

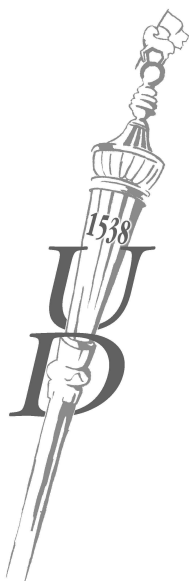
EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

AZ IMMUNREGULÁCIÓS ZAVAROK VIZSGÁLATA SZISZTÉMÁS AUTOIMMUN KÓRKÉPEKBEN

DR. PAPP GÁBOR

TÉMAVEZETŐ: PROF. DR. ZEHER MARGIT

PROGRAMVEZETŐ: PROF. DR. ZEHER MARGIT



DEBRECENI EGYETEM

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

Debrecen, 2012

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések jegyzéke	6. oldal
1. Bevezetés	8. oldal
2. Irodalmi áttekintés	9. oldal
2.1. Immunológiai tolerancia és autoimmunitás	9. oldal
2.2. Sjögren-szindróma	10. oldal
2.2.1. A Sjögren-szindróma klinikuma	10. oldal
2.2.2. A Sjögren-szindróma patogenezise	13. oldal
2.3. Szisztémás sclerosis	15. oldal
2.3.1. A szisztémás sclerosis klinikuma	16. oldal
2.3.2. A szisztémás sclerosis patogenezise	17. oldal
2.4. A fotoferezis kezelés	20. oldal
2.4.1. A fotoferezis kezelés immunbiológiai hatásai	21. oldal
2.4.2. A fotoferezis kezelés klinikai alkalmazása	24. oldal
2.5. Célkitűzések	26. oldal
2.5.1. A Sjögren-szindróma vizsgálata	26. oldal
2.5.2. A szisztémás sclerosis vizsgálata	27. oldal
2.5.3. A fotoferezis kezelés vizsgálata	28. oldal
3. Betegek és módszerek	30. oldal
3.1. Betegek	30. oldal
3.1.1. A Sjögren-szindróma vizsgálatába bevont betegek	30. oldal
3.1.2. A szisztémás sclerosis vizsgálatába bevont betegek	31. oldal
3.1.3. A fotoferezis kezelés vizsgálatába bevont betegek	31. oldal
3.2. A fotoferezis terápia	32. oldal
3.3. Klinikai vizsgálati módszerek	32. oldal
3.3.1. A Sjögren-szindrómás betegek vizsgálata	33. oldal
3.3.2. A szisztémás sclerosisos betegek vizsgálata	33. oldal
3.3.3. A fotoferezis kezelésben részesülő betegek vizsgálata	33. oldal
3.4. Laboratóriumi vizsgálati módszerek	34. oldal
3.4.1. Lymphocyta alcsoportok és aktivált T-sejtek meghatározása	34. oldal
3.4.2. CD4 ⁺ T-sejtek alcsoportjainak meghatározása	35. oldal

3.4.3. CD4+ CD25+ Treg sejtek in vitro funkcionális vizsgálata	37. oldal
3.4.4. Szérum citokinek meghatározása	37. oldal
3.4.5. Szérum komplement és autoantitest szintek meghatározása	38. oldal
3.5. Statisztikai módszerek	38. oldal
4. Eredmények	40. oldal
4.1. A Sjögren-szindróma vizsgálatának eredményei	40. oldal
4.1.1. Perifériás NK és NKT sejtek	40. oldal
4.1.2. Perifériás regulatív T-sejtek	42. oldal
4.1.3. A CD4+ CD25+ Treg sejtek in vitro funkcionális vizsgálata	44. oldal
4.1.4. Szolubilis citokinek	45. oldal
4.1.5. Regulatív sejtek és szolubilis citokinek közötti kapcsolat	46. oldal
4.1.6. A perifériás immunparaméterek és a siccás tünetek vizsgálati eredményeinek kapcsolata	46. oldal
4.1.7. Az autoantitest pozitivitás és a vizsgált immunparaméterek közötti összefüggések	47. oldal
4.2. A szisztémás sclerosis vizsgálatának eredményei	47. oldal
4.2.1. Perifériás B sejtek és T-sejt altípusok	47. oldal
4.2.2. Perifériás NK és NKT sejtek	49. oldal
4.2.3. Perifériás helper T-sejtek	50. oldal
4.2.4. Perifériás regulatív T-sejtek	50. oldal
4.2.5. A CD4+ CD25+ Treg sejtek in vitro funkcionális vizsgálata	50. oldal
4.2.6. Szolubilis citokinek	51. oldal
4.2.7. A belső szervi érintettség, a bőrérzettség súlyossága és a vizsgált immunparaméterek közötti összefüggések	51. oldal
4.2.8. A komplement szintek, az autoantitét pozitivitás és a vizsgált immunparaméterek közötti összefüggések	52. oldal
4.3. A fotoferezis kezelés vizsgálatának eredményei	54. oldal
4.3.1. Bőr-, ízületi és belső szervi érintettség	54. oldal
4.3.2. Perifériás B, T, NK és NKT sejtek	57. oldal
4.3.3. Perifériás Th1, Th2 és Th17 sejtek	57. oldal
4.3.4. Perifériás regulatív T-sejtek (Tr1 és CD4+ CD25+ Treg)	58. oldal
4.3.5. CD4+ CD25+ Treg sejtek szuppresszor aktivitása	61. oldal

4.3.6. Szérum citokin szintek	61. oldal
4.3.7. Szérum autoantitestek	65. oldal
4.3.8. Korrelációk a vizsgált immunparaméterek között	65. oldal
4.3.9. Összefüggések a klinikai állapotjavulás és a vizsgált immun- paraméterek változása között	68. oldal
5. Megbeszélés	69. oldal
5.1. A Sjögren-szindrómás betegeken végzett vizsgálatok	69. oldal
5.2. A szisztémás sclerosisos betegeken végzett vizsgálatok	71. oldal
5.3. A fotoferezis kezelés klinikai és immunológiai hatásai.....	73. oldal
6. Összefoglalás/Summary	76. oldal
7. Irodalomjegyzék	78. oldal
7.1. Hivatkozott közlemények jegyzéke	78. oldal
7.2. Saját közlemények jegyzéke	88. oldal
7.2. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények.....	88. oldal
7.2. További közlemények	89. oldal
8. Tárgyszavak/keywords	91. oldal
9. Köszönetnyilvánítás	92. oldal
10. Függelék	93. oldal

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

8-MOP	8-metoxi-pszoralen
ANOVA	variancia-analízis
APC	antigén prezentáló sejtek
BAFF	B-sejt aktivációs faktor
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BLyS	B-lymphocyta stimulátor
BSA	bovin szérum albumin
CCL2	kemokin (C-C motívum) ligand 2
CD	Cluster of Differentiation
CMV	cytomegalovírus
CTCL	cutan T-sejtes lymphoma
CTGF	kötőszöveti növekedési faktor
EBV	Epstein-Barr vírus
ECP	extrakorporális fotoferezis
EGF	epidermális növekedési faktor
EGM(s)	extraglanduláris manifesztáció(k)
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ENA	extrahálható nukleáris antigén
FasL	Fas ligand
FasR	Fas receptor
FGF	fibroblaszt növekedési faktor
FITC	fluorescein izotiocianát
FoxP3	forkhead box P3
GVHD	graft-versus-host betegség
HCV	hepatitis C vírus
HGF	hepatocyta növekedési faktor
HLA	humán leukocyta antigén
HRCT	nagy felbontású computer tomográfia
HTLV	humán T-sejtes leukaemia-lymphoma vírus

IFN	interferon
IL	interleukin
iTreg	indukálható regulatív T
IVIG	intravénás immunglobulin
M3	muszkarin receptor 3
MCP-1	monocyta kemotaktikus protein-1
MCTD	kevert kötőszöveti megbetegedés
MRSS	módosított Rodnan-féle bőrpontszám
NK	natural killer
NKT	natural killer T
nTreg	természetes regulatív T
OD	optikai denzitás
PAH	pulmonális arteriális hypertonia
PBMC(s)	perifériás mononukleáris sejt(ek)
PBS	foszfát puffer
PC5	fikoeritrin-Cy5
PDGF	vérlemezke eredetű növekedési faktor
PE	fikoeritrin
pSS	primer Sjögren-szindróma
PUVA	pszoralen és UV-A sugárzás
RA	rheumatoid arthritis
SD	standard deviáció
SLE	szisztémás lupus erythematosus
SSc	szisztémás sclerosis
Tc	cytotoxikus T
TGF	transzformáló növekedési faktor
Th	T-helper
TNF	tumor nekrosis faktor
Treg	regulatív T
Tr1	1-es típusú regulatív T
VEGF	vasculáris endotheliális növekedési faktor

1. BEVEZETÉS

Az elmúlt évtizedek egyik leggyorsabban fejlődő tudományterülete az immunológia volt, melynek hatására ugrásszerűen bővültek ismereteink az immunrendszert alkotó elemekről és azok működéséről. Azonban minél mélyebbre ásunk a szervezetünk védekezési mechanizmusainak vizsgálata során, és minél több részletre derül fény az immunkompetens sejtek működésével kapcsolatban, annál több kérdés merül fel, melyek további kutatásokat tesznek szükségessé.

A Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum III. sz. Belgyógyászati Klinikája hazánk egyik legnagyobb immunológiai centruma, és évtizedek óta végzi a szisztémás autoimmun betegségekben szenvedők mind klinikai, mind kutatási szempontból kiemelkedő igényességű gondozását. Zeher Margit professzornő, orvosszakmai igazgató irányítása alatt európai viszonylatban is egyedülállóan nagyszámú, több mint 1100 Sjögren-szindrómás beteg rendszeres ellátása és nyomon követése zajlik klinikánkon, mely ideális lehetőséget teremt a betegség klinikai és laboratóriumi vizsgálata számára. A tanulmányom fókuszában szereplő másik autoimmun betegségben, a szisztémás sclerosisban szenvedő betegek gondozásában is úttörő szerepet játszik klinikánk, ugyanis Zeher Margit professzornő vezetésével 2009-ben megszerveztük a betegek extrakorporális fotoferezissel való terápiáját, melyet azóta is folytatva egyre több beteget kezelünk eredményesen.

Az autoimmun jelenségek kutatásába 2005-ben, még IV. éves orvostanhallgatóként kapcsolódtam be tudományos diákköri pályamunkám során. Az immunológiai folyamatok tanulmányozása nyújtotta tapasztalatok és élmények alapvetően megerősítették tudományos érdeklődésemet, így végzésem után 2008-tól további vizsgálataimat, mint nappali tagozatos PhD hallgató folytattam. Jelen dolgozatomban az immunregulációs zavarok autoimmunitásban betöltött szerepének tanulmányozása során nyert kutatási eredményeimet összegzem.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Immunológiai tolerancia és autoimmunitás

A szervezet immunhomeosztázisának alapfeltétele, hogy az immunrendszer képes legyen különbséget tenni a szervezetet felépítő saját és a nem-saját struktúrák között, és azokra eltérő módon reagáljon. A környezetből bejutó idegen anyagokkal, illetve a szervezetben folyamatosan képződő megváltozott saját struktúrákkal szembeni immunválasz a kórokozók elleni védelmet és a genom állandóságának megőrzését szolgálja, míg a saját struktúrákkal szembeni tolerancia biztosítja, hogy mindeközben a szervezetet felépítő elemek ne, vagy a lehető legkevésbé károsodjanak.

A saját antigénstruktúrák védelmének biztosításában az immunrendszer többféle szabályozó mechanizmusa vesz részt. A centrális tolerancia kifejlődése a csontvelőben, illetve a thymusban megy végbe, mikor a sejtérés korai stádiumában a saját antigéneket felismerő receptorokkal rendelkező sejtek elpusztulnak (klonális deléció) vagy érzéketlenné válnak az adott stimulusra (klonális anergia). Mindemellett azonban számottevő mennyiségben jelennek meg autoreaktív sejtek a periférián, melyek szövet- és szervkárosító hatása normális körülmények között nem fejeződik ki, köszönhetően a perifériás tolerancia (anergia, deléció) jelenségének [1]. Abban az esetben, ha a szervezet saját antigénjeivel szemben immunválasz jön létre, autoimmun betegség alakulhat ki. A patológiás autoimmunitás során károsodhat egy-egy szerv, vagy szövet, mely szervspecifikus autoimmun betegség létrejöttéhez vezethet, azonban, ha az immunválasz több szövet-, és szervféleségben jelen lévő sejt, illetve sejtalkotó ellen irányul, szisztémás autoimmun betegség alakulhat ki. Autoimmun folyamatok az egészséges immunrendszer működése során is végbemennek, azonban nem vezetnek a szervezet működését veszélyeztető szövetkárosodáshoz, köszönhetően a perifériára kikerülő autoreaktív sejtek és a működésüket szabályozó humorális és sejtés mechanizmusok finom egyensúlyának [2].

Munkám első részében az immunhomeosztázis megbomlásában szerepet játszó patológiás immunreaktivitás, illetve elégtelen regulatórikus sejtműködés szerepét tanulmányoztam primer Sjögren-szindrómában (pSS) és szisztémás sclerosisban (SSc), különös tekintettel a klinikai tünetekkel való összefüggésekre. Kutatásaim második

részében a fotoferezis kezelések immunmoduláló hatásait és klinikai hatékonyságát vizsgáltam szisztémás sclerosisban szenvedő betegekben.

2.2. Sjögren-szindróma

A Sjögren-szindróma a második leggyakoribb szisztémás autoimmun megbetegedés a rheumatoid arthritist (RA) követően, az előfordulási gyakorisága elérheti a 3-4 %-ot [3]. A kórfolyamat elsősorban az exokrin elválasztású mirigyeket érinti, a szövetek lymphocytás infiltrációja és immunmediált károsodása következtében a csökkent könny- és nyáleválasztás keratoconjunctivitis siccához és stomatitis siccához vezet. A betegségnek két típusát különböztetjük meg, a primer és szekunder Sjögren-szindrómát. A primer formában a betegség glanduláris és esetleg extraglanduláris tünetei vannak jelen, míg a szekunder formában a klasszikus sicca-tünetek egy másik szisztémás autoimmun kórképhez, mint például RA-hoz, vagy szisztémás lupus erythematosushoz (SLE) társulva fejlődnek ki [4]. A betegség bármely életkorban jelentkezhet, azonban leginkább a 40-50 év közötti nők körében alakul ki. Az egyéb szisztémás autoimmun megbetegedésekhez hasonlóan itt is jellemző az erőteljes női dominancia, az érintett nők és férfiak aránya 9:1, hazánkban a tapasztalatok alapján a betegség 1,2 %-os gyakorisággal fordul elő [5].

2.2.1. A Sjögren-szindróma klinikuma

A kórkép általában lassan fejlődik ki, az egyes tünetek évekkal követhetik egymást. Az autoimmun exokrin mirigykárosodás és a következményes funkciócsökkenés az ún. glanduláris tünetek kialakulásához vezet. A betegek leggyakoribb panaszai a szemszárazsághoz köthetők, idegentest-érzés, viszketés, fájdalom és fényérzékenység képében jelenhetnek meg. A panaszok háttérében az áll, hogy az elégtelen könnyfilmképződés következtében a szemhéj szemfelszínén történő elmozdulásakor fokozott súrlódás keletkezik, továbbá a szemhéj letapadhat a conjunctivális és corneális felszínre, s így mozgása során vongálja az epitheliális sejteket. A keratoconjunctivitis sicca szövődményeként jelentkezhetnek bakteriális

infekciók, illetve előrehaladott esetekben szaruhártyafekély, sőt súlyosabb esetben perforáció is kialakulhat [6] (1. Ábra).



1. Ábra. Rose bengal teszt: az anilinfesték megfesti a károsodott epithelsejteket
(Prof. Dr. Zeher Margit anyagából)

A csökkent nyáltermelés szájszárazsághoz (stomatitis sicca) vezet, az ízérzés zavarát, nyálkahártya fájdalmakat és a száraz ételek nehezített lenyelését okozva. A nyál antimikrobiális funkciójának kiesése által gombás fertőzések, fogszuvasodás és különféle fogágybetegségek jelentkezhetnek [7]. A betegség speciális tüneteként előfordulhat kétoldali, aszimmetrikus jellegű nyálmirigyduzzanat, mely leggyakrabban a parotist érinti. Többségében ez az elváltozás átmeneti jellegű, azonban egyes esetekben perzisztens is lehet (2. Ábra).



2. Ábra. Kétoldali, aszimmetrikus parotisduzzanat
(Prof. Dr. Zeher Margit anyagából)

A légzőrendszer nyálkahártyájának csökkent mirigyszekréciója következtében orr-, garatszárazság (pharyngitis sicca) és tracheitis sicca is jelentkezhet, száraz köhögéshez, felsőlégtüti gyulladásokhoz, és akár pneumóniához is vezetve. A bőr csökkent mirigyfunkciója bőrszárazságot okoz, továbbá nőkben nem ritka a vaginitis sicca kialakulása sem [6].

A betegség lefolyása során a betegeknél jelentkezhetnek általános tünetek, mint fáradékonyság, myalgia és arthralgia, vagy időnként subfebrilitás. A kórkép extraglanduláris, vagy szisztémás tüneteinek (EGMs) többsége a kialakulási mechanizmus alapján két csoportra osztható: periepitheliális és extraepitheliális tünetekre. A periepitheliális tünetek az adott szervek epithelsejtjeinek lymphocytás infiltrációjával magyarázhatók, ide tartozik a bronchiolitis, az interstitialis nephritis és a hepatitis. Az extraepitheliális szervi érintettség elsősorban a poliklonális B-sejt aktiváció következménye, ebbe a csoportba a polyarthrit, a vasculitis és a glomerulonephritis sorolható. A neuromuscularis tünetek azonban nem illeszthetők be egyik nagyobb csoportba sem: a myositis és a szenzoros neuropathia az érintett izmok, illetve idegek direkt lymphocytás infiltrációja miatt jönnek létre, míg a motoros neuropathiát az idegeket tápláló erek vasculitise magyarázza [6].

2.2.2. A Sjögren-szindróma patogenezeise

A betegség patogenezeise a mai napig sem tisztázott teljes mértékben. Az eddigi ismereteink alapján a kórállapot kifejlődése összetett, multifaktoriális jellegű, és didaktikusan 3 főbb szakaszra osztható: az autoimmun gyulladásos folyamatot a genetikailag fogékony egyénekben környezeti tényezők (pl. egyes vírusok) triggerelik, az autoreaktív folyamatok felerősödnek és az autoimmun gyulladás szöveti károsodáshoz vezet.

A genetikai predispozíciós vizsgálatok során a humán leukocita antigének (HLA) tekintetében a legjelentősebb összefüggést a HLA-DR és HLA-DQ allélek és a pSS kialakulása között tapasztalták, azonban az asszociáció erősebbnek adódott a kórállapotban előforduló autoantitestek jelenlétével, mint magával a betegséggel [8]. Szintén fokozott gyakorisággal fordul elő a pSS betegekben a HLA-B8 és HLA-Dw3 antigének expressziója, továbbá a HLA-DQA1*0501 allél jelenléte is hajlamosító tényező [5]. A genetikailag hajlamos személyekben az autoreaktív folyamatok beindítását külső tényezők, mint például vírusinfekciók triggerelhetik. A tanulmányok alapján az Epstein-Barr vírus (EBV), cytomegalovírus (CMV), illetve a humán T-sejtes leukaemia-lymphoma vírus (HTLV) 1-es típus szerepe merül fel a betegség kiváltásában [5,9]. A hepatitis C vírus (HCV) szerepe a nyál- és könnymirigygyulladás kiváltásában kórélettanilag teljes mértékben igazolt. Mivel a HCV fertőzés mellett kifejlődő sicca-szindróma klinikai és szerológiai vizsgálatokkal megkülönböztethetetlen a primer Sjögren-szindrómától, ezért a jelenleg hatályos Amerikai-Európai konszenzus kritériumrendszer a HCV fertőzést a pSS kizárási kritériumaként tünteti fel [10].

Az autoreaktív immunfolyamatok és az autoimmun szövetkárosodás leginkább az exocrin mirigyek szöveteit érinti. Az immunválasz beindításában fontos szerepet játszhat a mirigyek ektópiás antigénprezentációja, az epithelsejtek, illetve a ductalis és acinaris sejtek HLA-DR expressziója. A lymphocytás infiltráció periductalisan indul, s az aktivált T-sejtek fokozott interleukin (IL)-1alfa, IL-6, tumor nekrosis faktor (TNF)-alfa és interferon (IFN)-gamma termelése következtében létrejövő proinflammatorikus citokin milió hozzájárul a poliklonális B-sejt aktivációhoz és a gyulladásos folyamatok krónikussá válásához [6]. A pSS betegek kisnyálmirigy biopsziáinak hisztológiai vizsgálata alapján az infiltráló sejtek dominálónan CD4⁺ T-sejtek, de B-sejtek, illetve

kisebb mennyiségben egyéb antigénprezentáló sejtek és természetes ölősejtek (natural killer, NK) is jelen vannak [11]. Az érintett mirigyszövetek további vizsgálata során leírták az epitheliális sejtek fokozott apoptózist, mely során megfigyelték a Sjögren-szindrómában jellegzetes autoantigénként szolgáló endogén Ro52, Ro60 és La48 antigének intracelluláris átrendeződését, és sejtfelszíni expresszióját [12]. Míg az epitheliális sejtek fokozott mértékben expresszálják felszínükön a Fas receptort (FasR) és az apoptózist indukáló Fas ligandot (FasL), addig az infiltráló lymphocyták esetén FasL és Bcl-2 expresszió figyelhető meg, mely lehetővé teszi számukra a programozott sejthalál kiváltását, azonban önmaguk védeltségével bírnak az apoptózissal szemben [13,14]. A mirigyszöveteket infiltráló mononukleáris sejtekben megfigyelhető emelkedett Bcl-2/Bax arány és a fokozott CD40 és CD154 (CD40L) expresszió magyarázhatja a masszív lymphocyta expanziót és a lokális proinflammatorikus citokin miliót [15]. A glanduláris szövetekben tapasztalt abnormalitások mellett azonban pSS-re a mononukleáris sejtek apoptotikus folyamatainak általános zavara is jellemző. Fokozott apoptózis hajlamot mutattak ki a perifériás vérben keringő CD4+ T-sejtek esetében, melynek mértéke korrelációt mutatott a betegség aktivitásával [16].

Az B-sejtek kulcsszerepe az elmúlt évtizedek során egyértelműen bizonyítást nyert a betegség patogenezisében. Sjögren-szindróma legáltalánosabb szerológiai jellemzője az emelkedett immunglobulin szint, mely számos autoantitestet tartalmazhat. A legismertebb, s a diagnosztika során is felhasznált autoantitestek az Ro/SS-A és az La/SS-B antigének ellen irányulnak [17], azonban többek között alfa-fodrin, illetve muszkarin receptor 3 (M3) ellenes autoantitestek is kimutathatók lehetnek a betegségben. Az anti-M3 antitestek paraszimpatolitikus hatása az exokrin mirigyek funkcionális károsodásához vezethet, hozzájárulva a szövetsérülés okozta funkcióvesztéshez [18]. A B-sejtek autoreaktív aktivációja a betegség patogenezisének egyik kulcspontja. A B-sejt aktivációs faktor (BAFF) vagy más néven B-lymphocyta stimulátor (BLyS) a TNF szupercsalád tagja, és fontos szerepet tölt be a B-sejtek proliferációjának, érésének és túlélésének szabályozásában. Sjögren-szindrómában a vizsgálatok magasabb szérumban BAFF/BLyS szinteket mértek, ezzel párhuzamosan aktivált B-sejtek fokozott jelenlétét is igazolták, melynek mértéke korrelált a keringő autoantitest szintekkel, valamint az ektópiás centrum germinatívumok kialakulásával [19,20]. Az emelkedett BAFF/BLyS koncentrációk antiapoptotikus hatásának

következtében az autoreaktív B-sejtek negatív szelekciós folyamata zavart szenvedhet, továbbá a perifériára kikerülve védetté válhatnak az apoptózist indukáló szignálokkal szemben. E mechanizmusok által a B-sejtek hosszabb túlélése hozzájárulhat a malignus lymphoproliferatív szövődmények kialakulásához a Sjögren-szindrómás betegekben [21].

Az immunfolyamatok kontrollálásában kulcsszerepet játszik a CD4⁺ regulatív T-sejtek hálózata. A CD4⁺ regulatív T-sejteket két főbb csoportba lehet sorolni: az egyikbe az ún. természetes Treg (nTreg) sejtek, míg a másikba az indukálható Treg (iTreg) sejtek tartoznak. Az nTreg hálózatát alkotó CD4⁺ CD25⁺ Treg regulációs potenciálja külső aktivációs jel hiányában is megnyilvánul [22], ezzel szemben az iTreg sejtek a szupresszor funkciójukat aktiválódás útján nyerik el. A perifériás T-sejtes immunválasz szabályozásában többféle iTreg sejt vesz részt, a leggyakrabban vizsgált csoportjaik az IL-10 termelő 1-es típusú regulatív T (Tr1) sejtek és a transzformáló növekedési faktor (TGF)-béta termelő T-helper (Th)3 típusú sejtek [23,24]. A regulatív T-sejtek csökkent jelenléte, illetve szupresszor funkciójának zavara a kutatások alapján fontos szerepet tölthet be a Sjögren-szindróma patogenezisében. Egyes tanulmányok a pSS betegek kisnyálmirigy biopszias mintáiban az egészséges mintákhoz képest alacsonyabb CD4⁺ CD25⁺ Treg sejtszámot írtak le, továbbá a perifériás vér vizsgálata során is csökkenést tapasztaltak a regulatív sejtek számában [25,26]. Említést érdemel azonban egy másik tanulmány is, mely nem igazolta a CD4⁺ CD25⁺ Treg sejtek eltéréseit pSS-ben [27].

2.3. Szisztémás sclerosis

A szisztémás sclerosis (SSc) egy krónikus szisztémás autoimmun megbetegedés, mely vasculáris károsodásokkal, és a bőr illetve egyes belső szervek fibrózisával majd késői atrófiájával jár. A betegség általában a 40-es életévekben kezdődik, és dominálón a nőket érinti. Prevalenciája 31-658/1.000.000 között mozog [28], hazai vizsgálatok alapján 91/1.000.000 [29]. A betegségnek klinikailag két formáját különböztetjük meg: a limitált cutan és a súlyosabb diffúz cutan formát. A diffúz cutan SSc-re a bőr kiterjedtebb érintettsége és a belső szervek gyors és progresszív fibrózisa jellemző. A

terápiás lehetőségek főleg a komplikációk kezelésére korlátozódnak, a betegség diffúz cutan típusában 55%-os a betegek 10 éves túlélési rátája, így ennek a kórformának a legmagasabb a mortalitása az autoimmun kötőszöveti megbetegedések között [30].

2.3.1. A szisztémás sclerosis klinikuma

A betegség legjellemzőbb klinikai tünete az ujjak bőrének vastagabbá, feszesebbé és nehezen elemelhetővé válása, a sclerodactylia kialakulása. A sclerodermás bőrelváltozások jelen lehetnek az acralis részeken, legfőképpen a füleken, az orron és a periorális területen, mely utóbbi a szájnyitási és mimikai képességek csökkenésével jár. A törzs bőrének, illetve a végtagok proximális részének érintettsége a diffúz cutan formában jellemző. A betegség kezdetekor a bőr megvastagodása a szembetűnő, később az idő előrehaladtával ez csökkenhet, azonban a fokozott kollagénlerakódás folyamatos marad, ami a bőrszövet fibrotikus átépüléséhez vezet. A bőr feszülése korlátozza az ízületek mozgathatóságát, különösen a kézujjakon, mely flexiós kontraktúrát eredményez. A betegség későbbi stádiumában az érintett szövetek atrófiája, a bőr és bőrfüggelékek sorvadása figyelhető meg [29] (3. Ábra).



3. Ábra. Sclerodactylia, az ujjak flexiós kontraktúrában
(Prof. Dr. Zeher Margit anyagából)

Egyéb bőrtünet lehet még a teleangiectasia, a hipo/hiperpigmentáció, a subcutan calcinosis, továbbá megjelenhetnek ujjbegyfelek is, melyek csillag alakú hegesedést mutatnak. A betegek átlagosan 95 %-ánál jelentkezik Raynaud-szindróma, mely általában már a betegség kezdetén észlelhető, s évekkel megelőzi az egyéb, súlyosabb tünetek kialakulását. A kapillármikroszkópos vizsgálati eredmény súlyossága összefüggést mutat a belső szervi érintettség kifejlődésével [31]. A betegeknél jellemző tünet lehet még a polyarthralgia, illetve az utolsó ujjperc csontjának reszorpciója.

A belső szervi manifesztációk kifejlődése és súlyossága határozza meg a betegek mortalitási mutatóit. A halálozási okok között a légzőrendszert érintő elváltozások a legjelentősebbek. A tüdőben lejátszódó gyulladásos és fibrotikus folyamatok interstitiális alveolitist, illetve pulmonális fibrózist eredményezhetnek, mely restriktív ventilációs zavarhoz vezet. A másik, súlyosabb tüdőmanifesztáció a pulmonális arteriális hypertonia (PAH), melynek kialakulása főképp a kis pulmonális artériák falának fibrotikus elváltozására vezethető vissza, s a vezető halálokot képezi SSc-ben [32]. Gastrointestinalis érintettségként gyakran megfigyelhető a motilitászavar, mely leginkább a nyelőcsövet érinti, azonban a gyomor-bél traktus egyéb része is érintett lehet [33]. A gyomorban ritka vasculáris malformációként ún. görögdinnyegyomor is előfordulhat, mely okkult vagy akár életveszélyes vérzéshez is vezethet. Cardialis manifesztációként pericarditis és myocardialis fibrózis jelentkezhet, mely utóbbi diasztolés funkciókárosodáshoz és ingervezetési-ingerképzési zavarokhoz vezethet. A betegségre jellemző érelváltozások a szívkoszorúereket is érinthetik. A rossz prognózisú sclerodermás vesebetegség jellemzően a betegség diffúz cutan formájában, a kórlefolyás első éveiben fordul elő. A vese kisartériáinak obliteratív károsodása következtében scleroderma renális krízis alakulhat ki, mely malignus hypertoniával és gyorsan progrediáló azotaemiával járó, az életet veszélyeztető állapot [29].

2.3.2. A szisztémás sclerosis patogeneze

Bár még nem tisztázott teljes mértékben a betegség patogeneze, a kórlefolyamat három alapvető lépése egyértelműen meghatározható: a vasculáris eltérések megjelenése, a patológiás immunreakció és az érintett szövetek fibrózisa. A genetikai eltérések vizsgálata során összefüggéseket írtak le egyes HLA-haplotípusok és

scleroderma specifikus autoantitestek között. Az anticentromer antitest a HLA-DQB1-gyel, az antitopoizomeráz jelenléte pedig a HLA-DRw11 alléllal mutat kapcsolatot [29]. Az extracelluláris mátrix felszaporodásában részt vevő faktorok genetikai polimorfizmusának is lényeges szerepe lehet a betegségre karakterisztikus fibrotikus folyamatok kiváltásában, mint a transzformáló növekedési faktor (TGF)-béta, fibronectin, vagy az IL-8 gén polimorfizmusa [34], azonban mindezekon felül az újabb genetikai kutatások számos további hajlamosító locust is azonosítottak [35]. A genetikai tényezőkön túl a környezeti ártalmak is fontos szerepet játszhatnak a betegség kifejlődésében. Egyes szerves oldószerek (toluol, benzol), vinil-klorid és bizonyos gyógyszerek esetében összefüggést sikerült kimutatni az adott vegyülettel történő expozíció és az SSc megjelenése között [36].

A betegség kifejlődésében komplex mechanizmusok játszanak szerepet. Az elképzelések szerint a megváltozott kölcsönhatás az endothel sejtek és bizonyos immunsejtek, illetve azok szolubilis mediátorai között vezet a fibroblasztok funkcionális zavaraihoz, mely kulcsszerepet játszik a fibrotikus folyamatokban. A kórfolyamat elsődleges jelensége az endothelialis lézió kialakulása, mely az endothelsejtek vacuolás degenerációjával és a bazális membrán sérülésével jár. Ennek hátterében az endothel sejtek elleni autoantitestek termelődése, illetve az endothelfüggő folyamatok egyensúlyának megbomlása, a vasoconstrictor hatású faktorok túltermelődése (endothelin-1, thromboxan A2) és a vasodilatator mediátorok (nitrogén-oxid, prosztaciklin) csökkent jelenléte állhat. [37]. Az ehhez társuló immunológiai működési zavarok, pl. az NK és cytotoxikus T (Tc) sejtek szerin proteáz termelése, és az immunaktivációs folyamatok következtében megváltozott citokin miliő az érfal strukturális károsodásához, a tunica intima és media hipertrófiájához, majd az adventitia fibrózisához vezetnek [38]. Az egyre súlyosbodó keringési zavar hypoxiás állapotot idéz elő az érintett szövetekben, mely reaktív oxigéngyökök képződéséhez és további növekedési faktor felszabaduláshoz, illetve a fibroblasztok aktivációjához vezet. Ezek a folyamatok az ér lumenének progresszív szűkületéhez, később elzáródásához és következményes szövet- és szervkárosodásokhoz vezetnek.

Az SSc patogenezisében szerepet játszó immundiszfunkció teljes részletében még nem ismert. Az érintett bőrszövetek immunhisztokémiai vizsgálata során az aktivált makrofágok mellett szintén aktivált állapotú CD4+ T-helper sejtek helyi

felhalmozódását is tapasztalták [39]. A T-helper sejteken belül korábban Th1 és Th2 altípusokat különböztették meg, és a Th1 és Th2 citokin profil Th2 irányú eltolódásának szerepét gyanították a fibrotikus folyamatok beindításában, ugyanis az IL-4 citokin emelkedett szintje a pro-fibrotikus citokin TGF- β fokozott termelődéséhez vezet [40]. Azonban a további kutatások a CD4⁺ T-sejteken belüli újabb altípusok (Th17 és Treg sejtek) azonosításával újabb mechanizmusokra derítettek fényt, melyek zavara a betegség kifejlődését eredményezheti. A Th17 sejtek által termelt IL-17 citokin IL-17F típusa az endothel sejtek receptoraihoz kötődve azokat TGF- β termelésre serkenti, míg az IL17A a fibroblasztok IL-6, IL-8 termelését és az ICAM-1 expresszióját váltja ki [41]. Azonban a Th17 sejtek pro-inflammatorikus és pro-fibrotikus hatásához számos egyéb folyamat, pl. IL-22 termelés is hozzájárulhat, mely nagyobb koncentrációban fokozott kemokin képződéshez és a fibroblasztok proliferációjához vezet [42]. A Th17 sejtek kulcsszerepét támasztják alá azok a vizsgálatok is, melyek e sejtípus fokozott perifériás jelenlétéről és az IL-17 citokin emelkedett szintjeiről számolnak be [43,44]. A betegségben a jellegzetes pro-inflammatorikus citokin miliő, az aktivált monocyták és T-sejtek, illetve az epitheliális sejtek és fibroblasztok által termelt IL-6 szintek emelkedett szintje a CD4⁺ CD25⁺ Treg sejtek szuppresszor működésének csökkenését okozhatják, ami a kóros immunfolyamatok további fokozódását eredményezheti [45]. A CD4⁺ CD25⁺ Treg sejteket célzó vizsgálatok a betegségben egymásnak ellentmondó eredményeket hoztak. Míg egyes munkacsoportok emelkedett, addig mások csökkent CD4⁺ CD25⁺ Treg sejtszámokat tapasztaltak az SSc betegek perifériás vérében [46-49].

Azonban a T-sejtes mechanizmusokon felül a patológiás B-sejt aktivációnak is szerepe lehet a betegség patogenezisében, ugyanis az SSc betegek szérumában az esetek döntő többségében magas specificitású autoantitestek mutathatók ki. Antinukleáris autoantitestek a kórképben 80-95 %-os gyakorisággal fordulnak elő. Az anti-Scl-70 autoantitest a DNS topoizomeráz I ellen irányul, és jelenléte az anti-RNS polimeráz I-III és antifibrillarin autoantitestekhez hasonlóan a betegség diffúz cutan formájára jellemző. A limitált cutan SSc-re leginkább az anticentromer autoantitest előfordulása jellemző [29]. Az egyes autoantitestek az immunfolyamatok serkentése, a sejtek direkt károsítása, az endothel aktivációja és a fibroblasztok stimulációja által járulhatnak hozzá a betegség patogeneziséhez [50,51].

A különféle immunmechanizmusok mellett az extracelluláris mátrix felszaporodásának közvetlen kiváltásában kulcsszerepet játszó növekedési faktorokat is élénk érdeklődés övezi. A kutatások célkeresztjében főképp a TGF-béta áll, azonban számos egyéb növekedési faktor [pl. vérlemezke eredetű növekedési faktor (PDGF), epidermális növekedési faktor (EGF), fibroblaszt növekedési faktor (FGF)] szerepe is felmerült a fibrózis kialakulásában [52]. A TGF-béta egy pleiotróp hatású citokin, melyet elsősorban a szövetet infiltráló makrofágok termelnek, azonban számos más sejttípus esetén is leírták szekrécióját. A TGF-béta hatása a fibroblasztokhoz kötődve azok myofibroblaszt irányú transzformációját, fokozott adhéziós és migrációs képességét és túlélését váltják ki, mely excesszív kollagén szintézishez, nagyobb mennyiségű kötőszöveti növekedési faktor (CTGF) termeléséhez, továbbá a mátrix gének fokozott expressziójához vezet [53]. A fibroblasztok aktivációját ezen felül egyéb mechanizmusok is kiválthatják SSc-ben, mint például az autoantitestek kötődése a fibroblasztok felszínéhez, mely a Toll-like receptor 4 aktiválódása által többek között a monocyta kemotaktikus protein-1 (MCP-1), vagy más néven a kemokin (C-C motívum) ligand 2 (CCL2) termelését váltja ki [52]. A TGF-bétának azonban a pro-fibrotikus aktivitása mellett anti- és pro-inflammatórikus hatásait egyaránt leírták. Szerepet játszhat a CD4⁺ CD25⁺ Treg sejtek képződésében és azok szuppresszor funkciójának biztosításában, azonban az újabb kutatások leírták, hogy a TGF-béta a gyulladásos citokinek (pl. IL-6, IL-1béta, TNF-alfa) fokozott jelenlétében jellemzően a CD4⁺ T-sejtek Th17 irányú differenciálódásának serkentésében vesz részt [54,55], mely megfigyelések aláhúzzák a betegség patogenezisében részt vevő mechanizmusok komplexitását.

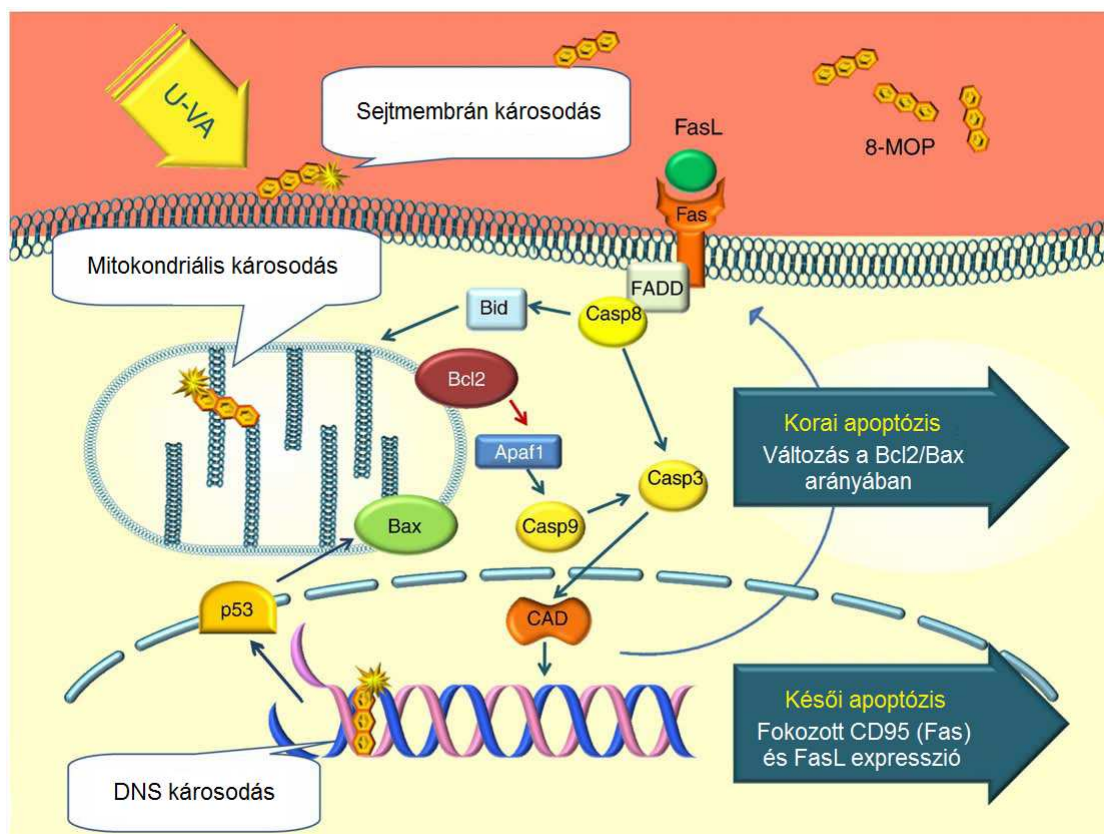
2.4. A fotoferezis kezelése

Az immun-mediált betegségek, és azokon belül az autoimmun kórállapotok kezelése terén az elmúlt évtizedben jelentős előrelépések történtek. A hagyományos terápiás lehetőségeken túl a modern biológiai gyógyszerek, az intravénás immunglobulin-kezelés (IVIG), a haematopoietikus őssejt transzplantáció és a plazmaferézis is egyre szélesebb körben vált használatossá. Az extrakorporális fotoferezis (ECP) egy speciális immunmoduláns terápia, mely a plazmaferézishez

hasnólóan az aferezis technológián alapul. Az eljárás során a beteg perifériás véréből nyert leukocytá gazdag plazma szeparálását követően 8-metoxi-pszoralennel (8-MOP), egy fotoszenzitizáló vegyülettel kezeljük a sejteket, majd UV-A besugárzást követően a sejteket reinfundáljuk a szervezetbe. A 8-MOP az UV-A sugárzás hatására fotoaktiválódik, és keresztkötéseket hoz létre a DNS láncok között, melynek következtében a kezelt sejtek nagy része, elsősorban a lymphocyták a keringésbe visszakerülve 72 órán belül apoptózissal elpusztulnak [56,57]. Számos hematológiai és immunológiai kórképben, továbbá transzplanátciót követően is leírták a fotoferezis kezeléseket jótékony klinikai hatását. Bár a javulás hátterében álló molekuláris mechanizmusok még nem tisztázottak teljes mértékben, az eljárás több betegségben is hatékonynak bizonyult a malignus, illetve autoreaktív sejtek eliminációjában és a szervezetre káros immunfolyamatok csillapításában [57].

2.4.1. A fotoferezis kezelés immunbiológiai hatásai

Az eljárás során a beteg szervezetében keringő perifériás leukocytáknak 2-5%-a esik át a 8-MOP fényérzékenyítő anyaggal történő kezelésen. Az UV-A besugárzás hatására a 8-MOP fotoaktivált állapotba kerül, és kovalens módon keresztkötéseket hoz létre a DNS láncok között, illetve direkt károsodásokat okoz a sejtmembránban, mely folyamatok a leukocyták apoptózisához vezetnek. A kezelést követő 20-24 órában, az ún. korai apoptózis során a mitokondriális működészavar dominál, és megváltozik a Bcl-2/Bax arány. A késői apoptózis fázisában fokozódik a sejtek CD95 (FasR) és FasL expressziója [58] (4. Ábra). A lymphocytákkal szemben a monocyták kevésbé tűnnek érzékenynek az ECP apoptózis-indukáló hatására, ugyanis a megfigyelések alapján a kezelések következtében aktivált állapotba kerülnek és fokozott mértékben termelnek IL-10 és TNF-alfa citokineket [57].

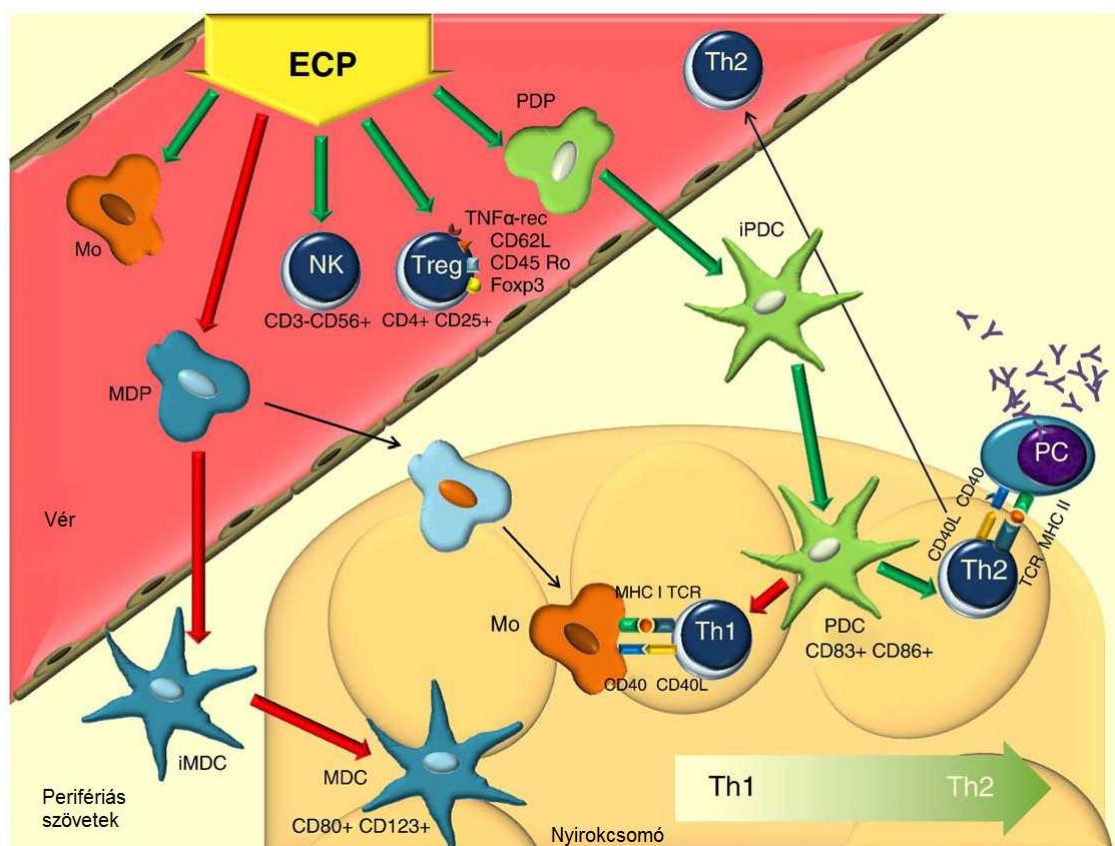


4. Ábra. A fotoaktivált 8-metoxi-pszoralen (8-MOP) a kezelt sejtek struktúráját több ponton is károsítja [57].

Az apoptotikus lymphoid sejteket makrofágok és dendritikus sejtek fagocitálják. Az apoptotikus sejtekből származó antigének antigén prezentáló sejtek (APC) általi bemutatása a „danger” szignálok hiányában szerepet játszhat a saját antigénekkal szembeni centrális és perifériás immuntolerancia kialakulásában [59]. A megfigyelések szerint a fotoferezis kezelésekre hatására a perifériás vérben a monocytoid dendritikus sejtek aránya csökken, míg a plazmacytoid dendritikus sejtek aránya növekszik. Mindezek mellett a T-helper sejtek citokin profiljának Th2 irányú eltolódásáról is beszámoltak graft-versus-host betegségben (GVHD) a terápia alkalmazása során [60].

Az újabb kutatások az immunregulatórikus működés megváltozásának a jelentőségét emelik ki a fotoferezis toleranciát indukáló hatásában. Egyre több bizonyíték támasztja alá, hogy a kezelésekre nyomán bekövetkező CD4⁺ CD25⁺ Treg sejt aktiváció és expansió kulcsszerepet játszik az immunrendszer autoreaktivitásának csillapításában [61,62]. Állatkísérletes vizsgálatok során IL-10 deficiens

egérmodellekben UV-A sugárzást követően csökkent regulatív T-sejt aktivitást tapasztaltak [63], mely a regulatív T-sejtek, illetve a dendritikus sejtek által termelt IL-10 citokin központi szerepére utal az immunmoduláció során. Az IL-10 termelés fokozódásának immunbiológiai jelentőségét kontakt hiperszenzitivitás egérmodelleken elvégzett fotoferezis kezelések is alátámasztják [64]. A fotoferezis eljárás feltételezett immunbiológiai hatásait az 5. Ábra foglalja össze.



5. Ábra. A fotoferezis eljárás (ECP) a monocytákra, T-sejtekre és a dendritikus sejtek (DC) prekurzoraira kifejtett komplex hatásainak következtében a T-helper citokin profil Th2 irányba eltolódik, továbbá fokozódik a monocyták, NK sejtek, plazmacytoid DC sejtek és Treg sejtek száma a perifériás vérben, míg a monocytoid DC sejtek száma csökken. *Rövidítések:* ECP: extrakorporális fotoferezis, iMDC: éretlen monocytoid dendritikus sejt, iPDC: éretlen plazmacytoid dendritikus sejt, MDC: monocytoid dendritikus sejt, MDP: monocytoid dendritikus prekurzor, Mo: monocyta, NK: natural killer, PC: plazmasejt, PDC: plazmacytoid dendritikus sejt, PDP: plazmacytoid dendritikus prekurzor, Th1: T-helper 1, Th2: T-helper 2, Treg: regulatív T [57].

Mivel a fotoferezis eljárás biológiai hatásait és azok mélyebb összefüggéseit ez idáig csak állatkísérletes modelleken, illetve humán GVHD-ban és cutan T-sejtes lymphomában (CTCL) vizsgálták, az autoimmun kórképek kezelése során mutatott hatékonyság mögött álló mechanizmusok feltérképezése új irányt adhat a kutatások számára.

2.4.2. A fotoferezis kezelés klinikai alkalmazása

Egyes immun-mediált bőrgyógyászati kórképekben, mint például a vitiligo, ekcéma, vagy a psoriasis, már régóta ismert a bőr pszoralennel történő fényérzékenyítést követő UV-A (PUVA) fényterápiájának hatékonysága [65]. A GVHD-ben megjelenő bőrtünetek kezelésében is hatékonynak bizonyult ez az eljárás, melyet továbbfejlesztve, mint fotoferezis kezelést elsőként a GVHD-ben szenvedő betegeken próbáltak ki. A terápia hatékonynak bizonyult a betegség mind akut, mind krónikus formájában, továbbá a CTCL-ben is [66,67]. A CTCL-ben leírt malignus T-sejtek klonális expanziója, és a transzplantációk rejekciója során megfigyelt donor specifikus T-sejtek klonális expanziója közötti hasonlóság alapján felvetődött a fotoferezis kezelések hatékony alkalmazásának lehetősége a szervtranszplantációk rejekciójának esetében is [68]. A fotoferezis jótékony hatása különféle immunmediált gyulladásos folyamatokban is felmerült, ezért ezt követően számos autoimmun kórkép esetén is megvizsgálták a kezelések következményeit. Bár a sclerosis multiplex krónikus progresszív típusában nem volt hatással a kórlefolásra, a betegség remittáló-relabáló formájában a fotoferezis terápia szignifikánsan csökkentette a relapszusok számát [69]. Atópiás dermatitisben és a gyulladásos bélbetegségek aktív, refrakter formájában szintén biztató eredmények láttak napvilágot az ECP kezelések hatékonyságát illetően [70,71].

A fotoferezis terápia ígéretes kezelési eljárásnak tűnik mindezen túl a szisztémás sclerosis diffúz cutan formájában is. Knobler és mtsai tanulmánya alapján a fotoferezis eljárás előnyösnek bizonyult a klinikai tünetek kezelésében, jelentősen csökkentve a betegek bőr- és ízületi panaszait [72]. Egy másik vizsgálat azt mutatta ki, hogy a fotoferezis hatására a bőr vastagsága csökkent, de az echo-intenzitása nőtt, ennek alapján a kezelés hatékonyabbnak tűnik a bőr duzzanatának csökkentésében, mint a már

kifejlődött fibrózis megszüntetésében [73]. A klinikai javulás hátterében valószínűleg multiplex mechanizmusok állhatnak, melyek magukba foglalhatják (I) a kezelt sejtek apoptózisának kiváltását, (II) az antigén-prezentáló sejtek modulációját, (III) az immunregulatórikus működés serkentését és (IV) az anti-inflammatórikus citokinek termelését [57]. Fontos azonban hangsúlyozni, hogy a kezelés által kiváltott molekuláris mechanizmusok részleteiben még nem tisztázottak SSc-ben, mivel a betegségben előttünk még nem vizsgálták a fotoferezis immunbiológiai hatásait.

2.5. Célkitűzések

2.5.1. A Sjögren-szindróma vizsgálata

Munkánk során a természetes és az adaptív immunrendszer regulatórikus tulajdonságú sejteinek a primer Sjögren-szindróma patogenezisében játszott szerepét igyekeztünk megismerni. A vizsgálataink során nyert eredményeket az egészséges kontroll személyeknél mért adatokkal vetettük össze.

Mivel a regulatív sejtek pSS-ben betöltött szerepéről az irodalomban eddig egymásnak látszólag ellentmondó eredmények láttak napvilágot, vizsgálataink céljait az alábbiakban határoztuk meg:

- 1.) A primer Sjögren-szindrómában szenvedő betegek perifériás vérében keringő regulatív sejtek (NK, NKT, Tr1 és CD4⁺ CD25⁺ Treg) kvantitatív eltéréseinek vizsgálata mind a természetes, mind az adaptív immunrendszer szintjén.
- 2.) A CD4⁺ CD25⁺ Treg sejtek szuppresszor képességének vizsgálata in vitro funkcionális teszttel, a kapott eredményeinek összehasonlítása a betegek és az egészséges kontrollok között.
- 3.) Az IL-4, IL-6, IL-10, TNF-alfa és IFN-gamma citokinek szérumkoncentrációjának meghatározása, a mért értékek összevetése a beteg és egészséges populációk között.
- 4.) A betegek két alcsoportba osztása az extraglanduláris tünetek megléte illetve hiánya alapján, majd az alcsoportok laboratóriumi paramétereinek összehasonlítása, és az esetleges eltérések és a klinikai adatok közötti asszociációk vizsgálata.
- 5.) A betegek két csoportra való elkülönítése az autoantitest pozitivitás alapján, majd az alcsoportok laboratóriumi paramétereinek összehasonlítása.
- 6.) A humorális és sejtes immunparaméterekben megfigyelt eltérések közötti asszociációk keresése.

2.5.2. A szisztémás sclerosis vizsgálata

Tanulmányunk során a perifériás immunkompetens sejttípusok széles spektrumát vizsgáltuk a szisztémás sclerosisban megfigyelhető immunológiai eltérések alaposabb leírása céljából, különös figyelmet fordítva a laboratóriumi paraméterekben tapasztalt eltérések és a betegség klinikai tüneteinek kapcsolatára.

Célkitűzéseinket az alábbiakban határoztuk meg:

- 1.) A szisztémás sclerosis diffúz cutan formájában szenvedő betegek perifériás vérében keringő B-sejtek, NK, NKT sejtek és egyes T-sejt altípusok (korai és késői aktivált T-sejtek, naív, memória T-sejtek) százalékos arányának vizsgálata és összevetése az egészséges kontrollok adataival.
- 2.) A perifériás Th1, Th2 és Th17 sejtek, illetve a Tr1 és CD4+ CD25+ Treg sejtek kvantitatív értékeinek összehasonlítása a betegek és egészségesek között.
- 3.) Az SSc betegek és a kontroll személyek CD4+ CD25+ Treg sejteinek in vitro szuppresszor képességének vizsgálata, a kapott eltérések leírása.
- 4.) Az IL-4, IL-10, és IFN-gamma citokinek szérumkoncentrációjának meghatározása, a mért értékek összevetése a beteg és egészséges populációk között.
- 5.) A szérum komplement szintek meghatározása a betegekben, esetleges összefüggések keresése a mért értékek és az egyéb laboratóriumi paraméterek között.
- 6.) A betegek két alcsoportba osztása az autoantitest pozitivitás alapján, majd az alcsoportok laboratóriumi paramétereinek összehasonlítása.
- 7.) A betegek klinikai állapotfelmérésének keretében a bőrérzettség meghatározására szolgáló módosított Rodnan-féle bőrpontszám kiszámítása, és az esetleges korrelációk keresése a kapott eredmények és a vizsgált immunparaméterekben megfigyelt eltérések között.

2.5.3. A fotoferezis kezelés vizsgálata

A fotoferezis terápia klinikai hatékonyságának felmérése céljából nyomon követtük a diffúz cutan SSc-ben szenvedő betegek bőr-, ízületi és belső szervi érintettségének változását a kezelések alatt. Az eljárás immunbiológiai hatásainak vizsgálata során a terápia bevezetése előtt meghatároztuk, majd később rendszeresen ellenőriztük a betegek perifériásan keringő regulatív és effektor immunsejtjeinek és szérum citokinjeinek széles spektrumát. A betegek kiindulási laboratóriumi értékeit összevetettük a vizsgálatunkba bevont egészséges kontroll személyek mért adataival is.

Célkitűzéseink között az alábbiak szerepeltek:

- 1.) A fotoferezis kezelésekre bevont betegek bőrérzettségének kiértékelése a terápia megkezdése előtt és minden kezelési ciklust követően a módosított Rodnan-féle bőrpontszámmal, orális apertúra méréssel és a bőr ultrahangos vizsgálatával.
- 2.) Az ízületi érintettség változásának követésére a végtagízületek mozgástartományainak megmérése a kezelések megkezdése előtt és minden terápiás ciklust követően.
- 3.) Az első kezelés előtt és az utolsó kezelés után a betegek belső szervi érintettségének kivizsgálása.
- 4.) A betegek perifériás vérében keringő B sejtek, NK, NKT sejtek és egyes T-sejt altípusok (korai és késői aktivált T-sejtek, naív, memória T-sejtek) abszolút számának és százalékos arányának meghatározása a kezelések megkezdése előtt, majd a kezelési ciklusokat követően.
- 5.) A perifériás Th1, Th2 és Th17 sejtek, illetve a Tr1 és CD4⁺ CD25⁺ Treg sejtek kvantitatív értékeinek megállapítása a terápia megkezdése előtt, majd az értékek nyomon követése a fotoferezis ciklusokat követően.
- 6.) Az SSc betegek CD4⁺ CD25⁺ Treg sejteinek szuppresszor képességében bekövetkezett változások in vitro vizsgálata a fotoferezis terápia során.
- 7.) Szérum citokinek széles spektrumának [TNF-alfa, IFN-gamma, IL-1-alpha, IL-1-beta, IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-17, CCL2, FGF, vasculáris endotheliális növekedési faktor (VEGF), EGF, hepatocyt

növekedési faktor (HGF) és TGF-béta] meghatározása a terápia megkezdése előtt, illetve az első, második, negyedik és hatodik ciklust követően.

- 8.) Az autoantitest szintek meghatározása a betegekben, majd az értékek változásának követése a kezelési ciklusokat követően.
- 9.) A betegek klinikai vizsgálati eredményei és laboratóriumi eredményei közötti összefüggések, asszociációk vizsgálata.

3. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Betegek

A DEOEC III. sz. Belgyógyászati Klinika Klinikai Immunológiai Tanszéke hazánk egyik legnagyobb múltú, illetve betegforgalmú immunológiai centruma. A kutatásaink során vizsgált Sjögren-szindrómás és szisztémás sclerosisos betegek rendszeres követése és gondozása a tanszékünkön történik. A tanulmányainkba bevont személyek írásbeli beleegyező nyilatkozatot tettek, a vizsgálatot a DEOEC Etikai Bizottsága engedélyezte, a kísérletek a Helsinki Nyilatkozatban foglaltaknak megfelelően történtek.

3.1.1. A Sjögren-szindróma vizsgálatába bevont betegek

A vizsgálatba 32 primer Sjögren-szindrómás beteget vontunk be. A diagnózis megállapítása az Amerikai-Európai Konszenzus Kritériumrendszer alapján történt [10]. Kilenc betegnél csupán glanduláris tünetek jelentkeztek, míg 23 beteg egy, vagy több extraglanduláris tünetet is mutatott a kórlefolyás során. A betegek extraglanduláris tüneteinek eloszlása a következőképpen alakult: tüdőérintettség $n = 2$, myositis/myalgia $n = 3$, polyneuropathia $n = 5$, Raynaud-jelenség $n = 14$, vasculitis $n = 15$, polyarthritis $n = 18$. Laboratóriumi méréseinkhez kontrollként 20 egészséges, korban és nemben a vizsgált betegpopuláció jellemzőinek megfelelő személy szerepelt. A vizsgálatunkba bevont egyének demográfiai tulajdonságait az I. Táblázat összegzi. A tanulmányban szereplő betegek, illetve kontroll személyek egyike sem részesült immunszuppresszív, vagy immunmoduláns kezelésben, illetve nem szenvedett fertőzésben a vizsgálat időtartama alatt, illetve az azt megelőző 6 hónapban.

	Egészséges kontrollok	pSS betegek	pSS EGM-mel	pSS glanduláris tünettel
Szám	20	32	23	9
Életkor (átlag ± SD)	46,9 ± 6,5	49,5 ± 7,2	51,2 ± 6,9	47,6 ± 8,1
Nem (nő/férfi)	19/1	31/1	11/1	9/0

I. Táblázat. A tanulmányunk során vizsgált személyek demográfiai adatai

3.1.2. A szisztémás sclerosis vizsgálatába bevont betegek

A vizsgálatba 21 diffúz cutan szisztémás sclerosisban szenvedő beteget vontunk be, a betegség diagnózisának megállapítása a megfelelő diagnosztikai kritériumok szerint történt [74]. Három beteg metilprednizolon (4 mg naponta), 2 beteg metotrexát (15 mg hetente) kezelésben részesült, míg 16 beteg nem kapott immunszuppresszív, vagy immunmoduláns terápiát a vizsgálat alatt, csupán napi 2 x 400 mg pentoxifillin és 2,5 mg amlodipin kezelésben részesült. A vérvételek időpontja előtt minden betegnél 48 órára felfüggesztettük a gyógyszeres terápiát. Tizenöt egészséges személy alkotta a kontroll csoportot, mely korban és nemből megfelelő volt a vizsgált betegek csoportjának. A tanulmányunk során vizsgált személyek demográfiai tulajdonságait a II. Táblázat összegzi. Sem a betegek, sem az egészséges kontrollok nem szenvedtek infekcióban a vizsgálat időpontjában, illetve az azt megelőző 6 hónapban.

	Egészséges kontrollok	SSc betegek	Betegek belszervi érintettséggel	Betegek csak bőrérintettséggel
Szám	15	21	12	9
Életkor (átlag ± SD)	47,5 ± 10,2	50,8 ± 15,2	53,9 ± 12,2	46,5 ± 17,3
Nem (nő/férfi)	14/1	20/1	11/1	9/0

II. Táblázat. A vizsgálatba bevont személyek demográfiai adatai

3.1.3. A fotoferezis kezelés vizsgálatába bevont betegek

A vizsgálatba 16 diffúz cutan szisztémás sclerosisban szenvedő beteget vontunk be (14 nő és 2 férfi; átlagos életkor: 46,5 ± 13,2 év). A diagnózis megállapítása a

megfelelő diagnosztikai kritériumok alapján történt [74], a betegség fennállásának átlagos időtartama a kezelések megkezdésének időpontjában 3,9 (0,5 - 7) év volt. A vizsgálatba bevont betegek a fotoferezis terápia bevezetése előtt legkevesebb 1 éven keresztül 2 x 400 mg pentoxifillin és 2,5 mg amlodipin kezelésben részesültek, immunszuppresszív, illetve immunmoduláns terápia alatt nem álltak. A laboratóriumi vizsgálatokhoz 16 egészséges, korban és nemi összetételben megfelelő személy (14 nő és 2 férfi; átlagos életkor: $43,9 \pm 12,8$ év) szolgált kontrollként. Egyik beteg, illetve kontroll személy sem szenvedett fennálló fertőzésben a kezelés időtartama alatt, sem az azt megelőző 6 hónapban.

3.2. A fotoferezis terápia

A fotoferezis kezelések a THERAKOS UVAR XTS készülék használatával (Therakos Inc., Raritan, NJ, USA) történtek. Első lépésként teljes perifériás vért nyertünk a betegektől egy centrifuga-edénybe, melyben a buffy coat szeparálása történt, s az így nyert buffy coat a recirkulációs zsákba került be. Miután összegyűlt 250 - 300 ml buffy coat, a hematokrit szenzor leállította a további szeparálást. A rendszer automatikusan hozzáadta a sejt koncentrátumhoz a 8-MOP fotoszenzitizáló reagenst, mígnem annak végső koncentrációja 334 ng/ml lett. Ezt követően a sejt koncentrátumot $1,5-2 \text{ J/cm}^2$ sugárdózisú UV-A fénynek tettük ki, majd visszajuttattuk a beteg keringésébe. A standard protokollnak megfelelően a kezelési ciklusokat 6 hetente ismételtük meg, mindegyik terápiás ciklus 2 fotoferezis eljárásból állt, melyeket az egymást követő napokon hajtottuk végre. A betegek fejenként összesen 6 kezelési ciklusban részesültek.

3.3. Klinikai vizsgálati módszerek

A betegek klinikai állapotának nyomon követése a DEOEC III. számú Belgyógyászati Klinika Klinikai Immunológiai Tanszékén történt.

3.3.1. A Sjögren-szindrómás betegek vizsgálata

A betegek könnymirigy szekréciójának kimutatása Schirmer-teszttel történt. Mindkét szem alsó szemhéja mögé egy-egy 30 mm hosszú filtert helyeztünk el. Becsukott szem mellett 5 percig tartott a vizsgálati idő, melynek végén meghatároztuk a könny által benedvesített rész hosszát mm-ben. 5 mm-nél kisebb érték csökkent könnytermelésre utalt.

A betegek kis és nagy nyálmirigy szekréciójának kvantitatív meghatározására szialometriás vizsgálat történt. Az eljárás során szialometriás csőben 5 percig mértük a nyugalmi nyáltermelést. A 0,1 ml/perc alatti értékeket tekintettük csökkentnek.

3.3.2. A szisztémás sclerosisos betegek vizsgálata

A vizsgálatba bevont betegek bőrérzettségének meghatározása a módosított Rodnan-féle bőrpontszám (MRSS) kiszámításával történt. Az eljárás során a beteg bőrének 17 helyen (arc, elülső mellkas, has, felkarok, alkarok, kezek, ujjak, combok, lábszárak, lábak) történő vizsgálata során megítéljük a bőrvastagságot, melyet 0-tól (normális bőr) 3-ig (súlyos bőrvastagodás) pontozunk. Az így nyert értékek összege adja az MRSS értékét [75].

A betegek belső szervi érintettségének kivizsgálására az alábbi diagnosztikai eszközök szolgáltak: mellkas röntgen, nagy felbontású computer tomográfia (HRCT), spirometria/diffúziós kapacitás mérése, Doppler szívultrahang, hasi ultrahang vizsgálat, nyelőcső passzázs radiográfia és rutin laboratóriumi tesztek.

3.3.3. A fotoferezis kezelésben részesülő betegek vizsgálata

A bőrérzettség kiértékelése a terápia megkezdése előtt és minden kezelési ciklust követően a módosított Rodnan-féle bőrpontszámmal, orális apertúra méréssel és a bőr ultrahangos vizsgálatával történt. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy SSc-ben szenvedő betegek felső végtagjának extensor felszínén lévő bőr vastagabb és szignifikánsan különbözik az egészséges bőrtől [73]. Tanulmányunk során az ultrahangos vizsgálatokat a betegek felső végtagjának extensor felszínének 4 különböző

pontján végeztük el (felkar, alkar, kézhát, 3. ujj bázisa), HP SONOS 5500 készüléket (Hewlett Packard, Andover, MA, USA) használva, mely 15-6L (15 MHz) transzducerrel működik. A vizsgálati mélység 10 mm volt, és minden alkalommal 3 ismételt vizsgálat történt, melyeknek az átlagát használtuk fel a kiértékelésekhez.

Az ízületi érintettség változásának követésére megmértük a mozgástartományokat mindkét oldalon a felső (váll, könyök, csukló) és az alsó (csípő, térd, boka) végtagokon.

Az első kezelés előtt és az utolsó kezelés után elvégeztük a betegek belső szervi érintettségének széleskörű kivizsgálását az alábbi diagnosztikai eszközökkel: mellkas röntgen, HRCT, spirometria/diffúziós kapacitás mérése, Doppler szívultrahang, hasi ultrahang vizsgálat, nyelőcső passzázs radiográfia és rutin laboratóriumi tesztek.

3.4. Laboratóriumi vizsgálati módszerek

A laboratóriumi méréseket a multiplex citokin vizsgálat kivételével a DEOEC III. számú Belgyógyászati Klinika Regionális Immunológiai Laboratóriumában végeztük el.

3.4.1. Lymphocyta alcsoportok és aktivált T-sejtek meghatározása

A lymphocyta alcsoportok meghatározásához monoklonális ellenanyagokat használtunk fel az alábbi sejtfelszíni markerek ellen: CD3, CD4, CD8, CD16, CD19 és CD56 (BD Biosciences, San Diego, CA, USA és Immunotech, Marseille, France). A T-sejt aktivációs markereket, úgy mint a HLA-DR és CD69 antigéneket szintén vizsgáltuk a CD3⁺ sejteken (BD Biosciences). A naív és memória T-sejtek meghatározásához a fentiekén kívül az alábbi ellenanyagok szolgáltak: anti-CD45RA-fluoreszcein izotiocianát (FITC)/CD4-fikoeritrin (PE) (Immunotech), anti-CD45RA-FITC/CD8-PE (AbD Serotec, Oxford, UK) és CD62L-fikoeritrin-Cy5 (PC5) (Immunotech). A CD95 (Fas receptor) expressziójának vizsgálatához anti-CD95 antitestet (Immunotech) használtunk. A minták feldolgozása a Coulter Q-PREP protokoll (Beckman Coulter Inc., Miami, FL, USA) alapján történt. A sejtfelszíni markerek jelölését 100 µl

heparinnal alvadásgátolt vérből végeztük, a mintákat a monoklonális antitestek hozzáadását követően 30 percig inkubáltuk, majd a vörösvértesteket hemolizáltuk FACS Lysing Solution (Becton Dickinson, Mountain View, CA) alkalmazásával. A sejteket BSA (10 mg/L) és nátrium azid (2 mg/L) tartalmú PBS-ben mostuk, majd 1%-os paraformaldehiddel fixáltuk. A méréseket és kiértékeléseket a pSS betegek vizsgálata során a Coulter EPICS XL-4 készüléken (Beckman Coulter Inc.), az SSc betegek esetén a Coulter FC500 flow cytometeren (Beckman Coulter Inc.) végeztük el. A lymphocytákat, monocytákat és granulocytákat a méretük és granulációs mintázatuk alapján különítettük el, az előre, illetve oldalra szórt fény intenzitásának meghatározása segítségével. A lymphocyta kapuban 5000 sejtet gyűjtöttünk össze a minták kiértékelése során.

A sejtek típusait az alábbi módon határoztuk meg: T-sejtek (CD3+), Th sejtek (CD3+ CD4+), cytotoxikus T-sejtek (CD3+ CD8+), B-sejtek (CD19+), korai aktivált T-sejtek (CD3+ CD69+), késői aktivált T-sejtek (CD3+ HLA-DR+), NK (CD3- CD16+ CD56+) és NKT sejtek (CD3+ CD16+ CD56+). A vizsgált sejtek arányát a teljes lymphocyta populációban adtuk meg.

A naív és memória T-sejt altípusok értékei a CD4+ és CD8+ sejtpopulációkon belül lettek meghatározva, az alábbiak szerint: naív helper T (CD4+ CD45RA+ CD62L+), centrális memória helper T (CD4+ CD45RA- CD62L+), effektor memória helper T (CD4+ CD45RA- CD62L-), naív cytotoxikus T (CD8+ CD45RA+ CD62L+), centrális memória cytotoxikus T (CD8+ CD45RA- CD62L+), effektor memória cytotoxikus T (CD8+ CD45RA- CD62L-) és terminálisan differenciálódott effektor memória cytotoxikus T-sejtek (CD8+ CD45RA+ CD62L-).

3.4.2. CD4+ T-sejtek alcsoportjainak meghatározása

A CD4+ T-sejtek intracelluláris festéséhez az alábbi monoklonális antitesteket használtuk: FITC-konjugált IFN-gamma, PE-konjugált anti-interleukin IL-4, PE-konjugált anti-IL-10 (BD Biosciences), továbbá PE-konjugált anti-IL-17 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). A meghatározás során 1 ml perifériás, heparinnal alvadásgátolt vért hígítottunk 1:2 arányban 80 mg/l gentamycint és 2 nM glutamint tartalmazó RPMI-1640-ben. A sejtek stimulálásához 25 ng/ml phorbol-myristát-

acetátot (Sigma Aldrich Corp, St. Louis, MO, USA), és 1 µg/ml ionomycint (Sigma Aldrich Corp) használtunk 4 órán keresztül, 37°C-on és 5% CO₂ mellett. A de novo szintetizált citokinek transzportját a Golgi apparátusból 10 µg/ml brefeldin-A-val gátoltuk meg (Sigma Aldrich Corp). A nem stimulált sejtek kontrollként szolgáltak. A stimuláció után a sejteket sejtfelszíni anti-CD4 antitesttel (BD Biosciences) jelöltük, és szobahőmérsékleten sötétben 30 percen keresztül inkubáltuk. Ezt követően hemolizáltuk a vörösvértesteket FACS Lysing Solution (Becton Dickinson) felhasználásával. A leukocytákat ezt követően centrifugáltuk (500 g, 10 perc) és sejtmembránjukat permeabilizáltuk FACS Permeabilizing Solution (BD Biosciences) segítségével. A mintákat PBS-ben átmostuk, és a Golgi apparátusban lévő citokineket a fluorokrómmal konjugáltatott monoklonális antitestekkel megjelöltük, a mintákat 30 percen át sötétben szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd a sejteket 1%-os paraformaldehidben fixáltuk. Az intracelluláris festődés alapján az alábbi sejteket különböztettük meg: Th1: CD4⁺ IFN-gamma⁺ IL4⁻; Th2: CD4⁺ IFN-gamma⁻ IL4⁺; Tr1: CD4⁺ IL10⁺; Th17: CD4⁺ IL17⁺.

A CD4⁺ CD25⁺ Treg sejttípus meghatározásához az alábbi reagenseket használtuk fel: Ficoll (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA), anti-CD4-FITC (Sigma Aldrich), anti-CD25-PC5 (Immunotech), anti-FoxP3-PE, clone: PCH101 (eBioscience, San Diego, CA, USA). A jelöléshez heparinnal alvadásgátolt vérből, Ficoll gradiens módszerrel izolált perifériás mononukleáris sejteket (PBMCs) használtunk. A PBMC-keket a az intracelluláris festéshez használt kit (eBioscience) A-oldatában felszuszpenzáltuk, majd egy éjszakán keresztül -20 °C-on inkubáltuk. Másnap a sejteket felolvasztás után felszuszpenzáltuk a B-oldatba, s 20 percig sötétben inkubáltuk 4 °C-os hőmérsékleten. Ezt követően a mintákat a jelölő pufferrel kétszer mostuk, majd felszuszpendálást követően hozzáadtuk a blocking puffert, és 15 percig sötétben szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezt követően a sejtfelszíni (CD4, CD25) és intracelluláris [forkhead box P3 (FoxP3)] markerek elleni antitesteket történő jelölés egyidejűleg történt. A CD4⁺ CD25⁺ Treg sejtek meghatározásának feltételeként a CD4⁺, FoxP3⁺ és CD25^{high} festődés szerepelt.

A mintákat a pSS betegek esetében a Coulter EPICS XL-4 készüléken, míg az SSc betegeknél Coulter FC500 flow cytometeren (Beckman Coulter Inc.) mértük le. A lymphocytákat, granulocytákat és monocytákat a morfológiai tulajdonságuk alapján

kapuztuk ki, s különítettük el. A kiértékelés 5000 CD4⁺ sejt begyűjtésével történt. A sejtek százalékos arányát a CD4⁺ lymphocyta populációban határoztuk meg.

3.4.3. CD4⁺ CD25⁺ Treg sejtek in vitro funkcionális vizsgálata

A CD4⁺ CD25⁺ T-sejteket perifériás, heparinnal alvadásgátolt vérből Ficoll gradiens módszerrel szeparált PBMCs-ből izoláltuk Miltenyi Regulatory T Cell Isolation Kit, illetve LD és MS oszlopok (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany) felhasználásával, a gyártó által leírt protokollnak megfelelően. A mágneses mikrogöngyök segítségével izolált 1×10^5 CD4⁺ CD25⁺ és CD4⁺ CD25⁻ T-sejteket 200 µl RPMI 1640-ben szeparáltan, illetve 1:1 arányú kevert kultúrában tenyésztettük 72 órán keresztül. A poliklonális stimuláció szimulálására anti-CD3/CD28 T-sejt expander mikrogöngyöket (Dyna, Oslo, Norway) alkalmaztunk 1 göngy/sejt koncentrációban. A sejtproliferációt tetrazolium-alapú teszttel vizsgáltuk (EZ4U Proliferation Kit, BioMedica Inc, San Diego, CA, USA). Az optikai denzitás (OD) értékeket 450 nm-es hullámhosszon Labsystems Multiskan MS készülékkel (MTX Lab Systems Inc., Vienna, VA, USA) mértük le. A kevert kultúrák OD értékeit korrigáltuk a tiszta CD4⁺ CD25⁺ T tenyészetek OD értékeivel. A szuppresszor aktivitást a CD4⁺ CD25⁻ T-sejt kultúrák és a kevert kultúrák korrigált OD értékeinek hányadosa alapján számoltuk.

3.4.4. Szérum citokinek meghatározása

A szérum IL-4, IL-6, IL-10, TNF-alfa, IFN-gamma és TGF-béta szinteket a megfelelő OptEIA ELISA kit-ek (BD Biosciences) felhasználásával szendvics ELISA technikával határoztuk meg, a gyártó által leírt instrukcióknak megfelelően. A mérések Labsystems Multiskan MS készüléken (MTX Lab Systems Inc.) történtek 450/570 nm-es hullámhosszon, a kiértékelést a Genesis v3.04 szoftver (Life Sciences Ltd, Nottingham, UK) segítségével végeztük.

A szérum citokinek széles spektrumának (TNF-alfa, IFN-gamma, IL-1-alpha, IL-1-beta, IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-17, CCL2, FGF, VEGF, EGF és HGF) meghatározása multiplex citokin assay-vel, ún. Fluorokine Multianalyte

Profiling Kit-ek (R&D Systems) felhasználásával történt. A minták feldolgozását a gyártó által megadott protokollnak megfelelően végeztük el, a mérések kivitelezése és kiértékelése Luminex 200 (Luminex, Austin, TX, USA) analizátor, illetve Applied Cytometry System STarStation 3.0 szoftver (Applied Cytometry, Dinnington, UK) felhasználásával történt a Semmelweis Egyetem Klinikai Kísérleti Kutató- és Humán Élettani Intézetében.

3.4.5. A szérum komplement és autoantitest szintek meghatározása

A C3 és C4 szérum komplement méréseket BN II Nephelometeren (Siemens AG, München, Germany) végeztük el anti-C3 és anti-C4 antitestek (Dialab GmbH, Neudorf, Austria) és a megfelelő kontrollok és kalibrátorok (Siemens AG) felhasználásával.

Az autoantitestek vizsgálatát HEp2 sejteken végeztük IFA-ANA-HEp2-IgG immunfluoreszcenciás kit (Viro-Immun Labor-Diagnostika GmbH, Oberursel, Germany) felhasználásával, a gyártó által megadott instrukcióknak megfelelően. A mintázatok azonosítására Eurostar II Plus fluoreszcens mikroszkópot (EUROIMMUN AG, Lübeck, Germany) használtunk. A HEp2 sejtes vizsgálat mellett az extrahálható nukleáris antigén (ENA) elleni antitestek ELISA szűrőtesztje is megtörtént, melynek pozitivitása esetén elvégeztük az Sm, Sm/RNP, SS-A, SS-B, Scl-70 és Jo-1 elleni antitestek egyedi meghatározását is ELISA módszerrel a megfelelő AUTOSTAT II kit (Hycor Biomedical, Indianapolis, IN, USA) alkalmazásával, a gyártó által megadott protokollnak megfelelően. A mérésekhez és az adatok kiértékeléséhez ETI-MAX 300 készüléket (Diasorin, Saluggia, Italy) használtunk.

3.5. Statisztikai módszerek

A statisztikai adatfeldolgozás során SPSS v.12.0 szoftvert (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) alkalmaztunk. Az adataink normál eloszlásának vizsgálatát Kolgomorov-Smirnov teszttel végeztük el. Normál eloszlás esetén meghatároztuk az átlag $\pm$ szórás (SD) értékeket, és a kísérleti adataink statisztikai kiértékeléséhez kétmintás t-próbát végeztünk. Nem-normál eloszlás esetén medián, valamint minimum és maximum

értékeket kalkuláltunk, és Mann-Whitney próbát alkalmaztunk. Ismételt mérések variancia-analízis (ANOVA) tesztet végeztünk a paraméterek időbeli változásának vizsgálatához. A korrelációs számítások során normál eloszlás esetén a Pearson-féle, nem-normál eloszlás esetén a Spearman-féle korrelációs koefficienszt határoztuk meg. A statisztikai próbák értékelésénél a $p < 0,05$ értéket tekintettük szignifikánsnak.

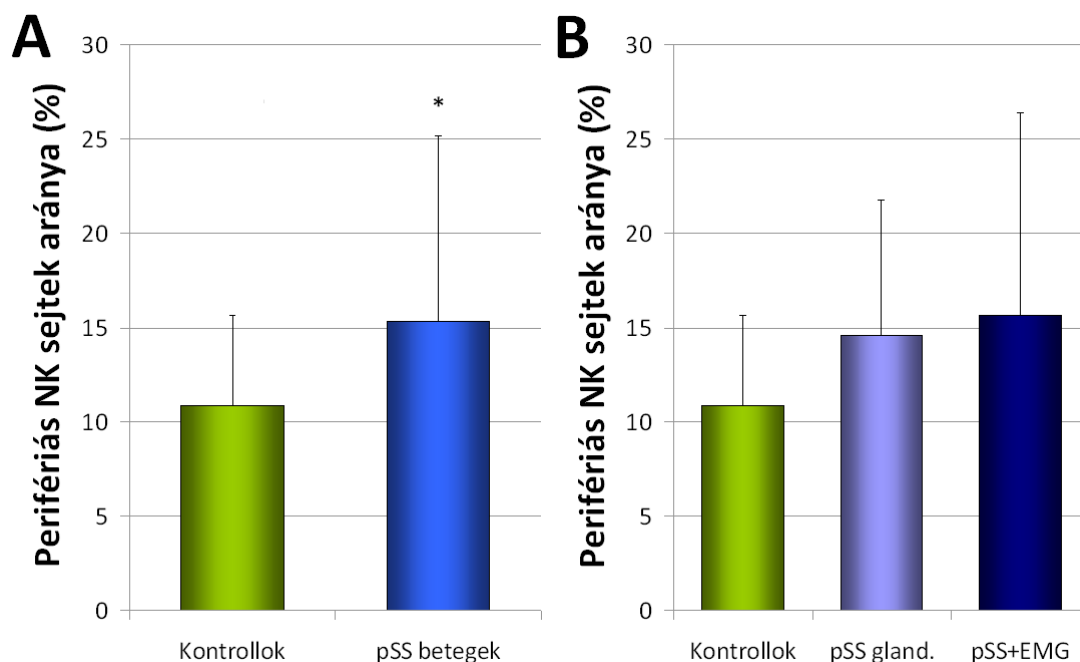
4. EREDMÉNYEK

4.1. A Sjögren-szindróma vizsgálatának eredményei

A betegek és a kontroll személyek immunstátuszának felmérésére meghatároztuk a perifériás vérükben az NK, NKT, Tr1 és CD4⁺ CD25⁺ T reg sejtek százalékos arányát. A CD4⁺ CD25⁺ Treg sejtek szuppresszor aktivitásának vizsgálatához in vitro funkcionális vizsgálatot végeztünk. Az eredményeink kiértékelése során figyelembe vettük az extraglanduláris tünetek hiányát, illetve meglétét a primer Sjögren-szindrómás betegek körében, s az ez alapján megkülönböztetett két betegcsoport sejtes adatainak összevetését is elvégeztük. Továbbá megmértük a szérumban az IL-4, IL-6, IL-10, TNF-alfa és IFN-gamma szinteket, s a sejtes és humorális immunparaméterek meghatározása során észlelt eltéréseket összevetettük a betegek mirigyszekréciós vizsgálati eredményeivel.

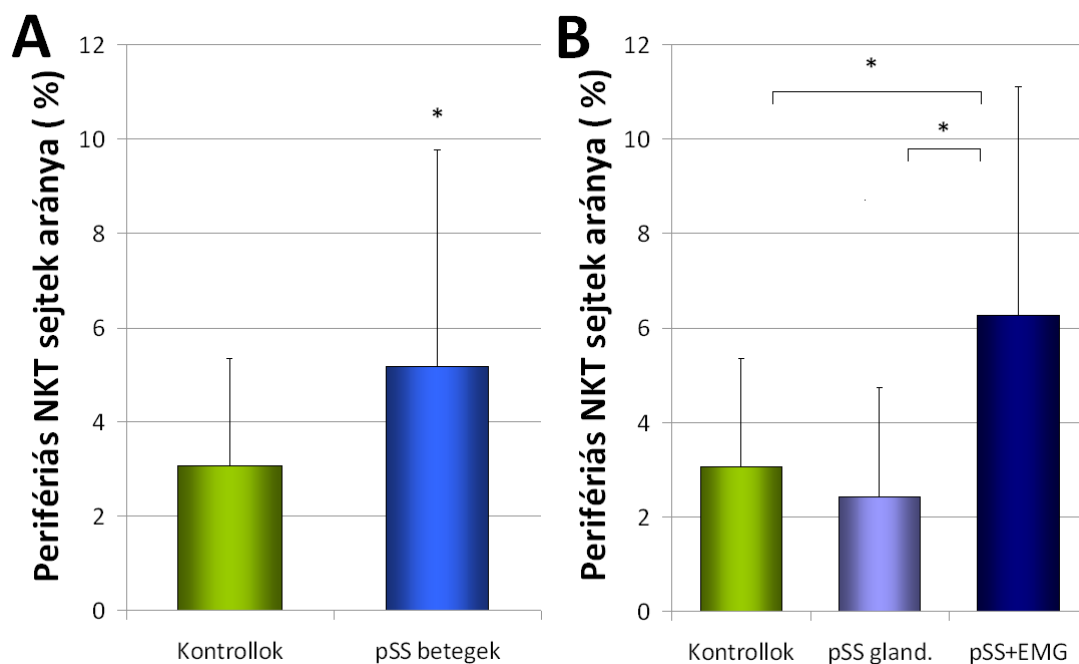
4.1.1 Perifériás NK és NKT sejtek

A perifériás NK sejtek százalékos arányát primer Sjögren-szindrómában szenvedő betegeknél az egészséges kontrollhoz viszonyítva szignifikánsan magasabbnak mértük ($15,31 \pm 9,81$ % vs. $10,87 \pm 4,74$ %, $p = 0,034$) (6A. Ábra). A szisztémás tünetek jelenléte, illetve hiánya alapján elkülönített két betegcsoportban közel azonos NK értékek igazolódtak, és bár a kontroll értékekhez képest magasabbak voltak, a különbségek nem érték el a statisztikailag szignifikáns szintet (6B. Ábra).



6. Ábra. NK sejtek százalékos értékei az egészséges személyek (n = 20), pSS betegek (n = 32), illetve glanduláris (n = 9) és extraglanduláris tüneteket mutató pSS betegek (n = 23) perifériás vérében. Az ábrákon az átlagértékeket és a szórásokat (SD) tüntettük fel. A szignifikáns különbségeket (*)-gal jelöltük.

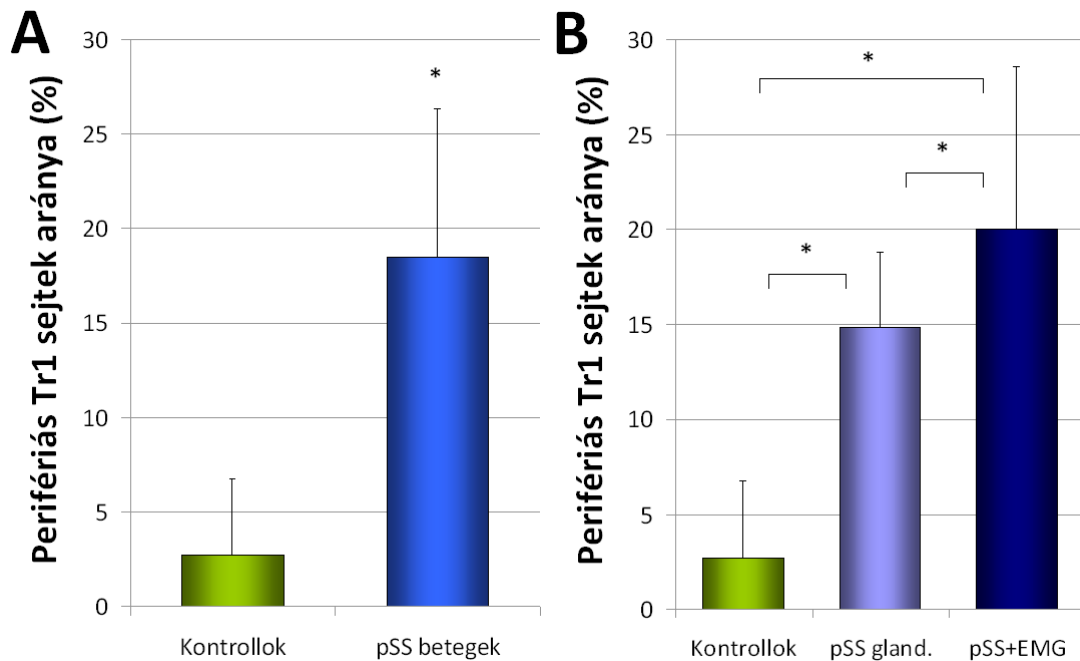
A perifériás NKT sejtek értékeit az NK sejtekéhez hasonlóan szignifikánsan emelkedettnek találtuk a betegekben a kontroll adatokhoz viszonyítva ($5,18 \pm 4,60$ % vs. $3,07 \pm 2,28$ %, $p = 0,033$) (7A. Ábra). Az EGM-t mutató betegek vérében az NKT sejtek aránya szignifikánsan magasabbnak adódott a csak glanduláris tünetektől szenvedő betegekben ($6,26 \pm 4,85$ % vs. $2,41 \pm 2,30$ %, $p = 0,003$), és a kontroll egyénekben mért értékekhez képest ($6,26 \pm 4,85$ % vs. $3,07 \pm 2,28$ %, $p = 0,005$). A glanduláris pSS betegek és az egészséges személyek adatai hasonlóan adódtak (7B. Ábra).



7. Ábra. Perifériás NKT sejtek százalékos értékei az egészséges személyek (n = 20), pSS betegek (n = 32), illetve glanduláris (n = 9) és extraglanduláris tüneteket mutató pSS betegek (n = 23) vérében. Az ábrákon az átlagértékeket és a szórásokat (SD) tüntettük fel. A szignifikáns különbségeket (*)-gal jelöltük.

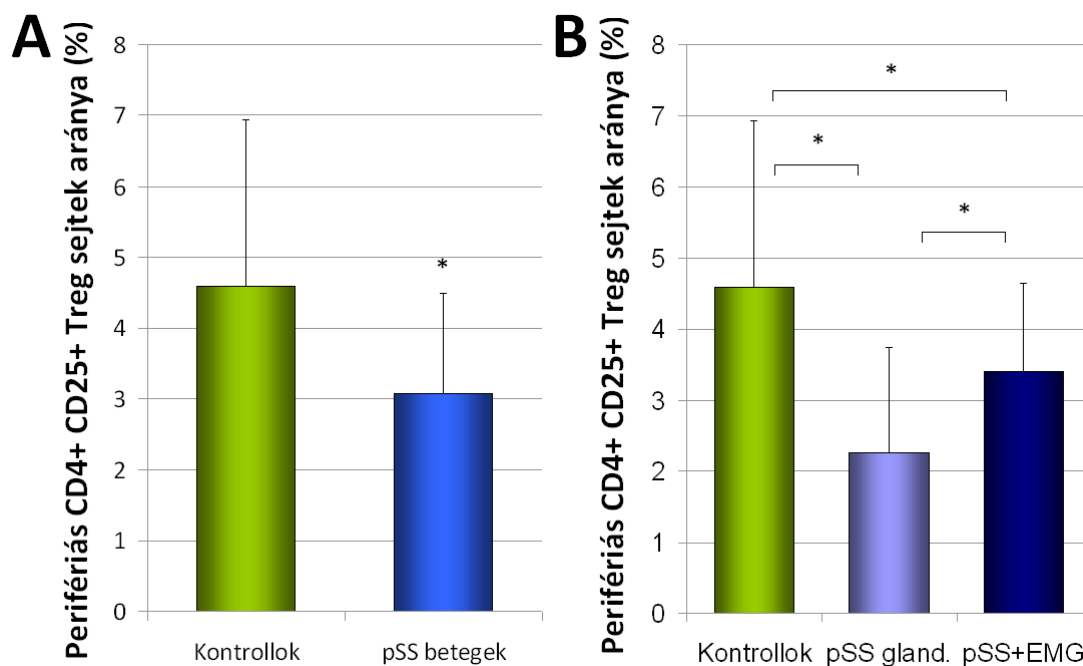
4.1.2. Perifériás regulatív T-sejtek

A perifériás Tr1 sejtek arányát jelentősen emelkedettnek mértük a betegekben az egészségesek adataihoz viszonyítva ($18,51 \pm 7,83$ % vs. $2,73 \pm 4,06$ %, $p < 0,001$) (8A. Ábra). A betegek két alcsoportjának összehasonlítása során azt tapasztaltuk, hogy az EGM-et mutató betegek Tr1 sejtjeinek aránya szignifikánsan magasabb volt a csupán glanduláris tüneteket mutató betegek értékeihez képest ($20,02 \pm 8,57$ % vs. $14,81 \pm 3,96$ %, $p = 0,028$). A kontroll értékekhez történő viszonyítás során a betegek mindkét alcsoportjában szignifikánsan emelkedett Tr1 arányok igazolódtak (glandularis pSS vs. kontroll: $14,81 \pm 3,96$ % vs. $2,73 \pm 4,06$ %, $p < 0,001$; pSS + EGM vs. kontroll: $20,02 \pm 8,57$ % vs. $2,73 \pm 4,06$ %, $p < 0,001$) (8B. Ábra).



8. Ábra. Tr1 sejtek százalékos értékei az egészséges személyek (n = 20), pSS betegek (n = 32), illetve glanduláris (n = 9) és extraglanduláris tüneteket mutató pSS betegek (n = 23) perifériás vérében. Az ábrákon az átlagértékeket és a szórásokat (SD) tüntettük fel, a szignifikáns különbségeket (*) jelöli.

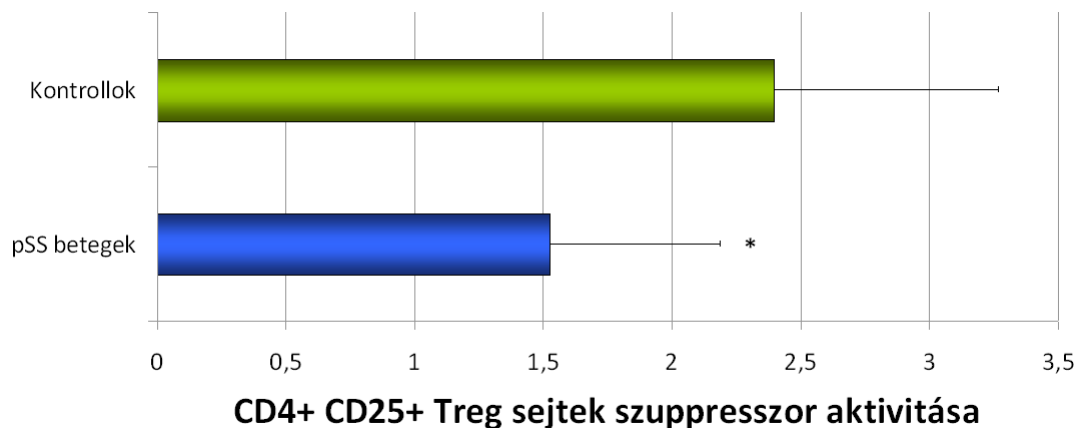
A CD4⁺ CD25⁺ Treg sejtek százalékos arányát szignifikánsan alacsonyabbnak mértük a pSS betegek perifériás vérében az egészséges kontrollokéhoz viszonyítva ($3,07 \pm 1,41$ % vs. $4,59 \pm 2,34$ %, $p = 0,005$) (9A. Ábra). A szisztémás tüneteket mutató pSS betegek értékei szignifikánsan magasabbak voltak a csak glanduláris eltéréseket mutató betegekéhez képest ($3,39 \pm 1,26$ % vs. $2,25 \pm 1,51$ %, $p = 0,038$), azonban a szignifikáns különbség továbbra is megmaradt a betegek két alcsoportja és az egészséges kontroll személyek adatai között (glandularis pSS vs. kontroll: $2,25 \pm 1,51$ % vs. $4,59 \pm 2,34$ %, $p = 0,003$; pSS + EGM vs. kontroll: $3,39 \pm 1,26$ % vs. $4,59 \pm 2,34$ %, $p = 0,038$) (9B. Ábra).



9. Ábra. Perifériás CD4+ CD25+ Treg sejtek százalékos értékei az egészséges személyek (n = 20), pSS betegek (n = 32), illetve glanduláris (n = 9) és extraglanduláris tüneteket mutató pSS betegek (n = 23) vérében. Az ábrákon az átlagértékeket és a szórásokat (SD) tüntettük fel. A szignifikáns különbségeket (*)-gal jelöltük.

4.1.3. A CD4+ CD25+ Treg sejtek in vitro funkcionális vizsgálata

Az in vitro funkcionális teszthez véletlenszerűen kiválasztottunk 14 beteget, melyek közül heten csak glanduláris, míg heten extraglanduláris tüneteket is mutattak. Az egészséges személyek közül szintén heten vettek részt a vizsgálatban. Adataink alapján a pSS betegek perifériás CD4+ CD25+ Treg sejtjei lényegesen csökkent szuppresszor aktivitást mutattak a kontroll eredményekhez képest ($1,526 \pm 0,66$ vs. $2,395 \pm 0,87$, $p = 0,019$) (10. Ábra). A betegek két alcsoportjának értékei között nem találtunk különbséget.



10. Ábra. A perifériás CD4+ CD25+ Treg sejtek in vitro szuppresszor aktivitása egészséges személyek (n = 7) és pSS betegek (n = 14) esetében. Az ábrán az átlagértékeket és a szórásokat (SD) tüntettük fel, a szignifikáns különbséget (*) jelöli.

4.1.4. Szolubilis citokinek

Vizsgálataink során szignifikánsan magasabb IL-6 és TNF-alfa, míg szignifikánsan csökkent IL-10 szinteket mértünk a pSS betegek szérumában a kontroll személyek értékeihez képest. A szérum citokinek betegekben és egészségesekben mért koncentrációit, s azok összehasonlítását a III. Táblázat szemlélteti.

Szolubilis citokin	pSS betegek	Kontrollok	Szignifikancia
IL-4	1,44 (0-38,06) pg/ml	0,95 (0,1-47,38) pg/ml	n.s.
IL-6	0,8 (0,8-32,5) pg/ml	0,8 (0,8-2,2) pg/ml	p = 0,001
IL-10	0,79 (0-72,86) pg/ml	5,14 (0,1-31,91) pg/ml	p = 0,017
TNF-alfa	0,8 (0,1-16,5) pg/ml	0,4 (0,1-1,2) pg/ml	p = 0,001
IFN-gamma	14,6 (0-272,88) pg/ml	10,47 (0,1-57,6) pg/ml	n.s.

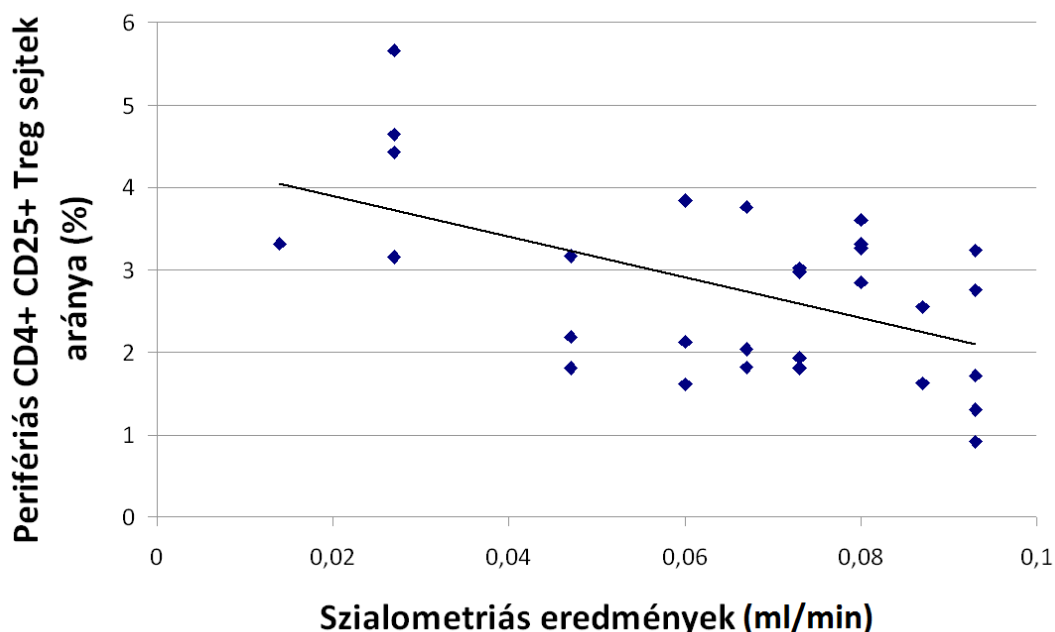
III. Táblázat. Szolubilis citokinek medián és szélső értékei. (n.s.: nem szignifikáns)

4.1.5. Regulatív sejtek és szolubilis citokinek közötti kapcsolat vizsgálata

Eredményeink statisztikai feldolgozása során negatív korrelációt tapasztaltunk a betegek szérum IL-10 szintjei és perifériás Tr1 sejteinek százalékos arányai között ($R = -0,369$, $p = 0,019$).

4.1.6. A perifériás immunparaméterek és a siccás tünetek vizsgálati eredményeinek kapcsolata

A betegek siccás tüneteinek klinikai vizsgálata során elvégzett szialometria és Schirmer-teszt eredményei és a tanulmányunk során mért immunparaméterek statisztikai kiértékelése során negatív korrelációt tapasztaltunk a perifériás CD4+ CD25+ Treg sejtek százalékos arányai és a betegek szialometriás eredményei között ($R = -0,538$, $p = 0,003$) (11. Ábra).



11. Ábra. Negatív korreláció a pSS betegek ($n = 32$) perifériás CD4+ CD25+ Treg sejteinek százalékos értékei és a szialometriás vizsgálatok eredményei között ($p = 0,003$).

A Schirmer-teszt során nyert eredmények feldolgozása során nem tapasztaltunk szignifikáns összefüggést a vizsgált immunparaméterek között.

4.1.7. Az autoantitest pozitivitás és a vizsgált immunparaméterek közötti összefüggések

A vizsgálatba bevont pSS betegek közül 19 beteg volt SS-A pozitív, míg 9 esetben SS-A – SS-B kettős autoantitest pozitivitás igazolódott. A statisztikai feldolgozás során nem találtunk összefüggést az autoantitestek jelenléte és a tanulmányunk során megfigyelt immunológiai eltérések között.

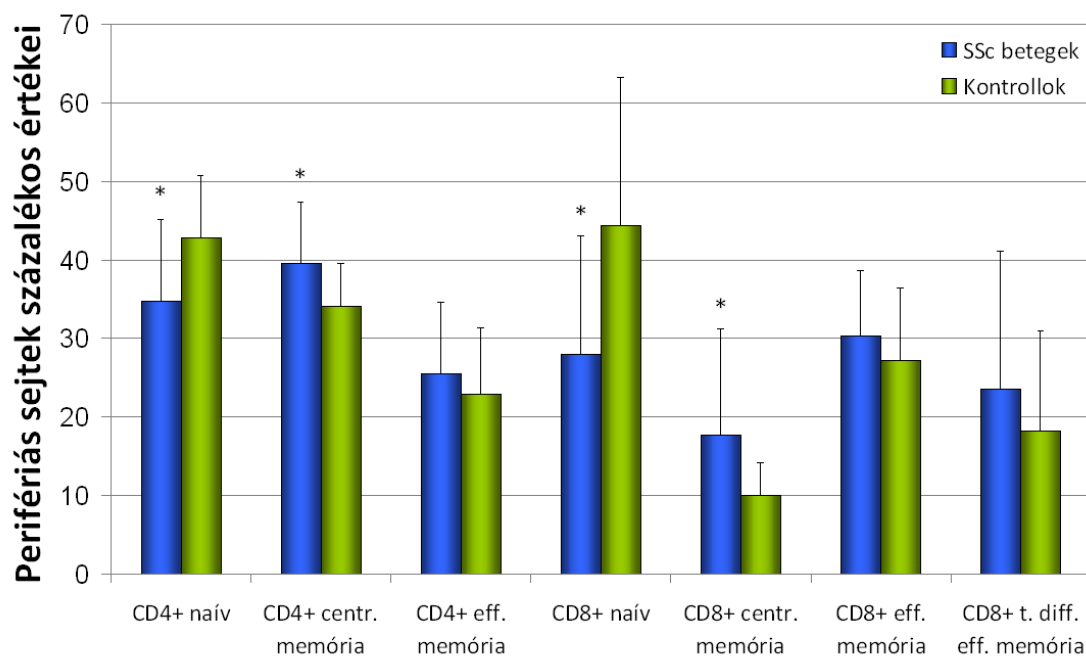
4.2. A szisztémás sclerosis vizsgálatának eredményei

A kutatásaink során az aktivált, illetve a naív és memória T-sejt alpopulációk, továbbá egyéb immunkompetens sejtek arányát (B, NK, NKT, Th1, Th2, Th17, Tr1, CD4+ CD25+ Treg) határoztuk meg az SSc betegek és egészséges kontrollok perifériás vérében. In vitro funkcionális teszttel megvizsgáltuk a betegek és egészségesek CD4+ CD25+ Treg sejtjeinek szuppresszor aktivitását. Megmértük a szérumban az IL-4, IL-10 és IFN-gamma, illetve a komplement szinteket, és összefüggéseket kerestünk a vizsgált laboratóriumi paraméterek és a betegek klinikai állapotának súlyossága között.

4.2.1. Perifériás B-sejtek és T-sejt altípusok

Nem találtunk szignifikáns különbséget az SSc betegek és egészséges kontroll személyek perifériás B, T, illetve a CD4+ és CD8+ T-sejtjeinek százalékos arányában. Az aktivált T-sejtpopulációk vizsgálata során míg a korai aktivált (CD3+ CD69+) T-sejtek nem mutattak érdemi különbséget, addig a késői aktivált (CD3+ HLA-DR+) T-sejtek szignifikánsan magasabb százalékos arányt mutattak az SSc betegek perifériás vérében az egészséges kontroll személyek értékeihez képest ($3,58 \pm 1,83$ % vs. $2,01 \pm 1,57$ %, $p = 0.012$).

A naív és memória sejtek vizsgálata során a betegekben szignifikánsan csökkent CD4+ naív T (CD4+ CD45RA+ CD62L+) sejtarányokat mértünk ($34,74 \pm 10,39$ % vs. $42,76 \pm 8,09$ %, $p = 0,038$), míg a CD4+ centrális memória T (CD4+ CD45RA- CD62L+) sejtek szignifikánsan emelkedettek voltak a kontrollok adataihoz viszonyítva ($39,59 \pm 7,77$ % vs. $34,16 \pm 5,43$ %, $p = 0,039$). A CD4+ effektor memória T (CD4+ CD45RA- CD62L-) sejtek értékei nem mutattak számottevő eltérést. A CD4+ naív és memória sejtpopulációkhoz hasonlóan, a kontroll adatokhoz képest a betegekben szignifikánsan csökkent CD8+ naív T (CD8+ CD45RA+ CD62L+) sejtarányt ($28,03 \pm 15,13$ % vs. $44,37 \pm 18,93$ %, $p = 0,027$), és emelkedett CD8+ centrális memória T (CD8+ CD45RA- CD62L+) sejtarányt tapasztaltunk ($17,75 \pm 13,51$ % vs. $10,05 \pm 4,22$ %, $p = 0,035$). A CD8+ effektor memória T (CD8+ CD45RA- CD62L-) és a CD8+ terminálisan differenciálódott T (CD8+CD45RA+CD62L-) sejtek százalékos arányai hasonlóknak adódtak a beteg és egészséges populációkban. A 12. Ábra szemlélteti a perifériás naív és memória T-sejt alcsoportok betegekben és kontroll személyekben mért százalékos arányait.

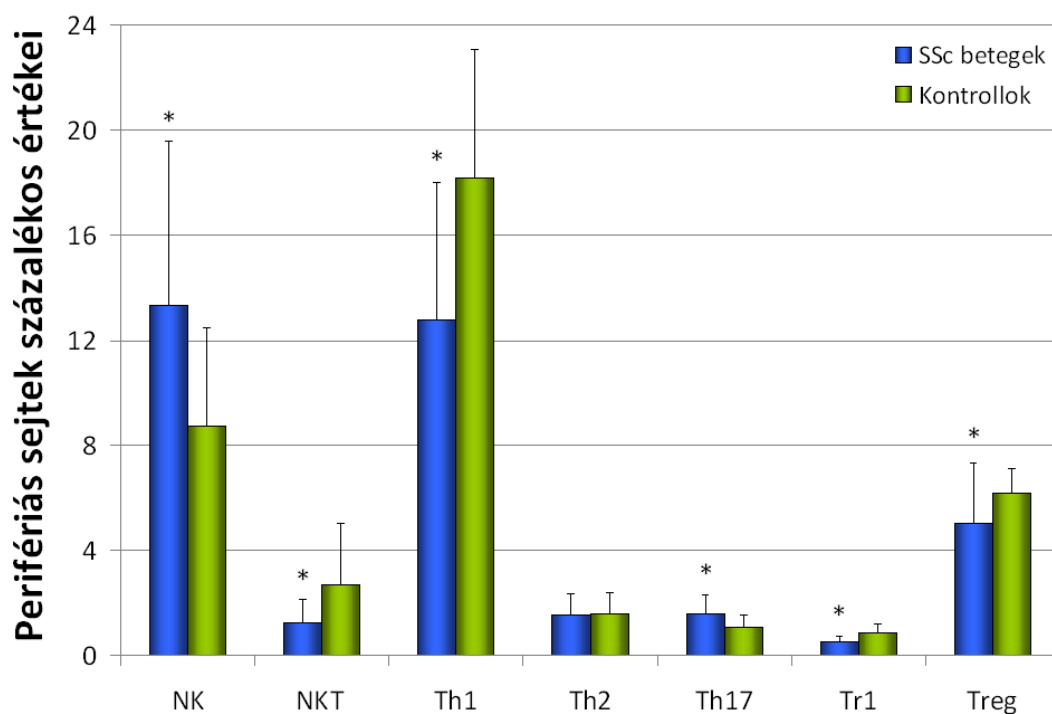


12. Ábra. Naív és memória T-sejtek százalékos értékei az SSc betegek (n = 21) és egészséges kontroll személyek (n = 15) perifériás vérében. Az arányok az egyes

sejttípusok gyakoriságát tükrözik a CD4⁺, illetve CD8⁺ T-lymphocyta populációban. Az ábrán az átlagértékeket és a szórásokat (SD) tüntettük fel. A szignifikáns különbségeket (*)-gal jelöltük.

4.2.2. Perifériás NK és NKT sejtek

A perifériás NK sejtek százalékos arányát SSc-ben szenvedő betegeknél az egészséges egyénekéhez viszonyítva szignifikánsan magasabbnak mértük ($13,33 \pm 6,25$ % vs. $8,74 \pm 3,74$ %, $p = 0,014$). Az NK sejtekkel szemben, az NKT sejtek százalékos aránya szignifikánsan alacsonyabbnak adódott a betegeknél a kontroll személyekhez képest ($1,25 \pm 0,91$ % vs. $2,67 \pm 2,34$ %, $p = 0,021$) (13. Ábra).



13. Ábra. Immunkompetens sejtek százalékos arányai az SSc betegeknél ($n = 21$) és egészséges kontroll személyek ($n = 15$) perifériás vérében. Az NK és NKT sejtek arányait a teljes lymphocyta populációban, míg az egyes T-sejt altípusok értékeit a CD4⁺ lymphocyta populációban adtuk meg. Az ábrán az átlagértékeket és a szórásokat (SD) tüntettük fel, a szignifikáns különbségeket (*) jelöli.

4.2.3. Perifériás helper T-sejtek

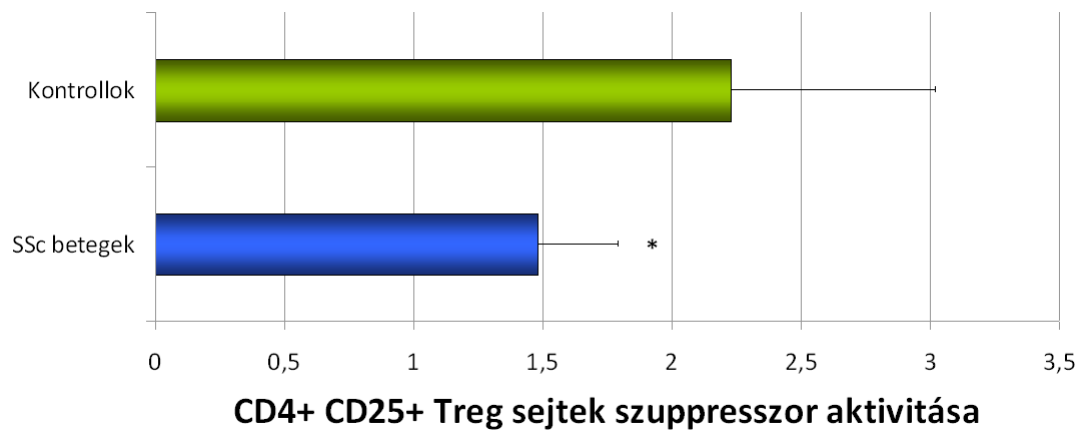
Az SSc betegekben a kontrollhoz képest szignifikánsan alacsonyabbnak találtuk a Th1 sejtek százalékos arányát ($12,78 \pm 5,21$ % vs. $18,19 \pm 4,87$ %, $p = 0,004$). A Th2 sejtek esetében nem tapasztaltunk eltérést a betegek és egészségesek értékei között. A Th17 sejtek esetében a betegek perifériás vérében szignifikánsan magasabb százalékos arányt mértünk a kontroll értékekhez viszonyítva ($1,58 \pm 0,71$ % vs. $1,05 \pm 0,49$ %, $p = 0,028$) (13. Ábra).

4.2.4. Perifériás regulatív T-sejtek

A perifériás Tr1 sejtek százalékos értékét jelentősen alacsonyabbnak mértük az SSc betegek vérében, mint az egészségesekben ($0,54 \pm 0,19$ % vs. $0,87 \pm 0,31$ %, $p = 0,002$). A CD4⁺ CD25⁺ Treg sejtek százalékos aránya a Tr1 sejtekéhez hasonlóan alacsonyabbnak adódott a betegek perifériás vérében ($5,03 \pm 2,29$ % vs. $6,21 \pm 0,91$ %, $p = 0,031$) (13. Ábra). Mindezen eltérésekből adódóan, amikor kiszámítottuk a Th17/CD4⁺ CD25⁺ Treg sejtek egymáshoz viszonyított arányát, az SSc betegek esetében szignifikánsan magasabb értékeket kaptunk az egészséges személyek hasonló módon kiszámított értékeihez viszonyítva ($0,39 \pm 0,28$ vs. $0,23 \pm 0,14$, $p = 0,042$).

4.2.5. A CD4⁺ CD25⁺ Treg sejtek in vitro funkcionális vizsgálata

A tanulmányba bevont minden egyes beteg és kontroll személy esetén elvégeztük a CD4⁺ CD25⁺ Treg szuppresszor funkciójának in vitro vizsgálatát. Eredményeink alapján az SSc betegek perifériás CD4⁺ CD25⁺ Treg sejtjeit szignifikánsan csökkent szuppresszor aktivitás jellemezte az egészséges kontrollokéhoz viszonyítva ($1,48 \pm 0,31$ vs. $2,23 \pm 0,79$, $p = 0,015$) (14. Ábra).



14. Ábra. A perifériás CD4+ CD25+ Treg sejtek in vitro szuppresszor aktivitása egészséges személyek (n = 15) és SSc betegek (n = 21) esetében. Az ábrán az átlagértékeket és a szórásokat (SD) tüntettük fel, a szignifikáns különbséget (*) jelöli.

4.2.6. Szolubilis citokinek

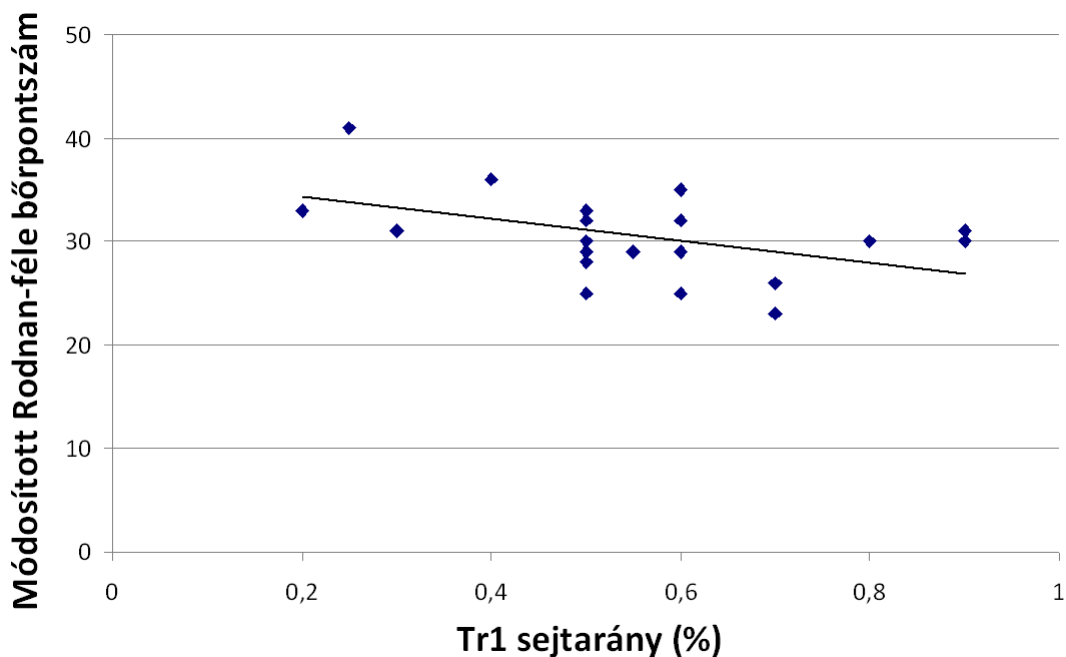
Vizsgálataink során szignifikánsan alacsonyabb IL-10 szinteket mértünk a betegek szérumában, a kontroll egyének eredményeihez viszonyítva ($2,71 \pm 2,13$ pg/ml vs. $7,19 \pm 4,16$ pg/ml, $p < 0,001$). Az IL-4 és IFN-gamma szérumszintek nem mutattak eltérést a betegek és egészségesek adatainak összehasonlítása során (IL4: $0,97 \pm 0,13$ pg/ml vs. $1,02 \pm 0,28$ pg/ml; IFN-gamma: $7,59 \pm 6,18$ pg/ml vs. $7,33 \pm 5,04$ pg/ml).

4.2.7. A belső szervi érintettség, a bőrérzettség súlyossága és a vizsgált immunparaméterek közötti összefüggések

Az SSc betegeket a klinikai vizsgálati eredményeik alapján két alcsoportba osztottuk. Tizenkét betegnél mutattunk ki belső szervi érintettséget, melynek eloszlása a következőképpen alakult: PAH n = 4, tüdőfibrózis n = 8, nyelőcső motilitási zavar n = 7, savóshártya gyulladás n = 1. A betegek közül kilencen csak bőrtünetektől szenvedtek. A statisztikai feldolgozás során azt tapasztaltuk, hogy a belső szervi érintettséget mutató betegek perifériás vérében szignifikánsan magasabb az NK sejtek százalékos aránya a csupán bőrtünetektől szenvedők ($15,41 \pm 6,27$ % vs. $9,21 \pm 4,21$ %, $p = 0,014$), illetve az egészséges kontroll személyek adataihoz képest ($15,41 \pm 6,27$ % vs. $8,74 \pm 3,74$ %, p

= 0,005). A perifériás NK sejtek százalékos értékei hasonlóknak adódtak a csak bőrérzettségűl szenvedő betegek és az egészséges egyének összehasonlítása során.

Negatív korrelációt tapasztaltunk a betegek módosított Rodnan-féle bőrpontszám értékei és a perifériás Tr1 sejtek százalékos arányai között ($R = -0.485$, $p = 0,026$) (15. Ábra).

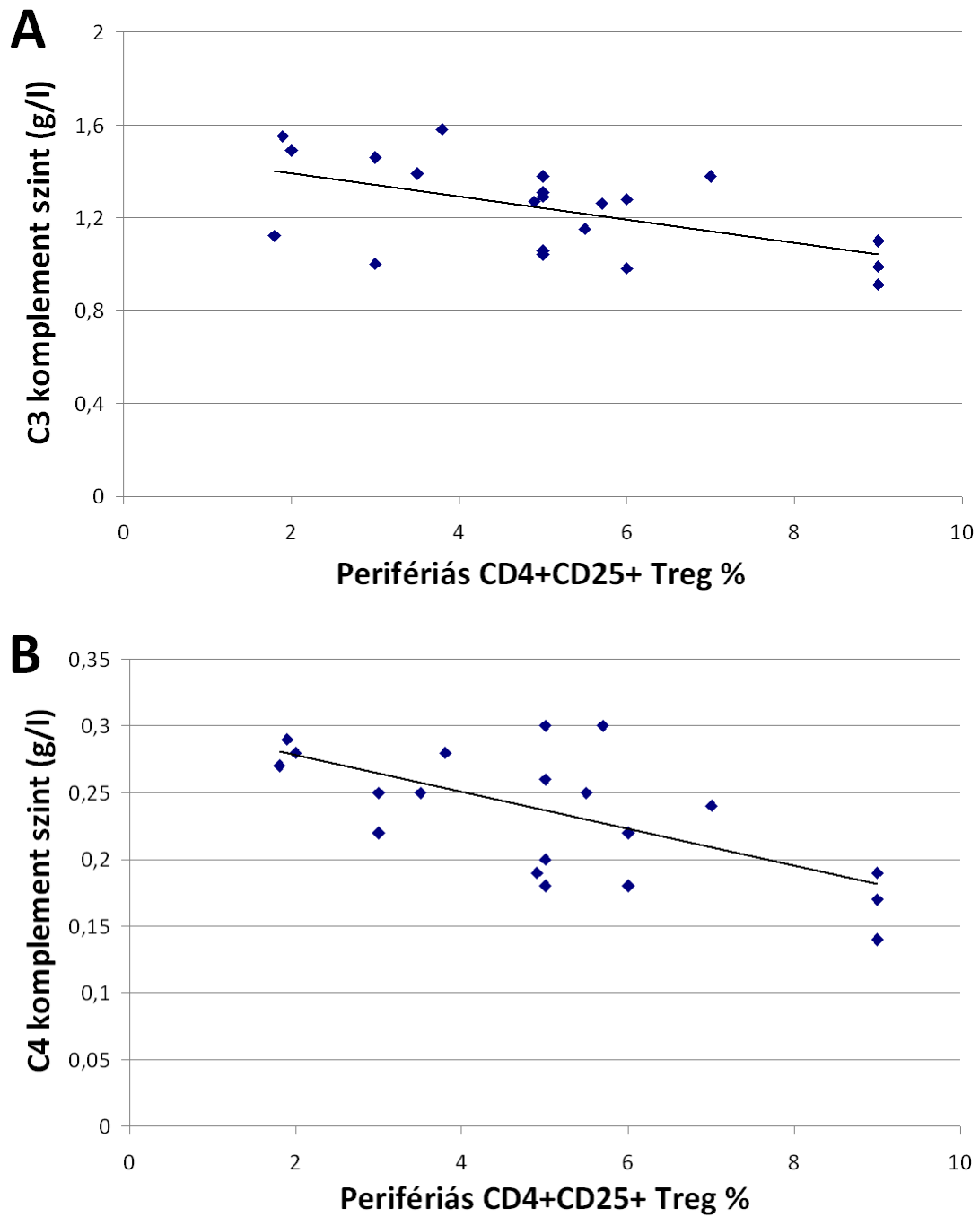


15. Ábra. Negatív korreláció az SSc betegek módosított Rodnan-féle bőrpontszám értékei és a perifériás Tr1 sejtek százalékos arányai között ($p = 0,026$).

4.2.8. A komplement szintek, az autoantitest pozitivitás és a vizsgált immunparaméterek közötti összefüggések

Negatív korrelációt figyeltünk meg a betegek CD4⁺ CD25⁺ Treg sejtjeinek százalékos arányai, valamint a C3 ($R = -0,531$, $p = 0,013$) és C4 komplement szintjei között ($R = -0,515$, $p = 0,017$) (16A és B. Ábra).

A betegek között 14 esetben volt kimutatható az anti-Scl-70 autoantitest jelenléte a perifériás vérben. Nem találtunk összefüggést az autoantitest jelenléte, illetve titere és a vizsgált immunparaméterek szintjei között.



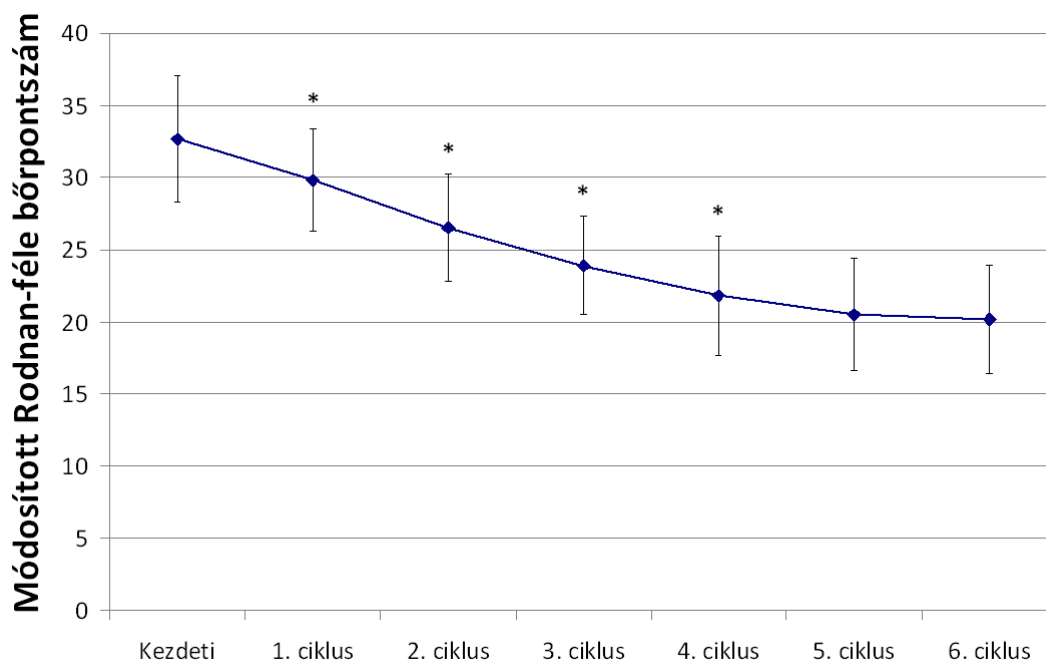
16. Ábra. Negatív korreláció az SSc betegek perifériás CD4+ CD25+ Treg sejtek százalékos arányai és a komplement szintek között, (A) C3: $p = 0,013$, (B) C4: $p = 0,017$).

4.3. A fotoferezis kezelés vizsgálatának eredményei

A tanulmányunk során kiértékeljük a fotoferezis terápia klinikai és immunbiológiai hatásait. Nyomon követtük az SSc betegek bőr- ízületi és belső szervi érintettségének alakulását a kezelések során. Vizsgáltuk az aktivált T-sejtek, a B, NK, NKT, Th1, Th2, Th17, Tr1, CD4⁺ CD25⁺ Treg sejtek abszolút számának és százalékos arányának változását a betegek perifériás vérében a terápia alatt. In vitro funkcionális teszttel nyomon követtük a CD4⁺ CD25⁺ Treg sejtek szuppresszor aktivitásának alakulását. Megmértük a szérumban TNF-alfa, IFN-gamma, IL-1-alpha, IL-1-beta, IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-17, CCL2, FGF, VEGF, EGF, HGF és TGF-beta szintjeit, és figyelemmel kísértük azok változását a terápia során. Végezetül összefüggéseket kerestünk a klinikai állapotjavulás és a vizsgált immunparaméterek között.

4.3.1. Bőr-, ízületi és belső szervi érintettség

A betegek módosított Rodnan-féle bőrpontszámában már az első kezelést követően szignifikáns javulást észleltünk ($32,69 \pm 4,36$ vs. $29,81 \pm 3,56$, $p = 0,049$), és a terápia további folytatása során is progresszív csökkenést tapasztaltunk (utolsó kezelés utáni MRSS érték: $20,17 \pm 3,76$) (17. Ábra).



17. Ábra. Az SSc betegek (n = 16) módosított Rodnan-féle bőrpontszámának változása a terápia során. Az ábrán az átlagértékeket és a szórásokat tüntettük fel. Egy adott időpontban mért értékeket az azt megelőző időpont adataival hasonlítottuk össze, a szignifikáns különbségeket (*)-gal jelöltük.

Az ultrahangos vizsgálatok alapján a bőrvastagság jelentős csökkenést mutatott a fotoferezis kezelések eredményeként. Statisztikailag szignifikáns különbséget tapasztaltunk a kiindulási és az utolsó kezelések után mért értékek között (IV. Táblázat).

	Terápia megkezdése előtt	Utolsó kezelési ciklus után	Szignifikancia
Felkar	0,98 ± 0,28 mm	0,84 ± 0,22 mm	p = 0,016
Alkar	1,01 ± 0,21 mm	0,90 ± 0,19 mm	p = 0,017
Kéz	1,12 ± 0,23 mm	0,99 ± 0,24 mm	p = 0,013
Ujj	1,25 ± 0,24 mm	1,06 ± 0,25 mm	p < 0,001

IV. Táblázat. A felső végtagok extensor felszínein mért bőrvastagságok átlagos ± SD értékei.

Az ízületi mozgáskéesség szintén jelentős javulást mutatott a kezelések hatására, a mozgástartományok szignifikáns növekedését eredményezve (V. Táblázat). Mindezekén túl javulást tapasztaltunk a betegek orális apertúrájának követése során is, ugyanis szignifikáns különbséget figyeltünk meg a betegek kiindulási és utolsó kezelés utáni értékei között ($2,96 \pm 0,53$ cm vs. $3,84 \pm 0,32$ cm, $p < 0,001$) (18. Ábra).

		Terápia megkezdése előtt	Utolsó kezelési ciklus után	Szignifikancia
Váll	anteflexio	$143,75 \pm 21,79^\circ$	$164,69 \pm 12,31^\circ$	$p = 0,003$
	retroflexio	$47,66 \pm 6,68^\circ$	$55,62 \pm 9,46^\circ$	$p = 0,010$
	elevatio	$70,47 \pm 4,49^\circ$	$75,31 \pm 8,06^\circ$	$p = 0,044$
Könyök	flexio	$56,87 \pm 11,27^\circ$	$69,37 \pm 9,32^\circ$	$p = 0,002$
Térd	flexio	$76,66 \pm 14,35^\circ$	$87,17 \pm 13,85^\circ$	$p = 0,049$

V. Táblázat. Szignifikáns javulást mutató ízületek mozgástartományainak átlagos $\pm$ SD értékei.

Tizenhárom betegnél diagnosztizáltunk a kezelések megkezdése előtt szervi érintettséget, amelyek eloszlása az alábbi volt: PAH $n = 3$; pulmonális fibrózis $n = 9$; nyelőcső motilitási zavar $n = 4$, savóshártya gyulladás $n = 1$. Bár a kezelések hatására nem javultak, azonban a terápia 9 hónapja során rosszabbodást sem mutattak a betegek belső szervi manifesztációi.



18. Ábra. Fotoferezis terápia előtti, illetve az utolsó kezelési ciklus utáni száj apertúra

4.3.2. Perifériás B, T, NK és NKT sejtek

Tanulmányunk során nem találtunk szignifikáns különbséget a perifériás CD3+, CD4+, CD8+ T-sejtek és a B-sejtek értékei esetében a betegek és kontroll személyek között. Az aktivált T-sejtek vizsgálata során a késői aktivációt mutató T-sejtek a betegekben szignifikánsan magasabb százalékos arányt mutattak, mint az egészséges személyekben ($3,72 \pm 1,59 \%$ vs. $2,24 \pm 1,43 \%$, $p = 0,018$), mely értékek a fotoferezis kezelések hatására nem változtak.

A CD95+ B-sejtek értékei nem mutattak érdemi eltérést, azonban a CD95+ T-sejtek esetében mind a sejtszám, mind a százalékos arány magasabbnak adódott a betegekben a kezelések megkezdése előtt a kontroll értékekhez viszonyítva (sejtszám: $0,485 \pm 0,164$ G/l vs. $0,342 \pm 0,139$ G/l, $p = 0,007$; sejtarány: $42,95 \pm 7,65 \%$ vs. $32,53 \pm 5,91 \%$, $p < 0,001$). Megfigyeléseink alapján ezen értékek már az első ECP ciklust követően szignifikánsan csökkentek a kiindulási adatokhoz képest (sejtszám: $0,373 \pm 0,131$ G/l vs. $0,485 \pm 0,164$ G/l, $p = 0,035$; sejtarány: $35,22 \pm 6,94 \%$ vs. $42,95 \pm 7,65 \%$, $p = 0,003$), és az egészséges kontrollokéhoz váltak hasonlóvá (19A. Ábra).

Az NK sejtek abszolút száma, és százalékos aránya is magasabb volt a betegekben a kontrollhoz képest (sejtszám: $0,199 \pm 0,102$ G/l vs. $0,131 \pm 0,038$ G/l, $p = 0,043$; sejtarány: $13,16 \pm 6,65 \%$ vs. $9,01 \pm 3,77 \%$, $p = 0,038$). Ezzel szemben az NKT sejtek értékei a betegekben szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyultak az egészségesekéhez képest (sejtszám: $0,0194 \pm 0,0177$ G/l vs. $0,0399 \pm 0,0284$ G/l, $p = 0,041$; sejtarány: $1,18 \pm 1,04 \%$ vs. $2,16 \pm 1,59 \%$, $p = 0,047$). Az eredményeink alapján megállapítható, hogy a fotoferezis terápia nem volt érdemi hatással e sejttípusok értékeire.

4.3.3. Perifériás Th1, Th2 és Th17 sejtek

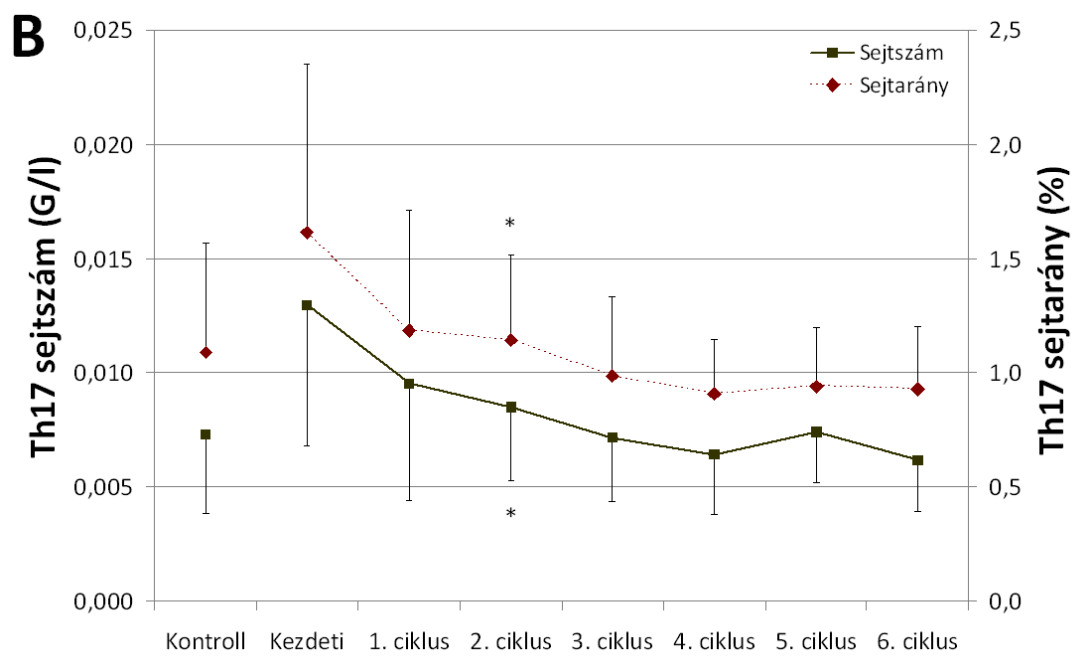
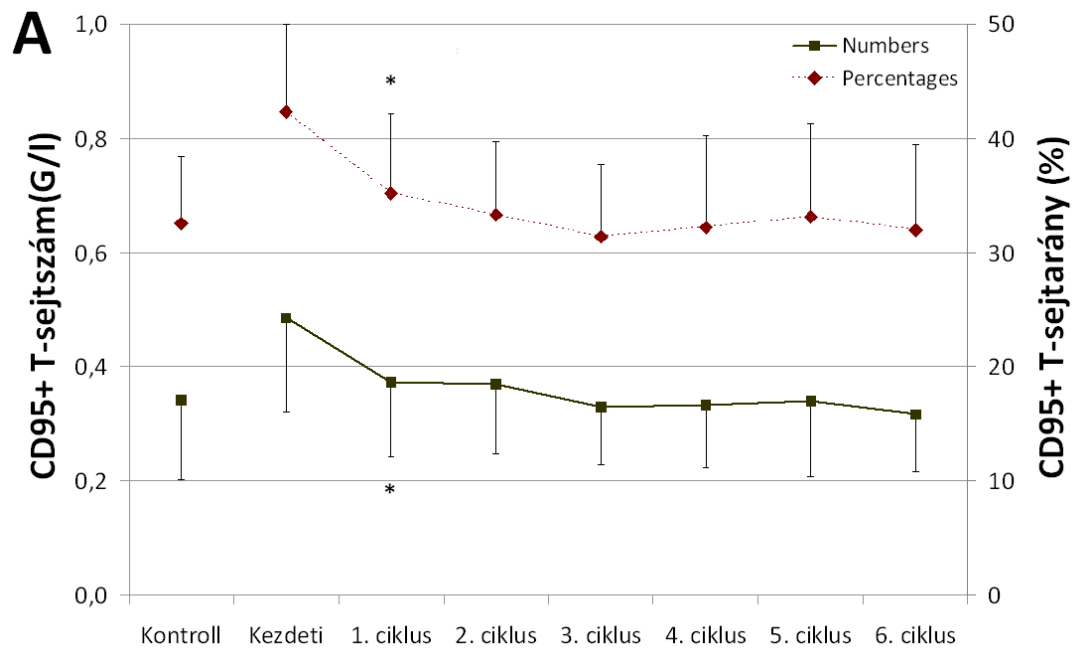
A Th1 sejtek száma és aránya szignifikánsan alacsonyabbnak adódott a betegekben a kontrollhoz képest (sejtszám: $0,119 \pm 0,067$ G/l vs. $0,167 \pm 0,045$ G/l, $p = 0,034$; sejtarány: $13,72 \pm 5,23 \%$ vs. $18,25 \pm 4,71 \%$, $p = 0,017$), azonban a megfigyelt eltérésre nem volt hatással a fotoferezis terápia. A Th2 sejtek kvantitatív értékei

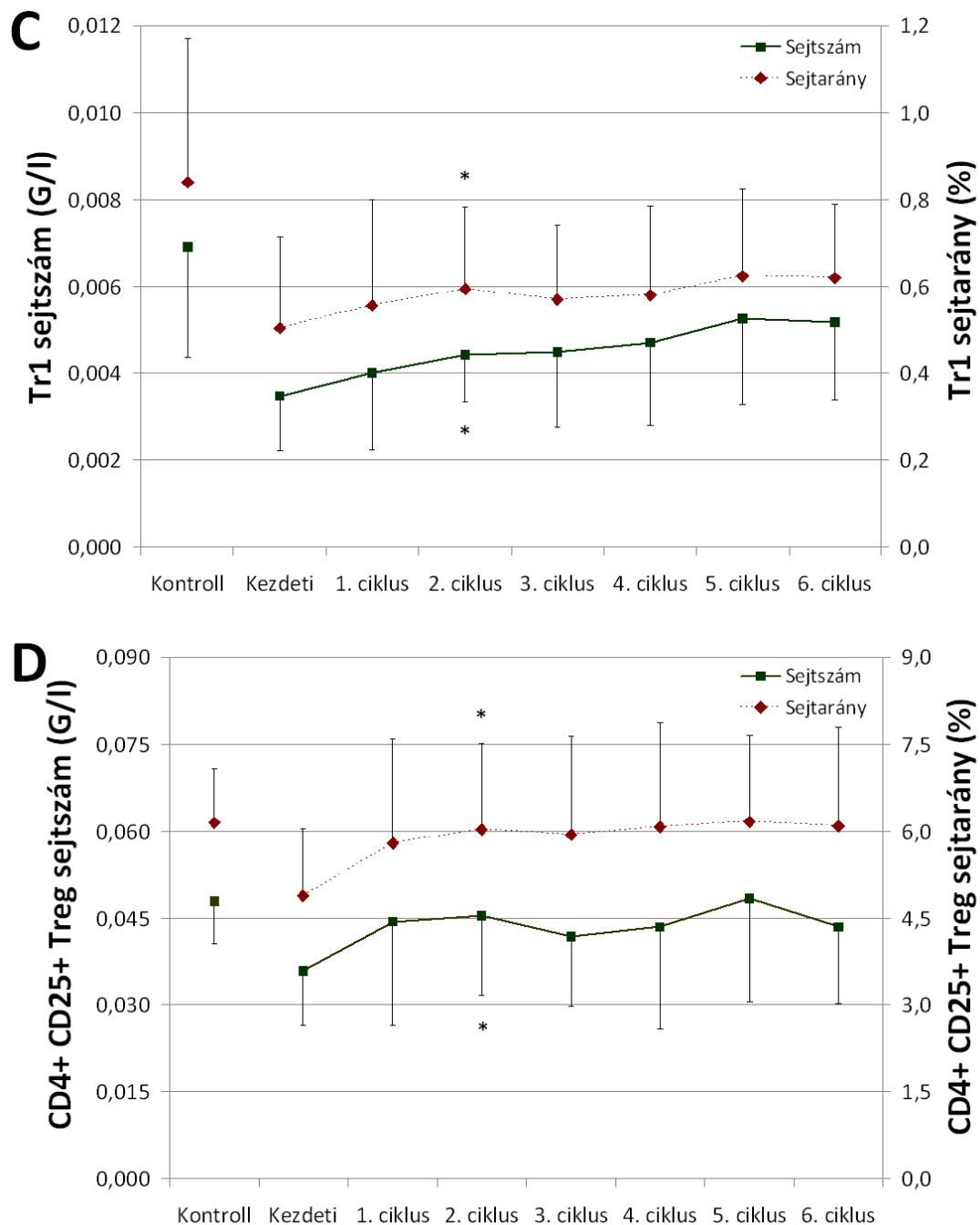
használóak voltak a betegekben és egészségesekben is, és szintén nem mutattak változást a kezelések hatására.

A Th17 sejtek adatai a kezelések megkezdése előtt szignifikánsan magasabbak voltak a betegekben a kontrollokéhoz képest (sejtszám: $0,0129 \pm 0,0062$ G/l vs. $0,0073 \pm 0,0034$ G/l, $p = 0,007$; sejtarány: $1,61 \pm 0,74$ % vs. $1,09 \pm 0,48$ %, $p = 0,025$), azonban már a második kezelést követően jelentősen csökkentek (sejtszám: $0,0085 \pm 0,0032$ G/l vs. $0,0129 \pm 0,0062$ G/l, $p = 0,021$; sejtarány: $1,14 \pm 0,37$ % vs. $1,61 \pm 0,74$ %, $p = 0,032$) és hasonlókká váltak a kontroll értékekhez (19B. Ábra).

4.3.4. Perifériás regulatív T-sejtek (Tr1 és CD4+ CD25+ Treg)

Mind a Tr1, mind a CD4+ CD25+ Treg sejtek csökkent sejtszámban és százalékos arányban voltak jelen a betegek perifériás vérében a kezelések megkezdése előtt a kontroll adatokhoz képest (Tr1 sejtszám: $0,00347 \pm 0,00126$ G/l vs. $0,00691 \pm 0,00254$ G/l, $p < 0,001$; Tr1 sejtarány: $0,45 \pm 0,17$ % vs. $0,84 \pm 0,33$ %, $p < 0,001$; CD4+ CD25+ Treg sejtszám: $0,0359 \pm 0,0094$ G/l vs. $0,0479 \pm 0,0075$ G/l, $p = 0,001$; CD4+ CD25+ Treg sejtarány: $4,88 \pm 1,17$ % vs. $6,14 \pm 0,93$ %, $p = 0,002$). A fotoferezis kezelések során viszont már a második ciklust követően szignifikáns emelkedést mutattak mindkét sejt típus értékei a kiindulási adatokhoz képest (Tr1 sejtszám: $0,00442 \pm 0,00108$ G/l vs. $0,00347 \pm 0,00126$ G/l, $p = 0,041$; Tr1 sejtarány: $0,59 \pm 0,19$ % vs. $0,45 \pm 0,17$ %, $p = 0,043$; CD4+ CD25+ Treg sejtszám: $0,0454 \pm 0,0138$ G/l vs. $0,0359 \pm 0,0094$ G/l, $p = 0,048$; CD4+ CD25+ Treg sejtarány: $6,02 \pm 1,48$ % vs. $4,88 \pm 1,17$ %, $p = 0,021$) (19C és D. Ábra). Mindezek következtében a kezdetben emelkedett Th17/Treg sejtarány szignifikánsan csökkent már a második kezelést követően ($0,35 \pm 0,17$ vs. $0,21 \pm 0,11$, $p = 0,042$) és az egészséges személyek értékeihez vált hasonlóvá ($0,22 \pm 0,21$).

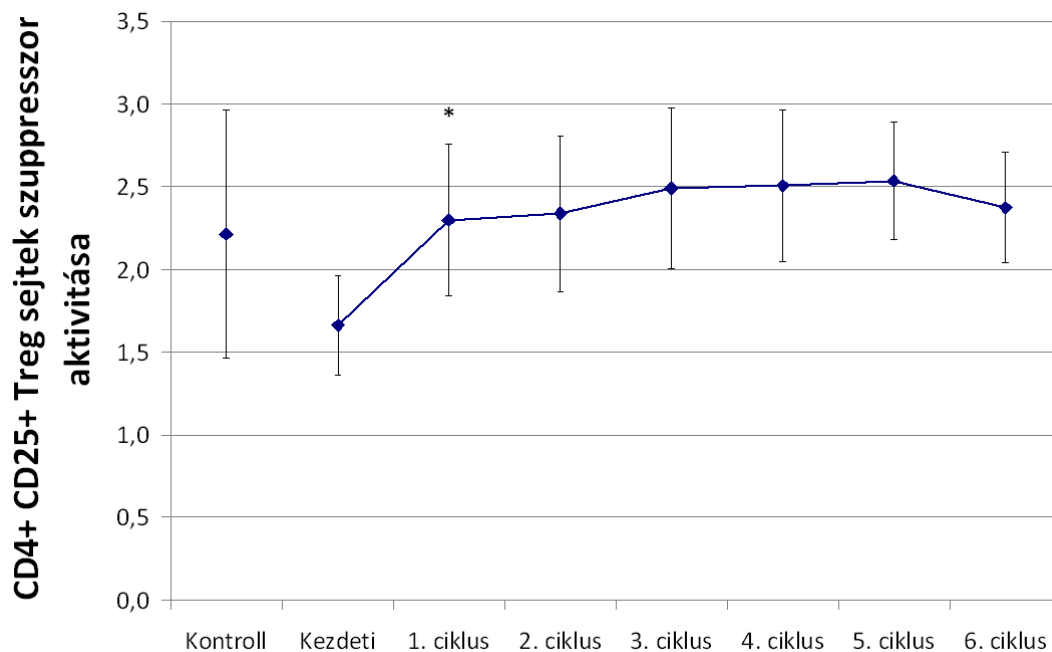




19. Ábra. A fotoferezis kezelések hatása a CD95+ T (A) Th17 (B), Tr1 (C) és CD4+ CD25+ Treg (D) sejtek számára és arányára az SSc betegek perifériás vérében (n = 16). Kontrollként egészséges személyek vérmintája szolgált (n = 16). Az ábrákon az átlagértékeket és a szórásokat tüntettük fel. A szignifikáns különbségeket (*)-gal jelöltük.

4.3.5. CD4+ CD25+ Treg sejtek szuppresszor aktivitása

Az in vitro funkcionális tesztek eredményei alapján a CD4+ CD25+ Treg sejtek szuppressziós aktivitása alacsonyabb volt a betegekben az egészségesekéhez képest ($1,66 \pm 0,30$ vs. $2,21 \pm 0,75$, $p = 0,014$), azonban már az első fotoferezis ciklust követően szignifikáns javulást tapasztaltunk a kiindulási értékekhez képest ($2,29 \pm 0,46$ vs. $1,66 \pm 0,30$, $p < 0,001$) (20. Ábra).



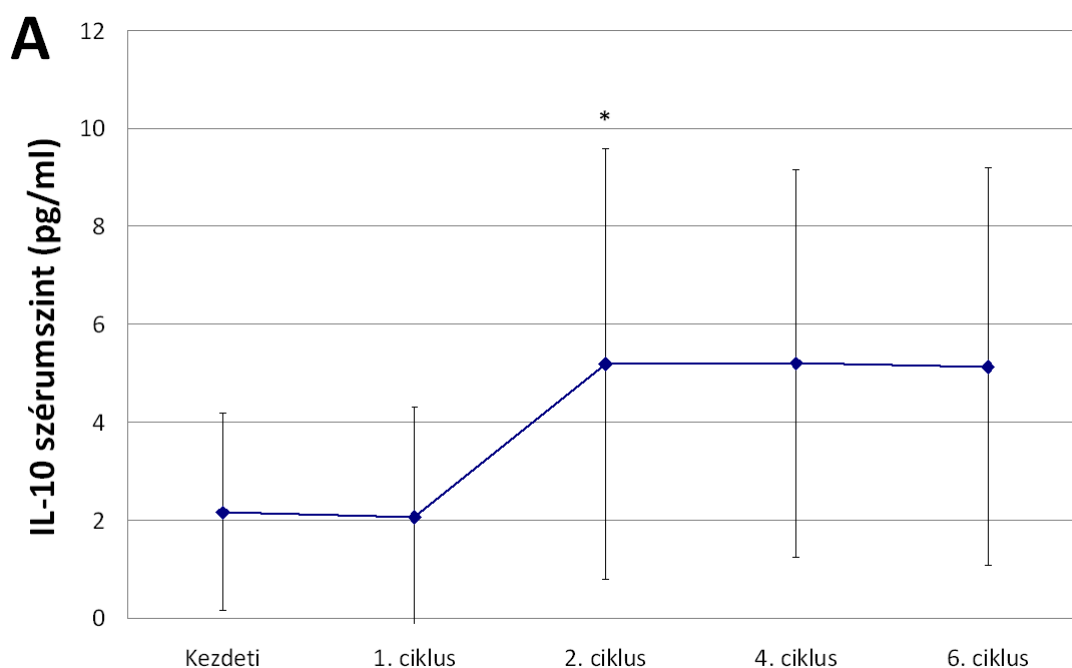
20. Ábra. A fotoferezis kezelések hatása a CD4+ CD25+ Treg sejtek in vitro szuppresszor aktivitására SSc betegek esetében ($n = 16$). Az ábrán az átlagértékeket és a szórásokat tüntettük fel, a szignifikáns különbséget (*) jelöli.

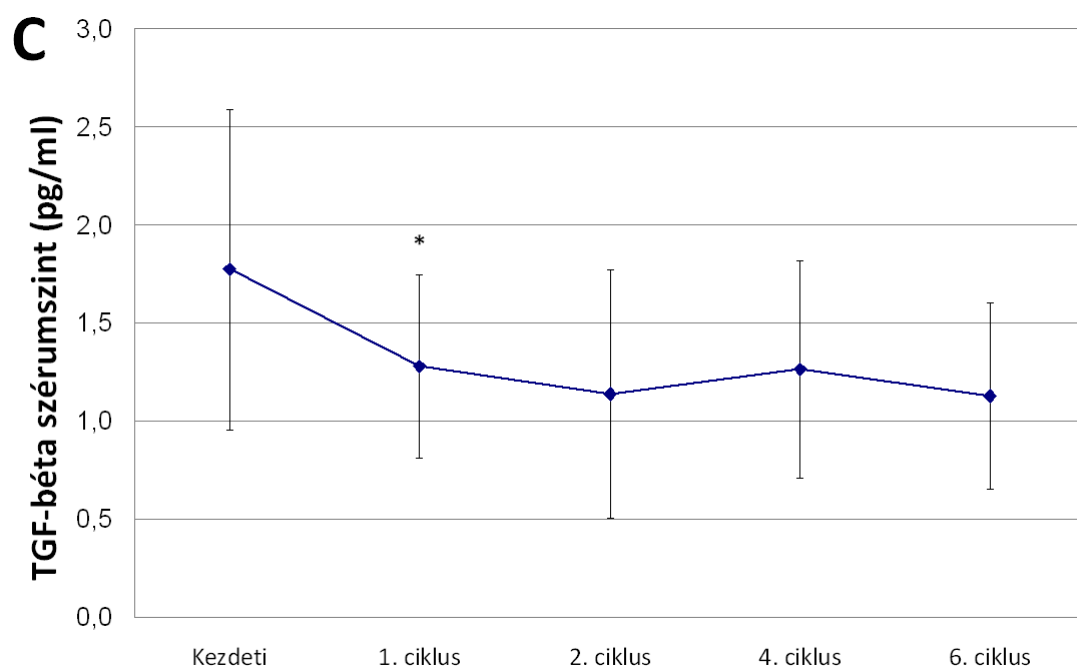
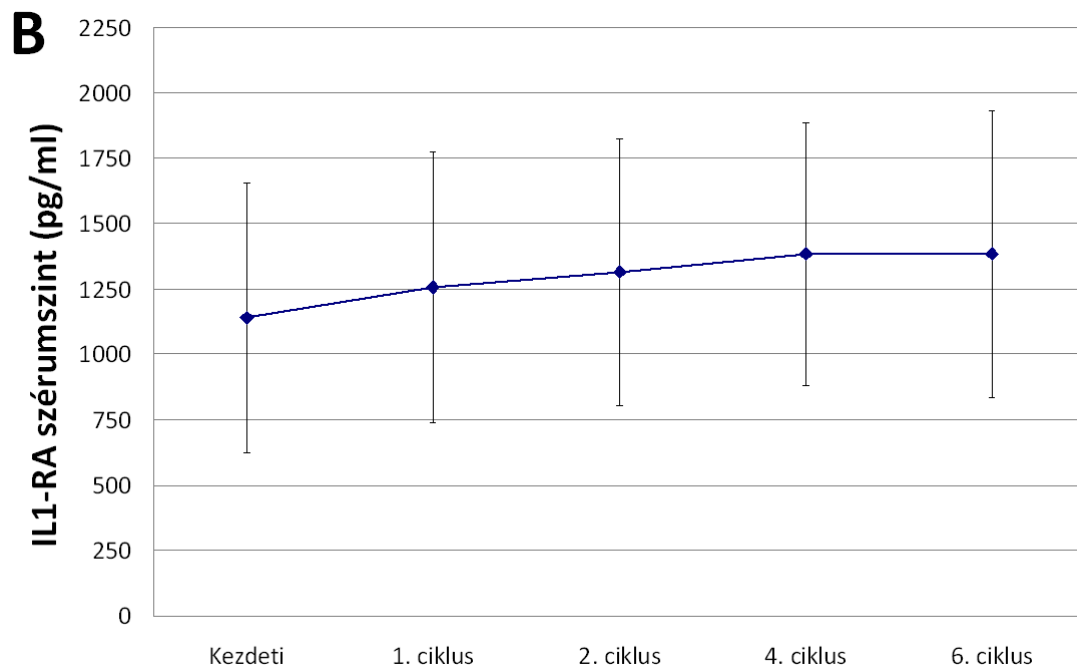
4.3.6. Szérum citokin szintek

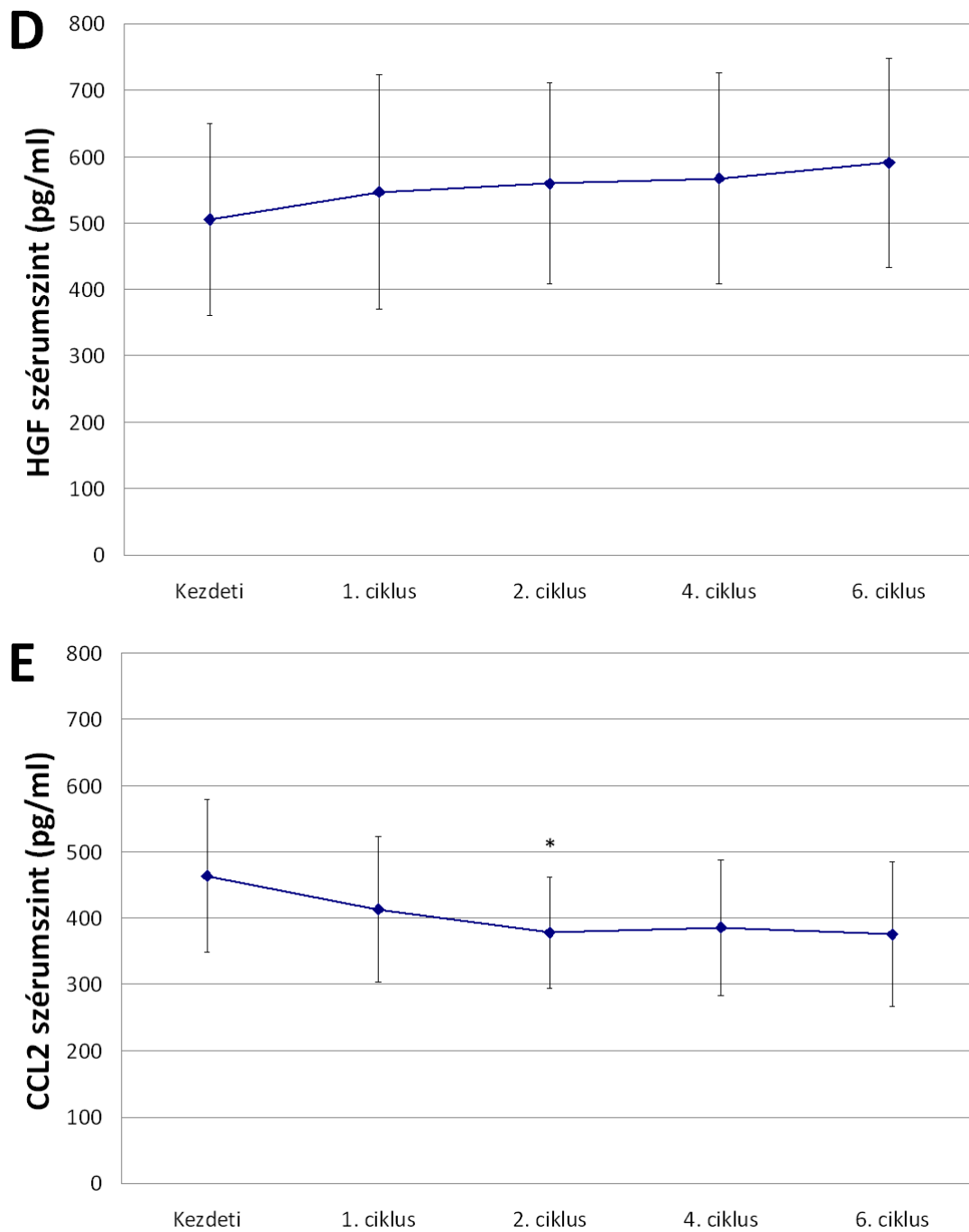
A vizsgált citokineket 5 funkcionális csoportba osztottuk: (I) citokinek, melyeknek főképp pro-inflammatórikus hatásai vannak (IL-1 alfa, IL-1 béta, IL-2, IL-4, IL-6, IL-17, TNF-alfa, IFN-gamma), (II) citokinek főleg anti-inflammatórikus hatással (IL-10, IL-1RA, IL-13), (III) citokinek jellemzően pro-fibrotikus tulajdonságokkal (TGF-beta, FGF, VEGF, EGF), (IV) citokin anti-fibrotikus hatással

(HGF) és (V) kemokinek (CCL2, IL-8). A méréseket a kezelések megkezdése előtt, illetve az első, második, negyedik és hatodik ciklust követően végeztük el.

Az eredményeink alapján a dominálónan pro-inflammatórikus hatású citokinek nem mutattak változást a fotoferezis hatására. Az anti-inflammatórikus citokinek közül az IL-10 szintje szignifikáns emelkedést mutatott a második kezelési ciklust követően ($5,18 \pm 4,38$ pg/ml vs. $2,15 \pm 2,01$ pg/ml, $p = 0,022$) (21A. Ábra). Az IL-1RA szintjének változása ANOVA vizsgálattal statisztikailag szignifikáns növekvő tendenciát mutatott ($F = 2,919$, $p = 0,028$) (21B. Ábra). A pro-fibrotikus hatású TGF-béta szintje már az első kezelést követően szignifikánsan csökkent a kiindulási adatokhoz viszonyítva ($1,28 \pm 0,46$ pg/ml vs. $1,77 \pm 0,84$ pg/ml, $p = 0,049$) (21C. Ábra), míg az anti-fibrotikus HGF koncentrációja ANOVA vizsgálattal statisztikailag szignifikáns növekvő tendenciát mutatott ($F = 2,687$, $p = 0,041$) (21D. Ábra). A CCL2 kemokin szintek szignifikánsan csökkentek már a második fotoferezis ciklust követően, a kezdeti értékekhez viszonyítva ($377,99 \pm 83,62$ pg/ml vs. $463,11 \pm 115,01$ pg/ml, $p = 0,037$) (21E. Ábra).







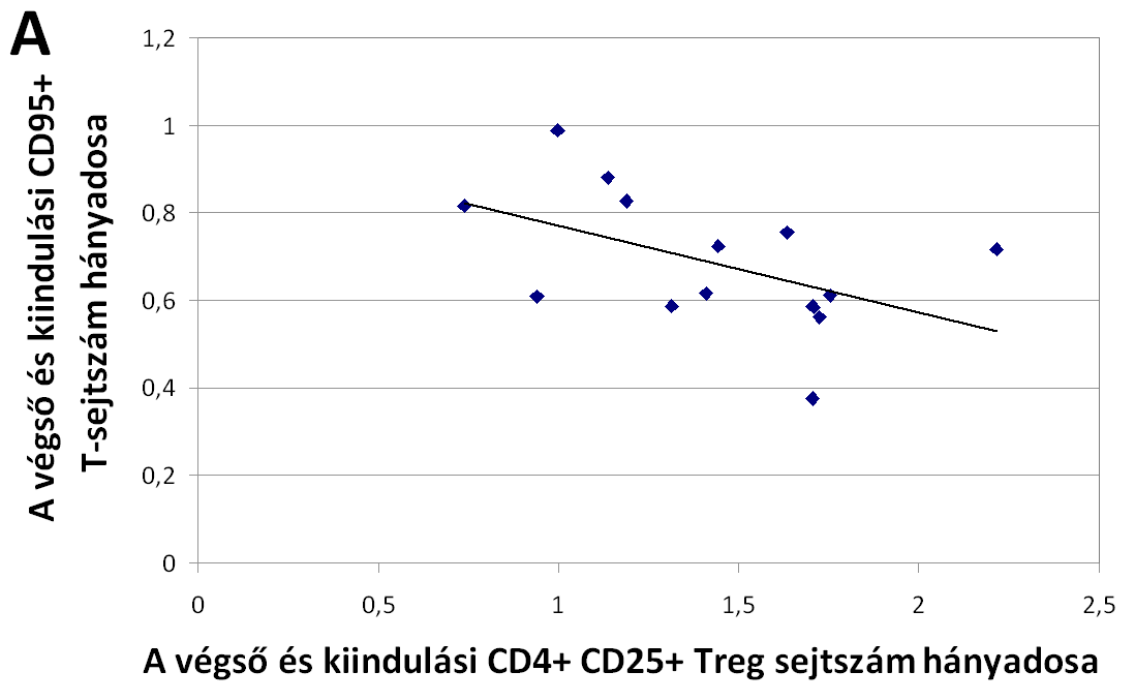
21. Ábra. A fotoferezis kezelések hatása az IL-10 (A), IL-1RA (B), TGF-béta (C) HGF (D) és CCL2 (E) szintekre az SSc betegek szérumában (n = 16). Az ábrákon az átlagértékeket és a szórásokat tüntettük fel. A szignifikáns különbségeket (*)-gal jelöltük.

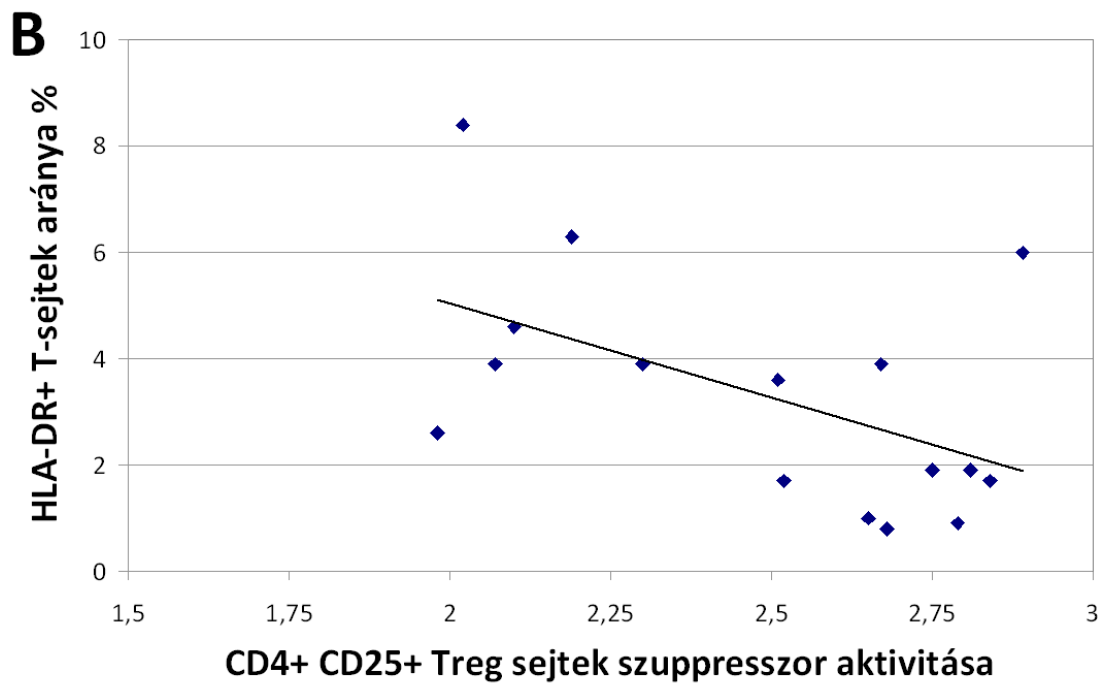
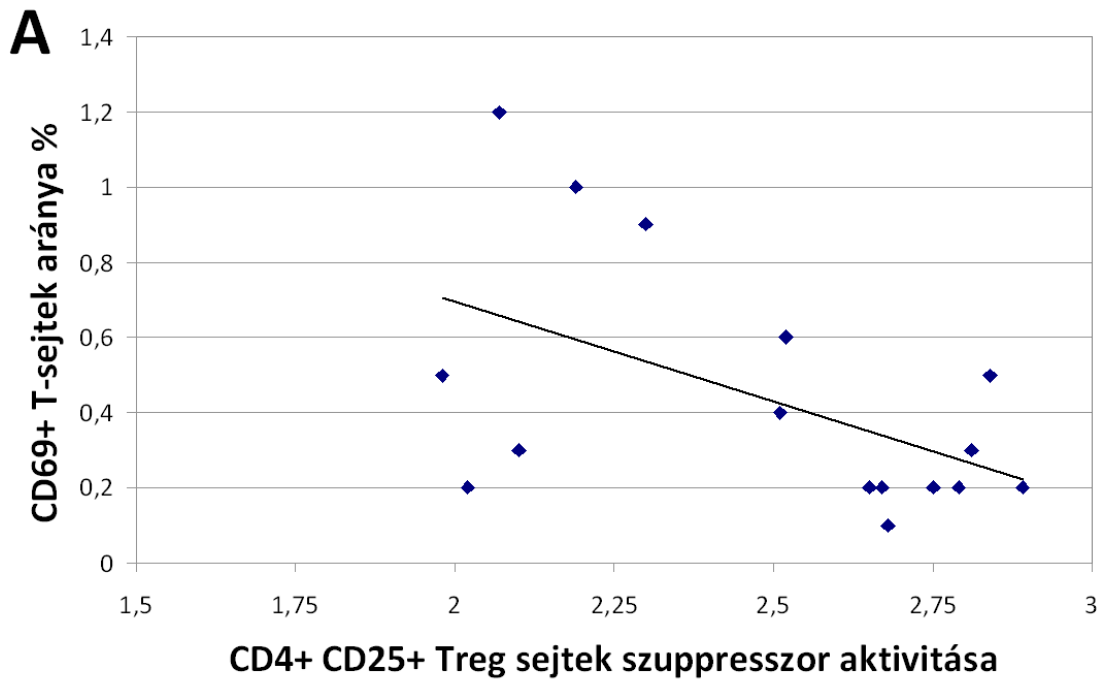
4.3.7. Szérum autoantitestek

A betegek között 15 személynél igazolódott az anti-Scl-70 antitest pozitívitas. A kezelések hatására nem következett be változás a betegek autoantitest szintjeiben.

4.3.8. Korrelációk a vizsgált immunparaméterek között

Az adatok statisztikai feldolgozása során negatív korrelációt tapasztaltunk a CD95+ T-sejtek és a CD4+ CD25+ Treg sejtek értékeiben a fotoferezis kezelése során mért változások (az utolsó kezelés utáni értékek és a kiindulási adatok hányadosa) között (sejtszámok: $R = -0,507$, $p = 0,048$; sejtarányok: $R = -0,514$, $p = 0,042$) (22A és B. Ábra).





23. Ábra. Negatív korreláció a CD4+ CD25+ Treg sejtek in vitro szuppressziós aktivitása és a korai (**A**), és késői aktivált T-sejtek (**B**) között a fotoferezis terápiát követően SSc betegekben (n = 16) [$p = 0,039$ (**A**), illetve $p = 0,036$ (**B**)].

4.3.9. Összefüggések a klinikai állapotjavulás és a vizsgált immunparaméterek változása között

Széleskörű korrelációs számításokat végeztünk, hogy összefüggéseket találjunk a fotoferezis terápia klinikai és immunmoduláns hatásai között. Eredményeink alapján szignifikáns korreláció áll fenn a Th17 sejtek számának és százalékos arányának csökkenése és a bőrvastagság ultrahangos vizsgálattal mért mérséklődése között (3. ujj bázisán végzett UH mérés esetén Th17 sejtszám: $R = 0,784$, $p = 0,001$; Th17 sejtarány: $R = 0,649$, $p = 0,009$; illetve alkaron végzett UH mérés esetén: Th17 sejtszám: $R = 0,532$, $p = 0,043$; Th17 sejtarány: $R = 0,518$, $p = 0,048$).

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. A Sjögren-szindrómás betegeken végzett vizsgálatok

Eredményeink azt mutatják, hogy Sjögren-szindrómában a regulatórikus aktivitású immunkompetens sejtek egyes típusai az egészséges személyekben mért értékektől eltérő mennyiségben vannak jelen a perifériás vérben. Hipotézisünk szerint a vizsgálataink során megfigyelt emelkedett NK és NKT sejtarányok pSS-ben egy fokozott ellenregulációs reakció részét képezhetik, mely által a szervezet a betegségre jellemző krónikusan perzisztáló, patológiás immunreaktivitás egyensúlyozására törekszik. A megfigyeléseink szerint azon pSS betegeken, akiknél az exokrin funkció csökkenés mellett extraglanduláris tünetek is jelentkeznek – melyek a betegség agresszívebb lefolyását jellemzik – az NKT sejtek aránya jelentősen magasabb a csak száraz panaszoktól szenvedőkéhez képest. A vizsgálataink során tapasztalt eltérések az NK és NKT sejtpopulációban felvetik e sejtek altípusainak részletes tanulmányozásának szükségességét, mely által pontosabban képet nyerhetnénk e sejtek számbeli és funkcionális változásáról és annak következményeiről. Az NK és NKT sejtekhez hasonlóan a Tr1 sejtek esetében is megfigyelhető a sejtarány emelkedése a betegek perifériás vérében, sőt a szisztémás tüneteket mutatóknál ugyanúgy kifejezettebb a növekedés, ami szintén alátámasztja a kompenzáló immunmechanizmusok jelenlétét a betegség lefolyása során.

Tanulmányunk során a perifériás CD4⁺ CD25⁺ Treg sejtek csökkent százalékos arányát figyeltük meg a betegségben, mely alapján feltételezhető, hogy az immunregulációban kulcsszerepet betöltő CD4⁺ CD25⁺ Treg sejtek kisebb számban nem képesek megfelelően kontrollálni Sjögren-szindrómában az autoreaktív immunfolyamatokat. Érdekes módon a szisztémás tünetektől szenvedő betegek vérében a CD4⁺ CD25⁺ Treg sejtek aránya magasabbnak adódott a glanduláris formában megfigyelhető szinteknél, azonban a kontroll személyekre jellemző érték alatt maradt. Mindez megerősíti feltételezésünket, miszerint a klinikai kép súlyosbodásával párhuzamosan felerősödnek a szervezet ellenregulációs mechanizmusai, emelkedik a regulatív T-sejtarány, azonban az egészségeshez viszonyítva továbbra is csökkent szintje nem képes kontroll alatt tartani az autoimmun folyamatokat. A CD4⁺ CD25⁺

regulatív T-sejtek funkcióját jelentősen befolyásolja a lokális citokin miliő. Tanulmányok kimutatták, hogy bizonyos gyulladásos citokinek, úgy mint a TNF-alfa és az IL-6 fokozott termelődése képes megzavarni a regulatív T-sejtek képződését és szuppresszor működését [76-78], továbbá az így megváltozott citokin profil hatására az autoagresszív T-sejt klónok rezisztenssé válnak a Treg sejtek reguláló aktivitásával szemben [79]. Kutatásunk során mind a TNF-alfa, mind az IL-6 citokin esetében emelkedett szinteket mértünk a pSS betegek szérumban, mely felvetette annak lehetőségét, hogy primer Sjögren-szindrómában e citokinek fokozott termelődése gátolhatja a regulatív T-sejtek immunszabályozó képességét. Ezért a CD4⁺ CD25⁺ Treg sejtek kvantitatív eltérései mellett az esetleges kvalitatív zavarait is megvizsgáltuk a betegségben. Az in vitro funkcionális teszt során a CD4⁺ CD25⁺ T-sejtek csökkent szuppresszor aktivitását tapasztaltuk, mely arra utal, hogy a megváltozott perifériás sejtarány és a sejtek csökkent funkciója egyaránt fontos tényező lehet a regulatív működés elégtelenné válásának folyamatában.

A pSS betegek szérumban szignifikánsan csökkent IL-10 szinteket mértünk az egészséges kontroll személyek értékeihez képest. Az IL-10 citokin, melyet többek között a Tr1, B, NK és egyéb PBMC sejtek is termelnek, központi szerepet játszik az immunválasz kontrollálásában [23,80]. Érdekes módon az eredményeink arra utalnak, hogy bár az erősödő ellenregulációs folyamatok részeként az IL-10-termelő Tr1 sejtek jelenléte fokozódik a pSS betegek perifériás vérében, azonban az IL-10 szintek az egészséges személyek értékei alatt maradnak. Ezenfelül a perifériás Tr1 sejtarányok és a szérumban IL-10 szintek között megfigyelt negatív korreláció felveti a Tr1 sejtek elégtelen anti-inflammatórikus citokinszekretáló képességét a betegségben.

A klinikai vizsgálati eredmények feldolgozása során negatív korrelációt figyeltünk meg a regulatív T-sejtek százalékos értékei és a betegek szialometriás eredményei között. A csökkent szekréciós képesség a Sjögren-szindróma patogenezisének sarokpontja, és összefügg a betegség súlyosságával. Megfigyeléseink alapján összességében elmondható, hogy a klinikai kép súlyosbodásával párhuzamosan felerősödnek a szervezet ellenregulációs mechanizmusai, melyek azonban nem képesek kontroll alá vonni az autoimmun szövetkárosító folyamatokat, részben a már jelen lévő gyulladásos citokin környezet, és az emelkedett IL-6 és TNF-alfa szintek következtében.

5.2. A szisztémás sclerosisos betegeken végzett vizsgálatok

Tanulmányunk során a diffúz cutan SSc-ben szenvedő betegek perifériás vérében szignifikánsan alacsonyabbnak találtuk a CD4⁺ és CD8⁺ naív T-sejtek százalékos arányát, míg a CD4⁺ és CD8⁺ centrális memória T-sejtek aránya szignifikánsan magasabb értéket mutatott. Mindezen eltérések a krónikusan aktív T-sejt populáció növekedésével együtt egy immunológiailag aktív állapotot reprezentálnak.

Vizsgálataink alapján a betegek perifériás vérében emelkedett az NK sejtek aránya, mely megfigyelésünk összhangban van az irodalmi adatokkal [81]. Megjegyzendő, mikor a betegeket két alcsoportra osztottuk a belső szervi érintettség jelenléte, illetve hiánya alapján, a súlyosabb klinikai képet mutató esetekben az NK sejtek értékében jelentősebb emelkedést tapasztaltunk, míg a csak bőrtüneteket mutató betegeknél az egészségesek adatainak megfelelő sejtarányokat mértünk. Az NK sejteknél megfigyelt expanszió kapcsolatban állhat a kifejezettebb gyulladásos folyamatokkal, melynek részeként fokozódik az IL-2 és IL-15 citokinek termelődése, ami az NK sejtek proliferációjához vezet a betegségben [82,83]. A perifériás NKT sejtek százalékos arányai alacsonyabbnak adódtak a betegek vérében, mely alapján arra következtethetünk, hogy a patológiás immunfolyamatok az NK sejtek mellett az NKT sejtekre is hatással vannak.

A Th1 és Th2 sejtprofilra célzó vizsgálataink során szignifikánsan csökkent Th1 sejtarányt tapasztaltunk a betegek perifériás vérében. Bár az egészséges kontrollok adataihoz képest a Th2 sejtek százalékos értékei, illetve a Th1 és Th2 sejtek által termelt citokinek szintjei nem mutattak eltérést a betegek vizsgálata során, továbbá a Th1/Th2 sejtarányban megfigyelt változás nem érte el a statisztikailag szignifikáns szintet, az általunk mért eredmények sem megerősíteni, sem cáfolni nem tudják a Th1/Th2 egyensúly megbomlásának hipotézisét.

A Th17 sejtek felfedezése új utakat nyitott a különböző autoimmun folyamatok megértéséhez, és számos autoimmun betegség kifejlődésében sikerült alátámasztani a sejttípus központi szerepét. Vizsgálataink során a perifériás Th17 sejtek fokozott jelenléte mellett, a CD4⁺ CD25⁺ Treg sejtek csökkent százalékos arányát tapasztaltuk a betegek vérében. Ennek következtében a Th17/CD4⁺ CD25⁺ Treg sejtek aránya megváltozott, kimoszdván az érzékeny immunológiai egyensúlyt a fokozott

immunreaktivitás irányába. Kutatásunk során vizsgáltuk a CD4⁺ CD25⁺ Treg sejtek in vitro szuppresszor aktivitását is, és az általunk megfigyelt csökkent szuppresszor képesség alapján a CD4⁺ CD25⁺ Treg sejteknek nem csupán a csökkent perifériás jelenléte, hanem a megváltozott funkciója is szerepet játszhat az elégtelen immunregulációs képességükben.

Tanulmányunk során az IL-10 termelő Tr1 sejtek csökkent százalékos aránya mellett a szolubilis IL-10 citokin alacsonyabb szintjét figyeltük meg a betegek perifériás vérében. Az IL-10 termelése a T-sejteken kívül a B-sejtekhez és egyéb PBMCs-hez is köthető. Egy nemrég elkészült vizsgálat kimutatta, hogy a PBMCs IL-10 termelő képessége az SSc betegekben az egészséges kontrollokéhoz hasonló, azonban stimuláció hatására a betegekben jelentősebben fokozódik a PBMCs IL-10 szekréciójának a mértéke [84]. Ezek a megfigyelések valószínűleg egyfajta fokozott ellenregulációs folyamat részjelenségére utalnak, mely vélhetően a Tr1 sejtek által csökkent mennyiségben termelődő IL10 citokin szintjének a kompenzációjára törekszik a betegségben.

A bőrérzettség súlyossága és a vizsgált laboratóriumi paraméterek közötti összefüggés vizsgálata során negatív korrelációt tapasztaltunk a módosított Rodnan-féle bőrpontszám értékek és a Tr1 sejtek százalékos arányai között. Mindezek alapján azt feltételezzük, hogy az egyre csökkenő Tr1 sejtszámmal párhuzamosan elégtelenné váló regulatív mechanizmusok nem képesek kontroll alatt tartani az autoimmun folyamatokat, ezáltal mind súlyosabb klinikai tünetekhez vezetnek.

Bár a szakirodalom a komplement útvonalat ritkán tartja az SSc patogenezisében fontos szerepet játszó tényezőnek, a betegségben gyakran megfigyelhető a hipokomplementémia [85], mely az eredményeink alapján összefüggésben állhat a megváltozott CD4⁺ CD25⁺ Treg sejtszámmal, ezáltal a károsodott immunregulációs profillal.

5.3. A fotoferezis kezelés klinikai és immunológiai hatásai

Vizsgálataink során egyértelmű javulást tapasztaltunk a betegek klinikai állapotában a fotoferezis kezeléseket követően. A bőrtünetek súlyosságát jelző MRSS pontszám csökkent, az ízületi mozgástartomány és az orális apertúra nőtt, illetve a mimikai funkciók is javultak. Mindezen megfigyeléseink összhangban állnak a korábbi vizsgálatok eredményeivel [72,73]. Fontos hangsúlyozni, hogy mivel előttünk még senki nem vizsgálta a fotoferezis kezelések részletes immunbiológiai hatásait szisztémás sclerosisban, az általunk megfigyelt laboratóriumi eredményeket csak az egyéb betegségekben alkalmazott ECP kezelés immunológiai következményeivel tudjuk összehasonlítani [86].

Az eddigi ismereteink alapján az SSc elsődlegesen egy vasculáris betegség, melynek létrejöttében autoimmun mechanizmusok játszanak szerepet, az érintett szövetek fibrózist eredményezve. A korábbi tanulmányok az NK és NKT mellett a Th17, Tr1 és CD4⁺ CD25⁺ Treg sejtek esetén is megváltozott kvantitatív és kvalitatív tulajdonságokat tapasztaltak SSc-ben [44,49]. Vizsgálati eredményeink hasonlóan megváltozott NK és NKT sejtarányokat, továbbá csökkent Th1, Tr1, CD4⁺ CD25⁺ Treg és emelkedett Th17 sejtszámot igazoltak az SSc betegek perifériás vérében. Mindez arra utal, hogy a regulatív és effektor funkciójú CD4⁺ T-sejtek arányának eltolódása fontos szerepet játszik az érzékeny szabályozási egyensúlynak a fokozott immunreaktivitás irányába való kibillentésében.

Az ECP kezelések, úgy tűnik kifejezettebb hatással vannak az egyes T-sejt altípusokra, mint az NK vagy az NKT sejtszámokra. A korábbi kutatások, melyek a fotoferezis immunológiai hatását vizsgálták GVHD-ban, úgy találták, hogy az autoreaktív sejtek direkt eliminációja mellett a perifériás CD4⁺ CD25⁺ Treg sejtek aránya is megemelkedik, mely az autoimmun folyamatok csillapításához járulhat hozzá [87]. Mi szintén tapasztaltuk a perifériás CD4⁺ CD25⁺ Treg sejtek számának és arányának növekedését az ECP kezelések hatására. Fontos hangsúlyozni, hogy a CD4⁺ CD25⁺ Treg értékek emelkedésével párhuzamosan a CD95⁺ T-sejtek adatai csökkenést mutattak. A CD95, vagy más néven FasR fontos központi szerepet játszik a programozott sejthalál kiváltásában. Az aktivált lymphocyták jellemzője a fokozott CD95 expresszió, mely a túlzott mértékben aktivált, illetve autoreaktív sejtek

apoptózisa által fontos tényező az immunválasz kontrollálásában [88]. Megfigyelésünk szerint tehát a kezdetben emelkedett CD95+ T-sejtszám az ECP kezelések során fokozatosan csökkent, és ez a változás prominensebbnek bizonyult azoknál a betegeknél, akiknél kifejezettebb volt a CD4+ CD25+ Treg sejtszám növekedés. Az in vitro funkcionális vizsgálatok tanúsága szerint az ECP kezelés hatására a CD4+ CD25+ Treg sejtek szuppresszor működése jelentősen javult, sőt a kezelések befejeztével negatív korreláció alakult ki a szuppresszor aktivitás és a korai, illetve késői aktivált T-sejtek értékei között. Mindezek a megfigyelések aláhúzzák a CD4+ CD25+ Treg sejtműködés kiemelkedő szerepét a fokozott autoreaktív immunfolyamatok csillapításában.

Mindemellett azonban a CD4+ T-sejt alcsoportokat érintő változások jóval komplexebbnek tűnnek. A fotoferezis növeli a regulatív tulajdonságú IL-10-termelő Tr1 sejtek számát és arányát a betegek perifériás vérében, míg az autoimmun és pro-fibrotikus folyamatokban kulcsszerepet játszó Th17 sejtekét csökkenti. Eredményeink alapján azokban a betegeken, akik esetében kifejezettebb bőrvastagság csökkenés volt tapasztalható, a Th17 sejtek számának és arányának csökkenése nagyobb mértékű volt.

A tapasztalataink alapján a dominálónan pro-inflammatórikus hatású citokinek nem mutattak változást a fotoferezis hatására. Az anti-inflammatórikus citokinek közül az IL-10 citokin szintek mutattak emelkedést, mely változás összhangban állhat az ECP terápia következtében növekedést mutató Tr1 értékekkel. Az IL-10 mellett az IL-1RA citokin koncentrációi is nőttek. Az IL-1RA kompetitíven kötődik a sejtek IL-1 sejtfelszíni receptorához, ezáltal gátolja az IL-1 citokinek pro-inflammatórikus hatásait [89]. Mivel az IL-1-béta citokin gátolja a CD4+ CD25+ Treg sejtek szuppresszor képességét, és elősegíti a Th17 irányú sejt differenciálódást [82], az IL-1RA szintjének növekedése, az emelkedett IL-10 koncentrációval együtt hozzájárulhat a fokozott immunfolyamatok csillapításához.

A fibrotikus folyamatokat tekintve egyre több eredmény támasztja alá a szöveteket infiltráló aktivált makrofágok és T-sejtek szerepét a pro-fibrotikus tulajdonságú TGF-béta, CCL2, IL-2, IL-4, IL-6 és IL-17 termelésében [44,54,90]. A kezelések hatására szignifikánsan csökkentek a TGF-béta és CCL2 szintek, csökkent pro-fibrotikus aktivitást jelezve, mely részben megmagyarázza a klinikai tünetek javulását. Egy tanulmány nemrég a HGF szintek csökkenéséről számolt be SSc-ben,

melynek szerepe lehet az elégtelen vasculáris reparációs folyamatokban, illetve a fokozott fibrogenézisben [91]. Vizsgálataink alapján a fotoferezis terápia a HGF szintek emelkedéséhez vezet, ami szintén szerepet játszhat a fibrotikus folyamatok mérséklésében.

Bár a fotoferezis valószínűleg nem képes megszüntetni a korábban már kifejlődött szöveti fibrózist SSc-ben, azonban jelentősen hozzájárul a betegség progressziójának gátlásához. Mindemellett a betegeink egyikénél sem jelentkeztek mellékhatások a fotoferezis kezeléseket követően, mely megerősíti a kezelés minimális toxicitásának jelentőségét, ami egyértelmű előny a többi immunmoduláns terápiával szemben.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A primer Sjögren-szindrómával kapcsolatos vizsgálataink eredményei alapján a betegség során megnyilvánuló patológiás immunmechanizmusokban mind a természetes, mind az adaptív immunrendszer regulatórikus aktivitású elemei érintettek. A perifériás NK, NKT és Tr1 sejtarányok emelkedése valószínűleg egy fokozott ellenregulációs mechanizmus része, ami az autoimmun folyamat által kiváltott krónikus gyulladásos állapot ellensúlyozására törekszik. Ezzel szemben az egészségesek értékeihez képest alacsonyabb CD4⁺ CD25⁺ Treg sejtarányokat figyeltünk meg. Elsőként írtuk le a CD4⁺ CD25⁺ Treg sejtek csökkent szuppresszor aktivitását a betegségben. Az általunk megfigyelt emelkedett IL-6 és TNF-alfa szérumszintek részben megmagyarázzák a megfigyelt funkcionális eltérést. Eredményeink összességében arra utalnak, hogy a primer Sjögren-szindrómában megfigyelhető elégtelen immunregulációs működés hátterében nem csupán a CD4⁺ CD25⁺ Treg sejtek csökkent aránya, hanem azok megváltozott funkciója is áll.

Szisztémás sclerosisban (SSc) a Th17 sejtek fokozott jelenlétét és a regulatórikus funkciójú IL10-termelő Tr1 és CD4⁺ CD25⁺ Treg sejtek csökkent arányát mutattuk ki. Az IL-10 szérumszintjét és a CD4⁺ CD25⁺ Treg sejtek szuppresszor aktivitását szintén alacsonyabbnak találtuk a betegekben. Mindezen felül negatív korrelációt fedeztünk fel a Tr1 sejtek és a betegek módosított Rodnan-féle bőrpontszáma között, mely alapján a megváltozott Th17/CD4⁺ CD25⁺ Treg arány mellett a Tr1 sejtek is szerepet játszanak a kóros immunfolyamatok fokozódásában SSc-ben.

A fotoferezis klinikai hatékonyságának vizsgálata során a korábbi tanulmányokkal összhangban a betegek jelentős állapotjavulását tapasztaltuk. Mivel a kezelés immunbiológiai hatásait előttünk még nem vizsgálták SSc-ben, ezért minden laboratóriumi eredményünk új megfigyelésnek számít a nemzetközi szakirodalomban.

Vizsgálataink alapján a fotoferezis kezelése a Th17 sejtek számát csökkenti, a Tr1 és CD4⁺ CD25⁺ Treg sejtek számát pedig emeli a betegek perifériás vérében, illetve normalizálja az utóbbiak szuppresszor működését. A CCL2 és TGF- β szintek csökkentek, míg az IL-1Ra, IL-10 és HGF szintek emelkedtek. Az ECP kezelés ezáltal hozzájárul a regulatív és effektor immunmechanizmusok egyensúlyának helyreállításához, és a betegség progressziójának gátlásához.

SUMMARY

The results of our study in Sjögren's syndrome (SSc) indicate that cells with certain regulatory activity are involved in the pathological immune mechanisms both at the level of innate and adaptive immune system. The increased percentages of peripheral NK, NKT and Tr1 cells may be part of an increased counter-regulatory reaction, presumably compensating the derailed, disproportional immune responses. Contrary to the other cell types, peripheral CD4⁺ CD25⁺ Treg cells showed decreased percentages in SSc. We were the first to report the decreased suppressor activity of CD4⁺ CD25⁺ Treg cells in primary Sjögren's syndrome. We demonstrated elevated IL-6 and TNF-alpha levels in the sera of the patients, which may be at least partially responsible for the functional defect in the suppression capability of these cells. In summary, our observations indicate that not only the decreased peripheral CD4⁺ CD25⁺ Treg cell percentages, but also their altered function may be responsible for their insufficient regulatory operation in pSS.

In systemic sclerosis (SSc), we observed increased Th17 cell percentages, while the ratios of the regulatory cells, such as IL-10-producing Tr1 and CD4⁺ CD25⁺ Treg cells were decreased. The levels of IL-10 and the suppressor activity of CD4⁺ CD25⁺ Treg cells were also lower in patients. Moreover, we revealed a negative correlation between the modified Rodnan skin score and Tr1 cell percentages, which indicates that beside the altered Th17/CD4⁺ CD25⁺ Treg ratio, the role of Tr1 cells may be also important in the progression of disproportionate immune responses in SSc.

During the investigation of the clinical efficacy of extracorporeal photopheresis (ECP) in SSc, in accordance with the earlier studies, we observed significant amelioration of symptoms. Since the immunobiological effects of ECP have not been investigated in SSc before our study, all of the laboratory results are novel observations in the international literature.

According to our results, ECP treatments reduce the number of Th17 cells, and increase the number of Tr1 and CD4⁺ CD25⁺ Treg cells in the peripheral blood. Moreover, the therapy improves the suppressor capacity of Treg cells in SSc patients. Levels of CCL2 and TGF-beta decreased, while levels of IL-1Ra, IL-10 and HGF increased. Thus ECP contributes to the restoration of the balance between regulatory and effector immune mechanisms leading to the deceleration of disease progression.

7. IRODALOMJEGYZÉK

7.1. Hivatkozott közlemények jegyzéke

1. Gergely J, Rajnavölgyi É. Immunológiai tolerancia és autoimmunitás. In: Gergely J, Erdei A (szerk.): Immunbiológia. 280-298. Medicina, Budapest. 2000.
2. Szegedi Gy. Az autoimmun betegségek sajátosságai. LAM. 2004;14:739-746.
3. Thomas E, Hay EM, Hajeer A, Silman AJ. Sjögren's syndrome: a community-based study of prevalence and impact. Br J Rheumatol. 1998;37:1069-76.
4. Szanto A, Szodoray P, Kiss E, Kapitany A, Szegedi G, Zeher M. Clinical, serologic, and genetic profiles of patients with associated Sjögren's syndrome and systemic lupus erythematosus. Hum Immunol. 2006;67:924-30.
5. Zeher M. Sjögren-szindróma. In: Czirják L (szerk.): Klinikai Immunológia. 215-224. Medicina. Budapest. 2006.
6. Zeher M. Sjögren's syndrome. In: Zeher M, Szodoray P (editors): Sjögren's syndrome and associated disorders. 1-25. Transworld Research Network. Kerala, India. 2009.
7. Nagy G, Kovács J, Zeher M, Czirják L. Analysis of the oral manifestations of systemic sclerosis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1994;77:141-6.
8. Hulkkonen J, Pertovaara M, Anttonen J, Lahdenperhoja N, Pasternack A, Hurme M. Genetic association between interleukin-10 promoter region polymorphisms and primary Sjögren's syndrome. Arthritis Rheum. 2001;44:176-9.
9. Perrot S, Calvez V, Escande JP, Dupin N, Marcelin AG. Prevalences of herpesviruses DNA sequences in salivary gland biopsies from primary and secondary Sjögren's syndrome using degenerated consensus PCR primers. J Clin Virol. 2003;28:165-8.
10. Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, Daniels TE, Fox PC, Fox RI, Kassan SS, Pillemer SR, Talal N, Weisman MH. European Study Group on Classification Criteria for Sjogren's syndrome. Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European

criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis.* 2002;61:554-558.

11. Daniels TE, Fox PC. Salivary and oral components of Sjögren's syndrome. *Rheum Dis Clin North Am.* 1992;18:571-89.
12. Ohlsson M, Jonsson R, Brokstad KA. Subcellular redistribution and surface exposure of the Ro52, Ro60 and La48 autoantigens during apoptosis in human ductal epithelial cells: a possible mechanism in the pathogenesis of Sjögren's syndrome. *Scand J Immunol.* 2002;56:456-69.
13. Matsumura R, Umemiya K, Kagami M, Tomioka H, Tanabe E, Sugiyama T, Sueishi M, Nakajima A, Azuma M, Okumura K, Sumida T. Glandular and extraglandular expression of the Fas-Fas ligand and apoptosis in patients with Sjögren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol.* 1998;16:561-8.
14. Kong L, Ogawa N, Nakabayashi T, Liu GT, D'Souza E, McGuff HS, Guerrero D, Talal N, Dang H. Fas and Fas ligand expression in the salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 1997;40:87-97.
15. Ohlsson M, Szodoray P, Loro LL, Johannessen AC, Jonsson R. CD40, CD154, Bax and Bcl-2 expression in Sjögren's syndrome salivary glands: a putative anti-apoptotic role during its effector phases. *Scand J Immunol.* 2002;56:561-71.
16. Zeher M, Szodoray P, Gyimesi E, Szondy Z. Correlation of increased susceptibility to apoptosis of CD4⁺ T cells with lymphocyte activation and activity of disease in patients with primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 1999;42:1673-81.
17. Tengnér P, Halse AK, Haga HJ, Jonsson R, Wahren-Herlenius M. Detection of anti-Ro/SSA and anti-La/SSB autoantibody-producing cells in salivary glands from patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 1998;41:2238-48.
18. Humphreys-Beher MG, Brayer J, Yamachika S, Peck AB, Jonsson R. An alternative perspective to the immune response in autoimmune exocrinopathy: induction of functional quiescence rather than destructive autoaggression. *Scand J Immunol.* 1999;49:7-10.

19. Mariette X, Roux S, Zhang J, Bengoufa D, Lavie F, Zhou T, Kimberly R. The level of BLyS (BAFF) correlates with the titre of autoantibodies in human Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2003;62:168-71.
20. Szodoray P, Alex P, Jonsson MV, Knowlton N, Dozmorov I, Nakken B, Delaleu N, Jonsson R, Centola M. Distinct profiles of Sjögren's syndrome patients with ectopic salivary gland germinal centers revealed by serum cytokines and BAFF. *Clin Immunol*. 2005;117:168-76.
21. Illes A, Varoczy L, Papp G, Wilson PC, Alex P, Jonsson R, Kovacs T, Konttinen YT, Zeher M, Nakken B, Szodoray P. Aspects of B-cell non-Hodgkin's lymphoma development: a transition from immune-reactivity to malignancy. *Scand J Immunol*. 2009;69:387-400.
22. Fehérvári Z, Sakaguchi S. A paragon of self-tolerance: CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells and the control of immune responses. *Arthritis Res Ther*. 2004;6:19-25.
23. Roncarolo MG, Bacchetta R, Bordignon C, Narula S, Levings M. K. Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev*. 2001;182:68-79.
24. Weiner H. L. Induction and mechanism of action of transforming growth factor- β -secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev*. 2007;182:207-214.
25. Li X, Li X, Qian L, Wang G, Zhang H, Wang X, Chen K, Zhai Z, Li Q, Wang Y, Harris DC. T regulatory cells are markedly diminished in diseased salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome. *J Rheumatol*. 2007;34:2438-45.
26. Liu MF, Lin LH, Weng CT, Weng MY. Decreased CD4⁺CD25⁺bright T cells in peripheral blood of patients with primary Sjogren's syndrome. *Lupus*. 2008;17:34-9.
27. Gottenberg JE, Lavie F, Abbed K, Gasnault J, Le Nevot E, Delfraissy JF, Taoufik Y, Mariette X. CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells are not impaired in patients with primary Sjögren's syndrome. *J Autoimmun*. 2005;24:235-42.
28. Barnes J, Mayes MD. Epidemiology of systemic sclerosis: incidence, prevalence, survival, risk factors, malignancy, and environmental triggers. *Curr Opin Rheumatol*. 2012;24:165-70.

29. Czirják L. Szisztémás sclerosis. In: Czirják L (szerk.): Klinikai Immunológia. 162-176. Medicina. Budapest. 2006.
30. Mayes MD, Lacey JV Jr, Beebe-Dimmer J, Gillespie BW, Cooper B, Laing TJ, Schottenfeld D. Prevalence, incidence, survival, and disease characteristics of systemic sclerosis in a large US population. *Arthritis Rheum.* 2003;48:2246-55.
31. Vonk MC, van den Hoogen FH, van Riel PL, Valentini G. What does the clinician need to improve patient care in systemic sclerosis? *Ann Rheum Dis.* 2007;66:1129-31.
32. Ngian GS, Sahhar J, Wicks IP, Van Doornum S. Cardiovascular disease in systemic sclerosis--an emerging association? *Arthritis Res Ther.* 2011;13:237.
33. Bassotti G, Battaglia E, Debernardi V, Germani U, Quiriconi F, Dughera L, Buonafede G, Puiatti P, Morelli A, Spinozzi F, Mioli PR, Emanuelli G. Esophageal dysfunction in scleroderma: relationship with disease subsets. *Arthritis Rheum.* 1997;40:2252-9.
34. Tan FK, Arnett FC. Genetic factors in the etiology of systemic sclerosis and Raynaud phenomenon. *Curr Opin Rheumatol.* 2000;12:511-9.
35. Broen JC, Coenen MJ, Radstake TR. Genetics of systemic sclerosis: an update. *Curr Rheumatol Rep.* 2012;14:11-21.
36. Czirják L, Kumánovics G. Exposure to solvents in female patients with scleroderma. *Clin Rheumatol.* 2002;21:114-8.
37. Kahaleh MB. Raynaud phenomenon and the vascular disease in scleroderma. *Curr Opin Rheumatol.* 2004;16:718-22.
38. Chatterjee S. Management of Raynaud's Phenomenon in the Patient with Connective Tissue Disease. *Curr Treat Options Cardiovasc Med.* 2010;12:185-204.
39. Roumm AD, Whiteside TL, Medsger TA Jr, Rodnan GP. Lymphocytes in the skin of patients with progressive systemic sclerosis. Quantification, subtyping, and clinical correlations. *Arthritis Rheum.* 1984;27:645-53.

40. Sakkas LI, Platsoucas CD. Is systemic sclerosis an antigen-driven T cell disease? *Arthritis Rheum.* 2004;50:1721-33.
41. Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, Flores-Romo L, Ait-Yahia S, Maat C, Pin JJ, Garrone P, Garcia E, Saeland S, Blanchard D, Gaillard C, Das Mahapatra B, Rouvier E, Golstein P, Banchereau J, Lebecque S. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med.* 1996;183:2593-603.
42. Deleuran B, Abraham DJ. Possible implication of the effector CD4⁺ T-cell subpopulation TH17 in the pathogenesis of systemic scleroderma. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2007;3:682-3.
43. Kurasawa K, Hirose K, Sano H, Endo H, Shinkai H, Nawata Y, Takabayashi K, Iwamoto I. Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2000;43:2455-63.
44. Murata M, Fujimoto M, Matsushita T, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Takehara K, Komura K, Sato S. Clinical association of serum interleukin-17 levels in systemic sclerosis: is systemic sclerosis a Th17 disease? *J Dermatol Sci.* 2008;50:240-2.
45. Hasegawa M, Sato S, Fujimoto M, Ihn H, Kikuchi K, Takehara K. Serum levels of interleukin 6 (IL-6), oncostatin M, soluble IL-6 receptor, and soluble gp130 in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 1998;25:308-13.
46. Radstake TR, van Bon L, Broen J, Wenink M, Santegoets K, Deng Y, Hussaini A, Simms R, Cruikshank WW, Lafyatis R. Increased frequency and compromised function of T regulatory cells in systemic sclerosis (SSc) is related to a diminished CD69 and TGFbeta expression. *PLoS One.* 2009;4:e5981.
47. Slobodin G, Ahmad MS, Rosner I, Peri R, Rozenbaum M, Kessel A, Toubi E, Odeh M. Regulatory T cells (CD4⁺)CD25(bright)FoxP3⁺) expansion in systemic sclerosis correlates with disease activity and severity. *Cell Immunol.* 2010;261:77-80.
48. Giovannetti A, Rosato E, Renzi C, Maselli A, Gambardella L, Giammarioli AM, Palange P, Paoletti P, Pisarri S, Salsano F, Malorni W, Pierdominici M. Analyses of T cell phenotype and function reveal an altered T cell homeostasis in systemic

sclerosis. Correlations with disease severity and phenotypes. *Clin Immunol.* 2010;137:122-33.

49. Banica L, Besliu A, Pistol G, Stavaru C, Ionescu R, Forsea AM, Tanaseanu C, Dumitrache S, Otelea D, Tamsulea I, Tanaseanu S, Chitonu C, Paraschiv S, Balteanu M, Stefanescu M, Matache C. Quantification and molecular characterization of regulatory T cells in connective tissue diseases. *Autoimmunity.* 2009;42:41-9.
50. Harris ML, Rosen A. Autoimmunity in scleroderma: the origin, pathogenetic role, and clinical significance of autoantibodies. *Curr Opin Rheumatol.* 2003;15:778-84.
51. Baroni SS, Santillo M, Bevilacqua F, Luchetti M, Spadoni T, Mancini M, Fraticelli P, Sambo P, Funaro A, Kazlauskas A, Avvedimento EV, Gabrielli A. Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor in systemic sclerosis. *N Engl J Med.* 2006;354:2667-76.
52. Chizzolini C, Brembilla NC, Montanari E, Truchetet ME. Fibrosis and immune dysregulation in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev.* 2011;10:276-81.
53. Bhattacharyya S, Wei J, Varga J. Understanding fibrosis in systemic sclerosis: shifting paradigms, emerging opportunities. *Nat Rev Rheumatol.* 2011;8:42-54.
54. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGF β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity.* 2006;24:179-89.
55. Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor- β and induction of the nuclear receptor ROR γ . *Nat Immunol.* 2008;9:641-9.
56. Yoo EK, Rook AH, Elenitsas R, Gasparro FP, Vowels BR. Apoptosis induction of ultraviolet light A and photochemotherapy in cutaneous T-cell Lymphoma: relevance to mechanism of therapeutic action. *J Invest Dermatol.* 1996;107:235-42.

57. Szodoray P, Papp G, Nakken B, Harangi M, Zeher M. The molecular and clinical rationale of extracorporeal photochemotherapy in autoimmune diseases, malignancies and transplantation. *Autoimmun Rev.* 2010;9:459-64.
58. Di Renzo M, Rubegni P, Sbrano P, Cuccia A, Castagnini C, Pompella G, Pasqui AL, Capecchi PL, Auteri A, Laghi Pasini F, Fimiani M. ECP-treated lymphocytes of chronic graft-versus-host disease patients undergo apoptosis which involves both the Fas/FasL system and the Bcl-2 protein family. *Arch Dermatol Res.* 2003;295:175-82.
59. Enk AH. Dendritic cells in tolerance induction. *Immunol Lett.* 2005;99:8-11.
60. Gorgun G, Miller KB, Foss FM. Immunologic mechanisms of extracorporeal photochemotherapy in chronic graft-versus-host disease. *Blood.* 2002;100:941-7.
61. Biagi E, Di Biaso I, Leoni V, Gaipa G, Rossi V, Bugarin C, Renoldi G, Parma M, Balduzzi A, Perseghin P, Biondi A. Extracorporeal photochemotherapy is accompanied by increasing levels of circulating CD4+CD25+GITR+Foxp3+CD62L+ functional regulatory T-cells in patients with graft-versus-host disease. *Transplantation.* 2007;84:31-9.
62. Gatz E, Rogers CE, Clouthier SG, Lowler KP, Tawara I, Liu C, Reddy P, Ferrara JL. Extracorporeal photopheresis reverses experimental graft-versus-host disease through regulatory T cells. *Blood.* 2008;112:1515-21.
63. Loser K, Apelt J, Voskort M, Mohaupt M, Balkow S, Schwarz T, Grabbe S, Beissert S. IL-10 controls ultraviolet-induced carcinogenesis in mice. *J Immunol.* 2007;179:365-71.
64. Maeda A, Schwarz A, Bullinger A, Morita A, Peritt D, Schwarz T. Experimental extracorporeal photopheresis inhibits the sensitization and effector phases of contact hypersensitivity via two mechanisms: generation of IL-10 and induction of regulatory T cells. *J Immunol.* 2008;181:5956-62.
65. Reynolds NJ, Franklin V, Gray JC, Diffey BL, Farr PM. Narrow-band ultraviolet B and broad-band ultraviolet A phototherapy in adult atopic eczema: a randomised controlled trial. *Lancet.* 2001;357:2012-6.

66. Foss FM, DiVenuti GM, Chin K, Sprague K, Grodman H, Klein A, Chan G, Stiffler K, Miller KB. Prospective study of extracorporeal photopheresis in steroid-refractory or steroid-resistant extensive chronic graft-versus-host disease: analysis of response and survival incorporating prognostic factors. *Bone Marrow Transplant*. 2005;35:1187-93.
67. Zic JA. The treatment of cutaneous T-cell lymphoma with photopheresis. *Dermatol Ther*. 2003;16:337-46.
68. Barr ML, Baker CJ, Schenkel FA, McLaughlin SN, Stouch BC, Starnes VA, Rose EA. Prophylactic photopheresis and chronic rejection: effects on graft intimal hyperplasia in cardiac transplantation. *Clin Transplant*. 2000;14:162-6.
69. Cavaletti G, Perseghin P, Dassi M, Cavarretta R, Frigo M, Caputo D, Stanzani L, Tagliabue E, Zoia C, Grimaldi M, Isella V, Rota S, Ferrarese C, Frattola L. Extracorporeal photochemotherapy: a safety and tolerability pilot study with preliminary efficacy results in refractory relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurol Sci*. 2006;27:24-32.
70. Sand M, Bechara FG, Sand D, Radenhausen M, Tomi NS, Altmeyer P, Hoffmann K. Extracorporeal photopheresis as a treatment for patients with severe, refractory atopic dermatitis. *Dermatology*. 2007;215:134-8.
71. Bisaccia E, Palangio M, Gonzalez J. Extracorporeal photochemotherapy for the treatment of refractory Crohn's disease. *Transfus Apher Sci*. 2007;37:171-4.
72. Knobler RM, French LE, Kim Y, Bisaccia E, Graninger W, Nahavandi H, Strobl FJ, Keystone E, Mehlmauer M, Rook AH, Braverman I; Systemic Sclerosis Study Group. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of photopheresis in systemic sclerosis. *J Am Acad Dermatol*. 2006;54:793-9.
73. Hashikabe M, Ohtsuka T, Yamazaki S. Quantitative echographic analysis of photochemotherapy on systemic sclerosis skin. *Arch Dermatol Res*. 2005;296:522-7.
74. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger TA Jr, Rowell N, Wollheim F. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol*. 1988;15:202-5.

75. Khanna D, Merkel PA. Outcome measures in systemic sclerosis: an update on instruments and current research. *Curr Rheumatol Rep.* 2007; 9: 151-157.
76. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature.* 2006;441:235-8.
77. Pasare C, Medzhitov R. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science.* 2003;299:1033-6.
78. Valencia X, Stephens G, Goldbach-Mansky R, Wilson M, Shevach EM, Lipsky PE. TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells. *Blood.* 2006;108:253-61.
79. Korn T, Reddy J, Gao W, Bettelli E, Awasthi A, Petersen TR, Bäckström BT, Sobel RA, Wucherpfennig KW, Strom TB, Oukka M, Kuchroo VK. Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nat Med.* 2007;13:423-31.
80. Deniz G, Erten G, Küçüksezer UC, Kocacik D, Karagiannidis C, Aktas E, Akdis CA, Akdis M. Regulatory NK cells suppress antigen-specific T cell responses. *J Immunol.* 2008;180:850-7.
81. Horikawa M, Hasegawa M, Komura K, Hayakawa I, Yanaba K, Matsushita T, Takehara K, Sato S. Abnormal natural killer cell function in systemic sclerosis: altered cytokine production and defective killing activity. *J Invest Dermatol.* 2005;125:731-7.
82. Needleman BW, Wigley FM, Stair RW. Interleukin-1, interleukin-2, interleukin-4, interleukin-6, tumor necrosis factor alpha, and interferon-gamma levels in sera from patients with scleroderma. *Arthritis Rheum.* 1992;35:67-72.
83. Suzuki J, Morimoto S, Amano H, Tokano Y, Takasaki Y, Hashimoto H. Serum levels of interleukin 15 in patients with rheumatic diseases. *J Rheumatol.* 2001;28:2389-91.
84. van Lieshout AW, Vonk MC, Bredie SJ, Joosten LB, Netea MG, van Riel PL, Lafyatis R, van den Hoogen FH, Radstake TR. Enhanced interleukin-10 production by dendritic cells upon stimulation with Toll-like receptor 4 agonists

in systemic sclerosis that is possibly implicated in CCL18 secretion. *Scand J Rheumatol.* 2009;38:282-90.

85. Hudson M, Walker JG, Fritzler M, Taillefer S, Baron M. Hypocomplementemia in systemic sclerosis-clinical and serological correlations. *J Rheumatol.* 2007;34:2218-23.
86. Samimi S, Rook AH. The relevance of photopheresis to autoreactive diseases. *Clin Immunol.* 2012;142:97-100.
87. Bladon J, Taylor P. Extracorporeal photopheresis normalizes some lymphocyte subsets (including T regulatory cells) in chronic graft-versus-host-disease. *Ther Apher Dial.* 2008;12:311-8.
88. Paulsen M, Janssen O. Pro- and anti-apoptotic CD95 signaling in T cells. *Cell Commun Signal.* 2011;9:7.
89. Arend WP, Guthridge CJ. Biological role of interleukin 1 receptor antagonist isoforms. *Ann Rheum Dis.* 2000;59 Suppl 1:i60-4.
90. Sakkas LI, Chikanza IC, Platsoucas CD. Mechanisms of Disease: the role of immune cells in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2006;2:679-85.
91. Hummers LK, Hall A, Wigley FM, Simons M. Abnormalities in the regulators of angiogenesis in patients with scleroderma. *J Rheumatol.* 2009;36:576-82.

7.2. Saját közlemények jegyzéke

7.2.1. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Papp G**, Horvath IF, Barath S, Gyimesi E, Vegh J, Szodoray P, Zeher M. Immunomodulatory effects of extracorporeal photochemotherapy in systemic sclerosis. Clin Immunol 2012;142:150-9. **IF: 3,932**
2. **Papp G**, Horvath IF, Barath S, Gyimesi E, Sipka S, Szodoray P, Zeher M. Altered T-cell and regulatory cell repertoire in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis. Scand J Rheumatol. 2011;40:205-10. **IF: 2,594**
3. **Papp G**, Horváth IF, Baráth S, Sipka S, Szodoray P, Zeher M. Immunregulatorikus sejtek vizsgálata primer Sjögren-szindrómában. Allergológia és Klinikai Immunológia. 2009;11:28-33.
4. Szodoray P, **Papp G***, Horvath IF, Barath S, Sipka S, Nakken B, Zeher M. Cells with regulatory function of the innate and adaptive immune system in primary Sjögren's syndrome. Clin Exp Immunol. 2009;157:343-9. **IF: 3,009**
(* megosztott első szerző)

7.2.2. További közlemények

5. Szodoray P, Varoczy L, **Papp G**, Barath S, Nakken B, Szegedi G, Zeher M. Immunological reconstitution after autologous stem cell transplantation in patients with refractory systemic autoimmune diseases. Scand J Rheumatol. 2012;41:110-5. **IF: 2,594**
6. Takáts A, Garai I, **Papp G**, Hevér T, Csiki E, András C, Csiki Z. Raynaud-szindróma, 2011. Orv Hetil. 2012;153:403-9.
7. Zilahi E, Tarr T, **Papp G**, Griger Z, Sipka S, Zeher M. Increased microRNA-146a/b, TRAF6 gene and decreased IRAK1 gene expressions in the peripheral mononuclear cells of patients with Sjögren's syndrome. Immunol Lett. 2012;141:165-8. **IF: 2,511**
8. Baráth S, Tarr T, Bodolay E, **Papp G**, Illés Á, Soltész P, Szegedi A, Zeher M, Sipka S. A CD3+Foxp3+ regulációs T-lymphocyták vizsgálata immunológiai és immunhematológiai kórképekben. Magyar Belorv Arch. 2011;64:99-103.
9. Csiki Z, Kovács D, Csiki E, András C, **Papp G**, Paragh G. A laktózérzékenység gyakorlati vonatkozásai. Metabolizmus. 2011;9:180-3.
10. Csiki Z, Garai I, Shemirani AH, **Papp G**, Zsori KS, Andras C, Zeher M. The effect of metoprolol alone and combined metoprolol-felodipin on the digital microcirculation of patients with primary Raynaud's syndrome. Microvasc Res. 2011;82:84-7. **IF: 2,39**
11. Zeher M, **Papp G**, Szodoray P. Autologous haemopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases. Expert Opin Biol Ther. 2011;11:1193-201. **IF: 3,279**

12. Csiki Z, Zeher M, **Papp G**, András Cs, Takáts A, Csiki E. Pre- pro- és szinbiotikumok szerepe, kedvező élettani hatásai. Metabolizmus. 2010;8:294-9.

13. Szodoray P, **Papp G***, Nakken B, Harangi M, Zeher M. The molecular and clinical rationale of extracorporeal photochemotherapy in autoimmune diseases, malignancies and transplantation. Autoimmun Rev. 2010;9:459-64. **IF: 6,556**
(* megosztott első szerző)

14. Szodoray P, Horvath IF, **Papp G**, Barath S, Gyimesi E, Csathy L, Kappelmayer J, Sipka S, Duttaray AK, Nakken B, Zeher M. The immunoregulatory role of vitamin A, D and E in patients with primary Sjogren's syndrome. Rheumatology (Oxford) 2010;49:211-7. **IF: 4,171**

15. Illes A, Varoczy L, **Papp G**, Wilson PC, Alex P, Jonsson R, Kovacs T, Kontinen YT, Zeher M, Nakken B, Szodoray P. Aspects of B-cell non-Hodgkin's lymphoma development: A transition from immune-reactivity to malignancy. Scand J Immunol. 2009;69:387-400. **IF: 2,108**

Lektorált közlemények száma: 15

Ebből angol nyelvű: 10

Összesített impakt faktor: 33,144

Összesített impakt faktor (első szerzős közlemények): 16,091

Összesített impakt factor (értekezés alapjául szolgáló közlemények): 9,535

Hivatkozások száma: 28

8. TÁRGYSZAVAK

Sjögren-szindróma, szisztémás sclerosis, regulatív sejtek, T-helper sejtek, extrakorporális fotoferezis, klinikai és immunológiai hatások

KEYWORDS

Sjögren's syndrome, systemic sclerosis, regulative cells, T-helper cells, extracorporeal photopheresis, clinical and immunological effects

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt Zeher Margit professzornőnek, a III. sz. Belgyógyászati Klinika igazgatójának tartozom hálás köszönettel, aki már egyetemi hallgató koromban szárnyai alá vett, megszerettetve velem a klinikai immunológiát, és rávezetett a precíz és szorgalmas munkavégzésre. Folyamatos figyelme, támogatása és ösztönzése nélkülözhetetlen volt ahhoz, hogy tudományos közleményeim és doktori értekezésem elkészüljenek.

Megköszönöm Szegedi Gyula akadémikus professzor úrnak, hogy figyelemmel kísérte munkámat, és segített abban, hogy nyomon követhessem a témámhoz kapcsolódó szakirodalom újdonságait.

Köszönöm Sipka Sándor professzor úrnak, a Regionális Immunológiai Laboratórium vezetőjének a jó tanácsait, amikkel laboratóriumi kutatásaimat elősegítette.

Köszönetet mondok Szodoray Péternek a szakmai és emberi segítségéért, mellyel munkám során támogatott.

Köszönettel tartozom közeli munkatársaimnak: Horváth Ildikó Fannynak, Baráth Sándornak, Gyimesi Editnek és Hodosi Katalinnak az önzetlen segítségükért, mellyel munkám során támogattak.

Hálás vagyok cikkeim társszerzőinek, illetve minden jelenlegi és volt munkatársamnak, akikkel a kialakult harmonikus kapcsolat hozzájárult értekezésem elkészüléséhez.

Megköszönöm a Regionális Immunlabor minden tagjának azt a támogatást, amit a laboratóriumban eltöltött éveim alatt kaptam.

Végezetül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni szüleimnek az állhatatos szeretetüket és folytonos támogatásukat, illetve feleségemnek a szerető türelmét és biztatását.

10. FÜGGELÉK

A Kenézy Élettudományi Könyvtár igazolása, illetve az értekezés alapjául szolgáló,
impakt faktoral rendelkező saját publikációk és kéziratok gyűjteménye

Iktatószám: DEENKÉTK /102/2012.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Papp Gábor

Neptun kód: CTWQKX

Doktori Iskola: Petrányi Gyula Klinikai Immunbiológiai és Allergológiai Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Papp, G.**, Horváth, I.F., Baráth, S., Gyimesi, E., Végh, J., Szodoray, P., Zeher, M.:
Immunomodulatory effects of extracorporeal photochemotherapy in systemic sclerosis.
Clin. Immunol. 142 (2), 150-159, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2011.09.014>
IF:3.932 (2010)
2. **Papp, G.**, Horváth, I.F., Baráth, S., Gyimesi, E., Sipka, S., Szodoray, P., Zeher, M.: Altered T-cell and regulatory cell repertoire in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis.
Scand. J. Rheumatol. 40 (3), 205-210, 2011.
IF:2.594 (2010)
3. **Papp G.**, Horváth I.F., Baráth S., Sipka S., Szodoray P., Zeher M.: Immunregulatorikus sejtek vizsgálata primer Sjögren-szindrómában.
Allerg. Klin. Immun. 12 (1), 28-33, 2009.
4. Szodoray, P., **Papp, G.**, Horváth, I.F., Baráth, S., Sipka, S., Nakken, B., Zeher, M.: Cells with regulatory function of the innate and adaptive immune system in primary Sjögren's syndrome.
Clin. Exp. Immunol. 157 (3), 343-349, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2249.2009.03966.x>
IF:3.009



További Közlemények

5. Szodoray, P., Váróczy, L., **Papp, G.**, Baráth, S., Nakken, B., Szegedi, G., Zeher, M.: Immunological reconstitution after autologous stem cell transplantation in patients with refractory systemic autoimmune diseases.
Scand. J. Rheumatol. 41 (2), 110-115, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3109/03009742.2011.606788>
IF:2.594 (2010)
6. Takáts A., Garai I., **Papp G.**, Hevér T., Csiki E., András C., Csiki Z.: Raynaud-szindróma, 2011.
Orv. Hetil. 153 (11), 403-409, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2012.29321>
7. Zilahi, E., Tarr, T., **Papp, G.**, Griger, Z., Sipka, S., Zeher, M.: Increased microRNA-146a/b, TRAF6 gene and decreased IRAK1 gene expressions in the peripheral mononuclear cells of patients with Sjögren's syndrome.
Immunol. Lett. 141 (2), 165-168, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2011.09.006>
IF:2.511 (2010)
8. Baráth S., Tarr T., Bodolay E., **Papp G.**, Illés Á., Soltész P., Szegedi A., Zeher M., Sipka S.: A CD3+Foxp3+ regulációs T-lymphocyták vizsgálata immunológiai és immunhematológiai kórképekben.
Magyar Belorv. Arch. 64, 99-103, 2011.
9. Csiki Z., Kovács D., Csiki E., András C., **Papp G.**, Paragh G.: A laktózzérékenység gyakorlati vonatkozásai.
Metabolizmus 9 (3), 180-183, 2011.
10. Csiki, Z., Garai, I., Shemirani, A., **Papp, G.**, Zsóri, K.S., András, C., Zeher, M.: The effect of metoprolol alone and combined metoprolol-felodipin on the digital microcirculation of patients with primary Raynaud's syndrome.
Microvasc. Res. 82 (1), 84-87, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mvr.2011.04.004>
IF:2.39 (2010)
11. Zeher, M., **Papp, G.**, Szodoray, P.: Autologous haemopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases.
Expert Opin. Biol. Ther. 11 (9), 1193-1201, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1517/14712598.2011.580272>

IF:3.279 (2010)

12. Csiki Z., Zeher M., **Papp G.**, András C., Takáts A., Csiki E.: Pre- pro- és szinbiotikumok szerepe, kedvező élettani hatásai.
Metabolizmus 8 (5), 294-299, 2010.
13. Szodoray, P., **Papp, G.**, Nakken, B., Harangi, M., Zeher, M.: The molecular and clinical rationale of extracorporeal photochemotherapy in autoimmune diseases, malignancies and transplantation.
Autoimmun. Rev. 9 (6), 459-464, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2009.12.011>
IF:6.556
14. Szodoray, P., Horváth, I.F., **Papp, G.**, Baráth, S., Gyimesi, E., Csáthy, L., Kappelmayer, J., Sipka, S., Duttaroy, A.K., Nakken, B., Zeher, M.: The immunoregulatory role of vitamins A, D and E in patients with primary Sjogren's syndrome.
Rheumatology (Oxford). 49 (2), 211-217, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/rheumatology/kep374>
IF:4.171
15. Illés, Á., Váróczy, L., **Papp, G.**, Wilson, C.P., Alex, P., Jonsson, R., Kovács, T., Kontinen, Y.T., Zeher, M., Nakken, B., Szodoray, P.: Aspects of B-cell non-Hodgkin's lymphoma development: A transition from immune-reactivity to malignancy.
Scand. J. Immunol. 69 (5), 387-400, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3083.2009.02237.x>
IF:2.108

Összesített impakt faktor: 33.144

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 9.535

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2012.04.02

