

EGYETEMI DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS

**REGULATÍV T-SEJTEK VIZSGÁLATA POLISZISZTÉMÁS
AUTOIMMUN KÓRKÉPEKBEN ÉS HODGKIN LYMPHOMÁBAN**

BARÁTH SÁNDOR

Témavezető: Prof. Dr. Sipka Sándor
Programvezető: Prof. Dr. Zeher Margit
Prof. Dr. Szegedi Gyula

Debreceni Egyetem
Orvos- és Egészségtudományi Centrum, ÁOK
III.sz. Belgyógyászati Klinika, Regionális Immunológiai Laboratórium

2006

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2
Rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezetés	6
1.1 Autoimmunitás	6
1.2 Szisztémás lupus erythematosus	7
1.3 Kevert kötőszöveti betegség	9
1.4 Hodgkin lymphoma	10
1.5 Természetes és indukálható regulatív sejtek	11
1.6 Regulatív T-sejtek autoimmun betegségekben	15
1.7 Regulatív T-sejtek tumoros megbetegedésekben	16
2. Célkitűzések	18
3. Anyag és Módszer.....	20
3.1 A vizsgálatok fő eszközei és vegyszerei	20
3.1.1. Mintavétel.....	20
3.1.2 Monoklonális ellenanyagok	20
3.1.3. Oldatok.....	20
3.1.4. Eszközök	20
3.2. Módszerek	21
3.2.1. CD4 ⁺ CD25 ⁺ T sejtek sejtfelszíni jelölése	21
3.2.2. CD4 ⁺ IL-10 ⁺ és CD8 ⁺ IL10 ⁺ sejtek intracitoplazmatikus jelölése.....	21
3.2.3. CD4 ⁺ CD25 ⁺ "bright" T-sejtek FoxP3 pozitívitasának igazolása	21
3.2.4. Az áramlási citometriás vizsgálatok technikai jellemzői	22
3.2.4.2. Sejtek kapuzása, hisztogramok, pontdiagramok.....	22

3.2.5. Abszolút sejtszám meghatározás	23
3.2.6. Plazmaferezis.....	23
3.3. Betegek	24
3.3.1. Szisztémás lupus erythematosus.....	24
3.3.2. Kevert kötőszöveti betegség.....	26
3.3.3. Hodgkin lymphoma	27
3.4. Statisztikai módszerek, adatfeldolgozás	27
4. Eredmények.....	28
4.1 Regulatív T-sejtek vizsgálata szisztémás lupus erythematosusban.....	28
4.2 Regulatív T-sejtek vizsgálata kevert kötőszöveti betegségben	35
4.3 Regulatív T-sejtek vizsgálata Hodgkin lymphomában.....	37
5. Megbeszélés	40
5.1 Szisztémás lupus erythematosus	40
5.2 Kevert kötőszöveti betegség	42
5.3 Hodgkin lymphoma	43
6. Megállapítások, új eredmények.....	47
7. Irodalomjegyzék.....	48
8. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények.....	56
9. Egyéb közlemények.....	57
10. Köszönetnyilvánítás.....	58

Rövidítések jegyzéke

ACD	citromsav
ACR	American College of Rheumatology
ANA	antinukleáris antigén
ANOVA	analysis of variance
APS	antifoszfolipid szindróma
APC	antigén prezentáló sejt
AZA	azathioprene
BSA	bovine serum albumin
CCL	kemokin ligand
CCR	kemokinreceptor
CD	Cluster of Differentiation
CTCL	cutaneous T-cell lymphoma
CTLA	citotoxikus T limfocita antigén
CXCR	CXC kemokinreceptor
DNS	dezoxiribonukleinsav
dsDNS	dupla szálú DNS
EBV	Epstein-Barr vírus
EDTA	etilén diamin tetraecetsav
ENA	extrahálható nukleáris antigén
FOXP3	forkhead box P3
FS	forward scatter /előreirányuló fényszórás
GITR	glükokortikoid indukált tumor nekrozis faktor család receptor
HL	Hodgkin lymphoma
HLA	humán leukocita antigén
HLH	haemophagocytic lymphohistiocytosis
IDO	indolamin 2,3-dioxigenáz
IFN	interferon
Ig	immunglobulin
IL	interleukin
IPEX	immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance

Cst	kortikosteroid
LAG	limfocita aktivációs gén
LN	lupus nephritis
MCTD	mixed connective tissue disease
MHC	fő hisztokompatibilitási komplex
mtsai	munkatársai
NK	„natural killer” sejt
PBMC	perifériás mononukleáris sejt
PBS	phosphate saline buffer
PMA	phorbol 12-myristoil 13-acetate
PSS	progresszív szisztémás sclerosis
RA	rheumatoid arthritis
RNP	ribonukleoprotein
Ro	Sjögren szindróma egyik antigénje
Rpm	a fordulatszám mértékegysége (fordulat/perc)
SD	standard deviation
SLAM	systemic lupus activity measure
SLE	szisztémás lupus erythematosus
SLE-DAI	SLE-Disease Activity Index
Sm	Smith antigén
SS	side scatter
TGF	transforming growth factor
Th	T helper
TNF	tumor nekrosis faktor
Tr1	T regulative type 1
WHO	World Health Organization

1. BEVEZETÉS

1.1 Autoimmunitás

Az immunrendszer alapvető feladata, hogy különbséget tudjon tenni a szervezetet felépítő, saját és nem-saját struktúrák között. Felismerésükben és a velük szemben kialakuló immunválaszban a természetes (veleszületett, „innate”) immunrendszer és a specifikus védekezést biztosító ún. adaptív (szerzett) immunrendszer elemei (T- és B-sejtek) vesznek részt. Mindazokat a struktúrákat (sejteket, molekulákat) amelyeket a funkcionálisan érett adaptív immunrendszer felismer *antigén*nek nevezünk [1]. Amennyiben az antigén a szervezet saját struktúrái, illetve azok módosult változatai közül kerül ki *autoantigén*ről beszélhetünk.

Az immunrendszer tehát védelmet nyújt a szervezetnek a veszélyes, káros külső és belső anyagokkal szemben úgy, hogy a saját struktúra lehetőleg ne – vagy csak minimálisan – sérüljön. Azokat a különféle, komplex szabályozási folyamatokat, amellyel az immunrendszer a saját antigénstruktúráját védelmezi, összefoglalóan immuntoleranciának nevezük. Ennek vannak központi (a thymusban kialakuló) és perifériás elemei (anergia, deléción).

Abban az esetben, ha az immunrendszer immunválaszt produkál a saját antigénekkal, epitópokkal szemben, autoimmun betegség alakulhat ki. Ez a patológiás autoimmunitás bizonyos esetekben sok szervet, máskor egy-egy szervet, szövetet, sejtet, sejtalkotót pusztít, legtöbbször gyulladásos formában jelentkezve. Ez alapján megkülönböztethetünk poliszisztémás és szervspecifikus autoimmun betegségeket, azonban a sejt- és szövetspecifikus autoimmun betegségek elkülönítése is indokolt.

Meg kell jegyeznünk, hogy a patológiás autoimmunitásra való hajlam bizonyos megnyilvánulási formákban és eltérő mértékben potenciálisan mindenkiben megvan. Szerencsére azonban ez nem mindenkiben jut érvényre, és nem olyan mértékben, hogy tartós autoimmun betegség alakulna ki [2]. Ma már világosan tisztázott, hogy a szervezetből nem tűnnek el teljes mértékben az autoreaktív T- és B-sejt-klónok. Egy felnőtt egyén immunrendszerének limfocitái mintegy 20-30% arányban autoreaktivitási képességgel rendelkeznek [3].

Az egészséges egyén fiziológiás immunreaktivitását eredményező immunológiai toleranciájának kialakításához alapvetően hozzájárulnak a regulatív T-sejtek, így a CD4⁺CD25⁺, az IL-10 termelő Tr1 típusú, illetve a TGF- β termelő Th3 sejtek, a természetes ölő (natural killer, NK-) T-sejtek és egyéb humorális és sejtes mechanizmusok [2,4] Az autoimmun betegségek etiopatogenetikai hátterét az immuntolerancia valamilyen szinten

jelentkező zavara, a fenti regulatív sejtek diszharmóniája képezi. A szabályozási rendellenességet genetikai, hormonális és környezeti tényezők (főképp infektív ágensek) kölcsönhatásai idézik elő. Az exogén tényezők között, a már említett mikrobiális faktorok mellett fontosak a különféle kémiai anyagok, vegyszerek és gyógyszerek betegségprovokáló hatása [2].

Autoimmun betegségről azonban egy konkrét esetben akkor beszélhetünk, ha az autoimmunitáshoz, mint immunpatológiai folyamathoz klinikai tünetek, illetve patológiai következmények társulnak [2]. Egy adott kórkép autoimmun betegséggént való besorolásához az alábbi kritériumoknak kell teljesülni:

- ismerni kell az autoantigéneket, epitopokat
- ki kell tudni mutatni az autoantitesteket, illetve az autoreaktív T-sejteket
- legyen állatkísérletes modell
- passzív transzferrel bizonyítani kell az autoantitestek, az autoreaktív T-sejtek patogén szerepét [2].

Az immunológia területén belül, az autoimmun betegségek elméleti és gyakorlati klinikai vonatkozású kutatása kiemelt jelentőséget kapott. A kutatási terület fő kérdései közé tartozik, hogy milyen előnyöket biztosít az ún. fiziológiásan is meglévő autoreaktivitási kapacitás, milyen szabályozási mechanizmusok biztosítják a sajáttal szembeni toleranciát, milyen formában, hol és hogyan sérül az immunológiai szabályozás, amely így patológiás immunológiai történések révén autoimmun betegséghez vezethet [3].

Munkám során az immunológia tolerancia kialakításában fontos szerepet játszó regulatív T sejtek – különös tekintettel a $CD4^+CD25^{+}$ "bright" gátló aktivitású (tolerogén regulatív) T sejtek – szerepét vizsgáltam poliszisztémás autoimmun betegségekben (szisztémás lupus erythematosus és kevert kötőszöveti betegség) és Hodgkin lymphomában.

1.2 Szisztémás lupus erythematosus (SLE)

Klinikailag változatos, sokszínű poliszisztémás betegség. Jellemzője, hogy többféle autoantitest képződik a sejtmag, citoplazma, membrán komponensek és szolúbilis fehérjék ellen. A legjelentősebbek az anti-dsDNA, anti-Sm, anti-foszfolipidek, anti-La, anti-Ro, SS-A, SS-B. Az autoantitestek a komplement aktiváció illetve az ún. ADCC (antigén dependens citotoxicitás) mechanizmus révén citotoxikus hatást fejtenek ki. Ennek következtében lymphopenia, T-citopenia, valamint monocitopenia alakulhat ki, egyéb célsejtek pusztulása mellett.

Az autoantitestek és autoantigének által képzett keringő, és a szövetekben lerakódott immunkomplexek mennyisége jelentősen megnövekszik, s típusos szerv- illetve szövetkárosodásokat (vese, ízület, idegrendszer) idéznek elő. Ennek tekintetében a szisztémás lupus erythematosus klasszikus immunkomplex betegségnek tekinthető. Mindezen humorális mechanizmusok mellett a Th1 típusú immunmechanizmus szerepköre is ismertté vált. Az SLE multifaktoriális betegség [5, 6].

A lupus pathogenezisében mind genetikai, mind környezeti tényezők egyaránt közrejátszanak. Egyértelmű a HLA-DR2 és HLA-DR3 génekkel való asszociáció, de mellette egyéb HLA független lokuszok szerepe is előtérbe került [7, 8]. A környezeti tényezők között kiemelt jelentőségű a vírusok (EBV, cytomegalovírus, retrovírusok) szerepe, valamint a proinflammatorikus citokinek felszabadulását elősegítő és a keratinociták apoptózisát fokozó ultraibolya (UV) sugárzás [6].

A betegség pathogenezisében fontos szerepet játszik az immunreguláció sérülése, amelynek következtében az autoreaktív T- és B-sejtek aktivitása fokozódik. Az SLE-s betegek B-sejtjei nagy mennyiségű autoantitestet termelnek. Az ilyen B-sejt klónok fennmaradásában kulcsfontosságú a T-sejtes szuppresszió csökkent mértéke, illetve hiánya. A B-sejt aktivációs faktorok, mint a BlyS, termelése fokozott mértékű SLE-ben, s ez szintén elősegíti az autoreaktív B-sejt klónok fennmaradását [9].

Az SLE-s betegek B- illetve T-sejtjeiben a szignalizáció folyamata is sérült, amelynek következtében abnormálisan magas intracelluláris kalcium szint és fokozott tirozin foszforilált fehérje termelés mutatható ki [10].

A keringő citokinek közül, a perifériás T-helper sejtek, valamint a regulatív Tr1 típusú sejtek által termelt IL-10 fokozza a B-sejtek proliferációját és autoantitest termelését. Az SLE-s betegek szérumában az IL-10 koncentrációja szignifikánsan magasabb, mint az egészséges személyekében [11]. A lupusos betegek IL-10-el stimulált B-sejtjein fokozott autoantitest termelés mutatható ki [12].

A tumor nekrozis faktor alfa (TNF- α) blokkoló gyógyszerek, mint az etanercept és az infliximab fokozhatják az anti-DNS autoantitest termelését [6, 13, 14].

Martinez és mtsai kimutatták, hogy a Foxp3 expresszáló, ún. természetesen megjelenő CD4⁺CD25⁺"bright" T sejtek százalékos aránya csökkent az SLE-s betegek perifériás vérében [15]. Az IL-10 termelő Tr1 sejtek szerepéről SLE-ben még keveset tudunk. Munkacsoportunk korábban már kimutatta, hogy a periférián a CD4⁺ sejtek között magas az intracitoplazmatikus IL-10 tartalmú sejtek száma [16]. Meglehetősen ellentmondásosak azok az irodalmi adatok, amelyek a betegség aktivitását jelző SLEDAI (SLE Disease Activity Index) és a regulatív

sejtek aránya közötti összefüggést vizsgálták. Azonban a természetesen megjelenő regulatív sejtek arányában tapasztalható csökkenés, minden bizonnyal lényegi szerepet játszik a betegség pathomechanizmusában.

1.3 Kevert kötőszöveti betegség (MCTD)

Az MCTD-t mint önálló entitást sokáig vitatták, de úgy tűnik a vita eldőlt. Az MCTD önállósága mellett szóló tények között szerepel a jellegzetes klinikum, az U1-RNP elleni antitest pozitivitás és az erekben megnyilvánuló proliferatív patológiai elváltozások és klinikai következmények.

A kevert kötőszöveti betegség (mixed connective tissue disease – MCTD) krónikus gyulladással járó poliszisztémás autoimmun kórkép.

A betegség elnevezése arra utal, hogy az MCTD-s betegekben észlelt eltérések a négy klasszikus poliszisztémás autoimmun betegség, a szisztémás lupus erythematosus (SLE), progresszív szisztémás sclerosis (PSS), rheumatoid arthritis (RA) és a polymyositis-dermatomyositis (PM/DM) egy-egy sajátos tünetét hordozzák. A változatos tünetcsoporttal jellemzett betegek közös jellemvonása, hogy az extrahálható nukleáris antigén (ENA) ribonucleoprotein (RNP) komponense ellen termelődött autoantitest megjelenik a betegek szérumában. A hosszabb távú megfigyelések alapján elmondható, hogy 10-20%-ban megjelenik a veseérintettség, a gyulladós myositis nehezen befolyásolható, gyakori a pulmonáris érintettség, mely a tüdő kisartériáinak endothelsejt-proliferációjával jár, s ami nemegyszer végzetes kimenetelű pulmonáris hypertenzióhoz vezet [17].

A szerológiai eltérések közül ki kell emelni az emelkedett, de a betegség ideje alatt fluktuáló IL-10 és TNF- α szinteket [18, 19, 20]. Az említett citokinek és a betegség aktivitása közötti összefüggést tárgyaló irodalom napjainkban még meglehetősen ellentmondásos. Az emelkedett IL-10 szintről beszámoló tanulmányokkal összhangban, munkacsoportunk egy korábbi vizsgálatában kimutattuk, hogy a CD4⁺ sejtek intracitoplazmatikus IL-10 termelése emelkedett az MCTD-s betegek perifériás vérében [21]. Az eddigi eredmények azt mutatják, hogy a betegség pathogenezisének hátterében immunregulációs zavar áll. Az MCTD irodalmát áttekintve, eddig még nem található olyan közlemény, amely azt vizsgálná, hogy a kevert kötőszöveti betegségben van-e módosulás a perifériás CD4⁺CD25⁺“bright” és a CD4⁺IL-10⁺ sejtek arányában illetve, hogy a betegség pathomechanizmusában a regulatív sejtek milyen szerepet tölthetnek be.

1.4 Hodgkin lymphoma

A betegség fő jellegzetessége, a tumor 1-2%-át alkotó, Hodgkin-Reed-Sternberg (HRS) sejtek jelenléte, amelyeket nagy mennyiségben vesznek körül reaktív limfociták [22, 23;]. A HRS sejtek B-limfocita eredete bizonyítást nyert, s ezáltal a malignus kórképeken belüli elkülönültsége megszűnt, s ez, a Hodgkin lymphoma elnevezéssel a malignus lymphomák csoportjába való egyértelmű betagozódással jár együtt. A HRS sejtek B-limfocita eredetére utal, hogy a normál B-limfociták aktivációjában szerepet játszó kostimulációs molekulák (CD15, CD30 és CD40) jelennek meg a sejtek felszínén [24]. A Bcl-2 családba tartozó Bcl-2 és Bcl-xL anti apoptotikus molekulák expressziója segíti a HRS sejtek túlélését, a Ki67 sejtproliferációs marker pedig a HRS sejtek osztódására és a betegség agresszív jellegére utal [24].

A HRS sejtek B-limfocita eredetét bizonyítja, hogy kimutatható bennük az immunglobulin (Ig) gének átrendeződése [25]. Bár a sejtekben a folyamat valóban végbemegy, mégsem termelnek immunglobulinokat. Az ezt megakadályozó molekuláris mechanizmusok aktiválását kiválthatja egy infekció, mint amilyen az Epstein-Barr vírus (EBV) fertőzés. Ez egyéb molekuláris útvonalak stimulációja révén megmentheti az apoptózisra ítélt sejteket a pusztulástól [26]. Az Epstein-Barr vírus DNS-e a HL biopsziák mintegy 25-50%-ban kimutatható, s transzgénikus kísérletekben az EBV LMP-1 fehérje overexpressziója a B-sejtek immortalizációját váltotta ki [27]. A fertőzés a HRS sejtek citokin (IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-13, IL-17) és kemokin (IL-8, TARC, MDC, Eotaxin, MCP-4, Ip-10, RANTES, Mig, MIP1 α) termelésére is befolyással lehet. Különösen fontosak az immunszuppresszív hatású IL-10 és a TGF- β [28].

Az immunszuppresszió fogalma már régóta kötődik a Hodgkin lymphomához. Dorothy Reed 1902-ben gyengyült hiperszenzitivitási reakciót mutatott ki észleltek [29,30]. Szintén a csökkent immunreaktivásra utal, hogy csökkent a beültetett szervek, szövetek kilökődése, a perifériás mononukleáris sejtek gyenge válasza a mitogénre, stb [31 - 34].

Mostanra a T-sejtek működéséről sok információ áll rendelkezésünkre és lehetővé vált a CD4⁺ sejtek különböző alcsoportjainak kimutatása, elkülönítése. Az utóbbi egy évtizedben a kutatás előterébe kerültek a regulatív aktivitással rendelkező, CD4⁺ T sejtek. Úgy tűnik ezek a sejtek, a HL pathomechanizmusában is kiemelten fontos szerepet töltenek be. Marshall és mtsai a tumoros nyirokcsomókban feldúsult limfocitákat vizsgálva kimutatták, hogy a CD4⁺ sejtek jelentős része a regulatív sejtek bizonyos jellemzőit hordozza, azaz CD25⁺, CTLA-4⁺, illetve intracitoplazmatikus IL-10 pozitív. A sejtek szuppresszor aktivitását vizsgálva igazolták,

hogy a nyirokcsomókba infiltrált sejtek a gátló hatásukat sejt-sejt kontaktus, IL-10 és CTLA-4 révén egyaránt kifejthetik [35].

1.5 Természetes és indukálható regulatív sejtek

A szervezet saját és nem-saját antigéneinek felismerését és megkülönböztetését lehetővé tévő mechanizmusban (tolerancia) bekövetkező sérülések autoimmun betegségek kialakulását eredményezhetik. Az elsődleges mechanizmus a tolerancia kialakulásában a tímuszban végbemenő „negatív szelekció” folyamata, amely során az autoreaktív T-sejtek apoptózissal elpusztulnak. Néhány saját antigént felismerő sejt azonban megmenekülhet és kikerülhet a perifériára. Ezen sejtek működését viszont az ún. regulatív sejtek kontrollálják.

Habár a regulatív T-sejtek elmélete az 1960-as évekre nyúlik vissza, kutatásuk az utóbbi 10 évben kapott nagyobb lendületet. Az 1990-es évek közepén Sakaguchi és mtsai kimutatták, hogy egérműkísérletek során az olyan CD4⁺ sejtek adoptív transzfere, amelyek közül eltávolították a CD25⁺ sejteket, autoimmun betegségeket indukált [36]. A későbbiek során *in vitro* és *in vivo* is sikerült igazolni a CD4⁺CD25⁺ sejtek regulatív hatását. A regulatív sejtek nemcsak az effektor T-sejtek, hanem az antigén-prezentáló sejtek és a B-sejtek működését is képesek szabályozni. Ma több sejtcsoportot ismerünk, amely adott körülmények között képes az említett sejtek proliferációját, citokin termelését, aktivitását gátolni. Az egyik fő csoportot az ún. természetes regulatív T-sejtek képezik, melyek CD4 pozitívak és nagy mennyiségben expresszálják a CD25 molekulát valamint a FoxP3 transzkripciós faktort. A másik fő csoportba az úgynevezett indukálható regulatív sejtek tartoznak, s a két leggyakrabban vizsgált csoportjuk az IL-10 termelő, CD4⁺, Tr1 típusú regulatív sejtek, valamint a TGF-β termelő, CD4⁺, Th3 típusú sejtek [1. Táblázat]. Sajnos ma még nem ismerünk olyan sejt felszíni vagy intracitoplazmatikus molekulákat, amelyek lehetővé tennék a regulatív T-sejtek egyértelmű azonosítását és elkülönítését [37].

A természetes regulatív T-sejtek általánosan elfogadott sejt felszíni azonosító molekulája a nagy mennyiségben expresszált IL-2 receptor alfa lánc (CD25). Habár a CD25 molekula megjelenhet a regulatív funkcióval nem rendelkező aktivált T-sejteken is, a humán CD4⁺ sejteken belül a CD25 expresszió mértéke alapján három sejtcsoport különböztethető meg. Az egyik a CD4⁺CD25⁻ sejtek csoportja, amely nem hordozza a CD25 molekulát, a másik CD4⁺ csoport a CD25-t csak „gyengén”, kis mennyiségben expresszálja. Ez a két sejtcsoport az *in vivo* és *in vitro* kísérletekben nem mutat regulatív tulajdonságot, ellentétben a

CD4⁺CD25⁺^{bright} T-sejtektől, amelyek fokozott CD25 expressziót mutatnak és kevert limfocita kultúrákban a CD4⁺CD25⁻ effektor T sejtek proliferációját gátolják [38].

Az irodalomban számos sejtfelszíni molekulát sorolnak fel, amely a CD4⁺CD25⁺^{bright} T-sejtek felszínén expresszálódik. Ilyenek a CTLA-4, CD62L, CD134 (OX40), GITR, a membrán kötött TGF-β valamint az apoptózisban kulcsszerepet játszó PD-L1. Azonban a felsorolt molekulák nem eléggé specifikusak a Treg sejtek azonosításához, ugyanis a T-sejtek aktivációjakor a nem regulatív funkciójú, aktivált T-sejteken is megjelennek [39]. Jelenleg a CD4⁺CD25⁺ sejtek FoxP3 expresszió mértékének a vizsgálata a legelfogadottabb módszer a természetesen megjelenő regulatív sejtek azonosítására. A *foxp3* gén az X kromoszómán helyezkedik el és a „scurfin” elnevezésű fehérjét kódolja, amely az IL-2 promoteréhez, illetve a granulocita-makrofág kolóniasztimuláló faktor „enhancer” régiójához kötődik. A FoxP3 molekula, mint represszor fehérje gátolja az IL-2 citokin termelését, s úgy tűnik a természetes regulatív T-sejtek fejlődéséhez a működése elengedhetetlen. A *foxp3* gén mutációja súlyos rendellenességeket idéz elő az immunrendszer regulatív mechanizmusában, olyan betegségeket kiváltva mint az IPEX, vagy az autoimmun diabetes [40,41,42]. Humán, nem-regulatív T-sejteknél a *foxp3* gén retrovirális expressziója olyan, a regulatív sejtekre jellemző tulajdonságok megjelenését idézte elő, mint a CD25 expresszió és a szuppresszor aktivitás [43,44].

A mechanizmus molekuláris részletei, amellyel a regulatív T-sejtek a proliferációt gátló hatásukat kifejtik, ma még nem ismertek. Jelenleg általánosan elfogadott, hogy a CD4⁺CD25⁺^{bright} T-sejtek szuppresszor aktivitása sejt-sejt kontaktus útján valósul meg [45, 46, 47], és de la Rosa és mtsai úgy vélik, hogy a CD4⁺CD25⁺^{bright} sejtek a magas IL-2R expresszió révén egyfajta kompetíciós versenyben az IL-2 molekulákat kiszűrik az autoreaktív T-sejtek elől [48]. Egy másik modell a CTLA-4 molekula szerepét hangsúlyozza, amely szintén nagy mennyiségben megtalálható a CD4⁺CD25⁺^{bright} T sejtek felszínén. Fallarino és mtsai kimutatták, hogy a CTLA-4 elősegíti a dendritikus sejtek indolamin 2,3-dioxigenáz (IDO) termelését, amely a triptofán – kinurenin átalakulást katalizálja, s a szabad triptofán mennyiségének csökkenése immunszuppresszív hatást eredményez [49]. A CD4⁺CD25⁺^{bright} sejtek képesek a CD80/CD86 molekulák sejtfelszíni mennyiségét csökkenteni a dendritikus sejteken, s így a gyenge kostimuláció által azok antigén-prezentáló sajátságát gyengíteni [50]. Bár meglehetősen ellentmondásosak az eredmények, néhány irodalmi adat azt mutatja, hogy a TGF-β szintén részt vehet a szabályozási folyamatban [45, 46], illetve a CD4⁺CD25⁻ sejtek indukciója esetén a regulatív fenotípus kialakításában [51, 52,53]. Grossman és mtsai által végzett *in vitro* kísérletekben a Treg sejtek képesek voltak

közvetlenül elpusztítani az aktivált CD4⁺ és CD8⁺ sejteket perforin- és granzyme-függő módon [54]. Azokban a betegben, ahol mutáció következik be a perforin génben, úgynevezett haemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) alakul ki. Ez a perforin jelentőségére utal az immunválaszt szabályozó folyamatokban [55]. Az IL-10 citokin szerepe a CD4⁺CD25⁺ "bright" sejtek gátló mechanizmusában nem egyértelmű, s az irodalom az IL-10 által megvalósított immunuszpresszív hatást inkább a Tr1 típusú sejteknek tulajdonítja.

Az indukálható regulatív T-sejtek csoportjába tartozó Tr1 típusú sejtek CD4⁺-ak, jelentős mennyiségű IL-10-et termelnek. A proliferációjuk *in vitro* körülmények között előidézhető, ha naiv vagy nyugvó CD4⁺ T-sejteket IL-10 és IFN- α jelenlétében anti-CD3 és anti-CD46 molekulákkal stimulálunk. Fontos szerepe van a stimulációban a természetes regulatív T-sejtek által termelt $\alpha_4\beta_7$ integrinnek [56]. A sejtek fenotípusos hasonlóságot mutatnak a természetes regulatív T-sejtekhez az anergia és CTLA-4-et expresszió tekintetében. A Tr1 típusú sejtek azonban nem expresszálnak (vagy csak kis mennyiségben) CD25, illetve FoxP3 molekulákat, és gátló hatásukat nem sejt-sejt kontaktus függő módon, hanem IL-10 révén valósítják meg [57]. Ebben a folyamatban valószínűleg a kisebb mennyiségben termelt TGF- β is szerepet játszhat [58]. Az eredetileg citokin szintézis gátló faktornak nevezett IL-10-ről később kiderült, hogy anti-inflammatorikus hatású és szuppressálja a haematopoetikus sejteket, valamint a T-sejt közvetített válaszra gyakorolt hatása révén, részt vesz a perifériás tolerancia kialakításában. Habár közvetett módon, de az IL-10 gátolja az antigén-prezentációt a dendritikus sejteken, Langerhans-sejteken és a makrofágokon. Az antigén-prezentáló sejtek citokin és kemokin termelését szintén gátolja, s ez hatással van a T-sejtek differenciációjára, proliferációjára és migrációjára [59,60, 61]. Ismert, hogy az IL-10 gátolja a T-sejtek IL-2, IL-5 és TNF- α termelését is [62,63].

Másrésről ki kell emelni, hogy az IL-10 immunstimulációs hatással is rendelkezik. Fokozza a B-sejtek átalakulását plazmasejteké, az MHC-II expressziót az egér B-sejteken, a CD5⁺ B1 sejtek expanzióját, valamint a CD8⁺ sejtek proliferációját és citotoxikus aktivitását [59, 64, 65].

A Tr1 sejtek aktivációjához, szuppresszor aktivitásuk megőrzése mellett, alapvetően fontos a TCR stimulus. Kalcium ionofór vagy PMA hatására megszűnik a rájuk jellemző citokin profil és fokozódik az IL-2 és IL-4 termelés. Az aktivációs markerek, mint a HLA-DR, CD69, CD40L normál értéket mutatnak, azonban a CTLA-4 erősebben expresszálódik, a TGF- β termelésük CTLA-4 függést mutat [66]. Nyugalmi állapotban sokféle kemokin receptort expresszálnak mint pl. CXCR3, CCR5, CCR3, CCR4, CCR8 valamint a Th1/Th2

sejtekre nem jellemző CCR7-et [67,68]. Az alacsony proliferatív kapacitásuk legalább részben az autokrin IL-10 termelésnek köszönhető [69,70].

Működésük során IL-10-et és TGF- β -t juttatnak a környezetükbe. Ezek a citokinek az APC-re, naiv és memória T-sejtekre hatva közvetlenül, illetve közvetett módon idézik elő a T-sejtes immunválasz gátlását. Egyes kísérletek az mutatják, hogy a szuppresszor aktivitásuk akkor maximális, ha a célsejtekkel a közvetlen kapcsolatuk is biztosított [58]. Ez valószínűsíti, hogy olyan inhibitor hatású sejt felszíni molekulák is részt vehetnek a folyamatban, amelyek ligandjai az APC-ken vagy a T-sejteken expresszálódnak [58].

Az indukálható regulatív T-sejtek egy másik csoportját képezik a CD8⁺ regulatív T-sejtek. Az eredetüket és a fenotípusukat tárgyaló irodalom még meglehetősen ellentmondásos. Filaci és mtsai igazolták, hogy *in vitro* körülmények között – IL-2 és GM-CSF hatására –, a frissen izolált CD8⁺CD28⁻ sejtekből regulatív tulajdonságú CD8⁺ sejtek keletkeztek. A frissen elkülönített CD8⁺CD28⁻ sejtek nem mutattak szuppresszor sajátosságot. A CD8⁺ regulatív sejtek IL-10 révén fejtik ki sejtproliferáció gátló hatásukat [71, 72]. Gonzalez-Rey és mtsai kimutatták, hogy a vazoaktív intestinalis peptid (VIP) a dendritikus sejtekre gyakorolt hatása révén elősegíti az IL-10 termelő CD8⁺ regulatív T-sejtek keletkezését [73]. Az *in vitro* generált, regulatív CD8⁺CD28⁻ sejtek FoxP3 pozitívak, míg a frissen izolált sejtek nem expresszálják a FoxP3-at. Az immunregulációban betöltött szerepük még nem tisztázott teljesen, de a jelentőségükre utal, hogy számuk – a CD4⁺CD25⁺“bright” sejtekkel együtt – emelkedett a tüdőrákos betegek perifériás vérében [74].

Sejttípus	Hatásmechanizmus
Természetes CD4⁺CD25⁺“bright” T sejtek	Sejt-sejt kontaktussal megvalósuló szuppresszió
Indukálható CD4⁺IL-10⁺ Tr1 típusú sejtek	IL-10 révén kifejtett szuppresszió vagy stimuláció
CD4 ⁺ TGF- β termelő Th3 típusú sejtek	TGF- β révén kifejtett gátló hatás
Indukálható CD4 ⁺ CD25 ⁺ T sejtek	Sejt-sejt kontaktus, illetve citokinek által megvalósuló szuppresszió
CD8 ⁺ CD28 ⁻ IL-10 termelő sejtek	IL-10 révén kifejtett szuppresszió vagy stimuláció

I. Táblázat A regulatív funkciójú T-sejtek fő típusai és hatásmechanizmusuk.

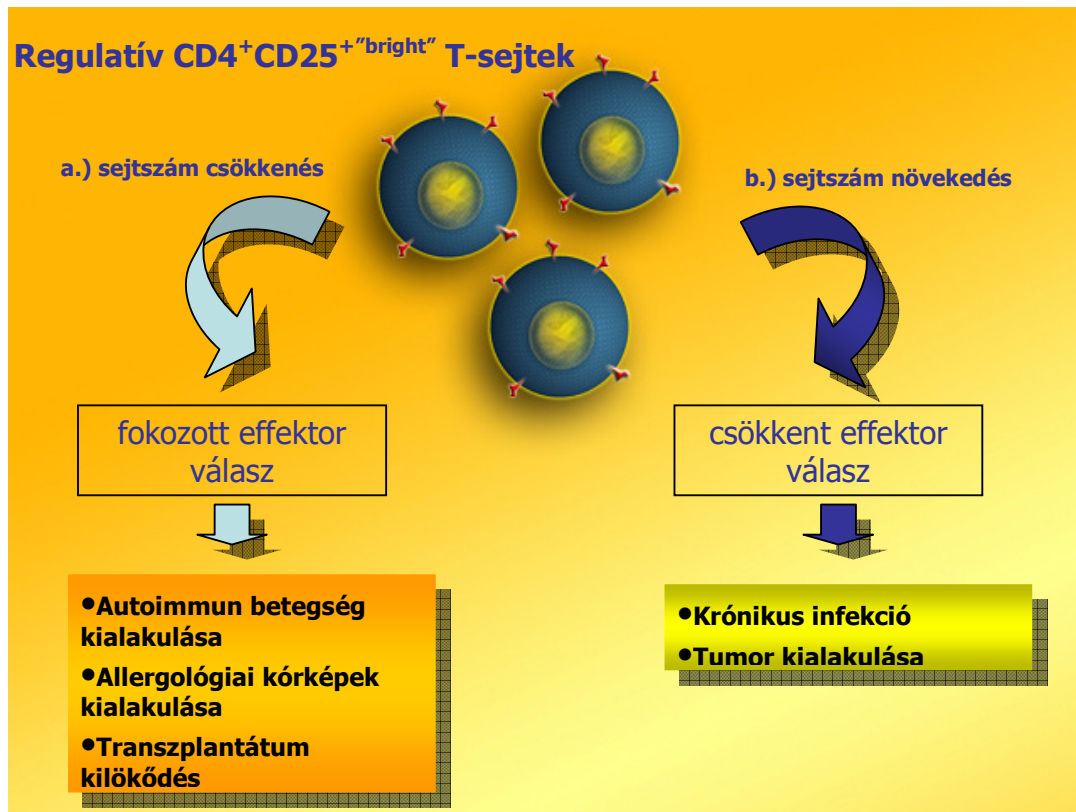
1.6 Regulatív T-sejtek autoimmun betegségekben

A regulatív T-sejtek létezését és az immunválasz valamint az autoimmun betegségekben betöltött szerepét igazolták azok a kísérletek, amelyeket az 1990-es évek közepén Sakaguchi és mtsai végeztek neonatális tímusz-irtott egereken [35]. A tímusz eltávolítása után, olyan $CD4^+$ sejteket juttattak az egerekbe, amelyek közül eltávolították a $CD25^+$ sejteket. Ezt követően az egereken különféle autoimmun kórképek jelentkeztek, mint colitis, gastritis, inzulin függő diabetes és thyroiditis. A $CD4^+CD25^+$ sejtek adoptív átvitele azonban megakadályozta az autoimmun kórképek kialakulását.

Bár a regulatív T-sejtek működésének molekuláris mechanizmusa még nem ismert, ma már több humán autoimmun betegségben kimutatták, hogy csökkent a számuk és/vagy a szuppresszor funkciójuk mértéke (1. ábra a.). Az autoimmun betegségek és a regulatív T-sejtek kapcsolatára vonatkozó irodalom tartalmaz ellentmondásokat, ezt azonban feloldhatja a szabályozási folyamat betegségre specifikus eltéréseinek jobb megismerése.

A természetes regulatív T-sejtek csökkent arányát írták le sclerosis multiplexben, Kawasaki betegség esetén, 1-es típusú diabetesben és SLE-ben. A rheumatoid arthritisben (RA) szenvedő betegek synovialis folyadékában a $CD4^+CD25^+$ sejtek száma emelkedett a perifériás vérhez képest, a szuppresszor aktivitás mértéke pedig nem tért el az egészséges személyeknél mérthez képest. Sjögren szindróma esetén a perifériás $CD4^+CD25^+$ sejtek száma emelkedett, azonban a betegség aktivitásával ez nem szignifikáns mértékre csökkent. Hodgkin lymphomás betegeknek a tumor területén emelkedett a $CD4^+CD25^+$ és a Tr1 típusú regulatív T-sejtek száma. Psoriasis, myasthenia gravis, sclerosis multiplex és szisztémás lupus erythematosus esetén a természetes regulatív T-sejtek csökkent szuppresszor aktivitása volt kimutatható [75-77, 15].

A szabályozási folyamat jobb megismerését segíti elő, ha minél több betegségre vonatkozólag ismerünk adatokat a regulatív T-sejtek számának változásáról. Több autoimmun betegség esetén még hiányosak az ismereteink a regulatív sejteket illetően, ezért kezdtük el vizsgálni a sejtek arányát és abszolút számát kevert kötőszöveti betegségben, szisztémás lupus erythematosusban, illetve Hodgkin lymphomában.



1. ábra A regulatív T-sejtek számának változása és annak lehetséges következményei

1.7 Regulatív T-sejtek tumoros megbetegedésekben

A regulatív T-sejtek funkcióját figyelembe véve az elméleti megfontolások azt sugallják, hogy a tumoros rendellenességek egyik oka lehet, hogy a regulatív T-sejtek túlsúlya vagy fokozott működése, gátolja a tumorra szembeni immunválaszt (1.ábra b.). Kimutatták, hogy a tüdőrákos betegek perifériás vérében a CD4⁺CD25⁺ sejtek aránya emelkedett [78,79]. A további megfigyelések szintén azt mutatják, hogy a regulatív T-sejtek gátolják a tumorra szembeni immunitást, mivel ezen sejtek aránya emelkedett a tumoros betegek vérében, a nyirokcsomókban és az érintett szövetekben. Petefészek tumoros betegek vizsgálata során kimutatták, hogy a tumor-sejtek és a mikrokoznyezetükben lévő makrofágok CCL22 kemokint szekretálnak, amely a regulatív sejtek CCR4 receptorával kölcsönhatásba lépve kemoattraktív jelzésként szolgál [80]. Azonosíthatók olyan regulatív sejtek, amelyek a humán tumorok által expresszált antigénekre specifikusak. Felhalmozódásuk az érintett szövetekben rossz prognózisra és a betegek csekélyebb túlélési esélyeire utal. Emelkedett regulatív T-sejt

számot mutattak ki tüdőrák, nyaki tumorok, emésztőrendszeri daganatos betegségek, bőr-, illetve emlőrák esetén [81-85].

A jelenlegi tumor vakcinák és immunterápiák sikerességének javításához fontos, hogy megértsük az egyes regulatív T-sejt csoportok szerepét az adott betegségben. A fokozott szuppresszor aktivitásuk csökkentése egy lehetséges stratégiát jelenthet az immunterápiák között.

2. Célkitűzések

Munkánk során a regulatív típusú sejtek két fő alcsoportjának, az ún. természetes regulatív CD4⁺CD25⁺“bright” T-sejtek és az indukálható, IL-10 termelő CD4⁺ Tr1 típus T-sejtek szerepét igyekeztünk megismerni poliszisztémás autoimmun kórképek és tumoros megbetegedések esetén. Két poliszisztémás autoimmun kórkép, a szisztémás lupus erythematosus (SLE) és a kevert kötőszöveti betegség (MCTD) és egy limfoproliferatív elváltozás, a Hodgkin lymphoma esetén vizsgálatuk a fent említett sejtek előfordulási arányát a betegek perifériás vérében. A regulatív T-sejt csoportok százalékos arányát és abszolút számát egészséges személyek adataival vetettük össze, illetve a Hodgkin lymphomás betegeknél pozitív kontroll csoportként emlő tumoros betegeket vizsgáltunk. A sejtek vizsgálata a CD3, CD4, CD25, CD69, HLA-DR sejtfelszíni molekulák és az intracitoplazmatikus IL-10 és a FoxP3 transzkripció faktor expressziójának mértéke alapján történt. A vizsgálataink megkezdésekor még nem állt rendelkezésre irodalmi adat a regulatív T-sejtekre vonatkozólag a fent említett kórképekben, ezért vizsgálataink céljait az alábbiakban határoztuk meg:

1.) Az irodalmi adatok hiánya miatt, célunk volt alapadatokat szolgáltatni a regulatív T-sejtek számának esetleges változásairól a fent említett kórképekben.

2.) Kérdésünk volt, hogy kimutatható-e eltérés a regulatív T-sejtek számában - különös tekintettel a CD4⁺CD25⁺“bright” regulatív sejtekre -, illetve százalékos arányában SLE-ben? Megállapítható-e valamilyen korreláció a betegség aktivitásának jellemzői (SLEDAI, anti-dsDNS koncentráció) és a regulatív T-sejtek számbeli változása között? A súlyos SLE-s betegeknél alkalmazott alternatív kezelési mód, a plazmaferezis, gyakorol-e valamilyen hatást a betegek CD4⁺CD25⁺“bright” regulatív T-sejtjeinek abszolút számára?

3.) A kevert kötőszöveti betegségben a módosult immunregulációra utaló jelek megfigyelhetők, de az irodalomban nem található semmilyen utalás a regulatív T-sejtek MCTD-ben betöltött szerepét illetően. Kimutatható-e változás a regulatív T-sejtek számában egy ilyen összetett poliszisztémás autoimmun betegség esetében is?

4.) Hodgkin lymphomában szintén számos jel utal egy felfokozott immunszuppresszív állapotra, s annak szerepére a betegség pathogenezisében. Ezért kezdtük el vizsgálni, hogy igazolható-e a regulatív T-sejtek fokozott jelenléte a periférián komplett remisszióban lévő betegek esetén, s ez mutat-e összefüggést a korábban alkalmazott terápiákkal, vagy a kezelés óta eltelt idővel.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1 A vizsgálatok fő eszközei és vegyszerei

3.1.1. *Mintavétel*

A vizsgálatokhoz felhasznált vérmintákat véralvadásgátlóval (heparin, EDTA) kezelt vákuumcsövekbe (BD Vacutainer, Becton Dickinson, USA) vettük le a betegektől.

3.1.2 *Monoklonális ellenanyagok*

- CD3-QR (Sigma-Aldrich, Germany)
- CD4-FITC (Sigma-Aldrich, Germany)
- CD8-FITC (Sigma-Aldrich, Germany)
- CD25-PC5 (Beckmann-Coulter, Immunotech, France)
- FoxP3-PE (eBioscience, USA)
- IgG1-FITC izotípus kontroll (Sigma-Aldrich, Germany)
- IgG1-QR izotípus kontroll (Sigma-Aldrich, Germany)
- IgG1-PE izotípus kontroll (Beckmann-Coulter, Immunotech, France)
- IL-10-PE (Becton-Dickinson, USA)

3.1.3. *Oldatok*

Vörösvértestek lizálása:

A oldat (100 ml desztillált víz + 180 µl hangyasav)

B oldat (Na₂CO₃:1,5g; NaCl:3,62g; Na₂SO₄:7,78g; + 250 ml desztillált víz)

2%-os paraformaldehid

Azidos BSA-s PBS

1%-os paraformaldehid

Intracelluláris jelölés:

FoxP3 festés: A oldat, B oldat, permeabilizáló és fixációs puffer (az összetételüket az eBioscience nem hozza nyilvánosságra)

IL-10 festés: Becton-Dickinson cég permeabilizáló és fixáló oldatai

3.1.4. *Eszközök*

Falcon cső (Becton-Dickinson, USA)

Centrifuga csövek

Eppendor csövek

Pipettahegyek

3.2. Módszerek

3.2.1. $CD4^+CD25^+$ T sejtek sejtfelszíni jelölése fluoreszcens molekulákkal jelölt monoklonális antitestek felhasználásával

A sejtfelszíni CD antigének ellen termeltetett monoklonális ellenanyagokból 5-10 μ l-t kimértünk Falcon csövekbe, majd hozzáadtunk 100 μ l heparinnal alvadásgátolt teljes vért. A mintákat ezután 30 percig inkubáltuk sötétben, szobahőmérsékleten. Az inkubálás után a vörösvértestek lízisét az alábbi módon végeztük. Az egyes mintákhoz 400 μ l A oldatot adtunk és rögtön vortexeltük 10 másodpercig. Ezt követően hozzámértünk 250 μ l B oldatot illetve 400 μ l 2%-os paraformaldehidet. A lizált vörösvértestek kimosásához 2-2 ml Azidos-BSA-s PBS-t használtunk, majd a mintákat 1800 rpm-en 3 percig centrifugáltuk. Ezt a lépést még kétszer megismételtük, s végül a sejteket 800 μ l, 1%-os paraformaldehidbe vettük fel.

3.2.2. $CD4^+IL-10^+$ és $CD8^+IL10^+$ sejtek intracitoplazmatikus jelölése

Első lépésben heparinnal alvadásgátolt vérből 1,5 ml-t PBS-el kétszeresére hígítottunk. A limfocitákat PMA-val (forbol 12-mirisztoil 13-acetát) (25 ng/ml) és ionomycinnel (1 μ g/ml) 37°C-on, 5%-os CO₂ tartalom mellett stimuláltuk 4 órán keresztül. A *de novo* szintetizált citokinek felszabadulását a Golgi apparatus Brefeldin-A-val (10 μ g/ml) történő blokkolásával akadályoztuk meg. Az inkubációt követően a sejtfelszíni CD4, illetve CD8 molekulákat megjelöltük Quantum Red fluorokrómmal konjugáltatott monoklonális ellenanyag segítségével. A festési lépés után a vörösvértesteket lizáltuk és a limfocita membránokat permeabilizáltuk. A Golgi apparatusban lévő citokineket fluorokrómmal konjugáltatott monoklonális antitestekkel jelöltük. A sejteket 1%-os paraformaldehiddel fixáltuk. A felhasznált anyagok: CD4-QR, PMA, ionomycin, Brefeldin-A (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany), lysing solution, permeabilising solution (Becton Dickinson, USA), intracitoplazmatikus IL-10 (Caltag Laboratories, San Francisco, CA, U.S.A).

3.2.3. $CD4^+CD25^{+}$ "bright" T sejtek FoxP3 pozitivitásának igazolása intracitoplazmatikus jelöléssel

Az intracitoplazmatikus jelöléshez heparinnal alvadásgátolt vérből, Ficoll gradiens módszerrel izolált perifériás mononukleáris sejteket (PBMC) használtunk. A PBMC-eket a Ficoll-os szeparálás után háromszor mostuk PBS-ben, majd centrifugálással összegyűjtöttük és az intracelluláris festéshez használt kit (eBioscience) A-oldatában felszuszpendáltuk. A

sejtszuszpenziót egy éjszakán keresztül -20°C-on inkubáltuk. Másnap a sejteket óvatosan felolvasztottuk, centrifugálással összegyűjtöttük, majd felszuszpendáltuk a B-oldatba s 20 percig inkubáltuk, 4°C-on, sötétben. Ezután a B-oldatot eltávolítottuk és a mintákat az ún. “Staining Buffer”-rel (továbbiakban: jelölő puffer) kétszer mostuk. Centrifugálás után a sejteket a jelölő pufferben felszuszpendáltuk (10⁷sejt/ml koncentrációban). A mintákat 100 µl-ként Falcon csövekbe mértük (10⁶ sejt/cső). Hozzáadtunk 20 µl “Blocking” puffert és 15 percig sötétben, szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezt követően a sejtfelszíni jelölés (CD4 /5 µl/, CD25 /10 µl/) és az intracitoplazmatikus jelölés (FoxP3 /10 µl/) egyidejűleg történt. A mintákat 30 percig sötétben, szobahőmérsékleten inkubáltuk. Végül a sejteket a jelölő pufferrel kétszer mostuk és ebben felszuszpendálva a mintákat FACSCalibur (Becton Dickinson) típusú áramlási citométeren a CellQuest szoftver segítségével vizsgáltuk.

3.2.4. Az áramlási citometriás vizsgálatok technikai jellemzői

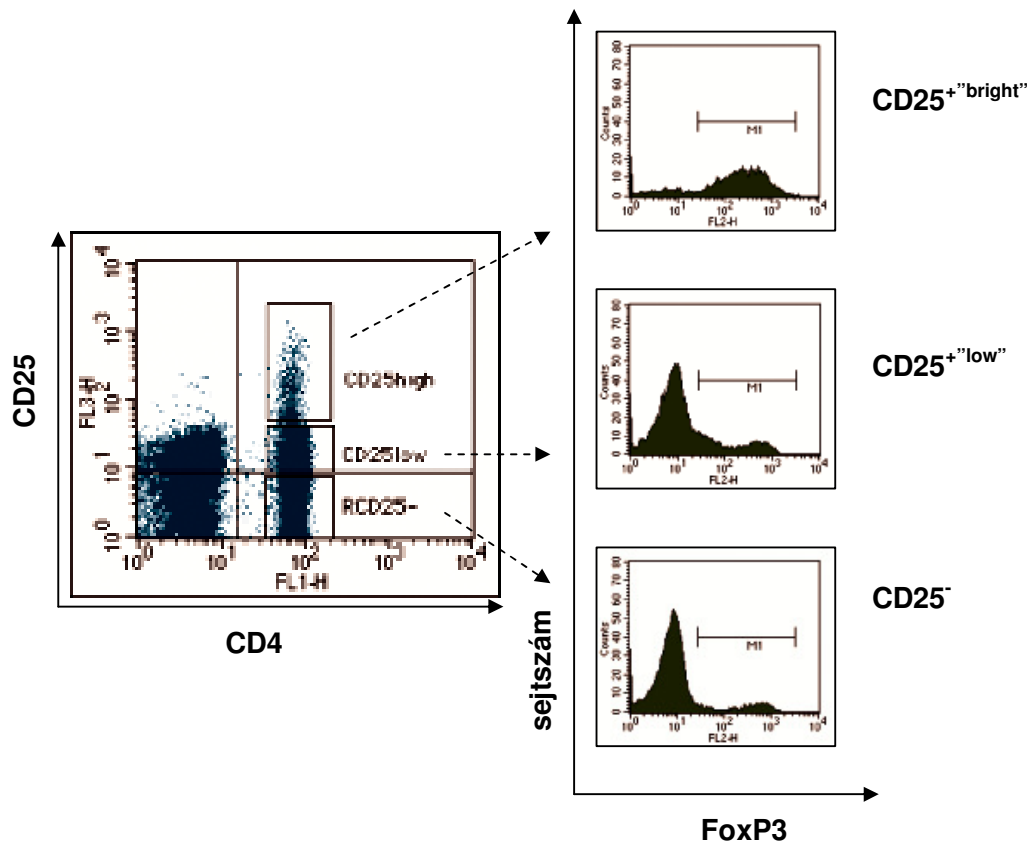
3.2.4.1. Az áramlási citométer (Becton Dickinson FACSCalibur) detektorainak feszültségértékei és kompenzációs beállításai:

Detektorok/Erősítők:			
Detektor	Feszültség	Erősítés	Mód
FSC	E00	1.90	Lin
SSC	411	1.00	Lin
FL1	650	1.00	Log
FL2	609	1.00	Log
FL3	720	1.00	Log
Elsődleges paraméter: FSC			
Érték: 239			
Kompenzáció:			
FL1 - 0,5% FL2			
FL2 – 31,0% FL1			
FL2 – 4,3% FL3			
FL3 – 20,4% FL2			

II. Táblázat Az áramlási citométerdetektorainak feszültségértékei és kompenzációs beállításai

3.2.4.2. Sejtek kapuzása, hisztogramok, pontdiagramok

Az adatok kiértékelését a Becton Dickinson cég CellQuest szoftverével végeztük. A limfocitákat, monocitákat és granulocitákat nagyságuk és granuláltságuk alapján különítettük el. A forward scatter (FSC) és side scatter (SSC) paraméterek alapján kiválasztott (kapuzott) limfocitákat vizsgálatuk tovább. Az 1. ábra a CD4⁺CD25⁺“bright” T-sejtek FoxP3 pozitivitását mutatja.



2. ábra A humán $CD4^+ CD25^{+}$ "bright" regulatív T-sejtek a $CD4^+$ sejtek 5-10%-t alkotják. A $CD4^+ CD25^+$ sejteket megjelenítő „dot-plot”-on a $CD4^+$ sejtektől kissé balra tolódva, a $CD25^+$ sejtektől kissé magasabban helyezkednek el, ami a fokozott $CD25$ expresszió következménye. Az ábra histogramjai igazolják, hogy a $CD4^+ CD25^{+}$ "bright" T-sejtek FoxP3 pozitivitást mutatnak.

3.2.5. Abszolút sejtszám meghatározás

A $CD4^+ CD25^{+}$ "bright", $CD4^+ IL-10^+$ és $CD8^+ IL-10^+$ regulatív T-sejtek abszolút számait az áramlási citometriával meghatározott százalékos értékekből és haematológiai automatán végzett limfocita abszolút sejtszám (10^9 sejt/liter) meghatározásokból számítottuk.

3.2.6. Plazmaferezis

Azon súlyos SLE-ben szenvedő betegek esetén, akiknél a gyógyszeres kezelésnek nem várt illetve súlyos mellékhatásai jelentkeztek, valamint akiknél egyéb okok miatt a gyógyszeres kezelés nem volt alkalmazható, a betegek állapotának javítására ismételt plazmaferezis kezeléseket alkalmaztak a klinikánk orvosai. A vizsgálatokkal kapcsolatban

esetlegesen felmerülő etikai problémák kiküszöbölésére a plazmaferezis megkezdése előtt, minden beteg beleegyező nyilatkozatot adott. A plazmaferezishez folyamatos áramlási típusú sejtszeparátort használtak (Baxter Fenwal CS-3000 Plus, USA). Egy napon csak egy plazmaferezis kezelés történt. Egy-egy beteg a kezelések 4-6 napja alatt 3-4 plazmaferezisen ment keresztül. Testsúly kilogrammonként 30 ml plazmát távolítottak el egy betegtől, minden kezelés alkalmával. Az eltávolított plazmát Ringer és 5%-os humán albumin oldattal pótolták. Az antikoagulációt citromsavas (ACD) kezeléssel akadályozták meg. Azért, hogy a plazmaferezis regulatív sejtekre gyakorolt hatását a gyógyszerhatásoktól mentesen lehessen vizsgálni, a betegek gyógyszeres kezelésében nem volt változtatás sem a terápia alatt, sem pedig már az azt megelőző egy hétben.

3.3. Betegek

3.3.1. Szisztémás lupus erythematosus

A.) Az SLE-s betegcsoportban 42 nő és 2 férfi beteg (összesen n=44) perifériás vérében vizsgálatuk a regulatív funkciójú CD4⁺CD25^{”bright”} T sejtek százalékos arányát és abszolút számát. A betegek átlagéletkora 34 év volt (20-54). A betegség diagnózisának felállítása az American College of Rheumatology (ACR) klasszifikációs kritériumrendszere alapján történt. A betegség aktivitásának jellemzése az SLE betegség aktivitási indexe, az SLE Disease Activity Index (SLEDAI) alapján történt. Azokat a betegeket vettük klinikailag aktívnak, akiknél az SLEDAI nagyobb volt, mint 3,0. Az SLEDAI átlagértéke 6,2 (0-16), míg a betegség fennállásának átlagos ideje 4,9 év (2-12) volt. Kontrollként 32 egészséges személy vérmintáit dolgoztuk fel (18 nő, 14 férfi, átlagéletkor 39 év (22-53)).

B.) A tanulmány kibővítésekor összesen 72 lupusos beteg (63 nő és 9 férfi)adatait elemeztük. Minden betegről elmondható, hogy az ACR klasszifikációs kritériumrendszer legalább 4 pontjának megfelelt. A tanulmány idején az átlagéletkoruk 34,4±13,9 év, a betegség fennállásának ideje 9,4±8,12 év volt. A betegek között 53 személy volt a betegség inaktív és 19 személy volt az aktív stádiumában. Az inaktív stádiumban lévő betegek aktivitási indexe <5, az aktív stádiumban lévők ≥ 5 volt. Az aktív stádiumú betegnél a betegség fennállása rövidebb volt, alacsonyabb volt az átlagéletkor és magasabb SLEDAI értékkel, valamint magasabb anti-dsDNA koncentrációval rendelkeztek. A kontroll csoport 41 egészséges, korban és nemben illeszkedő személyből állt.

A betegek adatait az alábbi táblázatban foglaltuk össze:

	Összes	Inaktív	Aktív	p<
Betegek száma	72	53	19	n.s.
Nő:Férfi arány	63:9	46:7	17:2	0.03
Életkor, átlag ± SD, (év)	43.4±13.9	46.2±13.9	35.5±10.3	0.003
Betegség időtartama (év)	9.4±8.12	10.8±18.86	5.5±3.47	0.001
SLEDAI (átlag±SD)	4.34±3.64	1.74±1.68	8.63±2.95	0.001
SLEDAI medián (min-max)	4 (0-14)	2 (0-4)	8 (5-14)	n.s.
Anti-dsDNS koncentráció (IU/ml)	58.59±100.72	37.36±68.85	117.85±145.89	0.001
Methyl-prednisolon napi dózisa (mg)	7.47±7.54	4.83±3.43	14.84±10.61	0.001
Immunszuppresszív terápia (nem:igen)	48:24	41:12	7:12	n.s.
Azathioprine	10	4	6	n.s.
Chloroquin	8	6	2	n.s.
Cyclosporin A	5	2	3	n.s.
Cyclophosphamide	1	0	1	n.s.

n.s.:nem szignifikáns

III. Táblázat *A vizsgálatba bevont SLE-s betegek adatai*

C.) Az III. Táblázat mutatja annak az öt súlyosan SLE-s betegnek az adatait, akik ismételt plazmaferezis kezelést kaptak. Az átlagéletkoruk 11,6 év volt. A plazmaferezis regulatív sejtekre gyakorolt hatásának vizsgálatához - hogy a gyógyszerhatásoktól mentesen lehessen vizsgálni -, a betegek gyógyszeres kezelésében nem volt változtatás sem a terápia alatt, sem pedig már az azt megelőző egy hétben.

Betegek	Nem	Kor (év)	SLEDAI (a plazmaferezis kezdetekor)	Gyógyszerek
No 1.	Nő	20	16	GCS, Cy
No 2.	Nő	53	11	GCS, MTX, AZA, CL
No 3.	Nő	45	16	GCS
No 4.	Nő	28	8	GCS,AZA
No 5.	Nő	25	10	GCS,CL

IV. Táblázat *Plazmaferezis kezelést kapott betegek adatai*

A plazmaferezis kezelést a betegség alábbi manifesztációi tették indokolttá.

1. beteg: Szisztémás lupus erythematosus (SLE), antiphospholipid szindróma (APS) és lupus nephritis (LN) (WHO IV.) lett diagnosztizálva. A beteg aktív stádiumban maradt a kortikosteroid (Cst) és az azathioprene (AZA) terápia alatt is. A kora miatt nem kaphatott cyclosporin kezelést.

2. beteg: SLE/RA overlap-et és aktív arthritist diagnosztizáltak nála. Az alkalmazott immunszuppresszív terápianak káros mellékhatásai voltak.

3.beteg: SLE-t és LN-t állapítottak meg a betegnél. Hepathopathia miatt nem kaphatott immunszuppresszív terápiát.

4. beteg: A betegnél SLE volt diagnosztizálható, valamint recidiváló pericarditise volt a pericardialis fenesztráció ellenére. A kortikosteroid terápia miatt a kezdődő Cushing szindróma alakult ki. Korábban már rezisztensnek bizonyult a különféle immunszuppresszív terápiákra.

5. beteg: SLE-t és pancytopenia-t lehetett nála megállapítani. A Cst és AZA terápia nem vezetett eredményre és a Cst-nek káros mellékhatásai is voltak.

3.3.2. *Kevert kötőszöveti betegség*

Vizsgálatainkba 48 kevert kötőszöveti betegségben szenvedő beteget vontunk be (47 nő, 1 férfi). A betegek átlagéletkora 53 ± 9 év, a betegség fennállásának átlagos ideje 13 ± 7 év volt. A kevert kötőszöveti betegség diagnózisa az Alarcon-Segovia és Villareal kritériumrendszere alapján történt. A betegség aktivitását a SLAM index jellemezte, aminek a

tartománya 3-27-ig terjedt. A vizsgálatba bevont minden beteg megfelelt a kritériumrendszernek. Kontroll csoportként 20 egészséges nő perifériás vérben vizsgáltuk a CD4⁺CD25⁺“bright” és CD4⁺IL-10⁺ regulatív T-sejtek számát.

3.3.3. *Hodgkin lymphoma*

A klinikánkon gondozott Hodgkin lymphomás betegekből kiválasztottunk 94 komplett remisszióban lévő beteget (52 nő, 42 férfi), akik a tanulmányt megelőző három évben nem kaptak semmilyen citosztatikumot illetve immunoszuppresszív szert, nem estek át őssejt transzplantáción és nem kaptak kemo-, radio- vagy kombinált terápiát. A betegség fennállásának átlagos ideje 8,2 év (3-33) volt. A vizsgálatba bevont betegek átlagos életkora 44 év (20-77) volt, akik közül 54 személy Epstein-Barr vírus pozitívnak bizonyult. A betegek közül 39-en voltak a betegség I-II. stádiumában és 55-en a III-IV. stádiumában. A szövettani vizsgálat a WHO klasszifikáció szerint 60 betegnél mutatta ki a HL kevert sejtes, 28 betegnél nodular sclerosis, 2 betegnél a limfocita predomináns, 2 betegnél a noduláris limfocita predomináns és 2 betegnél a limfocita depléciós formáját.

„Negatív” kontroll csoportként 41 egészséges személy perifériás vérében vizsgáltuk a CD4⁺CD25⁺“bright”, CD4⁺IL-10⁺ valamint a CD8⁺IL-10⁺ sejteket. „Pozitív” kontrollként pedig, komplett remisszióban lévő, emlő tumoros nőbetegekből álló 47 fős csoportot vizsgáltunk. Ezek az emlő tumoros betegek korábban radio- illetve kemoterápiát, de a tanulmányt megelőző két évben csak hormonkezelést kaptak.

3.4. Statisztikai módszerek, adatfeldolgozás

Az adatok elemzéséhez az SPSS 11.0 statisztikai szoftvert és egyes ábrák elkészítéséhez a PAST statisztikai programot használtuk. Az eredmények értékelése során az adatsorok normalitásától függően paraméteres és nem-paraméteres statisztikai próbákat egyaránt használtunk. Két független adatsor összehasonlításához Student féle *t*-tesztet, illetve Mann-Whitney próbát, önkontrollos, ismétléses minták kiértékeléséhez ANOVA, Kruskal-Wallis teszteket használtunk. Az adatokat normál eloszlás esetén oszlop diagramokon átlag ± szórás(SD), a normál eloszlástól eltérő esetekben az eloszlást tükröző Box and Whiskers formában, a medián, a kvartilisek, a minimum és a maximum értékekkel ábráztuk. Az eredményekben mutatkozó különbségeket $p < 0,05$ értéke esetén tekintettük szignifikánsnak.

4. EREDMÉNYEK

4.1 Regulatív T-sejtek vizsgálata szisztémás lupus erythematosusban

Természetes ($CD4^+CD25^{+}$ "bright") és indukálható ($CD4^+IL-10^+$) sejtek vizsgálata szisztémás lupus erythematosusban

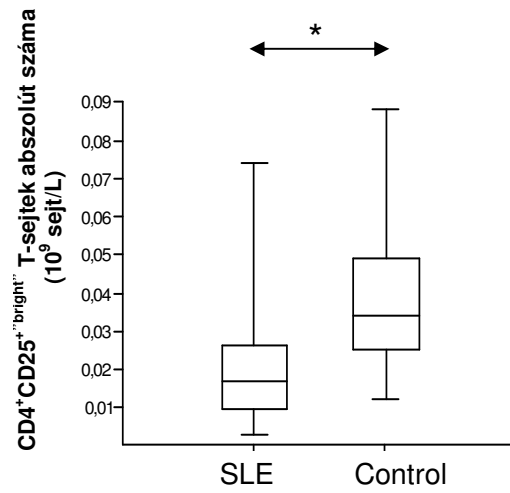
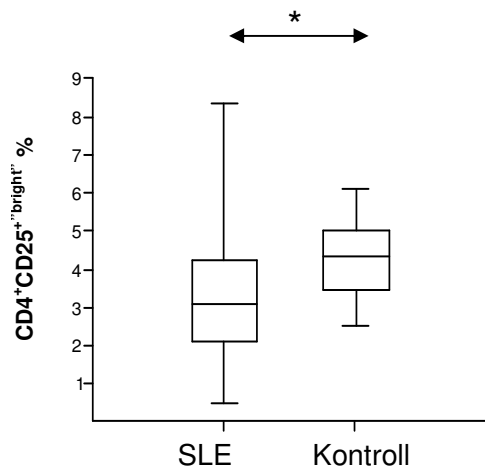
Megvizsgáltuk 72 SLE-s beteg perifériás vérében a $CD4^+CD25^{+}$ "bright" és a $CD4^+IL-10^+$ T-sejtek százalékos arányát és abszolút számát. A $CD4^+CD25^{+}$ "bright" sejtek százalékos aránya és abszolút száma egyaránt szignifikáns mértékű csökkenést mutatott az SLE-s betegekben szemben az egészséges, kontroll csoporttal. A $CD4^+CD25^{+}$ "bright" sejtek számában nem találtunk különbséget az aktív és inaktív stádiumban lévő betegek között (V. táblázat és 3. ábra a-b).

A $CD4^+IL-10^+$ sejtek százalékos aránya emelkedést mutatott, ugyanakkor az abszolút számukban nem találtunk szignifikáns eltérést a kontroll csoporthoz viszonyítva. Az aktív és inaktív stádiumú betegek között nem mutatkozott eltérés a $CD4^+IL-10^+$ sejtek számában (V. táblázat és 4. ábra a-b).

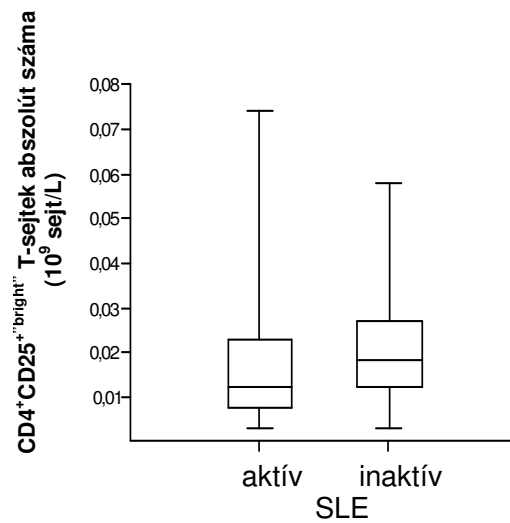
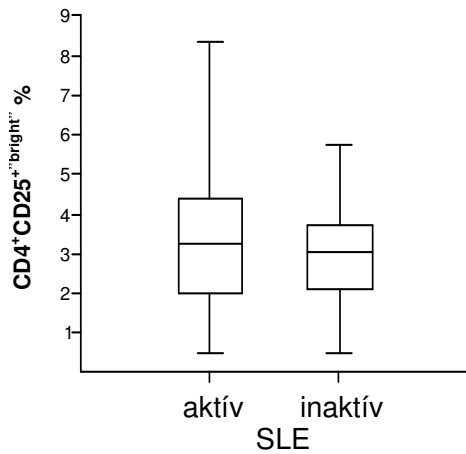
A betegség aktivitási index, az anti-dsDNA szint illetve a napi kortikosteroid dózisa nem mutatott korrelációt a vizsgált sejtcsoportok számának változásával. Szignifikáns pozitív korrelációt találtunk a SLE-DAI és az anti-dsDNA szint (r: 0,505, $p < 0,001$), SLE-DAI és a napi kortikosteroid dózisa (r: 0,499, $p < 0,001$) valamint az anti-dsDNA koncentráció és a napi kortikosteroid dózisa (r: 0,367, $p = 0,002$) között.

	SLE N=72	Aktív SLE N=19	Inaktív SLE N=53	Kontroll N=41	p érték: SLE vs Kontroll	p érték: aktív vs inaktív SLE
CD4⁺CD25⁺"bright" (%)						
Medián	3,07	3,24	3,07	4,31	0,001	n.s.
Alsó és felső kvartilis	2,08; 4,22	1,99; 4,25	2,08; 4,07	3,40; 4,91		
CD4⁺CD25⁺"bright" (10⁹ sejt/L)						
Medián	0,016	0,012	0,017	0,038	0,001	n.s.
Alsó és felső kvartilis	0,009; 0,026	0,007; 0,024	0,011; 0,026	0,0257; 0,048		
CD4⁺IL-10⁺ (%)						
Medián	18,67	19,20	18,44	12,95	0,03	n.s.
Alsó és felső kvartilis	11,05; 28,3	13,10; 29,62	10,92; 27,28	7,8; 16,2		
CD4⁺IL-10⁺ (10⁹ sejt/L)						
Medián	0,255	0,176	0,273	0,211	n.s.	n.s.
Alsó és felső kvartilis	0,150; 0,430	0,105; 0,442	0,162; 0,474	0,110; 0,310		

V. Táblázat Természetes (CD4⁺CD25⁺"bright") és indukálható (CD4⁺IL-10⁺) sejtek százalékos aránya és abszolút száma szisztémás lupus erythematosusban (n.s.: nem szignifikáns)

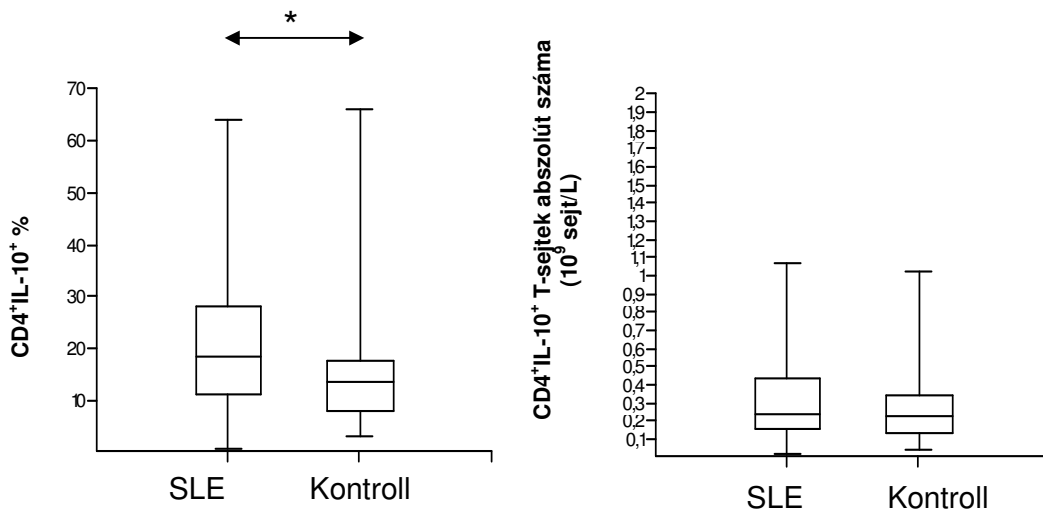


a.)

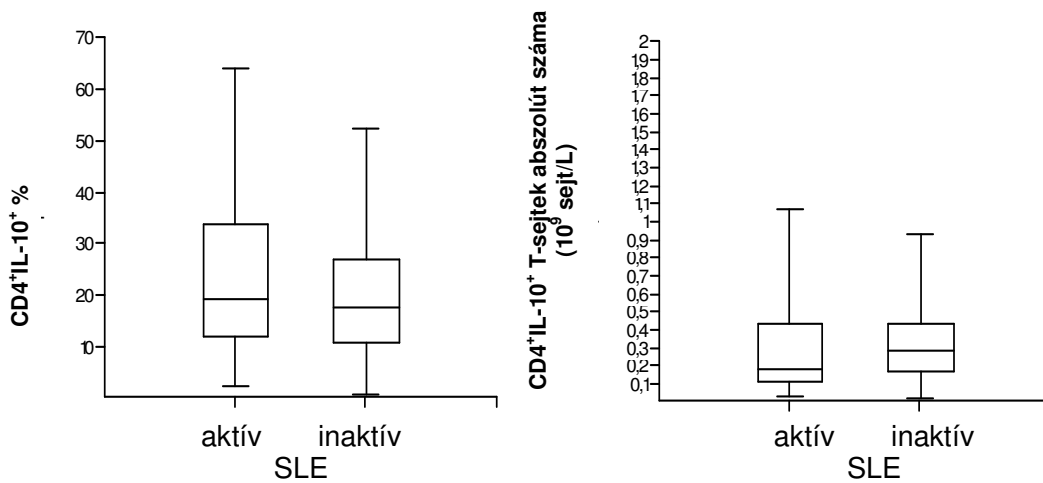


b.)

3. ábra A CD4⁺CD25⁺"bright" T-sejtek abszolút száma és százalékos értéke csökkent az SLE-s betegek perifériás vérében. Az aktív és inaktív stádiumban lévő betegek között a regulatív T-sejtek számában nem volt szignifikáns különbség.



a.)



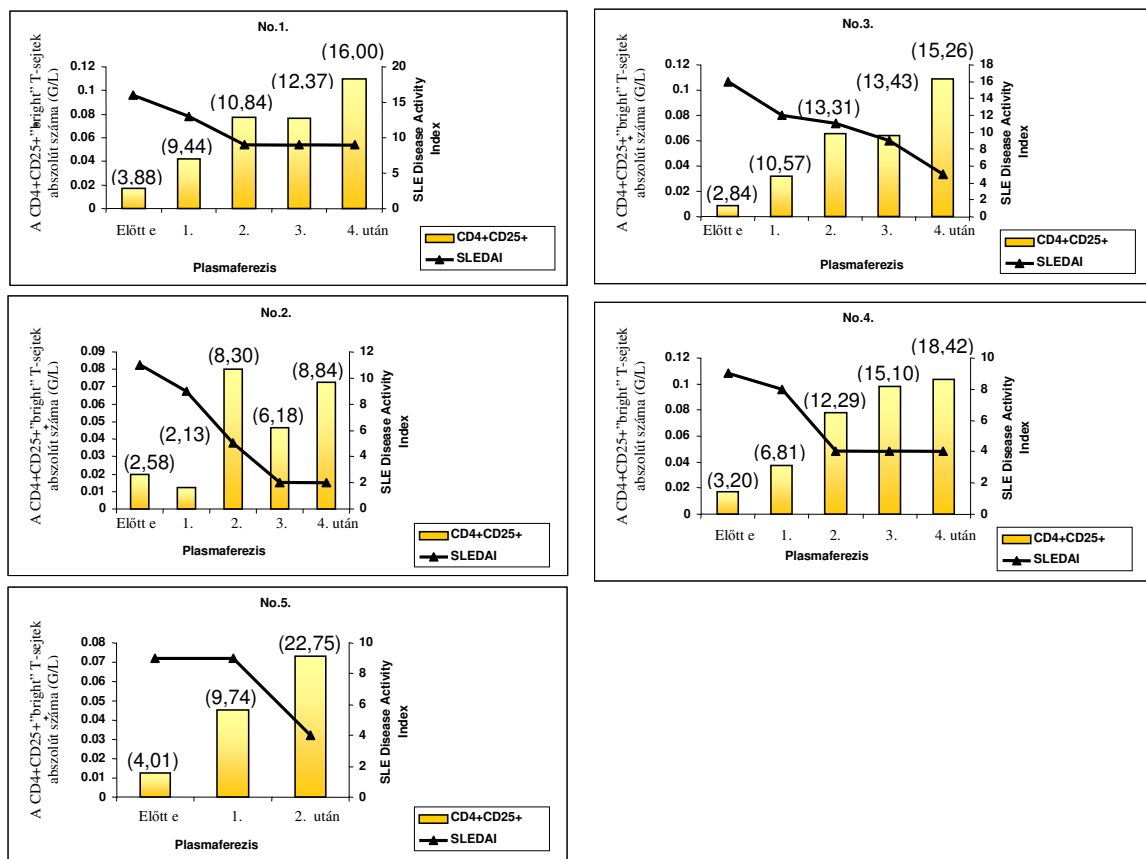
b.)

4. ábra A CD4⁺IL-10⁺ T-sejtek százalékos értéke emelkedett az SLE-s betegek perifériás vérében, azonban az abszolút számokban nem volt szignifikáns különbség a kontroll csoporthoz képest. Szintén nem találtunk különbséget az aktív és inaktív stádiumban lévő betegek között a CD4⁺IL-10⁺ regulatív T-sejtek számában.

Az SLEDAI érték és a CD4⁺CD25⁺"bright" T sejtek számának változása ismételt plazmaferézis kezeléseken átesett SLE-s betegek perifériás vérében

A továbbiakban megvizsgáltuk, változik-e a perifériás CD4⁺CD25⁺"bright" T sejtek száma az ismételt plazmaferézis kezelése hatására. Ebből a célból öt súlyosan SLE-s betegtől – akiknél más kezelési módot a korábban említett okok miatt nem lehetett alkalmazni - vérmintát vettünk a plazmaferézis megkezdése előtt, illetve minden egyes kezelés után. A plazmaferézis kezelése ideje alatt (3-5 nap) a betegség aktivitási index (SLEDAI) változását is nyomon követtük.

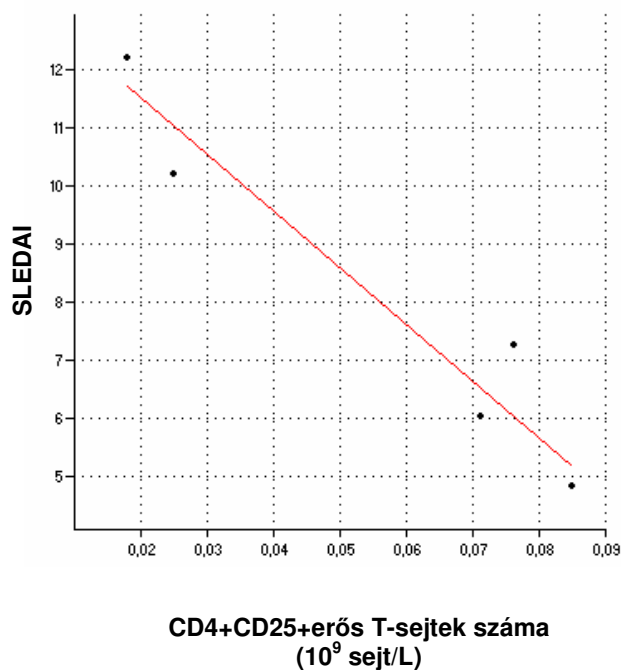
A CD4⁺CD25⁺"bright" T sejtek abszolút száma a kezelése hatására fokozatosan emelkedett. Az utolsó plazmaferézis után 24 órával mért abszolút sejtszám mind az öt beteg esetében többszörösen (3, illetve 6-szor) magasabb volt a kezelés előtti értékhez képest (1. beteg = 0,11 versus 0,042; 2. beteg = 0,072 vs 0,012; 3. beteg = 0,11 vs 0,031; 4. beteg = 0,103 vs 0,037; 5. beteg = 0,073 vs 0,012 x10⁹ sejt/L). Az adatokat a 5. ábrán tüntettük fel.



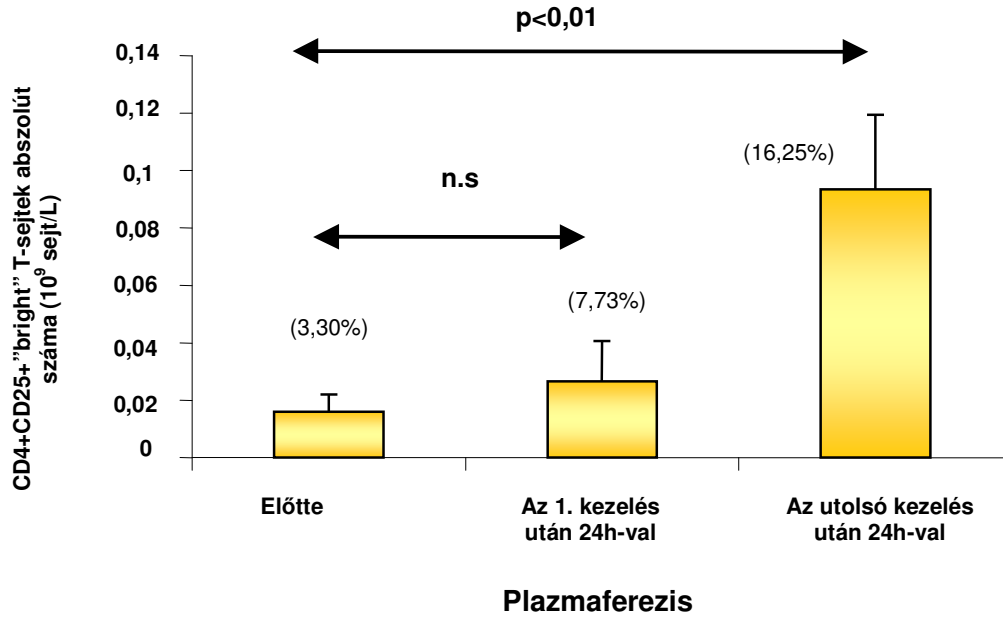
5. ábra A CD4⁺CD25⁺"bright" sejtek számának változása öt plazmaferézis kezelést kapott beteg perifériás vérében a kezeléseket követően.

A kapott eredményeken elvégzett ANOVA analízis azt mutatta, hogy a bekövetkezett változások mind a $CD4^+CD25^{+}$ "bright" T-sejtek, mind pedig az SLEDAI tekintetében szignifikánsak ($p=0,0013$). A lineáris regresszió azt mutatja, hogy a $CD4^+CD25^{+}$ "bright" T-sejtszám növekedésével az SLEDAI értéke csökken ($r=-0,96$, $r^2=0,92$, $p=0,008$) (6. ábra).

Az öt betegnek az egyes kezelések során kapott, abszolút számban és százalékban kifejezett, $CD4^+CD25^{+}$ "bright" T-sejtek értékeinek átlaga szintén szignifikáns különbséget mutat a kezelés előtti és az utolsó kezelés után ($0,093 \pm 0,026$ vs $0,016 \pm 0,006$; $p<0,01$) (7. ábra).



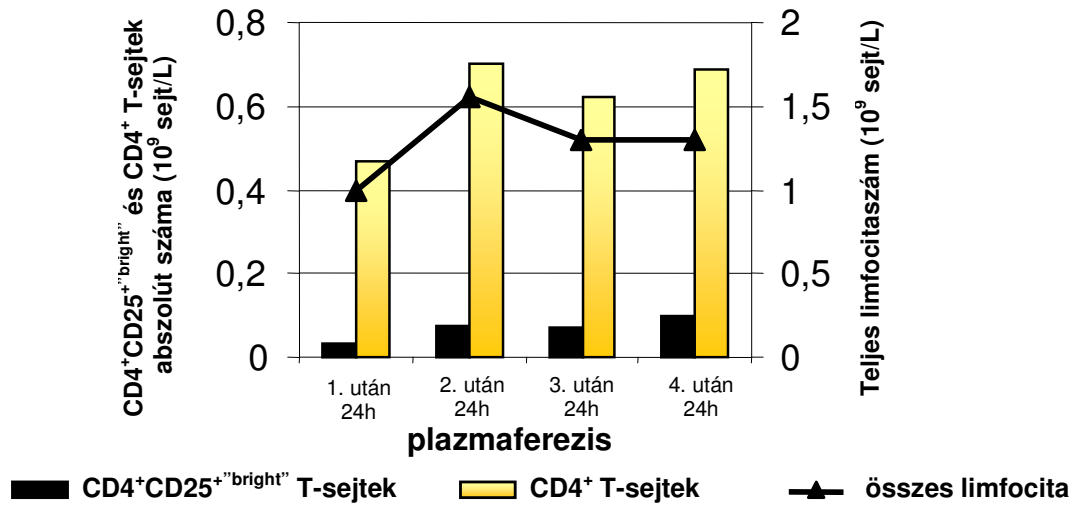
6. ábra Az SLEDAI értékek és a $CD4^+CD25^{+}$ "bright" T-sejtek számának a változása az ANOVA teszt alapján szignifikánsnak bizonyult. Az ábra inverz korrelációt mutat a $CD4^+CD25^{+}$ "bright" sejtek száma és az SLEDAI között



7. ábra Az egyes betegek kezelés előtti és az utolsó kezelés utáni adatainak átlaga között szignifikáns különbség mutatható ki.

A CD4⁺CD25⁺"bright" T sejtek számának változása a teljes CD4⁺ T sejtszám valamint a teljes limfocitaszám tükrében, ismételt plazmafereztilis kezelést kapott betegeknél

Lényeges kérdés, hogy a megemelkedett CD4⁺CD25⁺"bright" T-sejtszám valóban abszolút mértékű növekedést jelent-e, azaz a számuk ténylegesen emelkedik-e a limfocita populáción belül, vagy a teljes limfocitaszám változását követi. Ennek érdekében a követtük a teljes limfocita és a teljes CD4⁺ T sejtszám változást is a kezeléseket alatt. Az eredmények azt mutatják, hogy a teljes limfocita illetve a CD4⁺ sejtek száma a kezeléseket hatására nem változott szignifikáns mértékben. Azonban a CD4⁺CD25⁺"bright" T-sejtek a CD4⁺ sejtekre vonatkoztatott abszolút száma fokozatosan emelkedik a kezeléseket során (8. ábra).



8. ábra Az ábra $CD4^+ CD25^{+ "bright"}$ T-sejtek számának változását mutatja a teljes limfocita szám és a $CD4^+$ sejtszám változásával együtt.

4.2 Regulatív T-sejtek vizsgálata kevert kötőszöveti betegségben

CD4⁺CD25⁺“bright” regulatív és CD4⁺IL-10⁺ Tr1 típusú regulatív sejtek vizsgálata kevert kötőszöveti betegségben szenvedő betegek perifériás vérében

Tanulmányunkban a CD4⁺CD25⁺“bright” és CD4⁺IL10⁺ sejtek előfordulását vizsgáltuk 48 MCTD-s beteg perifériás vérében. A CD4⁺CD25⁺“bright” tolerogén regulatív sejtek százalékos értékét és abszolút számát szignifikánsan alacsonyabbnak találtuk MCTD esetén összehasonlítva a kontroll csoporttal ($3,5 \pm 1,6 \%$ vs $4,26 \pm 1,0 \%$; $p < 0,01$; $0,03 \pm 0,017 \times 10^9$ sejt/L vs $0,04 \pm 0,016 \times 10^9$ sejt/L; $p < 0,04$). A betegek adatait csoportosítottuk aszerint, hogy a beteg a vizsgálat idején épp a betegség aktív vagy inaktív szakaszában volt-e. A CD4⁺CD25⁺“bright” T-sejtek abszolút száma és százalékos aránya szignifikánsan alacsonyabb volt az aktív stádiumban lévő betegeknél szemben azokkal, akik inaktív stádiumban voltak. ($2,67 \pm 1,2 \%$ vs $4,0 \pm 1,5 \%$; $p < 0,001$; $0,022 \pm 0,011 \times 10^9$ sejt/L vs $0,035 \pm 0,018 \times 10^9$ sejt/L; $p < 0,01$) (VI.Táblázat).

A sejtek FoxP3 átlagos fluoreszcencia intenzitása nem különbözött sem az egyes csoportokban, sem pedig a kontroll csoporthoz viszonyítva.

A CD4⁺IL-10⁺ regulatív sejtek százalékos aránya és abszolút száma a CD4⁺CD25⁺“bright” sejtekhez képest ellentétesen változott az MCTD-s betegek perifériás vérében. A kontroll csoporttal összehasonlítva szignifikáns mértékű emelkedést figyeltünk meg ($6,1 \pm 4,4\%$ vs $2,2 \pm 0,63 \%$; $p < 0,002$; $0,119 \pm 0,09 \times 10^9$ sejt/L vs $0,062 \pm 0,02 \times 10^9$ sejt/L; $p < 0,02$). A betegek adatait aktív és inaktív stádium szerint csoportosítva, a CD4⁺IL-10⁺ regulatív sejtek százaléka magasabb volt az aktív stádiumban lévő betegeknél, szemben az inaktív stádiumban lévőkkel ($10,0 \pm 5,9 \%$, vs $4,9 \pm 5,9$; $p < 0,005$). Az abszolút sejszámokban azonban nem találtunk szignifikáns különbséget az aktív és inaktív stádiumú betegek között ($0,116 \pm 0,09$ vs $0,118 \pm 0,1 \times 10^9$ sejt/L; ns) (VII.Táblázat).

	Kontroll, N=40	MCTD N=48	Aktív MCTD N=17	Inaktív MCTD N=31	p érték: MCTD vs kontroll	p érték: aktív MCTD vs. kontroll	p érték: inaktív MCTD vs. kontroll	p érték: aktív vs inaktív MCTD
CD4 ⁺ CD25 ⁺ "bright" %	4,26±1,0	3,54±1,6	2,67±1,2	4,0±1,5	0,01	0,05	n.s.	0,001
CD4 ⁺ CD25 ⁺ "bright" 10 ⁶ sejt/L	0,04±0,016	0,03±0,017	0,022±0,011	0,035±0,018	0,001	n.s.	n.s.	0,01

VI. Táblázat CD4⁺CD25⁺"bright" sejtek százalékos aránya és abszolút száma aktív és inaktív stádiumban lévő MCTD-s betegek és egészséges (kontroll) személyek perifériás vérében (átlag±SD)

	Kontroll, N=40	MCTD N=48	Aktív MCTD N=17	Inaktív MCTD N=31	p érték: MCTD vs kontroll	p érték: aktív MCTD vs. kontroll	p érték: inaktív MCTD vs. kontroll	p érték: aktív vs inaktív MCTD
CD4 ⁺ /IL10 ⁺ %	2,2±0,63	6,1±4,4	10,0±5,9	4,9±5,9	0,002	n.s.	n.s.	0,005
CD4 ⁺ /IL10 ⁺ 10 ⁶ sejt/L	0,062±0,02	0,119±0,096	0,116±0,09	0,118±0,1	0,02	n.s.	n.s.	n.s.

VII. Táblázat CD4⁺IL-10⁺ sejtek százalékos aránya és abszolút száma aktív és inaktív stádiumban lévő MCTD-s betegek és egészséges (kontroll) személyek perifériás vérében (átlag±SD)

4.3 Regulatív T-sejtek vizsgálata Hodgkin lymphomában

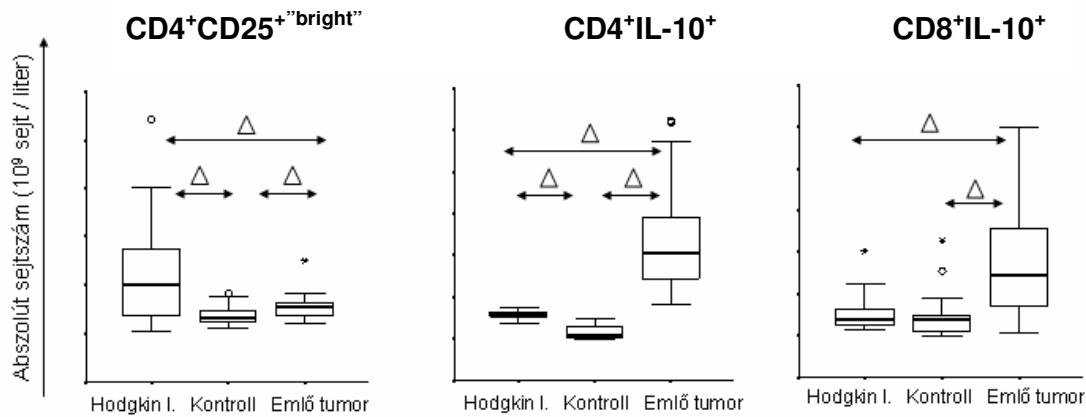
CD4⁺/IL-10⁺, CD4⁺/CD25⁺“bright”, CD8⁺/IL-10⁺ regulatív T sejtek abszolút számának változása Hodgkin lymphomas betegek, emlő tumoros betegek és egészséges személyek perifériás vérében

Vizsgálatunk célja az volt, hogy kiderítsük, megfigyelhető e változás a CD4⁺CD25⁺“bright”, CD4⁺IL-10⁺ és CD8⁺IL-10⁺ regulatív sejtek számában, egymáshoz viszonyított arányában a Hodgkin lymphomás betegek *perifériás* vérében. A vizsgálatok során 94 Hodgkin lymphomas beteg adatait hasonlítottuk össze ún. „negatív” kontroll csoportként egészséges személyek, illetve „pozitív” kontrollként emlőtumoros betegek adataival.

Mindhárom sejtípus esetében szignifikáns mértékű emelkedést találtunk a Hodgkin lymphomas betegek és az emlő tumoros betegek perifériás vérében összehasonlítva az egészséges személyek adataival. A CD4⁺CD25⁺“bright” T-sejtek száma a Hodgkin lymphomas betegeknek karakterisztikusan magasabbnak bizonyult, mint a másik két csoportban, míg a CD4⁺IL-10⁺ és CD8⁺IL-10⁺ sejtek száma az emlő tumoros betegek esetén jelentősen magasabb értéket mutatott mint a Hodgkin lymphomas, illetve az egészséges személyek vérében (VIII. Táblázat, 8. ábra.).

	Hodgkin lymphomás betegek	Egészséges, „negatív” kontroll csoport	Emlő tumoros, „pozitív” kontroll csoport
CD4⁺CD25⁺“bright” (10⁹ sejt/L)			
Medián	0,084	0,034	0,053
Alsó és felső kvartilis	0,037; 0,180	0,024; 0,049	0,038; 0,065
CD4⁺IL-10⁺ (10⁹ sejt /L)			
Medián	0,072	0,008	0,2
Alsó és felső kvartilis	0,055; 0,1	0,001; 0,03	0,12; 0,28
CD8⁺IL-10⁺ (10⁹ sejt /L)			
Medián	0,081	0,072	0,330
Alsó és felső kvartilis	0,056; 0,13	0,012; 0,095	0,12; 0,550

VIII. Táblázat Regulatív T-sejtek számának medián értékei Hodgkin lymphomás, emlő tumoros és egészséges személyek perifériás vérében.



Δ $p < 0.01$

9. ábra Regulatív T-sejtek abszolút száma Hodgkin lymphomas, emlő tumoros és egészséges személyek perifériás vérében. A Δ szimbólum a szignifikáns eltéréseket mutatja.

Regulatív T-sejtek számának alakulása a Hodgkin lymphomás betegek csoportosításakor a kapott terápia, a betegség stádiuma és kezelés óta eltelt idő szerint.

Az adatok elemzése során nem találtunk szignifikáns különbséget a $CD4^+CD25^{+}$ "bright", $CD4^+IL-10^+$ és $CD8^+IL-10^+$ sejtek számában, ha a betegeket a korábban kapott terápia (kemoterápia, radioterápia vagy kombinál kezelés) szerint, illetve a betegség stádiuma (stádium I-II, stádium III-IV) vagy a kezelés óta eltelt idő szerint csoportosítottuk (3-5, 6-10 és 10 év fölött). Az eredményeket a IX. Táblázat mutatja.

a	3–5 év			6–10 év			10 év fölött		
	medián	min	max	medián	min	max	medián	min	max
CD4 ⁺ CD25 ⁺ ^{bright}	0,093	0,001	0,078	0,005	0,008	0,421	0,068	0,003	0,759
CD4 ⁺ /IL-10 ⁺	0,056	0	0,171	0,094	0,018	0,495	0,075	0,009	0,884
CD8 ⁺ /IL-10 ⁺	0,071	0,016	0,391	0,088	0,027	0,408	0,086	0,019	0,589

b	CMT			CT			RT		
	medián	min	max	medián	min	max	medián	min	max
CD4 ⁺ CD25 ⁺ ^{bright}	0,071	0,001	0,759	0,074	0,007	0,442	0,008	0,003	0,783
CD4 ⁺ /IL-10 ⁺	0,094	0	0,884	0,057	0,009	0,882	0,069	0,014	0,434
CD8 ⁺ /IL-10 ⁺	0,141	0,016	0,589	0,063	0,019	0,571	0,079	0,027	0,247

c	Stádium I–II			Stádium III–IV		
	medián	min	max	medián	min	max
CD4 ⁺ CD25 ⁺ ^{bright}	0,067	0,034	0,078	0,073	0,001	0,759
CD4 ⁺ /IL-10 ⁺	0,065	0	0,459	0,089	0,009	0,884
CD8 ⁺ /IL-10 ⁺	0,082	0,027	0,583	0,085	0,016	0,589

CMT = kombinált terápia, CT = kemoterápia, RT = radioterápia,

IX. Táblázat *Immunregulációs T sejtek abszolút száma(10⁹ sejt/L) Hodgkin lymphomás betegek perifériás vérében., A betegek adatait a.) a kezelés óta eltelt idő b.) a kapott terápia és c.) a betegség stádiuma alapján csoportosítottuk*

5. MEGBESZÉLÉS

5.1 Szisztémás lupus erythematosus

A regulatív T-sejtek számában vagy funkcionális aktivitásában bekövetkező csökkenés szerepet játszhat az SLE-s B- és T-sejtek felfokozott aktivitásában. A regulatív T-sejtek közül a $CD4^+CD25^+$ regulatív T-sejtek szerepét vizsgálták legtöbbször szisztémás lupus erythematosusban. Az irodalmi adatok több, látszólag ellentmondó eredményt tartalmaznak a betegségben megfigyelhető regulatív T-sejtek számának változását illetően.

Vizsgálataink eredményei összhangban vannak azokkal az irodalmi adatokkal, amelyek szerint az SLE-s betegek perifériás vérében a $CD4^+CD25^{+}$ "bright" T-sejtek százalékos aránya csökkent [86,87], és ez megmutatkozik a $CD4^+CD25^{+}$ "bright" T-sejtek abszolút számában is. A csökkenés a teljes limfocitaszám változások figyelembevételével is kimutatható. Ezzel szemben, Alvarado-Sanchez és mtsai 23 SLE-s beteg perifériás vérmintáját megvizsgálva nem találtak szignifikáns eltérést a $CD4^+CD25^{+}$ "bright" sejtek számában [88]. Minami és mtsai a perifériás $CD4^+CD25^+$ sejtarány kis mértékű emelkedéséről számolnak be [89]. A $CD4^+CD25^+$ regulatív T-sejtek szignifikáns mértékű emelkedését írta le Suarez és mtsai 110 „válogatatlan” SLE-s beteg esetén. A $CD4^+CD25^+$ T-sejtek számának emelkedése korrelációt mutatott a betegek glükokortikoid kezelésével [90]. Karagiannidis és mtsai asztmás betegeket vizsgálva kimutatták, hogy a betegek steroid kezelése fokozta a Foxp3 expressziót és megemelte a $CD4^+CD25^+$ természetes regulatív T-sejtek számát [91]. Az aktív és inaktív stádiumban lévő betegek adatait összevetve, nem találtunk eltérést a $CD4^+CD25^{+}$ "bright" sejtek számában. Az aktív stádiumban lévő betegek napi glükokortikoid kezelése a regulatív T-sejtekre gyakorolt aktiváló hatása révén eredményezheti, hogy a $CD4^+CD25^{+}$ "bright" sejtek száma nem csökkent az inaktív stádiumban lévő betegekhez képest.

Szignifikáns, pozitív korrelációt találtunk a betegség aktivitási index (SLEDAI) értékek és az anti-dsDNA antitest szintje között. A két paraméter szintén pozitív korrelációt mutatott a napi glükokortikoid kezeléssel. Azonban nem volt szignifikáns mértékű korreláció a fenti paraméterek és a regulatív T-sejtek százalékos aránya, illetve abszolút száma között. Fields és mtsai SLE-s B-sejtek és $CD4^+CD25^{+}$ "bright" regulatív T-sejtek kapcsolatát vizsgálva kimutatták, hogy a $CD4^+CD25^{+}$ "bright" T-sejtek képesek az anti-dsDNA termelését gátolni, ezáltal pedig, a betegség aktivitását csökkenteni [92]. Hasonló módon, Lee és mtsai negatív

korrelációt mutattak ki a gyerekkori SLE-ben mért anti-dsDNA szint és a CD4⁺ regulatív T-sejtek aránya között [93].

A szuppresszor mechanizmusokban résztvevő citokinek közül kiemelkedő jelentőségű az IL-10. Az ún. indukálható CD4⁺ regulatív (Tr1) sejtek nagy valószínűséggel ezen citokin segítségével fejtik ki - sejt-sejt kontaktus független módon - gátló hatásukat. Ismerjük, hogy az SLE-s betegek szérumban az IL-10 szint magas. Ez felveti a lehetőséget, hogy az indukálható sejtek számában, arányában esetleg eltérés mutatkozik szisztémás lupus erythematosus esetén. Crispin és mtsai aktív SLE-s betegek PBMC-it megvizsgálva, a felülúszókban alacsony IL-10 szintet mutattak ki [87]. Munkacsoportunk eredményei, melyek összhangban vannak a jelenlegi irodalmi adatokkal, azt mutatják, hogy különösen az aktív SLE-s betegeknél nemcsak a szérumban IL-10 koncentrációja, de a periférián előforduló intracitoplazmatikus IL-10 pozitív, CD4⁺ sejtek aránya is emelkedett, habár abszolút számban nincs szignifikáns különbség az egészséges személyekhez viszonyítva [88].

Az eredményeink és az irodalmi adatok szerint, az SLE-s betegeknél a CD4⁺CD25⁺ "bright" sejt szám csökkent, míg a Tr1 típusú sejtek aránya emelkedett. Az aktív és inaktív stádiumban lévő beteg közötti kisfokú eltérések arra utalhatnak, hogy a regulatív T-sejtek száma által tükrözött immunregulációs eltérések a betegség inaktív stádiumában is jelen vannak. A regulatív T-sejtek szerepe minden bizonnyal kulcsfontosságú a betegség pathogenezisében. A regulatív T-sejtek pontos – meglehet, hogy betegségre specifikus – hatásmechanizmusának megismerése a célzottabb terápiás lehetőségek kifejlesztése szempontjából nagy jelentőséggel bír.

Súlyos SLE-s betegeknél, ha az alkalmazott terápiás módszerekkel szemben a beteg rezisztens, illetve a mellékhatások miatt a hagyományos kezelési módok nem alkalmazhatóak, a betegek plazmaferezis kezelése lehetőséget biztosít a tünetek átmeneti enyhítésére. Munkánk során megvizsgáltuk, hogy változik-e a CD4⁺CD25⁺ "bright" T-sejtek számban a plazmaferetizált betegeknél.

Ismert, hogy a plazmaferezis csökkenti a keringő immunkomplexek és patológiás autoantitestek mennyiségét. Ezenkívül, immunmodulációs hatását is kimutatták, ugyanis fokozza a komplement receptor 1 aktivációját az erythrocytákon. Elsőként Jones és mtsai javasolták a plazmaferezist SLE-s betegek kezelésére. Véleményünk szerint, a plazmaferezis alkalmazása csak a súlyos SLE-s betegeknél indokolt, ahol veseérintettség, a központi idegrendszer érintettsége vagy antifoszfolipid-szindróma is előfordul.

Vizsgálatainkban megfigyeltük, hogy az ismételt (3-4) plazmaferézis kezelést kapott, súlyos SLE-s betegek perifériás $CD4^+CD25^{+}$ "bright" T sejtjeinek abszolút száma többszörösére emelkedett a kezeléssorozat végére.

Eredményeink azt mutatják, hogy a $CD4^+CD25^{+}$ "bright" T-sejtek számbeli emelkedése együtt jár a betegség aktivitási index, az SLE DAI értékének csökkenésével. Mellor-Pita és mtsai 33 SLE-s beteg és 14 egészséges kontroll személyt megvizsgálva, az SLE-s betegeknél csökkent $CD4^+CD25^{+}$ "bright" sejtarányt, valamint a $CD4^+CD25^{+}$ "bright" T-sejtek és az SLE DAI között inverz korrelációt mutattak ki [94]. Liu és mtsai nem találtak korrelációt az SLE DAI és a $CD4^+CD25^{+}$ "bright" T-sejtek száma között, azonban a közleményből kitűnik, hogy nem vették figyelembe a betegeknél alkalmazott kezelés módját. A glükokortikoid kezelés ugyanis megemeli a természetes regulatív T-sejtek Foxp3 expresszióját és fokozza a sejtek proliferációját [91]. Hogy kiküszöbölhessük az alkalmazott gyógyszerek esetleges, a regulatív T-sejtekre gyakorolt hatását, vizsgálataink során nem módosítottuk a gyógyszeres terápiát a plazmaferézist megelőző napokban és a kezelés ideje alatt.

A plazmaferézis jótékony hatásának egyik tényezője lehet a kezelés hatására megemelkedő regulatív sejtszám. Ez egy lehetséges következménye az SLE-ben lymphocytopeniát okozó limfocitotoxikus antitestek eltávolításának. Ezért, mint alternatív terápia, a súlyos SLE-s betegek esetében megfontolandó, azonban az alkalmazása során figyelembe kell venni, hogy a regulatív T-sejtek emelkedett száma és a fokozott szuppresszor aktivitás a fertőző betegségekkel szembeni fogékonyságot is növelheti.

5.2 Kevert kötőszöveti betegség

Az immunválasz szabályozása során a természetes, $CD4^+CD25^{+}$ "bright" és az indukálható Tr1 típusú regulatív sejtek kulcsfontosságú szerepet töltenek be a pathológiás, autoreaktív T-sejtek proliferációjának megakadályozásában, ezáltal az autoimmun betegségek kialakulásának megelőzésében és a progresszió gátlásában. Az eddigi irodalmi adatok nem szolgáltatnak semmiféle információt a regulatív T-sejtek számáról, arányáról MCTD esetén. Ezért megvizsgáltuk, hogyan alakul a természetes, $CD4^+CD25^{+}$ "bright" és az $IL-10^+$, $CD4^+$ sejtek aránya és abszolút száma a kevert kötőszöveti betegségben szenvedő betegek perifériás vérében.

Mint ahogy a bevezetőben említésre került, több tanulmány jelent meg, amely a $CD4^+CD25^{+}$ "bright" T-sejtek csökkent százalékos arányáról számolt be egyéb autoimmun betegségekben, így a rheumatoid arthritisben, autoimmun diabetesben vagy SLE-ben.

Eredményeink azt mutatják, hogy a kevert kötőszöveti betegségben szenvedő betegek perifériás vérében is csökkent a $CD4^+CD25^{+}$ "bright" sejtek abszolút száma és százalékos értéke az egészséges (kontroll) személyekhez képest. A csökkenés még nagyobb mértékű volt az aktív stádiumban lévő betegnél. Azonban az IL-10 termelő $CD4^+$ sejtek számában emelkedést mutattunk ki a betegek perifériás vérében. Az aktív stádiumban lévő betegeknél ez az emelkedés tovább fokozódott. A két sejtféleség számbeli változása ellentétes tendenciát mutat. A sejtek által kifejtett szuppresszor mechanizmus molekuláris részletei még nem ismertek teljesen, azonban az eddigi eredmények alapján két citokin szerepét ki kell emelnünk. Az MCTD-s betegek szérumában kimutatható, hogy emelkedett az IL-6 és IL-10 szint. Ez részben magyarázhatja a regulatív T-sejtek természetes és indukálható csoportjainak eltérő viselkedését. Doganci és mtsai tüdő-tumoros betegeknél a tumor környezetében nagy számú $CD4^+CD25^{+}$ "bright" T-sejtet találtak. Kimutatták, hogy a tüdőből származó $CD4^+CD25^{+}$ "bright" sejtekre az IL-6 és a szolúbilis IL-6 receptor egyaránt gátló hatást fejt ki, csökkentve a természetes $CD4^+CD25^{+}$ "bright" regulatív T sejtek funkcióját és proliferációját [95]. A Tr1 sejtek hatásukat IL-10 révén fejtik ki. Az így megvalósuló szuppresszor mechanizmusban a sejt-sejt kontaktusnak csak csekély szerepe van, de a maximális szuppresszió eléréséhez ez is szükséges. A Tr1 sejtek proliferációja IL-10 és IFN- α jelenlétét igényli, így az MCTD-s betegek emelkedett IL-10 szintje hozzájárulhat a Tr1 sejtek fokozott jelenlétéhez, és a B-sejtek aktivitásához is.

5.3 Hodgkin lymphoma

A betegség egyik jellemzője a Hodgkin-Reed-Sternberg sejtek jelenléte a tumorban, azonban annak csak kis részét képezik. A fennmaradó sejtmennyiséget főképp limfociták teszik ki, amelyek többsége $CD4$ pozitív sejt. Annak ellenére, hogy ezen limfociták immunfenotipizálása megtörtént és a citokin, kemokin termelésük jól jellemzett [29], a patogenetikai szerepük még tisztázatlan. Marshall és mtsai vetették fel a lehetőséget, hogy a limfociták nagy része esetleg szuppresszor aktivitással bír, s az immunválasz gátlása révén sajnos hozzájárulhat a tumor fennmaradásához [35].

Korábban általánosan elfogadott volt, hogy a nyirokcsomókba felgyülemlt limfociták elsősorban Th2 fenotípussal rendelkeznek [29,96]. Dukers és mtsai azonban kimutatták, hogy az IL-2 és IL-4 pozitív limfociták száma alacsonyabb az érintett területen, mint az IL-10, illetve IFN- γ termelő, reaktív sejteké [97]. Marshall és mtsai nem találtak szignifikáns különbséget a HL betegek infiltrált limfocitáinak IL-4 termelésében a kontroll

csoporthoz képest. Ezek az eredmények inkább a CD4⁺IL-10⁺, Tr1 fenotípusra utalnak. A sejtek jelentős része ugyanakkor CD25 expressziót és CTLA-4, LAG-3 pozitivitást mutat. Az elvégzett funkcionális vizsgálatok megerősítik az elképzelést, hogy szuppresszor aktivitású sejtek képezik az infiltrált limfociták fő tömegét [35]. A sejtek felszínén kimutatható a CCR4 elnevezésű kemokin receptor, amely segíti a nyirokcsomóba vándorlásukat [98].

A szabályozó mechanizmus megvalósulhat IL-10 termelés, továbbá sejt-sejt kontaktus és CTLA4 közreműködésével. Az IL-10 ellenes antitestek alkalmazása a kevert limfocita kultúrákban a proliferáció gátlás csökkenését eredményezte. Ez is mutatja, hogy az IL-10 fontos mediátora az infiltrált limfociták szuppresszor aktivitásának. Kiseb mértékben, de csökkenést mutatott a szuppresszor aktivitás azokban a kísérletekben, ahol a sejt-sejt kontaktust akadályozták meg. A CTLA-4 molekula blokkolása anti-CTLA-4 F(ab)₂ révén szintén gátolta a limfociták szuppresszor aktivitását. Bár a csökkenés mértéke egyénenként széles tartományban változott, mindez azt mutatja, hogy mind a három mechanizmus jelentős szerepet kap a HL betegek nyirokcsomóiba infiltrált limfociták szabályozó tevékenységében [35]. A Maksimow és mtsai által kifejlesztett modell a regulatív T-sejtek jelentőségét mutatja a tumoros illetve lymphomás sejtek fennmaradásában. Ebben ovalbumin expresszáló ún. E.G7-OVA lymphoma sejteket oltottak be olyan egerekbe, amelyek az ovalbumint mint saját antigént expresszálták a hasnyálmirigy szigetsejteken. A kísérlet során a dendritikus sejtekkel történő vakcináció hatékonyságát vizsgálták. Az eredmény azt mutatja, hogy ha a regulatív T-sejtek aktivitásuk gátolták, a dendritikus sejtek hatékonyabban járultak hozzá a lymphomás sejtek eltávolításához [99]. Ehhez hasonló eredményekről számol be Zhou és mtsai. Kísérletükben kimutatták, hogy a CD4⁺ sejtek egy csoportja felismerve a tumor antigéneket olyan sejtekké differenciálódik, amelyek képesek a naiv és effektor T-sejtek gátlására. A vakcinációt követően az ilyen „tumor indukált” regulatív sejtek száma is megemelkedett az effektor sejtekkel párhuzamosan és csökkentette a tumorról szembeni immunválasz hatékonyságát [100].

A regulatív T-sejtek típusai kölcsönös regulációs kapcsolatban állnak mind egymással, mind a Th1/Th2, és az NKT-sejtekkel. Smyth és mtsai által végzett egérvizsgálatok azt mutatják, hogy a CD4⁺CD25⁺ regulatív T-sejtek többféle módon képesek az NK-sejtek tumor ellenes aktivitását gátolni. *In vitro* körülmények között TGF- β függő, de IL-10 független módon gátolták az NKG2D-közvetített citolízist. A regulatív T-sejtek bevitele RAG-1 deficiens egerekbe gátolta az NK-sejtek metasztatizist megakadályozó hatását [101]. Tumoros megbetegedések esetén a regulatív T-sejtek emelkedett száma és fokozott szuppresszor aktivitása várható [102, 74], de az egyes regulatív sejtípusok aránya és jelentősége eltérő

lehet a betegség típusától függően. A CD4⁺CD25⁺ regulatív T-sejtek emelkedett számát írták le myeloma multiplexben, felnőtt T-sejtes lymphomában és non-Hodgkin lymphomában, gastrointestinalis tumorokban [103-106]. A krónikus lymphoid leukémiásbetegknél alkalmazott fludarabin terápia csökkentette a CD4⁺CD25⁺ „bright” T-sejtek számát [107]. Tiemessen és mtsai CTCL-es (cutaneous T-cell lymphoma) betegek perifériás vérében nem találtak szignifikáns változást a regulatív CD4⁺CD25⁺ T-sejtek százalékos arányában. A funkcionális tesztek alapján a sejtek aktivitása a kevésbé súlyos betegeknél megfelelő volt, a súlyosabb betegnél csökkent. A súlyos betegek CD4⁺CD25⁻ sejtjei fogékonyak voltak az egészséges személyek regulatív sejtjeinek szuppresszív hatására, azonban a CD4⁺CD25⁺ sejtjeik Foxp3 expressziója csökkent mértéket mutatott [108].

Munkánk során, 94, komplett remisszióban lévő Hodgkin lymphomás beteg *perifériás* vérében vizsgáltuk a CD4⁺CD25⁺ „bright” T-sejtek, a CD4⁺IL-10⁺ valamint a CD8⁺IL-10⁺ T-sejtek abszolút számát. A HL betegek eredményeit összehasonlítottuk a „pozitív” kontrollként szolgáló emlő tumoros betegek és az egészséges személyek („negatív kontroll”) adataival. A HL és az emlő tumoros betegek perifériás vérében mindhárom sejttípus abszolút száma emelkedett az egészséges személyekhez képest. A CD4⁺CD25⁺ „bright” sejtek száma szignifikánsan magasabb volt a HL betegek perifériás vérében, összehasonlítva az emlő tumoros betegekkel. A másik két sejtcsoport (CD4⁺IL-10⁺, CD8⁺IL-10⁺ sejtek) abszolút száma az emlő tumoros betegekben magasabb szintet ért el, mint a HL betegekben. A regulatív T-sejtek emelkedése függetlennek tűnik a kapott kezelés típusától, és az azóta eltelt időtől, ugyanis a betegeket csoportosítva a kezelés óta eltelt idő, illetve a kapott terápiák típusa alapján, az egyes csoportok között a sejtek számában nem találtunk lényeges eltérést.

A vizsgálatok során mi is igazoltuk a korábban már leírt csökkent CD4/CD8 arányt, az emelkedett aktivált T-sejt számot (CD3⁺CD69⁺ és CD3⁺HLA-DR⁺). Meg kell említeni, hogy nem találtunk eltérést az EBV pozitivitás és a CD4⁺CD25⁺ „bright” sejtek száma, illetve a szérum IL-10 szint és a regulatív T-sejtek száma között.

A CD4⁺CD25⁺ „bright” T-sejtek számának emelkedése az immunreguláció betegség-specifikus elváltozására utal. A fokozott immunszuppresszív állapot a periférián is kimutatható, nemcsak a nyirokcsomókban. Azonban további vizsgálatok szükségesek annak a megválaszolására, hogy a.) a CD4⁺CD25⁺ „bright” sejtszám emelkedése valamiféle hajlamosító tényező-e betegségre, vagy b.) már a betegség manifesztálódásának következménye?

Mindenesetre az adott regulatív sejtek funkcionális aktivitásával számolni kell, ami sajnos immunszuprimált állapottal járhat, és esetleg közrejátszhat a másodlagos daganatok képződésében is.

6. MEGÁLLAPÍTÁSOK, ÚJ EREDMÉNYEK

Vizsgálataink egy részének eredménye megerősíti azokat az irodalmi adatokat, amelyek a perifériás $CD4^+CD25^{+}$ "bright" regulatív T-sejtek csökkent arányáról számolnak be szisztémás lupus erythematosusban. Igazoltuk, hogy ez a változás az abszolút sejtszámokra is igaz. Kimutattuk, hogy szemben a $CD4^+CD25^{+}$ "bright" sejtekkel a $CD4^+IL-10^+$ sejtek aránya kissé emelkedett a periférián, ez az emelkedés azonban az abszolút sejtszámra nem áll fenn. Megfigyeltük, hogy a plazmaferezis kezelést kapott súlyos SLE-s betegeknel, a kezelés egyik következményeként emelkedik a $CD4^+CD25^{+}$ "bright" sejtek száma, s ezzel párhuzamosan csökken a betegség aktivitását jellemző SLE-DAI érték.

Elsőként sikerült leírunk, hogy a $CD4^+CD25^{+}$ "bright" természetes regulatív T-sejtek aránya és abszolút száma csökkent a kevert kötőszöveti betegséggel érintett betegek perifériás vérében. A betegség aktív stádiumában a csökkenés mértéke még kifejezettebb. Ezzel szemben, az indukálható regulatív T-sejtek száma éppen ellentétes irányban változott. A sejtek százalékos aránya szignifikáns mértékű emelkedést mutatott, az abszolút számokban azonban nem találtunk eltérést sem a kontroll csoporthoz viszonyítva, sem az aktív és inaktív stádiumban lévő betegek között.

A komplett remisszióban lévő Hodgkin lymphomás betegek regulatív T-sejtjeinek vizsgálata során megállapítottuk, hogy a természetes és indukálható regulatív T-sejtek aránya és abszolút száma egyaránt emelkedett a betegek perifériás vérében. „Pozitív” kontroll csoportként emlő tumoros betegeket vizsgálva megállapítottuk, hogy a $CD4^+CD25^{+}$ "bright" tolerogén regulatív T-sejtek emelkedése a Hodgkin lymphoma egyik jellemző sajátja. A $CD4^+IL-10^+$ és $CD8^+IL-10^+$ sejtek emelkedése mindkét betegcsoportban szignifikáns mértékű volt, de a Hodgkin lymphomás betegeknel a $CD4^+CD25^{+}$ "bright" T-sejtek emelkedett száma kifejezettebb volt, mint az emlő tumoros betegeknel. A betegek csoportosítása a kezelés óta eltelt idő, vagy a korábban kapott terápia típusa szerint, azt mutatta, hogy a regulatív T-sejtek számának változása független a fent említett paraméterektől.

A regulatív T-sejtek mérésének gyakorlati jelentőségét az adja, hogy a regulatív sejtek alulműködéséből származó autoimmun folyamat, vagy a túlműködésből adódó fokozott immunszuppresszív állapot korai felismerése elősegítheti a megfelelő terápia kiválasztását, prediktív értékű lehet a betegség progresszióját illetően (pl. NDC), s alkalmas lehet a terápia hatékonyságának mérésére.

7. IRODALOMJEGYZÉK

1. Erdei A. Az immunrendszer felépítése. Immunbiológia. Szerk. Gergely J, Erdei A. Medicina, 1998.
2. Szegedi Gy. Az autoimmun betegségek sajátosságai. LAM 2004; 14(11):739-746.
3. Szegedi Gy. Autoimmun betegségek. Klinikai immunológia. Szerk. Petrányi Gy. Medicina, 2001.
4. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. Science 2003;299:1057-61.
5. Manson J. J, Rahman A. Systemic lupus erythematosus. Orphanet Journal of Rare Diseases 2006; 1:6 doi:10.1186/1750-1172-1-6
6. Manson J. J, Isenberg D.A. The pathogenesis of systemic lupus erythematosus. Neth J Med 2003; 61:343-346.
7. Woodrow JC. Immunogenetics of SLE. J Rheumatol 1988;15:197-9.
8. Criswell LA, Amos CI. Update for genetic risk factors for SLE and rheumatoid arthritis. Curr Opin Rheumatol 2000;12:85-90.
9. Stohl W. Systemic lupus erythematosus: a blissless disease of too much BLYS protein. Curr Opin Rheumatol 2002;14:522-528.
10. Tsokos GC, Wong HK, Enyedy EJ, Nambiar MP. Immune cell signaling in lupus. Curr Opin Rheumatol 2000;12:355-363.
11. Lacki JK, Leszczynski P, Kelemen J, Muller W, Mackiewicz SH. Cytokine concentration in serum of lupus erythematosus patients: the effect on acute phase response. J Med 1997;28:99-107.
12. Llorente L, Zou W, Levy Y, et al. Role of IL-10 in the B lymphocyte hyper activity and autoantibody production of human SLE. J Exp Med 1995;181:839-844.
13. Shakoor N, Michalska M, Harris CA, Block JA. Drug-induced SLE associated with etanercept therapy. Lancet 2002;359:579-80.
14. Favalli EG, Sinigaglia L, Varenna M, Arnoldi C. Drug-induced lupus following treatment with infliximab for rheumatoid arthritis. Lupus 2002;11:753-755.
15. Crispin JC, Martinez A, Alcocer-Varela J. Quantification of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. J Autoimmun 2003;21:273-276.

16. Soltesz P, Aleksza M, Antal-Szalmás P, Lakos G, Szegedi G, Kiss E. Plasmapheresis modulates Th1/Th2 imbalance in patients with systemic lupus erythematosus according measurement of cytoplasmic cytokines. *Autoimmunity* 2002;35:51-6.
17. Szegedi Gy, Zeher M, Bakó Gy: *Klinikai Immunológia Kevert kötőszöveti betegség, MCTD* Springer 1999;161-7.
18. Hassan BA, Ronnelid J, Gunnarsson I, Karlsson G, Berg L, Lundberg I. Increased serum level of immunoglobulins, C-reactive protein, type 1 and type 2 cytokines in patients with mixed connective tissue disease. *J Autoimmun* 1998;5:503-8.
19. Hassan BA, Gunnarson I, Karlsson G, Klareskog L, Forslid J, Lundberg IE. Longitudinal study of interleukine -10, tumor necrosis factor-alpha, anti-U1-snRNP antibody levels and disease activity in patients with mixed connective tissue disease. *Scand J Rheumatol* 2001;5:282-9.
20. Funauuchi M, Sugishima H, Minoda M, Horiuchi A. Serum level of intrereferon-gamma in autoimmune diseases *Tohoku J Exp Med* 1991;4:259-67.
21. Bodolay E, Aleksza M, Antal-Szalmás P Vegh J, Szodoray P, Soltesz P, et al. Serum cytokine levels, type 1 and intracellular T cell cytokine profiles in mixed connective tissue disease. *J Rheumatol* 2002;29:2136-42.
22. Anagnostopoulos I, Herbst H, Niedobitek G, Stein H. Demonstration of monoclonal EBV genomes in Hodgkin's disease and Ki-1-positive anaplastic large cell lymphoma by combine Southern blot and in situ hybridization. *Blood* 1989;74:810-16.
23. Kuppers R. *Molecular Biology of Hodgkin's lymphoma*. *Adv Cancer Res* 2002;84:277-312.
24. Thompson LD, Fisher SI, Chu WS, Nelson A, Abbondanzo SL. HIV associated Hodgkin lymphoma: a clinicopathologic and immunophenotypic study of 45 cases. *Am J Clin Pathol* 2004;121:727-38.
25. Hertel CB, Zhou XG, Hamilton-Dutoit SJ, Junker S. Loss of B cell identity correlates with loss of B cell-specific transcription factor in Hodgkin/Reed-sternberg cells of classical Hodgkin lymphoma. *Oncogene* 2002; 21:4908-4920.
26. Brauninger A, Wacker H.-H, Rajewsky K, Kuppers R, Hansmann M-L. Typing the histogenetic origin of the tumor cells of lymphocyte rich classical Hodgkin's lymphoma in relation to tumor cells of classical and lymphocyte-praedominance Hodgkin's lymphoma. *Cancer Res* 2003;63:1644-51.
27. Meyer RM, Ambinder RF, Stroobants S. Hodgkin's lymphoma evolving concepts with implications for practice. *Haematology* 2004; 184-202.

28. Maggio E, van den Berg A, Diepstra A, Kluiver J, Visser L, Poppema S. Chemokines, cytokines and their receptors in Hodgkin's lymphoma cell lines and tissues. *Ann Oncol.* 2002;13 Suppl 1:52-6.
29. Skinnider BF, Mak TW. The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2002;99:4283-97.
30. Reed DM. On pathological changes in Hodgkin's disease, with especial reference to its relation to tuberculosis. *John Hopkins Hosp Rep* 1902; 10: 133-196.
31. Green I, Corse PF. A study of skin homografting in patients with lymphomas. *Blood* 1959;14:235-45.
32. Miller DG, Lizardo JG, Snyderman RK. Homologous and heterologous skin transplantation in patients with lymphomatous disease. *J Natl Cancer Inst* 1961;26:569-79.
33. Baglin TP, Joysey VC, Horsford J, Johnson RT, Broadbent V, Marcus RE. Transfusion-associated graft-versus-host disease in patients with Hodgkin's disease and T cell lymphoma. *Transfus Med* 1992;2:195-99.
34. Levy R, Kaplan HS. Impaired lymphocyte function in untreated Hodgkin's disease. *N Engl J Med* 1974;290:181-186.
35. Marshall NA, Christie LE, Munro LR, Culligan DJ, Johnston PW, Barker RN, Vickers MA. Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma. *Blood* 2004;103:1755-62.
36. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by achieved T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995;155:1151-64.
37. DeJaco C, Duftner C, Grubeck-Loebenstien B, Schirmer M. Imbalance of regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Immunology* 2005;117:289-300.
38. Baecher-Allan C, Brown J, Freeman GJ, Hafler DA. CD4⁺CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2001;167:1245-1253.
39. Shevach EM. Regulatory/suppressor T cells in health and disease. *Arthritis Rheum* 2004;50:2721-4.
40. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005;6:345-52.

41. Wildin RS, Smyk-Pearson S, Filipovich AH. Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. *Med Genet* 2002;39:537-52.
42. Bassuny WM, Ihara K, Sasaki Y, Kuromaru R, Kohno H, Matsuura N, Hara T. A functional polymorphism in the promotor/enhancer region of the FOXP3/Scurfin gene associated with type 1 diabetes. *Immunogenetics* 2003;55:149-56.
43. Yagi H, Nomura T, Nakamura K, et al. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Int Immunol* 2004;16:1643-56.
44. Oswald-Richter K, Grill SM, Shariat N, Leelawong M, Sundrud MS, Haas DW, Unumatz D. HIV infection of naturally occurring and genetically reprogrammed human regulatory T-cells. *PLoS Biol* 2004;2:E198.
45. Annunziato F, Cosmi L, Lotta F, Lazzeri E, Manetti R, Vanini V, et al. Phenotype, localization, and mechanism of suppression of CD4(+)CD25(+) human thymocytes. *J Exp Med* 2002; 196:379-87.
46. Cosmi L, Liotta F, Lazzeri E, Francalanci M, Angeli R, Mazinghi B, et al. Human CD8+CD25+ thymocytes share phenotypic and functional features with CD4+CD25+ regulatory thymocytes. *Blood* 2003;102:4107-14.
47. Jonuleit H, Schmitt E, Kahirman H, Stassen M, Knop J, Enk AH. Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells. *J Exp Med* 2002;196:255-60
48. de la Rosa M, Rutz S, Dominguez H, Scheffold A. Interleukine-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur J Immunol* 2004;34(9):2480-8.
49. Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, Orabona C, Vacca C, Bianchi R, et al. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003;4:1206-12.
50. Paust S, Lu L, McCarty N, Cantor H. Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(28):10398-403.
51. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, et al. conversion of peripheral CD4+CD25-naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 2003;198:1875-86.

52. Peng Y, Laouar Y, Li MO, Green EA, Flavell RA. TGF-beta regulates in vivo expansion of Foxp3-expressing CD4+CD25+ regulatory T cells responsible for protection against diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:4572-7.
53. Rao PE, Petrone AL, Ponath PD. Differentiation and expansion of T cells with regulatory function from human peripheral lymphocytes by stimulation in the presence of TGF- β . *J Immunol* 2005;174:1446-55.
54. Grossman WJ, Verbsky JW, Barchet W, Colonna M, Atkinson JP, Ley TJ. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity* 2004;21:589-601.
55. Stepp SE, Dufourcq-Lagelouse R, Le Deist F et al. Perforin gene defects in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Science* 1999;286:1957-9.
56. Stassen M, Fondel S, Bopp T, Richter C, Muller C, Kubach J, et al. Human CD25⁺ regulatory T cells: two subsets defined by the integrins alpha 4 beta 7 or alpha 4 beta 1 confer distinct suppressive properties upon CD4⁺ T helper cells, *Eur J Immunol* 34 (2004) (5), pp. 1303–1311.
57. Berthelot JM, Maugars Y. Role for suppressor T cells in the pathogenesis of autoimmune diseases (including rheumatoid arthritis). *Facts and hypotheses, Jt Bone Spine* 71 (2004) (5), pp. 374–380.
58. Roncarolo MG, Bacchetta R, Bordignon C, Narula S, Levings MK. Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev* 2001;182:68-79.
59. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukine-10 and interleukine-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001;19:683-765.
60. Tager K, Mostowski H, Tosato G. Human interleukine-10 can directly inhibit T-cell growth. *Blood* 1993;81:2964-71.
61. Bejarano MT, et al. Interleukine-10 inhibits allogenic proliferative and cytotoxic T cell responses generated in primary mixed lymphocyte cultures. *Int Immunol* 1992;4:1389-97.
62. De Waal Malefyt R, Yssel H, De Vries JE. Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4⁺ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation. *J Immunol* 1993;150:4754-65.
63. Schandene L, et al. B7/CD28 dependent IL-5 production by human resting T cells is inhibited by IL-10. *J Immunol* 1994;152:4368-74.
64. Groux H, Bigler M, de Vries JE, Roncarolo MG. Inhibitory and stimulatory effects of IL-10 on human CD8⁺ T cells. *J Immunol* 1998;160:3188-93.

65. Groux H, et al. A transgenic model to analyze the immunoregulatory role of IL-10 secreted by antigen-presenting cells. *J Immunol* 1999;162:1723-29.
66. Kitani A, Chua K, Nakamura K, Strober W. Activated self-MHC-reactive T cells have the cytokine phenotype of Th3/T regulatory cell 1 T cells. *J Immunol* 2000;165:691-702.
67. Sebastiani S, et al. Chemokine receptor expression and function in CD4+ T lymphocytes with regulatory activity. *J Immunol* 2001;166:996-1002.
68. Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 1999;401:708-712.
69. Groux H, et al. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevent colitis. *Nature* 1997;389:737-42.
70. Filaci G, Fravega M, Fenoglio D, Rizzi M, Negrini S, Viggiani R, Indiveri F. Non-antigen specific CD8+ T suppressor lymphocytes *Clin Exp Med* 2004;4:86-92.
71. Filaci G, Fravega M, Negrini S, Procopio F, Fenoglio D, Rizzi M, Brenci S, Contini P, Olive P, Ghio M, Setti M, Accolla RS, Puppo F, Indiveri F. Nonantigen specific CD8⁺ T suppressor lymphocytes originate from CD8⁺CD28⁺ T cells and inhibit both T-cell proliferation and CTL function. *Human Immunology* 2004;65:142–156.
72. Gonzalez –Rey E, Chomy A, Fernandez-Martin A, Ganea D, Delgado M. Vasoactive intestinal peptide generates human tolerogenic dendritic cells that induce CD4 and CD8 regulatory T cells. *Blood* 2006;107:3632-3638.
73. Meloni F, Morosini M, Solari N, Passadore I, Nascimbene C, Novo M, Ferrari M, Consentino M, Marino F, Pozzi E, Fietta MA. Foxp3 expressing CD4⁺CD25⁺ and CD8⁺CD28⁺ T regulatory cells in the peripheral blood of patients with lung cancer and pleural mesothelioma. *Human Immunology* 2006;67:1-12.
74. Sugiyama H, Gyulai R, Toichi E, Garaczi E, Shimada S, Stevens SR, McCormick TS, Cooper KD. Dysfunctional blood and target tissue CD4+CD25^{high} regulatory T cells in psoriasis: mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. *J Immunol.* 2005;174(1):164-73.
75. Balandina A, Lecart S, Dartevelle P, Saoudi A, Berrih-Aknin S. Functional defect of regulatory CD4+CD25⁺ T cells in the thymus of patients with autoimmune Myasthenia Gravis. *Blood* 2005;105(2):735-41
76. Baecher-Allan C, Hafler DA. Human regulatory T cells and their role in autoimmune disease. *Immunol Rev.* 2006;212:203-16.

77. Bacchetta R, et al. High levels of interleukin-10 production in vivo are associated with tolerance in SCID patients transplanted with HLA mismatched hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 1994;179:493-502.
78. Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, Schlienger K, Yeh H, Coukos G, et al. Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer, *Cancer Res* 61 (2001), pp. 4766–4772.
79. Woo EY, Yeh H, Chu CS, Schlienger K, Carroll RG, Riley JL, et al. Cutting edge: regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation, *J Immunol* 168 (2002), pp. 4272–4276
80. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival, *Nat Med* 10 (2004), pp. 942–949.
81. Schaefer C, Kim GG, Albers A, Hoermann K, Myers EN, Whiteside TL. Characteristics of CD4+CD25+ regulatory T cells in the peripheral circulation of patients with head and neck cancer, *Br J Cancer* 92 (2005), pp. 913–920.
82. Wolf AM, Wolf D, Steurer M, Gastl G, Gunsilius E, Grubeck-Loebenstien B. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients, *Clin Cancer Res* 9 (2003), pp. 606–612.
83. Gray CP, Arosio P, Hersey P. Association of increased levels of heavy-chain ferritin with increased CD4+ CD25+ regulatory T-cell levels in patients with melanoma, *Clin Cancer Res* 9 (2003), pp. 2551–2559.
84. Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, et al., Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma, *J Immunol* 169 (2002), pp. 2756–2761.
85. Ichihara F, Kono K, Takahashi A, Kawaida H, Sugai H, Fujii H. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers, *Clin Cancer Res* 9 (2003), pp. 4404–4408.
86. Liu MF, Wang CR, Fung LL, Wu CR. Decreased CD4⁺CD25⁺ T cells in peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol* 2004;59:198-202.
87. Crispin JC, Martinez A, Alcocer-Varela J. Quantification of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun* 2003;21(3):273-6.

88. Alavarado-Sanchez B, Hernandez-Castro B, Portales-Perez D, Baranda L, Layseca-Espinosa E, Abud-Mendoza C, Cubillas-Tejeda AC, Gonzalez-Amaro R. Regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun* 2006;27(2):110-8.
89. Minami R, Sakai K, Miyamura T, Yamamoto M, Suematsu E. The role of CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with Rheumatoid Arthritis *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*. 2006 Feb;29(1):37-42.
90. Suarez A, Lopez P, Gomez J, Gutierrez C: Enrichment of CD4+CD25+high T cell population in LSE patients treated with glucocorticoids. *Ann. Rheum. Dis.* 2006;65(11):1512-7.
91. Karagiannidis C, Akdis M, Holopainen P et al. Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004;1425-33.
92. Fields ML, Hindowicz BD, Wharton GN et al. The regulation and activation of lupus associated B cells. *Immunol Rev* 2005;204:165-83.
93. Lee JH, Wang LC, Lin YT, Yang AH, Lin DT, Chiang BL: Inverse correlation between CD4+ regulatory T-cell population and antibody levels in paediatric patients with systemic lupus erythematosus. *Immunology* 2006, 117:280-6.
94. Mellor-Pita S, Citores JM, Cajeston R, Tutor-Ureta P, Yebra-Bango M, Andreu LJ, Vargas AJ. Decrease of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2006;65:553-4.
95. Doganci A, Eigenbrod T, Krug N, De Sanctis GT, Hausding M, Erpenbeck VJ, Haddad el-B, Lehr HA, Schmitt E, Bopp T, Kallen KJ, Herz U, Schmitt S, Luft C, Hecht O, Hohlfeld JM, Ito H, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T, Rose-John S, Renz H, Neurath MF, Galle PR, Finotto S. The IL-6R alpha chain controls lung CD4+CD25+ Treg development and function during allergic airway inflammation in vivo. *J. Clin. Invest.* 2005;115:313-25.
96. Poppema S, van den Berg A. Interaction between host T cells and Reed-Stenberg cells in Hodgkin lymphomas. *Semin Cancer Biol* 2000;10:345-50.
97. Dukers DF, Jaspars LH, Vos W, et al. Quantitative immunohistochemical analysis of cytokine profiles in Epstein-Barr virus-positive and -negative cases of Hodgkin's disease. *J Pathol* 2000;190:143-9.
98. Ishida T, Ueda R. CCR4 as a novel molecular target for immunotherapy of cancer. *Cancer Sci.* 2006 Nov;97(11):1139-46.

99. Maksimow M, Miiluniemi M, Marttila-Ichihara F, Jalkanen S, Hanninen A. Antigen targeting to endosomal pathway in dendritic cell vaccination activates regulatory T cells and attenuates tumor immunity. *Blood* 2006;108(4):1298-305.
100. Zhou G, Drake CG, Levitsky HI. Amplification of tumor-specific regulatory T cells following therapeutic cancer vaccines. *Blood* 2006;107(2):628-36.
101. Smyth MJ, Teng MW, Swann J, Kyparissoudis K, Godfrey DI, Hayakawa Y. CD4+CD25+ T regulatory cells suppress NK cell-mediated immunotherapy of cancer. *J Immunol.* 2006 Feb 1;176(3):1582-7.
102. Shevach EM. CD4+CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2002;2(6):389-400.
103. Beyer M, Kochanek M, Giese T, Endl E, Weihrauch MR, Knolle PA, Classen S, Schultze JL. In vivo peripheral expansion of naive CD4+CD25highFoxP3+ regulatory T cells in patients with multiple myeloma. *Blood.* 2006 May 15;107(10):3940-9.
104. Roncador G, Garcia JF, Garcia JF, Maestre L, Lucas E, Menarguez J, Ohshima K, Nakamura S, Banham AH, Piris MA. FOXP3, a selective marker for a subset of adult T-cell leukaemia/lymphoma. *Leukemia.* 2005;19:2247-53.
105. Ikeda M, Takeshima F, Ohba K, Ohnita K, Isomoto H, Yamakawa M, Omagari K, Mizuta Y, Kohno S. Flow cytometric analysis of expression of transforming growth factor-beta and glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor on CD4(+) CD25(+) T cells of patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci.* 2006;51(1):178-84.
106. Sasada T, Kimura M, Yoshida Y, Kanai M, Takabayashi A. CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignances: possible involvement of regulatory cells in disease progression. *Cancer* 2003;98:1089-99.
107. Beyer M, Kochanek M, Darabi K, Popov A, Jensen M, Endl E, Knolee PA, Thomas RK, von Bergwelt-Baildon M, Debey S, Hallek M, Schultze JL. Reduced frequencies and suppressive function of CD4+CD25high regulatory T cells in patients with chronic lymphocytic leukaemia after therapy with fludarabine. *Blood* May 25; DOI 10.1182/blood-2005-02-0642
108. Tiemessen MM, Mitchell TJ, Hendry L, Whittaker SJ, Taams LS, John S. Lack of suppressive CD4+CD25+FOXP3+ T cells in advanced stages of primary cutaneous T-cell lymphoma. *J Invest Dermatol.* 2006;126(10):2217-23.

8. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

1. **Baráth S**, Aleksza M, Keresztes K, Tóth J, Sipka S, Szegedi Gy, Illés Á. Immunoregulatory T cells in peripheral blood of patients with Hodgkin's lymphoma. *Acta Haem.* 2006; 116: (DOI:10.1159/000094678) **IF: 1,229**
2. **Baráth S**, Sipka S, Szodoray P, Szegedi A, Aleksza M, Végh J, Szegedi Gy, Bodolay E. Circulating regulatory T cells in patients with mixed connective tissue disease (MCTD). *Scand. J. Rheum.* 2006; 35:300-304. **IF: 1,687**
3. Aleksza M, Keresztes K, **Baráth S**, Sipka S, Illés Á. Immunológiai eltérések hosszan túlélő Hodgkin-kóros betegeken. *Magyar Imm.* 2005; 4(1):19-25.
4. **Baráth Sándor**, Aleksza Magdolna, Szegedi Andrea, Sipka Sándor, Szegedi Gyula, Bodolay Edit. Regulatórikus T-sejtek kevert kötőszöveti betegségben. *Magyar Imm.* 2005;3-4:25-32
5. **Baráth S**, Aleksza M, Tarr T, Sipka S, Szegedi Gy, Kiss E. Measurement of natural (CD4⁺CD25^{high}) and inducible (CD4⁺IL-10⁺) regulatory T-cells in patients with systemic lupus erythematosus. Beküldve: *Lupus*.
4. **Baráth S**, Soltész P, Kiss E, Aleksza M, Zeher M, Szegedi Gy, Sipka S. The activity of systemic lupus erythematosus negatively correlates with the increasing number of CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells during repeated plasmapheresis treatment of patients. Beküldve: *Autoimmunity*

9. EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

5. Sipka S Jr, Brath E, Toth FF, Aleksza M, Kulcsar A, Fabian A, **Barath S**, Balogh P, Sipka S, Furka I, Miko I. Cellular and serological changes in the peripheral blood of splenectomized and spleen autotransplanted mice. *Transpl Immunol.* 2006;16:99-104. **IF: 2,134**
6. Sipka S Jr, Brath E, F Toth F, Fabian A, Krizsan C, **Barath S**, Sipka S, Nemeth N, Balint A, Furka I, Miko I. Distribution of peripheral blood cells in mice after splenectomy or autotransplantation. *Microsurgery.* 2006;26(1):43-9. **IF: 0,757**
7. Zsilak S, Gal J, Hodinka L, Rajczy K, Balog A, Sipka S, **Barath S**, Kapitany A, Zilahi E, Szekanecz Z. HLA-DR genotypes in familial rheumatoid arthritis: increased frequency of protective and neutral alleles in a multicase family. *J Rheumatol.* 2005 Dec;32(12):2299-302. **IF: 3,010**
8. Acs G, Furka I, Miko I, Szendroi T, Hajdu Z, Sipka S Jr, **Barath S**, Aleksza M, Csipo I, Balo E, Balint A, Fekete K. Comparative hematologic and immunologic studies of patients with splenectomy and spleen autotransplantation. *Magy Seb.* 2005 Apr;58(2):74-9. Hungarian.
9. Keresztes K, Aleksza M, **Baráth S**, Miltényi Zs, Váróczy L, Gergely L, Sipka S, Illés Á. Helicobacter pylori-fertőzés Hodgkin kóros betegeken. *Hemat Transzf* 2004; 37:265-271.

Összesített impakt faktor: 8,817

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálás köszönettel tartozom Szegedi Gyula Professzor Úrnak azért a folyamatos figyelemért, ösztönzésért, szakmai segítségért, amivel támogatott.

Köszönettel tartozom Prof Dr Zeher Margitnak, a III.sz. Belgyógyászati Klinika igazgatójának, hogy a Ph.D. dolgozatomat a III.sz. Belgyógyászati Klinika Regionális Immunológiai Laboratóriumában megírhattam.

Köszönöm Prof Dr Sipka Sándornak, a Regionális Immunológiai Laboratórium, szűkebb munkahelyem vezetőjének és egyben témavezetőmnek, a szakmai és emberi segítségét, támogatását, biztatását.

Köszönöm Dr Bodolay Editnek, Dr Illés Árpádnak és Dr Kiss Emesének a dolgozat alapjait alkotó közleményekhez nyújtott maximális szakmai segítséget, támogatást.

Szeretném megköszönni a Regionális Immunológiai Laboratórium minden dolgozójának azt a támogatást, amit a laboratóriumban eltöltött évek alatt kaptam, különösen Dr Csípő Istvánnak, a sejtes részleg munkatársainak, Kovács Ildikónak, Karcza Anikónak, Szárazné Széles Mariannak, a molekuláris biológiai részleg asszisztenseinek, Bíróné Barna Krisztinának és Deák Györgynének.

Köszönöm szüleimnek.