

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

**A CD14 MOLEKULA ÉS EGYES TOLL-LIKE RECEPTOROK JELLEMZÉSE
ATÓPIÁS ÉS AUTOIMMUN KÓRKÉPEKBEN**

SÜMEGI ANDREA

**TÉMAVEZETŐK:
DR. ANTAL-SZALMÁS PÉTER
DR. SIPKA SÁNDOR**

**DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
KLINIKAI BIOKÉMIAI ÉS MOLEKULÁRIS
PATOLÓGIAI INTÉZET
DEBRECEN, 2007**

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK	4.
2. BEVEZETÉS	6.
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	8.
3.1. A természetes és az adaptív immunrendszer	9.
3.2. A természetes immunrendszer mintázatfelismerése	9.
3.3. Szolúbilis mintázatfelismerő receptorok	10.
3.4. Sejthez kötött mintázatfelismerő receptorok	13.
3.4.1. <i>Membrán asszociált receptorok</i>	13.
3.4.2. <i>Intracelluláris mintázatfelismerő receptorok</i>	13.
3.5. A Toll-like receptor (TLR) család	14.
3.6. A CD14 molekula	18.
3.7. A vizsgált atópiás és autoimmun betegségek	22.
3.7.1. <i>Atópiás dermatitis</i>	22.
3.7.2. <i>Szisztémás lupus erythematosus (SLE)</i>	25.
3.7.3. <i>Polymyositis/Dermatomyositis</i>	27.
4. BETEGEK	31.
4.1. Atópiás dermatitis	31.
4.2. Szisztémás lupus erythematosus	31.
4.3. Polymyositis/dermatomyositis	32.
5. MÓDSZEREK	34.
5.1. A sejtfelszíni receptorok jelölése, kvantitálása	34.
5.2. A CD14 mediálta LPS kötés	35.
5.3. A monocyták, granulocyták CD14-mediálta fagocitózisának jellemzése	36.
5.4. Az LPS indukálta sejtaktiváció mérése	37.
5.5. A szolúbilis CD14 mérésére alkalmas módszer kifejlesztése	37.
5.6. A CD14 izoformák mennyiségi meghatározása Western blot-tal	40.
5.7. A CD14 gén C(-159)T polimorfizmusának vizsgálata	41.
5.8. Egyéb alkalmazott (rutin) laboratóriumi módszerek	42.
5.9. Statisztikai módszerek	42.

6. EREDMÉNYEK	44.
6.1. A CD14/TLR expresszió és a CD14-függő funkciók változása atópiás dermatitisben	44.
6.1.1. A TLR2, TLR4, CD14 és CD180 molekulák sejtfelszíni expressziójának meghatározása atópiás dermatitisben szenvedő betegek monocytáin, granulocytáin és lymphocytáin	44.
6.1.2. A CD14-mediálta LPS kötés és fagocitózis vizsgálata atópiás dermatitisben szenvedő betegek monocytáin és granulocytáin	46.
6.1.3. A szérumban sCD14 koncentrációjának meghatározása atópiás dermatitisben szenvedő betegekben	48.
6.2. A CD14 expresszió, valamint a CD14-függő funkciók változása SLE-ben szteroid terápia hatására	48.
6.2.1. A glükokortikoszteroid terápia hatása a monocyták CD14 expressziójára	48.
6.2.2. A glükokortikoszteroid terápia hatása a monocyták CD14-függő LPS kötésére	49.
6.2.3. A glükokortikoszteroid terápia hatása a monocyták CD14-függő LPS-indukálta aktivációjára	50.
6.2.4. A glükokortikoszteroid terápia hatása a monocyták alcsoportok arányára és abszolút sejtszámára	52.
6.3. A sCD14 koncentráció, sCD14 izoformák, CD14 expresszió és a CD14 gén C(-159)T polimorfizmusának összefüggése a PM/DM klinikai paramétereivel	53.
6.3.1. A szérumban sCD14 izoformáinak koncentrációja, a perifériás monocyták CD14 expressziója és a CD14 gén C(-159)T polimorfizmusának megoszlása polymyositisben és dermatomyositisben	53.
6.3.2. A sCD14 koncentrációk, a monocyták CD14 expressziója és a betegség aktivitása közötti összefüggés vizsgálata myositisben szenvedő betegekben	55.
6.3.3. A sCD14 koncentrációk, a monocyták CD14 expressziója és a betegség lefolyása közötti összefüggés vizsgálata myositisben szenvedő betegekben	56.
6.3.4. A sCD14 koncentrációk, a monocyták CD14 expressziója és egy, a betegség aktivitását jelző biokémiai marker közötti összefüggés vizsgálata	57.
6.3.5. A CD14 gén C(-159)T polimorfizmusa és a betegség aktivitása, valamint a kórlefordulás közötti összefüggés vizsgálata	58.
6.3.6. A CD14 gén C(-159)T polimorfizmusa és a szérumban sCD14 koncentrációja	

közötti összefüggés vizsgálata	59.
7. MEGBESZÉLÉS	60.
8. ÖSSZEFOGLALÁS	69.
9. SUMMARY	70.
10. IRODALOMJEGYZÉK	71.
11. A TÉZISEKHEZ FELHASZNÁLT KÖZLEMÉNYEK	81.
12. EGYÉB KÖZLEMÉNYEK	82.
13. TÁRGYSZAVAK	83.
14. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	84.

1. RÖVIDÍTÉSEK

AD	atópiás dermatitis
mCD14	membrán CD14
sCD14	szolúbilis CD14
DM	dermatomyositis
FITC	fluorescein isothiocyanate – fluoreszcein-izotiocianát
GCS	glükokortikoszteroid
GPI	glikozil-foszfatidil inozitol
IFNγ	interferon-gamma
IL	interleukin
IRF	interferon-regulatory factor – interferonreguláló faktor
LBP	lipopolysaccharide binding protein - lipopoliszacharidkötő fehérje
LRR	leucine-rich repeat – leucinban gazdag szakasz
LPS	lipopoliszacharid
MAA	myositissel asszociált autoantitestek
MFI	mean fluorescence intensity – átlagos fluoreszcencia intenzitás
MSA	myositisre specifikus autoantitestek
MyD88	myeloid differenciálódási 88. faktor
NF-κB	nukleáris faktor- κ B
NHS	normal human serum – normál humán szérum
NK	natural killer – természetes ölő
PAMP	pathogen-associated molecular pattern – patogén asszociált molekuláris mintázat
PDM	a poly- és dermatomyositises betegek egyesített csoportja
aPDM	aktív stádiumban lévő PDM-es betegek

iPDM	inaktív stádiumban lévő PDM-es betegek
PE	phycoerythrin
PM	polymyositis
PRR	pattern recognition receptor – mintázatfelismerő receptor
SLE	systemic lupus erythematosus – szisztémás lupus erythematosus
SP1,2,3	specificity protein 1,2,3 (transzkripció faktor)
SRP	signal recognition particle – szignálfelismerő részecske
Tc	citotoxikus T-sejt
TIR	Toll/IL-1R homology – Toll/IL-1R homológ
Th	helper T-sejt
TLR	toll-like receptor – toll-szerű receptor
TNFα	tumor necrosis factor α – tumornekrózis-faktor α
Treg	regulatórikus T-sejt

2. BEVEZETÉS

Az emberi szervezet folyamatosan ki van téve a különböző patogén kórokozók támadásának. Az ezek elleni védekezés evolúciós szempontból ősből formáját a természetes immunrendszer biztosítja. A természetes immunrendszer effektor elemeinek (fagocitózis, antimikrobiális peptidok termelése,) triggerelésében és szabályozásában kulcsfontosságú szerepe van a kórokozók konzervált strukturális elemeit („patogénhez asszociált molekuláris mintázat”) azonosító mintafelismerő receptoroknak. Ezek lehetnek szolúbilisek és sejtasszociáltak és elhelyezkedhetnek a sejtek felszínén és azok belsejében. A sejtasszociált receptorok ligandjuk kötése után különböző szignalizációs útvonalakon keresztül eredményezik a kórokozók eliminálását elősegítő effektor molekulák termelődését. Attól függően, hogy mely receptorok és mely intracelluláris szignalizációs útvonalak aktiválódnak, többé-kevésbé patogén-specifikus immunválasz generálódhat.

A sejtasszociált receptorok közül központi szerepet töltenek be a toll-like receptor (TLR) család molekulái és az ezekkel asszociált fehérjék, mint pl. a CD14 molekula. Ezek nem csak a természetes immunválasz elindítására képesek, de az antigén prezentáló sejtek koreceptor expresszióját és citokin termelését befolyásolva szerepük van az adott mikrobiális antigénre specifikus adaptív immunválasz regulálásában is. A TLR család egyes tagjai képesek ugyanakkor bizonyos saját, az emberi szervezetből származó ligand felismerésére is, és így az antigénprezentáció során elősegíthetik a látens jelenlévő autoreaktív B-sejtek aktiválódását, autoantitest termelését. Ezeknek a molekuláknak, tehát, szerepe lehet az autoimmun betegségek kialakulásában is.

A CD14 molekula expressziója, a szérumban sCD14 koncentrációja, a CD14 gén egyes genetikai polimorfizmusai valamint a TLR-ek expressziós és funkcionális változásai összefüggést mutatnak bizonyos autoimmun és immunmediált betegségekkel. Adatok szólnak

amellett is, hogy bizonyos terápiás beavatkozások alkalmasak ezen rendszer komponenseinek modulálására. Munkánk során eltérő patomechanizmusú autoimmun betegségekben (szisztémás lupus erythematosus, poly- és dermatomyositis) vizsgáltuk meg a CD14 és egyes TLR-ek expressziójának és funkcióinak változásait. Analizáltuk ezeket a paramétereket a gyakori bakteriális bőrfertőzésekkel jellemezhető atópiás dermatitises betegek mintáiban, továbbá megvizsgáltuk az autoimmun betegségek esetében széles körben alkalmazott szteroid terápiás hatását is ezekre a molekulákra.

Kísérleteink során a következő konkrét kérdésekre kerestünk választ:

- Hogyan változik a perifériás leukocitákon a CD14 molekula és egyes TLR-ek sejtfelszíni expressziója, a CD14 molekula ligand kötése valamint a szérumban sCD14 koncentrációja intrinsic és extrinsic atópiás dermatitis-es betegek mintáiban?
- Van-e összefüggés a monocyták CD14-expressziója, a szérumban sCD14 koncentrációja, a sCD14 izotípusok megoszlása és a CD14 gén C(-159)T polimorfizmusa valamint a betegség klinikai paraméterei között a myositises betegpopulációban?
- Hogyan befolyásolja a perifériás monocyták CD14-expresszióját, a CD14-mediálta LPS kötését és az LPS-indukálta sejtaktivációt az *in vivo*, szisztémásan alkalmazott glükokortikoszteroid terápia SLE-ben?

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. A természetes és az adaptív immunrendszer

Az emberi immunrendszer a szervezetbe kerülő minden olyan struktúra – nem saját, vagy megváltozott saját – ellen immunreakciót indít, amely megzavarhatja a szervezet integritását, homeosztázisát. Az immunválasz kétszintű. Az adaptív (szerzett) immunitás fajlagos (antigénspecifikus), az egyed élete során kialakuló elemek, a természetes (natív, veleszületett) immunitás nem fajlagos (nem antigénspecifikus), öröklött elemek részvételével valósul meg. Az immunrendszer e két része szorosan együttműködik, egymásra épül, funkcionálisan nem választható szét egymástól (1, 2, 3, 4).

A természetes immunrendszer filogenetikailag ősből, valamilyen formában jelen van minden többsejtű élőlényben, míg az adaptív immunitás az evolúció során később, csak a gerincesekben fejlődött ki. A veleszületett immunrendszer a védekezés első vonalát képezi, gyors, azonnal működésbe lép, elemei (fagocita sejtek, NK sejtek, komplement rendszer, dendritikus sejtek,...) a kórokozó jelenlététől függetlenül funkcióképes állapotban vannak jelen a szervezetben, vagy nagyon rövid időn belül eléri ezt. A szerzett immunrendszer klónszelekcióval létrejövő nagyfokú fajlagosságot mutató elemei (T-lymphocyták, B-lymphocyták, ellenanyagok) csak látenciával, a patogén szervezetbe jutása után 1-2 hét múlva jelennek meg, hatékonyan, specifikusan támadják a kórokozót, s biztosítják az immunológiai memóriát (1, 2, 3, 4). Sokáig élt az a nézet, hogy a magasabb rendű élőlényekben a természetes immunrendszer nem specifikus – leginkább a mikrobák és idegen anyagok fagocitózisában, megemésztésében megnyilvánuló – válasza csak arra szolgál, hogy gyors, de nem tökéletes védelmet nyújtson a behatoló patogénekkel szemben a lassúbb, de hatékonyabb fajlagos immunválasz megjelenéséig. Ma már nyilvánvaló, hogy a veleszületett immunrendszernek meghatározó szerepe van mind az antigénspecifikus immunválasz elindításában

(antigénprezentáció, kostimuláció), mind az effektor folyamatok irányításában. Arra is fény derült az elmúlt években, hogy a természetes immunválasz nem teljesen aspecifikus, különbséget tud tenni a saját anyagok, és a patogénekből származó molekulák között, bár a felismerés módja alapvetően különbözik az adaptív immunrendszerétől (1, 3, 4, 5)

3.2. A természetes immunrendszer mintázatfelismerése

A természetes immunrendszer elemei nem egy-egy konkrét, jól meghatározott struktúrát ismernek fel, hanem olyan molekuláris mintázatokat, amelyek azonosak a különböző patogénekből, azok túléléséhez nélkülözhetetlenek, ezért evolúciósan konzerváltak, ugyanakkor a gazdaszervezet (magasabbrendűek) szervezetében nem fordulnak elő. Ezeket a patogénekre jellemző molekuláris mintázatokat nevezzük PAMP-oknak („Pathogen Associated Molecular Patterns”). Míg az adaptív immunrendszer T- és B-lymphocytái, ellenanyagai főként fehérjéket ismernek fel, addig a természetes immunrendszer elemei által felismert mintázatok kémiai természetükre nézve szénhidrátok, lipidek, szíalsav, nem metilált CpG motívum, dupla szálú RNS stb. (1, 3, 6). A természetes immunrendszer felismerő tevékenysége limitált számú, a csírvonalban kódolt (nem átrendeződő), nem klonálisan megjelenő receptorokon alapul. Ezeket, a több géncsalád által kódolt receptorokat mintázat felismerő receptoroknak (PRR - „Pattern Recognition Receptors”) nevezzük. Többféle sejten is kifejeződnek, főként azokon, amelyek elsőként találkoznak a szervezetbe behatoló patogénnel (epithelsejtek, makrofágok, dendritikus sejtek). A különböző PRR-ok különböző PAMP-okat ismernek fel, expressziós mintázatuk eltérő, specifikus szignalizációs útvonalakat aktiválnak, így különböző az általuk kiváltott, patogén ellen irányuló immunválasz is. A PRR-ok a sejtfelszínen kívül megjelenhetnek a sejtek belsejében is, és számos sejtektől független szolúbilis mintázatfelismerő receptor is létezik (3, 4, 6, 7).

3.3. Szolúbilis mintázatfelismerő receptorok

A C-típusú lektinek közé tartozó **kollektinek** olyan fehérjék, amelyek hordoznak egy kollagén-szerű domént és egy mikrobiális szacharidok kötésére alkalmas lektin részt. Opszonizálják a patogéneket, valamint aktiválják a komplement rendszert s így fagocitózisukat elősegítve hozzájárulnak a kórokozók eliminálásához. A kollektinek családjába tartozik többek között a mannózkötő lektin (MBL), MBL-asszociált proteinek (MASPs), a surfactant protein A és D (SP-A, SP-D) (3, 6, 8).

A mikrobiális szacharidokat ismerik fel a **fikolinok** is. Az MBL-hez hasonlóan kollagénszerű domént tartalmaznak, de a szénhidrátok felismerésében fibrinogén domének vesznek részt. A komplement rendszer lektin függő útját aktiválják a MASP-2 szerin proteáz segítségével (3, 8).

A ciklikus pentamer struktúrával rendelkező **pentraxinok** közé tartozik a C-reaktív protein (CRP) és szérum amiloid protein (SAP). Ezek a májban szintetizálódó akut fázis fehérjék mikrobiális poliszacharidokat kötnek meg, opszonizálják a behatoló kórokozót és az Fc γ receptor segítségével illetve a komplement kaskád aktiválásával elősegítik fagocitózisukat. Nemcsak a mikrobák, hanem az apoptotikus sejtek eltávolításában is szerepet játszanak (3).

A **komplementrendszer** a természetes immunitás leghatékonyabb humorális eleme. Kaskádszerű aktivációja három főbb úton valósulhat meg, melyek mindegyike egy lízist okozó, membránkárosító multimolekuláris komplex (MAC – membrane-attack complex) képződéséhez vezet. A lektinfüggő utat mannóz tartalmú mikrobák aktiválják, melyek a kollektinekhez tartozó MBL-hez, vagy MASP-hoz kötődnek. A mannóz komponensek MBL-hez való kötődése C4b2a képződésén keresztül vezet a C3 hasításához, míg a MASP közvetlenül is hasítja azt. Az alternatív utat a szíálsavban szegény, szénhidrátban gazdag patogének indítják be. A spontán, de kis mértékben keletkező C3b a B faktorhoz kötődik, majd a D faktor hasítása után létrejövő C3bBb komplex C3 konvertázként működve aktiválja a

komplement kaszkádot. A gazdasejt szíalsavban gazdag felületén a C3b gyorsan inaktiválódik, meggátolva a saját sejtek lízisét. Sem a lektinfüggő út, sem az alternatív út nem igényli antigénspecifikus antitestek jelenlétét, a komplementrendszer ezek hiányában is képes felismerni a szervezetet veszélyeztető kórokozókat azok jellegzetes, az eukarióta sejtektől eltérő szénhidrátkomponenseik alapján. A komplement aktiválás harmadik, „klasszikus” útja az adaptív immunrendszer működésétől függ, mivel az antigén-antitest komplex C1q komponenshez való kötődése indítja el a membránkárosító komplex kialakulásához vezető láncreakciót. Ugyanakkor a C-reaktív protein is iniciálhatja a klasszikus utat, így ezen aktivációs út sem feltétlen igényli az antigénspecifikus elemek jelenlétét. A komplementrendszer C3 komponensének aktiválódása után létrejövő C3bi fragmens a mikrobák felszínén jelenlévő fehérje- és szénhidrátmolekulák oldalláncainak hidroxil- és amino- csoportjaihoz képes kovalensen kötődni, így opsonizálja a kórokozót és a komplementreceptoron keresztül elősegíti annak fagocitózist (2, 3, 8).

A **lipopoliszacharidkötő protein (LBP)** egy szérumban található, endotoxint kötő akut fázis fehérje. A lipopoliszacharid (LPS, endotoxin) a Gram-negatív baktériumok sejtfalának legjellemzőbb komponense, fontos virulencia faktora, mely a Gram-pozitív baktériumok sejtfalából hiányzik. Szorosan kötődik a bakteriális sejtfal külső membránjához, de onnan folyamatosan (kis mértékben) leválik. Már kis mennyisége is intenzív biológiai/élettani hatást válthat ki. Ha az LPS/LBP arány kicsi, az LBP 1-2 LPS molekulát köt meg, ha nagy, akkor akár egész aggregátumokat is. Diszaggregálja az endotoxint, segíti, fokozza annak CD14-hez való kötődését. A szolúbilis CD14 (sCD14)-hez csak szállítja az LPS molekulákat, míg a membrán CD14 (mCD14)-gyel komplexet képezve segít aktiválni a szervezet védekező (gyulladásos) folyamatait. Ugyanakkor képes az endotoxin neutralizálására is azáltal, hogy egymagában, vagy a sCD14-en keresztül a HDL részecskékhez szállítja az LPS molekulákat. A Gram-negatív baktériumokat is köti és opsonizálja, elősegítve ezzel fagocitózist (3, 6, 9).

A **bactericid/permeabilitást fokozó fehérje (BPI)** bakteriosztatikus, baktericid hatással rendelkező LPS-kötő protein, mely elsősorban a neutrophil granulocyták primer granulumaiban található. A bakteriális sejtfal permeabilitását fokozva, a sejtmembránt károsítva a Gram-negatív baktériumok intracelluláris elpusztításában játszik szerepet. Aggregálja az LPS-t, meggátolja a mCD14-hez jutását, neutralizálja az endotoxin biológiai hatásait (6).

A természetes immunrendszer effektor molekulái közé tartoznak az **antimikrobiális peptidek (AMP)**. Olyan oligo-, vagy polipeptidek, melyek amellet, hogy közvetlen módon károsítják a mikrobákat (Gram- pozitív és -negatív baktériumok, gombák, burokkal rendelkező vírusok), vagy gátolják a szaporodásukat, elősegítik a fehérvérsejtek kemotaxisát, szerepet játszanak a gyulladásos folyamatok kialakulásában, a sejtosztódás szabályozásában, epithelizációban, érképződésben, sebgyógyulásban, valamint az adaptív immunválasz létrejöttében. Fontosabb képviselőik a defenzinek, katelicidinek, granulizin, dermicidin (hisztatinok, lizozim). Általában pozitív töltésű molekulák, melyeknél az elektrosztatikusan töltött molekularész a hidrofób résztől térben elkülönül. Antimikrobiális hatásuk egyrészt azon alapul, hogy közvetlen kapcsolatba lépve a target sejt membránjával, károsítják annak membránfunkcióit. Az AMP-k prokarióta sejtek irányában megmutatkozó szelektivitása, valószínűleg membránjuknak az eukariótákétól eltérő lipidösszetételének (eltérő mennyiségű negatívan töltött molekula) köszönhető. Egyes AMP-k az RNS, vagy a fehérje szintézist is gátolják. A defenzinek, katelicidinek az LPS-hez kötődve gátolják annak biológiai hatását, s e kötődés révén ezen AMP-k a target sejtbe is könnyebben bejutnak. (10).

3.4. Sejthez kötött mintázatfelismerő receptorok

3.4.1. *Membrán asszociált receptorok*

Számos membránhoz kötött mintázatfelismerő receptor található a veleszületett immunrendszer sejtjein. Főként a makrofágokon és dendritikus sejteken, kisebb mértékben az epithel sejteken fejeződnek ki. Legfontosabbak a CD14 és TLR-ek, de a többi receptor is hozzájárul a természetes immunrendszer hatékony működéséhez. A **scavenger receptorok** trimer szerkezetű transzmembrán proteinek, melyek az LDL részecskéken kívül kötni tudják az LPS-t, a Gram-pozitív baktériumokra jellemző teikolsavat, sőt egész baktériumokat is. Fagocitózist iniciálva elősegítik a kórokozók eliminálását. A **mannózureceptor** mikrobiális szénhidrátokat (poli-mannóz egységeket) felismerő fagocitareceptorként vesz részt a mikrobák eltakarításában. A **komplementreceptorok** (CR1, CR2, CR3) a komplement komponensek által opsonizált részecskék fagocitózist segítik elő. A **formil-peptid receptorok** a formil-metionil-leucil-fenilalanin kötésére képes receptorok, a monocytákon és neutrophil granulocytákon fejeződnek ki, s részben ezek irányítják a neutrophilek fertőzés helyére történő kemotaxisát (3).

3.4.2. *Intracelluláris mintázatfelismerő receptorok*

Az intracitoplazmatikus TLR-eken kívül egyéb mintázatfelismerő receptorok is találhatók a citoplazmában, melyek a sejtekbe bejutó kórokozókat detektálják.

A **NOD-szerű receptorok** (NLR-ek, NOD-like receptors, NOD-LRR fehérjék) egy nukleotid kötő, oligomerizációt elősegítő NOD doménből (nucleotide-binding oligomerization domain), egy ligand felismerő és kötő C-terminális LRR (leucine rich repeat) doménből és az N-terminálison elhelyezkedő, jeltovábbító, effektor doménből épülnek fel. Ez az effektor domén rendszerint CARD (caspase recruitment domain) – a NOD receptorok esetében, vagy

PYRIN domén (PYD) – a NALP családnál. A NOD család tagjai (NOD1 és 2) bakteriális mintázatokat ismernek fel, s az NF- κ B aktiválásán keresztül gyulladásos citokinek termelődését indukálják. A NALP család receptorai ún. „inflammoszómák” kialakításában vesznek részt és – többek között – a caspase-1 aktiválásával az érett IL-1 β és IL18 keletkezését segítik elő. Ligandjaik bakteriális eredetű fehérjék és RNS, a család két új tagja (IPAF és NAIP5) az intracelluláris patogén *Legionella pneumophila*-ból származó flagellin felismerésére képes (3, 4, 7, 11, 12).

A **RIG-szerű receptorok, CARD-helikáz fehérjék** családjába tartozik például a RIG I (retinoic acid-inducible gene I) és az MDA-5 (melanoma differentiation-associated gene 5). Két CARD doménből és egy helikáz doménből épülnek fel, mely utóbbi a virális dupla szálú RNS felismerésére képes. A ligand kötődése az NF- κ B, vagy az IRF-3 aktiválódását váltja ki, így gyulladásos citokinek, illetve I. típusú interferonok képződéséhez vezet (3, 4, 7, 11).

3.5. A Toll-like receptor (TLR) család

A TLR-ek az evolúció során nagymértékben konzervált szekvenciájú és felépítésű molekulák. Már a férgekben (*Caenorhabditis elegans*) megjelentek és bizonyos növényekben is kimutathatóak, de nevüket a *Drosophila*-kban található analógjaik alapján kapták. Funkciójukban is hasonlóság található, különböző patogénekre jellemző mintázatokat ismernek fel, s antimikrobiális választ indítanak el. Napjainkig a humán TLR családnak 10 tagját azonosították. Az I.-es típusú transzmembrán proteinek családjába tartoznak. Egy extracelluláris ligandfelismerő LRR (leucine rich repeat) doménből, egy transzmembrán doménből és egy jeltovábbító citoplazmatikus TIR (Toll/IL-1R homology) doménből épülnek fel. Sokféle sejten (sejtben) megtalálhatóak, epithel sejteken és a legtöbb immunsejten, neutrophil-, eozinofil granulocytákon, hízósejteken, T-, B- és NK- sejteken, monocytákon, makrofágokon, myeloid- és plasmacytoid dendritikus sejteken (pDC). Ligandspecifitásukban,

celluláris lokalizációjukban és szignalizációs útvonalaikban is különbség mutatkozik az egyes TLR molekulák között. Minden immunsejt egyedi variációban fejezi ki a TLR-eket, így sokféle, viszonylag specifikus immunválasz generálódhat (11-17).

A TLR4 a Gram-negatív baktériumok falában található lipopoliszacharidot (LPS-t) és bizonyos endogén molekulákat ismer fel, mint pl. a különböző hősokk proteineket, a fibronectin EDA doménjét és a hialuronsavat. A TLR2 a Gram-pozitív baktériumok különböző komponenseit köti, úgy mint a peptidoglikánokat, lipoteikolsavat és lipopeptideket, a mycobacteriumokból származó lipoarabinomannánt, valamint a gomba sejtfal egyik fontos komponensét, a zymosan-t is. Szemben a többi TLR-rel a TLR2 heterodimereket alkot a TLR1 és TLR6 molekulákkal, melyek a triacil- és diacil-lipopeptidek megkülönböztetésében vesznek részt. A TLR5 a Gram-negatív baktériumok mozgásáért felelős flagellum fő alkotó fehérjéjét, a flagellint ismeri fel. A TLR3, TLR7 és TLR8, a vírusok detektálásában játszik szerepet, a TLR3 a virális kettősszalú RNS (dsRNA), a TLR7 és TLR8 az egyszálú RNS (ssRNA) kötése révén. A TLR7 és TLR8 ugyanakkor bizonyos antivirális szerek (imiquimod) kötésére is képes. A TLR9 a bakteriális és virális metilátlan CpG DNS felismeréséért felelős. A TLR4-hez nagymértékben hasonló LPS felismerő molekula az RP105 (radioprotective 105, CD180), mely leginkább a B-lymphocytaon, kisebb mértékben a makrofágokon, dendritikus sejteken fejeződik ki. A B-sejtek proliferációját, a CD86 molekula expressziójának fokozódását indukálja, fokozza a sugárzás által indukált apoptózissal szembeni rezisztenciát. Extracelluláris LRR doménnel rendelkezik, de intracelluláris TIR domént nem tartalmaz (11-14).

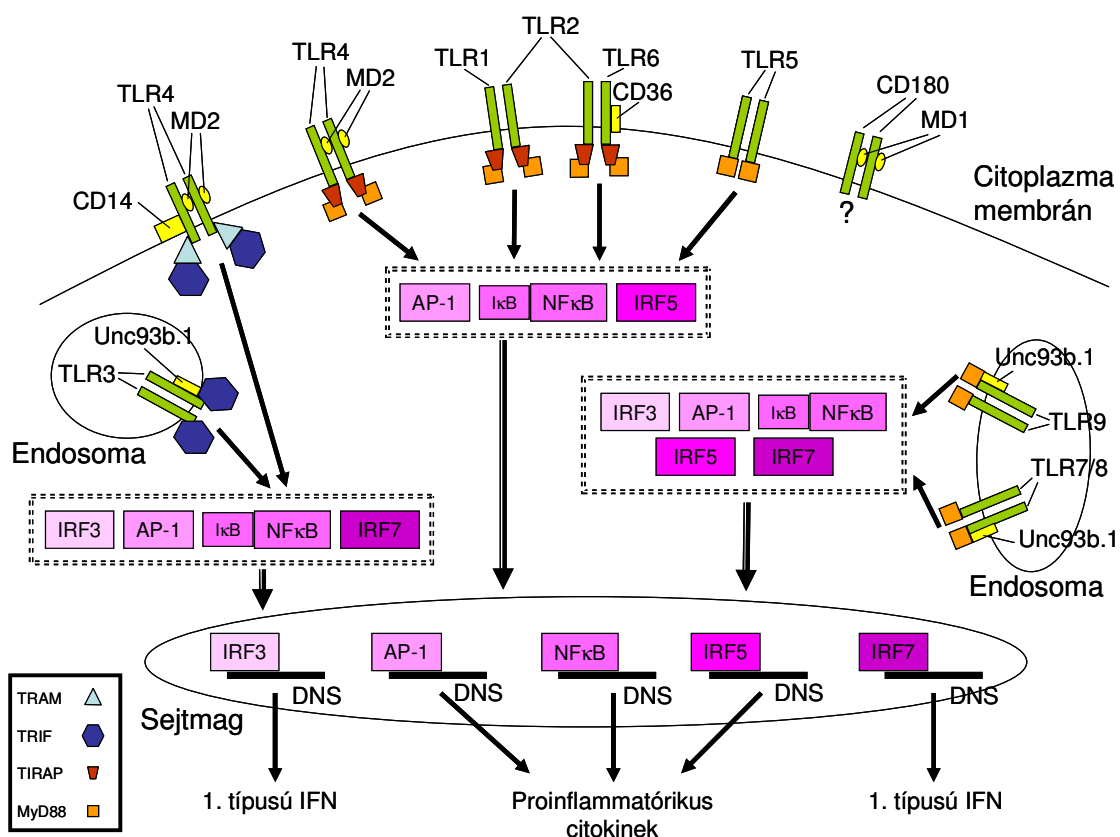
A celluláris lokalizációt illetően a CD180, TLR2, TLR4 és a TLR2-vel asszociált TLR1 és TLR6 a sejtek felszínén a citoplazma membránban helyezkedik el. A TLR5 lokalizációja hasonló, de jellegzetes módon az intestinális epithel sejtek basolaterális felszínén található, így csak akkor mediál sejttaktivációt, ha a kórokozók behatolnak a bél nyálkahártyájába. A TLR3,

TLR7, TLR8, TLR9 intracellulárisan, az endoszómában/fagoszómában helyezkedik el, így aktiváció csak akkor következik be, ha ligandjaik internalizálódnak (11-14).

A ligand felismerésben és a szignalizációban a TLR-eket bizonyos koreceptor molekulák is segítik. A TLR4 megfelelő működéséhez szükséges az MD2 molekula jelenléte, míg a TLR4-hez sokban hasonló CD180 esetében az MD1 kötődése a receptor komplexhez. A TLR4 mediálta szignalizáció TRAM/TRIF útvonalának iniciálása CD14-függő. A CD36 molekula jelenléte szükséges a TLR2/TLR6 komplex diacilglicerol felismeréséhez. Végül az endoplasmaticus reticulumban elhelyezkedő Unc93b1 molekula esszenciális az intracellulárisan elhelyezkedő TLR3, TLR7 és TLR9 bakteriális/virális eredetű nukleinsav felismeréséhez. (13)

A szignalizáció mechanizmusát tekintve is számos különbség van a különböző TLR-ek között. A TLR2 (TLR1 és TLR6) kivételével valamennyi TLR homodimer formájában aktív, a TLR2 azonban a TLR1-gyel, vagy a TLR6-tal alkot heterodimereket. A szignalizációs útvonal intracelluláris komponensei közül legjelentősebb a TIR domént tartalmazó adaptor molekula, a MyD88 (myeloid differenciálódási 88. faktor), amely a TLR3 kivételével valamennyi TLR molekula esetében részt vesz a jelátviteli folyamatában. A TLR4 és a TLR2/TLR1/TLR6 esetében egy másik adaptor fehérje (TIRAP: TIR associated protein) is része a szignalizációnak. A MyD88 mediálta folyamat általában 3 transzkripciós faktor aktiválásához vezet: az NF- κ B, az AP-1 (a MAP kinázok közvetítésével) és az IRF5 (interferonszabályzó 5. faktor). Ezek a molekulák nukleáris transzlokációjuk után fokozzák az általuk regulált gének – elsősorban proinflammatorikus citokinek – transzkripcióját és így ezen citokinek termelődését. A TLR7, TLR8 és TLR9 esetében a MyD88-függő szignalizáció az IRF3 és az IRF7 transzkripciós faktor aktiválódását is eredményezi, ami I. típusú IFN termelődéséhez vezet. A TLR3 és TLR4 esetében leírtak egy MyD88-tól független jelátviteli utat is, mely során egy másik TIR domént tartalmazó adaptor molekula a TRIF (TIR domain-

containing adaptor-inducing interferon- β) illetve a TLR4 szignalizáció esetében a TRIF + TRAM (toll receptor-associated molecule) közreműködésével az IRF3 és az IRF7 aktiválódik, ami az I. típusú IFN-ok és az IFN-által indukált fehérjék fokozott termelését eredményezi. A TRIF/TRAM adaptor molekulák képesek ugyanakkor az AP-1 és az NF- κ B aktiválására is (1.ábra)(13, 14).



1. ábra A Toll-like receptorok szignalizációja

Egyre több adat igazolja, hogy a TLR-ek működése kapcsolatot teremt a természetes és az adaptív immunválasz között. Az antigénprezentáló dendritikus sejtek CD80/CD86 koreceptor expressziója csak megfelelő TLR szignalizáció után nő meg olyan mértékben, ami lehetővé teszi az antigén bemutatást. Másrészt a TLR-ek ligandkötése specifikus citokin termelést indít be. Ezek közül különösen az IL-6 termelése jelentős, mert a T-helper sejtek aktiválódását gátló

T-regulatórikus sejtek hatását szorítja vissza és így elősegíti az antigénbemutatást. Más citokinek mint pl. az IL-12 az érő Th0-sejtek polarizálódását is befolyásolják és facilitálják a celluláris immunválasz kialakulását elősegítő Th1-sejtek differenciálódást. (15)

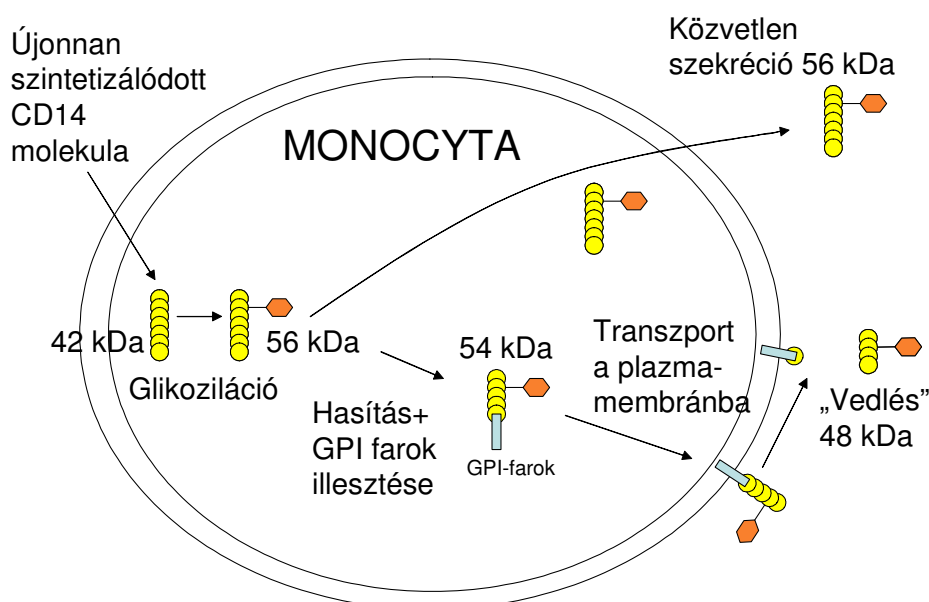
Ahogy a korábbi felsorolásból is kitűnt a TLR-eknek egyre több endogén ligandja is ismert már, melyek közül talán a TLR3, TLR7, TLR8 és TLR9 által azonosított saját RNS és saját CpG DNS tartalmú komplexek a legjelentősebbek. Ezek mennyisége jelentősen megnőhet pl. a perifériás sejtek fokozott apoptosisa és az apoptotikus testek nem megfelelő eltakarítása esetében. Az antigén prezentáló sejtek TLR-jeinek saját ligand kötése elősegítheti ezen saját molekulák bemutatását és így az autoreaktív T majd B-sejtek aktiválódását. Kísérletes rendszerekben már sikerült igazolni DNS vagy snRNP tartalmú immunkomplexek TLR9 illetve TLR3/TLR7 mediálta bemutatását, ami autoantitest termelő autoreaktív B-sejtek aktiválódásához vezetett. Ez alapján, bizonyos patológiás körülmények között a TLR-ek működésének szerepe lehet az autoimmun betegségek kialakulásában is. (15, 16)

3.6. A CD14 molekula

A CD14 molekula a természetes immunrendszer egyik központi mintázatfelismerő receptora, az egyik legjelentősebb LPS kötő fehérje, amely patofiziológiailag releváns koncentrációjú (<10 ng/ml) LPS kötésére képes. A CD14 egy 356 aminosavból és egy 19 aminosav hosszúságú N-terminális leader peptidből álló membrán glikoprotein. Transzláció után a C-terminális vég utolsó 28-30 aminosava lehasad és helyére egy glikozil-foszfatidil-inozitol (GPI) farok kerül. A CD14 molekula molekulatömege glikoziláció után 56 kDa. Nem transzmembrán fehérje, a GPI-farkon keresztül illeszkedik a sejtmembránba, mely nagy laterális mobilitást biztosít a receptor molekulának (9, 17, 18).

A membrán-expresszált formán (mCD14) kívül szolúbilis formája (sCD14) is létezik, melynek két fő típusa különíthető el a humán szérumban: egy 56 kDa-os és egy 48 kDa-os

izoforma, melyeknek eredete eltérő. A 48 kDa-os izoforma különböző stimulusokra a membrán-expresszált CD14 molekulák sejtekről való lehasadása során keletkezik, mely folyamatban szerin-proteázok szerepét igazolták. Az 56 kDa-os izoforma direkt módon szekretálódik, megtartja C-terminális végét s elkerüli a GPI-farok kötődését. Ezen forma valószínűleg intracellulárisan raktározódik, s szekrécióját szerin-proteázok nem befolyásolják (2. ábra) (17, 19, 20, 21).



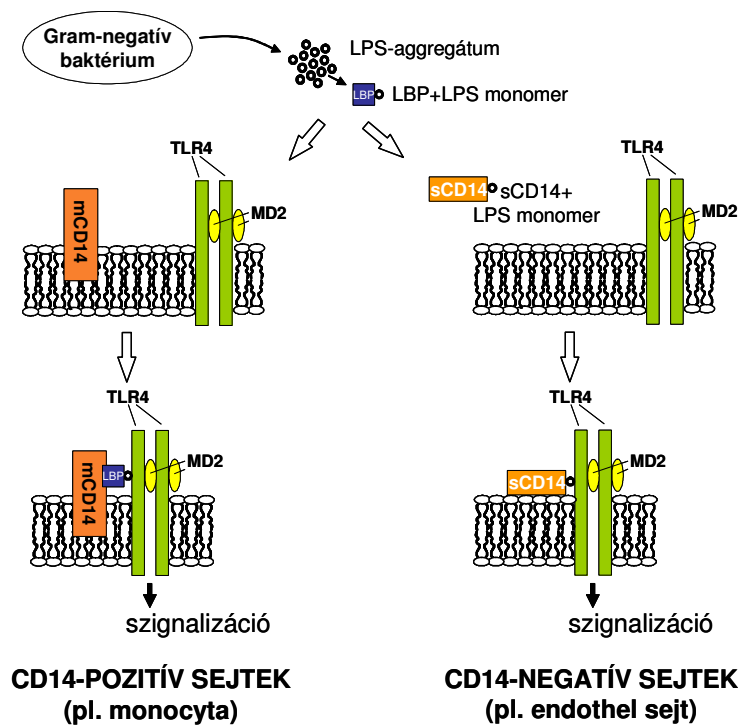
2. ábra A sCD14 izoformáinak keletkezése

A mCD14 myeloid differenciálódási marker, elsősorban érett myeloid sejtek expresszálják. A monocytákon megközelítőleg 110000 molekula, míg a granulocytákon 3000-5000 molekula található sejtenként, makrofágokon szöveti lokalizációjuktól függően változik a sejtenkénti CD14-szám. Kisebb mennyiségben kimutatható B-lymphocytákon, dendritikus sejteken, bazofil granulocytákon, trofoblaszt sejteken és gingivalis fibroblasztokon is. A sCD14 termeléséhez a hepatocyták is nagymértékben hozzájárulnak (17, 18, 22).

A CD14, mint LRR-eket tartalmazó mintázatfelismerő receptor jelentős szerepet tölt be a kórokozókkal szembeni védekezésben, ugyanis az LPS-en kívül számos egyéb, Gram-negatív, Gram-pozitív baktériumokból, gombákból származó konzervatív struktúrát képes felismerni. Ilyen molekulák például a peptidoglikán, lipoteikolsav, a mycobacterialis lipoarabinomannán, vagy a *Pseudomonas* eredetű poliuronsav (17). A CD14 legfőbb sajátága, hogy a Gram-negatív baktériumokból származó endotoxin (LPS) nagy affinitású kötésére képes. A mCD14 önmagában is meg tudja kötni az LPS-t, de az LPS kötő fehérje (LBP) jelenléte az interakció érzékenységet 100-1000-szeresére fokozza. Az LPS először a vérplazmában jelenlévő LBP-hez kapcsolódik, majd ennek közvetítésével jut a sejtek membránjához rögzített CD14-hez, ami ezt követően megköti. Mivel a CD14-nek nincs intracelluláris doménje, nem indíthat el önmagában jelátviteli folyamatokat, ehhez szignalizációs molekulák közreműködésére van szüksége. A CD14-hez kötött LPS az MD2-TLR4 komplexhez kapcsolódva azonban már képes a sejtaktiválás mediálására, ami az NF- κ B aktiválódásán keresztül proinflammatorikus citokinek termelődéséhez vezet (3. ábra)(5, 9, 13, 14, 17).

A szolúbilis CD14 az egészséges emberi szérumban 1-5 μ g/ml koncentrációban található, de akut gyulladás esetén 3-4-szeresére emelkedik a szintje (17, 23-26). A sCD14 molekula LBP jelenlétében alacsony koncentrációjú LPS kötésére is képes. A sCD14-LPS komplex a CD14 molekulát nem expresszáló sejtek (pl. endothel-, epithel-, simaizom sejtek) membránjához tud kötődni, és ilyen módon képes ezeket aktiválni (3. ábra)(17, 27, 28). Másrészt a nagy mennyiségben jelenlévő sCD14 verseng a myeloid sejtek mCD14-ével az LPS kötéséért, így nagy koncentrációban az LPS biológiai hatását neutralizálni tudja (17). A sCD14 az LBP-vel egy effektív foszfolipid transzfer-protein párt alkot, gyorsítja az LPS transzportját a HDL részecskékhez, ezáltal elősegíti az endotoxin detoxifikálását, eliminációját (29). A CD14 molekula képes a keringő apoptotikus testek kötésére és ezek celluláris felvételének

mediálására anélkül, hogy eközben gyulladásos folyamatokat indukálna (17). Szerepe lehet a Gram-negatív baktériumok kötésében és fagocitózisában is (17).



3. ábra Az LBP, a mCD14/sCD14 és a TLR4/MD2 komplex szerepe a CD14-pozitív és CD14-negatív sejtek aktivációjában

Több olyan fertőzőes, krónikus gyulladással járó, autoimmun és atópiás-allergiás betegség is ismeretes, ami a mCD14 és a szérumban található sCD14 szintek megváltozásával jár (17, 23, 24, 30-36).

A CD14-et kódoló gén proximális promóter régiójában találtak egy funkcionálisan jelentős polimorfizmust, mely a transzkripció kezdőpontjához képest a -159-es pozícióban C-T tranzíciót eredményez (37). Kimutatták, hogy azokban a sejtekben, amelyekben a gátló hatású SP3 transzkripciós faktor szintje alacsony (pl. monocyták), a T allél fokozott transzkripciós aktivitást mutat, míg az SP3-ban gazdag hepatocytákban a T és a C allél transzkripciós

aktivitása között nem találtak különbséget (37). Az is ismert, hogy a T/T homozigóták szérumsCD14 szintje jelentősen magasabb, mint a C/C, vagy C/T genotípusúaké. Bár az adatok helyenként ellentmondóak, a T/T genotípus asszociációt mutat a szepszis, különböző krónikus gyulladásos és kardiovaszkuláris betegségek megjelenésével (32-34, 38, 39).

3.7. A vizsgált atópiás és autoimmun betegségek

3.7.1. Atópiás dermatitis

Az atópiás dermatitis (AD) gyakori, multifaktoriális, rendszeresen visszatérő, vagy krónikus lefolyású, erős viszketéssel járó gyulladásos bőrbetegség. Tünetei az esetek 60-65%-ában már az első életévben, 85-90%-ában az első öt évben megjelennek, de felnőtt korban is kialakulhatnak. Az atópiára való hajlam öröklődik, az AD gyakran más atópiás betegségekkel (allergiás rhinitis, asthma) jár együtt, illetve azokat megelőzve jelenik meg. Gyakorisága emelkedő tendenciát mutat, különösen az iparilag fejlett országokban, ahol prevalenciája a gyerekek körében 10-20% (40-42).

Az AD legáltalánosabban elfogadott diagnosztikus kritériumrendszerét Hanifin és Rajka fogalmazta meg, ami a családi anamnézist, jellegzetes bőr- és szemtüneteket és bizonyos laboratóriumi eltéréseket vesz figyelembe (43).

Az atópiás dermatitises betegek bőre igen száraz, viszkető, a gyakori dörzsölés, vakarózás következtében az érintett bőrfelület kipirosodik, duzzadtá, repedezetté, nedvedzővé válik, majd hámló és kérges lesz. Csecsemőknél ezek a bőrtünetek elsősorban az arcon jelennek meg, majd ahogy növekszik a gyermek, az érintett terület kiterjed a kézre, karra, lábra, nyakra, míg a felnőtteknél a testfelület bármely része érintett lehet (40, 41, 44). Az AD-ben szenvedő betegek fogékonyabbak bizonyos kután vírusos (poxvirus vaccinia, *Herpes simplex* 1, HPV, molluscum vírus), bakteriális (*Staphylococcus aureus*) és gombás (*Candida albicans*, *Malassezia furfur*) fertőzésekre (44-47).

Az atópiás dermatitis pontos oka nem ismert, valószínűleg az egyén genetikai adottságai, immunrendszerének állapota, a bőr barrier funkciójának sérülése, bakteriális és vírusos infekciók, valamint környezeti tényezők együttes hatása vezet a betegség kialakulásához. Az AD fontosabb provokáló faktorai az infektív ágensek, a környezeti allergének (háziporatka, pollen, állati szőr), élelmiszer-antigének, irritáló faktorok (gyapjú, szintetikus anyagok, detergensok, dohányfüst), de a betegség tüneteinek a kiváltásához hozzájárulnak az időjárási, hormonális és pszichés tényezők is (40, 42, 44, 48). Az AD patogenezisében valószínűleg legjelentősebb tényező az immunrendszer Th1/Th2 egyensúlyának a Th2 irányba való eltolódása és részben ennek következtében a bőr védekező funkciójának meggyengülése. A betegség kezdeti szakaszában tapasztalt Th2 dominancia pontos oka nem ismert. A higiéniahipotézis szerint a Th1-stimulációval járó mikrobiális expozíció gyermekkori elmaradása lehet az oka az atópiás betegségekben tapasztalt Th2 túlsúlynak, de a mucosális tolerancia fenntartásában fontos szerepet betöltő szabályozó T-sejtek (Treg-sejtek) nem megfelelő működése is eredményezheti ezt az eltérést (40, 44, 45, 48, 49).

A bőr meggyengült védekezőképességére utal, hogy az AD-ban szenvedő betegek bőre különösen fogékony bizonyos mikrobiális infekciókra, a *Staphylococcus aureus* például a betegek több mint 90%-ának bőrén detektálható. Az AD-s betegek keratinocytáinak csökkent ceramid termelése a bőr permeabilitásának növekedéséhez, transzepidermális vízvesztéshez vezet, mely a környezeti allergének, irritánsok, mikrobák könnyebb behatolását eredményezheti. Mind a konstitutívan szekretálódó (dermicidin), mind pedig a gyulladás hatására fokozottan termelődő antimikrobiális peptidek (β -defenzinek, katelicidin) szintje alacsonyabb az AD-s betegek bőrében, mint az egészségesekben. A természetes immunrendszer mintázatfelismerő receptorainak mennyiségi és szerkezeti változásai is hozzájárulhatnak a csökkent védekezőképességhez: megfigyelték MBL deficiencia, csökkent

L-fikolin szérumkoncentráció, NOD1 és TLR2 polimorfizmusok valamint az AD asszociációját (42, 44, 45, 50, 51).

Az atópiás dermatitisnek két fő variánsát ismerjük. Az extrinsic (allergiás) AD, melyet a környezeti-, és/vagy ételallergénekkal szembeni fokozott specifikus IgE-termelés, pozitív prick- és intrakután teszt jellemez, a betegek 70-80%-ánál fordul elő. Az intrinsic (nem allergiás) variáns esetében, mely a betegek 20-30%-át érinti, nem mutatható ki IgE-mediált szenzitizáció, a szérum IgE koncentrációja nem emelkedett (40, 42, 49).

Az atópiás dermatitises betegek tünetmentes bőrében nagyszámú dendritikus sejt és aktivált, kután lymphocytá antigént (CLA) hordozó T-sejt mutatható ki. Az antigénprezentáló dendritikus sejtek extrinsic AD-ban nagy, míg intrinsic AD-ban kisebb mennyiségű, az IgE nagy affinitású kötésére képes FcεRI-et hordoznak a felszínükön. Allergiás (extrinsic) AD esetén az akut léziókban a CLA⁺ T-sejtek Th2 típusú citokineket, IL-4-t, IL-5-t és IL-13-t termelnek, majd a gyulladás későbbi, krónikus szakaszában, feltehetően mikrobiális stimulációk hatására megjelennek az IFNγ-termelő Th1-sejtek is. (Az IL-4 és a TLR szignálok együttesen hatva IL-12 termeléshez és Th1-sejtek keletkezéséhez vezetnek). A nem allergiás (intrinsic) AD-ben szenvedő betegekben a bőr CLA⁺-T-sejtjei az extrinsic AD-ban tapasztaltnál hasonló mennyiségű IL-5-t és IFNγ-t, de kevesebb IL-4-t és IL-13-t termelnek. Az IL-5 az eozinofil granulocyták termelődését fokozza, az IL-4 és IL-13 pedig az IgE szintézisét. Az atópiás dermatitis mindkét formájában nagy számban fordulnak elő eozinofil granulocyták a tünetes bőrben és szérumkoncentrációjuk is magas (40, 45, 49).

Az extrinsic variáns esetében, tehát, a környezeti- és/vagy ételallergének által kiváltott, I. típusú, IgE-mediált túlérzékenységi reakció megy végbe, amit a krónikus szakaszban mikrobiális infekciók által kiváltott Th1 aktivitás kísér és súlyosbít (40, 49). Az intrinsic formában a mikrobák elleni meggyengült védekezőképesség következtében gyakoriak a kután infekciók. A mikrobiális toxinok, amellet, hogy egyesek szuperantigén hatásuk következtében

aktiválják a T-sejtek képződését, klasszikus allergénként viselkedve specifikus IgE képződést indukálnak. Így a mikrobiális komponensekkel szembeni hiperreaktivitás vezet a betegség tüneteinek a kialakulásához (49, 52).

Az atópiás dermatitises betegek kezelésekor fontos az egyénekre specifikus provokáló faktorok eliminálása, a bőrszárazság csökkentése. A gyógyszeres terápia során leggyakrabban helyi kortikoszteroidokat alkalmaznak, melyek gyulladásgátló, immunszuppresszív és antiproliferatív hatásúak. A helyi kalcineuringátlók gátolják a Th1 és Th2 citokinek termelődését, valamint a hisztamin felszabadulását a hízósejtekből. Gyakran alkalmaznak szisztémás H1-receptor antagonistá antihisztaminokat, leginkább a viszketés csökkentése céljából. Súlyos, helyi kezelésre nem reagáló AD-s betegek esetén szisztémás immunszuppresszív terápia alkalmazható (40).

3.7.2. Szisztémás *lupus erythematosus* (SLE)

Az SLE ismeretlen eredetű, több szervet érintő, változatos tüneteket okozó, általában hullámzó lefolyású szisztémás, gyulladásos autoimmun betegség. Kezdeti tünetei, a láz, rossz közérzet, fáradékonyság, gyengeség, fogyás nem specifikusak, más betegségekre is jellemzőek. A legáltalánosabban elfogadott kritériumrendszer – melyet az Amerikai Reumatológusok Kollégiuma 1982-ben állított össze, s 1997-ben kissé módosított – szerint SLE akkor diagnosztizálható egy betegnél, ha az alábbi kritériumok közül legalább négy jelen van: pillangószárny-erythema, diszoid jellegű bőrelváltozás, fényérzékenység, orális fekélyek, arthritis, serozitis (pleuritis és/vagy pericarditis), vesebetegség, neurológiai rendellenesség (epilepszia, vagy pszichózis), hematológiai eltérések (hemolitikus anaemia, vagy leukopenia, vagy lymphopenia, vagy thrombocytopenia), immunológiai eltérések (anti-DNS antitest-, anti-Sm antitest-, antifoszfolipid antitest pozitivitás), antinukleáris antitest pozitivitás. A betegség aktivitásának mértéke többek között a SLEDAI (SLE Disease Activity Index) értékkel is

kifejezhető, melyet a különbözően súlyozott klinikai tünetek számbavételével kalkulálnak (40, 53, 54).

Az SLE prevalenciája átlagosan 50/100000, incidenciája pedig 5-10 új beteg/év/100000 lakos). Nőkben 9-10-szer gyakoribb, mint férfiakban. Multifaktoriális betegség. A családi halmozódás, a tünetmentes rokonokban észlelt gyakoribb immunológiai eltérések, az afrikai és ázsiai rasszokban észlelt gyakoribb előfordulás, a HLA asszociáció genetikai predispozícióra utal. A hormonális tényezők jelentőségét bizonyítja a kifejezett női dominancia, valamint az a tény, hogy a betegség elsősorban a reprodukzív korú nőket érinti, s a terhesség alatt gyakran fellángol. A környezeti tényezők – infekciók, ultraibolya sugárzás, emocionális stressz, különböző gyógyszerek – is hozzájárulhatnak a betegség kialakulásához, súlyosbodásához (40, 53).

SLE-ben az immunrendszer regulációjának komplex zavara alakul ki. A patomechanizmus lényeges elemei a saját antigénekkal szembeni tolerancia áttörése, az autoantigén kínálat növekedése, a sejttermelések eltakarításának zavara, melyek autoreaktív T-sejtek képződéséhez, majd T-sejt dependens, illetve T-sejt independens módon (toll-like receptorokon keresztül) poliklonális B-sejt aktivációhoz és autoantitestek széles skálájának nagyarányú termeléséhez vezetnek. Nagyon jellemző SLE-ben a sejtmagalkotórészek ellen irányuló autoantitestek, mint az antinukleáris antitestek (ANA), vagy az anti-DNS antitestek termelődése. Az autoantitestek egy része direkt módon is károsíthatja a sejteket, szöveteket, de a patogenezis szempontjából leglényegesebb mechanizmus az antigén-antitest komplexek képződése és lerakódása, ami az érintett szervekben gyulladást idéz elő. Az immunkomplexek csökkent eliminációja miatt a gyulladás tartóssá válhat, ami szövetdestrukcióhoz vezet (III. típusú túlérzékenységi reakció, immunkomplex betegség) (40, 54, 55).

Az SLE terápiájának célja az autoimmun jelenségek szuppressziója, az inaktív stádium elérése, fenntartása, a szervkárosodások megelőzése, mérséklése. A kezelés agresszivitását a

betegség aktivitása és a potenciálisan legsúlyosabb szervi tünet határozza meg. Enyhe tünetek esetén elegendő lehet nem szteroid gyulladáscsökkentők (NSAID), bőrtünetek esetén helyi kezelés és fényvédők alkalmazása. Aktív stádiumban viszonylag agresszív kortikoszteroid terápia javasolt, ami inaktív stádiumban mérsékelhető, illetve elhagyható. Súlyos esetekben, illetve a szokásos kezelésre nem reagáló betegeknél lökés szteroid terápia használható. Citosztatikumokkal (pl.: bolus cyclophosphamid, methotrexat) való kezelés súlyos vese- illetve idegrendszeri érintettség esetén javasolt (56).

3.7.3. Polymyositis/Dermatomyositis

A polymyositis (PM) és a dermatomyositis (DM), az ismeretlen eredetű gyulladásos izombetegségek közé tartozó szisztémás autoimmun kórképek, melyek közös jellemzője a proximális végtagizmok immunmediált krónikus gyulladása, amely progresszív, szimmetrikus izomgyengeséghez vezet. A dermatomyositises betegeken típusos, gyulladásos bőrelváltozások is megfigyelhetők (40, 57).

A PM/DM ritka megbetegedés, 100000 lakosból 1-6 embert érint. A DM gyermek- és felnőttkorban is előfordulhat s kétszer annyi nőt érint, mint ahány férfit, a PM gyermekkorban igen ritka, 30 éves kor felett jelentkezik azonos arányban mindkét nemben (40).

Bár a két betegség patomechanizmusa eltérő, a kóros immunfolyamatok mindkét esetben az izmok krónikus gyulladásához, az izomrostok pusztulásához, fibrózishoz vezetnek. Az általános tünetek hasonlóak a két betegségnél, jellemző a rossz közérzet, hőemelkedés, láz, gyengeség, fogyás s a betegeknél nehézséget okoznak a proximális végtagizmokat igénybe vevő mindennapi tevékenységek, mint fésülködés, borotválkozás lépcsőn járás, székről való felállás. A szem- és arcizmok érintetlenek maradnak, de súlyos esetben a garat- és légzőizmok károsodhatnak, ami fatális komplikációkhoz vezethet. A belső szerveket érintő tünetek között gyakori a myocarditis, az interstitiális alveolitis és pulmonális fibrózis (40, 57).

A dermatomyositisben fellépő bőrtünetek közül pathognomikusak (a betegségre specifikusak) a Gottron papulák, melyek vöröses árnyalatú papulák a kéz MCP-és IP-izületei felett, valamint a Gottron-jel, ami az ízületek fesztő felszínén ödémával, vagy anélkül megjelenő hámló jellegű, lilásvöröses macula. A DM-re karakterisztikus, de más betegségben is megjelenő tünet a felső szemhéj ödémája és lilás elszíneződése, amit heliotróp rash-nek is nevezünk, valamint a vörös erythema az arcon, a nyakon és a ruhakivágásnak megfelelő helyeken (V-tünet). A bőrelváltozásokat gyakran kíséri intenzív viszketés, fotoszenzitivitás (57).

A PM/DM diagnosztikai jellemzői Bohan és Peter jelenleg is elfogadott kritériumrendszere alapján (58):

1. a proximális végtagizmok szimmetrikus gyengesége,
2. a harántcsíkolt izomzatra jellegzetes enzimek – elsősorban CK, valamint az aldoláz, GOT, GPT, LDH - szérumszintjének emelkedése,
3. pozitív izombiopszia (mononukleáris sejtes infiltráció, nekrozis, izomrost degeneráció / regeneráció, kötőszövet felszaporodása, kapilláriselzáródás),
4. myopathiára jellemző electromyographiás kép,
5. DM esetén karakterisztikus bőrtünetek.

Az első négy diagnosztikai kritérium fennállásakor definitív PM-et, az ötödik és három másik esetén definitív DM-et lehet megállapítani.

A PM/DM etiológiája még ma sem teljesen ismert. A betegség autoimmun eredetére utal az izomszövetet infiltráló mononukleáris gyulladásos sejtek jelenléte, különböző autoantitestek megjelenése, asszociációja más autoimmun betegségekkel és az immunszuppresszív terápiára adott pozitív válasz is (57, 59). Valószínűleg genetikailag fogékony egyéneknél különböző külső környezeti és belső hatások kóros immunológiai folyamatok aktiválódását eredményezik, ami myositis kialakulásához vezet (57). PM-ben a celluláris immunitás játssza a fő szerepet a

gyulladás fenntartásában, az endomyseálisan, fasciculákon belül megjelenő gyulladásos infiltrátum két fő sejtje a makrofág és a CD8⁺ citotoxikus T-sejt (Tc-sejt). A makrofágok proinflammatorikus citokineket termelnek. Valószínűleg ez is hozzájárulhat ahhoz, hogy az infiltrált, de még a távolabbi izomrostokon is az MHC I molekulák expressziója fokozódik. A kostimulátorikus molekulák (CD80, CD86, ICOSL, CD40) szintén megjelennek az izomsejtek felszínén, az infiltráló Tc-sejteken pedig az ezekkel reagáló ligandumok, receptorok (CD28, CTLA4, ICOS, CD40L). Az ilyen módon antigénprezentáló sejtekké váló izomrostokkal immunológiai szinapszisba lépő autoinvazív Tc-sejtek aktiválódnak, klonálisan felszaporodnak, s perforint termelve károsítják az izomsejteket. Az MHC-I molekulák által prezentált izom autoantigén egyelőre ismeretlen. A polymyositiszes betegek perifériás vérében a Th1-Th2 egyensúly a Th1-sejtek irányába tolódik el (40, 57, 59).

Dermatomyositisben a kóros, főként humorális immunfolyamatok az intramuscularis mikrovasculatura endotheliuma ellen irányulnak. A perivascularisan, illetve perifascicularisan megjelenő gyulladásos infiltrátumban Th-sejtek, B-lymphocyták, makrofágok, pDC-sejtek, neutrophil sejtek fordulnak elő. Kóros autoantitestek aktiválják a komplementrendszer és a kapillárisok falában litikus hatású C5b-9 MAC komplex rakódik le, ami a kapillárisok pusztulásához, izomischemiához, majd perifascicularis atrófiához vezet. Az endothel sejtek kóros folyamatokat kiváltó autoantigénje még nem ismert. DM-ben a Th1-Th2 egyensúly a Th2-sejtek irányába tolódik el (40, 57, 59).

Jellegzetes kóros autoimmun jelenség PM/DM-ben a különböző autoantitestek jelenléte, melyek lehetnek myositisre specifikusak (MSA) és myositissel asszociáltak (MAA). Az MSA-k a myositiszes betegek egyharmadában jelennek meg, valamilyen citoplazmatikus, vagy nukleáris antigén ellen irányulnak. Egy adott beteg esetében csak egy MSA van jelen, melynek szérumszintje korrelál a betegség aktivitásával. A myositis kialakulásában fontos, bár pontosan nem ismert szerepük lehet. A myositisre specifikus autoantitestek alapján klinikailag

homogénebb alcsoportok képezhetők az egyébként változatos megjelenésű PM/DM-ben. A leggyakrabban előforduló MSA-k: az aminoacil-transzfer RNS szintetázok ellen termelődő antiszintetázok (közülük a legfontosabb az anti-Jo-1), a signal recognition particle (SRP) ellen irányuló anti-SRP és a nukleáris protein komplex ellen irányuló anti-Mi-2 (40, 57).

A myositis kialakulásában a genetikai tényezők jelentőségét támasztja alá a több esetben leírt családi halmozódás, bizonyos etnikai csoportokban való gyakoribb előfordulás, a betegség HLA-asszociációja (57). A myositis tüneteinek szezonális, akut megjelenése, melyet gyakran vírusos fertőzés előz meg, az új esetek egyes földrajzi területeken megfigyelhető halmozódása pedig az infektív ágensek szerepére utal (57, 60, 61).

A PM/DM gyógyításában fontos a betegek korai, esetenként agresszív kezelése. A gyógyszeres kezelés mellett fontos a kiegészítő fizioterápia. Az elsővonalbeli terápia alapja a kortikoszteroidok (prednisolon, methylprednisolon) alkalmazása. Súlyosbodó tünetek, illetve a szteroid-terápia hatástalansága esetén alkalmazandók a másodvonalbeli immunszuppresszív szerek (pl. azathioprin, cyclosporin A, methotrexat, cyclophosphamid), illetve intravénás gammaglobulin (40).

4. BETEGEK

4.1. Atópiás dermatitis

Munkánk során a DEOEC Bőrgyógyászati Klinikájának allergológiai szakrendelésén gondozott 30 atópiás dermatitisben szenvedő beteg (12 nő, 18 férfi, átlagéletkoruk $19,7 \pm 9,3$ év), valamint 56 korban és nemben illesztett egészséges személy mintáit vizsgáltuk. A diagnózist Hanifin és Rajka kritériumrendszere alapján állítottuk fel. Az intrinsic AD csoportjába azt a 10 beteget soroltuk, akiknek bőrpróbája, allergén specifikus IgE tesztje negatív, a szérum össz IgE koncentrációja 120 kU/L alatti, átlagban $45,6 \pm 36,6 \text{ kU/L}$ volt. A további 20 beteg – akiknek össz IgE koncentrációja átlagosan $2788,2 \pm 3512,6 \text{ kU/L}$ volt – alkotta az extrinsic AD csoportját. A betegség súlyosságát a SCORAD (SCORe Atopic Dermatitis) index alapján határoztuk meg, ennek átlagértéke az összes AD-s betegre vonatkoztatva $39,8 \pm 16,7$ volt. Az intrinsic AD-s csoportra ($36,4 \pm 15,1$) és az extrinsic AD-s csoportra ($41,5 \pm 17,6$) kalkulált SCORAD index nem tért el szignifikánsan egymástól. A betegek a vérvételt megelőzően legalább négy hétig nem kaptak szisztémás immunmoduláló gyógyszereket és UV-fény terápiában sem részesültek. Az egészséges kontrollok allergiás betegségektől mentesek voltak, szérum IgE koncentrációik a normál tartományba estek.

4.2. Szisztémás lupus erythematosus

A DEOEC III. sz. Belgyógyászati Klinikájának járóbeteg szakrendelésén gondozott betegek közül 18 SLE-ben szenvedő beteget (16 nő, 2 férfi, átlagéletkoruk $38,8 \pm 11,7$ év) vontunk be a glükokortikoszteroid terápiának a monocyták CD14 expressziójára, valamint CD14 függő aktiválhatóságára gyakorolt hatását vizsgáló munkánkba. A betegek az Amerikai Reumatológusok Kollégiuma által összeállított SLE-re vonatkozó diagnosztikus kritériumrendszer legalább négy kritériumának megfeleltek. A vizsgálat ideje alatt 10 beteg (10

nő, átlagéletkoruk $40,6 \pm 14,3$) volt inaktív stádiumban (SLEDAI: $0,9 \pm 1,29$), ők a mintavételkor már legalább három hónapja nem kaptak semmiféle szisztémás kezelést. Ezek a személyek alkották a „szteroidmentes” csoportot. A másik csoportba 8 olyan beteg (6 nő, 2 férfi, átlagéletkoruk $36,5 \pm 7,5$, betegségük átlagos időtartama $9,2 \pm 5,5$ év, SLEDAI: $8,5 \pm 1,93$) tartozott, akik fenntartó terápiaként kis dózisú kortikoszteroidot (4-16 mg methylprednisolon/nap) kaptak. A vizsgálat időtartama alatt betegségük súlyos mértékű fellángolása miatt mindegyikük átesett egy rövid pulzus (lökés) szteroid kezelésen (1 g/nap, három napig). A pulzus szteroid kezelés előtt vett mintájuk szolgáltatta a „kis dózisú szteroid” csoport adatait, a pulzusterápia utolsó adagjának beadása után 24 órával vett mintájuk pedig a „pulzus szteroid” csoport adatait. A kontroll csoportot 11 korban és nemben hasonló egészséges személy képezte.

4.3. Polymyositis/dermatomyositis

Vizsgálatainkba a DEOEC III. sz. Belgyógyászati Klinikájának járóbeteg szakrendelésén gondozott 76 polymyositises (60 nő és 16 férfi, átlagéletkoruk $54,0 \pm 12,1$ év), valamint 34 dermatomyositises beteget (27 nő, 7 férfi, átlagéletkoruk $53,1 \pm 13,9$ év) válogattunk be. Diagnózisuk egyértelmű volt, mindannyian megfeleltek a Bohan és Peter által felállított kritériumrendszernek. A PM-ben szenvedő betegek közül 23 volt aktív, 53 pedig inaktív stádiumban. 14 DM-es beteg volt aktív, 20 pedig inaktív stádiumú a vizsgálat idején. A betegség aktivitását a klinikai tünetek, leginkább az MMT (Manual Muscle Testing) segítségével jellemzett izomgyengeség, valamint az izomenzimek (kreatin kináz, laktát dehidrogenáz) emelkedett szérumkoncentrációja alapján határoztuk meg. Aktív bőrtünetek és extramuscularis tünetek esetén a betegeket szintén az aktív csoportba soroltuk. Az inaktív stádiumban a betegek már remisszióba kerültek, amit az izomerő stabil javulása, az

izomenzimek szérumkoncentrációjának normalizálódása, a bőrtünetek eltűnése és az extramuscularis tünetek javulása jelzett.

A betegség kórlefolyását a betegek követésének ideje alatt jelentkező aktív fázisok száma alapján határoztuk meg. Monofázisos kórlefolyás esetén a beteg követése során csupán egy aktív periódust észleltünk, és az alkalmazott terápia segítségével sikerült elkerülni a relapszust (53 beteg). A policiklusos myositises betegeknel egynél több aktív fázis jelentkezett a követés folyamán és ezek között inaktív szakaszokat lehetett megfigyelni (40 beteg). A krónikus betegek esetében hullámzó erősségű, de folyamatos betegségaktivitást tapasztaltunk (17 beteg). A betegekre jellemző kórlefolyást legalább két éven át tartó követés után határoztuk meg. A vizsgálat idején 71 beteget kortikoszteroiddal, 27 beteget másodvonalbeli immunosuppresszív szerekkel kezeltek és tizenketten semmilyen szisztémás terápiában nem részesültek. A vizsgálatban kontrollként 35 egészséges személy vett részt. A C(-159)T genotipizálás esetében az eredményesebb statisztikai analízis érdekében a kontrollok számát 110-re növeltük.

Irodalmi adatok alapján egy nagyobb, virtuális kontroll csoportot is létrehoztunk. A C(-159)T polimorfizmus megoszlását egészséges személyekben is vizsgáló publikációk között nyolc olyan közleményt találtunk, melyekben a kontroll személyek a kaukázusi rasszhoz tartoztak és a nők aránya vagy egyenlő, vagy nagyobb volt a férfiakénál, csakúgy, mint a mi myositises betegcsoportunknál. Ezen közlemények adatai alapján összegeztük a C/C, C/T és T/T genotípusú kontrollok számát.

5. MÓDSZEREK

5.1. A sejtfelszíni receptorok jelölése, kvantitálása

A sejtfelszíni receptorok mennyiségi meghatározásához direkt és indirekt módon jelölt monoklonális ellenanyagokat, valamint ezek izotípus kontrolljait használtunk.

A következő antitesteket alkalmaztuk:

Direkten jelölt receptor-specifikus antitestek:

Anti humán CD14 mEa LeuM3-PE és anti humán CD16 mEa B73.1-PE (Becton-Dickinson, Mountain View, CA, USA) valamint anti humán CD14 mEa Tük4-FITC (Caltag, Burlingame, CA, USA)

Jelöletlen receptor-specifikus antitestek:

Anti humán CD180 mEa és anti humán TLR4 mEa (Becton-Dickinson), anti humán TLR2 mEa (Serotec, Raleigh, N.C., USA) valamint anti humán CD14 mEa 26ic (Dr. Jos A.G. van Strijp és Dr.Kok P.M. van Kessel bocsátotta rendelkezésünkre – Eijkman-Winkler Institute, Utrecht University, Utrecht, Hollandia)

A jelöletlen antitestek kimutatásához használt „2.” antitest:

Anti egér IgG-FITC és anti egér IgG-PE (DAKO, Glostrup, Denmark)

Izotípus kontroll antitestek:

Egér IgG2a-PE, IgG2a-FITC és IgG1-PE mEa (Becton-Dickinson) valamint jelöletlen egér IgG1, IgG2a és IgG2b mEa (Serotec)

100 µL alvadásgátolt teljes vérmintát 10 µg/mL koncentrációjú monoklonális antitesttel inkubáltunk 30 percig jégen. Indirekt jelölés esetében, a mosási lépések után a „2.” antitesttel is inkubáltuk a mintákat. A vörösvértestek ammónium-kloridos lizálása után a fehérvérsejteket 1%-os paraformaldehiddel fixáltuk. A minták fluoreszcencia intenzitását Coulter EPICS XL, illetve FACSCalibur áramlási citométerrel mértük le. Legalább 5000 monocyta, 20000

lymphocyták és 50000 granulocyták adatait gyűjtöttük be. A monocytákat, lymphocytákat, granulocytákat fényszórási paramétereik, granuláltságuk (side scatter – SSC) és méretük (forward scatter – FSC) alapján választottuk el egymástól. A receptor specifikus antitestet tartalmazó minták átlagos fluoreszcencia intenzitásából (MFI), mint háttérrel kivontuk a megfelelő izotípus kontroll esetében mért MFI-t. Egyes vizsgálatok során a receptorok abszolút számát is meghatároztuk a sejtek felszínén, monoklonális antitesttel fedett standard bead-ek (Qifikit; DAKO) segítségével. A bead-ek egy-egy csoportja különböző és ismert mennyiségű anti-humán CD5 monoklonális ellenanyagot hordozott a felszínén. Ugyanannyi ideig és ugyanolyan koncentrációjú „2.” antitesttel inkubáltuk a bead-eket, mint a sejteket tartalmazó mintákat. Egy mosási lépés után 50000 bead fluoreszcencia intenzitását mértük meg a sejteknél is alkalmazott protokollt használva. A bead-ek MFI-jét az egy bead-en található antitestek számának függvényében ábrázoltuk (log/log skálán). Az így nyert standard görbe segítségével határoztuk meg az egy sejtre jutó receptorok számát.

A sejtfelszíni receptorok vizsgálatokkor általában egyszeres jelölést alkalmaztunk, egyedül a $CD14^{dim+}/CD16^{+}$ és $CD14^{high+}/CD16^{-}$ monocyták szubpopulációk arányának a meghatározásakor használtuk egyszerre, egy tesztcsőben két direkten jelölt antitestet, illetve izotípus kontrolljaikat.

5.2. A CD14 mediálta LPS kötés

A monocyták és granulocyták CD14 mediálta LPS kötésének vizsgálatához a betegek és a kontrollok heparinnal alvadásgátolt, mosott teljes vérét, illetve izolált mononukleáris sejteit használtuk fel. 3×10^5 mononukleáris sejtet, illetve 80 μ L, 5×10^6 /mL leukocytát tartalmazó mosott, hígított vért 30 percig +4°C-on előinkubáltunk 10 μ g/mL blokkoló anti-CD14 monoklonális antitesttel (60bca, Dr. Jos A.G. van Strijp ajándéka), vagy anélkül. Ezután 10, vagy 1000 ng/mL FITC-LPS-t (FITC-cel jelölt *Salmonella minnesota* Re 595), illetve 100

ng/mL bodipy-LPS-t (bodipy-vel jelölt *Salmonella minnesota* Re 595, mindkét LPS Dr. Jos A.G. van Strijp ajándéka) adtunk 4% normál humán szérummal (NHS) együtt a sejtekhez. A sejteket további 30 percig inkubáltuk 37°C-on. Ezt követően a teljes vérből kiinduló minták esetén a vörösvértesteket lizáltuk, végül a fehérvérsejteket 1%-os paraformaldehiddel fixáltuk. A minták értékelése Coulter EPICS XL, illetve FACSCalibur áramlási citométeren történt. A monocytákat és a granulocytákat fényszórási paramétereik alapján kapuztuk. A jelöletlen sejtek fluoreszcencia intenzitását, mint háttérrel minden minta MFI értékéből levontuk. A CD14-függő módon kötődött LPS mennyiségének a meghatározásához az anti-CD14 antitest nélkül inkubált sejtek fluoreszcencia intenzitásából (ami a össz LPS kötés mértékét mutatja) levontuk a blokkoló antitest jelenlétében inkubált sejtek fluoreszcencia intenzitását (CD14 független kötődés).

5.3. A monocyták, granulocyták CD14-mediálta fagocitózisának jellemzése

A betegek és kontroll személyek EDTA-val alvadásgátolt vérmintáját kétszer mostuk Ca^{2+} mentes PBS-sel, majd a leukocyták koncentrációját $5 \times 10^6/\text{mL}$ -re állítottuk be. 50 μL mosott, hígított vérmintát 10% EDTA-plazma jelenlétében bodipy-vel jelölt *Escherichia coli* (K-12-es törzs, Molecular Probes, Eugene, Oreg., USA) baktériumokkal inkubáltuk 37°C-on 30 percig. A sejt/baktérium arány 1:8 volt a kísérleti rendszerben, az EDTA plazmát 10 egészséges donor normál plazmájának összekeverésével készítettük. A vörösvértestek lizálása után a fehérvérsejteket 1%-os paraformaldehiddel fixáltuk. A mérés és kiértékelés FACSCalibur áramlási citométerrel történt. Megmértük a fagocitáló, a nem fagocitáló sejtek és külön csőben a baktériumok FL1-bodipy fluoreszcencia intenzitását, meghatároztuk a fagocitáló sejtek arányát és kiszámoltuk az egy sejt által átlagosan felvett baktériumok számát, vagyis a „fagocitózis index”-et:

$$\text{Fagocitózis index} = \text{fagocitáló sejtek \% -a} \times ((\text{MFI}^f - \text{MFI}^{nf}) / \text{MFI}^b) / 100$$

Az MFI^f , MFI^{nf} , MFI^b a fagocitáló sejtek, a nem fagocitáló sejtek és a baktériumok FL1 csatornán mért átlagos fluoreszcencia intenzitása.

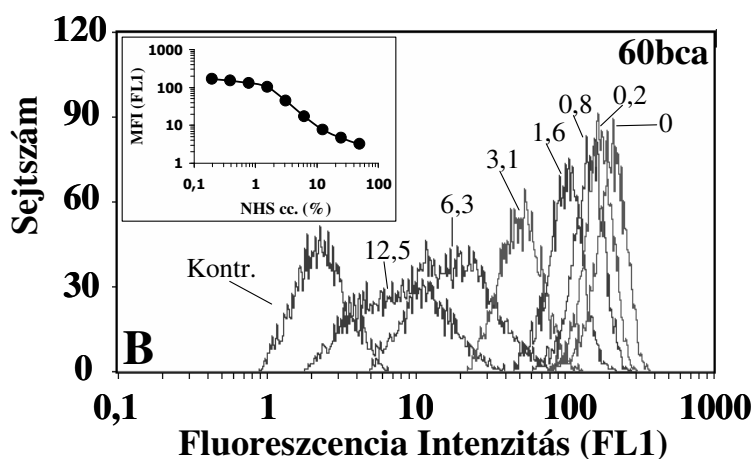
5.4. Az LPS indukálta sejtaktiváció mérése

A sejtaktiváció mértékét a sejtek $\text{TNF}\alpha$ termelésének méréseivel határoztuk meg. Mononukleáris sejteket izoláltunk ficoll sűrűséggradiens segítségével. Mind az izolálás, mind a további lépések steril körülmények között történtek. Az 5×10^5 sejtet tartalmazó mintákat 96 lyukú mikrotiter lemez vályúiba mértük duplikátumban és 60 percig 37°C -on, 5% CO_2 -t tartalmazó termosztátban inkubáltuk. A le nem tapadt sejteket mosással eltávolítottuk. A letapadt monocytákat $10 \mu\text{g/mL}$ anti-CD14 monoklonális antitesttel (60bca), vagy antitest nélkül újabb 60 percig inkubáltuk. Ezután 4% NHS-sel együtt 10, vagy 1000 ng/mL LPS-t (*S.minnesota* Re595) mértünk a megfelelő lyukakba. A mintákat tovább inkubáltuk még 16 órán keresztül, majd a felülúszókat leszívtuk és -70°C -on tároltuk a további felhasználásig. A felülúszók $\text{TNF}\alpha$ koncentrációjának meghatározását egy kereskedelmi forgalomban kapható citokin ELISA kit (OptEIA™ system, Pharmingen, San Diego, CA) segítségével végeztük, a gyártó útmutatásai alapján. Az LPS és NHS nélkül inkubált sejtek $\text{TNF}\alpha$ termelését, mint háttérrel levontuk minden egyes mintához tartozó $\text{TNF}\alpha$ értékből. A sejtek CD14-függő aktiválódását úgy kalkuláltuk ki, hogy a blokkoló anti-CD14 antitest hiányában mért $\text{TNF}\alpha$ mennyiségéből (ami a össz aktiváció mértékét jelzi) kivontuk a gátló antitest jelenlétében mért $\text{TNF}\alpha$ mennyiségét (ez a CD14-független aktiváció mértékére utal).

5.5. A szolúbilis CD14 mérésére alkalmas módszer kifejlesztése

A humán plazma és szérumban sCD14 koncentrációjának mérésére egy egyszerű, áramlási citometriás módszert dolgoztunk ki. A kimutatás a szérumban található sCD14 molekuláknak

és az izolált monocytákon kifejeződő membrán CD14 (mCD14) molekuláknak egy CD14 ellenes monoklonális antitesthez való kötődéséért folyó versengésén alapul. A sejtekhez kötődött fluoreszcensen megjelölt antitest mennyiségét áramlási citométerrel határoztuk meg. A fluoreszcens szignál nagysága fordítottan arányos a szérumból hígítási sort, majd a fluoreszcencia intenzitások meghatározása után kalibrációs görbét készítettünk, melynek segítségével a minták MFI értékének ismeretében a tesztelendő szérumok sCD14 koncentrációját meghatároztuk (4. ábra). A saját módszerünkkel kapott adatokat összevetettük egy kereskedelmi forgalomban kapható ELISA-val (Enzyme-linked immunosorbent assay, Quantikine, R&D systems, Minneapolis, MN, USA) kapott eredményekkel. A módszer beállításánál kétféle CD14 ellenes antitestet, többféle antitestkoncentrációt, szérumkoncentrációt és mononukleáris sejtkoncentrációt teszteltünk le. Az alábbiakban csak a kimutatás eredményessége szempontjából legoptimálisabb paraméterek szerepelnek.



4. ábra A sCD14 meghatározásához használt kalibrációs görbe. A fluoreszcens hisztogrammok felett látható számok a standard szérumból hígítását (%) jelzik. (100% = hígítatlan szérumból)

A kompetícióhoz szükséges mononukleáris sejteket egészséges donorok heparinnal alvadásgátolt véréből ficoll-sűrűséggradiens (Histopaque-1077, Sigma) segítségével izoláltuk, majd a sejtszámot $5 \times 10^6/\text{mL}$ -re állítottuk be. A mononukleáris sejtek 10-25%-ban tartalmaztak monocytákat. A meghatározás további lépései alatt a mintákat jégen tartottuk, valamint enzimblokkoló hatású Na-azid tartalmú oldatokat használtunk, hogy meggátoljuk a CD14 membrán turnoverét a monocytákon. $2,5 \times 10^5$ mononukleáris sejtet ($50 \mu\text{L}$) $6,4 \text{ mg/mL}$ humán IgG-vel (Human, Gödöllő, Magyarország) inkubáltunk 30 percig, hogy blokkoljuk a monocytákon lévő Fc-receptorokat. Ezt követően $50 \mu\text{L}$ 16-szorosára hígított szérumot mértünk a sejtekhez. A standard szérum hígítási sorához ELISA-val már meghatározott, ismert sCD14 koncentrációjú ($1969,3 \text{ ng/mL}$) kevert szérumot (NHS) használtunk, 64-, 32-, 16- és 8-szoros hígításban. A mintákat 15 percig inkubáltuk, majd $1 \mu\text{g/mL}$ anti-CD14 mEa 60bca hozzáadása után újabb 30 perces inkubáció következett. Kétszeri mosás után a sejteket 30 percig $100 \mu\text{L}$ 1:20 arányban hígított FITC-jelölt, kecskében termeltetett anti-egér IgG-vel ((Fab)₂ fragment; Dako, Glostrup, Denmark) inkubáltuk. Mosás után a sejteket 1%-os paraformaldehiddel fixáltuk. A mintákat Coulter EPICS XL, illetve FACSCalibur áramlási citométeren mértük és analizáltuk. A monocyták elkülönítéséhez első körben a mononukleáris sejtek FSC értékeit (lineáris skálán) ábrázoltuk az SSC értékek (lineáris skálán) függvényében. Az így nyert dot plot-on a sejtpopulációk átfedőnek bizonyultak, így egy újabb kapuzással, ahol az FL1 (logaritmikus) értékeket ábrázoltuk az SSC (lineáris) értékek függvényében, kijelöltük a monocyták egy homogén, magas SSC értékű populációját, és ezzel a kapuzással el tudtuk különíteni a monocytákat a lymphocyttól. 5000 monocyta átlagos fluoreszcencia intenzitását mértük meg, s a kalibrációs görbe alapján kiszámoltuk a minták (53 egészséges kontroll személy és 23 SLS-s beteg) sCD14 koncentrációját. A 60bca mEa segítségével a fenti protokollal végzett kimutatás esetében a legkisebb, még detektálható sCD14 koncentráció 30 ng/mL volt.

Meghatároztuk a mérés intraassay és interassay variációs koefficiensét (CV). Az intraassay CV a kontrollok esetében 3,2%, az SLE-s betegek esetében 3,4% volt. Az interassay CV a kontrolloknál 13,3%, az SLE-seknél 11,5% volt. Ismert sCD14 koncentrációjú minta visszamérhetőségét úgy vizsgáltuk, hogy összemértünk egy ELISA-val már meghatározott koncentrációjú (1660,1 ng/mL), 1:32 arányban hígított kontroll szérum mintát és 80 ng/mL koncentrációjú rekombináns sCD14-et (rsCD14, az ELISA kit komponense) 1:2 és 2:1 arányban. Mind a különálló komponensek, mind a keverékek esetében a visszanyerés 100-115% között volt. Az új, áramlási citométeres módszerrel és az ELISA-val mért koncentrációértékek Pearson regresszióval való összevetése azt mutatta, hogy a két módszer jól korrelál egymással ($r=0,92$). Mivel korábbi tanulmányok az SLE-s betegekben az egészséges személyekhez képest magasabb sCD14 koncentrációt mutattak ki, a sCD14 koncentráció mérés diagnosztikai használhatóságát ROC analízissel vizsgáltuk SLE-s betegekben. A két módszer a ROC analízis alapján sem tért el szignifikánsan egymástól (a ROC görbe alatti terület: ELISA: $A=0,854$; áramlási citometriás módszer: $A=0,838$). Bár az új módszer szenzitivitása kissé alulmúlja az ELISA módszerét, mégis megbízható, könnyen elvégezhető, olcsó eljárásnak bizonyult. Az áramlási citometriás módszer egyszerűsítése és gyorsítása végett a későbbiekben a közvetlen, phycoerythrinrel jelölt CD14 ellenes antitest, az anti CD14 mEa MY4-PE (Coulter, Hialeah, Fla., USA) használatát vezettük be, a kétlépéses indirekt jelölés helyett.

5.6. A CD14 izoformák mennyiségi meghatározása Western blot-tal

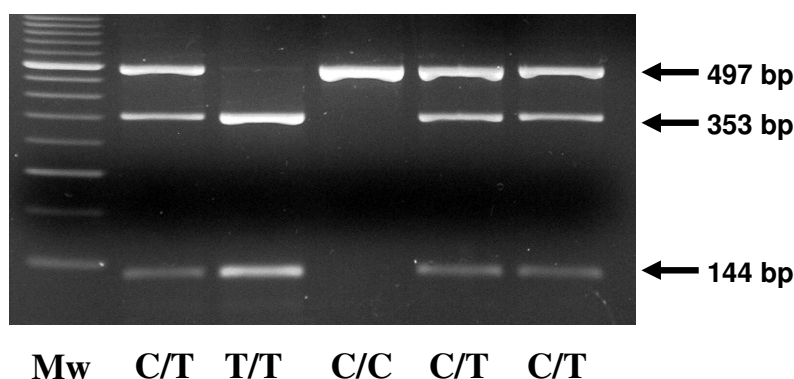
A szolúbilis CD14 56 és 48 kDa molekulatömegű izoformáit poliakrilamid-gélelektroforezis és Western-blot segítségével detektáltuk. A szérummintákat 100-szoros hígítás és denaturálást követően, Rainbow molekulatömeg marker (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) kíséretében 7,5%-os poliakrilamid gélre (Serva, Heidelberg, Germany) vittük fel. Az elektroforetikusan elválasztott mintákat Transblot készülékkel (Bio-Rad) nitrocellulóz

membránra (Bio-Rad) blottoltuk át. A membránt 3%-os BSA/TBST oldattal blokkoltuk, majd 0,2 µg/mL koncentrációjú biotinnal jelölt poliklonális, anti-humán CD14 antitesttel (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) jelöltük. A mosási lépések után a membránhoz kötött CD14 molekulákat alkalikus foszfátazzal konjugált streptavidin (DAKO) és NBC/BCIP szubsztrát (Promega, Madison, WI, USA) segítségével detektáltuk. A megszáritott nitrocellulóz membránt a GelDoc1000 (BioRad) gëldokumentációs rendszerrel analizáltuk, a 48 és az 56 kDa-os izoformának megfelelő sávok denzitását mértük. Meghatároztuk az izoformák arányát és a szérum össz sCD14 koncentrációjának ismeretében kiszámoltuk a két izoforma koncentrációját.

5.7. A CD14 gén C(-159)T polimorfizmusának vizsgálata

A C(-159)T polimorfizmus meghatározását polimeráz láncreakciót követő restrikciós fragmenthossz polimorfizmus vizsgálattal (PCR-RFLP) végeztük. A betegek és kontroll személyek genomi DNS-ét QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Németország) segítségével izoláltuk. A polimorf szekvencia körüli DNS szakaszt polimeráz láncreakcióval felsokszoroztuk. A PCR 25 µl térfogatú elegye 4x250 µM dNTP-t (Roche, Basel, Svájc), 10x PCR puffert (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 2,0 U AmpliTaq Gold polimerázt (Applied Biosystems), 1-1 µM primert és 250 ng genomi DNS-t tartalmazott. Az amplifikációhoz a következő primerpárt használtuk: 5'GCCTCTGACAGTTTATGTAATC3' és 5'GTGCCAACAGATGAGGTTTCAC3'. A PCR körülményei a következők voltak: 95°C 12 perc, 35x (95°C 45 másodperc, 55°C 45 másodperc, 72°C 45 másodperc), 72°C 10 perc. Az amplifikálódott 497 bp hosszúságú PCR terméket egy éjszakán keresztül 37°C-on emésztettük 10 U *AvaII* restrikciós enzimmal (New England Biolabs, Beverly, MA, USA), majd az emésztett termékeket 3%-os agaróz gélen szétválasztottuk, a keletkezett fragmenteket etídium-bromid segítségével vizualizáltuk. A PCR termék csak a T allél esetén hordozza az *AvaII*

restrikciós endonukleáz felismerőhelyét, így T/T genotípus esetén a gélen egy 144 és egy 353 bp hosszúságú fragment, C/C genotípusnál csak egy 497 bp-os fragment, C/T genotípus esetén pedig egy 497 bp-os, egy 353 bp-os és egy 144 bp-os fragment volt látható (5. ábra).



5. ábra A CD14 gén C (-159) T polimorfizmusának vizsgálata PCR+RFLP módszerrel. (Agaróz gélelektroforézis kép a PCR termékek emésztése után.)

5.8. Egyéb alkalmazott (rutin) laboratóriumi módszerek

A monocyták abszolút sejtszámát a Sysmex SF3000 hematológiai automatán (Sysmex Corporation, Kobe, Japán) mértük le, a szérum laktát-dehidrogenáz aktivitását Integra 700 kémiai automatával (Roche, Basel, Svájc) határoztuk meg. A szérum össz IgE koncentrációjának meghatározása a Modular E170 automata (Roche, Basel, Svájc), míg az allergén-specifikus IgE koncentrációjának mérése a MAST CLA1 analízátor (Mountain View, Calif., USA) segítségével történt.

5.9. Statisztikai módszerek

A vizsgált numerikus paraméterek adatainak normális eloszlását Kolmogorov-Smirnov teszt segítségével ellenőriztük. Normális eloszlást mutató eredmények esetében a kontroll és a különböző betegcsoportok adatait Student-féle két mintás t próbával hasonlítottuk össze, míg a nem-normális eloszlású csoportok esetében Mann-Whitney U-tesztet alkalmaztunk. A pulzus-

szteroid terápia előtt és után ugyanazon SLE-s beteg esetében meghatározott paraméterek közötti eltérést a Wilcoxon-féle párosított teszt segítségével analizáltuk. A sCD14 mérő áramlási citometriás módszer beállításakor a kontrollok és az SLE-s betegek mintáiban két különböző módszerrel meghatározott sCD14 szintek közötti eltérést Student féle egy-mintás t-próbával értékeltük és a köztük lévő korrelációt Pearson regressziós analízissel határoztuk meg. A két módszer diagnosztikai használhatóságát ROC analízissel vizsgáltuk meg. A PM/DM-es betegek esetében a sCD14 szintek a felszíni CD14-expresszió és a szérum LDH aktivitások közötti összefüggést Spearman rank regressziós analízissel értékeltük. A CD14 gén C(-159)T polimorfizmusának genotípus megoszlását a kontroll és a különböző betegcsoportokban Khi-négyzet próbával vetettük össze. Az analízist a „Statistica” program segítségével végeztük, bármely különbséget akkor tekintettünk szignifikánsnak ha $p < 0,05$ volt.

6. EREDMÉNYEK

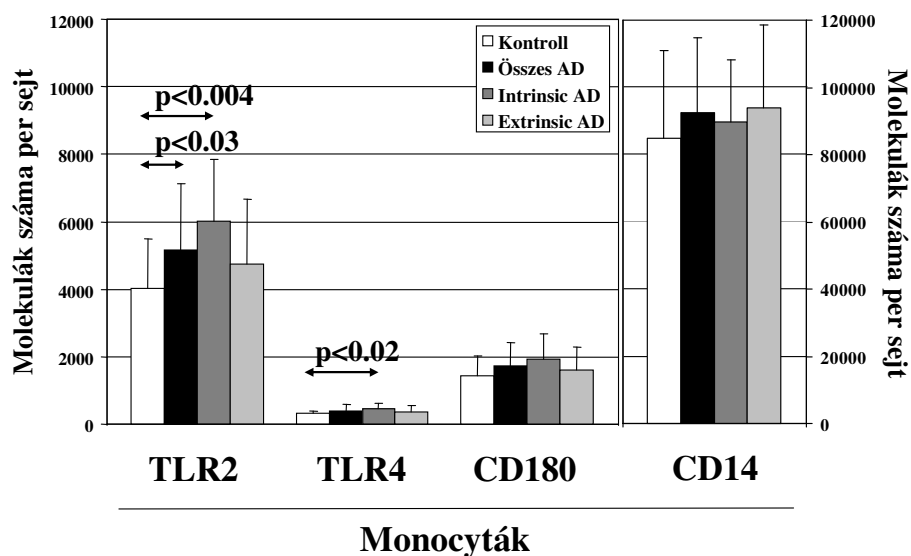
6.1. A CD14/TLR expresszió és a CD14-függő funkciók változása atópiás dermatitisben

6.1.1. A TLR2, TLR4, CD14 és CD180 molekulák sejtfelszíni expressziójának meghatározása atópiás dermatitisben szenvedő betegek monocytáin, granulocytáin és lymphocytáin

A sejtfelszíni receptorok expressziójának meghatározását jelöletlen receptor-specifikus antitestek, jelölt második antitest, monoklonális ellenanyaggal fedett standard bead-ek és áramlási citometria segítségével végeztük. A monocyták és granulocyták esetében a megfelelő hisztogramok tanulmányozása során csak egy sejtpopulációt láttunk, így a receptorok expressziójának meghatározását az egész monocyta-, illetve granulocyta sejtpopuláción végeztük el. A CD180-nal jelölt lymphocytáknál két sejtpopulációt lehetett elkülöníteni, a sejtek 5-15%-a mutatott CD180-pozitivitást, míg 85-95%-a CD180-negatívnak bizonyult. Ebben az esetben csak a CD180-pozitív sejtek adatait értékeltük. Mivel a lymphocyták közül csak a B-lymphocyták expresszálnak jelentősebb mennyiségű CD180-at, valószínűleg a CD180-pozitív sejtek a B lymphocytáknak felelnek meg.

Az atópiás dermatitisben szenvedő betegeket a szérum össz és allergén-specifikus IgE koncentrációja alapján két alcsoportra osztottuk: intrinsic és extrinsic AD. A monocyták sejtfelszíni receptor expresszióját tanulmányozva azt találtuk, hogy az összes AD-s beteg, valamint az intrinsic AD-s betegek TLR2 expressziója szignifikánsan emelkedett volt a kontroll személyekéhez képest (összes AD: 5167 ± 1961 , $p < 0,03$; intrinsic AD: 6024 ± 1826 , $p < 0,004$; kontrollok: 4029 ± 1460 molekula/sejt). Az intrinsic AD-s betegek monocytáin a kontrollokéhoz képest a TLR4 is szignifikánsan magasabb számban volt kimutatható (intrinsic AD: 474 ± 153 , kontrollok: 331 ± 70 molekula/sejt, $p < 0,02$). Az extrinsic AD-s betegek

monocytáin az intrinsic AD-s betegekéhez képest alacsonyabb TLR2 és TLR4 expresszió volt mérhető (TLR2: 4739 ± 1931 ; TLR4: 372 ± 175 molekula/sejt), de a különbség nem volt szignifikáns. Nem találtunk szignifikáns különbséget a betegcsoportok és kontrollok monocytáin kifejeződő CD14 és CD180 molekulák számában sem (6. ábra).

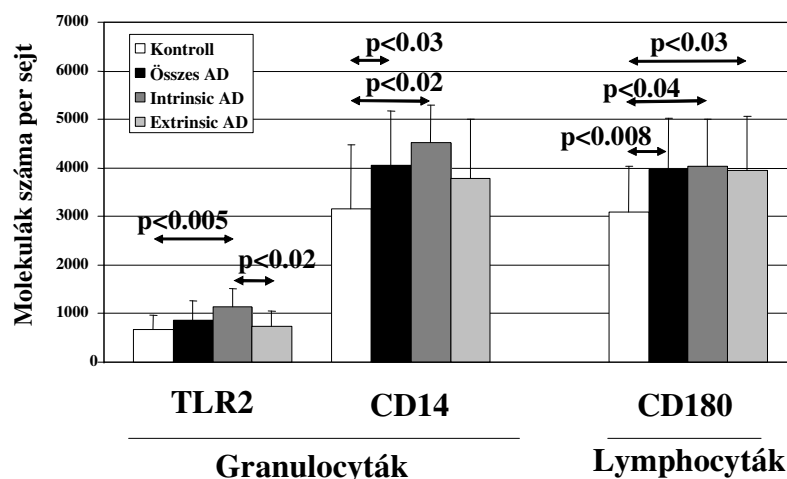


6. ábra Az atópiás dermatitiszes betegek monocytáinak CD14, TLR2, TLR4 és CD180 expressziója

A granulocyták TLR2 expressziója az összes AD-s beteget magába foglaló csoportban és az intrinsic AD-s betegek csoportjában is emelkedett volt az egészségesekéhez képest, de a különbség csak az intrinsic AD-s csoport esetében volt szignifikáns (összes AD: 866 ± 386 , $p < 0,08$; intrinsic AD: 1125 ± 394 , $p < 0,005$; kontrollok: 681 ± 276 molekula/sejt). Az intrinsic AD-s betegek granulocytáin szignifikánsan több TLR2 molekula fejeződött ki, mint az extrinsic AD-s betegekén (extrinsic AD: 736 ± 318 molekula/sejt, $p < 0,02$). A granulocyták CD14 expressziója mind az intrinsic AD-s csoport, mind az összes AD-s beteg esetében a kontrollokénál magasabbnak bizonyult (összes AD: 4051 ± 1127 , $p < 0,03$; intrinsic AD: 4518 ± 783 , $p < 0,02$; kontrollok: 3150 ± 1318 molekula/sejt)(7. ábra).

A sejtfelszíni CD180 molekulák száma a CD180-pozitív lymphocyták esetében az összes AD-s beteg, az intrinsic AD-s és az extrinsic AD-s betegek esetében is a referensekénél szignifikánsan magasabbnak mutatkozott (összes AD: 3975 ± 1055 , $p < 0,008$; intrinsic AD: 4028 ± 968 , $p < 0,04$; extrinsic AD: 3949 ± 1126 , $p < 0,03$; kontrollok: 3089 ± 948 molekula/sejt) (7. ábra).

A granulocyták TLR4 és CD180, a lymphocyták TLR2, TLR4 és CD14 expressziója a kimutathatósági határ alatt maradt.



7. ábra Az atópiás dermatitises betegek granulocytáinak és lymphocytáinak CD14, TLR2 és CD180 expressziója

6.1.2. A CD14-mediálta LPS kötés és fagocitózis vizsgálata atópiás dermatitises betegek monocytáin, granulocytáin

A monocyták és granulocyták CD14-mediálta LPS kötésének vizsgálatakor a mosott teljes vérmintát 100 ng/mL bodipy-vel jelzett LPS-sel és 4% normál humán szérummal inkubáltuk. Blokkoló anti CD14 mEa segítségével határoztuk meg a CD14-független LPS kötést. A sejtek fluoreszcencia intenzitását áramlási citométerrel mértük le, majd kiszámoltuk a CD14-függő LPS kötés mértékét. Az adatok összevetése során nem találtunk különbséget az atópiás

dermatitisben szenvedő betegek és az egészséges személyek monocytáinak CD14-mediálta LPS kötése között (1. táblázat).

A monocyták és granulocyták CD14-mediálta baktérium felvételét bodipy-vel jelzett *E.coli* segítségével vizsgáltuk EDTA plazma jelenlétében. Az EDTA plazma elősegíti a CD14-függő, de gátolja az Fc és komplement receptor-mediálta fagocitózist. A fagocitáló monocyták és granulocyták százalékos arányát áramlási citométerrel határoztuk meg. Megmértük a baktériumok átlagos fluoreszcencia intenzitását is és ez alapján kiszámoltuk a fagocitózis indexet, ami az egy sejt által megkötött/felvett baktériumok átlagos számát mutatja meg. Nem találtunk szignifikáns eltérést az atópiás dermatitises betegek és a kontrollok CD14-mediálta baktérium felvételének mértékében (1. táblázat).

	LPS kötés	fagocitáló sejtek %-a	Fagocitózis index
MONOCYTÁK			
Kontroll	43,1±33,1	21,1±21,1	0,50±0,94
Összes AD	51,1±26,5	22,6±16,6	0,40±0,38
Intrinsic AD	58,5±32,9	23,9±16,6	0,37±0,27
Extrinsic AD	48,0±23,7	22,0±17,0	0,42±0,43
GRANULOCYTÁK			
Kontroll	8,7±5,7	15,8±11,1	0,35±0,33
Összes AD	6,4±4,4	12,5±6,1	0,25±0,15
Intrinsic AD	5,0±2,4	14,1±5,8	0,24±0,07
Extrinsic AD	6,8±5,0	11,8±6,3	0,26±0,17

1. táblázat Az atópiás dermatitises betegek és az egészséges kontrollok monocytáinak és granulocytáinak CD14-függő bodipy-LPS és bodipy-*E.coli* felvétele

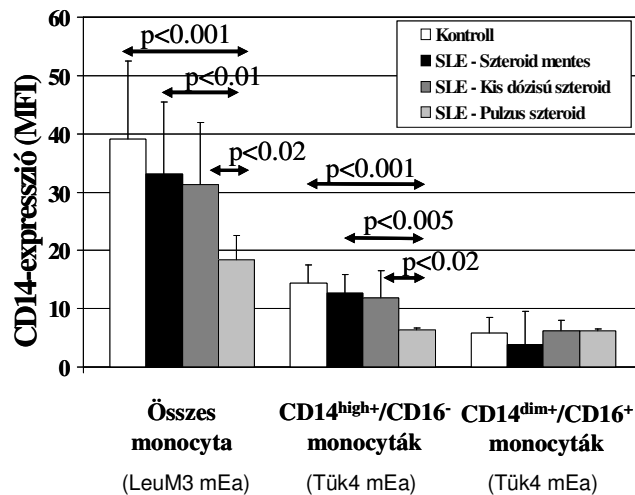
6.1.3. A szérumban sCD14 koncentrációjának meghatározása atópiás dermatitisben szenvedő betegekben

A szérumban sCD14 koncentrációját a kompetíciós alapuló áramlási citométeres módszer alapján határoztuk meg anti CD14 My4-PE ellenanyag segítségével. Az összes AD-s beteget egyesítő csoportban, valamint az extrinsic AD-s betegek csoportjában az egészséges kontrollokéhoz képest szignifikánsan alacsonyabb sCD14 koncentrációt mértünk (összes AD: $1119,9 \pm 372,5$ ng/mL, $p < 0,03$; extrinsic AD: $1084,2 \pm 407,9$ ng/mL, $p < 0,02$; kontrollok: $1334,4 \pm 385,7$ ng/mL).

6.2. A CD14 expresszió, valamint a CD14-függő funkciók változása SLE-ben glükokortikoszteroid terápia hatására

6.2.1. A glükokortikoszteroid terápia hatása a monocyták CD14 expressziójára SLE-s betegekben

A különböző koncentrációjú kortikoszteroiddal *in vivo* kezelt SLE-s betegek monocytáinak CD14 expresszióját közvetlenül jelölt CD14 ellenes monoklonális ellenanyag (LeuM3-PE) és áramlási citométer segítségével határoztuk meg. Eredményeink azt mutatták, hogy a sejtfelszíni CD14 molekulák száma csökkent a terápiásan alkalmazott szteroid dózis emelkedésével, bár szignifikáns különbség csak a pulzus terápiában részesült betegek (MFI= $18,4 \pm 3,8$) és a többi vizsgált személy adatai között mutatkozott (szteroidmentes-SLE: MFI= $33,1 \pm 12,4$, $p < 0,01$; kis dózisú szteroid-SLE: MFI= $32,1 \pm 11,2$, $p < 0,02$; kontroll: MFI= $39,1 \pm 13,4$, $p < 0,001$)(8. ábra). Hasonlóan szignifikáns eredményeket kaptunk akkor is, amikor a pulzus szteroid terápia előtti és utáni értékpárokat hasonlítottuk össze a Wilcoxon-féle párosított teszt segítségével ($p < 0,03$)(2. táblázat).



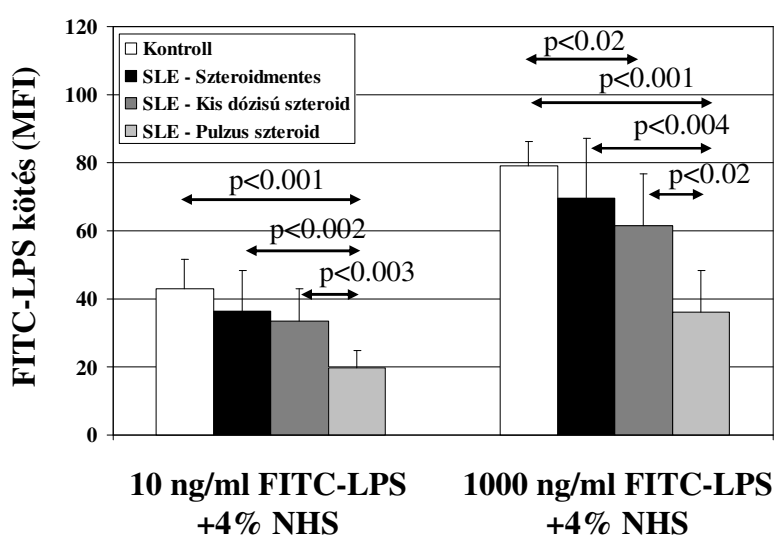
8. ábra Az SLE-s monocyták CD14-expressziója a szteroid dózis függvényében

6.2.2. A glükokortikoszteroid terápia hatása a monocyták CD14-függő LPS kötésére

A sejtfelszíni CD14 ligandkötését SLE-s betegek monocytáin FITC-jelölt LPS és áramlási citométer alkalmazásával vizsgáltuk. A CD14-függő és független LPS kötést egy olyan CD14 ellenes monoklonális antitest (60bca) segítségével határoztuk meg, amely gátolja az LPS CD14-hez való kötődését. Az SLE-s betegekből izolált monocyták CD14-függő LPS kötése csökkent az *in vivo* alkalmazott szteroid dózis emelkedésével, akár 10, akár 1000 ng/mL koncentrációjú FITC-LPS-t használtunk a jelöléshez 4% NHS jelenlétében. Szignifikáns különbségeket találtunk, amikor a kontrollok adatait (10 ng/mL LPS – MFI: 42,9±8,7; 1000 ng/mL LPS – MFI: 79,2±7,2) vetettük össze a pulzus (10 ng/mL LPS – MFI: 19,7±4,8, $p<0,001$; 1000 ng/mL LPS – MFI: 38,1±12,7, $p<0,001$) és a kis dózisú (1000 ng/mL LPS – MFI: 63,3±15,4, $p<0,02$) szteroid terápiaiban részesült betegek adataival, de nem találtunk eltérést, mikor a kontrollok és a szteroid terápiaiban nem részesült SLE-sek (10 ng/mL LPS – MFI: 36,3±12; 1000 ng/mL LPS – MFI: 69,4±17,8) eredményeit hasonlítottuk össze. Pulzus szteroid terápia után a betegek monocytái szignifikánsan kevesebb LPS-t kötöttek meg CD14-függő módon, mint kis dózisú terápia esetén, illetve terápia nélkül (10 ng/mL LPS - szteroid

mentes vs. pulzus szteroid: $p<0,002$; kis dózisú szteroid vs. pulzus szteroid: $p<0,003$; 1000 ng/mL LPS - szteroid mentes vs. pulzus szteroid: $p<0,004$; kis dózisú szteroid vs. pulzus szteroid: $p<0,02$)(9. ábra).

Hasonló szignifikáns különbségeket tapasztaltunk a CD14-függő LPS kötést illetően, amikor a pulzus szteroid kezelésben részesült betegek terápia előtti és utáni értékpárjait hasonlítottuk össze a Wilcoxon-féle párosított teszt segítségével (10 ng/mL LPS: $p<0,02$; 1000 ng/mL LPS: $p<0,02$)(2. táblázat).



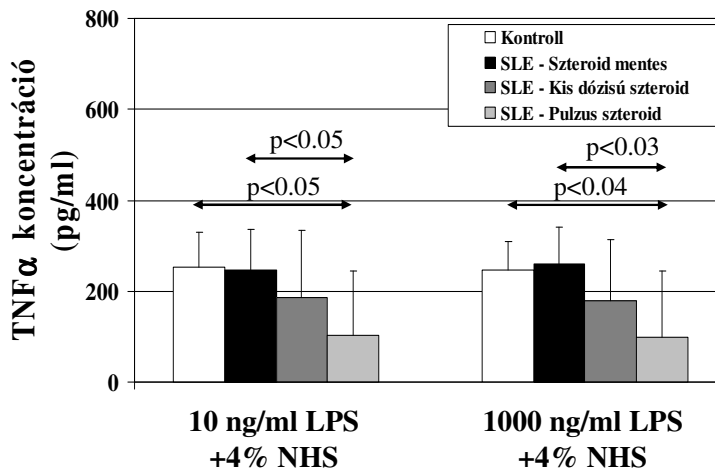
9. ábra Az SLE-s monocyták CD14-mediálta LPS-kötése a szteroid dózis függvényében

6.2.3. A glükokortikoszteroid terápia hatása a monocyták CD14-függő LPS-indukálta aktivációjára

A kontrollok és az SLE-s betegek monocytáinak CD14-független és CD14-függő LPS-indukálta aktivációját a blokkoló hatású anti CD14 mEa (60bca) jelenlétében, illetve hiányában mért TNF α szekréció mérésével határoztuk meg. A pulzus, illetve a kis dózisú szteroid kezelésben részesült betegek LPS-indukálta TNF α termelése alacsonyabb volt, mint a kontroll személyeké (10 ng/mL LPS: $254,1\pm76,4$ pg/mL; 1000 ng/mL LPS: $246,6\pm62,2$ pg/mL), de a különbség csak a pulzus terápiában részesültek (10 ng/mL LPS: $111,4\pm123,3$ pg/mL, $p<0,05$;

1000 ng/mL LPS: $124,9 \pm 113,0$ pg/mL, $p < 0,04$) esetén volt szignifikáns. A pulzus terápiás csoportban mért értékek szignifikánsan (10 ng/mL LPS: $p < 0,05$; 1000 ng/mL LPS: $p < 0,03$) alacsonyabbak voltak a kezeletlen betegekéhez (10 ng/mL LPS: $246,5 \pm 90,4$ pg/mL; 1000 ng/mL LPS: $260,1 \pm 81,5$ pg/mL) képest is (10. ábra).

Abban az esetben, ha a pulzus terápia előtt és után mért adatokat 1-1 csoportba foglaltuk és ezek eltérését Mann-Whitney U teszttel vizsgáltuk, akkor a két csoport között szignifikáns különbség nem volt kimutatható. Ugyanakkor a terápia előtti és utáni értékpárok Wilcoxon-féle párosított teszttel való értékelése szignifikáns különbséget mutatott ki a monocyták pulzus terápia előtti és utáni CD14-függő LPS-indukálta TNF α termelésében (10 ng/mL LPS: $p < 0,05$; 1000 ng/mL LPS: $p < 0,04$) (2. táblázat). A TNF α termelés nagyfokú egyéni variabilitása magyarázhatja a kétféle statisztikai elemzés eredménye közti különbséget.



10. ábra Az SLE-s monocyták CD14-függő TNF α szekréciója a szteroid dózis függvényében

	CD14-expresszió (MFI)		FITC-LPS kötés (MFI)				TNF α termelés (pg/ml)			
	előtt ^a	után ^a	10 ng/ml LPS		1000 ng/ml LPS		10 ng/ml LPS		1000 ng/ml LPS	
	előtt	után	előtt	után	előtt	után	előtt	után	előtt	után
Beteg 1	41,5	22,2	22,5	15,6	46,2	30,0	68,2	15,3	85,3	20,2
Beteg 2	24,4	17,2	21,9	15,9	42,5	28,4	18,7	28,6	45,3	58,31
Beteg 3	25,4	21,2	23,6	20,7	48,7	34,2	196,7	55,9	201,5	98,5
Beteg 4	38,0	11,6	47,1	16,9	83,8	21,8	307,8	92,8	290,7	84,2
Beteg 5	40,5	20,2	31,4	18,8	66,2	32,3	84,9	3,0	137,5	12,8
Beteg 6	10,2	14,6	47,0	30,7	74,3	50,7	304,3	291,5	273,9	271,4
Beteg 7	34,8	18,7	36,8	20,2	74,0	52,8	233,7	87,5	319,9	135,4
Beteg 8	41,7	21,8	37,2	18,9	70,4	55,0	300,9	316,7	326,4	318,6

2. táblázat Az SLE-s betegek monocytáinak CD14-expressziója, CD14-függő FITC-LPS kötése és az LPS-stimulálta TNF α szekréció összehasonlítása pulzus terápia előtt és után

6.2.4. A glükokortikoszteroid terápia hatása a monocyta alcsoportok arányára és abszolút sejtszámára

Antigenitási és funkcionális tulajdonságaik alapján alapvetően két fő monocyta szubpopulációt lehet megkülönböztetni. A monocyták 90-95%-a a CD14^{high+}/CD16⁻ alcsoportba tartozik, míg a proinflammatorikus sajátságú CD14^{dim+}/CD16⁺ alcsoport 5-10%-ot tesz ki. Mivel a különböző CD14 expressziót mutató monocyta típusok arányának nagyfokú változása az egész monocyta populáció CD14 expressziójának, valamint CD14-mediálta funkcióinak a megváltozását is eredményezheti, ezért hematológiai analizátor és áramlási citométer segítségével meghatároztuk ezen szubpopulációk arányát és abszolút sejtszámát is. A sejtfelszíni receptorok jelöléséhez anti CD14-FITC és anti CD16-PE ellenanyagokat használtunk. Bár az egész monocyta populáció és a CD14^{high+}/CD16⁻ típus abszolút sejtszáma növekedett a szteroid terápia alatt, ez a növekedés nem volt szignifikáns (abszolút monocyta szám - kontrollok: 508 $\pm$ 210 sejt/ μ L, szteroid mentes: 429 $\pm$ 185 sejt/ μ L, kis dózisú szteroid: 451 $\pm$ 182 sejt/ μ L, pulzus szteroid: 589 $\pm$ 288 sejt/ μ L; abszolút CD14^{high+}/CD16⁻ szám - kontrollok: 493 $\pm$ 209 sejt/ μ L, szteroid mentes: 403 $\pm$ 180 sejt/ μ L, kis dózisú szteroid: 436 $\pm$ 177 sejt/ μ L, pulzus szteroid: 578 $\pm$ 286 sejt/ μ L). A CD14^{dim+}/CD16⁺ típusú sejtek száma és aránya szignifikánsan magasabb volt a kezeletlen SLE-s betegekben (6,4 $\pm$ 3,3% és 26 $\pm$ 14 sejt/ μ L) mint

a kontrollokban ($3,1 \pm 1,7\%$, $p < 0,02$ és 15 ± 8 sejt/ μL , $p < 0,05$) és a szteroid terápia hatására csökkenést mutatott (kis dózisú szteroid: $3,3 \pm 1,6\%$, $p < 0,02$ és 15 ± 7 sejt/ μL $p < 0,2$; pulzus szteroid: $2,0 \pm 1,1\%$, $p < 0,005$ és 11 ± 6 sejt/ μL $p < 0,02$).

Adataink tehát azt mutatják, hogy a monocyták sejtszámának enyhe növekedése, valamint a monocyta típusok számában és arányában bekövetkező kis fokú változás nem magyarázhatja a kortikoszteroiddal kezelt SLE-s betegek monocytáinak CD14 expresszióban, LPS kötésben és LPS-indukálta TNF α produkcióban bekövetkező jelentős mértékű csökkenését.

A két monocyta típus CD14 expresszióját összehasonlítva az derült ki, hogy a CD14^{high+}/CD16⁻ típus expressziója hasonló módon változott a szteroid kezelés hatására, mint amit az egész monocyta populáció esetében tapasztaltunk az antiCD14 mEa LeuM3-PE antitesttel vizsgálva, míg a sejtfelszíni CD14 molekulák száma nem változott szignifikánsan a CD14^{dim+}/CD16⁺ alcsoportban (8. ábra).

6.3. A sCD14 koncentráció, sCD14 izoformák, CD14 expresszió és a CD14 gén C(-159)T polimorfizmusának összefüggése a PM/DM klinikai paramétereivel

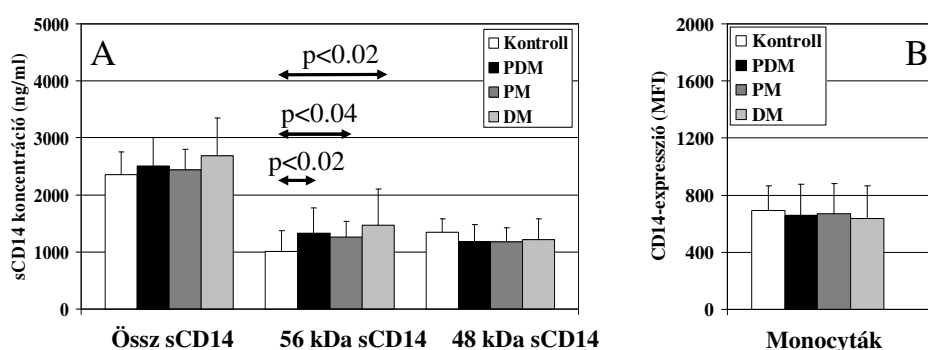
6.3.1. A szérumban sCD14 össz- és 48/56 kDa-os izoformáinak koncentrációja, a perifériás monocyták CD14 expressziója, és a CD14 gén C(-159)T polimorfizmusának megoszlása polimyositisben és dermatomyositisben

Első lépésként a PM-es és a DM-es betegcsoportokat hasonlítottuk össze a CD14 fehérje (sCD14, mCD14) fenotípusos és genotípusos tulajdonságait illetően. A szérumban sCD14 koncentrációját a kompetícióra alapuló áramlási citometriás módszerrel mértük meg. A 48 és 56 kDa-os sCD14 izoforma arányát Western-blottal határoztuk meg, és a sCD14 koncentráció ismeretében számoltuk ki szérumban sCD14 koncentrációjukat. Nem találtunk szignifikáns eltérést a két betegcsoport ezen adatai között, mint ahogy a PM-es és DM-es betegek

monocytáinak áramlási citométerrel meghatározott CD14 expressziójában sem (11. ábra). Megvizsgáltuk a CD14 gén C(-159)T polimorfizmusának a megoszlását és ez a két betegcsoportban hasonlóan bizonyult (PM – C/C: 23,7%, C/T:53,9%, T/T:22,4%; DM – C/C: 35,3%, C/T: 44,1%, T/T: 20,6%, $p=0,44$)

A betegcsoportok (PM, DM, PDM) és az egészséges kontrollok adatait is összehasonlítottuk. Szignifikáns különbséget csak az 56 kDa molekulatömegű sCD14 izoforma esetében találtunk, aminek koncentrációja szignifikánsan emelkedett volt a betegekben a kontrollokhöz képest (PM: $1256,0 \pm 281,3$ ng/mL, $p<0,04$; DM: $1465,5 \pm 637,3$ ng/mL, $p<0,02$; PDM: $1329,7 \pm 446,0$ ng/mL, $p<0,02$; Kontroll: $1015,6 \pm 351,1$ ng/mL)(11. ábra).

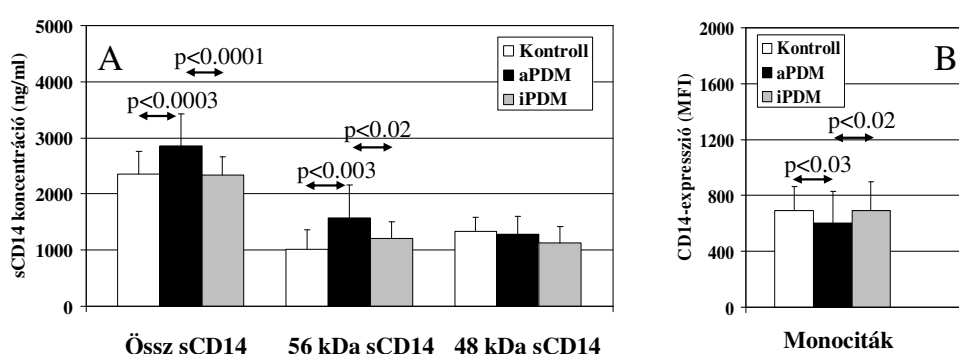
Mivel a vizsgált paraméterekben nem találtunk szignifikáns eltérést a polymyositisben és dermatomyositisben szenvedő betegek között, ezért a későbbiekben az összes myositises beteget egy homogén – PDM elnevezésű - betegcsoportba tartozóként kezeltük.



11. ábra A szérumban sCD14 koncentrációk és a monocyták CD14-expressziójának összevetése polymyositises, dermatomyositises betegek és egészséges kontrollok mintáiban

6.3.2. A sCD14 koncentrációk, a monocyták CD14 expressziója és a betegség aktivitása közötti összefüggés vizsgálata myositises betegekben

A betegeket két csoportra osztottuk betegségük aktivitása alapján, melyet a klinikai tünetek és a laboratóriumi paraméterek figyelembe vételével határoztunk meg. Eredményeink azt mutatták, hogy a össz sCD14 és az 56 kDa-os izoforma koncentrációja szignifikánsan magasabb volt az aktív betegekben (aPDM) mint az inaktív betegekben (iPDM) vagy a kontrollokban (aPDM-össz: $2850,8 \pm 577,4$ ng/mL; aPDM-56 kDa: $1567,2 \pm 591,3$ ng/mL, iPDM-össz: $2337,6 \pm 325,2$ ng/mL, $p < 0,0001$; iPDM-56 kDa: $1210,9 \pm 296,5$ ng/mL, $p < 0,02$; Kontroll-össz: $2357,6 \pm 399,9$ ng/mL, $p < 0,0003$; Kontroll-56 kDa: $1015,6 \pm 351,1$ ng/mL, $p < 0,003$)(12. ábra). A monocyták CD14 expressziója viszont éppen ellenkezőleg, szignifikánsan alacsonyabb volt az aktív betegekben az inaktív betegekhez és a kontrollokhoz viszonyítva (aPDM-MFI: $601,6 \pm 227,0$; iPDM-MFI: $690,7 \pm 204,1$, $p < 0,02$; Kontroll-MFI: $693,3 \pm 172,0$, $p < 0,03$) (12. ábra).



12. ábra A szérumban sCD14 koncentrációk és a monocyták CD14-expressziójának összefüggése a betegség aktivitásával poly/dermatomyositisben

6.3.3. A sCD14 koncentrációk, a monocyták CD14 expressziója és a betegség lefolyása közötti összefüggés vizsgálata myositises betegekben

A PDM-es betegeket különböző alcsoportokba soroltuk betegségük lefolyása alapján: monofázisos, policiklusos és krónikus. Szignifikánsan magasabb volt az össz sCD14 koncentráció a krónikus lefolyású betegek szérumban a monofázisos, a policiklusos betegekhez és a kontrollokhoz viszonyítva. A krónikus csoportba tartozó betegek szérumban mértük a legmagasabb koncentrációt az 56 kDa-os izoformát illetően is, de a különbségek a többi alcsoporthoz viszonyítva nem voltak szignifikánsak. Ugyanakkor valamennyi betegség-lefolyás alapján létrehozott alcsoport 56 kDa-os sCD14 koncentrációja szignifikánsan magasabb volt, mint az egészséges kontrolloké. A monocyták CD14 expressziója a krónikus csoportban bizonyult a legalacsonyabbnak és a különbségek ezen alcsoport és a monofázisos alcsoport, valamint a kontroll csoport között a szignifikancia szintjét is elérték (3. táblázat).

Mivel szignifikáns különbséget észleltünk az aktív és inaktív stádiumban lévő betegek között az össz és 56 kDa-os sCD14 koncentrációját, valamint monocytáik CD14 expresszióját illetően, ezen aktivitási csoportokat tovább osztottuk a betegség lefolyása szerinti alcsoportokra. Az inaktív betegek csoportján belül nem tudtunk szignifikáns különbséget kimutatni a monofázisos, policiklusos és krónikus betegek között, sem pedig bármely alcsoport és a kontrollok között a monocyták CD14 expresszióját és a szérumban sCD14 koncentrációit illetően. Az aktív betegeknél sem találtunk különbséget ezen paraméterekre vonatkozóan a különböző betegség-lefolyású alcsoportok között, de a össz sCD14 és az 56 kDa-os izoforma szérumban koncentrációja minden alcsoportban szignifikánsan magasabb volt, mint a kontrollokban. Az aktív krónikus betegek monocytáinak CD14 expressziója a kontroll személyekéhez képest szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult (3. táblázat).

Az aktív stádiumú betegek aránya a krónikus csoportban (100%) szignifikánsan magasabb volt a monofázisos (15,1%, $p<0,0001$) és policiklusos (30,0%, $p<0,0001$) csoporthoz viszonyítva.

	Ossz sCD14 (ng/mL)	56 kDa sCD14 (ng/mL)	48 kDa sCD14 (ng/mL)	CD14-expresszió (MFI)
Összes PDM-es beteg				
Monofázisos	2456,5 $\pm$ 415,5	1308,1 $\pm$ 344,6	1148,4 $\pm$ 327,1	669,6 $\pm$ 192,9
Policiklusos	2436,6 $\pm$ 424,0	1278,4 $\pm$ 348,3	1158,2 $\pm$ 270,6	688,1 $\pm$ 233,4
Krónikus	2817,1 $\pm$ 724,7	1535,5 $\pm$ 833,0	1281,6 $\pm$ 287,9	580,4 $\pm$ 240,3
PDM-es betegek aktív betegséggel				
Monofázisos	2991,0 $\pm$ 529,6	1742,5 $\pm$ 189,3	1248,5 $\pm$ 478,8	633,6 $\pm$ 217,9
Policiklusos	2681,2 $\pm$ 441,8	1392,0 $\pm$ 454,9	1289,2 $\pm$ 192,0	646,8 $\pm$ 226,7
Krónikus	2817,1 $\pm$ 724,7	1535,5 $\pm$ 833,0	1281,6 $\pm$ 287,9	580,4 $\pm$ 240,3
Kontrollok	2357,6 $\pm$ 399,9	1015,6 $\pm$ 351,1	1342,0 $\pm$ 239,3	693,3 $\pm$ 172,0

3. táblázat A szérumban sCD14 koncentrációk és a monocyták CD14-expressziója egészséges kontrollokban és különböző betegséglefolyással jellemezhető PDM-es betegekben

Az egyes csoportok közötti különbséget Mann-Whitney U-tesztel vizsgáltuk.

Összes PDM-es beteg, össz sCD14: k. vs kont., $p<0,02$; k. vs mf., $p<0,02$; k. vs pc., $p<0,04$.
 Összes PDM-es beteg, 56 kDa sCD14: k. vs kont., $p<0,05$; mf. vs kont., $p<0,03$; pc. vs kont., $p<0,05$.

Összes PDM-es beteg, CD14-expresszió: k. vs kont., $p<0,04$; k. vs mf., $p<0,05$.

aPDM betegek, össz sCD14: k. vs kont., $p<0,02$; mf. vs kont., $p<0,02$; pc. vs kont., $p<0,05$.

aPDM betegek, 56 kDa sCD14: k. vs kont., $p<0,05$; mf. vs kont., $p<0,01$; pc. vs kont., $p<0,05$.

aPDM betegek, CD14-expresszió: k. vs kont., $p<0,04$.

k.=krónikus, kont.=kontroll, mf.=monofázisos, pc.=policiklusos

6.3.4. A sCD14 koncentrációk, a monocyták CD14 expressziója és egy, a betegség aktivitását jelző biokémiai marker közötti összefüggés vizsgálata

Mivel a szérumban össz és 56 kDa-os sCD14 koncentrációja, valamint a monocyták CD14 expressziója asszociációt mutatott a betegség aktivitásával, megvizsgáltuk ezen

paramétereknek a myositis egy ismert aktivitási markerével való korrelációját. A betegek szérumának össz sCD14 koncentrációja szignifikánsan korrelált a szérum laktát-dehidrogenáz aktivitásával ($R=0,273$, $p<0,004$). A monocyták CD14 expressziója és a laktát-dehidrogenáz aktivitás között szignifikáns negatív korrelációt tudtunk kimutatni ($R=-0,295$, $p<0,002$).

6.3.5. A CD14 gén C(-159)T polimorfizmusa és a betegség aktivitása, valamint a kórlefordulás közötti összefüggés vizsgálata

A statisztikai elemzés hatásfokának növelése érdekében az egészséges kontroll személyek számát 110-re növeltük, sőt irodalmi adatok felhasználásával egy nagyobb kontrollcsoportot is létrehoztunk, mely 1420 főből állt (570 férfi, 850 nő, átlagéletkoruk: 54,0 év). Az allélok és a genotípusok eloszlása ebben a virtuális kontrollcsoportban hasonló volt, mint a saját kontrollcsoportunkban (4. táblázat).

Összevetettük az aktív és az inaktív PDM-es betegcsoportban tapasztalható genotípuseloszlást. Eredményeink azt mutatták, hogy a T/T genotípus aránya az aktív PDM-es betegek csoportjában szignifikánsan magasabb volt (40,5%), mint akár az inaktív PDM-es csoportban (12,3%, $p<0,002$), akár a kétféle kontrollcsoportban (saját: 19,1%, $p<0,02$; irodalmi: 21,5%, $p<0,01$). A T/T genotípus aránya szintén nagyobb volt a krónikus lefolyást mutató betegcsoportban, mint a policiklusos, vagy a monofázisos csoportban, vagy a kontrollokban, de a különbség csak krónikus (47,1%) és a policiklusos csoport (7,5%, $p<0,002$) illetve a krónikus csoport és a kontrollok (saját: 19,1%, $p<0,03$; irodalmi: 21,5%, $p<0,03$) összevetésekor bizonyult szignifikánsnak. A T/T genotípusú PDM-es betegek csoportjában az aktív stádiumú ($15/24=62,5\%$) és a krónikus lefolyású betegek ($8/24=33,3\%$) aránya szignifikánsan magasabb volt, mint az egyéb genotípusokat egyesítő C/C+C/T csoportban (aktív: $22/86=25,6\%$, $p<0,002$; krónikus: $9/86=10,5\%$, $p<0,02$)(4. táblázat).

	C/C + C/T	T/T	C-allél	T-allél
Inaktív	64 (87,7%)	9 (12,3%)	58,2%	41,8%
Aktív	22 (59,5%)	15 (40,5%)	41,9%	58,1%
Monofázisos	40 (75,5%)	13 (24,5%)	50,0%	50,0%
Policiklusos	37 (92,5%)	3 (7,5%)	66,2%	33,8%
Krónikus	9 (52,9%)	8 (47,1%)	29,4%	70,6%
Kontroll (saját)	89 (80,9%)	21 (19,1%)	50,9%	49,1%
Kontroll (irodalom)	1115 (78,5%)	305 (21,5%)	53,0%	47,0%

4. táblázat A CD14 gén C(-159)T polimorfizmusa, a betegség aktivitás és betegség lefolyás közötti összefüggés vizsgálata poly/dermatomyositis-ben

A genotípusok megoszlása közötti különbséget Khi-négyzet teszt segítségével értékeltük. (aktív vs inaktív betegek: $p<0,002$; aktív betegek vs saját kontrollok: $p<0,02$; aktív betegek vs irodalmi kontrollok: $p<0,01$; policiklusos vs krónikus betegek: $p<0,002$; krónikus betegek vs saját kontrollok: $p<0,03$; krónikus betegek vs irodalmi kontrollok: $p<0,03$).

6.3.6. A CD14 gén C(-159)T polimorfizmusa és a szérumban sCD14 koncentrációja közötti összefüggés vizsgálata

Összehasonlítottuk a CD14 gén C(-159)T polimorfizmusára vonatkozóan különböző genotípusú betegek szérumban sCD14 koncentrációit. A T/T genotípus esetében a szérumban sCD14 koncentrációja (T/T-össz sCD14: $2672,6 \pm 522,4$ ng/mL, $p<0,03$) és az 56 kDa-os izoforma koncentrációja is (T/T-56 kDa sCD14: $1529,1 \pm 381,5$ ng/mL, $p<0,02$) szignifikánsan magasabb volt, mint a többi genotípus esetében (C/C+T/C-össz sCD14: $2464,9 \pm 472,8$ ng/mL; C/C+T/C-56 kDa sCD14: $1278,7 \pm 450,9$ ng/mL).

MEGBESZÉLÉS

A természetes immunrendszer meghatározó molekuláris elemei közé tartozó CD14 molekula és TLR-ek, mint a patogénekre jellemző molekuláris mintázatokat felismerő receptorok együttműködő rendszere, számos mikrobiális termék felismerésében játszik szerepet (2, 4-6, 11-14, 17). Bármilyen, ezek expresszióját, méginkább működését érintő változás nagy hatással lehet a gazdaszervezet immunregulációjára, patogénekkel szembeni védekezőképességére. A CD14 molekula a „befogó” szerepét játssza ebben az együttesben, közvetlenül kötődik a patogénekre jellemző molekulákhoz. A kötődésnek két következménye van: egyrészt a felismert mintázat az asszociált TLR4 receptorok számára is könnyen hozzáférhetővé válik, ami a kötődést követően sejtaktivációt eredményez (12-14, 62), másrészt a megkötött ligandum internalizációja a mikrobiális termékek eltakarításához és detoxifikálásához is hozzájárul (62). A CD14, a TLR-ek és az infekciók közötti kapcsolat kétféle módon is megvalósulhat. Ezen receptorok csökkent expressziója, illetve aktivitása a fertőzések gyakoriságának növekedéséhez vezethet, ugyanakkor a súlyos lokális, vagy szisztémás fertőzések az egész szervezet immunrendszerét mozgósítják, ami a CD14 és egyes TLR-ek aktivitását, expresszióját fokozhatja.

Számos megfigyelés szerint a *S. aureus* kimutatható az atópiás dermatitisben szenvedő betegek bőrtünetek által érintett és nem érintett bőrfelületén is, mind az akut, mind a krónikus léziókban. Ezen baktériumok a krónikus gyulladás fenntartása, felerősítése révén hozzájárulnak az atópiás tünetek kifejlődéséhez. Olyan anyagokat (pl. peptidoglikán) bocsátanak ki, amelyek a T-sejtek, makrofágok, eozinofil granulocyták és keratinocyták proinflammatorikus citokin termelését serkentik (42, 45). Ráadásul a *Staphylococcus* exotoxinok szuperantigénként viselkedve a T-sejtek poliklonális aktivációját okozzák (42, 45, 63), ezen túlmenően hagyományos allergénként funkcionálva az exotoxinra specifikus T-sejtek termelését indukálják, ami exotoxin-specifikus IgE antitestek képződéséhez vezet (44, 47).

Az atópiás bőrt érintő gyakori bakteriális fertőzések okát teljesen még nem ismerjük. Mivel az AD-s bőr stratum corneum rétege sérült, a bőr szabadon maradó fibronectin receptorai elősegíthetik a *S. aureus* adhézióját (42, 50). Ráadásul az atópiás dermatitisben szenvedő betegek keratinocytái kevesebb defenzint és egyéb antimikrobiális peptidet termelnek, mint az egészséges személyek, ami elősegítheti a baktériumok megtelepedését, szaporodását (42, 51). A gazdaszervezet mikrobák elleni védekezőrendszerének fontos eleme a mononukleáris fagocita rendszer. A monocyták, makrofágok a baktériumokból származó anyagok (LPS, peptidoglikán) hatására aktiválódnak, s ez a folyamat leginkább a CD14/TLR receptorok közvetítésével valósul meg (11-14, 17). Így egy lehetséges magyarázat a gyakori fertőzésekre ezeknek a molekuláknak a csökkent expressziója és funkciója. Éppen ezért vizsgálataink során a CD14 és TLR-ek fenotípusos és funkcionális tulajdonságait vizsgáltuk atópiás dermatitisben szenvedő betegek mintáiban. Szignifikánsan magasabb számú TLR2-t detektáltunk a perifériás monocytákon, CD14-et a granulocytákon és CD180-at a CD180⁺ lymphocytákon az AD-s betegekben, mint az egészséges kontrollokban. Hasonlóan magasabb volt a TLR4 molekulák száma a monocytákon és a TLR2 molekuláké a granulocytákon, de az egészségesekhez viszonyítva a különbség nem volt szignifikáns. Nem találtunk eltérést az AD-s betegek CD14 mediálta LPS-kötésének és baktérium felvételének mértékében sem. Mivel a vizsgált receptorok expressziója nem csökkent a betegekben, így a csökkent receptorszám nem okozhatta az atópiás dermatitises bőrön oly gyakori bakteriális infekciókat. Ugyanakkor ismert, hogy a Gram-negatív és Gram-pozitív baktériumok különböző termékei a perifériás fehérvérsejteken fokozhatják a CD14, TLR2 és TLR4 molekulák expresszióját (64), és ezen receptorok száma szignifikánsan magasabb volt a baktériumok okozta szepszises betegekben (65) is. Ezek a megfigyelések, valamint a saját eredményeink is arra utalnak, hogy a gyakori lokális bakteriális infekciók és az AD-s bőr csökkent barrier funkciója következtében bizonyos bakteriális molekulák (LPS, peptidoglikán, szuperantigének) bejuthatnak a vérkeringésbe és

fokozhatják a fehérvérsejtek CD14/CD180/TLR expresszióját. A CD180 molekulák számának a CD180⁺ lymphocytákon tapasztalható növekedése hasonló módon magyarázható. A CD180 a TLR4-hez hasonló szerkezetű és funkciójú molekula, a lymphocyták fontos LPS kötő receptora (66).

A sejtfelszíni receptorok számában észlelt eltérések kifejezettebbek és szignifikánsabbak voltak az intrinsic AD-s betegek esetében, míg az extrinsic AD-s betegcsoport adatai nem tértek el jelentősen az egészséges kontrolloktól. Mivel a bakteriális fertőzések gyakorisága nem nagyobb az intrinsic AD-s betegekben, mint az extrinsic AD-s csoportban (67), feltételezhetjük, hogy az intrinsic AD-s betegek érzékenyebben reagálnak a különböző mikrobiális eredetű anyagokra. Ez a túlérzékenység válthatja a ki az atópiás dermatitisnek ezt a formáját. Irodalmi adatok azt mutatják, hogy az intrinsic AD-ben szenvedő betegek 50%-ában mikrobiális komponensekkel szembeni allergén-specifikus IgE termelődését lehet kimutatni. Ez a megfigyelés tovább növeli annak a valószínűségét, hogy az intrinsic AD kialakulásában kiváltó tényező lehet a mikrobiális eredetű anyagokkal szembeni túlérzékenység (52).

A CD14 és a TLR-ek fontos szerepet játszanak a perifériás leukociták és antigén bemutató sejtek aktiválásában, a gyulladásos folyamatok és az antigénspecifikus immunválasz beindításában (11-15, 17). Hogy az autoimmun betegségek kialakulásában, lefolyásában is szerepet játszhatnak ezek a receptorok, arra utal az a tény, hogy megváltozott mCD14 expressziót, sCD14 koncentrációt és a CD14 gén C(-159)T polimorfizmusának megváltozott genotípus eloszlását figyelték meg különböző autoimmun betegségekben (23, 31, 34). Azért, hogy választ kapjunk arra, hogy a CD14 molekulát érintő változások befolyásolhatják-e a szisztémás autoimmun betegségek kialakulását és a betegség lefolyását, polymyositisben és dermatomyositisben szenvedő betegek mintáiban vizsgáltuk meg a CD14 rendszer fenti paramétereit. E két szisztémás autoimmun betegségnek nagyon hasonlóak a klinikai tünetei, de patomechanizmusuk eltérő. Polymyositis esetében az immunrendszer sejtes elemei közvetlenül

károsítják az izomrostokat, míg dermatomyositisben az immunrendszer humorális elemei az izmokat ellátó ereket megtámadva roncsolják az izomszövetet (57, 59). A polymyositises és a dermatomyositises betegek adatait összevetve nem találtunk különbséget a monocyták mCD14 expressziójának mértékében, a szérumban sCD14 különböző formáinak koncentrációjában és a C(-159)T polimorfizmus genotípusainak megoszlásában sem. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a CD14 rendszert érintő változások nem magyarázzák a PM és DM patogenezeise közötti különbségeket. Mivel a vizsgált paraméterekben nem találtunk különbséget a két betegcsoport között, így a későbbiekben egy egységes myositises (PDM) csoportba soroltuk a PM-es és DM-es betegeket.

A PDM-es betegek és a kontrollok adatait összevetve nem tudtunk szignifikáns különbséget kimutatni a két csoport között sem a össz sCD14 koncentrációt, sem a mCD14 expressziót illetően. Az aktív és az inaktív stádiumban lévő betegek adatait elemezve azt találtuk, hogy az aktív betegek sCD14 koncentrációja magasabb, monocytáiknak mCD14 expressziója alacsonyabb volt az inaktív betegekhez és a kontrollokhoz viszonyítva is. Ha a betegeket a betegségfolyás alapján osztottuk alcsoportokba, azt találtuk, hogy a krónikus csoportba tartozó betegeknek magasabb volt a sCD14 koncentrációjuk és kevesebb mCD14-et expresszáltak. Ha az aktivitás alapján megállapított csoportokat a betegségfolyás szerint osztottuk további alcsoportokra, akkor az alcsoportok között nem voltak szignifikáns különbségek. Az aktív betegek azonban minden betegségfolyás szerinti alcsoportban magasabb sCD14 koncentrációt és alacsonyabb CD14 expressziót mutattak, mint az egészséges kontrollok, s a különbség majdnem minden összehasonlításban szignifikánsnak bizonyult. Az inaktív betegek ezen paraméterei a kontrollokéhoz voltak hasonlóak. A sCD14-et és mCD14-et érintő, a teljes krónikus csoportban tapasztalható szignifikáns eltérések azzal magyarázhatók, hogy e csoporton belül szignifikánsan magasabb volt az aktív betegek aránya, mint a többi csoportban. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a sCD14 koncentráció emelkedése,

és a mCD14 expresszió csökkenése a betegség aktivitását jelző markerek. Ráadásul ezek a paraméterek szignifikáns korrelációt mutattak a hagyományos, myositisekre jellemző aktivitási marker, az LDH koncentrációjának változásával.

Eredményeinkhez hasonlóan emelkedett sCD14 koncentrációt és csökkent mCD14 expressziót tapasztaltak még egyes fertőzések (24, 30, 31, 68), krónikus gyulladásal járó (32, 33), atópiás/allergiás (35, 36), kardiovaszkuláris (39) és autoimmun (23, 31, 34) betegségekben is. Bizonyos esetekben a sCD14 és mCD14 változások összefüggést mutattak a betegség aktivitásával, vagy esetleg a betegség halálos kimenetelével (24, 31). A CD14 változásoknak a különböző gyulladásos folyamatokkal való összefüggése felveti annak a lehetőségét, hogy a CD14 egy pozitív akut fázis fehérje. Két különböző tanulmány is kimutatott összefüggést a sCD14 koncentráció, vagy a CD14 expresszió és a CRP koncentrációja között (30, 68), Bas és kollégái pedig bizonyították ezt a hipotézist (69).

A szérumban található sCD14 eredete mind egészséges, mind kóros állapotban még nem teljesen tisztázott. Akut fázis fehérjeként a máj hepatocytái is termelhetik (22, 69), ugyanakkor számos vizsgálat utal arra, hogy a monocyták, granulocyták és a makrofágok is termelnek sCD14-et (19-21). Az újonnan szintetizálódó CD14 molekulák enzimatisz modifikációt követően glikozil-foszfatidil-inozitol (GPI) farok segítségével jelennek meg a sejtmembrán felszínén, majd proteolitikusan lehasadhatnak a sejtek felszínéről. A „vedlés” következtében a szérumba kerülő CD14 48 kDa tömegű. Az intracelluláris CD14 molekulák egy másik része elkerülve a GPI-farok kapcsolódását, direkt módon szekretálódik s 56 kDa-os formában kerül a szérumba (19-21). Annak érdekében, hogy eldöntsük, a myositises betegek szérum sCD14 koncentrációjának emelkedése mögött melyik mechanizmus áll, Western-blot segítségével meghatároztuk a különböző sCD14 izoformák koncentrációját a betegek szérumában. Eredményeink azt mutatták, hogy a betegek 48 kDa-os izoformájának koncentrációja nem tért el a kontrollokétól, ugyanakkor az 56 kDa-os izoforma koncentrációja az össz sCD14

koncentrációhoz hasonlóan változott. Az aktív myositises betegek össz sCD14 koncentrációja emelkedésének hátterében tehát az 56 kDa molekulatömegű izoforma direkt szekréciója állt. Ennek a folyamatnak a dominálása és következésképpen a GPI-farok kapcsolódásának és a mCD14 képződésének a visszaszorulása magyarázhatja a mCD14 expresszió PDM-es betegekben észlelt csökkenését.

Számos megfigyelés és adat utal arra, hogy a CD14 gén C(-159)T polimorfizmusa befolyásolja a szérumban sCD14 koncentrációját. A T/T genotípus különböző betegségekben összefüggést mutatott a sCD14 koncentráció emelkedésével (32, 33), s mi is ezt tapasztaltuk vizsgálataink során. Bár az adatok néha ellentmondóak, a T/T genotípus egyes fertőzőes (38), gyulladásos (32, 33), autoimmun (34) és kardiovaszkuláris (39) betegségek kialakulásával és aktivitásával is összefüggést mutatott. Saját eredményeink szerint a T/T genotípus szignifikánsan magasabb arányban volt jelen az aktív stádiumú és a krónikus betegek között. Mivel ezen betegcsoportok esetében a sCD14 koncentráció is emelkedett volt, ez szintén a T/T genotípus és a magasabb sCD14 koncentráció közötti asszociációt támasztja alá. Mivel a sCD14 a felszínükön mCD14 molekulákat nem hordozó endothel, epithel és simaizom sejtek aktivációját is elősegíti (27, 28), a magasabb sCD14 koncentráció hozzájárulhat ezen sejtek kis mértékű, de állandó aktivációjához, proinflammatorikus citokinek termeléséhez és a krónikus gyulladásos folyamatok fenntartásához. A PDM-es betegekben tehát a T/T genotípus esetében – az emelkedett sCD14 koncentrációval összefüggésben – nagyobb valószínűséggel alakul ki a myositis krónikus formája. A természetes immunrendszer folyamatos aktiválása által kiváltott kis mértékű gyulladás szerepét egyes betegségek (pl: atherosclerosis, II. típusú cukorbetegség, krónikus obstruktív tüdőbetegség) patogenezisében már leírták (70).

A CD14 rendszer működése terápiás szerekkel befolyásolható. Az immunszuppresszív, antiinflammatorikus hatásokról ismert glükokortikoszteroidok (GCS) több módon, többféle sejtre hatva fejtik ki hatásukat. Elősegítik a T-sejtek apoptózisát, gátolják az IL-2 termelést és a

T-sejtek kiáramlását a lymphoid szervekből, így redukálják a keringésben lévő T lymphociták számát (71-75). A B-sejtekre gyakorolt hatásuk kevésbé közvetlen, leginkább a T-sejtek segítő funkciójának csökkenése következtében lesz alacsonyabb a keringő autoantitestek mennyisége hosszan tartó GCS kezelés hatására (74, 75). A monocyták, makrofágok és neutrophil granulocyták működésére viszont gyorsabban, közvetlenebbül hatnak a szteroidok (71). Csökkentik az ezen sejtek felszínén kifejeződő adhézis molekulák számát (76), gyengítik fagocita funkcióikat, kemotaxisukat (71), az oxidatív intermedierek, baktericid hatású proteinek, eikozanoidok termelésének csökkentésével gyengítik baktériumölő képességeiket (71, 74). GCS terápia hatására a proinflammatorikus gének (IL-1, TNF α , IL-2, IL-12) transzkripciója csökken, míg az anti-inflammatorikus gének (IkB, IL-10, IL-1RII) aktiválódnak (77, 78, 79).

A szteroid hatás újabb feltételezett mechanizmusa lehet a monocyták CD14/TLR mediálta aktivációjának a gátlása és ezt vizsgáltuk meg kísérleteink során. A kortikoszteroidoknak a CD14 expresszióra, CD14-függő funkciókra kifejtett hatását még nem sok tanulmány elemezte s ezeknek az adatai is ellentmondásosak. Creery és munkatársai (80), Cranny és munkatársai (81), valamint Schmidt és munkatársai (82) izolált mononukleáris sejteket kezeltek különböző dózisú dexamethasonnal és a sejtfelszíni CD14 molekulák szignifikáns csökkenését tapasztalták. Ezzel szemben egy hasonló *in vitro* rendszerben Wenzel és munkatársai (83) azt észlelték, hogy a szteroid terápia nem befolyásolta a CD14 expressziót, míg Kodama és munkatársai (84) a monocyták felszínén megjelenő mCD14 molekulák számának a növekedéséről számoltak be. A glükokortikoszteroiddal kezelt egészséges és beteg egyének monocytáinak CD14 expresszióját vizsgálva szintén ellentmondásos eredmények születtek. Volk és munkatársai (85), Landmann és munkatársai (86), valamint Fingerle-Rowson és munkatársai (87) változatlan, míg Nupponen és munkatársai (88) csökkent CD14 expresszióról számoltak be. Nockher és Scheerberich vizsgálataik során az *in vitro* GCS kezelt monocyták

mCD14 expressziójának és sCD14 termelésének dózis-függő csökkenését, valamint az LPS-kötés és az LPS-indukálta IL-1 β termelés csökkenését tapasztalták (25). *In vivo* kísérleteik során viszont csak a pulzus szteroid terápiában részesült SLE-s betegek CD14 expresszióját és szérumsCD14 koncentrációját vizsgálták, mindkét paramétert illetően csökkenést figyeltek meg. Saját vizsgálataink azt mutatták, hogy a kezeletlen, vagy kis dózisú szteroid terápiában részesült SLE-s betegek monocytáinak CD14 expressziója nem tért el szignifikánsan a kontrollokétól, viszont a pulzus szteroid terápia 40-50%-kal csökkentette a sejtfelszíni CD14 molekulák számát. Nockher és Scherberich megfigyeléseihez (25) hasonlóan saját adatainkból is az derül ki, hogy csak magas szteroid koncentráció alkalmazása esetén regulálódik le a mCD14 expresszió és az ehhez szükséges *in vivo* kezelésnek is megfelelően hosszúnak, 2-3 naposnak kell lennie.

A szteroiddal kezelt betegek monocytáinak csökkent CD14 expressziója és az ezzel összefüggésben csökkent CD14-függő LPS kötés a szteroidoknak a CD14 gén szabályozására gyakorolt közvetlen hatásával is magyarázható. A CD14 gén promóter régiójában található egy SP1 transzkripciós faktor kötőhely. Kimutatták, hogy a dexamethason (egy szintetikus szteroid készítmény) gátolni képes e reguláló szekvencia és az SP1 kötődését (89). A gátolt transzkripció eredményeképpen csökkenhet a sejtfelszíni CD14 molekulák száma. Egy másik lehetséges magyarázat az, hogy a kortikoszteroid terápia az intracelluláris CD14 sorsát befolyásolja: ha a CD14 direkt szekréciója kerül előtérbe, akkor a membránhoz transzportálódó, majd GPI-farokkal a sejtfelszínhez kapcsolódó CD14 molekulák száma csökkenhet.

A kortikoszteroid terápia hatására az SLE-s monocytáknak nemcsak a CD14 expressziója, de az LPS-indukálta CD14-függő aktivációja is csökkent. Az alacsonyabb expresszió és a kisebb mértékű aktiváció összefügghet egymással, de a magyarázat vélhetően bonyolultabb. A szteroidok ugyanis számos olyan transzkripciós faktor működését (pl. NF- κ B) is gátolják,

melyeknek a TNF α és egyéb proinflammatorikus citokinek termelésében van fontos szerepük, valamint anti-inflammatorikus citokinek (IL10, IL1RII) termelését is indukálhatják (77, 79, 80). Ezek a hatások az általunk alkalmazott viszonylag hosszú inkubációs idő (16h) alatt is érvényesülhettek (74, 77). A glükokortikoszteroidoknak ez a komplex hatása magyarázhatja az aktivációt vizsgáló kísérleteinkben tapasztalt nagyobb egyéni variabilitást.

A GCS terápia hatására csökkenő CD14 expresszió, LPS-kötés és sejtaktiváció redukálhatja az immunrendszer reaktivitását és hozzájárulhat a szteroidok immunszuppresszív hatásához. A gátolt működésű CD14 rendszer ugyanakkor a gazdaszervezet kórokozókkal szembeni védekezőképességének a csökkenéséhez vezet, ami fontos kiváltó tényezője lehet az SLE-s betegekben szteroid terápia alatt gyakran tapasztalható fertőzéseknek (90).

ÖSSZEFOGLALÁS

A veleszületett immunrendszer mintafelismerő receptorai közül kiemelkedő jelentősége van a toll-like receptoroknak és a bizonyos TLR-ekkel asszociált CD14-nek. A kórokozók eliminálásának elősegítésén kívül ezek szerepet játszanak az adaptív immunrendszer regulálásában, és az autoimmun betegségek kialakulásában is. Munkánk során a CD14 rendszer és egyes TLR-ek expressziójának és funkcióinak változását vizsgáltuk autoimmun betegségekben (szisztémás lupus erythematosus – SLE, poly/dermatomyositis – PM/DM) valamint a gyakori bőrfertőzésekkel jellemezhető atópiás dermatitis-ben (AD). A szérumban sCD14 mérésére egy új, áramlási citometriás módszert állítottunk be, a sejtfelszíni receptor expresszió és ligandkötés meghatározása citofluorimetriával, a ligand indukálta sejtaktiváció TNF α szekréció mérésével, a sCD14 izotípusok meghatározása Western-blot, míg a CD14 gén C(-159)T polimorfizmus genotipizálása egy PCR+RFLP módszer segítségével történt.

Az AD intrinsic formájában emelkedett CD14, TLR2, TLR4 és CD180 expressziót észleltünk a leukociták felszínén, és a monocyták/granulocyták LPS és baktérium felvétele sem mutatott csökkenést. Ez alapján a gyakori bőrfertőzések vélhetően nem függenek össze a CD14 és a vizsgált TLR-ek csökkent működésével. Sokkal valószínűbb, hogy a fokozott bőrpermeabilitás miatt a keringésbe kerülő bakteriális eredetű molekulák szisztémásan is fokozzák az immunrendszer aktivitását, ami fokozott receptor expressziót eredményez.

A C(-159)T polimorfizmus T/T genotípusa emelkedett sCD14 szinttel járt együtt myositisben és asszociációt mutatott a krónikus betegséglefolyással. A T/T genotípus hajlamot jelenthet a krónikus betegséglefolyásra, vélhetően azzal, hogy magasabb sCD14 szintet tart fent, ami a CD14-negatív endothel és izomsejtek kis mértékű, de konstans aktiválódását eredményezi.

A pulzus szteroid terápia szignifikánsan csökkentette az SLE-s monocyták CD14-expresszióját, LPS kötését és LPS-indukálta TNF α szekrécióját, ami a szteroid hatás egy új mechanizmusát jelentheti.

SUMMARY

Toll-like receptors and their associated molecules like CD14 are the most important pattern recognition receptors of the innate immune system. They support the elimination of invading microorganisms, furthermore have an important role in the initiation of the adaptive immune response and even can participate in the development of autoimmune disorders. In our studies we analyzed the expression and functions of the CD14 system and certain TLRs in autoimmune disorders (systemic lupus erythematosus – SLE, poly/dermatomyositis – PM/DM) and in atopic dermatitis (AD) characterized by frequent bacterial skin infections. A novel flow cytometric assay was developed to measure serum sCD14 concentrations, the receptor expression and ligand binding was quantitated by cytofluorometry, ligand induced cellular activation was evaluated by measuring TNF α secretion, sCD14 isoforms were identified by Western-blotting and the C(-159)T polymorphism of the CD14 gene was characterized using a PCR+RFLP assay. In the intrinsic form of AD we observed an upregulation of CD14, TLR2, TLR4, CD180, and the CD14 mediated LPS- and bacteria-binding was not altered. Based on these data, the presence of frequent infections in AD are probably not attributable to the diminished functions of these molecules. It is more likely that bacterial components are able to translocate through the altered barrier of the skin and can induce the systemic activation of the immune system and upregulation of certain receptors. The T/T genotype of the C(-159)T polymorphism showed association with high sCD14 concentrations and with the chronic disease course in myositis. In this way the T/T genotype might mean susceptibility for the development of chronic disease course by maintaining elevated sCD14 levels that can induce the mild but constant activation of CD14-negative endothelial and muscle cells. Pulse steroid treatment significantly reduced CD14-expression, CD14-mediated LPS-binding and LPS-induced cellular activation in monocytes of SLE patients that can mean a new biochemical pathway of steroid action.

IRODALOMJEGYZÉK

- 1 Gergely J, Erdei A (szerkesztők). Immunbiológia. Medicina Könyvkiadó. 2000
- 2 Tosi MF. Innate immune responses to infection. J Allergy Clin Immunol. 2005;116:241-249.
- 3 Basset C, Holton J, O'Mahony R, Roitt I. Innate immunity and pathogen-host interaction. Vaccine. 2003;1;21.
- 4 Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. Cell. 2006;124:783-801.
- 5 Kabelitz D, Medzhitov R. Innate immunity--cross-talk with adaptive immunity through pattern recognition receptors and cytokines. Curr Opin Immunol. 2007;19:1-3.
- 6 Kocsis B, Emődy L. A baktériumok patogénmintázata és a gazdaszervezeti felismerés. Magyar Immunológia. 2003; 4:10-19
- 7 Creagh EM, O'Neill LA. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. Trends Immunol. 2006;27:352-357.
- 8 Erdei A. A komplementrendszer szerepe az elsődleges felismerési mechanizmusokban és az immunválasz szabályozásában. Magyar Immunológia. 2003; 4:33-38
- 9 Schumann RR, Leong SR, Flaggs GW, Gray PW, Wright SD, Mathison JC, Tobias PS, Ulevitch RJ. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. Science. 1990;249:1429-1431.
- 10 Beisswenger C, Bals R. Functions of antimicrobial peptides in host defense and immunity. Curr Protein Pept Sci. 2005;6:255-264.
- 11 Kaisho T, Akira S. Toll-like receptor function and signaling. J Allergy Clin Immunol. 2006;117:979-987;

- 12 Lee MS, Kim YJ. Pattern-recognition receptor signaling initiated from extracellular, membrane, and cytoplasmic space. *Mol Cells*. 2007;23:1-10.
- 13 Akashi-Takamura S, Miyake K. Toll-like receptors (TLRs) and immune disorders. *J Infect Chemother*. 2006;12:233-240.
- 14 Albiger B, Dahlberg S, Henriques-Normark B, Normark S. Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: focus on the Toll-like receptors. *J Intern Med*. 2007;261:511-528.
- 15 Pasare C, Medzhitov R. Toll-like receptors and acquired immunity. *Semin Immunol*. 2004;16:23-26.
- 16 Ding C, Yan J. Regulation of autoreactive B cells: checkpoints and activation. *Arch Immunol Ther Exp*. 2007;55:83-89.
- 17 Antal-Szalmás P. Evaluation of CD14 in host defence. *Eur J of Clin Invest*. 2000;30:167-179.
- 18 Antal-Szalmás P, Strijp JA, Weersink AJ, Verhoef J, Van Kessel KP. Quantitation of surface CD14 on human monocytes and neutrophils. *J Leukoc Biol*. 1997;61:721-728.
- 19 Bufler P, Stiegler G, Schuchmann M, Hess S, Kruger C, Stelter F, Eckerskorn C, Schutt C, Engelmann H. Soluble lipopolysaccharide receptor (CD14) is released via two different mechanisms from human monocytes and CD14 transfectants. *Eur J Immunol*. 1995;25:604-610.
- 20 Labeta MO, Durieux JJ, Fernandez N, Herrmann R, Ferrara P. Release from a human monocyte-like cell line of two different soluble forms of the lipopolysaccharide receptor, CD14. *Eur J Immunol*. 1993;23:2144-2151.
- 21 Durieux JJ, Vita N, Popescu O et al. The two soluble forms of the lipopolysaccharide receptor, CD14: characterization and release by normal human monocytes. *Eur J Immunol*. 1994;24:2006-2012.

- 22 Su GL, Dorko K, Strom SC, Nussler AK, Wang SC. CD14 expression and production by human hepatocytes. *J Hepatol.* 1999;31:435-442.
- 23 Nockher WA, Wigand R, Schoeppe W, Scherberich JE. Elevated levels of soluble CD14 in serum of patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol.* 1994;96:15-19.
- 24 Landmann R, Zimmerli W, Sansano S, Link S, Hahn A, Glauser MP, Calandra T. Increased circulating soluble CD14 is associated with high mortality in gram-negative septic shock. *J Infect Dis.* 1995;171:639-644
- 25 Nockher WA, Scherberich JE. Expression and release of the monocyte lipopolysaccharide receptor antigen CD14 are suppressed by glucocorticoid in vivo and in vitro. *J Immunol.* 1997;158:1345-1352.
- 26 Kruger C, Schutt C, Obertacke U, Joka T, Muller FE, Knoller J, Koller M, Konig W, Schonfeld W. Serum CD14 levels in polytraumatized and severely burned patients. *Clin Exp Immunol.* 1991;85:297-301.
- 27 Pugin J, Schurer Maly CC, Leturcq D, Moriarty A, Ulevitch RJ, Tobias PS. Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:2744-2748.
- 28 Loppnow H, Stelter F, Schonbeck U et al. Endotoxin activates human vascular smooth muscle cells despite lack of expression of CD14 mRNA or endogenous membrane CD14. *Infect Immun.* 1995;63:1020-1026.
- 29 Yu B, Hailman E, Wright SD. Lipopolysaccharide binding protein and soluble CD14 catalyze exchange of phospholipids. *J Clin Invest.* 1997;99:315-324.

- 30 Rahman SH, Salter G, Holmfield JH, Larvin M, McMahon MJ. Soluble CD14 receptor expression and monocyte heterogeneity but not the C-260T CD14 genotype are associated with severe acute pancreatitis. *Crit Care Med.* 2004;32:2457-2463.
- 31 Egerer K, Feist E, Rohr U, Pruss A, Burmester GR, Dorner T. Increased serum soluble CD14, ICAM-1 and E-selectin correlate with disease activity and prognosis in systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2000;9:614-621.
- 32 Griga T, Klein W, Epplen JT, Hebler U, Stachon A, May B. CD14 expression on monocytes and soluble CD14 plasma levels in correlation to the promotor polymorphism of the endotoxin receptor CD14 gene in patients with inactive Crohn's disease. *Hepatogastroenterology.* 2005;52:808-811.
- 33 Obana N, Takahashi S, Kinouchi Y et al. Ulcerative colitis is associated with a promoter polymorphism of lipopolysaccharide receptor gene, CD14. *Scand J Gastroenterol.* 2002;37:699-704.
- 34 Nishimura S, Zaitse M, Hara M et al. A polymorphism in the promoter of the CD14 gene (CD14/-159) is associated with the development of coronary artery lesions in patients with Kawasaki disease. *J Pediatr* 2003;143:357-362.
- 35 Pforte A, Schiessler A, Gais P et al. Increased expression of the monocyte differentiation antigen CD14 in extrinsic allergic alveolitis. *Monaldi Arch Chest Dis.* 1993;48:607-612.
- 36 Wuthrich B, Kagi MK, Joller-Jemelka H. Soluble CD14 but not interleukin-6 is a new marker for clinical activity in atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res.* 1992;284:339-342.
- 37 LeVan TD, Bloom JW, Bailey TJ et al. A common single nucleotide polymorphism in the CD14 promoter decreases the affinity of Sp protein binding and enhances transcriptional activity. *J Immunol.* 2001;167:5838-5844.

- 38 Gibot S, Cariou A, Drouet L, Rossignol M, Ripoll L. Association between a genomic polymorphism within the CD14 locus and septic shock susceptibility and mortality rate. *Crit Care Med.* 2002;30:969-973.
- 39 Shimada K, Miyauchi K, Mokuno H et al. Promoter polymorphism in the CD14 gene and concentration of soluble CD14 in patients with in-stent restenosis after elective coronary stenting. *Int J Cardiol* 2004;94:87-92.
- 40 Czirják László (szerkesztő). *Klinikai Immunológia. Medicina Könyvkiadó.* 2006
- 41 Spergel JM, Paller AS. Atopic dermatitis and the atopic march. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;112:S118-127.
- 42 Leung DY, Jain N, Leo HL. New concepts in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Curr Opin In Immunol.* 2003;15:634-638.
- 43 Hanifin JM, Rajka G. Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol.* 1980; 92: 44-47
- 44 Galli E, Cicconi R, Rossi P, Casati A, Brunetti E, Mancino G. Atopic dermatitis: molecular mechanisms, clinical aspects and new therapeutical approaches. *Curr Mol Med.* 2003;3:127-138.
- 45 Biedermann T. Dissecting the role of infections in atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol.* 2006;86:99-109.
- 46 Leung DY. Atopic dermatitis and the immune system: the role of superantigens and bacteria. *J Am Acad Dermatol.* 2001;45:S13-16.
- 47 Leung DY, Harbeck R, Bina P, Reiser RF, Yang E, Norris DA et al. Presence of IgE antibodies to staphylococcal exotoxins on the skin of patients with atopic dermatitis. Evidence for a new group of allergens. *J Clin Invest.* 1993;92:1374-1380.
- 48 Novak N, Bieber T, Leung DY. Immune mechanisms leading to atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2003 Dec;112:S128-139.

- 49 Novak N, Bieber T. Allergic and nonallergic forms of atopic diseases. *J Aller Clin Immunol.* 2003;112:252-262.
- 50 Cho SH, Strickland I, Boguniewicz M, Leung DY. Fibronectin and fibrinogen contribute to the enhanced binding of *Staphylococcus aureus* to atopic skin. *J Aller Clin Immunol.* 2001;108:269-274.
- 51 Ong PY, Ohtake T, Brandt C, Strickland I, Boguniewicz M, Ganz T et al. Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N Engl J Med.* 2002;347:1151-1160.
- 52 Novak N, Allam JP, Bieber T. Allergic hyperreactivity to microbial components: a trigger factor of „intrinsic” atopic dermatitis? *J Aller Clin Immunol.* 2003;112:215-216.
- 53 Kiss E, Zeher M, Szegedi G. A szisztémás lupus erythematosus diagnosztikája és klasszifikációja. *Magyar Immunológia.* 2002;1:38-40
- 54 Szanto A, Szodoray P, Kiss E, Kapitany A, Szegedi G, Zeher M. Clinical, serologic, and genetic profiles of patients with associated Sjogren's syndrome and systemic lupus erythematosus. *Hum Immunol.* 2006;67:924-930.
- 55 Kawai M, Szegedi G. Immune complex clearance by monocytes and macrophages in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev.* 2007;6:497-502.
- 56 Parker BJ, Bruce IN. High dose methylprednisolone therapy for the treatment of severe systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2007;16:387-393.
- 57 Dalakas MC. Mechanisms of disease: signaling pathways and immunobiology of inflammatory myopathies. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2006;2:219-227.
- 58 Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (parts 1 and 2). *N Engl J Med* 1975;292:344-347, 403-407.
- 59 Grundtman C, Malmstrom V, Lundberg IE. Immune mechanisms in the pathogenesis of idiopathic inflammatory myopathies. *Arthritis Res Ther.* 2007;9:208.

- 60 Leff RL, Burgess SH, Miller FW et al. Distinct seasonal patterns in the onset of adult idiopathic inflammatory myopathy in patients with anti-Jo-1 and anti-signal recognition particle autoantibodies. *Arthritis Rheum.* 1991;34:1391-1396.
- 61 Zampieri S, Ghirardello A, Iaccarino L et al. Polymyositis-dermatomyositis and infections. *Autoimmunity.* 2006;39:191-196.
- 62 Gegner JA, Ulevitch RJ, Tobias PS. Lipopolysaccharide (LPS) signal transduction and clearance. Dual roles for LPS binding protein and membrane CD14. *J Biol Chem.* 1995;270: 5320-5325.
- 63 Leung DY. Infection in atopic dermatitis. *Curr Opin Pediatr.* 2003;15:399-404.
- 64 Hadley JS, Wang JE, Foster SJ, Thiemermann C, Hinds CJ. Peptidoglycan of *Staphylococcus aureus* upregulates monocyte expression of CD14, Toll-like receptor 2 (TLR2), and TLR4 in human blood: possible implications for priming of lipopolysaccharide signaling. *Infect Immunol.* 2005;73:7613-7619.
- 65 Harter L, Mica L, Stocker R, Trentz O, Keel M. Increased expression of Toll-like receptor-2 and -4 on leukocytes from patients with sepsis. *Shock.* 2004;22:403-409.
- 66 Kimoto M, Nagasawa K, Miyake K. Role of TLR4/MD-2 and RP105/MD-1 in Innate Recognition of Lipopolysaccharide. *Scand J Infect Dis.* 2003;35:568-572.
- 67 Ricci G, Patrizi A, Neri I, Bendandi B, Masi M. Frequency and clinical role of *Staphylococcus aureus* overinfection in atopic dermatitis in children. *Ped Dermatol.* 2003;20:389-392.
- 68 Gluck T, Silver J, Epstein M, Cao P, Farber B, Goyert SM. Parameters influencing membrane CD14 expression and soluble CD14 levels in sepsis. *Eur J Med Res.* 2001;6:351-358.
- 69 Bas S, Gauthier BR, Spenato U, Stingelin S, Gabay C. CD14 is an acute-phase protein. *J Immunol.* 2004;172:4470-4479.

- 70 Joppa P, Petrasova D, Stancak B, Tkacova R. Systemic inflammation in patients with COPD and pulmonary hypertension. *Chest*. 2006;130:326-333.
- 71 Boumpas DT, Paliogianni F, Anastassiou ED, Balow JE. Glucocorticosteroid action on the immune system: molecular and cellular aspects. *Clin Exp Rheumatol* 1991;9: 413-423.
- 72 Bloemena E, Weinreich S, Schellekens PT. The influence of prednisolone on the recirculation of peripheral blood lymphocytes in vivo. *Clin Exp Immunol*.1990;80:460-466.
- 73 Hepburn B, Slade JD. Effect of divided daily dose prednisone therapy on circulating T cell subsets. *J Rheumatol*. 1987;14:19-22.
- 74 Brinkmann V, Kristofic C. Regulation by corticosteroids of Th1 and Th2 cytokine production in human CD4+ effector T cells generated from CD. *J Immunol* 1995;155:3322-3328.
- 75 Daynes R.A., Araneo B.A. Contrasting effects of glucocorticoids on the capacity of T cells to produce the growth factors interleukin 2 and interleukin 4. *Eur J Immunol*. 1989;19: 2319-2325.
- 76 Cronstein BN, Kimmel SC, Levin RI, Martiniuk F, Weissmann G. A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* . 1992;89:9991-9995.
- 77 Adcock IM. Molecular mechanisms of glucocorticosteroid actions. *Pulm Pharmacol Ther*. 2000;13:115-126.
- 78 Hu X, Li WP, Meng C, Ivashkiv LB. Inhibition of IFN-gamma signaling by glucocorticoids. *J. Immunol*. 2003;170: 4833-4839.

- 79 Tsiavou A, Degiannis D, Hatziagelaki E, Koniavitou K, Raptis S. Flow cytometric detection of intracellular IL-12 release: in vitro effect of widely used immunosuppressants. *Int Immunopharmacol.* 2002;2:1713-1720.
- 80 Creery D, Angel JB, Aucoin S, Weiss W, Cameron WD, Diaz-Mitoma F, Kumar A. Nef protein of human immunodeficiency virus and lipopolysaccharide induce expression of CD14 on human monocytes through differential utilization of interleukin-10. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002;9:1212-1221.
- 81 Cranny A, Crowley P, Whelan A. Effects of human placental lactogen on the expression of CD163 and CD14 on human monocytes in culture. *Clin Exp Immunol.* 2002;128:275-278.
- 82 Schmidt M, Pauels HG, Luger N, Luger A, Domschke W, Kucharzik T. Glucocorticoids induce apoptosis in human monocytes: potential role of IL-1 beta. *J Immunol.* 1999;163:3484-3490.
- 83 Wenzel I, Roth J, Sorg C. Identification of a novel surface molecule, RM3/1, that contributes to the adhesion of glucocorticoid-induced human monocytes to endothelial cells. *Eur J Immunol.* 1996;26:2758-2763.
- 84 Kodama M, Takahashi HK, Iwagaki H, Itoh H, Morichika T, Yoshida A, Yoshioka H, Morimoto Y, Nishibori M, Tanaka N. Effect of steroids on lipopolysaccharide/interleukin 2-induced interleukin 18 production in peripheral blood mononuclear cells. *J Int Med Res.* 2002;30:144-160.
- 85 Volk T, Schmutzler M, Engelhardt L, Docke WD, Volk HD, Konertz W, Kox WJ. Influence of aminosteroid and glucocorticoid treatment on inflammation and immune function during cardiopulmonary bypass. *Crit Care Med.* 2001;29:2137-2142.
- 86 Landmann R, Schaub B, Link S, Wacker HR. Unaltered monocyte function in patients with major depression before and after three months of antidepressive therapy. *Biol*

- Psychiatry. 1997;41:675-681.
- 87 Fingerle-Rowson G, Angstwurm M, Andreessen R, Ziegler-Heitbrock HW. Selective depletion of CD14+ CD16+ monocytes by glucocorticoid therapy. Clin Exp Immunol. 1998;112:501-506.
- 88 Nupponen I, Repo H, Kari A, Pohjavuori M, Andersson S. Early dexamethasone decreases expression of activation markers on neutrophils and monocytes in preterm infants. Acta Paediatr. 2002;91:1200-1207.
- 89 Jarvis BW, Qureshi N. Inhibition of lipopolysaccharide-induced transcription factor Sp1 binding by spectrally pure diphosphoryl lipid A from Rhodobacter sphaeroides, protein kinase inhibitor H-8, and dexamethasone. Infect Immun. 1997;65:1640-1643.
- 90 Staples PJ, Gerding DN, Decker JL, Gordon RS. Incidence of infection in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 1974;17:1-10

A TÉZISEKHEZ FELHASZNÁLT KÖZLEMÉNYEK

1. Antal-Szalmás P, Szöllősi I, Lakos G, Kiss E, Csipő I, **Sümegei A**, Sipka S, van Strijp JA, van Kessel KP, Szegedi Gy. A novel flow cytometric assay to quantify soluble CD14 concentration in human serum.
Cytometry. 2001; 45:115-123. **IF: 2,220**
2. **Sümegei A**, Antal-Szalmás P, Aleksza M, Kovács I, Sipka S, Zeher M, Kiss E, Szegedi Gy. Glucocorticosteroid therapy decreases CD14-expression and CD14-mediated LPS-binding and activation of monocytes in patients suffering from Systemic Lupus Erythematosus.
Clinical Immunology. 2005; 117:271-279. **IF: 3,217**
3. **Sümegei A**, Szegedi A, Gál M, Hunyadi J, Szegedi Gy, Antal-Szalmás P. Analysis of components of the CD14/TLR system on leukocytes of patients with atopic dermatitis.
International Archives of Allergy and Immunology. 2007; 143:177-184. **IF: 2,524**
4. **Sümegei A**, Dankó K, Ponyi A, Szegedi Gy, Antal-Szalmás P. Associations between C(-159)T T/T genotype of the CD14 gene, CD14-expression, serum total and 56 kDa sCD14 concentrations and disease activity and course in patients suffering from polymyositis/dermatomyositis.
Annals of Rheumatic Disease. bírálat alatt

EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

5. **Sümegi A**, Birkó Z, Szeszák F, Vitális S, Biró S. A short GC-rich sequence involved in deletion formation of cloned DNA in *E. coli*.
Acta Biol Hung. 1997; 48:275-279.
6. Birkó Z, **Sümegi A**, Vinnai A, van Wezel G, Szeszák F, Vitális S, Szabó PT, Kele Z, Janaky T, Biró S. Characterization of the gene for factor C, an extracellular signal protein involved in morphological differentiation of *Streptomyces griseus*.
Microbiology. 1999; 145:2245-2253. **IF: 2,700**
7. Szűcs M, **Sümegi A**, Tóth Cs. “Idiopátiás” azoospermia háttérében észlelt Y-kromoszóma mikrodeléciók kimutatása.
Magyar Urológia. 2003; 15:184-186.
8. Antal-Szalmás P, Poppelier M JJG, **Sümegi A**, van der Bruggen T, Verhoef J, van Kessel KPM and van Strijp JAG. Spare CD14 molecules on human monocytes enhance the sensitivity for low LPS concentrations.
Immunology Letters. 2004; 93:11-15. **IF: 2,136**

Összesített impaktfaktor: 12,797

TÁRGYSZAVAK

CD14, szolúbilis CD14, CD14 izoformák, CD14 C(-159)T polimorfizmus, CD180, TLR2, TLR4, LPS, szisztémás lupus erythematosus, myositis, atópiás dermatitis

CD14, soluble CD14, CD14 isoforms, CD14 C(-159)T polymorphism, CD180, TLR2, TLR4, LPS, systemic lupus erythematosus, myositis, atopic dermatitis

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Muszbek Lászlónak és Dr. Kappelmayer Jánosnak támogatásukért, továbbá, azért, hogy lehetővé tették számomra, hogy a Klinikai Biokémiai és Molekuláris Patológiai Intézetben írhattam meg PhD dolgozatomat.

Köszönöm Prof. Dr. Szegedi Gyula Professzor Úrnak szakmai segítségét és támogatását.

Hálásan köszönöm témavezetőim, Dr. Antal-Szalmás Péter és Prof. Dr. Sipka Sándor útmutatását, szakmai és emberi támogatását.

A betegek gondozásáért és a klinikai adatok megosztásáért köszönettel tartozom Dr. Dankó Katalinnak, Dr. Kiss Emesének és Dr. Szegedi Andreának.

Hálásan köszönöm szüleim és férjem odaadó támogatását.