

Doktori (Ph.D.) – értekezés tézis

**A CD44 ÉS L-SZELEKTIN LEUKOCITA-ENDOTÉL
INTERAKCIÓKBAN BETÖLTÖTT SZEREPÉNEK
VIZSGÁLATA GYULLADÁSOS EGÉRMODELLEKBEN**

GONDA ANDREA DR.

Témavezetők:

Prof. Dr. Hunyadi János, M.D., D.Sc.

Prof. Dr. Mikecz Katalin, M.D., D.Sc.

Debreceni Egyetem
Orvos- és Egészségtudományi Centrum
DEBRECEN

2006

Bevezetés

A szervezetet érő gyulladásos stimulus hatására intenzív fehérvérsejt áramlás indul az érintett szövet felé. A posztkapilláris venulák területén végbemenő leukocita extravazációt a gyulladásos sejtek érfallal történő laza kapcsolódása előzi meg, mely megteremti a feltételét az endotél mentén végbemenő gördülő mozgásnak (rolling). Ez utóbbi reverzibilis tapadás során a leukociták mozgása lelassul, a lokálisan felszabaduló kemokinek hatására a fehérvérsejtek aktiválódnak és alkalmassá válnak az immár irreverzibilisnek tekinthető szoros adhézióra, mely közvetlenül megelőzi a fehérvérsejtek érpályából történő kilépését.

Ez a máig nem minden részletében ismert folyamat különböző, a fehérvérsejtek, ill. az endotélsejtek felszínén lévő adhéziós molekulák közötti specifikus interakció eredménye. A laza kapcsolódás és gördülő mozgás létrejöttében a szelektinek (L-szelektin, E-szelektin, P-szelektin) és karbohidrát ligandjainak kapcsolódása döntő jelentőséggel bír.

Az L(leukocita)-szelektin (CD62L) a fehérvérsejtek felszínén konstitutívan expresszálódik. Kimutatták, hogy az L-szelektin molekulához kapcsolódó karbohidrát komponensek (sialyl Lewis^x) a vaszkuláris E- és P-szelektinek számára ligandként szolgálnak, emellett a gyulladásos sejtek lelassulását egy szekunder adhéziós mechanizmus, a sejt felszíni L-szelektin valamint a fehérvérsejtek PSGL-1 (P-szelektin glikoprotein ligand-1) molekulái közötti kapcsolódás, tehát egy leukocita-leukocita interakció is segíti. Az L-szelektin molekula központi jelentőségű a limfociták regionális nyirokcsomókba történő vándorlásában („homing”).

Az E-és P-szelektinek gyulladásos stimulus hatására az endotél sejtek felszínén expresszálódnak, ligandjaik a leukociták felszínén található glikoproteinek (pl. P-szelektin glikoprotein ligand 1, PSGL-1). A P-szelektin molekula az endotél sejtek ún. Weibel-Palade testecskéiben, valamint a vérlemezkék α -granulumaiban preformáltan jelen van, és akut

gyulladás esetén innen rapidan mobilizálódik, míg az E-szelektin IL-1, TNF α , vagy más citokinek hatására de novo szintetizálódik.

Proinflammatorikus vagy „homing” kemokinek hatására a gördülő mozgást végző fehérvérsejtek felszínén β_1 (másnéven VLA-4, „very late activation Ag”), vagy β_2 (Mac-1 vagy LFA-1, „leukocyte function Ag”) integrin aktiváció történik, melyek az endotél membránján lévő megfelelő receptoraikkal (VCAM-1, vagy ICAM-1) reakcióba lépve a leukociták megállását és a véráramlás által már nem megszüntethető szoros adhézióját biztosítják. A VLA-4 molekula kivételével az integrinek nem képesek a keringő fehérvérsejtek sejtfalhoz kötésére megelőző rolling mozgás nélkül.

A CD44 molekula egy transzmembrán glikoprotein, mely hasonlóan a szelektinekhez, a leukociták érfal menti gördülését segíti az aktivált endotél felszínén található hialuronsav felismerése és megkötése révén. Számos sejttípus membránjában megtalálható, beleértve a fehérvérsejteket és endotél sejteket is. Az aktivált T sejtek gyulladásos szövetbe történő vándorlásában kulcsfontosságúnak tartják. Proinflammatorikus stimulusok hatására mind sejtfelszíni denzitása, mind hialuronsav kötő képessége változik, ugyanakkor az endotél felszínén is fokozódik a hialuronsav expresszió, s ez a magas lokális ligand sűrűség tovább segíti a CD44 molekula dependens interakciók erősségét.

A CD44 és L-szelektin molekulák működését, esetleges működéskiesésük következményeit számos gyulladásos állatmodellben vizsgálták részben blokkoló antitestek, részben géndeficiens állatok felhasználásával. A kapott eredmények néha ellentmondásosak, ami az adhéziós folyamatban részt vevő molekulák ill. interakcióik még nem teljesen feltérképezett volta miatt enged következtetni.

Az atopiás dermatitisz veleszületett atopiás hajlam alapján kifejlődő, multifaktoriális úton öröklődő, viszketéssel, száraz bőrrel járó, recidíváló gyakori bőrbetegség, mely legtöbbször

már gyermekkorban megjelenik. A betegek közel 80%-ában különböző antigénekkal szemben termelt magas IgE szint mutatható ki. A betegség tüneteinek kifejlődésében a T sejtek kiemelt szereppel bírnak. Immunhisztológiai vizsgálatokkal a dermiszben makrofágok mellett mononukleáris sejtinfiltrációt lehet igazolni, mely főleg aktivált CD4+ T sejtekből áll. A gyulladás akut lézióiban szignifikánsan nő az IL-4, IL-5 citokineket termelő sejtek száma, utalva a Th2 típusú sejtek domináciájára ebben a szakaszban. Krónikus fázisban mindemellett nagyszámú Th1 limfocita is jelen van a dermatitisz területén. Kísérleti állatok protein antigénnel (pl.ovalbumin) történő szenzitizálása után, ugyanazon antigénnel való lokális stimuláció egy bifázisos, Th2 típusú limfociták dominanciájával járó válaszreakciót eredményez. A humánhoz hasonlóan, az állatmodellekben kialakuló, atopiás dermatitiszre emlékeztető gyulladásos reakció az antigén expozíciót követően mastociták beáramlásával illetve szöveti ödémával jellemezhető „azonnali válasszal” kezdődik (immediate-phase response, IPR). 4-6 órával később ezt egy „késői reakció” (late-phase response, LPR) követi, melyet nagyszámú fehérvérsejt dermiszbe áramlása (szövettanilag mononukleáris sejtek, neutrofilek, bazofil-és eozinofil leukociták) illetve a szöveti duzzanat további fokozódása jellemez.

Metilált borjú-szérum-albuminnal (BSA) egereken végzett szubkután/intradermális, illetve intraperitoneális immunizációt követően a vizsgálati állatok térdízületébe ugyanazon antigént injektálva abban arthritisz hozhatunk létre (antigén indukált arthritisz,AIA) . A kialakult gyulladás hasonlóságokat mutat a reumatoid artritiszsel (gyulladásos leukociták szinoviális infiltrációja, szinoviális hiperplázia, porc erozió). Az egér arthritiszek szisztémás autoimmun formáival szemben az AIA kezdete jobban meghatározható, hiszen az intraartikuláris injekció után rövid időn belül kialakul, emiatt a gyulladás paramétereinek időfüggő változásai pontosabban meghatározhatóak.

Célkitűzések

Munkám során CD44, L-szelektin, valamint CD44-L-szelektin dupla deficiens egerekben ovalbuminnal intraperitoneálisan , illetve mBSA-val intrakután/szubkután, valamint intraperitoneálisan végzett immunizációt követően a megfelelő antigénnel allergiás dermatitist illetve antigén indukált artritist hoztunk létre.

A fenti állatmodellek segítségével választ kerestünk a következő kérdésekre:

- 1, Intraperitoneális immunizációt követően L-szelektin hiányában kiváltható-e lokális gyulladásos reakció?
- 2, Az egyes adhéziós molekulák hiánya hogyan befolyásolja a kialakult inflammáció antigén specifikus reakcióit ill. morfológiai jellemzőit?
- 3, A CD44 és L-szelektin molekulák együttes hiánya additív vagy szinergista módon negatív hatással van-e a vizsgált gyulladásos folyamatok paramétereire?
- 4, Intravitalis mikroszkópiával vizsgálva milyen a gyulladásban részt vevő leukociták és az endotél sejtek kölcsönhatásának kinetikája és ezt hogyan befolyásolják a vizsgált adhéziós molekulák?

Anyagok és módszerek

Vizsgálati állatok és immunizációjuk

CD44 deficiens egereket célzott gén disruptioval hoztunk létre, míg az L-szelektin hiányos állatok beszerzése a The Jackson Laboratory-ból történt. Mindkét géndeficiens vonalat BALB/c egerekbe kereszteztük vissza hat generáción keresztül. A CD44 és L-szelektin hiányos állatokat egymással keresztezve kaptuk meg a mindkét molekulára nézve deficiens egereket (dupla knockout).

Allergiás dermatitisz modellje

8-10 hetes vad típusú, CD44, L-szelektin és CD44-L-szelektin dupla deficiens egereket alumínium hidroxid gélben 10µg csirke ovalbuminnal intraperitoneálisan injektáltunk, majd a procedúrát azonos mennyiségű OVA-val 3 hét múlva megismételtük. 2 héttel a második intraperitonealis injekció után a lokális allergiás reakciót 5µg OVA-val váltottuk ki, melyet az immunizált egerek egyik fülének ventrális oldalára intradermálisan fecskendeztünk.

Antigén indukált artritisz (AIA)

A vad típusú és deficiens egerek komplett Freund adjuvánsban (CFA) emulzifikált 100µg mBSA-t kaptak szubkután a talpukba ill. a farok tövébe. Az állatok egy másik csoportja azonos mennyiségű antigént intraperitoneálisan kapott. A beavatkozást mindkét egércsoportban 2 hét múlva megismételtük. 2-3 héttel az immunizáció után az állatok jobb térdízületébe PBS-ben oldott 30µg mBSA-t injektáltunk.

Antigén specifikus immunválasz meghatározása

Az OVA intradermális injektálása után 24 órával, míg az artritiszes állatmodellben az intraartikuláris provokáció után 5 nappal az egereket leöltük, szérumaikat összegyűjtöttük. Az antigén specifikus IgE szinteket ELISA technikával mértük tisztított anti-IgE antitest és biotin konjugált OVA felhasználásával.

Az OVA és BSA specifikus IgG1 és IgG2a antitestek mérése szintén ELISA-val történt. Az OVA- ill. BSA-specifikus antitestek izotípusainak koncentrációját peroxidáz-konjugált patkány anti-egér IgG1-el és IgG2a-val mint szekunder antitestekkel határoztuk meg. A szérum antitest koncentrációkat a megfelelő egér IgG izotípus standardok vagy tisztított egér IgG révén számítottuk ki.

A leölt állatok lépéből (ill. az allergiás dermatitisz modelljében a submandubuláris nyirokcsomókból is) frissen izolált sejteket az OVA és BSA specifikus T sejt válaszok mérésére használtuk. A megfelelő antigén jelenlétében kialakuló T sejt proliferációt az ötödik napon határoztuk meg megmérve a ^3H -thymidine beépülést. Az antigén specifikus T sejt választ (a direkt T sejt proliferációt) stimulációs indexben fejeztük ki, amely az antigén stimulált tenyészetekben és a nem stimulált kultúrákban jelenlévő inkorporált ^3H -thymidine percenkénti beütésszámának arányaként definiálható.

A sejtenyészet felülúszójában ELISA technikával meghatároztuk az interferon- γ (IFN γ), ill. interleukin-4 (IL-4) antigén specifikus termelődését is.

Áramlási cytometria

1 nappal az AIA indukció után az állatok egy részét leöltük, lépsejtjeit izoláltuk, anti egér L-szelektin (MEL-14), ill. anti-CD44 (IRAWB14) antitestekkel inkubáltuk, majd fikoeritein (PE) konjugált streptavidinnel festettük. A korai aktivációs limfocita marker CD69 expresszió meghatározásánál kettős fluoreszcens festést alkalmaztunk (anti-CD3-PE és anti-CD69-FITC a T sejtekenél, valamint biotinilált anti-CD19 és streptavidin-PE anti-CD69-FITC kombinációt a B sejtekenél).

Emellett gyulladásos sejteket gyűjtöttünk a térdízületekből 4, 24 órával, ill. 5 nappal az intraartikuláris mBSA injekció után. A sejtek felszínén a CD44 ill. CD62L molekulákon kívül a granulocita marker Gr1, ill. CD3 expressziót is vizsgáltuk.

4, ill. 24 órával az AIA indukciója után az állatok retroorbitális üregéből vért vettünk, majd felszínükön a leukociták granulocita specifikus adhézios molekuláit vizsgáltuk (L-szelektin, Mac-1, LFA-1, VLA-4, PSGL-1) kettős fluoreszcens festéssel, melynek során a sejteket együtt inkubáltuk biotinilált, vagy PE-konjugált anti Gr1-gyel valamint biotinilált, vagy PE-konjugált adhézios molekula specifikus monoklonális antitesttel.

Intravitális mikroszkópia (IVM)

Az atopiás dermatitiszre emlékeztető allergiás reakció kezdeti fázisának vizsgálata során külön csoportokban vizsgáltuk az oltás előtti (0h), valamint az OVA expositiot követő 1, 2, 6, 12 és 24 órával kialakult leukocita áramlást. Az anesztetizált állatok köré a konstans testhőmérsékletet biztosítása céljából gézt csavartunk, majd üveglapra helyeztük őket. A vizsgálandó fület immerziós olaj segítségével rögzítettük és az intravitális mikroszkóp 10x-es nagyítású objektívje alá helyeztük. A fehérvérsejteket intravénásan adott, *in vivo* adhéziójukat nem befolyásoló, fluoreszcens, sejt-permeábilis, DNS-hez kötődő rhodamine 6G festékkel tettük láthatóvá.

Az egérfül posztkapilláris venuláiban jelentkező fehérvérsejt áramlásról a meghatározott időpontokban 1-1 percre készítettünk felvételeket egy, a mikroszkóphoz csatlakoztatott digitális kamera segítségével „On-screen” caliper segítségével hasonló átmérőjű ereket választottunk ki. A felvételek visszajátszásakor a kapott eredményeket Metavue image analízis számítógépes programmal értékeltük. Vizsgálataink során a következő paramétereket határoztuk meg: *a*, a rolling interakciók frekvenciája (az endotelium mentén egy perc alatt gördülő mozgást végző sejtek száma), *b*, rolling sebesség ($\mu\text{m}/\text{sec}$), *c*, adherens (szorosan tapadó) sejtek száma (legalább 30 másodpercig mozdulatlan sejtek), melyet a vizsgált venula 100 μm hosszú szakaszára vonatkoztattunk.

A BSA-val injektált térdízület szinoviumát az ízület elülső oldaláról közelítettük meg. A bőr átmetszése után a ligamentum patellae-t sterilen felpreparáltuk. A szinoviális membrán szabaddá tétele után az állatokat az intravitális mikroszkóp alá helyeztük. A nyitott térdízület szinoviális szövetét folyamatosan áramoltatott steril meleg (37⁰C) PBS-sel tartottuk nedvesen. A keringő fehérvérsejtek láthatóvá tétele, a „real time” felvételek készítése és értékelése az egérfülnél leírtaknak megfelelően történt.

A gyulladásos reakciók klinikai paramétereinek meghatározása, hisztológia

Az egérfül vastagságát microkaliper segítségével határoztuk meg az intradermális oltás előtt (0 h), valamint 1, 6, 12 és 24 órával az antigén expozíciót követően. Az 1 és 24 órás mérések után az egerek egy részét leöltük és az érintett füleket szövettani feldolgozás céljából eltávolítottuk. Az anyagot részben paraffinba ágyasztuk, a metszeteket hematoxylin-eozinnal, ill. safranin O-val festettük, utóbbit a masztociták identifikálása céljából. A fülek másik részéből immunhisztokémiai vizsgálatok céljából fagyasztott metszetek készültek. A granulocytákat és T helper sejteket biotinilált patkány anti-egér Gr-1, ill. anti CD4 monoklonális antitestekkel jelöltük.

Az AIA modelljében az injekciót követő 4h és 5 nap között meghatározott időpontokban monitoroztuk az egerek térdízületeit, microkaliperrel mérve az ízület átmérőjét.

A BSA-val injektált ízületek szövettani feldolgozása során (az oltás után 4, 24 órával ill. 5 nappal) a térdízületeket formalinban fixáltuk, decalcifikáltuk, majd paraffinba ágyazás után metszettük és hematoxylin-eozinnal festettük.

Statisztikai analízis

Statisztikai analízist az SPSS program 7.5 verzióját használva végeztünk (SPSS, Chicago, IL, USA). Mann-Whitney és Wilcoxon tesztek alkalmaztunk csoportok közötti összehasonításra. A 0.05-nél kisebb P értékeket tekintettük szignifikánsnak.

Eredmények

Sejt felszíni CD44 és L-szelektin expresszio mBSA-immunizált vad típusú, CD44 ill. L-szelektin deficiens, valamint CD44-L-szelektin dupla knockout egerekben

Az mBSA-val végzett immunizálás után a CD44 hiányos egerek lépsejtjei felszínén szignifikánsan kevesebb L-szelektin expresszáldott, mint a vad típusú állatoknál . Ugyanakkor az L-szelektin molekula hiánya nem befolyásolta a a CD44 sejtfelszíni denzitását.

mBSA és OVA specifikus immunválasz a vad típusú, ill. géndeficiens egerekben.

Ismert, hogy L-szelektin molekula hiányában a „naive” T sejtek nyirokcsomóba irányuló „homingja” korlátozott , ezért kután immunizáció során nem alakul ki tökéletes immunválasz az újabb antigén expozíciót követően. Kísérleteink során szubkután/intradermális mBSA immunizációkor az L-szelektin deficiens egerekben valóban szignifikánsan alacsonyabb T sejt stimulációt mértünk, mint a vad típusú, vagy CD44 knockout állatokban, míg az mBSA specifikus IgG termelést nem befolyásolta az L-szelektin molekula hiánya.

Az mBSA intraperitonealis injektálásakor (mikor a regionális nyirokszerv a lép) az L-szelektin deficiens egerekben is a vad ípushoz hasonló normális T sejt választ detektáltunk. Ez a tény megerősíti azt a feltételezést, hogy a limfociták lépbe történő vándorlása (és ottani aktiválódása) nem L-szelektin függő folyamat.

OVA-val történt intraperitonealis szenzitizáció ill. intradermális injekció mérhető mennyiségű antigén-specifikus IgE termelődést eredményezett mind a négy állatcsoportban, megerősítve ezzel a bőrreakció allergiás jellegét.

Az OVA-specifikus szérum IgG1 szint többszöröse volt az antigén ellen termelődött IgG2a mennyiségnek, mely az allergiás reakcióban részt vevő T sejtek populációján belül elsősorban a Th2 típusú sejtek dominanciájára utal.

A vizsgált antigén-specifikus immunglobulinok egyikénél sem tapasztaltunk a mért mennyiségek vonatkozásában szignifikáns különbséget az egyes egércsoportok között.

Az ovalbuminnal immunizált vad típusú és deficiens egerek lépsejtjeit *in vitro* OVA-val stimulálva, azok mérhető mennyiségű Th1 típusú immunválaszra jellemző IFN γ -t termeltek. Ez a citokin azonban körülbelül ezredrésze a hasonló genetikai háttérű (BALB/c) egerek Th1 típusú immunválasz irányába polarizáló antigén-adjuváns komplexel történő immunizálása során mért értékeknek. Az izolált lépsejtek a Th2 típusú immunválaszra jellemző IL-4-ből is detektálható mennyiséget termeltek. Ez a citokin Th1 dominanciájú reakcióban hasonló vizsgálatban csak nyomokban mutatható ki.

Összehasonlítva a lépsejtek illetve az OVA intradermális expozíciója után 24 órával gyűjtött submandibuláris nyirokcsomó sejtek OVA hatására létrejövő stimulációjának mértékét azt tapasztaltuk, hogy L-szelektin izolált hiányában szignifikánsan alacsonyabb volt a stimulációs index a nodális limfociták esetében a lépsejtekéhez képest, tehát károsodott a regionális nyirokcsomókba irányuló limfocita „homing”.

OVA-indukált allergiás dermatitisz, ill. mBSA-indukált AIA klinikai jellemzői a vad típusú ill. géndefektusos egereknél

Az azonnali típusú immunválasznál leírtakhoz hasonlóan 1 órával az OVA intradermális injektálása után a fülkagylók vastagsága növekedni kezdett mind a négy genotípusban. Az OVA oltást követő 6. és 24. óra között a vad típusú ill. L-szelektin deficiens állatokban az érintett fülkagylók vastagsága fokozatosan nőtt, és a caliperrel meghatározott méretek szignifikánsan különböztek az ellenoldali, PBS injekció után kialakult oedemához képest.

Ehhez képest CD44 molekula hiányában ill. a dupla deficiens egerekben csak minimális vastagság növekedést észleltünk.

Az intraperitoneális immunizációt követően a vad típusú, CD44 , valamint L-szelektin deficiens ill. CD44-L-szelektin dupla knockout egerek jobb térdízületébe mBSA-t, a bal oldalra steril PBS-t oltottunk. Az ezt követő 4. óra ill. 5. nap között meghatározott időpontokban monitoroztuk az artritisz létrejöttét. mBSA hatására mind a négy vizsgálati csoportban ízületi duzzanat jelentkezett, melynek kiteljesedését az oltást követően 24 órával láttuk. Az L-szelektin ill. CD44-L-szelektin dupla deficiens állatokban a térd megvastagodása szignifikánsan kisebb mértékű volt a vad típusú egerekéhez képest minden vizsgálati időpontban az oltást követő 12. óra ill. 5. nap közötti intervallumban.

Az egérfülek ill. térdízületek hisztológiai, immunhisztokémiai vizsgálata

Az OVA oltást követő 1 óra múlva feldolgozott fülek szövettani metszetén minden állatcsoportban kismértékű dermális ödéma és minimális sejtinfiltráció volt megfigyelhető. 24 órával az antigén beszúrása után a vad típusú és L-szelektin deficiens állatok füleinek hám alatti kötőszövetében masszív fehérvérsejt infiltrátumot találtunk, míg láthatóan kevesebb gyulladásos sejt extravazálódott a CD44 ill. CD44-L-szelektin dupla knockout egerekben. A szövetet infiltráló leukociták mennyiségének semiquantitatív meghatározása során (HE metszeten) a CD44 ill. dupla deficiens állatokban szignifikánsan kevesebb fehérvérsejt hagyta el az érpályát, mint a vad típusú ill. L-szelektin knockout egerek esetében. A sejtinfiltrátum nagy mennyiségben tartalmazott polimorfonukleáris sejtet ill. néhány degranulált masztocitát. Fagyasztott metszeten leukocita subpopuláció-specifikus antitestek használata során a fehérvérsejt gyülem területén elsősorban granulocytákat ill. CD4⁺ T sejteket detektáltunk a vad típusú ill. L-szelektin hiányos fülekben, míg ezen sejtek mennyisége jelentősen kevesebb volt CD44, ill. CD44-L-szelektin dupla deficiencia esetében.

Az arthritisztes egérízületek szövettani metszetein 4 órával az mBSA injektálása után kifejezett leukocita gyülem volt detektálható a vad típusú ill. valamivel kevésbé kifejezett a CD44 deficiens egerek szinoviális szövetében. Az L-szelektin ill. dupla knockout állatok térdízületében ebben az időpontban azonban még alig volt sejtinfiltráció, ill. a leukociták nagy része még intravasalisán helyezkedett el. (Az L-szelektin és CD44-L-szelektin dupla deficiens állatok szinoviuma hasonló hisztopatológiai képet mutatott). A vad típusú egerekben a szinovitisz rapid progressziója jelentkezett. 1 nappal az mBSA expozíció után masszív leukocita infiltráció volt látható a szinovium-porc kapcsolódás területén, ill. a ligamentum patellae alatt. A sejtgyülem főleg polimorfonukleáris leukocitákból állt. CD44 hiány esetében ez az infiltrátum valamivel kisebb volt a vad típusban megfigyelthez képest, míg ugyanebben az időpontban csak szolid, neutrofilokat és limfocitákat egyaránt tartalmazó sejtszaporulat volt kimutatható az L-szelektin ill. dupla knockout csoportban.

Míg az AIA kezdeti időszakában a térdízületek hisztológiai jellemzői különbözőek voltak a a géndeficiens állatokban a vad típushoz képest, addig a gyulladás 5. napján ezek a különbségek már nem voltak kimutathatóak. Ebben a stádiumban a szövettani metszeteken szinoviális hiperplázia mellett masszív granulocita infiltrátum jelenléte volt jellemző.

Leukocita-endotel interakciók a dermatitiszes egérful ill. gyulladt térdízületi szinovium posztkapilláris venuláiban

A fehérvérsejtek gördülő mozgását ill. szoros adhézióját vizsgáltuk az egérful posztkapilláris venuláiban OVA intradermális injekciója után intravitalis mikroszkopia (IVM) segítségével. Intravitalis vizsgálatokat végeztünk közvetlen az OVA oltás előtt (0 h), valamint 1, 6, 12, és 24 órával az antigén expozíció (ill. PBS injekció) után. A videokról készült pillanatfelvételek jól mutatják, hogy a PBS-sel oltott fülekben minimális leukocita áramlást tapasztaltunk, ugyanakkor számos fluoreszkáló, az endotellel kapcsolatba lépő fehérvérsejtet detektáltunk a vad típusú egerekben 1 ill. 12 órával az OVA injekciót követően.

OVA expozíció után 1 órával mind a négy állatcsoportban gördülő mozgást végző és szorosan tapadó fehérvérsejtet egyaránt rögzítettünk a video felvételeken. Az IVM felvételek adatainak részletes feldolgozása során a vad típusú egereknél az OVA oltást követő 1. és 12. óra között a gördülő mozgást végző sejtek számának kontinuus növekedése, ill. ezt követően a rolling interakciók fokozatos csökkenése volt megfigyelhető. A CD44 deficiens állatok esetében minden vizsgálati időpontban magas volt a gördülő sejtek száma.

A gördülő mozgás sebessége az oltást követően mért magasabb értékhez képest mind a négy állatcsoportban fokozatos csökkenést mutatott az idő előrehaladtával. A rolling sebesség 1 órával az antigén expozíció után a CD44 ill. L-szelektin deficiens csoportban volt a legmagasabb, de az 1. és 6. óra között a lassulás mértéke kifejezettebb volt az L-szelektin hiányos állatokban, mint a CD44 knockout egerekben.

A szorosan adheráló sejtek mennyisége fokozatosan emelkedett az első 12 órában majd ezt követően csökkent a vad típusú ill. L-szelektin deficiens állatokban. CD44 és dupla knockout egerekben azonban minden vizsgálati időpontban csak néhány kitapadt sejtet detektáltunk.

Annak érdekében, hogy bepillantást nyerjünk az antigén indukált artritisz korai és késői fázisának leukocita forgalmába, 4, 12, valamint 24 órával ill. 5 nappal az mBSA intraartikuláris oltása után intravitális mikroszkópiával vizsgáltuk az érintett térdízületeket.

A nem gyulladt kontroll ízület szinoviumában csak néhány gördülő mozgást végző sejtet detektáltunk, míg szorosan tapadó leukocita egyáltalán nem volt.

A vad típusú egerek térdízületében intenzív leukocitaáramlást találtunk a mBSA adása után. Az endotellel interakcióba lépő sejtek nagy része szorosan tapadt az érfalhoz 4 órával az antigén injectálás után. Az AIA ezen korai fázisában a CD44 deficiencia ettől eltérő reakciót eredményezett: a szinoviális venulákban szignifikánsan több fehérvérsejt végzett gördülő mozgást, azonban csak kevés adheráló leukocita volt megfigyelhető. Hasonló mértékű volt a szoros tapadás redukciója az L-szelektin deficiens ill. dupla knockout állatokban is. Az

antigén expozíció után 12 órával a rollingoló sejtek frekvenciája kissé nőtt a vad típusú szinoviumban, ill. csökkent CD44 hiány esetén, míg az adheráló sejtek száma nem változott szignifikánsan a korábbi időponthoz képest.. A szoros adhezio vonatkozásában a vad típusú ill. deficiens egércsoportok között az AIA indukciója után 24 órával is jelentős különbség volt kimutatható.

A fehérvérsejt-endotel kölcsönhatás mértéke a gyulladás 1. napja után csökkenni kezdett, és az 5. napon is alacsony maradt

A fehérvérsejtek minden deficiens csoportban gyorsabban gördültek, mint a vad típusú sejtek. Ez a jelenség legkifejezettebben 4 órával az mBSA oltás után volt detektálható. Az átlagos rolling sebesség minden knockout egérben magasabb volt a vad típusúhoz képest, de ez a különbség egyik vizsgálati időpontban sem volt szignifikáns.

Leukociták az arthritises ízületben ill. periferiás vérben a vad típusú, CD44, L-szelektin, ill. CD44-L-szelektin dupla deficiens egerekben.

Az mBSA-val injektált egérízületekben áramlási citometriával kvantitatíve is meghatároztuk a gyulladásos infiltrátum cellularis összetételét. 4 órával az antigén expozíciót követően a gyulladásos sejtek 88-92%-a expresszálta a Gr-1 granulocita markert a vad típusú ill. a CD44 deficiens állatok ízületében, míg ez az arány csak 29-36% volt az L-szelektin ill. dupla knockout egerekben. 24 órával az oltást követően a Gr-1 pozitív sejtek aránya a vad típusban, ill. CD44 hiányban meghaladta a 98%-ot, ugyanakkor a másik két állatcsoportban is növekedést mutatott, de ennek ellenére relatíve alacsony maradt (48-76%). Az arthritis indukciója után 5 nappal a korábbi különbségek már nem voltak detektálhatók, a Gr-1 pozitivitás minden egércsoportban 90% fölött volt.

Anti-CD3 antitest segítségével meghatároztuk a limfociták arányát is a sejtinfiltrátumon belül. A 4 órás időpontban, minden genotípusban, a begyűjtött sejtek kevesebb, mint 4%-a mutatott CD3 pozitivitást. Ez az arány aztán minden vizsgált ízületben lassan növekedett

(legmagasabb, >20% arányt a dupla knockout egerekben mértünk 24 órával az injekció után), majd az 5. napra csökkenést tapasztaltunk.

A keringő fehérvérsejtek felszínén a CD11b molekula, a CD18 (β_2 lánc az LFA-1-nek és Mac-1-nek), a VLA-4 és PSGL-1 α_4 és β_1 láncának expressziója azonos mértékű volt minden genotípusban.

Megbeszélés

Csirke ovalbuminnal végzett intraperitonealis szenzitizáció után a vizsgált egerek egyik oldali fülébe intracutan OVA-t adva az atopias dermatitisz akut fázisának kezdeti stádiumára több szempontból hasonlító, dominálón Th2 típusú sejtcsoport aktivációjával járó allergiás reakciót váltottam ki. Egy másik egérpopuláción bovin serum albuminnal történt immunizációt, majd ugyanazon antigén intraartikuláris injectálást követően egy, korábbi vizsgálatok alapján mechanizmusát tekintve inkább Th1 típusú immunválasszal járó artritisz sikerült létrehozni.

Az L-szelektin molekula expressziója elengedhetetlen a „naiv” T sejtek regionális nyirokcsomókba történő vándorlásához (homing), ill. nyirokcsomón belüli aktivációjához. L-szelektin deficiens egerekben epicutan sensibilizáció után contact dermatitisz nem vagy csak minimális mértékben váltható ki. Saját vizsgálatunkban az OVA intradermális injektálása után a regionális submandibularis nyirokcsomók T sejtjeinek antigén specifikus immunválasza szignifikánsan kisebb volt az L-szelektin és CD44-L-szelektin dupla deficiens egerekben a vad típusúakhoz képest, ill. az mBSA indukált T sejt proliferáció mértéke szubkután/intradermális immunizációt követően L-szelektin hiányában szignifikánsan alacsonyabb volt a kontroll vad típusú egerekben mért értékhez viszonyítva. Intraperitonealis immunizációt követően a fenti különbségek egyik egér modellben sem voltak kimutathatók, alátámasztva azt a feltételezést, hogy intraperitoneálisan adva az antigént az először a lépbe kerül, mely folyamat az L-szelektintől függetlenül zajlik le.

Míg intraperitonealis sensitizáció után az antigén specifikus immunválaszok vonatkozásában egyik egérmodellben sem volt jelentős különbség az egyes állatcsoportok között, addig az egyes adhézión molekulák genetikai hiánya morfológiai különbségeket eredményezett a vad típusú egerekben tapasztaltakhoz képest.

Az OVA oltást követő első órában, valamint a 6 és 24 óra között a vad típusú ill. L-szelektin deficiens állatokban az érintett fülkagylók vastagsága fokozatosan nőtt, és a kialakult ödéma mértéke szignifikánsan nagyobb volt az ellenoldali, PBS injekció után kialakult mérethez képest. CD44 hiányában az antigénnel injektált fül azonban csak minimálisan vastagodott ugyanazon időtartam alatt, utalva a gyulladásos társuló vaszkuláris permeabilitás kisebb mértékű növekedésére.

Szöveti feldolgozás során 24 órával az antigén expozícióját követően masszív fehérvérsejt infiltrátumot találtunk a vad típusú és L-szelektin deficiens állatok füleinek hám alatti kötőszövetében. Ezzel szemben az extravazálódott gyulladásos sejtek mennyisége láthatóan kevesebb volt CD44 expresszió hiányában, utalva a CD44 molekula prominensebb szerepére az effektor sejtek gyulladásos bőrbe való vándorlása során a Th2 típusú limfociták dominanciájával jellemezhető allergiás bőrreakcióban. Immunhisztokémiai vizsgálatok megerősítették a CD44 molekula hiányának a T helper sejtek és a polimorfonukleáris leukociták (beleértve az eosinofileket is) transzendentális migrációjára kifejtett negatív hatását.

Az AIA modelljében az mBSA-val injektált térdízületek vastagsága a CD44 deficiens egerekben az oltást követő 2 napban, míg L-szelektin hiányában az 5 napos vizsgálati időszakban végig szignifikánsan kisebb volt a kontroll vad típusú állatokéhoz képest.

Az érintett ízületek szöveti feldolgozása ill. a szinóriumot infiltráló sejtek áramlási citometriás analízise az AIA korai fázisában a vad típusú ill. CD44 hiányos állatokban rapidan növekvő neutrofil granulocita influx tényét igazolta. Ezzel ellentétben az L-szelektin deficiens

ill. CD44-L-szelektin dupla knockout egerekben a leukocita extravazáció késleltetését, a neutrofil sejtek lassabb accumulációját észleltük. 5 nappal az antigén expozíciót követően azonban mind a 4 genotípusban masszív ízületi leukocita gyülemet találtunk, mely dominálónan neutrofil sejtekből állt.

Az AIA egyébként T-sejt dependens állatmodelljében tapasztalt, a T sejtekhez képest igen kifejezett szinoviális neutrofil invázió egy nem várt jelenség volt. Ennek egyik lehetséges magyarázata az mBSA és mBSA specifikus szérum ellenanyagok által létrehozott, és az ízületben lerakódott immunkomplexek jelenléte lehet. A komplement rendszer aktiválása mellett az immunkomplexek neutrofil chemotaxiszt eredményező kemokinek lokális termelődését indukálják.

A granulocyttákkal ellentétben, az L-szelektin molekula hiánya a T sejt extravasációt nem befolyásolta az AIA korai fázisában. Ez a megfigyelés arra utal, hogy a gyulladás kezdeti szakaszában meginduló neutrofil influx L-szelektin nélkül sérül, míg a T sejtek transzendentális migrációja az L-szelektintől független folyamat.

Érdekes jelenség a CD44 deficiens egerekben az L-szelektin „down-regulációja” a fehérvérsejtek felszínén, melyet először kollagén-indukált artritiszben írtak le.

Az L-szelektin leválása (shedding) „normál” körülmények között a leukocita aktiváció velejárója, melyet a megfelelő aktivációs markerek (Mac-1, CD69) expressziójának fokozódása kísér. A CD44 hiányos egerek fehérvérsejtjeinek felszínén sem a Mac-1, sem a CD69 molekulák kifejeződése nem különbözött a vad típusban megfigyeltékhez képest, mely arra utal, hogy az L-szelektin expressziójának csökkenése CD44 hiányában nem a mutáns sejtek excesszív aktivációjának köszönhető, sokkal inkább az L-szelektin expresszió megváltozott regulációja állhat a háttérben.

Mindkét állatmodellben azt vártuk, hogy az L-szelektin és CD44 molekulák együttes hiánya additív vagy szinergista módon negatív hatást gyakorol a fülben ill. az ízületben kialakult

gyulladásra, azonban a dupla knockout egerekben kialakult inflammáció morfológiai paraméterei az OVA indukált allergiás dermatitiszben a CD44 deficiens, míg AIA-ban az L-szelektin hiányos állatokban tapasztaltakhoz képest nem különbözött.

Intravitalis mikroszkópiával vizsgálva az injektált egérful mikrocirkulációját, új információkat nyertünk az atopiás dermatitiszre emlékeztető hiperszenzitivitási reakció korai (IPR) és késői (LPR) fázisában kialakuló leukocita-endotel interakciókról. Míg a gyulladás során az ödéma létrejötte bifázisos mintát követett, addig a vad típusú ill. L-szelektin deficiens állatokban 12 óránál tetőzött a leukocita beáramlás, vagyis, nem tudtunk két fázisú sejtbeáramlást igazolni. Az inflammáció klinikai tünetei, valamint a fehérvérsejt mozgás kinetikája közötti discrepancia lehetséges magyarázata, hogy IPR fázisban a masztociták rapid beáramlása és felszabaduló sejtproduktumaik, míg az LPR szakaszban az intravaszkulárisan folyamatosan akkumulálódó, majd extravasálódó aktivált leukociták eredményezik a fokozott vaszkuláris permeabilitást és következményes oedemát. Először alkalmazva IVM technikát allergiás dermatitisz állatmodelljében azt találtuk hogy L-szelektin deficiens és L-szelektin-CD44 dupla knockout állatokban az endotel mentén gördülő sejtek száma OVA injekciót követően 6 ill. 12 órával alacsonyabb volt a vad típusúhoz képest, de nem különbözött attól a 24. órában. Mivel a CD44 molekula a hialuronsavban gazdag endotelium mentén történő gördülő mozgást mediálja, a molekula hiányában a rollingoló sejtek számának csökkenését várhattuk. Ezzel szemben CD44 hiányos állatokban a rolling interakciók frekvenciája az oltást követően 1 nappal szignifikánsan magasabb volt a vad egerekben tapasztaltakhoz képest.

A vaszkuláris endotelium ill. a fehérvérsejtek aktivációs állapotának növekedése a rolling sebesség csökkenését vetítette előre. A 24 órás megfigyelési periódus első felében valóban csökkent a gördülő leukociták sebessége mind a négy genotípusban. A CD44 hiányos, ill. dupla knockout állatokban azonban a sejtek gyorsabban gördültek a vad típusban mért

értékekhez képest. Mindemellett ugyanezen két deficiens genotípusban az adherens sejtek száma jóval alacsonyabb volt, mint a vad egerekben. A gyorsabb rolling és kisebb mértékű adhézió jelensége egymással szorosan összefügg, hiszen a lassabban gördülő leukocitákra intenzívebben hatnak az integrin aktivációt, s ezáltal a szoros tapadást indukáló, lokálisan felszabaduló kemokinek. Az irreverzibilis adhézió elmaradása ill. csökkent volta a szöveti gyulladás mértékének redukációjához vezet, mint ahogy ezt a CD44, ill. CD44-L-szelektin dupla deficiens egerek esetében tapasztaltuk. Bár a CD44 molekula elsősorban a fehérvérsejtek gördülő mozgásában játszik szerepet, a sejtfelszíni integrinekkel való együttműködése miatt a leukocita adhézió stabilizálásában is jelentőséggel bírhat. Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a normál egér T sejtek felszínén expresszálandó CD44 fizikai kontaktusban van a plazmamembrán VLA-4 molekulájával. Gyulladásos stimulus hatására a CD44 molekula közreműködésével létrejövő rolling a VLA-4 aktivációjához, majd a leukocita szoros adhéziójához vezet. CD44 hiány esetén tehát feltételezhetően nem csak a gyorsabb rolling, hanem a CD44-VLA-4 interakció hiánya is hozzájárul a fehérvérsejtek csökkent mértékű adhéziójához.

Az antigén indukált artritisz modelljében a gyulladt térdízületek szinoviális ereiben a legintenzívebb leukocitaáramlást az mBSA oltást követő 4. órában tapasztaltuk. A vad típusú egerek esetében már ebben az időpontban is jelentős számú fehérvérsejt adherált az érfalhoz, míg a gördülő sejtek száma elenyésző volt. Ehhez képest a rolling frekvencia szignifikánsan nagyobb, míg a kitapadt leukociták mennyisége szignifikánsan kisebb volt a CD44 deficiens állatoknál. Azt gondolhattuk, hogy az intenzívebb rollingért jelen esetben az L-szelektin felelős, azonban L-szelektin hiányában a gördülő mozgás frekvenciája még intenzívebb volt. Az L-szelektin hiányát nem kompenzálta a CD44 molekula, hiszen a rolling és adhézió kinetikája az L-szelektin és L-szelektin-CD44 dupla deficiens egereknél csaknem azonos volt. Az a tény, hogy a CD44 expresszió elmaradása az L-szelektint nem termelő sejteknél nem

befolyásolta szignifikánsan a rolling mozgást, illetve CD44 deficiens sejtek felszínén csökkent L-szelektin expresszió detektálható, felveti annak lehetőségét, hogy az ízületbe irányuló mérsékelten csökkent leukocita „influx” CD44 deficiencia esetén inkább a csökkent L-szelektin kifejeződésnek, semmint a CD44 funkció hiányának tudható be.

A vad típusú egerekben detektáltakhoz képest mindegyik géndeficiens genotípusban a rolling frekvencia emelkedett volt. Mivel az L-szelektin vagy hiányzott, vagy csökkent mértékben expresszáldott, illetve úgy tűnik, hogy ebben a modellben a CD44 hiány befolyásoló hatása elenyésző volt, feltételezhetően a sejtek elsősorban a PSGL-1, ill. VLA-4 molekulák segítségével gördültek az érfal mentén. Ez a mechanizmus azonban kevésbé volt effektív az L-szelektin mediált rollinghoz képest. Mindemellet L-szelektin hiányában az L-szelektin-PSGL-1 interakció, tehát a leukocita-leukocita kapcsolódás is sérül, hozzájárulva a gyulladásos sejtek ízületbe vándorlásának késleltetéséhez.

A két gyulladásos modellben fellépő, IVM-mel vizsgált leukocita-endotel interakciók különböző kinetikájának ill. az egyes adhézis molekulák eltérő szerepének hátterében több tényező állhat.:

a, Míg az allergiás dermatitisz esetében a T sejt (és dominálón a Th2 típusú limfociták) kivándorlása dominál, addig AIA-ban (mely elvileg egy Th1 túlsúllyal jellemezhető gyulladás) döntően neutrofil leukociták áramlanak a szinoviális membránba.

b, A domináló sejtípus eltérő volta, az allergiás bőrgyulladásban mért magas IgE más chemokin profilt, eltérő sejtmozgósítást eredményez.

c, A gyulladásos reakciókban domináló sejtek típusa befolyásolja az adhézis molekulák interakcióját más adherenciában részt vevő molekulákkal. Így pl. CD44 hiánya negatív hatású lehet a VLA-4 mediált kitapadásra, mely folyamat elsősorban a T sejt mediált reakciónál jön szóba, míg a neutrofilek által uralt folyamatokban az L-szelektin hiányzó expressziójának

köszönhetően elmarad az L-szelektin-PSGL-1 kötődés, tehát a leukocita-leukocita kapcsolódás, mely hozzájárul a gyulladásos sejtek késleltetett extravazációjához.

A rolling interakciók frekvenciája, illetve a gördülő mozgás sebessége számos faktor által befolyásolt paraméterek. A fehérvérsejt-endotel interakciókban szerepet játszó receptorok illetve ligandjaik sejtfelszíni denzitása, az adhézións molekulák aviditása és membránban való eloszlása, valamint a lokálisan felszabaduló kemokinek specifitása és koncentrációja mind hatással lehet a leukocita-ér kapcsolódás folyamatára. Addicionális faktorok (az érintett szövet adhézións molekuláinak eltérő „mintázata, a gyulladásos folyamatban részt vevő effektor sejtek típusa, immunkomplexek jelenléte az érintett szövetben, az adott szöveti mikrokörnyezetre specifikus kemokinek stb.) szintén befolyásolhatják a CD44, illetve L-szelektin molekulák hiánya miatt egyébként is destabilizálódott leukociták viselkedését, következmenyesen az indukált inflammatió morphologiai parametereit.

Összefoglalás

Munkám során CD44, L-szelektin, valamint CD44-L-szelektin dupla deficiens egerekben létrehozott két különböző egérmodellen dolgoztam.

Intraperitoneálisan csirke ovalbuminnal 2 alkalommal immunizált állatokban az egyik oldali fülbe intradermálisan adott ugyanazon antigénnel allergiás dermatitist váltottam ki. A magas antigén specifikus IgE szinttel, emelkedettebb Il-4 termeléssel járó bőrgyulladásban dominálón Th2 típusú limfociták vettek részt. A kialakult inflammatió emiatt több szempontból is hasonlóságot mutatott az atopiás dermatisz acut fázisával.

Intradermálisan/szubkután , valamint ugyancsak a hasüregbe , majd meghatározott idő után az egerek egyik oldali térdízületébe injektált mBSA-val antigén indukált artritisz hoztunk létre.

Az immunizáló ágensekre adott specifikus válasz reakciók (immunglobulin termelés, T sejt proliferáció) meghatározása mellett a gyulladásos folyamatokban részt vevő leukociták és az endotel sejtek közötti interakciók kinetikájának tanulmányozása céljából a fülek, ill. az

érintett ízületek szinoviális membránjának posztkapilláris venuláit intravitális mikroszkópiával vizsgáltuk.

Az antigén specifikus immunválaszok szignifikánsan egyik modell esetében sem különböztek a vad típusú ill. géndeficiens egércsoportok között, azonban a kialakuló gyulladásos reakciók morfológiai eltérést mutattak az egyes adhézis molekulák hiányában.

Az OVA intradermális injektálása után kialakult ödéma a CD44 deficiens ill. dupla knockout állatokban szignifikánsan kisebb volt, illetve ugyanezen állatokban a fülek szövettani feldolgozása során kevesebb intradermális gyulladásos sejtet találtunk.

Az AIA modelljében a kialakult ízületi duzzanat L-szelektin hiányában kisebb volt a vad típusúhoz képest. Szövettani feldolgozással a gyulladásban domináló neutrofil granulocyták extravazációjának késésére derült fény, míg a szinoviumba történő T sejt vándorlás nem gátlódott az L-szelektin molekula expressziójának elmaradása esetén.

Intravitális mikroszkópiával allergiás dermatitiszben CD44 hiányában fokozott rolling frekvencia valamint nagyobb rolling sebesség, emellett csökkent adherencia igazolódott.

Ezzel szemben mBSA intraarticuláris injekciója után a CD44 deficiens állatokban csak minimálisan csökkent az effektorsejt extravazáció, mely elsősorban az ebben a géndefektusban a leukociták felszínén létrejövő csökkent L-szelektin kifejeződésnek, semmint a CD44 hiányának tudható be. Ugyanakkor L-szelektin deficienciában fokozott rolling frekvenciát ill. sebességet és késleltetett adherenciát detektáltunk.

Az egyes adhézis molekulák különböző gyulladásos folyamatokban betöltött eltérő szerepe megerősíti azt a tényt, mely szerint az inflammációban részt vevő effektor sejtek és az aktivált endotel interakcióinak hátterében bonyolult, máig nem teljesen tisztázott mechanizmusok és tényezők állnak.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

Gonda A, Gal I, Szanto S, Sarraj B, Glant T.T, Hunyadi J, Mikecz K. CD44, but not L-selectin, is critically involved in leukocyte migration into the skin in a murine model of allergic dermatitis. *Exp Dermatol*. 2005; 14:700-708.

IF: 1,707

Szanto S, Gal I, **Gonda A**, Glant TT, Mikecz K. Expression of L-selectin, but not CD44, is required for early neutrophil extravasation in antigen-induced arthritis. *J Immunol*. 2004; 172:6723-34.

IF: 6,486

Gal I, Lesley J, Ko W, **Gonda A**, Stoop R, Hyman R, Mikecz K. Role of the extracellular and cytoplasmic domains of CD44 in the rolling interaction of lymphoid cells with hyaluronan under physiologic flow. *J Biol Chem*. 2003; 278:11150-8.

IF: 6,355

Egyéb saját közlemények:

Szegedi A, Aleksza M, **Gonda A**, Irinyi B, Sipka S, Hunyadi J, Antal-Szalmas P. Elevated rate of Thelper1 (T(H)1) lymphocytes and serum IFN-gamma levels in psoriatic patients.

Immunol Lett. 2003 May 1;86(3):277-80.

IF: 2,136

Szabo I, **Gonda A**, Bakos B, Toth K, Hunyadi J. Lymphoblast transformation colorimetry in the diagnosis of drug hypersensitivity] *Orv Hetil*. 1998 Oct 4;139(40):2379-82.Hungarian

Gonda A, Szántó S, Hunyadi J. Leukocita-endotél interakciók vizsgálata gyulladásos egérmodellekben. *Magyar Immunológia* (közlésre elfogadva)

Az értekezés alapjául szolgáló publikált, idézhető absztraktok:

Gonda A, Szanto S, Gal I, Mikecz K. Real-Time Analysis of Leukocyte-Endothelial Cell Interactions in Vivo during Inflammation in Mice Lacking CD44 or L-Selectin or Both.

Arthritis Rheum. 2002; 46:S78

Gal I, Lesley J, Ko W, **Gonda A**, Glant TT, Hyman R, Mikecz K. Mutations in CD44 Differentially Influence the Rolling Interactions of Lymphoid Cells with Hyaluronan.

Arthritis Rheum. 2002; 46:S602

Gal I, Szanto S, **Gonda A**, Mikecz K. Intravital Microscopy on the Synovial Microcirculation Demonstrates a Role for CD44 in Inflammatory Cell Extravasation in a Murine Model of RA.

Arthritis Rheum. 2003; 48:S677

Gonda A, Szanto S, Gal I, Glant TT, Mikecz K. CD44 is Critically Involved in Leukocyte Extravasation During a Th2 Type Inflammatory Response. *Arthritis Rheum*. 2003; 48:S271

Szanto S, Gal I, **Gonda A**, Mikecz K. L-selectin and CD44 Regulate Leukocyte Rolling in Synovial Microvessels in Mice with Antigen-induced Arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003; 48:S272

Szanto S, Gal I, **Gonda A**, Mikecz K. A Greater Requirement for L-Selectin than CD44 for Early Neutrophil Accumulation in the Synovial Microvasculature in Antigen-induced Arthritis (AIA). *Ann Rheum Dis.* 2004;

Egyéb publikált, idézhető absztraktok:

Szanto S, Adarichev VA, Nesterovitch AB, **Gonda A**, Szabo Z, Glant TT. Quantitative Trait Loci (QTLs) on Chromosome 15 Play Crucial Role in Male and Female Susceptibility of Proteoglycan-induced Arthritis (PGIA). *Arthritis Rheum.* 2003; 48:S149

Szanto S, Bardos T, Kolman KJ, **Gonda A**, Gal I, Glant TT, Mikecz K. TSG-6 (TNF α -Stimulated Gene-6)-deficiency Accelerates Inflammatory Events, Cartilage Damage and Bone Erosion in a Murine Model of Progressive Polyarthritis. *Arthritis Rheum.* 2003; 48:S252

Szanto S, Bardos T, **Gonda A**, David CS, Mikecz K, Glant TT. Peptide Epitopes and Arthritogenicity of Human Cartilage Proteoglycan (PG) in Human MHC Class II Transgenic Mice (HLA-DR4 AND HLA-DQ8) *Ann Rheum Dis.* 2004;

Az értekezés témájában tartott előadások

Angol nyelven:

A.Gonda, K.Mikecz: CD44 is Critically Involved in Leukocyte Extravasation During a Th2 Type Inflammatory Response. 2003 ACR, Orlando, FL, USA

A.Gonda, S.Szanto, K. Mikecz: A Greater Requirement for L-Selectin than CD44 for Early Neutrophil Accumulation in the Synovial Microvasculature in Antigen-induced Arthritis (AIA). EULAR 2004, Berlin, Németország

A. Gonda, J. Hunyadi, K. Mikecz: Role of CD44 and L-selectin in leukocyte migration into the skin in a murine model of allergic dermatitis. DUDDG 2005, Drezda, Németország

Magyar nyelven:

Gonda A., Szántó S., Mikecz K., Hunyadi J.: A CD44 és L-szelektin molekulák leukocita-endotel interakciókban betöltött szerepe atopiás dermatitisz egérmodelljében. Magyar Dermatológiai Társulat Nagygyűlése 2005.

