

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Az egészséges és a gyulladássos bőr immunológiai státuszának vizsgálata

Jenei Adrienn

Témavezető: Dr. Kapitány Anikó



DEBRECENI EGYETEM

Petrányi Gyula Klinikai Immunológiai és Allergológiai Doktori Iskola

Debrecen, 2021

Az egészséges és a gyulladásoos bőr immunológiai státuszának vizsgálata

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a Klinikai Orvostudományok tudományágban

Írta: Jenei Adrienn
okleveles biológia-kémia szakos tanár

Készült a Debreceni Egyetem Petrányi Gyula Klinikai Immunológiai és Allergológiai Doktori
Iskolája keretében

Témavezető: Dr. Kapitány Anikó, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Bácsi Attila, az MTA doktora
tagok: Dr. Szabó Kornélia, PhD
Dr. Lányi Árpád, PhD

A doktori szigorlat időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK
2021. december 10-én (pénteken) 11 óra (online formátum)

Az értekezés bírálói:

Dr. Hidvégi Bernadett, PhD
Dr. Szántó Magdolna, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Bácsi Attila, az MTA doktora
tagok: Dr. Hidvégi Bernadett, PhD
Dr. Szántó Magdolna, PhD
Dr. Lányi Árpád, PhD
Dr. Szabó Kornélia, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK
2021. december 10-én (pénteken) 13 óra (online formátum)

A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben a vitán részt kíván venni, úgy jelezze a jenei.adrienn@gmail.com email címre küldött üzenettel, a vitát megelőző nap (2021. december 9.) 14 óráig. A határidő lejáratát követően technikai okok miatt már nincs lehetőség a védéshez kapcsolódni.

Bevezetés

A bőr az emberi szervezet első védelmi vonala, véd a külső környezet fizikai, kémiai és mikrobiológiai hatásaival szemben. Az egészséges bőr topográfiaileg eltérő bőrrégiói különböző anatómiai és fizikokémiai sajátosságokkal rendelkeznek, ami alapján 3 bőrrégiót különböztetünk meg: a faggyúmirigyekben gazdag, zsíros (sebaceous gland rich, SGR), az apokrin mirigyekben gazdag, nedves (apocrine gland rich, AGR) valamint a mirigyekben szegény, száraz (sebaceous and apocrine gland poor, GP) bőrrégiókat.

Korábbi kutatások kimutatták, hogy az egészséges bőr topográfiaileg eltérő régiói különböző mikrobióta összetétellel rendelkeznek valamint kutatócsoportunk igazolta, hogy az SGR bőrterület immunológiai tulajdonságaiban különbséget mutat a GP bőrterülethez képest. Azt azonban eddig még nem vizsgálták, hogy az AGR bőrterületek is sajátos immunmilióval rendelkeznek-e.

A hidradenitisz szuppurativa (HS) egy AGR bőrterületekre lokalizálódó gyulladós bőrbetegség. A pathomechanizmusát vizsgáló korábbi tanulmányokban az immunológiai homeosztázis eltolódásának mértékét a GP bőrrégióhoz hasonlították, ami pontatlan eredményekhez vezetett a gyulladás kialakulásának megismerésével kapcsolatban. Továbbá korábban nem vizsgálták még, hogy az AGR bőrre jellemző sajátos immunmilió hogyan változik meg az ezekre a területekre lokalizálódó HS kialakulása során.

A bőr antimikrobiális peptid (AMP) profiljának vizsgálata diagnosztikai és prediktív jelentőséggel bír. Az AMP-k, mint markerek információt adhatnak a bőrbetegségek kialakulásáról, állapotáról és súlyosságáról. Munkacsoportunk korábbi mRNS és fehérje alapú vizsgálatai során szignifikáns különbséget azonosított bizonyos AMP-k tekintetében a GP, SGR és AGR bőrrégiókat összehasonlítva.

Jelenlegi ismereteink szerint kevés olyan vizsgálati módszer van, mely alkalmas a bőrminták gyors, minimális invazivitással járó és így ismételhető gyűjtésére. Jelenleg az AMP-eket antigén-antitest alapú ELISA és immunohisztokémiai módszerrel (IHC) azonosítják invazív eljárással nyert bőrbioptizás mintákban. Mivel a biopszia fájdalommal és heggedéssel járó folyamat, ezért nem alkalmas a mintavétel ismétlésére ugyanarról a bőrterületről. Egy minimálisan invazív mintavételi eljárás gyors és megbízható analitikai módszerrel kombinálva lehetőséget teremthet a bőr immunstátusz-változásának nyomon követésére mind az

egészséges, mind a klinikai tünetet nem mutató gyulladásban lévő bőr és a már manifesztálódott betegségek esetén is, emellett elősegítheti profilaktikus terápiák kidolgozását és alkalmazását, valamint a kezelések hatékonyságának nyomon követését.

PhD munkám során az egészséges nedves bőr és HS-s léziós bőr immunológiai sajátosságait, valamint a stratum corneum (SC) immunológiai státuszának meghatározására alkalmas diagnosztikai és prediktív markerek új, nem invazív kimutatási lehetőségét vizsgáltam.

Célkitűzés

Jelen doktori értekezés alapjául szolgáló kísérletsorozatok céljai:

I/1. Az egészséges apokrin és faggyúmirigyekben szegény (GP) és az apokrin mirigyekben gazdag (AGR) bőrrégiók immun és barrier sajátosságai közötti különbségek feltárása.

I/2. Az apokrin mirigyekben gazdag bőrterületek sajátosságainak vizsgálata abból a szempontból, hogy hogyan változnak meg a nedves bőrre lokalizálódó gyulladásos bőrbetegség, a HS kialakulása során.

II/1. Egy minimálisan invazív, tape stripping technikával történő SC mintagyűjtési módszer beállítása tömegspektrometriás analízishez.

II/2. A PRM alapú tömegspektrometriás mérés paramétereinek optimalizálása SC mintára.

II/3. Egy új, hexánmentes fehérje kinyerési módszer kidolgozása és összevetése a hexán alapú módszerrel.

II/4. Az egészséges bőr különböző régióiban a SC AMP összetételének vizsgálata a nagy specifitással rendelkező PRM alapú tömegspektrometriás módszer segítségével.

Anyagok és módszerek

A vizsgálatainkhoz használt bőrbopsziás és SC minták gyűjtése a Debreceni Egyetem Bőrgyógyászati Klinika és Sebészeti Klinika Járóbeteg Szakrendelésein megjelent betegektől, valamint egészséges önkéntesektől történt. Valamennyi résztvevő aláírta a vizsgálat elvégzéséhez szükséges, a Helsinkai nyilatkozat irányelveinek megfelelő és a DE RKEB/IKEB által elfogadott Betegbeleegyező nyilatkozatot (az etikai engedélyek száma: 4492 -2015 - DE RKEB/IKEB, 5064 – 2018 - DE RKEB/IKEB). Vizsgálatainkhoz egészséges személyek és gyulladásos bőrbetegségben szenvedő betegek mintáit használtuk. Az egészséges személyek bőrén nem manifesztálódott és kórtörténetükben sem jelent meg gyulladásos bőrbetegség. A gyulladásos bőrbetegségben szenvedő betegek közepes vagy súlyos tünetekkel rendelkeztek, az esetleges terápiás kezelésük mintavétel előtt pontosan meghatározott időben le lett állítva.

1. Mintagyűjtés

1.1. Bőrbopsziás minták gyűjtése

Első kutatási projektünk során egészséges személyektől származó nedves (AGR, n=8) és száraz (GP, n=8) bőrmintákat, valamint a HS-ás betegektől származó léziós bőrmintákat (n=8) vizsgáltunk. A GP mintákat lábszárról vagy alkarról, az AGR és a HS mintákat axilláris régióból nyertünk. Kutatócsoportunk definíciója szerint apokrin mirigyekben gazdag bőrről akkor beszélünk, ha az apokrin mirigyek száma a teljes bőrmetszet 100x-os mikroszkópos nagyítása során meghaladja a kettőt.

A vizsgált HS-ban szenvedő betegek közé olyan személyek kerültek beválogatásra, akik 18 év felettek, középsúlyos vagy súlyos HS tünetekkel rendelkeztek, és tüneteik legalább 6 hónapja jelentkeztek először. Mintavétel előtt a betegek biológiai terápiában nem részesültek, a hagyományos szisztémás terápiát 4 héttel, míg a helyi kezeléseket 4 nappal a biopszia előtt leállították.

A begyűjtött bőrbopsziás minták egyik feléből génszintű vizsgálatok történtek RT-qPCR módszerrel. Ebben az esetben a mintákat RNAlater reagensben (Qiagen, Hilden, Németország)

tároltuk -70 fokon az RNS izolálásig. A minták másik felét IHC vizsgálatokhoz használtuk. Ebben az esetben a teljes bőrmetszeteket formalinban fixáltuk, majd paraffinba ágyasztuk.

1.2. A stratum corneum minta gyűjtése

23 felnőtt önkéntestől (19 egészséges és 4 beteg [HS, Ps, PPR, AD]) összesen 60 SC mintát gyűjtöttünk be.

Mivel a minta kinyeréséhez és analíziséhez egy olyan új módszert alkalmaztunk, mely korábbi irodalmakban még nem volt leírva, ezért a begyűjtött minták egyik felét a vizsgálati módszer optimalizálására használtuk fel. Első lépésként a mintagyűjtés metodikáját optimalizáltuk (2 egészséges önkéntes: 1 nő, kora: 41 év; 1 férfi, kora: 34 év), ezt követte a PRM alapú tömegspektrometriás módszer beállítása (egy súlyos HS-ás nő, kora: 44 év; 1 közepesen súlyos Ps-os férfi, kora: 30 év; 1 súlyos PPR-ás nő, kora: 40 év; 1 közepesen súlyos AD-es férfi, kora: 44 év; 1 egészséges férfi, kora: 34 év), majd a fehérjemennyiség kinyerését optimalizáltuk (1 egészséges férfi, kora: 34 év) a méréshez.

A minták másik felében az egészséges bőr három régiójának SC-ban található AMP-k összetételét vizsgáltuk (15 egészséges önkéntes: 10 nő, életkor megoszlás medián értéke: 28 ± 9.7 év; 5 férfi, életkor megoszlás medián értéke: 35 ± 10.8 év).

2. RNS izolálás bőربيopsziás mintákból, Reverz Transzkripció és RT-qPCR

Az RNAlater oldatban tárolt mintákat teljes RNS izolálás során TriReagent oldatban (Sigma-Aldrich, Dorset, UK) homogenizáltuk Tissue Lyser-ben (Qiagen) autoklávozott vasgolyók segítségével (Qiagen). Az izolálás során nyert teljes RNS tisztaságának és koncentrációjának ellenőrzése NanoDrop Spectrophotométerrel (Thermo Scientific, Bioscience, Budapest, Hungary) történt. Az RNS minőségét az Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) segítségével ellenőriztük.

A kinyert RNS a High Capacity cDNA Archive Kit (Invitrogen, Life Technologies, San Francisco, CA) gyári ajánlásnak megfelelően, hőindukált enzimmel került átírásra

komplementer DNS-é (cDNS). A mintákat DNase I (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) enzimmel kezeltük, annak érdekében, hogy elkerüljük a genomi DNS kontaminációt.

Az RT-qPCR vizsgálatokhoz gyárilag megtervezett FAM-MGB assay-t használtunk. A mérések triplikátumban történtek TaqMan® Gén expressziós Master Mix használatával (Applied Biosystem, Life Technologies).

A mérések minden esetben a LightCycler® 480 System (Roche Magyarország Kft., Budaörs, Magyarország) műszerrel történtek a Debreceni Egyetem Genomi Medicina és Bioinformatikai Szolgáltató Laboratóriumában. A célgének relatív mRNS mennyiségét a komparatív $\Delta\Delta C_t$ módszer használatával határoztuk meg a standard görbéhez viszonyítva. A mérések PPIA mRNS expressziós szintjéhez lettek normalizálva.

3. A teljes bőrmetszetek rutin festése és immunohisztokémiai jelölése

Első lépésben a teljes bőrmintákat az apokrin mirigyek száma szerinti osztályoztuk. A szöveti részletek pontos meghatározása May-Grünwald-Giemsa festéssel történt. A HS léziókból származó bőrminták pathológiai súlyosságát haematoxylin-eosin (H&E) festés után határoztuk meg. A metszetek pathológiai vizsgálatát a DE Bőrgyógyászati Klinika patológusa végezte. A bőrminták osztályozása után a célfehérjék mennyiségének meghatározása IHC-i jelöléssel történt.

3.1. Immunohisztokémiai jelölés

Az IHC jelöléshez a 3 mikronos metszetek deparaffináltuk, majd rehidratálása után az endogén peroxidázokat 3%-os H₂O₂ oldattal kötöttük meg 15 perces kezeléssel. Hőindukált antigénfeltárás után az aspecifikus antitest bekötődéseket 1 %-os szarvasmarha szérum albuminnal (bovine serum albumin - BSA) (Sigma-Aldrich Kft.) blokkoltuk, majd a metszeteket nedves kamrában, 4 °C-on, egész éjszakán át inkubáltuk a primer antitestekkel.

Ezt követően az anti-egér/anti-nyúl HRP-konjugált másodlagos antitestet (Dako) 15 percig, nedves kamrában a gyártó ajánlásának megfelelően használtuk. Az antitestekkel való jelölések

előtt és után a mintákat TBST mosó pufferrel háromszor mostuk 5 percen keresztül. A fehérje jelenlétére utaló jelet Vector® VIP és ImmPACT™ NovaRED™ Kit (VECTOR Laboratories, Burlingame, CA, USA) használatával detektáltuk. A háttérfestés metil-zöld oldattal történt.

Annak érdekében, hogy a különböző bőrterületek mintáiban egy adott fehérje mennyiségét össze tudjuk hasonlítani, a jelölés idejét standardizáltuk. Egy fehérje jelölését minden esetben egymással parallel, ugyanabban az időben végeztük. Minden fehérje jelölés alkalmával a normalizálást pozitív, negatív és izotípus kontroll használata mellett végeztük [egér és nyúl IgG (Covalab), nyúl immunoglobulin frakció (Dako)].

4. A stratum corneum eltávolítása a bőrfelszínéről

A SC-t az irodalomban leírt, bőrgyógyászati mintavételre kifejlesztett D-Squame korongok segítségével gyűjtöttük be a bőrfelszínről tape stripping módszerrel. A mintavétel standardizálásához fontos volt, hogy a mintavételt minden esetben azonos személy végezte, púdermentes latex kesztyű használatával. A mintaadók a mintavétel előtt 24 órával nem mosták meg detergenssel a mintavétel helyét, nem használtak semmilyen kozmetikumot. Közvetlenül a mintavétel előtt a bőrfelszínt nem tisztítottuk le alkoholos fertőtlenítővel. A D-Squame korongokat 10 másodpercig, közepes erővel nyomtuk a bőr felszínére. Ezt követően a SC-ot tartalmazó korongokat nedves kamrában, szobahőmérsékleten tároltuk a minta feldolgozásáig, ami minden esetben a mintavétel napján megtörtént.

5. A stratum corneum fehérjetartalmának elúciója a D-Squame korongokról

Korábbi irodalmi adatok alapján a tape stripping technikával eltávolított fehérjéket hexán alapú módszerrel nyerték ki a korongok felszínéről. Ezt a módszert használva a korongokat szilán borítású tárgylemezre (Sigma-Aldrich Kft.) ragasztottuk, majd egy éjszakán át, szobahőmérsékleten hexánban áztattuk. A metszeteket 8 M-os ureában denaturáltuk 30 percig, szobahőmérsékleten, nedves kamrában.

A SC-ból kinyerhető AMP mennyiségének növelése érdekében a hexán alapú extrakciós módszert a következők szerint módosítottuk. A D-Squame korongokat a bőr felszínéről való

eltávolítása után nedves kamrába helyeztük úgy, hogy a korong mintát tartalmazó oldala felfelé nézzen, majd közvetlenül a korongra helyeztük a 8 M-os ureát, ami denaturálta a fehérjéket.

6. A stratum corneum fehérjekoncentrációjának meghatározása

A SC korong fehérje tartalmát 10 ml 0.1%-os SDS oldatban 2 percig szonikáltuk, majd 10 percig 5500 rpm-en, 4 °C-on centrifugáltuk. A minták beszárítása után 2 ml Milli-Q vízben oldottuk vissza.

A fehérje koncentrációk meghatározásához a Pierce BCA Protein Assay Kit-et (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts) használtuk a gyártó által meghatározott protokollt követve 96 lyukú mikrotiter lemezen. Negatív kontrollként a 0.1%-os SDS oldat szolgált. A fehérjetartalmat 570 nm hullámhosszon mértük le a Labsystem Multiskan MS spektrofotométer segítségével (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts).

7. A stratum corneum fehérjetartalmának proteolitikus emésztése

A tripszines emésztés előtt a fehérjék redukciója 10 mM-os ditiotreitollal történt 1 órán át 37 °C-on. Ezt követően 20 mM-os jódcetamid oldattal alkiláltuk 45 percig szobahőmérsékleten, sötétben. A tripszin hozzáadása előtt az oldat urea tartalmát 1 M koncentrációra hígítottuk 25 mM-os ammónium-bikarbonáttal. A fehérjéket 37 °C-on egy éjszakán át emésztettük stabilizált, MS tisztaságú TPCCK vizsgált szarvasmarha tripszinnel (Sigma-Aldrich Kft.). A tripszin:fehérje arány 1:25 volt. Emésztés után a mintákat vákuum koncentrátorban (ThermoScientific) beszárítottuk, majd 100 µl 1 %-os hangyasavban (VWR International Kft.) visszaoldottuk.

A minták sómentesítése C18-as PierceTip hegygel (ThermoScience) történt. Az eluátumokat beszárítás után -20 °C-on tároltuk a tömegspektrometriás analízisig. Mérés előtt a peptideket 10 µl 1 %-os hangyasavban oldottuk vissza.

8. A PRM assay tervezés

A PRM assay tervezéséhez 13 AMP 18 aminosav szekvenciáját választottuk ki az UniProt adatbázisból (www.uniprot.org). A kiválasztott fehérjékről korábbi vizsgálataink, valamint irodalmi adatok alapján megállapítottuk, hogy alkalmasak az egészséges bőr és gyulladásos bőrbetegségek jellemzésére.

A fehérjék aminosav szekvenciáit az UniProt adatbázisból letöltöttük, és az ExPaSy PeptideCutter szoftvert (https://web.expasy.org/peptide_cutter/) segítségével *in silico* tripszines hasítást végeztünk. A 100% hasítási valószínűséggel keletkező 5-14 aminosav hosszúságú triptikus peptid szekvenciákkal BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) analízist végeztünk az NCBI nem redundáns fehérje szekvencia adatbázisban, és azonosítottuk az egyedi, fehérje-specifikus peptideket. A keresés eredményeként kapott fehérje specifikus peptideket használtuk a PRM alapú tömegspektrometriás analízishez. A kiválasztott peptidek stabil izotóppal jelölt (SIL) szintetikus formáit a JPT Peptide Technologies GmbH-től (Németország) szereztük be és a későbbiekben minőségi és kvantitálási kontrollként használtuk.

9. Tömegspektrometriás vizsgálat

A tripszinnel emésztett SC minták tömegspektrometriás vizsgálatát randomizálás után duplikátumban végeztük el azonos mérési feltételek mellett. A tömegspektrometriás analízis előtt minden mintához a korábbi beállításoknak megfelelő SIL peptid-mennyiséget adtuk.

A PRM analíziseket Orbitrap Fusion tömegspektrométeren (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts) végeztük el, a kromatográfiás elválasztást az Easy nLC1200 nanoUPLC (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts) készülék biztosította.

A peptidek 60 perces víz-acetonitril gradiens alkalmazásával 300 nl/perc áramlási sebességgel voltak elválasztva Acclaim PepMap C18 (20 mm x 75 µm, 3 µm részecskeméret, 100 Å pórusátmérő, Thermo Scientific) segítségével egy Acclaim PepMap RSLC (150 mm x 50 µm, 2 µm részecskeméret, 100 Å pórusátmérő, Thermo Scientific) előtétoszlopon történt sómentesítés után. Az 'A' puffer LC minőségű víz volt 0,1 % hangyasavval (VWR), míg a 'B' puffer LC minőségű acetonitril 0,1 % hangyasavval. A elválasztás során a 'B' puffer aránya 5

% -ról 20 % -ra nőtt 5 perc alatt, majd 45 % -os emelkedés következett be 40 perc alatt. Ezután a 'B' puffer aránya 3 perc alatt 85 % -ra lett növelve, majd 5 percig 85 % -on lett tartva. Ezután a 'B' puffer arány 1 perc alatt 5% -ra csökkent és ezen a szinten volt tartva 6 percen keresztül.

A PRM analíziseket célzott MS2 módban végeztük el. A prekursor ionok kiválasztását követően 30 % normalizált CID energiával fragmentáltuk a peptideket, majd a fragmens ionokat az Orbitrap analizátorban (50000 felbontás, AGC cél: 1,0e4, centroid mód) regisztráltuk 114-1000 m/z tartományban.

10. Az adatok kiértékelése, statisztikai analízise

A teljes bőr IHC és RT-qPCR vizsgálatát legalább két ismétlésben és biológiai triplikátumban végeztük el. A statisztikai számításokhoz a GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) és az Excel szoftvert használtunk. A statisztikai szignifikanciát az ANOVA egyirányú variancia analízisével, a Newman-Keuls post hoc teszt használatával számítottuk ki (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001). A grafikonokon a 95 %-os konfidencia intervallum alsó és felső értékét, valamint az átlagértékeket ábrázoltuk, amit a Panoramic Viewer szoftverrel értékeltünk ki.

A SC fehérjéinek kvantitálásához a Skyline szoftvert használtuk. Shapiro-Wilk teszttel vizsgáltuk meg az adatok normalitását. Mivel az adatok nem követték a normál eloszlást, a vizsgált három csoportot a Kruskal-Wallis próbával hasonlítottuk össze Dunn's post hoc teszt segítségével. A statisztikai analízist a GraphPad Prism 8.0.1 szoftverrel végeztük el (GraphPad Software, San Diego, CA). Az adatokat átlagban \pm SEM ábrázoltuk. A különbségeket abban az esetben tekintettük szignifikánsnak, ha a p-érték kisebb volt 0,05-nél (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001).

Eredmények

1. Az egészséges nedves bőr immunkörnyezete és annak megváltozása hidradenitisz szuppuratívában

Mivel munkacsoportunk korábbi vizsgálatai során kimutatta, hogy a faggyúmirigyekben gazdag bőrt eltérő immun és permeabilitási barrier sajátosságok jellemzik, mint a mirigyekben szegény bőrrégiókat, így jelen munkánk során először a harmadik bőrrégióknak, az apokrin mirigyekben gazdag, nedves bőr jellegzetességeinek vizsgálatát tűztük ki célul, majd azt vizsgáltuk, hogy az AGR bőr immunkarakterisztikája fogékonyá teheti-e ezen területeket egy IL-17 mediálta gyulladás kialakulására.

1.1. Immunsejtek vizsgálata nedves bőrben és hidradenitisz szuppuratívában

Az AGR bőrterület sejtes összetételét elsőként a GP bőrterülethez hasonlítottuk. Fehérjeszintű vizsgálataink azt mutatták, hogy az egészséges AGR bőrterületen a CD11c⁺ DC-k és a CD4⁺ T-sejtek szignifikánsan nagyobb számban voltak jelen az egészséges GP bőrterülethez hasonlítva, míg a LC-k (CD1a⁺) és a makrofágok (CD163⁺) számában nem detektáltunk szignifikáns különbséget a két bőrrégió között. Vizsgáltuk a DC-k érési és aktivációs markereinek (CD80, CD83 és CD86) expresszióját is (gén és/vagy fehérje szinten), amelyek a vizsgálatok többségében nem mutattak jelentős különbséget a két egészséges bőrrégió között. Egészséges nedves bőr és léziós HS bőrminták fehérje szinten történő összehasonlítása során azt tapasztaltuk, hogy a HS bőrmintákban a CD11c⁺ DC-k és a CD4⁺ T-sejtek száma szignifikánsan tovább nőtt az AGR bőrmintákhoz képest, a DC-k aktivált állapotba kerültek, valamint szignifikáns mennyiségű CD163⁺ makrofág jelent meg. A DC-k magasabb aktiváltsági fokát a génextpressziós vizsgálatok is alátámasztották.

1.2. A T-sejt altípusokhoz köthető komponensek

Következő lépésként a különböző T-sejt altípusokhoz köthető citokinek és transzkripciós faktorok expresszióját vizsgáltuk. IHC vizsgálataink alapján elmondható, hogy az IL-17⁺ és

IL10⁺ sejtek szignifikánsan nagyobb számban jelentek meg az egészséges AGR bőrterületen a GP bőrregióhoz képest, sőt ez utóbbi régióban ezek a sejtek majdnem teljesen hiányoztak. Kvantitatív RT-qPCR módszerrel a fent említett T-sejtekhez kapcsolódó faktorok expressziója nem mutatott szignifikáns különbséget a vizsgált egészséges bőrregiók (AGR, GP) között.

Az IL-17⁺/IL-10⁺ sejteken túl néhány IFN- γ ⁺ sejtet is azonosítottunk az AGR bőrterületeken IHC vizsgálattal, míg GP bőrben ez a sejttípus nem volt detektálható. Th2, Th22 és Treg sejtekhez köthető molekulák tekintetében nem találtunk jelentős eltéréseket a két egészséges bőrregió között.

Egészséges AGR és léziós HS minták összehasonlításakor azt tapasztaltuk, hogy a Th17 sejtekhez köthető molekulák (IL-1B, IL-17A, IL-23A, TGF- β), valamint a Th1 sejteket jellemző faktorok (IL-12B, TBX21, TNF- α) génexpressziós szintje szignifikánsan magasabb volt HS bőrben, mint az egészséges AGR bőrben. Ráadásul IHC vizsgálataink azt mutatták, hogy az IL-17⁺, IL-10⁺ sejtek száma szignifikánsan tovább növekedett és nagy mennyiségű TNF- α ⁺ és az IFN- γ ⁺ sejt jelent meg a HS-ás bőrmintákban az egészséges AGR bőrterületekhez képest.

1.3. A Th17 sejtekhez köthető komponensek

Vizsgálataink következő részében a bőr immunstátuszát meghatározó kemokinek, AMP-k, barrier és proinflammatorikus molekulák jelenlétét vizsgáltuk meg AGR, GP és léziós HS bőrben.

Összehasonlítva az egészséges AGR bőrterületet a GP bőrterülettel. Génexpressziós szinten a KRT79, fehérje szinten a kemokinek közül a CCL2, CCL20, AMP-k közül a TSLP, LCN2, valamint a FLG, mint a bőrbarrier egyik jellemző molekulája mutatott szignifikáns eltérést AGR bőrben GP bőrhöz képest.

A léziós HS és az AGR bőrmintákat összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy a HS bőrmintákban a CCL3, CCL19, CCL20, CCL23 kemokinek, a DEFB4B, S100A7, S100A8, S100A9 és a LCN2 AMP-k, valamint a KRT17 barrier molekula génexpressziós szintje szignifikánsan magasabb volt, mint az egészséges AGR bőrben. A Th17-hez kötődő kemokinek közül a CCL2, CCL20, az AMP-k közül az S100A8, LCN2 és a barrier molekulák közül a

KRT17 szignifikánsan emelkedett mennyisége fehérje szinten is kimutatható volt, míg a LOR molekula fehérje mennyisége szignifikánsan csökkent a HS bőrben az AGR mintához képest. Mindez azt jelzi, hogy a HS léziós bőrben az IL-17 által szabályozott immunválasz van jelen.

A proinflammatorikus molekulák vizsgálata során megállapítható, hogy sem fehérje, sem génexpressziós szinten nem tapasztalható jelentős eltérés az egészséges GP és az AGR bőrrégió között, HS bőrben mennyiségük szignifikánsan megemelkedett.

A TLR2, TLR4, NLRP3, IL-1 β és a TNF- α komponensek fehérje és génexpressziós szinten egészséges AGR és GP bőrben alacsonynak mutatkoztak, míg HS bőrben szignifikánsan nagyobb mennyiségben voltak jelen az AGR bőrrégióval összehasonlítva.

2. Egészséges bőrrégiók stratum corneumának vizsgálata tömegspektrometriás módszerrel

2.1. Az AMP tartalom vizsgálatához szükséges módszer optimalizálása

Második kutatási projektünk célja a különböző bőrrégiók SC-ban jelen levő AMP-k azonosítása, expressziójuk összehasonlítása. A SC AMP tartalmának meghatározásához vizsgálataink első részében optimalizáltuk a minta gyűjtését, a fehérje kinyerésének metodikáját és az PRM alapú tömegspektrometriás módszert egészséges, valamint gyulladt bőrben. A fehérjét speciális D-Squame adhéziós koronggal gyűjtöttük be az egészséges, kezeletlen és tisztítatlan bőrfelszínről. A SC mintákat egészséges egyének homlokáról, valamint arcáról gyűjtük.

2.1.1 A mintagyűjtés optimalizálása

A SC-ról D-Squame koronggal eltávolítható fehérje mennyisége korlátozott. Annak érdekében, hogy a legnagyobb mennyiségű fehérjét tudjuk kinyerni, első lépésben résztvevőnként 5 vagy 10 korongot használtunk fel, hogy meghatározzuk a kinyert fehérje mennyiségének és a mintavételhez alkalmazott korongok számának összefüggését. Minden

korongot az adott bőrrégióon belül különböző területre ragasztottuk, majd a minták teljes fehérje koncentrációját az 5 vagy 10 korong fehérje tartalmának egybegyűjtése után mértük meg.

A SC-ból nyerhető teljes fehérje mennyisége inkább egyénekre specifikus tulajdonság, nem függ attól, hogy melyik bőrrégióról vagy hány korong felhasználásával lett eltávolítva a SC.

A mintavétel során megfigyeltük, hogy ugyanarról a helyről három vagy annál több korong eltávolítása jelentős diszkomfort érzést okozott a mintaalanyoknak, ezért minden további mintavétel esetén egy régióban öt különböző helyre ragasztott korongot használtunk.

2.1.2. A PRM alapú tömegspektrometriás módszer tervezése és optimalizálása

Korábbi vizsgálataink során az egészséges bőr három különböző régióját összehasonlítva szignifikáns különbségeket detektáltunk különböző AMP-k (S100A7, S100A8, S100A9, hBD2, LCN2, valamint TSLP) expressziójában gén és/vagy fehérje szinten. Jelen munkánk során a korábbi kísérleteink célmolekuláit kiegészítve az egészséges bőr egyensúlyi állapotában és gyulladt bőr mélyebb rétegeiben jelen lévő további AMP-k (hBD1, 3, 4, LL-37, LACRT, LYZ és DCD) SC-ban jelen lévő mennyiségét vizsgáltuk.

A kiválasztott AMP-k fehérjeszekvenciáit bioinformatikai módszerekkel analizáltuk, majd azonosításra kerültek az egyedi fehérje-specifikus triptikus peptidszekvenciák. A triptikus peptidszekvenciák a fehérje triszinnel történő emésztése során kinyert fragmentumok szekvenciái. Az így kiválasztott peptidszekvenciák kerültek felhasználásra a PRM alapú tömegspektrometriás analízis során.

A kvantitáláshoz a kiválasztott, endogén peptidek szintetikus SIL peptid megfelelőjét használtuk. A PRM adatokat a Skyline szoftver segítségével analizáltuk, majd feltöltöttük a Panoramic repozitóriumba (<https://tinyurl.com/mbbuwrw>). Amikor az endogén peptid és a szintetikus SIL peptid spektruma ugyanabban a retenciós időben azonosítható volt (koelúciót mutatott), a vizsgált peptidet azonosítottként fogadtuk el. Amennyiben az endogén peptid spektruma nem mutatott koelúciót a neki megfelelő szintetikus SIL peptid spektrumával, ki lett zárva a további analízisből. Az endogén és a szintetikus SIL peptidek arányát a Skyline szoftver segítségével határoztuk meg. Az így meghatározott arányok lettek felhasználva a vizsgálati csoportok esetében a kiválasztott AMP-k komparatív analízisére.

Annak érdekében, hogy a SC mintákban jelen lévő konstitutív és indukált AMP-k azonosíthatóságáról megbizonyosodjunk egészséges, valamint gyulladásos bőrbetegségben szenvedő önkéntesektől gyűjtöttünk SC mintát. Négy gyulladásos bőrbetegségben szenvedő beteg (HS, Ps, PPR, AD), valamint egy önkéntes egészséges résztvevő lett bevonva a vizsgálat ezen részébe. A HS mintákat hónalji régióból, a Ps mintákat az alsó végtagról, a PPR mintákat arcról és az AD mintákat combról gyűjtöttük be, míg az egészséges kontroll minták homlokról származtak. Az SC mintákból 'AMP koktélt' készítettünk, mely pozitív kontrollként szolgált a tömegspektrometriás analízishez.

Mind egészséges, mind gyulladásos bőrben sikerült detektálni az S100A8 fehérje ALNSIIDVYHK és GADVWFK peptidjét, az LCN2 fehérje VPLQQNFQDNQFQG peptidjét, a DCD fehérje ENAGEDPGLAR peptidjét, a LACRT fehérje SILLTEQALAK peptidjét és az LYZ fehérje WESGYNTR peptidjét. Az S100A9 fehérje DLYNFLK peptidje, az LL-37 fehérje LLGDFFR peptidje és a LCN2 fehérje TFVPGCQPGEFTLGNIK peptidje csak a gyulladásos bőrben volt jelen. Az S100A7 fehérje SIIGMIDMFHK peptidje, a hBD1 fehérje IQGTCYR peptidje, a hBD2 fehérje GIGDPVTCLK peptidje, a hBD3 fehérje GIINTLQK peptidje, a hBD4 fehérje ICGYGTAR peptidje, a LCN2 fehérje SYNVTSVLFR peptidje, a TSLP fehérje CLEQVSQLQGLWR peptidje, a LACRT fehérje QELNPLK peptidje, valamint a LYZ fehérje GISLANWMCLAK peptidje sem a gyulladásos, sem az egészséges bőrből származó SC-ban nem volt detektálható mennyiségben jelen.

2.1.3. A fehérje elúció optimalizálása

Egészséges és gyulladt bőrben a vizsgált 18 peptidből 9-et lehetett detektálni (DLYNFLK peptid az S100A9 fehérjéből, LLGDFFR peptid az LL-37 fehérjéből, TFVPGCQPGEFTLGNIK peptid az LCN2 fehérjéből, ALNSIIDVYHK peptid és GADVWFK peptid az S100A8 fehérjéből, VPLQQNFQDNQFQGK peptid a LCN2 fehérjéből, ENAGEDPGLAR peptid a DCD fehérjéből, SILLTEQALAK peptid a LACRT fehérjéből, WESGYNTR peptid a LYZ fehérjéből), a másik 9 peptid nem volt jelen detektálható mennyiségben a vizsgált mintákban. A fehérje elúciójához az irodalomban korábban leírt hexán alapú elúciós eljárást használtuk. Annak érdekében, hogy tisztázzuk, vajon az említett 9 peptid alacsony hozamának a hexán alapú elúciós eljárás-e az oka, a következő lépésben a hexán alapú elúciós eljárást összehasonlítottuk a hexánmentes elúciós

eljárással. Tíz koronggal gyűjtöttünk SC mintát egy egészséges felnőtt férfi homlokáról, amit két részre osztottuk a hexán alapú és a hexánmentes peptid kinyerési módszerhez.

A korongról kinyert fehérjéket tripszines emésztése után tömegspektrométer segítségével vizsgáltuk meg. A hexán alapú és a hexánmentes technikával kinyert peptidek mennyiségét hat fehérje hét peptidjének összehasonlításával határoztuk meg. A peptidmennyiségek relatív kvantitálására az endogén és SIL peptidek arányát használtuk. Az így meghatározott arányszám a minták peptid mennyiségét mutatja meg a szintetikus SIL peptidek mennyiségéhez normalizálva; a magasabb arány a minta nagyobb peptidmennyiségét jelzi.

Tapasztalataink szerint a hexánmentes elúciós módszerrel szignifikánsan nagyobb peptidmennyiséget lehet kinyerni a korongokról, mint a hexán alapú eljárással. Ezért a további vizsgálatokhoz a hexánmentes elúciós eljárást használtuk.

2.2. Különböző egészséges bőrrégiók antimikrobiális peptid mennyiségének összehasonlító vizsgálata

A módszer optimalizálása után az egészséges GP, SGR és AGR bőrrégiók AMP mennyiségének összehasonlító vizsgálatát végeztük el. A SC mintákat 15 egészséges (10 nő és 5 férfi) résztvevő GP, SGR, AGR bőrrégiójából gyűjtöttük. A SC minták rendre az alkarról, a homlokról és a hónalji területről lettek gyűjtve, ami a GP, SGR, és AGR bőrrégiókat reprezentálja. A begyűjtött minták fehérjemennyiségét az optimalizált peptid elúciós módszerrel nyertük ki a korongokról, majd PRM alapú tömegspektrometriás módszer segítségével meghatároztuk a vizsgált 18 AMP endogén és SIL peptid arányát a három (GP, SGR, AGR) bőrrégióban.

A kvantifikálás feltételeinek öt fehérje hat peptidje felelt meg koelúciójuk alapján. Az S100A8 fehérje ALNSIIDVYHK peptidjét és a LCN2 fehérje VPLQQNFQDNQFQGK peptidjét nem, míg a S100A8 fehérje GADVWFK peptidét alacsony mennyiségben tudtuk GP bőrrégióban detektálni. Ezek a peptidek AGR területen emelkedettebb, míg SGR bőrterületen szignifikánsan nagyobb mennyiségben voltak jelen a GP bőrterülethez képest. A LACRT fehérje SILLTEQALAK peptidje és a LYZ fehérje WESGYNTR peptidje AGR bőrben nem volt mérhető. GP bőrben a LACRT fehérje SILLTEQALAK peptidje alacsony mennyiségben, a LYZ fehérje WESGYNTR peptidje nem volt detektálható. Ez a két peptid szignifikánsan

nagyobb mennyiségben volt jelen SGR bőrben a GP és az AGR bőrrégióhoz hasonlítva. A DCD fehérje ENAGEDPGLAR peptidje mindhárom bőrrégióban detektálható mennyiségben volt jelen, viszont az egyes bőrterületek DCD mennyiségében nem volt szignifikáns különbség.

Megbeszélés

1. Az egészséges és a gyulladt teljes bőr különbségei

Munkacsoportunk jelentős eltéréseket talált a topográfiailag eltérő egészséges bőrrégiók immunológiai és barrier sajátosságai között, valamint a nedves bőr és a nedves bőrön lokalizálódó HS-ás gyulladt bőr immunparamétereiben. Nedves bőrben egy nem gyulladós IL-17/IL-10 citokin környezet figyelhető meg száraz bőrrel összehasonlítva, szignifikánsan magasabb T- és DC szám jelenlétében. A sejtek aktivitásában viszont nem tapasztaltunk emelkedést, gyulladós jelleget nem mutattak. A nedves bőr nem gyulladós IL-17/IL-10 miliójét IL-17-hez köthető kemokinek, AMP-k és barrier tulajdonságok jelenléte egészíti ki.

Korábbi irodalmi adatok szerint a HS manifesztációját egy szubklinikus gyulladós állapot előzi meg, mely a follikulusok kommenzális baktériumai ellen irányuló aberráns KC válasszal kezdődik. Az egészséges nedves bőr egy sajátos régió-specifikus mikrobióta környezettel rendelkezik, az erre a területre specifikus kémiai miliónek, pH-nak, páratartalomnak és hőmérsékletnek köszönhetően. Ez a sajátos kommenzális flóra homeosztatisz kapcsolatot tart fenn az AGR bőr régió-specifikus immun és barrier környezetével.

Hipotézisünk szerint a HS kialakulása során ez az „AGR-specifikus” homeosztatisz szimbiózis módosul (vagy ki sem alakul teljesen), így a nem gyulladós IL-17/IL-10 környezet károsodik. Ezek a folyamatok vezetnek az IL-17/IFN- γ típusú gyulladás kialakulásához HS-ban.

Kísérleti eredményeink szerint a HS pathomechanizmusa nagyon hasonlít a Crohn betegségben leírt patológiás folyamatokhoz.

Eredményeink arra utalnak, hogy az egészséges AGR bőrre jellemző nem gyulladós IL-17 immunmilió hajlamossá teheti ezt a területet olyan IL-17 típusú gyulladós betegségek kialakulására, mint amilyen a HS, mivel a nedves bőr összes jellegzetes adaptív és veleszületett immun és barrier jellegzetessége HS-ban is megtalálható, sőt felerősödött formában van jelen. Emellett HS-ban újabb aktivációs és gyulladós markerek is megjelennek, létrehozva egy gyulladós környezetet. Tehát az egészséges AGR bőrben alacsony mennyiségben jelen lévő, gyulladós aktivitást nem mutató T-sejtek, DC-k, kemokinek, AMP-k és barrier molekulák egyensúlyának eltolódásával kifejeződik egy IL-17 által szabályozott gyulladós betegség, melyet jelentős kemokin, AMP és barrier eltérések jellemeznek. Emellett magas IFN- γ és TNF-

α expressziós szintet is detektáltunk HS léziós bőrben, mellyel kapcsolatban az irodalmi adatok eddig ellentmondásosak voltak.

2. Az egészséges bőr stratum corneumának antimikrobiális peptidösszetételének különbségei száraz, nedves és zsíros bőrrégióban

Az AMP-k fontos szerepet játszanak a bőr homeosztatisz állapotának fenntartásában, a bőr felszínén elhelyezkedő normálflóra optimális környezetének biztosításában, a patogén mikrobák inváziójának gátlásában. Az AMP-k jelenléte vagy hiánya, mennyiségük emelkedése vagy csökkenése a bőrbarrier egyensúlyi állapotának változását jelző markerek lehetnek.

Korábbi tanulmányokban ugyanarról a helyről 6 vagy több koronggal távolítottak el SC-ot, valamint az első korong fehérje tartalmát kizárták a vizsgálatból. A SC mélyebb rétegei felé haladva a korneociták közötti kohéziós erő nő, ennek megfelelően a tape stripping technikával eltávolítható fehérje mennyisége exponenciálisan csökken a SC mélyebb rétegei felé haladva. Megfigyelték azt is, hogy a mintavételek során a mintát adó személy diszkomfort érzete nő, ha ugyanarról a helyről több korongot távolítanak el. A SC legfelső rétege biztosítja az első védelmi vonalat a szervezetet érő kórokozókkal szemben, ezért a bőrfelszínre szekretált AMP-k összetételének meghatározása szempontjából a SC vizsgálatának kiemelkedő jelentősége van. Vizsgálatainkhoz az első korong fehérjetartalmát használtuk fel és egy helyről csak egy korongot távolítottunk el.

Az AMP összetételében bekövetkező változások prediktív markerként a bőrfelszínen megjelenő, betegségre utaló fizikai jelek megjelenése előtt bekövetkezhetnek. Bőrgyulladás esetén bizonyos AMP-k jelenléte vagy hiánya, expressziós szintje a gyulladás súlyosságára utalhat, így vizsgálatának klinikai relevanciája lehet.

Az egészséges bőr topográfiaailag eltérő területeinek és a gyulladásos bőrbetegségek pathomechanizmusának vizsgálata szempontjából a SC analízisének kiemelkedő jelentősége van mind a kutatásban, mind a klinikumban. Jelenleg a bőrben lezajló immunológiai változások vizsgálatához biopsziával gyűjtenek mintát, mely egy invazív, sebképződéssel járó eljárás. Épp ezért felmerült az igény egy minimális invazivitással járó, fájdalom és hegképződés nélküli mintagyűjtési módszer iránt. A klinikai gyakorlatban ez a vizsgálati módszer kiegészítheti a

korábbi protokollokat, segítheti a pontos diagnózis meghozatalát, valamint a megfelelő terápiás lehetőség kiválasztását.

Vizsgálataink során kidolgoztunk egy, a korábbi tanulmányokban leírt hexán alapú elúciós módszerrel ellentétben új, hexánmentes elúciós módszert. A mintagyűjtéshez D-Squame korongot használtunk. Mivel a D-Squame koronggal eltávolítható fehérje mennyisége korlátozott, az volt a célunk, hogy a korongról kinyerhető fehérje mennyiségét növeljük. Összehasonlítva a hexán alapú és hexánmentes technikát, az utóbbival szignifikánsan nagyobb mennyiségű fehérjét lehetett kinyerni a korongok felszínéről. A hexánmentes elúciós technika esetén a fehérje denaturálása közvetlenül a korong felszínéről történt, míg a hexán alapú mintakinyerési módszer esetén a fehérjét tartalmazó korongokat először egy szilán borítású tárgylemezre kellett ragasztani és a fehérjék denaturálása csak a hexános áztatás után történt meg. A denaturálás előtt beiktatott hexánnal történő áztatás, méréseink szerint jelentős fehérje veszteséssel jár, de ennek bizonyítása további vizsgálatokat igényel.

Korábbi irodalmakban a SC proteomikai vizsgálatához az általunk is használt tape stripping mintavételi módszert használták, azzal a különbséggel, hogy ugyanarról a bőrfelszínről több koronggal távolították el a fehérjetartalmat. Ezt követően antigén-antitest felismerésen alapuló (ELISA, IHC) molekuláris biológiai módszerrel különböző AMP-eket detektáltak (hBD, LL-37, RNase 7, S100A7, DCD). Ezzel ellentétben, mi a minták analíziséhez a Parallel Reaction Monitoring (PRM) alapú tömegspektrometriás módszert választottuk. A PRM egy célzott, hibrid tandem tömegspektrometriás módszer, ahol az analízist egy nagy felbontású analízátor (Orbitrap) segítségével végeztük el. A PRM MS nagy specifitása, érzékenysége, széles dinamikai tartománya és multiplex tulajdonságai miatt alkalmas olyan biológiai minták vizsgálatára, amelyekben a minta fehérjetartalma alacsony. Mivel a SC külső rétegeiből eltávolítható fehérje mennyisége tape stripping módszerrel korlátozott, ezért a PRM alapú tömegspektrometriás módszer alkalmas a minták pontos analízisére.

A SC mintákban 6 olyan AMP-t (S100A7, S100A8, S100A9, hBD2, LCN2, TSLP) vizsgáltunk meg, aminek expressziós szintjét a teljes bőrmintában is meghatároztuk a munkafolyamat első szakaszában. Ezen kívül további 7 olyan AMP-t (hBD1, 3, 4, DCD, LACRT, LYZ, LL37) is beválasztottunk a vizsgálataink második szakaszába, melyek konstitutív vagy indukált AMP-ként jellemző markerei az egészséges vagy gyulladással járó bőrnek. A vizsgált 13 AMP közül 5 fehérje 6 peptidjét (az S100A8 fehérje ALNSIIDVYHK és GADVWFK peptidjét, a LCN2 fehérje VPLQQNFQDNQFQGK peptidjét, a DCD fehérje

ENAGEDPGLAR peptidjét, a LACRT fehérje SILLTEQALAK peptidjét és a LYZ fehérje WESGYNTR peptidjét) tudtuk detektálni az egészséges bőr különböző régióiban.

A kimutatható 5 fehérjéből 4-et (S100A8, LCN2, LACRT és a LYZ fehérjék) szignifikánsan nagyobb mennyiségben detektáltunk SGR bőrrégióban összehasonlítva a GP és az AGR bőrrégiókkal. Az S100A8 fehérje ALNSIIDVYHK és GADVWFK peptidjeit és a LCN2 fehérje VPLQQNFQDNQFQGGK peptidjét jelentősen nagyobb mennyiségben tudtuk detektálni AGR bőrben összehasonlítva a GP bőrrégióval, valamint szignifikánsan nagyobb mennyiségben volt jelen SGR bőrterületen, mint GP és AGR bőrben. Ezek az adatok összhangban vannak a vizsgálataink első részében tapasztaltakkal.

Két, korábban nem vizsgált AMP-t is azonosítottunk SC-ban (a LACRT SILLTEQALAK peptidjét és a LYZ WESGYNTR peptidjét), melyek szignifikánsan nagyobb mennyiségben voltak jelen SGR bőrterületen, mint GP vagy AGR bőrterületen. A GP bőrben a LYZ és a LCN2 hiánya, valamint az S100A8 alacsony szintje alátámasztja, hogy az egészséges AGR és SGR bőrterületet egy nem gyulladásos, de „készenléti” immunstátusz jellemzi a GP bőrterülethez képest.

Az ekkrin verejékmirigyek által termelt DCD-t a három egészséges bőrrégióban közel azonos mennyiségben tudtuk detektálni, mely összhangban van az irodalmi adatokkal. A DCD az egészséges bőr felszínén, néhány kivételtől eltekintve mindenhol megtalálható az ekkrin verejékmirigy által termelt és a bőr felszínére szekretált verejték miatt. Mennyisége jelentősen csökken vagy teljesen eltűnik gyulladásos bőrbetegség kialakulása során az ekkrin mirigyek működési zavara miatt. Vagyis a DCD mennyiségének változása fontos indikátor lehet bizonyos gyulladásos bőrbetegségek kezdeti stádiumában.

Az AMP-k fontos szerepet játszanak bizonyos bőrbetegségek pathogenezisében, mennyiségük összefügghet a betegségek súlyosságával. A tape stripping technikával nyert SC fehérje tartalmának PRM alapú tömegspektrometriás analízise lehetőséget biztosít az AMP-k vizsgálatára. Ez segítséget nyújthat a különböző bőrbetegségek (HS, AD, Ps, PPR) pathomechanizmusának kutatásában, a klinikai gyakorlatban pedig a betegség súlyosságának monitorozásában. Hasznos lehet továbbá a terápiás hatékonyság nyomonkövetésében, mivel lehetőséget biztosít a bőrfelszín AMP összetételének meghatározására terápia előtt és után.

Összefoglalás

Az emberi bőr nem csak az anatómiai, kémiai és mikrobióta összetételében mutat különbséget a topográfiaileg eltérő három fő bőrterületen (mirigyekben szegény [GP], faggyúmirigyekben gazdag [SGR], apokrin mirigyekben gazdag [AGR]), hanem immunstátuszukban és barrier tulajdonságaikban is. Ez megmagyarázhatja azt a tényt, hogy különböző bőrterületeken eltérő, az adott régióra specifikus gyulladásos bőrbetegségek alakulnak ki. Ilyen például GP bőrterületen az AD, AGR régióban a HS és SGR területen az akné és a PPR előfordulása.

Elsőként fehérje és gén szinten vizsgáltuk az egészséges AGR bőr és egy AGR bőrre lokalizálódó gyulladásos bőrbetegség, a HS immunológiai jellegzetességeit. GP bőrrel összehasonlítva AGR bőrben egy nem gyulladásos IL-17/IL-10 citokin környezet figyelhető meg, emelkedett CD4⁺ Th sejt és gyulladásos aktivitást nem mutató CD11c⁺ DC számmal. Az IL-17-hez köthető kemokinek, AMP-k és barrier molekula szintje szignifikánsan nagyobb AGR-ben, mint GP-ben. HS-ás bőrben ez az AGR-specifikus, nem gyulladásos IL-17/IL-10 környezet gyulladásos IL-17/IFN- γ típusú környezetté alakul, valamint az AGR bőrben már jelen levő gyulladásos markerek mellett újabbak is megjelennek. Összehasonlítva az egészséges AGR bőrrel, HS-ás bőrben szignifikánsan megemelkedett az immunválasz sejtjes elemeinek száma és aktivitása, a Th1/Th17 immunválaszokhoz köthető citokinek és transzkripciós faktorok, kemokinek, AMP-k és barrier molekulák mennyisége.

Ezt követően kidolgoztunk és optimalizáltunk egy olyan PRM alapú tömegspektrometriás módszert, mely során egy minimálisan invazív mintagyűjtési és vizsgálati technika segítségével az egészséges és gyulladásos bőr SC AMP összetételét analizáltuk. Vizsgálataink során megfigyeltük, hogy a koronggal eltávolítható SC mennyisége az egyénekre specifikus és nem függ a vizsgált bőrregiótól. Kimutattuk, hogy a hexánmentes elúciós technikával szignifikánsan nagyobb mennyiségű fehérjét nyerhetünk ki a korongokról, mint a hexán alapú elúciós módszerrel. Összehasonlítva az egészséges SGR bőrterület SC AMP mennyiségét a GP vagy az AGR bőrterület SC-ának AMP mennyiségével, szignifikáns különbséget detektáltunk 4 fehérje 5 peptidje (S100A8, LCN2, LACRT és a LYZ fehérjék peptidjei) kapcsán. A különböző bőrterületek SC-ában a DCD fehérje peptidjének mennyiségében nem detektáltunk jelentős eltérést. Ezen vizsgálati módszer segítséget nyújthat a bőrbetegségek pathomechanizmusának kutatásában, a klinikai gyakorlatban a gyulladás-specifikus AMP-k meghatározásával képet kaphatunk a gyulladás mértékéről.

Publikációs lista



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**
H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/445/2021.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Jenei Adrienn
Doktori Iskola: Petrányi Gyula Klinikai Immunológiai és Allergológiai Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10055221

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Jenei, A.**, Kalló, G., Dajnoki, Z., Gáspár, K., Szegedi, A., Kapitány, A., Csósz, É.: Detection of Antimicrobial Peptides in Stratum Corneum by Mass Spectrometry.
Int. J. Mol. Sci. 22, 1-15, 2021.
IF: 5.923 (2020)
2. **Jenei, A.**, Dajnoki, Z., Medgyesi, B., Gáspár, K., Béke, G., Kinyó, Á., Méhes, G., Hendrik, Z., Dinya, T., Töröcsik, D., Zouboulis, C. C., Prens, E. P., Bíró, T., Szegedi, A., Kapitány, A.: Apocrine Gland-Rich Skin Has a Non-Inflammatory IL-17-Related Immune Milieu, that Turns to Inflammatory IL-17-Mediated Disease in Hidradenitis Suppurativa.
J. Invest. Dermatol. 139 (4), 964-968, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jid.2018.10.020>
IF: 7.143

További közlemények

3. Gécz, D., Nagy, B., Szilágyi, M., Penyige, A., Klekner, Á., **Jenei, A.**, Virga, J., Hádáné Birkó, Z.: Analysis of Circulating miRNA Profile in Plasma Samples of Glioblastoma Patients.
Int. J. Mol. Sci. 22 (10), 1-20, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22105058>
IF: 5.923 (2020)
4. Bukva, M., Dobra, G., Gomez-Perez, J., Koós, K., Harmati, M., Gyukity-Sebestyén, E., Bíró, T., **Jenei, A.**, Kormondi, S., Horváth, P., Kónya, Z., Klekner, Á., Buzás, K.: Raman Spectral Signatures of Serum-Derived Extracellular Vesicle-Enriched Isolates May Support the Diagnosis of CNS Tumors.
Cancers (Basel). 13 (6), 1407-1426, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cancers13061407>
IF: 6.639 (2020)





5. Kapitány, A., Medgyesi, B., **Jenei, A.**, Somogyi, O., Szabó, L., Gáspár, K., Méhes, G., Hendrik, Z., Dócs, K., Szűcs, P., Dajnoki, Z., Szegedi, A.: Regional Differences in the Permeability Barrier of the Skin: implications in Acantholytic Skin Diseases.
Int. J. Mol. Sci. 22 (19), 1-15, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms221910428>
IF: 5.923 (2020)
6. Szivos, L., Virga, J., Hortobágyi, T., Zahuczky, G., Uray, I. P., **Jenei, A.**, Bognár, L., Árkosy, P., Klekner, Á.: Az inváziós spektrum prognosztikai jelentősége glioblastomában.
Ideggyogy. Szle. 73 (9-10), 317-325, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.18071/ISZ.73.0317>
IF: 0.427
7. Gáspár, K., **Jenei, A.**, Khasawneh, A., Medgyesi, B., Dajnoki, Z., Janka, E. A., Szabó, I. L., Hendrik, Z., Méhes, G., Szegedi, A., Kapitány, A.: Comparison of Immune and Barrier Characteristics in Scalp and Skin Psoriasis.
Acta Derm.-Venereol. 100 (14), 1-7, 2020.
DOI: <https://doi.org/10.2340/00015555-3553>
IF: 4.437
8. Dobra, G., Bukva, M., Szabó, Z., Bruszel, B., Harmati, M., Gyukity-Sebestyén, E., **Jenei, A.**, Szűcs, M., Horváth, P., Bíró, T., Klekner, Á., Buzás, K.: Small Extracellular Vesicles Isolated from Serum May Serve as Signal-Enhancers for the Monitoring of CNS Tumors.
Int. J. Mol. Sci. 21 (15), 1-20, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21155359>
IF: 5.923
9. Khasawneh, A., Baráth, S., Medgyesi, B., Béke, G., Dajnoki, Z., Gáspár, K., **Jenei, A.**, Pogácsás, L., Pázmándi, K. L., Gaál, J., Bácsi, A., Szegedi, A., Kapitány, A.: Myeloid but not plasmacytoid blood DCs possess Th1 polarizing and Th1/Th17 recruiting capacity in psoriasis.
Immunol. Lett. 189, 109-113, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2017.04.005>
IF: 2.436





10. Radócz, L., Tarcali, G., **Jenei, A.**: In Vitro Susceptibility of Different Oak Species to the Blight Fungus (*Cryphonectria parasitica*).
Acta Hortic. 866, 455-458, 2010.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 44,774

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
13,066**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2021.09.29.

