

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

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

SÜMEGI ANDREA

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

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**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**

1. BEVEZETÉS

1.1. A természetes immunrendszer mintázatfelismerése

Az emberi szervezetet folyamatosan ki van téve a különböző patogén kórokozók támadásának. Az ezek elleni védekezés evolúciós szempontból ősből formáját a természetes immunrendszer biztosítja. 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 patogénekkal 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. A természetes immunválasz elindításában 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.

1.2. A toll-like receptor család

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. 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. Ligandspecifitásukban, celluláris lokalizációjukban és szignalizációs útvonalaikban különbség mutatkozik az egyes TLR molekulák között, és miután minden immunsejt egyedi variációban fejezi ki a TLR-eket, így sokféle viszonylag specifikus immunválasz generálódhat.

A TLR4 a Gram-negatív baktériumok falában található lipopoliszacharidot (LPS-t) és bizonyos endogén molekulákat (hősokk proteinek) ismer fel. A TLR2 a Gram-pozitív baktériumok különböző komponenseit köti, úgymint 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 képesek. A TLR9 a bakteriális és virális metilálatlan CpG DNS felismeréséért felelős. A TLR4-hez nagymértékben hasonló LPS felismerő molekula az RP105 (radioprotective 105, CD180), mely leginkább a B-lymphocytákon, 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.

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 sejtaktivációt, 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.

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 kötődik a receptor komplexhez. A TLR4 mediálta szignalizáció TRAM/TRIF útvonalának inicializálása 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 azonosításához.

A TLR család egyes tagjai képesek 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.

1.3. A CD14 molekula

A CD14 molekula a természetes immunrendszer egyik központi mintázatfelismerő receptora, az egyik legjelentősebb LPS kötő fehérje. Nem transzmembrán fehérje, egy glikozil-foszfatidil-inozitol (GPI) farkon keresztül

illeszkedik a sejtmembránba, mely nagy laterális mobilitást biztosít a receptor molekulának.

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.

A mCD14 myeloid differenciálódási marker, elsősorban érett myeloid sejtek expresszálják, de kisebb mennyiségben kimutatható B-lymphocytákon, dendritikus sejteken, bazofil granulocytákon, trofoblaszt sejteken és gingivalis fibroblasztokon is. A sCD14 termeléséhez a hepatocyták is nagymértékben hozzájárulnak.

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 és gombákból származó konzervatív struktúrát képes felismerni. Ilyen molekulák például a peptidoglikán, lipoteikolsav, a mycobacterialis lipoarabinomannán, vagy a *Pseudomonas* eredetű poliuronsav. 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 kötődve azonban már képes a sejtek stimulálására, ami az NF- κ B aktiválódásán keresztül proinflammatorikus citokinek termelődéséhez vezet.

A szolúbilis CD14-hez kötött LPS a CD14 molekulát nem expresszáló sejtek (pl. endothel-, epithel-, simaizom sejtek) membránjához tud kötődni, és ilyen

módon képes ezeket aktiválni. Ugyanakkor a nagy mennyiségben jelenlévő sCD14 verseng a myeloid sejtek mCD14-ével az LPS kötéseért, így nagy koncentrációban az LPS biológiai hatását neutralizálni tudja. 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. A CD14 molekula képes a keringő apoptotikus testek kötésére és ezek celluláris felvételének mediálására anélkül, hogy eközben gyulladásos folyamatokat indukálna. Szerepe lehet a Gram-negatív baktériumok kötésében és fagocitózisában is.

A CD14-et kódoló gén proximális promóter régiójában ismert a C(-159)T, egy funkcionálisan jelentős polimorfizmus. A T allél fokozott transzkripciós aktivitást mutatott azokban a sejtekben, amelyekben a gátló hatású SP3 transzkripciós faktor szintje alacsony (pl. monocyták), míg az SP3-ban gazdag hepatocytákban a T és a C allél transzkripciós aktivitása között nem találtak különbséget. Az is ismert, hogy a T/T homozigóták szérumban sCD14 szintje szignifikánsan magasabb, mint a C/C, vagy C/T genotípusúaké.

A CD14 molekula expressziója, a szérumban lévő sCD14 koncentráció, 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.

1.4. A vizsgált atópiás és autoimmun betegségek

1.4.1. Atópiás dermatitis

Az atópiás dermatitis (AD) gyakori, multifaktoriális, rendszeresen visszatérő, vagy krónikus lefolyású, erős viszketéssel járó gyulladásos bőrbetegség, mely gyakran más atópiás betegségekkel (allergiás rhinitis, asthma) jár együtt, illetve azokat megelőzve jelenik meg. Az AD-ben szenvedő betegek igen fogékonyak

bizonyos kután vírusos, bakteriális és gombás fertőzésekre. 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. Az extrinsic variáns esetében, 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. Az intrinsic formában is gyakoriak a kután infekciók a miróbák elleni meggyengült védekezőképesség következtében. A mikrobiális toxinok, amellet, hogy egyesek szuperantigén hatásuk következtében aktiválják a T-sejteket, klasszikus allergénként viselkedve specifikus IgE képződést indukálnak. Ilyen módon lehetséges, hogy a mikrobiális komponensekkel szembeni hiperreaktivitás vezethet az intrinsic AD tüneteinek a kialakulásához.

Az AD patogenezisében valószínűleg a 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 mucosalis tolerancia fenntartásában fontos szerepet betöltő szabályozó T-sejtek (Treg-sejtek) nem megfelelő működése is eredményezheti ezt az eltérést.

1.4.2. Szisztémás lupus erythematosus

A szisztémás lupus erythematosus (SLE) ismeretlen eredetű, multifaktoriális, több szervet érintő, változatos tüneteket okozó, általában hullámzó lefolyású

szisztémás, gyulladással autoimmun betegség. SLE-ben az immunrendszer regulációjának komplex zavara alakul ki. A patomechanizmus lényeges elemei a saját antigénekkal szembeni tolerancia áttörése, az autoantigén kínálat növekedése, a sejttörmelékek 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).

1.4.3. Polymyositis, dermatomyositis

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

Bár a két betegség patomechanizmusa eltérő, a kóros immunfolyamatok mindkét esetben az izmok krónikus gyulladásához, az izomrostok pusztulásához, fibrózishoz vezetnek. Jellemző kóros autoimmun jelenség PM/DM-ben a különböző myositisre specifikus és myositissal asszociált autoantitestek jelenléte.

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 és bizonyos kostimulatórikus molekulák expressziója fokozódik. 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 polymyositises betegek perifériás vérében a Th1-Th2 egyensúly a Th1 sejtek irányába tolódik el.

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 granulocyták 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.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A CD14 molekula expressziója, a szérumban lévő sCD14 koncentráció, a CD14 gén egyes genetikai polimorfizmusai valamint a TLR-ek expressziós és funkcionális változásai összefüggést mutatnak bizonyos autoimmun és immunmediált betegségekkel. Adatok szólnak amellet 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 lévő sCD14 koncentrációja intrinsic és extrinsic atópiás dermatitis-es betegek mintáiban?
- Van-e összefüggés a monocyták CD14-expressziója, a szérumban lévő sCD14 koncentrációja, a sCD14 izotípusok megoszlása és a CD14 gén C(-159)T polimorfizmusával 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 glükokortikoid terápia SLE-ben?

3. BETEGEK

3.1. Atópiás dermatitis

Munkánk során a DEOEC Bőrgyógyászati Klinikájának allergológiai szakrendelésén gondozott 30 atópiás dermatitisben szenvedő beteg (12 nő, 18 férfi, átlagéletkor $19,7 \pm 9,3$ 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 és allergén specifikus IgE tesztje negatív, a szérum össz IgE koncentrációja pedig 120 kU/L alatti volt. A további 20 beteg alkotta az extrinsic AD csoportját. Az egészséges kontrollok allergiás betegségektől mentesek voltak, szérum IgE koncentrációik a normál tartományba estek.

3.2. 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 vizsgálat ideje alatt 10 beteg (10 nő, átlagéletkoruk $40,6 \pm 14,3$) volt inaktív stádiumban, 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 $36,5 \pm 7,5$) 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 szolgáltatotta 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.

3.3. Polymyositis/dermatomyositis

Vizsgálatainkba a DEOEC III. sz. Belgyógyászati Klinikájának járóbeteg szakrendelésén gondozott 76 polymyositises (60 nő, 16 férfi, 23 aktív, 53 inaktív, átlagéletkoruk $54,0 \pm 12,1$ év), valamint 34 dermatomyositises beteget (27 nő, 7 férfi, 14 aktív, 20 inaktív, átlagéletkoruk $53,1 \pm 13,9$ év) válogattunk be. A betegség kórlefolását a betegek követésének ideje alatt (legalább két év) jelentkező aktív fázisok száma alapján határoztuk meg. 53 beteget soroltunk a monofázisos, 40 beteget a policiklusos és 17 beteget a krónikus csoportba. 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.

4. MÓDSZEREK

4.1. Sejtfelszíni receptor jelölés, receptor kvantitálás

A sejtfelszíni receptorok mennyiségi meghatározásához alvadásgátolt teljes vérmintát, direkt és indirekt módon jelölt monoklonális ellenanyagokat,

valamint ezek izotípus kontrolljait használtuk. A jelölést követően a vörösvérttesteket lizáltuk majd a fehérvérsejteket paraformaldehiddel fixáltuk.

A minták fluoreszcencia intenzitását Coulter EPICS XL, illetve FACSCalibur áramlási citométerrel mértük le. A monocytákat, lymphocytákat, granulocytákat fényszórási paramétereik, granuláltságuk és méretük 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, ismert mennyiségű monoklonális antitesttel fedett standard bead-ek (Qifikit; DAKO) felhasználásával készített kalibrációs görbe segítségével.

4.2. CD14 mediálta LPS kötés

A monocyták és granulocyták CD14 mediálta LPS kötésének vizsgálatához a betegek és a kontrollok heparinnal alvadásgátolt, mosott teljes vérmintáit, illetve izolált mononukleáris sejtjeit használtuk fel. A mintákat blokkoló anti-CD14 monoklonális antitesttel (60bca), vagy anélkül előinkubáltuk, majd FITC-LPS-sel (FITC-cel jelölt *Salmonella minnesota* Re595), illetve bodipy-LPS-sel (bodipy-vel jelölt *Salmonella minnesota* Re595) inkubáltuk 4% normál humán szérumban (NHS) jelenlétében. Ezt követően a teljes vérből kiinduló minták esetén a vörösvérttesteket lizáltuk, végül a fehérvérsejteket 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 totál LPS kötés mértékét mutatja) levontuk a blokkoló antitest jelenlétében inkubált sejtek fluoreszcencia intenzitását (CD14 független kötődés).

4.3. A monocyták, granulocyták CD14-mediálta fagocitózisának jellemzése

A betegek és kontroll személyek EDTA-val alvadásgátolt mosott, hígított vérmintáit EDTA-plazma jelenlétében, bodipyvel jelölt *Escherichia coli* (K-12-es törzs) baktériumokkal inkubáltuk. Az EDTA plazma elősegíti a CD14-függő, de gátolja az Fc és komplement receptor-mediálta fagocitózist. A sejt/baktérium arány 1:8 volt a kísérleti rendszerben. A vörösvértestek lizálása után a fehérvérsejteket 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.

4.4. LPS indukálta sejtaktiváció mérése

A sejtaktiváció mértékét izolált mononukleáris sejtek TNF α termelésének mérésével határoztuk meg. A mikrotiter lemez vályúiban letapadt sejteket anti-CD14 monoklonális antitesttel (60bca), vagy antitest nélkül előinkubáltuk. Ezután NHS-sel együtt LPS-t mértünk a megfelelő lyukakba. A mintákat 16 órán keresztül inkubáltuk, majd a felülúszók TNF α koncentrációját egy kereskedelmi forgalomban kapható citokin ELISA kit (OptEIA™ system) segítségével határoztuk meg a gyártó útmutatásai alapján. Az LPS és NHS nélkül inkubált sejtek TNF α termelését, mint háttérrel levontuk minden egyes mintához tartozó TNF α értékből. A sejtek CD14-függő aktiválódását úgy kalkuláltuk ki, hogy a blokkoló anti-CD14 antitest hiányában mért TNF α mennyiségéből (ami a totál aktiváció mértékét jelzi) kivontuk a gátló antitest jelenlétében mért TNF α mennyiségét (ez a CD14-független aktiváció mértékére utal).

4.5. Szolúbilis CD14 mérésére alkalmas módszer kifejlesztése

A humán plazma és szérum 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 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 szérum sCD14 koncentrációjával. A koncentrációértékeket ismert sCD14 koncentrációjú standard szérumból készített hígítási sor felhasználásával készült kalibrációs görbe segítségével határoztuk meg. A saját módszerünkkel kapott adatokat összevetettük egy kereskedelmi forgalomban lévő ELISA-val (Quantikine, R&D systems) kapott eredményekkel. Az új, áramlási citométeres módszerrel és az ELISA-val mért koncentrációértékek Pearson regresszióval való összevetése azt mutatta, hogy a két módszer jól korrelál egymással ($r=0,92$).

4.6. A szérum sCD14 izoformáinak mennyiségi meghatározása Western blot-tal

A szérumban lévő szolúbilis CD14 56 és 48 kDa molekulatömegű izoformáinak mennyiségi meghatározását Western-blot és denzitometráls segítségével végeztük el. A szérumfehérjéket poliakrilamid-gélelektroforezissel elválasztottuk, majd nitrocellulóz membránra blottoltuk. A sCD14 izoformákat biotinnal jelölt poliklonális, anti-humán CD14 antitest (R&D Systems), valamint alkalikus foszfátázzal konjugált streptavidin (DAKO) és NBC/BCIP szubsztrát (Promega) segítségével detektáltuk. A nitrocellulóz membránt a GelDoc1000 (BioRad) géldokumentációs rendszerrel analizáltuk, a 48 és az 56 kDa-os izoformának megfelelő sávok denzitását megmértük. Meghatároztuk az izoformák arányát és a szérum össz sCD14 koncentrációjának ismeretében kiszámoltuk a két izoforma koncentrációját.

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

A C(-159)T polimorfizmus meghatározását polimeráz lánreakciót követő restrikciós fragmenthossz polimorfizmus vizsgálattal (PCR-RFLP) végeztük. A betegek és kontroll személyek genomiális DNS-ét QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN) segítségével izoláltuk. A polimorf szekvencia körüli DNS szakaszt polimeráz lánreakcióval felsokszoroztuk. Az amplifikálódott PCR terméket *AvaII* restrikciós enzimmel (New England Biolabs) emésztettük, majd a keletkezett fragmenteket agaróz gélen szétválasztottuk és etídium-bromiddal vizualizáltuk. Mivel a PCR termék csak a T allél esetén hordozza az *AvaII* restrikciós endonukleáz felismerőhelyét, a keletkezett fragmentek hossza alapján meghatároztuk a vizsgált személyek genotípusát.

4.8. Egyéb alkalmazott (rutin) laboratóriumi módszerek

A monocyták abszolút sejtszámát a Sysmex SF3000 hematológiai automatán (Sysmex Corporation) mértük le, a szérum laktát-dehidrogenáz aktivitását Integra 700 kémiai automatával (Roche) határoztuk meg. A szérum totál IgE koncentrációjának meghatározása a Modular E170 automata (Roche), míg az allergén-specifikus IgE koncentrációjának mérése a MAST CLA1 analizátor segítségével történt.

4.9. 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 pulzusszteroid terápia előtt és után ugyanazon SLE-s beteg esetében meghatározott paraméterek közötti eltérést a Wilcoxon-féle párosított teszt segítségével analizáltuk. A sCD14 koncentrációt 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 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 beteg csoportokban Khi-négyzet próbával vetettük össze. Az analízist a „Statistica” program segítségével végeztük, bármely különbséget akkor tekintettünk szignifikánsnak, ha $p < 0,05$ volt.

5. EREDMÉNYEK

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

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

Az atópiás dermatitisben szenvedő betegeket a szérum totál 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. Az intrinsic AD-s betegek monocytáin a kontrollokéhoz képest a TLR4 is szignifikánsan magasabb számban volt kimutatható. Az extrinsic AD-s betegek monocytáin az intrinsic AD-s betegekéhez képest alacsonyabb TLR2 és TLR4 expresszió volt mérhető, de a különbség nem volt szignifikáns. Nem

találtunk szignifikáns különbséget a betegcsoportok és kontrollok monocytáin kifejeződő CD14 és CD180 molekulák számában sem.

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. Az intrinsic AD-s betegek granulocytáin szignifikánsan több TLR2 molekula fejeződött ki, mint az extrinsic AD-s betegeknél. A granulocyták CD14 expressziója mind az intrinsic AD-s csoport, mind az összes AD-s beteg esetében a kontrollokénál magasabbnak bizonyult. 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 referenseknél szignifikánsan magasabbnak mutatkozott. A granulocyták TLR4 és CD180, a lymphocyták TLR2, TLR4 és CD14 expressziója a kimutathatósági határ alatt maradt.

5.1.2. CD14-mediálta LPS kötés és fagocitózis vizsgálata atópiás dermatitises betegek monocytáin és granulocytáin

Az adatok összevetése során nem találtunk különbséget az atópiás dermatitisben szenvedő betegek és az egészséges személyek monocytáinak CD14-mediálta LPS kötése között. Nem találtunk szignifikáns eltérést az atópiás dermatitises betegek és a kontrollok CD14-mediálta baktérium felvételének mértékében sem.

5.1.3. Szérum sCD14 koncentráció meghatározása atópiás dermatitisben szenvedő betegekben

Az összes AD-s beteget egyesítő csoportban, valamint az extrinsic AD-s betegek csoportjában az egészséges kontrollokéhoz képest szignifikánsan alacsonyabb sCD14 koncentrációt mértünk.

5.2. A CD14 expresszió, valamint a CD14-függő funkciók változása SLE-ben szteroid terápia hatására

5.2.1. A glükokortikoszteroid terápia hatása a monocyták CD14 expressziójára

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 és a többi vizsgált személy adatai között mutatkozott. Hasonlóan szignifikáns különbségeket kaptunk akkor is, amikor a pulzus szteroid terápia előtti és utáni értékpárokat hasonlítottuk össze a Wilcoxon-féle párosított teszt segítségével.

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

Az SLE-s betegekből izolált monocyták CD14-függő LPS kötése csökkent az *in vivo* alkalmazott szteroid dózis emelkedésével. Szignifikáns különbségeket találtunk, amikor a kontrollok adatait vetettük össze a pulzus és a kis dózisú szteroid terápiában részesült betegek adataival, de nem találtunk eltérést, amikor a kontrollok és a szteroid terápiában nem részesült SLE-sek 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. 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.

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

A pulzus, illetve a kis dózisú szteroid kezelésben részesült betegek, valamint a kezeletlen SLE-sek LPS-indukálta TNF α termelése alacsonyabb volt, mint a kontroll személyeké, de a különbség csak a pulzus terápiában részesültek esetén

volt szignifikáns. A pulzus terápiás csoportban mért értékek szignifikánsan alacsonyabbak voltak a kezeletlen betegekéhez képest is.

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. A TNF α termelés nagyfokú egyéni variabilitása magyarázhatja a kétféle statisztikai elemzés eredménye közti különbséget.

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

5.3.1. A szérum sCD14 totál és 48/56 kDa-os izoformáinak koncentrációja, a perifériás monocyták CD14 expressziója és a CD14 gén C(-159)T polimorfizmusának megoszlása polymyositisben és dermatomyositisben

Első lépésként a PM-es és a DM-es betegcsoportokat hasonlítottuk össze a CD14 fehérje (sCD14, mCD14) fenotípusos és genotípusos tulajdonságait illetően. Nem találtunk szignifikáns eltérést a két betegcsoport össz sCD14, illetve a különböző izoformák koncentrációi között, mint ahogy a PM-es és DM-es betegek monocytáinak CD14 expressziójában sem. Megvizsgáltuk a CD14 gén C(-159)T polimorfizmusának a megoszlását és ez a két betegcsoportban hasonlóan bizonyult. 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 kontrollokhoz képest. 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.

5.3.2. 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 az össz sCD14 és az 56 kDa-os izoforma koncentrációja szignifikánsan magasabb volt az aktív betegekben, mint az inaktív betegekben vagy a kontrollokban. A monocyták CD14 expressziója viszont éppen ellenkezőleg, szignifikánsan alacsonyabb volt az aktív betegekben az inaktív betegekhez és a kontrollokhoz viszonyítva.

5.3.3. 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 szérumában a monofázisos, a policiklusos betegekhez és a kontrollokhoz viszonyítva. A krónikus csoportba tartozó betegek szérumában 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.

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 betegséglefolyású alcsoportok között, de a totál 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.

Az aktív stádiumú betegek aránya a krónikus csoportban szignifikánsan magasabb volt a monofázisos és policiklusos csoporthoz viszonyítva.

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

Mivel a szérumban totál 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 szérumban totál sCD14 koncentrációja szignifikánsan korrelált a szérumban laktát-dehidrogenáz aktivitásával. A monocyták CD14 expressziója és a laktát-dehidrogenáz aktivitás között szignifikáns negatív korrelációt tudtunk kimutatni.

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

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, mint akár az

inaktív PDM-es csoportban akár a kétféle kontrollcsoportban. 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 a krónikus és a policiklusos csoport illetve a krónikus csoport és a kontrollok összevetésekor bizonyult szignifikánsnak. A T/T genotípusú PDM-es betegek csoportjában az aktív stádiumú és a krónikus lefolyású betegek aránya szignifikánsan magasabb volt, mint az egyéb genotípusokat egyesítő C/C+C/T csoportban.

5.3.6. 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 totál sCD14 koncentrációja és az 56 kDa-os izoforma koncentrációja is szignifikánsan magasabb volt, mint a többi genotípus esetében.

6. MEGBESZÉLÉS

A veleszületett immunrendszer mintafelismerő receptorai közül kiemelkedő jelentősége van a toll-like receptoroknak és az ezekkel asszociált CD14-nek. A kórokozók eliminálásának elősegítésén kívül ezek szerepet játszanak az adaptív immunrendszer regulálásában, és valószínűleg az autoimmun betegségek kialakulásában is. Vizsgálataink során a CD14 rendszer és egyes TLR-ek expressziójának és funkciójának változását vizsgáltuk autoimmun betegségekben (SLE, PM/DM) valamint a gyakori bőrfertőzésekkel jellemezhető AD-ben.

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. Mivel a vizsgált CD14 és TLR receptorok expressziója nem csökkent az AD-s betegekben, így a csökkent receptorszám nem okozhatja az atópiás dermatitises bőrön oly gyakori bakteriális infekciókat. Ugyanakkor ismert, hogy a baktériumok különböző termékei a perifériás fehérvérsejteken fokozhatják a CD14, TLR2 és TLR4 expressziót, és ezen receptorok száma szignifikánsan magasabb volt a baktériumok okozta szepszises betegekben 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 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, 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.

Azért, hogy választ kapjunk arra, hogy a CD14 molekulát érintő változások befolyásolhatják-e szisztémás autoimmun betegségek kialakulását és a betegség lefolyását, polymyositisben és dermatomyositisben szenvedő betegek mintáiban

vizsgáltuk meg a CD14 rendszer egyes paramétereit. 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.

A PDM-es betegek és a kontrollok adatait összevetve nem tudtunk szignifikáns különbséget kimutatni a két csoport között sem a totál 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, a krónikus csoportba tartozó betegeknek magasabb volt a sCD14 koncentrációjuk és sejtjeik kevesebb mCD14-et expresszáltak. A sCD14-et és mCD14-et érintő, a 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 koncentráció csökkenése a betegség aktivitását jelző markerek. Ráadásul ezek a paraméterek szignifikáns korrelációt mutattak a hagyományos, myositisekre jellemző aktivitási marker, az LDH koncentrációjának változásával. 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, Bas és kollégái pedig bizonyították ezt a hipotézist.

Eredményeink azt mutatták, hogy az aktív myositises betegek össz sCD14 koncentrációja emelkedésének hátterében az 56 kDa molekulatömegű izoforma

direkt szekréciója állhat. 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, s mi is ezt tapasztaltuk vizsgálataink során. 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 stimulációját is elősegíti, 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 CD14 rendszer működése terápiás szerekkel befolyásolható. Az immunszuppresszív, antiinflammatorikus hatásokról ismert glükokortikoszteroidok (GCS) több módon, többféle sejtre hatva fejtik ki hatásukat. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy 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.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A veleszületett immunrendszer mintafelismerő receptorai közül kiemelkedő jelentősége van a toll-like receptoroknak és az ezekkel 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 funkciójának változását vizsgáltuk autoimmun betegségekben (szisztémás lupus erythematosus, poly/dermatomyositis) valamint a gyakori bőrfertőzésekkel jellemezhető atópiás dermatitis-ben.

A vizsgálatok legfontosabb eredményei és új megállapításai:

- A szérumban sCD14 koncentrációjának mérésére egy új, kompetíciós alapú, áramlási citometriás módszert állítottunk be.
- 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 betegségfolyással. A T/T genotípus hajlamot jelenthet a krónikus betegségfolyásra 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.

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.
Intern. 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. **Sümegei 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, **Sümegei 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, **Sümegei A**, Tóth Cs. "Idiopátiás" azoospermia háttérében észlelt Y-kromoszóma mikrodeléciók kimutatása.

Magyar Urológia. 2003; 15:184-186.

8. Antal-Szalmás P, Poppelier MJG, **Sümegei 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

A TÉZISEKHEZ KAPCSOLÓDÓ KONGRESSZUSI PREZENTÁCIÓK

1. **Sümegei A**, Sarudi S, Sipka S, Dankó K, Antal-Szalmás P. Altered CD14-expression and serum soluble CD14 (sCD14) levels show correlation with disease activity in patients suffering from poly/dermatomyositis. (poszter) EUROMEDLAB, 2003, Barcelona (Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 41., S169, 2003. IF: 1,523)
2. Antal-Szalmás P, **Sümegei A**, Sarudi S, Sipka S, Dankó K. A CD14-expresszió és a szérumban oldható CD14 (sCD14) koncentráció változásai poly/dermatomyositis (PDM) betegek mintáiban. (poszter) MAKIT, 2003, Eger
3. **Sümegei A**, Kiss E, Antal-Szalmás P, Aleksza M, Csípő I, Sipka S, Zeher M, Szegedi Gy. A steroid terápia hatása a perifériás monociták CD14-expressziójára és a CD14-mediált LPS-kötésre ill. sejtaktivációra SLE-s betegekben. (poszter) MAKIT, 2003, Eger

4. Antal-Szalmás P, **Sümegei A**, Sarudi S, Sipka S, Dankó K. Alterations in the components of the natural immune system in patients suffering from poly- and dermatomyositis (PM and DM).(előadás) MIT, 2003, Győr
5. Antal-Szalmás P, **Sümegei A**, Szöllősi I, Tar T, Sipka S, Kiss E, Szegedi Gy. A CD14, TLR2 és TLR4 expressziójának és funkciójának változásai az SLE-s betegek monocitáin és ezek összefüggése a fertőzőes komplikációk gyakoriságával. (poszter) MIT, 2004, Szeged
6. **Sümegei A**, Dankó K, Kiss E, Szegedi A, Tar T, Ponyi A, Szegedi Gy, Antal-Szalmás P. A CD14, TLR2 és TLR4 gének polimorfizmusainak vizsgálata autoimmun és immunpatomechanizmusú betegségekben. (poszter) MIT, 2004, Szeged
7. Szegedi A, **Sümegei A**, Irinyi B, Hunyadi J, Antal-Szalmás P. Altered serum concentration and altered expression of the components of the CD14/TLR complex on the peripheral leukocytes of patients with atopic dermatitis. (poszter) ESDR, 2005, Tübingen, Németország (Journal of Investigative Dermatology, 124(S1)., A40, 2005; IF: 4,406)
8. Antal-Szalmás P, **Sümegei A**, Hunyadi J, Szegedi A. A CD14/TLR komplex elemeinek változásai atópiás dermatitises betegek perifériás leukocitáin. MAKIT, 2005, Debrecen
9. Antal-Szalmás P, Kiss E, **Sümegei A**, Tarr T, Aleksza M, Sipka S, Szegedi Gy. CD14/TLR vizsgálatok autoimmun megbetegedésekben. (előadás) FACS Users' Meeting, 2005, Pécs
10. **Sümegei A**, Dankó K, Ponyi A, Szegedi G, Antal-Szalmás P. Associations between T/T genotype of the CD14 gene's C(-159)T polymorphism, serum sCD14 concentration, sCD14 isotype distribution and disease activity and course in patients suffering from polymyositis/dermatomyositis (PM/DM). (poszter) ISAC XXIII congress, 2006, Quebec, Canada

