

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Keratinocita eredetű mediátorok vizsgálata egészséges bőrben és atópiás dermatitisben

Szabó Lilla

Témavezető: Prof. Dr. Szegedi Andrea



DEBRECENI EGYETEM
Petrányi Gyula Klinikai Immunológiai és
Allergológiai Doktori Iskola

Debrecen, 2024

Keratinocita eredetű mediátorok vizsgálata egészséges bőrben és atópiás dermatitisben

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

Írta: Szabó Lilla, okleveles molekuláris biológus

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

Témavezető: Prof. Dr. Szegedi Andrea, az MTA doktora

Az értekezés bírálói:

Dr. Hidvégi Bernadett, PhD

Dr. Mihály Johanna, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Bácsi Attila, az MTA doktora

tagok: Dr. Hidvégi Bernadett, PhD

Dr. Mihály Johanna, PhD

Dr. Szabó Kornélia, PhD

Dr. Lányi Árpád, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A”
Épület Tanterme, 2024. október 25. 13:00

BEVEZETÉS

A bőrünk nélkülözhetetlen kapcsolatot tart fenn a testünk és környezetünk között. A jól ismert *permeabilitási barrier* funkciója mellett bőrünk aktív *immunológiai barrier* is képez, amely az immunológiai védelem első vonalát biztosítja a fertőzésekkel szemben. Az epithelialis sejtek és immunsejtek között egy hatékony „crosstalk” áll fenn, amely biztosítja a gazdaszervezet védelmét, és a szöveti homeosztázis fenntartását vagy helyreállítását. Emellett, a bőr felszínét és függelékeit egy nagyon változatos mikrobiális közösség népesíti be (*mikrobiális barrier*), mely szintén folyamatos kölcsönhatásban van a szervezet epithelialis és immunsejtjeivel, és ezáltal képes befolyásolni az immunműködést. A mikrobiális közösségen túl egy szigorúan szabályozott kémiai milió (*kémiai barrier*) is szerepet játszik a bőr barrier funkciójában. Az említett négy fő barrier komponens (permeabilitási, immunológiai, mikrobiális, kémiai barrier) között létrejövő jól szabályozott kölcsönhatások finoman hangolt egyensúlya elengedhetetlen a bőr barrier működéséhez, ami egyszerre kell, hogy biztosítsa a mechanikai (permeábilis) barrier, az immunológiai barrier, a mikrobióta közösség és a kémiai milió fennállását.

Ha a négy komponens bármelyike károsodik, a közöttük lévő egyensúly valamilyen oknál fogva felbomlik, fertőző, daganatos vagy immunmediált gyulladásos bőrbetegségek alakulhatnak ki. Ezen betegségekre jellemző tulajdonság a barrier károsodás által iniciált régióspecifikus megjelenés, mint például az atópiás dermatitis (AD) és rosacea.

Emellett ismert tény, hogy a bőrünk nem egységes, hiszen az anatómiai különbségek alapján három fő régiót különböztethetünk meg: faggyúmirigyekben gazdag (zsíros, sebaceous gland rich, SGR), apokrin mirigyekben gazdag (nedves, apocrine gland rich, AGR) és mirigyekben szegény (száraz, gland poor, GP) területek. Az SGR régióhoz sorolhatjuk a hajas fejbőrt, arcot, fül mögötti régiót, a mellkast és vállakat, az AGR régióhoz tartoznak a hajlati területek, mint pl. a hónalj és a gluteális régió, míg a GP régióhoz a végtagok és a törzs alsó része tartozik. Az utóbbi évek kutatásai fényt derítettek arra, hogy az anatómiai regionális különbségek mellett, feltehetően azzal összefüggésben, a barrier komponensek tekintetében is regionális eltérések figyelhetők meg, és ez fontos jelentőséggel bírhat, hiszen magyarázatot adhat egyes gyulladásos bőrbetegségek, különösen a barrier károsodás által iniciált betegségek tulajdonságaira.

A kutatócsoportunk legfőbb kutatási célja az egészséges bőrrégiók barrier egységeinek vizsgálata, illetve a különböző bőrrégiókon kialakuló régió specifikus bőrbetegségek megjelenésének hátterében álló molekuláris mechanizmusoknak a feltárása. Munkám során először a keratinociták által termelt főként citokin típusú mediátorokat vizsgáltam a három eltérő bőrrégióban, illetve a GP régióra lokalizálódó atópiás dermatitis-ben. A disszertációmát képező második tanulmányban pedig mélyebben vizsgáltuk az atópiás dermatitis-t, mely során az antimikrobiális peptid típusú mediátorok expressziójának feltárására fókuszáltunk, majd összehasonlítottuk őket a psoriasisban (PsV) mért kifejeződési szintekkel.

CÉLKITŰZÉS

A kutatócsoport korábbi kutatásai során az egészséges bőrrégiók keratinocita eredetű antimikrobiális peptid és kemokin molekula mintázata már feltárára került, azonban a keratinocita eredetű citokinek vizsgálata még nem történt meg. Emellett, eddig még senki nem vizsgálta átfogóan az antimikrobiális (AMP) típusú epimmunom molekulák expresszióját atópiás dermatitis-ben.

I. Jelenlegi kutatásunkban célunk tehát az egészséges SGR, AGR és GP bőrrégiók citokin típusú epimmunom molekula profiljának összehasonlítása: **1.)** mRNS szinten qRT-PCR-al, **2.)** fehérjeszinten immunhisztokémia (IHC) és **3.)** immunfluoreszcencia (IF) módszerekkel.

II. Ezután célul tűztük ki az egészséges GP bőrre jellemző citokin típusú epimmunom molekulák vizsgálatát egy régióspecifikus immunmediált gyulladásos bőrbetegségben, AD-ben fehérjeszinten IF módszerrel, illetve elvégeztük ezen citokinek expressziójának összehasonlítását másik két gyulladásos bőrbetegséggel, a rosaceával (PPR) és PsV-al.

III. Végezetül az AMP típusú epimmunom molekulák expressziós szintjeinek átfogó vizsgálatát végeztük el **1.)** AD-ben mRNS szinten qRT-PCR-al, és **2.)** fehérjeszinten IHC-val, **3.)** illetve PsV-ban fehérjeszinten IHC-val, az összehasonlítható fehérje expressziós szintek érdekében.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Jelen tanulmányokhoz az egészséges bőrminták plasztikai műtéteken áteső egészséges személyektől, a betegektől származó bőrbioptiás minták pedig a Debreceni Egyetem Bőrgyógyászati Klinika járóbeteg szakrendelésén megjelent betegektől származtak. A vizsgálathoz szükséges Helsinkai nyilatkozat irányelveinek megfelelő beleegyező nyilatkozatok minden esetben aláírásra kerültek. A tanulmányt a Debreceni Egyetem helyi etikai bizottsága jóváhagyta (engedély szám: IV/2072-2/2020/EKU).

A bőrminták gyűjtése során minden mintát 2 darabra vágunk, melynek egyik részét RNA*later*-be helyeztük a későbbi RNS izoláláshoz, majd -80°C -on tároltuk, másik felét pedig formalinos fixálást követően paraffinba ágyasztuk a fehérjeszintű kísérletekhez. Az egészséges mintákat a hematoxylin-eosin festést követően csoportosítottuk a faggyúmirigyek és apokrin mirigyek száma alapján. Fénymikroszkóp 10X-es nagyításán, ha az egységnyi területre jutó faggyúmirigyek száma meghaladta a hármat, akkor SGR; ha az apokrin mirigyek száma meghaladja a kettőt, akkor AGR; ha pedig az apokrin és faggyúmirigyek száma kevesebb mint egy, akkor GP minták közé soroltuk az adott mintát. A beteg bőrminták közepsúlyos-súlyos állapotú betegektől származtak, akik szisztémás kezelés alatt nem álltak, vagy a kezelés legalább 3 héttel a mintavétel előtt le lett állítva.

Mintagyűjtés

Az citokin típusú epimmunom molekulák vizsgálatához (első projekt) az egészséges bőrminták ($n=10-10-10$ db) SGR (átlagéletkor \pm SD: $63,4 \pm 15,43$ év), AGR (átlagéletkor \pm SD: $63,3 \pm 10,48$ év) és GP (átlagéletkor \pm SD: $48,1 \pm 15,94$ év) bőrterületekről származtak. Emellett 7 db léziós AD (átlagéletkor \pm SD: $29 \pm 8,25$) és PPR (átlagéletkor \pm SD: $53,3 \pm 14,70$) mintát, illetve 6 db PsV (átlagéletkor \pm SD: $68 \pm 15,52$) és Scalp Ps (átlagéletkor \pm SD: $57 \pm 18,12$) betegmintát gyűjtöttünk.

Az AMP típusú epimmunom molekulák expressziójának vizsgálatához 10 db súlyos AD-s beteg léziós és nem léziós (átlagéletkor \pm SD $34,3 \pm 10,06$), illetve 5 db súlyos PsV beteg léziós (átlagéletkor \pm SD $47,8 \pm 14,3$) területéről gyűjtöttünk bőrmintákat. Egészséges kontrollként 10 db GP (átlagéletkor \pm SD $46,90 \pm 7,95$) bőrmintát használtunk.

RNS izolálás, reverz transzkripció átírás és real-time kvantitatív PCR (qRT-PCR)

Minden mintát TriReagent (Sigma-Aldrich, Dorset, UK) oldatban homogenizáltunk Tissue Lyzer (QIAGEN, Németország) használatával, fémgyöngyökkel töltött innuSPEED líziscsővek segítségével (Analytik Jena, Németország). A bőrbíopsziákból total RNS-t izoláltunk, az RNS koncentrációját és tisztaságát NanoDrop spektrofotométerrel mértük meg (Thermo Fisher Scientific, Bioscience, Waltham, MA), az RNS minőségét pedig Agilent 2100 Bioanalyzer-rel (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) ellenőriztük. Az RNS-t a High Capacity cDNA Archive Kit (Invitrogen, Life Technologies, San Francisco, CA, USA) segítségével írtuk át komplementer DNS-sé (cDNS) a gyártó utasításait követve. A mintákat DNase I-el (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) kezeltük elő. A reverz transzkripció real time kvantitatív PCR (qRT-PCR) méréseket triplikátumban végeztük el előre megtervezett FAM-MGB próbák, valamint TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies) használatával. A mérések minden esetben a LightCycler® 480 (Roche) műszer segítségével történtek. A relatív mRNS mennyiséget a $2^{-\Delta\Delta Ct}$ módszerrel számoltuk ki a PPIA mRNS expressziójára normalizálva.

Immunhisztokémia (IHC)

Az IHC vizsgálatokhoz paraffinba ágyazott blokkokból metszett mintákat használtunk. A deparaffinálás és a rehidratálás után endogén peroxidáz gátlást végeztünk 15 percig 3%-os H₂O₂-al. Ezután következett a hőindukált antigén feltárás. Az 1%-os Bovin Szérum Albuminos (BSA) (Sigma-Aldrich kft.) blokkolás után (1 óra) a metszeteket a kihígított primer antitestekkel nedves kamrában egy éjszakán át 4°C-on inkubáltuk. Ezt követően másnap anti-egér/anti-nyúl HRP konjugált másodlagos antitesttel (Dako) inkubáltuk a mintákat 45 percig. Az antitestekkel való inkubálás előtt és után a mintákat háromszor 5 percig mostuk TBST-vel. Az előhívást Vector® VIP és ImmPACT™NovaRED™Kit (VECTOR Laboratories, Burlingame, CA, USA) segítségével végeztük, a háttérfestéshez pedig metil-zöldet alkalmaztunk. Az egyes fehérjék kimutatását minden metszeten párhuzamosan, egyidejűleg végeztük, hogy az eredmények kiértékelésekor a detektált fehérje expressziós szintek összehasonlíthatóak legyenek. A festések normalizálására pozitív, negatív és izotípus kontrollt használtunk.

IHC kvantifikálás

Minden vizsgált molekula esetében a megfestett metszetek Whole Slide Imaging módszerrel, Zeiss Mirax Midi szkener (Zeiss, Oberkochen, Németország) segítségével bedigitalizálásra kerültek. Ezután a metszeteket a Panoramic Viewer szoftver (3DHitech, Budapest, Magyarország) HistoQuant alkalmazásával értékeltük ki. Az alkalmazást minden molekula esetében betanítottuk a pozitív területnek (pozitív pixel), és a háttér elkülönítésére. Minden metszeten legalább 3 db 500 µm hosszúságú epidermális területet tartalmazó régiót (Region of interest - ROI) jelöltünk ki. Ezt a betanított algoritmust használtuk minden metszet esetében a ROI kiértékelésére. Végezetül meghatároztuk a teljes festődési intenzitást és összehasonlítottuk az értékeket a mintacsoportok között.

Pontozási rendszer

Az citokin típusú epimmunom molekulák vizsálatánál a metszetek kiértékelése után célul tűztük ki az egyes régiókra jellemző epimmunom-mintázat meghatározását, és ehhez egy egyszerűsített, pontozási rendszeren alapuló megközelítést alkalmaztunk. Minden molekula esetében az összes mintacsoport egyéni (Panoramic Viewerrel mért) értékeit növekvő sorrendbe rendeztük, és a legkisebb és a legnagyobb érték közötti lineáris skálát 3 egyenlő tartományra osztottuk. Ezeket az előre meghatározott tartományokat (+), (++) vagy (+++) jelekkel jelöltük. Minden molekula esetében az egyes tartományokat képviselő adatok mediánértékét rangsoroltuk ezekbe a tartományokba. Végezetül azokat a molekulákat tekintettük reprezentatívnak egy adott régióra nézve, amelyek három jelölést (+++) kaptak.

Immunfluoreszcens (IF) festés és kvantifikálás

A citokin típusú epimmunom molekulák vizsgálata esetén az IF festést az IHC festéshez leírtakhoz hasonlóan végeztük a másodlagos antitest alkalmazásának a pontjáig. A primer antitestekkel való inkubálást követően Alexa Fluor™ 555 kecske anti-egér IgG (H + L) és Alexa Fluor™ 555 kecske anti-nyúl IgG (H + L) másodlagos antitesteket alkalmaztunk (ThermoFisher Scientific). Az IF festődés értékeléséhez metszetenként legalább 3 képet készítettünk 200×-os nagyításon. Fiji (ImageJ) program segítségével meghatároztuk az epidermális területenkénti teljes intenzitásértéket 8 bites szürkeárnyalatos képeken. Mivel az

IL-33 molekula a sejtmagban lokalizálódik, a pozitivitást csak a nukleáris területen mértük ezen citokin esetében.

Statisztikai analízis

A statisztikai szignifikancia kiszámolásához minden esetben One-way ANOVA-t, kiegészítve Tukey post hoc tesztel (normál adateloszlás esetén) vagy Kruskal-Wallis tesztet, kiegészítve Dunn post hoc tesztel (ha az adatok eloszlása nem volt normál) alkalmaztunk. A grafikonok a mért mRNS és fehérjeszintek átlagait, illetve a 95%-os konfidenciaintervallumok min és max értékeit mutatja. Az IF-elemzéseinkhez a csoportok közötti statisztikai szignifikancia meghatározásához párosítatlan t-próbát használtunk (*P <0,05; **P <0,01; ***P <0,001) normál adateloszlás esetén, vagy Mann Whitney-tesztet, ha az adateloszlás nem volt normál. A statisztikai elemzéseket a GraphPad Prism szoftver 8-as verziójával (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) végeztük.

EREDMÉNYEK

1. Citokin típusú epimmunom molekulák vizsgálata topográfiailag eltérő egészséges bőrterületeken

1.1 mRNS szinten a különböző bőrterületeket eltérő epimmunom készlet jellemzi

Elsőként az irodalomból ismert citokin típusú epimmunom mediátorokat vizsgáltuk meg mRNS szinten RT-qPCR-ral: *IL25*, *IL33*, *IL23A*, *IL17C*, *IL36RA*, *IL37*, *IL38*, *IL18*, *IL1B*, *IL24*, *IL6*, *IL1A*, *C-X-C Motif Chemokine Ligand [CXCL] 8* és *IL36A*. Mivel az AMP- és kemokin-típusú epimmunom molekulák regionális eltéréseit korábbi kutatásainkban már vizsgáltuk, ezek nem képezték ennek a tanulmánynak a részét. Eredményeink szerint az *IL25*, *IL36RA*, *IL37*, *IL38* és *IL18* mRNS szintje szignifikánsan magasabb volt a GP régióban az SGR területhez képest. Ugyanakkor az *IL1B* szignifikánsan emelkedett szintet mutatott az SGR bőrben. Az AGR terület GP régióval való összehasonlításakor az *IL36RA*, *IL38* és *IL18* molekulák mRNS szintje mutatott szignifikánsan alacsonyabb expressziót az AGR bőrben. Az AGR és SGR régiók összehasonlításakor az *IL33* és *IL6* molekulák mRNS szintje szignifikánsan magasabb, az *IL1B* mRNS szintje pedig szignifikánsan alacsonyabb volt az AGR területen az SGR bőrhöz képest

1.2 A különböző bőrterületeket eltérő epidermális epimmunom fehérjeszintek jellemzik

Következő lépésként célul tűztük ki a citokin típusú epimmunom molekulák (IL-25, IL-33, IL-23, IL-17C, IL-36RA, IL-38, IL-18, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 és IL-24) vizsgálatát fehérjeszinten IHC-val a három egészséges bőrterületen. Festődési mintázatuk alapján az IL-18, IL-1 β , IL-23, IL-25, IL-33 és IL-17C epimmunom molekulák homogén eloszlást mutattak az epidermiszben, az IL-33 és IL-18 molekulák a sejtmagban expresszáálódtak, míg a többi citokin a KC-k citoplazmájában volt megfigyelhető. Az IL-1 α , IL-24, IL-36RA és IL-38 festődésének intenzitása a stratum granulosum rétegben volt a legerősebb, a bazális réteg felé csökkenő intenzitást mutatva. Az IL-6 és IL-8 festődése előzőkénél gyengébb volt, azonban hasonló csökkenő mintázatot mutatott a bazális KC-k felé. A festődési mintázat minden molekula esetében hasonló volt a különböző régiókban. Az SGR és GP bőrterületek összehasonlításakor az IL-25, IL-33, IL-36RA és IL-38 fehérjeszintje szignifikánsan magasabb volt a GP régióban. Ezzel szemben az IL-17C és az IL-23 molekulák fehérjeszintje szignifikánsan magasabb volt az SGR régióban a GP-hez képest. Az AGR és GP területek összehasonlításakor az AGR területen szignifikánsan magasabb IL-17C fehérjeexpressziót mértünk. Az AGR és SGR bőrrégiók összehasonlításakor pedig az IL-1 β , IL-24, IL-25 és IL-33 fehérjeszintek szignifikánsan magasabbak voltak az AGR régióban.

Az mRNS- és fehérjeszintű vizsgálatok közötti ellentmondás azzal magyarázható, hogy a transzkripció és a fehérjeszintézis között számos lépés van (RNS-feldolgozás, transzkripció és transláció módosítások), amely befolyásolhatja a termelt fehérje mennyiségét. Az eltérés azonban abból is adódhat, hogy az mRNS szintű vizsgálataink során teljes bőrbioptziás mintákat használtunk, ezzel szemben a fehérjeszintű eredmények elemzésekor viszont csak az epidermális festődést vettük figyelembe, hiszen jelen kutatásunk fókuszja az epidermális KC-k által termelt epimmunom molekulák, így a dermiszben lévő mirigysejtek citokintermelése nem lett számszerűsítve.

Az IHC méréseink eredményeinek további megerősítése érdekében IF festést végeztünk azon molekulák esetében, amelyek jelentősen eltértek a három bőrrégióban, hiszen a fluorofórok intenzitása lineárisan arányos a fehérjetartalommal. Ezt a megközelítést alkalmazva azt találtuk, hogy az epidermális IL-17C, IL-23, IL-25, IL-33, IL-36RA és IL-38 fehérjeszintek minden esetben összhangban álltak az IHC mérésekkel.

1.3 Különböző bőrterületek eltérő epimmunom profiljainak funkcionális karakterizálása

Mivel jelen tanulmányunkban egészséges bőrrégiókat vizsgáltunk, nem tudtunk hagyományos módon kontroll bőrmintákat alkalmazni. Ezért az egyes régiók egyedi epimmunom-mintázatának meghatározását tűztük ki célul, amihez egy leegyszerűsített pontozási rendszert dolgoztunk ki. Minden molekula esetében az egyes régiókat reprezentáló adatok mediánértékét három előre meghatározott tartomány alapján rangsoroltuk, amelyeket (+), (++) vagy (+++) jelekkel ábrázoltunk. Azokat a molekulákat tekintettük egy régióra jellemző molekuláknak, amelyek három jelölést (+++) kaptak. Eredményeink szerint az SGR területet az IL-23, az IL-17C és az IL-18 jelenléte, a GP régiót pedig az IL-25, IL-33, IL-36RA, IL-38 és IL-18 molekulák jelenléte jellemzi. Az AGR régiót pedig az IL-25, IL-33, IL-23 és IL-18 jelenléte reprezentálja, így mind az SGR mind a GP területek jellemzőit hordozza. Ezután, hogy feltárjuk az egyes régiókra jellemző epimmunom molekulák szerepét, áttekintettük az azonosított molekulák homeosztatis és gyulladáshoz kapcsolódó funkcióira vonatkozó szakirodalmat. Az irodalmi adatok alapján a GP területre jellemző epimmunom molekulák homeosztatis körülmények között Treg sejteket indukálnak, míg gyulladáshoz kapcsolódó állapotban elősegítik a Th2-es és/vagy gátolják a Th17-es válaszokat. Az SGR területre jellemző mediátorok homeosztatis körülmények között segítenek fenntartani a bőrt kolonizáló mikrobákkal való egyensúlyt egy nem gyulladáshoz kapcsolódó Th17-es immunmilió fenntartásával, míg gyulladáshoz kapcsolódó Th17-es válaszokat indítanak el. Az AGR régió mind az SGR, mind a GP régió jellemzőivel rendelkezik.

2. Citokin típusú epimmunom molekulák vizsgálata atópiás dermatitisben, összehasonlítva rosacea-val és psoriasis-sal.

Az irodalmi analízis alapján a különböző régiókat vagy pro-Th2-es vagy pro-Th17-es epimmunom profil jellemzi. Ezért következőnek arra voltunk kíváncsiak, hogy az epimmunom molekulák expressziója gyulladáshoz kapcsolódó körülmények között hogyan változik meg. Kutatásaink során a legfontosabb KC által termelt Th2- és Th17-hez kapcsolódó citokineket (Th17: IL-23 és IL-17C; Th2: IL-33, IL-25, IL-36RA és IL-38) vizsgáltuk immunfluoreszcens festéssel AD-ban és PPR-ban, amelyek a GP és SGR régiókra jellemző „epidermális challenge” által kiváltott outside-in bőrbetegségeknek tekinthetők. Továbbá, betegségkontrollként ugyanezen GP és

SGR régiókra jellemző PsV és Scalp Ps mintákat is vizsgáltunk, hogy egy inside-out bőrbetegségben szintén kimutassuk az epimmunom molekulákkal kapcsolatos változásokat. AD-ben a GP régiót jellemző IL-33, IL-25, IL-36RA és IL-38 citokinek epidermális fluoreszcencia-intenzitása jelentősen megnőtt, míg az IL-23 és IL-17C szintje nem változott. Ezzel szemben PPR-ben az egészséges SGR régiót jellemző IL-23 és IL-17C citokinek intenzitása erősen megemelkedett, míg az IL-33, IL-25, IL-36RA és IL-38 expressziója nem nőtt. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a külső epidermális challenge által kialakult outside-in bőrbetegségben (AD és PPR) a gyulladással epimmunom termelés nagy mértékben hasonlít a homeosztatisz régió specifikus epimmunom mintázathoz, azonban eltűzött mértékben. Ezzel szemben, psoriasisban, amely egy inside-out bőrbetegség, a kialakuló gyulladással epidermális citokin millió független az adott bőrterület homeosztatisz epimmunom milliójától.

3. Az antimikrobiális peptid típusú epimmunom molekulák vizsgálata atópiás dermatitisben

3.1 Az antimikrobiális peptid típusú epimmunom molekulák mRNS expressziójának vizsgálata léziós (AD L) és nem léziós atópiás dermatitis (AD NL) bőrben

Elsőként az AD NL és a GP területől származó egészséges kontroll (HC) bőrmintáknál hasonlítottuk össze a vizsgált AMP-k mRNS expresszióját. Szignifikáns változás alig volt kimutatható; mindössze 2 AMP esetében találtunk szignifikánsan eltérő mRNS expressziót, nevezetesen az enzimatisz aktivitású RNASE7 szintje csökkent, míg az SLPI magasabb szinten fejeződött ki az AD NL mintákban az egészséges kontrollokhoz képest. A többi AMP hasonló szinten volt jelen ebben a két mintacsoportban. Ezután az AD L mintákat hasonlítottuk össze a HC mintacsoporttal. A klasszikus AMP-k közül, a hBD-2-t kódoló béta defenzin (DEFB)4B, illetve a hBD-4-et kódoló DEFB104A molekulák expressziója szignifikánsan magasabb volt az AD L bőrben a kontroll bőrhöz képest. Ezzel szemben a hBD-1-et kódoló DEFB1 ellenkező tendenciát mutatott, szignifikáns különbségekkel az AD L és a kontroll bőr között. A hBD-3-at kódoló DEFB103A/DEFB103B és a katelicidint/LL-37-et kódoló CAMP génexpressziós szintje nem különbözött szignifikánsan a mintacsoportok között. A proteáz inhibitor és enzimatisz aktivitással rendelkező AMP-k esetében azt találtuk, hogy a PI3 és a LYZ szignifikánsan magasabb, míg az RNASE5/ANG és az RNASE7 mRNS szintje szignifikánsan alacsonyabb volt az AD L bőrben az egészséges kontroll bőrhöz viszonyítva. Az

SLPI génexpressziós szintje hasonló volt az AD L és az egészséges bőrben. Ami a kemokin aktivitású AMP-ket illeti, az S100A molekulák mRNS-expressziós szintje szignifikánsan magasabb volt az AD L bőrben, mint a kontroll bőrben. A CCL20 tekintetében nem volt szignifikáns különbség a mintacsoportok között. A neuropeptid aktivitással rendelkező ADM génexpressziós szintje szignifikánsan alacsonyabb volt az AD L bőrben a kontrollokhoz képest, míg az LCN2 szintje szignifikánsan magasabb volt az AD L bőrben.

3.2 Az antimikrobiális peptidek fehérje expressziójának vizsgálata AD L és AD NL bőrben

Ezt követően fehérjeszinten is meghatároztuk a különböző funkcionális csoportokba tartozó AMP-k expresszióját IHC segítségével, melyek kiértékelésre kerültek. Az AD NL és a kontroll csoportok összehasonlításakor az mRNS szintű eredményekkel összhangban szinte minden AMP (hBD-k, RNase7, CCL20, S100A8, ADM, LCN2) esetében hasonló fehérjeszintet mutattunk ki, kivéve az LL-37 esetében, ahol az AD NL bőrben szignifikánsan alacsonyabb szintet mértünk a kontroll bőrhöz képest. Az AD L és az egészséges kontrollok összehasonlításakor a legtöbb vizsgált AMP (9-ből 6) szignifikánsan magasabban expresszálódott az AD L bőrben az egészséges kontroll bőrhöz képest, összhangban az mRNS szintű eredményekkel. Két AMP hasonló szinten volt jelen, míg csak egy AMP expressziója volt szignifikánsan alacsonyabb az AD L bőrben a kontroll bőrhöz képest. Ami a klasszikus AMP-ket illeti, a hBD-k szignifikánsan magasabb szinten voltak jelen, míg az LL-37 esetében egy tendenciózus csökkenést tapasztaltunk az AD L bőrben a kontrollhoz képest. A CCL20 és az S100A8 molekulák fehérjeszintje szignifikánsan magasabb volt az AD L bőrben az egészséges kontroll bőrhöz képest. Az RNase7 és az ADM molekulák kifejeződésének tekintetében nem mutattunk ki szignifikáns különbséget az AD L és az egészséges bőrminták között, az LCN2 szintje azonban szignifikánsan magasabb volt az AD L bőrben a kontrollhoz képest.

A vizsgált AMP-k festődési mintázatát tekintve azt találtuk, hogy az LCN2, a hBD-4, az ADM molekulák expressziója az epidermiszben homogén eloszlást mutat. Az LCN2 és a hBD-4 festődése erős, míg az ADM festődése gyenge volt az AD L mintákban, az LL-37 festődése viszont alig volt kimutatható az AD csoportokban. A hBD-1, hBD-2, S100A8 és LCN2 molekulák az összes mintacsoportban főként az epidermisz apikális részén lokalizálódtak, a

bazális keratinociták felé csökkenő tendenciával. Az RNase7 a stratum corneum, illetve a felső granuláris epidermális rétegben volt megfigyelhető az összes mintacsoportban.

Összefoglalva tehát csak az LL-37 szintje csökkent szignifikánsan az AD NL bőrben a kontrollhoz képest. Az mRNS szinten szignifikáns csökkenést mutató AMP-k nem mutattak csökkenést fehérjeszinten az AD L mintákban. Fehérjeszinten az AMP-k expressziója legtöbb esetben szignifikáns emelkedést mutatott, két esetben hasonló expressziót mértünk, míg egyetlen molekula, az LL-37 esetében detektáltunk csökkenést az AD L bőrben a kontrollhoz képest.

3.3 Az antimikrobiális peptid fehérjeszintek összehasonlítása AD L és léziós psoriasis vulgaris (PsV L) bőrminták között

Feltételezéseink alapján a szakirodalomban található ellentmondásos eredmények abból adódhatnak, hogy az AMP szinteket az egészséges bőr helyett PsV bőrrel hasonlították össze. Ezért célul tűztük ki az AMP molekulák fehérjeszintű kimutatását PsV L mintákban, hogy ezt az ellentmondást tisztázzuk. A legtöbb AMP esetében a PsV L bőrben szignifikánsan magasabb fehérjeexpressziót detektáltunk az egészséges bőrhöz képest. Az ADM és az RNase7 kiemelkedő festődést mutattak, azonban a szintjeik nem különböztek jelentősen a PsV L bőrben az egészséges kontroll bőrhöz képest. Az AD L és a PsV L csoportok összehasonlításakor érdekes módon a legtöbb AMP esetében hasonló volt az expresszió az AD L és a PsV L csoportok között. Ezzel szemben az LL-37 és a CCL20 AMP-k szignifikánsan magasabb szintet mutattak a PsV L bőrben az AD L csoporthoz képest, míg az ADM hasonló tendenciát mutatott, azonban egy kisebb emelkedést ennél a molekulánál is megfigyelhetünk a PsV L mintacsoportban.

MEGBESZÉLÉS

1. A citokin típusú epimmunom molekulák vizsgálata topográfiaileg eltérő egészséges bőrterületeken

Tanulmányunk során a citokin típusú epimmunom mediátorok összehasonlító elemzését végeztük el mRNS (RT-qPCR) és fehérje (IHC és IF) szinten a három egészséges bőrterület között. Továbbá, egy egyszerűsített pontozási rendszer segítségével meghatároztuk ezen

területek abszolút homeosztatikusan epimimmunom profilját is. Eredményeink szerint a különböző egészséges bőrterületek eltérő homeosztatikusan epidermális epimimmunom profilokkal rendelkeznek. Fehérjeszintű eredményeink alapján a GP bőrre az IL-25/IL-33/IL-36RA/IL-38/IL-18 epidermális epimimmunom milió jellemző, az SGR régió egy IL-23/IL-17C/IL-18 epimimmunom-mintázatot mutat, az AGR régió pedig egy IL-25/IL-33/IL-23/IL-18 miliót hordoz. Az mRNA szintű eredmények is hasonló tendenciát mutattak, azonban a fehérje szintű eredményeket tartjuk fontosabbnak, hiszen a fehérjék a molekulák funkcionális formái.

Ezután, hogy jobban megértsük a különböző egészséges bőrrégiók eltérő epimimmunom profiljának szerepét, egy átfogó irodalmi analízist végeztünk. Az irodalmi adatok alapján feltételezzük, hogy a három bőrterület jellegzetes epimimmunom készletei különböznek a homeosztázis fenntartásának mechanizmusában, mivel úgy tűnik, hogy a GP területre jellemző mediátorok a Treg sejtek működését támogatják, az SGR területre jellemző citokinek pedig nem gyulladásszerű Th17-es sejteket indukálnak, míg az AGR terület mind az SGR és GP területek jellemzőit hordozza. Gyulladásszerű körülmények között pedig úgy tűnik, hogy az SGR területre jellemző epimimmunom molekulák a 3-as típusú (Th17-hez kapcsolódó), a GP területre jellemző molekulák meg a 2-es típusú (Th2-höz kapcsolódó) adaptív immunfolyamatokat támogatják, míg az AGR terület mindkettőt hordozza.

Ezekkel az eredményekkel összhangban *Del Duca és munkatársai* magasabb *CXCL8*, *IL1B*, *IL6* és *IL23* mRNA szintet mutattak ki az SGR területen (hát), míg a GP régiót (kar, külső comb és has) magasabb *IL33* és *IL37* mRNA szint jellemezte. Egy másik tanulmányban a Treg számot illetően találtak eltéréseket a különböző bőrterületeken, és a szerzők véleménye szerint a különböző Treg-mennyiségek felelősek lehetnek a bőrmetasztázisok kialakulásának eltérő valószínűségéért a különböző régiókban. Ezek az eredmények összhangban vannak korábbi vizsgálatainkkal is, ahol leírtuk, hogy a nem gyulladásszerű Th17(β) sejteknek kiemelkedő szerepük van a Th17-hez kapcsolódó AMP-k (LCN2 és S100A8) és kemokinek (CCL2) jelenlétével együtt az egészséges SGR és AGR régiókban.

Számos tényező, mint például a mikrobióta, a lipidösszetétel, a nedvesség és a pH, mind felelősek lehetnek az egészséges régiókban detektált eltérően kifejeződő epimimmunom molekulákkal kapcsolatos különbségekért. Azonban úgy gondoljuk, hogy ezek közül a bőr mikrobióta diverzitása nagyon fontos tényező, és nagy mértékben hozzájárul ezekhez a tapasztalt különbségekhez, hiszen a mikrobióta folyamatos közvetlen kapcsolatban van a KC-
kal, és a regionális eltérésük miatt máshogy hathatnak ezekre a sejtekre. Az egyedi bakteriális

összetétel mellett az SGR és AGR bőrterületek különböző gombaközösségek kolonizációjának is kedveznek. A legújabb szekvenáláson alapuló vizsgálatok kimutatták, hogy a *Malassezia* gombafaj domináns az emberi bőrfelületen, és abszolút gyakorisága rendkívül magas az SGR régióban, azonban az AGR területen is kiemelkedő a jelenléte. Ennél is fontosabb, hogy a *Malassezia* fajokról megállapították, hogy Th17-es válaszokat váltanak ki, ami szerepet játszhat a Th17-es útvonalhoz kapcsolódó epimmunom termelés beindításában az SGR és AGR régiók epidermiszében.

2. A citokin típusú epimmunom molekulák szerepének feltárása gyulladásoos bőrbetegségeekben

Következő lépésként meghatároztuk a GP és SGR régiók epimmunom termelésének változásait a rájuk jellemző outside-in típusú gyulladásoos bőrbetegségeekben (AD és PPR). Megvizsgáltuk a legjelentősebb KC-eredetű epimmunom molekulákat, köztük az IL-17C, IL-23, IL-25, IL-33, IL-36RA és IL-38 molekulák expresszióját lézióos AD és PPR bőrmintákon. Emellett psoriasisos betegek SGR (Scalp Ps) és GP (PsV) régióiból származó lézióos bőrmintákat is vizsgáltuk annak érdekében, hogy meghatározzuk az epimmunom molekulák expressziójának változásait egy inside-out típusú bőrbetegségben is. Eredményeink szerint, amikor egy outside-in, azaz epidermális challenge által kiváltott bőrbetegség alakul ki a GP régióban, az IL-33, IL-25, IL-36RA és IL-38 (a GP homeosztatisus citokinjei) molekulák szintje jelentősen emelkedik, míg az IL-23 és IL-17C (kis mennyiség a GP-ben steady-state alatt) szintje nem változik, következésképpen egy 2-es típusú (Th2 mediált) gyulladás alakul ki, akárcsak az AD-ben. Az SGR régióban, amikor a külvilágból érkező epidermális challenge gyulladást indukál, az IL-23 és IL-17C (az SGR homeosztatisus citokinjei) mediátorok szintje jelentősen megnő, míg az IL-33, IL-25, IL-36RA és IL-38 (alacsony a mennyiségük az SGR-ben homeosztatisus körülmények között) nem indukálódik, és ez elősegítheti a 3. típusú (Th17 mediált) gyulladás kialakulását, mint például a PPR esetében. *De Benedetto és munkatársai* a jelenlegi eredményeinkkel összhangban leírták, hogy a barrier károsodás okozta epidermális milió bizonyos szöveti környezetben elősegítheti az adaptív immunaktiváció különböző típusait, ezáltal 2-es vagy 3-as típusú immunválaszt indukálva. Ezzel szemben psoriasisban, mind a GP (PsV) és az SGR (Scalp Ps) területek hasonlóan viselkednek, egy erősen upregulált IL-23 és IL-17 milió van jelen, amelynek háttérében inkább a DC-k által bemutatott autoantigének állhatnak, mintsem az „epidermális challenge”. Ezen eredmények alapján tehát az epimmunom molekulák által kiváltott bőrbetegségeben azon KC-eredetű epimmunom mediátorok

expressziója emelkedik meg, amelyek már homeosztatisz körülmények között is magasabb szinten voltak jelen az adott bőrterületen. Fontos megjegyezni, hogy nem csak a bőr sajátossága a régió-specifikus epimmunom termelés homeosztatisz és gyulladási körülmények között. A TSLP, az IL-25 és az IL-23 eltérő szintjét mutatták ki a vékonybélben és a vastagbélben, ami befolyásolhatja bizonyos gyulladási bélbetegségek, például a Crohn-betegség (Th1/17-vezérelt) és a colitis ulcerosa (Th2-vezérelt) jellegzetes lokalizációját.

Összefoglalva úgy gondoljuk, hogy homeosztatisz körülmények között a különböző bőrterületek jellegzetes mikrobióta kompozíciójának köszönhetően, így az eltérő immun „training” miatt, az eltérő bőrrégiók sajátos epimmunom molekulák termelésére „szakosodnak”. Ez befolyásolhatja a KC-k mediátor termelését patológiás körülmények között is, és meghatározhatja az olyan gyulladási bőrbetegségek komplex immunológiai jellegét és lokalizációját, mely betegség elindításában egy külső epidermális challenge áll, mint pl. az AD (Th2 gyulladás a GP-n) és a PPR (Th17 gyulladás az SGR-en) esetében. Ezzel szemben egy inside-out bőrbetegségben, mint pl. psoriasisban, a gyulladás független a régió homeosztatisz epimmunom-profiljától. Eredményeink alapján javasoljuk a bőrrégiók specifikus különbségeinek figyelembe vételét az adott bőrterületek barrierjavító terápiájának megválasztásakor.

3. Az AMP típusú epimmunom molekulák expressziójának vizsgálata gyulladási bőrbetegségekben

Az AMP-k kiemelkedő szerepet játszanak számos immunmediált bőrbetegség patogenezisében. A PsV és a PPR esetében e molekulák termelődése erősen indukált a keratinocitákban, és az is ismert, hogy egyes AMP-k iniciáló szerepet játszanak a betegség patogenezisében. AD-ben a bőr permeabilitási barrier károsodása bizonyítottan a betegséget kiváltó egyik fő tényező. A szakirodalom arra is utal, hogy a bőr permeabilitás és az antimikrobiális barrier szabályozása szorosan összefügg. Az AMP-k vizsgálata AD-ben azonban hiányos, és az AMP-kifejeződés mértékét illetően számos ellentmondás áll fenn. Ezek részben azért lehetnek, mert az AMP-k expresszióját gyakran inkább a PsV-vel, mint normál kontrollokkal hasonlították össze. Ezenkívül sok esetben az AMP-eket csak mRNS-szinten vizsgálták, ami félrevezető lehet, mivel a fehérjék a molekulák funkcionális formái. A legtöbb esetben a vizsgálatok nem tartalmaztak AD NL bőrmintákat, amelyek kritikus adatokat szolgáltatnának a betegség patofiziológiájának kezdeti lépéseiről. Végül, a mai napig

egyetlen tanulmány sem vizsgálta az AMP-eket az AD-ben azt figyelembe véve, hogy az egyes AMP-k melyik funkcionális alcsoportba tartoznak. Ebben a tanulmányunkban átfogóan vizsgáltuk az 5 funkcionális AMP-csoportot, mind mRNS- és fehérjeszinten. A betegek AD NL (klinikailag tünetmentes) és AD L (klinikailag tünetes) bőrét hasonlítottuk össze a GP területekről származó egészséges kontroll (HC) mintákkal. A PsV egy krónikus gyulladással járó bőrbetegség, amelynek klinikai és immunológiai jellemzői teljesen eltérnek az AD jellemzőitől; a barrier károsodás feltehetően nem a betegség kiváltó oka, ezért PsV L mintákat is vizsgáltunk, mint betegség kontrollt. Az AD NL és a kontroll minták AMP-szintjének összehasonlításakor mRNS szinten nem találtunk szembetűnő különbséget, és csak 2 AMP mutatott szignifikáns változást. Fehérjeszinten csak az LL-37 kifejeződése változott, mely az AD NL bőrben szignifikánsan csökkent szintet mutatott. Az irodalomban korlátozott adatok állnak rendelkezésre az AMP-k fehérjeexpresszióját illetően az AD NL bőrben, és egyetlen tanulmány sem foglalkozott a legtöbb AMP vizsgálatával egyidejűleg egy tanulmányban. A jelenlegi eredményeinkkel összhangban nem mutattak ki kiugró különbségeket az AD NL és a kontroll minták között.

Számos AMP expressziója jelentősen megváltozott az AD L bőrben mRNS szinten, és a legtöbb AMP szintje megemelkedett a kontrollhoz képest. Fehérjeszinten az AMP-k expressziója jelentősen megnövekedett az AD L bőrben a kontrollhoz képest, míg 2 AMP kifejeződése nem változott, és az LL-37 volt az egyetlen AMP, amelynek szintje erősen csökkent az AD L bőrben. A publikált adatok a viszonylag nagyszámú vizsgálatok ellenére ellentmondásosak. Az összefoglaló cikkek hangsúlyozzák, hogy az AMP-k kifejeződése általában csökken az AD L bőrben; azonban az eredeti tanulmányok túlnyomórészt emelkedett vagy hasonló AMP-szintekről számoltak be. A legtöbb adat azonban csak mRNS-szinten áll rendelkezésre, és az IHC-eredmények kvantifikálása a legtöbb esetben hiányzott vagy szubjektív volt. Az akut AD vizsgálatának tekintetében korlátozott számú tanulmány áll rendelkezésre, az eredmények viszont arra utalnak, hogy az AMP-k (S100A7, hBD-2, RNase7) kifejeződése akut AD-ben már erősen indukált, és a kifejeződésük az akut-krónikus átmenet során nem fokozódik lényegesen. Az AD L és a PsV L minták összehasonlításakor azt találtuk, hogy a legtöbb AMP mindkét betegségben kiemelkedően indukálódott, hasonló expressziós mintázattal; azonban sok esetben az adott AMP szintje AD-ben nem érte el a PsV-ben tapasztalt szintet. Az LL-37 mutatta a legszembetűnőbb különbséget a két betegség között, hiszen szintje szignifikánsan megnövekedett a PsV léziókban, míg AD-ben csökkent a kontrollhoz képest. A jelenlegi eredményekkel összhangban a legtöbb AMP emelkedett szintjét mindkét betegség esetében már korábbi vizsgálatok is kimutatták. A szakirodalmat áttekintve viszont az LL-37-tel

kapcsolatos adatok AD-ben ellentmondásosak. Eddig csak egy tanulmány írta le, hogy az LL-37 szintje magasabb az AD L bőrben a kontrollokhoz képest; a szerzők azonban nem tudták detektálni a molekulát számos AD L-mintában IHC-val, ami viszont egybeesik a saját eredményeinkkel. Emellett, néhány más vizsgálat nem detektált szignifikáns különbséget az LL-37 fehérjeszintjében az AD L és a kontrollok között. Végül, több kutatásban az LL-37 a detektálási határ alatt volt, ami szintén összhangban van a jelenlegi eredményeinkkel.

Az a tény, hogy az LL-37 volt az egyetlen AMP, amely csökkent szintet mutatott, felveti a kérdést, hogy milyen szerepet játszhat az AD patogenezisében. Az irodalmi adatok arra utalnak, hogy az LL-37 összefüggésbe hozható az AD mindhárom fő patogenetikai jellemzőjével, ideértve a barrier károsodást, a *Staphylococcus* hiperkolonizációt és a Th2-es gyulladást. Egészséges körülmények között homeosztatikussá egyensúly áll fenn az LL-37, a permeabilitási barrier és a mikrobióta között, amely egy gyulladástól mentes T-sejt (effektor és rezidens memória) és Treg környezetet tart fenn. Az irodalmi adatok azonban arra utalnak, hogy a permeabilitási barrier károsodása szoros kapcsolatban áll a LL-37 csökkenéssel és a *Staphylococcus* túlszaporodásával. Az LL-37 szintjének csökkenése a tight junction gyengüléséhez és a bőr barrier funkciójának károsodásához vezet, hiszen az LL-37 köztudottan fokozza a bőr permeabilitási barrierjét fenntartó tight junction molekulák (pl. claudinok) expresszióját. Ezenkívül a *Staphylococcus* baktérium túlzott jelenléte károsíthatja mind az antimikrobiális és permeabilitási barriereket, hiszen az *S. epidermidis* cisztein-proteáz aktivitása *in vitro* bizonyítottan hasítja az LL-37-et és az egyik fő deszmoszóma-komponenst, a DSG1-et. Ezek az eredmények azért is nagyon fontosak, hiszen a *Staphylococcus*-sűrűség már az AD NL bőrön is jelentősen megnövekszik. Ezenkívül az LL-37 csökkenés tovább fokozhatja a *Staphylococcus* hiperkolonizációra való fogékonyságot AD-ben, mivel az LL-37 rendkívül hatékony a *Staphylococcus* fajok és a biofilmek ellen, ellentétben más AMP-vel, mint pl. a hBD. Ezenkívül a barrier károsodás során a KC-k alarminokat termelnek; főként olyan mediátorokat, amelyek a Th2-es sejtek promócióját indítják el. Az AD-specifikus Th2 citokin miliőről ismert, hogy gátolja az LL-37 *in vitro* indukcióját, ami összhangban van a vizsgálatunkban tapasztalt csökkent LL-37 szinttel.

Összefoglalva elmondható, hogy az AMP-k expressziója általánosságban nem változik, vagy megnövekszik az AD léziós területeken. Az LL-37 indukciójának hiánya volt az egyetlen csökkenés, amelyet AD-ben tapasztaltunk fehérje szinten. Az AMP molekulák kifejeződésének mintázata és mértéke figyelemre méltó hasonlóságot mutatott az AD és a PsV mintacsoportok

esetében, mely alól az egyetlen kivétel az LL-37 volt. Az LL-37 kiemelkedő szerepe az AD patogenezisében könnyen elképzelhető, mivel az LL-37 az AD mindhárom fő patogenetikai jellemzőjével, köztük a barrier károsodással, a *Staphylococcus* hiperkolonizációval és a Th2-es gyulladással is összefüggésbe hozható. Az LL-37 szignifikánsan csökkent szintje az AD NL bőrben azt jelzi, hogy ez a molekula vezető szerepet játszhat az AD patogenezisében, és felveti az LL-37 mint terápiás célpont lehetőségét az AD kezelésében.

ÖSSZEFOGLALÁS

Első lépésként a citokin típusú epimmunom molekulák vizsgálatát végeztük el az egészséges SGR, AGR és GP bőrrégiókban mRNS (RT-qPCR) és fehérjeszinten (IHC). Eredményeink alapján a GP régiót az IL-25, IL-33, IL-36RA, IL-38 és IL-18 molekulák jelenléte jellemzi, az SGR területre az IL-23, IL-17C és IL-18 molekulák jellemzőek, míg az AGR régióban mind az IL-25, IL-33, IL-23 és IL-18 jelen van, tehát az SGR és GP területek jellemzőit is hordozza. Az irodalmi analízis alapján arra következtethettünk, hogy a különböző régiókat pro-Th2-es vagy pro-Th17-es epimmunom profil jellemzi, így gyulladással körülmények között (AD-ben és PPR-ben) is megvizsgáltuk a legfontosabb KC által termelt Th2- és Th17-hez kapcsolódó citokinek jelenlétét. AD-ben a GP régiót jellemző IL-33, IL-25, IL-36RA és IL-38 citokinek magas expressziója volt jellemző, míg PPR-ben az egészséges SGR régiót jellemző IL-23 és IL-17C citokinek intenzitása volt erősen megemelkedett. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a külső epidermális challenge által kialakult outside-in bőrbetegségben (AD és PPR) azon citokinek expressziója emelkedett meg, amelyek már az adott bőrterületen homeosztatikus körülmények között is jellemző citokinek voltak. Ezzel szemben, psoriasisban, amely egy inside-out bőrbetegség, a kialakuló gyulladással epidermális citokin milió független az adott bőrterület homeosztatikus epimmunom milliójától.

A második munkában az AMP típusú epimmunom molekulákat vizsgáltunk (öt funkcionális csoportban) AD-ben és PsV-ban mRNS (RT-qPCR) és fehérjeszinten (IHC) az egészséges GP bőrhöz viszonyítva. Eredményeink alapján, az AD L és a PsV L minták összehasonlításakor a legtöbb AMP mindkét betegségben indukálódott, hasonló expressziós mintázatot mutatva; azonban sok esetben az adott AMP szintje AD-ben nem érte el a PsV-ben tapasztalt értéket. Az LL-37 esetében találtuk a legnagyobb különbséget a két betegség között, hiszen míg PsV léziókban a szintje szignifikánsan megemelkedett, addig AD-ben csökkent a kontroll csoporthoz képest. A jelenlegi eredményekkel összhangban a legtöbb AMP emelkedett szintjét

mindkét betegségben kimutatták, azonban AD-ben a szakirodalmi adatok az LL-37-tel kapcsolatban ellentmondásosak. E molekulának kiemelkedő szerepe az AD patogenezisében elképzelhető, hiszen az LL-37 az AD mindhárom fő patogenetikai jellemzőjével összefüggésbe hozható (barrier károsodás, Staphylococcus hiperkolonizáció, Th2-es gyulladás). Az LL-37 szignifikánsan csökkent szintje az AD NL bőrben azt is jelezheti, hogy a molekulának iniciáló szerepe van az AD patogenezisében, így felveti ezen molekulának a terápiás célpont lehetőségét az betegség kezelésében.



Nyilvántartási szám: DEENK/116/2024.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Szabó Lilla

Doktori Iskola: Petrányi Gyula Klinikai Immunológiai és Allergológiai Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Szabó, L.**, Kapitány, A., Somogyi, O., Alhafez, I., Gáspár, K., Palatka, R., Soltész, L., Töröcsik, D., Hendrik, Z., Dajnoki, Z., Szegedi, A.: Antimicrobial Peptide Loss, Except for LL-37, is not Characteristic of Atopic Dermatitis.
Acta Derm.-Venereol. 103, adv9413, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.2340/actadv.v103.9413>
IF: 3.6 (2022)
2. **Szabó, L.**, Dajnoki, Z., Somogyi, O., Gáspár, K., Hendrik, Z., Szabó, I. L., Szöllösi, A. G., Dinya, T., Töröcsik, D., Kapitány, A., Szegedi, A.: Cytokine profile of the epidermis is region specific and may determine the characteristics of inflammation.
Exp. Dermatol. 32 (7), 1120-1131, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/exd.14820>
IF: 3.6 (2022)

További közlemények

3. Somogyi, O., Dajnoki, Z., **Szabó, L.**, Gáspár, K., Hendrik, Z., Zouboulis, C. C., Dócs, K., Szűcs, P., Dull, K., Töröcsik, D., Kapitány, A., Szegedi, A.: New Data on the Features of Skin Barrier in Hidradenitis Suppurativa.
Biomedicines. 11 (1), 1-12, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/biomedicines11010127>
IF: 4.7 (2022)
4. Dajnoki, Z., Somogyi, O., Retzlerné Medgyesi, B., Jenei, A., **Szabó, L.**, Gáspár, K., Hendrik, Z., Gergely, P., Imre, D., Póliska, S., Töröcsik, D., Zouboulis, C. C., Prens, E. P., Kapitány, A., Szegedi, A.: Primary alterations during the development of hidradenitis suppurativa.
J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. 36 (3), 462-471, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/jdv.17779>
IF: 9.2





5. Kapitány, A., Retzlerné 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: 6.208

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 27,308

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 7,2

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, 2024.03.25.

