bronchial asthma. *N Engl J Med.* 2006;354(11):1117-1129.
124. Vijayanand P, Seumois G, Pickard C, et al. Invariant natural killer T cells in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med.* 2007;356(14):1410-1422.
125. Metelitsa LS. Flow cytometry for natural killer T cells: Multi-parameter methods for multifunctional cells. *Clin Immunol.* 2004;110(3):267-276.
126. Jing Y, Gravenstein S, Chaganty NR, et al. Aging is associated with a rapid decline in frequency, alterations in subset composition, and enhanced Th2 response in CD1d-restricted NKT cells from human peripheral blood. *Exp Gerontol.* 2007;42(8):719-732.
127. Molling JW, Kolgen W, van der Vliet HJ, et al. Peripheral blood IFN-gamma-secreting Valpha24+Vbeta11+ NKT cell numbers are decreased in cancer patients independent of tumor type or tumor load. *Int J Cancer.* 2005;116(1):87-93.
128. Prussin C, Foster B. TCR V alpha 24 and V beta 11 coexpression defines a human NK1 T cell analog containing a unique Th0 subpopulation. *J Immunol.* 1997;159(12):5862-5870.
129. Ilhan F, Kandi B, Akbulut H, Turgut D, Cicek D. Atopic dermatitis and Valpha24+ natural killer T cells. *Skinmed.* 2007;6(5):218-220.
130. Takahashi T, Nakamura K, Chiba S, Kanda Y, Tamaki K, Hirai H. V alpha 24+ natural killer T cells are markedly decreased in atopic dermatitis patients. *Hum Immunol.* 2003;64(6):586-592.

131. Magnan A, Mely L, Prato S, et al. Relationships between natural T cells, atopy, IgE levels, and IL-4 production. *Allergy*. 2000;55(3):286-290.
132. Oishi Y, Sakamoto A, Kurasawa K, et al. CD4-CD8- T cells bearing invariant Valpha24JalphaQ TCR alpha-chain are decreased in patients with atopic diseases. *Clin Exp Immunol*. 2000;119(3):404-411.
133. Prell C, Konstantopoulos N, Heinzelmann B, et al. Frequency of Valpha24+CD161+ natural killer T cells and invariant TCRAV24-AJ18 transcripts in atopic and non-atopic individuals. *Immunobiology*. 2003;208(4):367-380.
134. Croudace JE, Curbishley SM, Mura M, et al. Identification of distinct human invariant natural killer T-cell response phenotypes to alpha-galactosylceramide. *BMC Immunol*. 2008;9:71-2172-9-71.
135. Im JS, Kang TJ, Lee SB, et al. Alteration of the relative levels of iNKT cell subsets is associated with chronic mycobacterial infections. *Clin Immunol*. 2008;127(2):214-224.
136. Lind SM, Kuylensstierna C, Moll M, et al. IL-18 skews the invariant NKT-cell population via autoreactive activation in atopic eczema. *Eur J Immunol*. 2009;39(8):2293-2301.
137. Seino K, Taniguchi M. Functionally distinct NKT cell subsets and subtypes. *J Exp Med*. 2005;202(12):1623-1626.
138. Lee PT, Benlagha K, Teyton L, Bendelac A. Distinct functional lineages of human V(alpha)24 natural killer T cells. *J Exp Med*. 2002;195(5):637-641.

139. Arrenberg P, Halder R, Kumar V. Cross-regulation between distinct natural killer T cell subsets influences immune response to self and foreign antigens. *J Cell Physiol.* 2009;218(2):246-250.

140. Kronenberg M, Gapin L. The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(8):557-568.

141. Wang ZY, Kusam S, Munugalavadla V, Kapur R, Brutkiewicz RR, Dent AL. Regulation of Th2 cytokine expression in NKT cells: Unconventional use of Stat6, GATA-3, and NFAT2. *J Immunol.* 2006;176(2):880-888.

TÁRGYSZAVAK

atopiás dermatitis, veleszületett immunválasz, IL-16, myeloid DC, iNKT

KEYWORDS

atopic dermatitis, innate immunesystem, IL-16, myeloid DC, iNKT

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőmnek, Szegedi Andrea professzor asszonynak, aki kiemelkedő szakmai tudásával, ötleteivel, odafigyelésével munkámat az elmúlt évek során fáradságot nem ismerve, végtelen türelemmel segítette, aki mindvégig ösztönzött mind szakmailag, mind emberileg, és nélkülözhetetlen támogatást nyújtott tudományos eredményeim eléréséhez.

Szeretnék továbbá köszönetet mondani a debreceni Bőrgyógyászati Klinika igazgatóinak, Hunyadi János professzor úrnak és Remenyik Éva professzor asszonynak, akik figyelemmel kísérték munkámat, és lehetővé tették számomra a doktori értekezésemhez szükséges kísérletek elvégzését. Külön köszönet illeti a Sejtterápia Klinikai Központ és az OMNINVEST Kft. vezetőit és dolgozóit, akik lehetővé tették, hogy új módszereket sajátítsak el, és hozzájárultak a kísérletes munkáim elvégzéséhez, szakmai fejlődésemhez.

Köszönettel tartozom Bőrgyógyászati Klinika kutató laboratóriumában dolgozó munkatársaimnak és a Szegedi Andrea professzor asszony által vezetett munkacsoport tagjainak (Dr. Gáspár Krisztián, Mócsai Gábor, Dr. Kapitány Anikó, Dajnoki Zsolt, Dr. Boross Gábor, Dr. Emri Eszter, Dr. Mikó Edit) akik közvetlen munkatársaim voltak a kutatások során, és észrevételeikkel, segítségükkel, javító tanácsaikkal folyamatosan segítettek munkám megvalósulását. Emellett köszönöm a Bőrgyógyászati Klinika minden dolgozójának segítségét, akik támogattak doktori munkám elkészültében.

Külön köszönet illeti a kollaborációs munkában résztvevő hazai és külföldi munkatársaimat, a Debreceni Egyetem Belgyógyászati Intézet, III. Belgyógyászati Klinika Regionális Immunológiai Laboratóriumából Dr. Baráth Sándort és Dr. Gyimesi Editet, az Immunológiai Intézetből Nagyné Kovács Erzsébetet, az Élettani Intézetből Bíró Tamás professzor urat, Dr. Dobrosi Nórát és Dr. Tóth István Balázst, valamint a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet laborjának munkatársait, Dr. Bacsó Zsoltot és Minh Doant, akik munkájukkal vagy szakmai tudásukkal mind hozzájárultak doktori értekezésem elkészüléséhez.

Köszönöm Családomnak és Barátaimnak a támogatását és biztatását, ami az évek során végig ösztönözte munkámat és segített a céljaim elérésében.

Munkámat támogatta az Országos Tudományos Kutatási Alapprogram, OTKA K108421 és OTKA-PD 112077, a TÁMOP-4.2.2-08/1-2008-0019, a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0023-”DEFENSE-NET”, a GINOP-2.3.2-15-2016-0050 számú projektek (A projektek az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósultak meg.), a TÁMOP-4.2.2/B- 10/1-2010- 0024. A Debreceni Egyetem tudományos képzési műhelyeinek támogatása pályázat.

10. FÜGGELÉK

A Kenézy Élettudományi Könyvtár igazolása, illetve az értekezés alapjául szolgáló, impact faktorral rendelkező saját publikációk és kéziratok gyűjteménye.



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



Nyilvántartási szám: DEENK/38/2017.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Nagy Georgina

Neptun kód: G8HUZY

Doktori Iskola: Petrányi Gyula Klinikai Immunológiai és Allergológiai Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Nagy, G.**, Doan-Xuan, Q. M., Gáspár, K., Mócsai, G., Kapitány, A., Törőcsik, D., Bacsó, Z., Gyimesi, E., Remenyik, É., Bíró, T., Szegedi, A.: The atopic skin-like microenvironment modulates the T-cell-polarising cytokine production of myeloid dendritic cells, as determined by laser scanning cytometry.
Exp. Dermatol. 23 (4), 276-278, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/exd.12342>
IF: 3.762
2. Gyimesi, E., **Nagy, G.**, Remenyik, É., Sipka, S., Zeher, M., Bíró, T., Szegedi, A.: Altered peripheral invariant natural killer T cells in atopic dermatitis.
J. Clin. Immunol. 31 (5), 864-872, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10875-011-9551-5>
IF: 3.077
3. **Nagy, G.**, Gáspár, K., Irinyi, B., Gál, M., Tumpek, J., Gyimesi, E., Sipka, S., Remenyik, É., Szodoray, P., Szegedi, A.: Association between Serum IL-16 Levels and the Degree of Sensitization in Patients with Atopic Dermatitis.
Int. Arch. Allergy Immunol. 156 (1), 69-74, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1159/000321959>
IF: 2.403





További közlemények

4. Kapitány, A., Béke, G., **Nagy, G.**, Doan-Xuan, Q. M., Bacsó, Z., Gáspár, K., Boros, G., Dajnoki, Z., Bíró, T., Rajnavölgyi, É., Szegedi, A.: CD1c+ Blood Dendritic Cells in Atopic Dermatitis are Premature and Can Produce Disease-specific Chemokines.
Acta Derm.-Venereol. [Epub ahead of print], 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.2340/00015555-2540>
IF: 3.638 (2015)
5. Emri, E., Mikó, E., Bai, P., Boros, G., **Nagy, G.**, Rózsa, D., Juhász, T., Hegedűs, C., Horkay, I., Remenyik, É., Emri, G.: Effects of non-toxic zinc exposure on human epidermal keratinocytes.
Metalomics. 7 (3), 499-507, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/C4MT00287C>
IF: 3.54
6. Gáspár, K., Baráth, S., **Nagy, G.**, Mócsai, G., Gyimesi, E., Szodoray, P., Irinyi, B., Zeher, M., Remenyik, É., Szegedi, A.: Regulatory T-cell Subsets in Atopic Dermatitis: important Indicators of Disease Severity with Acquired Functional Impairment.
Acta Derm. Venereol. 95 (2), 151-155, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.2340/00015555-1882>
IF: 3.638
7. Mócsai, G., Gáspár, K., **Nagy, G.**, Irinyi, B., Kapitány, A., Bíró, T., Gyimesi, E., Lajszné Tóth, B., Maródi, L., Szegedi, A.: Severe skin inflammation and filaggrin mutation similarly alter skin barrier in atopic dermatitis patients.
Br. J. Dermatol. 170 (3), 617-624, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/bjd.12743>
IF: 4.275
8. Gáspár, K., Nagy, M., Herédi, E., **Nagy, G.**, Szegedi, A.: A psoriasisos betegek kezelésében megfigyelhető változások az elmúlt évtizedben a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Bőrgyógyászati Klinikáján és a területi járóbeteg szakrendeléseken = Changes in the treatment of psoriatic patients in the last decade at the Department of Dermatology, University of Debrecen Medical and Health Science Center and at the outpatient clinics.
Bőrgyógyász. Venerol. Szle. 89 (4), 99-104, 2013.





9. Herédi, E., Csordás, A., Clemens, M., Ádám, B., Gáspár, K., Törőcsik, D., **Nagy, G.**, Ádány, R., Gaál, J., Remenyik, É., Szegedi, A.: The prevalence of obesity is increased in patients with late compared with early onset psoriasis.
Ann. Epidemiol. 23 (11), 688-692, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.annepidem.2013.08.006>
IF: 2.145
10. Boros, G., Mikó, E., Muramatsu, H., Weissman, D., Emri, E., Rózsa, D., **Nagy, G.**, Juhász, A., Juhász, I., Horst, G. T. J. v. d., Horkay, I., Remenyik, É., Karikó, K., Emri, G.: Transfection of pseudouridine-modified mRNA encoding CPD-photolyase leads to repair of DNA damage in human keratinocytes: a new approach with future therapeutic potential.
J. Photochem. Photobiol. B. 129, 93-99, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.09.010>
IF: 2.803
11. Törőcsik, D., **Nagy, G.**, Remenyik, É., Szegedi, A.: A psoriasis kezelésében alkalmazható jelenlegi és új szisztémás terápiás eljárások.
Immunol. Szle. 3 (5), 22-26, 2011.
12. Matta, C., Juhász, T., Szijgyártó, Z., Kolozsvári, B., Somogyi, C., **Nagy, G.**, Gergely, P., Zákány, R.: PKCdelta is a positive regulator of chondrogenesis in chicken high density micromass cell cultures.
Biochimie. 93 (2), 149-159, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2010.09.005>
IF: 3.022
13. Juhász, T., Matta, C., Mészár, Z., **Nagy, G.**, Szijgyártó, Z., Molnár, Z., Kolozsvári, B., Bakó, É., Zákány, R.: Optimized transient transfection of chondrogenic primary cell cultures.
Cent. Eur. J. Biol. 5 (5), 572-584, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.2478/s11535-010-0053-x>
IF: 0.685
14. Gaál, J., Lakos, G., Szodoray, P., Kiss, J., Horváth, I., Horkay, E., **Nagy, G.**, Szegedi, A.: Immunological and clinical effects of alphacalcidol in patients with psoriatic arthropathy: results of an open, follow-up pilot study.
Acta Derm. Venereol. 89 (2), 140-144, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.2340/00015555-0555>
IF: 3.007





15. Juhász, T., Matta, C., Veress, G., **Nagy, G.**, Szijgyártó, Z., Molnár, Z., Fodor, J., Zákány, R., Gergely, P.: Inhibition of calcineurin by cyclosporine A exerts multiple effects on human melanoma cell lines HT168 and WM35.
Int. J. Oncol. 34 (4), 995-1003, 2009.
DOI: http://dx.doi.org/10.3892/ijo_00000225
IF: 2.447
16. Szegedi, A., Baráth, S., **Nagy, G.**, Szodoray, P., Gál, M., Sipka, S., Bagdi, E., Banham, A. H., Krenács, L.: Regulatory T cells in atopic dermatitis: epidermal dendritic cell clusters may contribute to their local expansion.
Br. J. Dermatol. 160 (5), 984-993, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2133.2009.09035.x>
IF: 4.26
17. Dobrosi, N., Tóth, I. B., **Nagy, G.**, Dózsa, A., Géczy, T., Nagy, L., Zouboulis, C. C., Paus, R., Kovács, L., Bíró, T.: Endocannabinoids enhance lipid synthesis and apoptosis of human sebocytes via cannabinoid receptor-2-mediated signaling.
FASEB J. 22 (10), 3685-3695, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1096/fj.07-104877>
IF: 7.049
18. Szegedi, A., **Nagy, G.**, Baráth, S., Gaál, J.: A D3 vitamin immunomoduláló hatása.
Magyar Immunol. 6 (1-2), 4-10, 2007.
19. Gaál, J., Lakos, G., Aleksza, M., Kiss, J., Horváth, I., Horkay, E., **Nagy, G.**, Szegedi, A.: Az alfakalcidol psoriasis arthropathiában: klinikai és immunológiai hatások.
Magyar Immunol. 6 (5), 31-37, 2007.
20. Sárközi, S., Almássy, J., Lukács, B., Dobrosi, N., **Nagy, G.**, Jóna, I.: Effect of natural phenol derivatives on skeletal type sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and ryanodine receptor.
J. Muscle Res. Cell. Motil. 28, 167-174, 2007.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10974-007-9113-x>
IF: 1.731

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 51,482

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 9,242

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2017.03.01.