

**EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**A KÁROSODOTT IMMUNREGULÁCIÓ ÉS A SZÖVETI  
ÁTÉPÜLÉS VIZSGÁLATA ATÓPIÁS DERMATITISBEN**

**Dr. Gáspár Krisztián**

**Témavezető: Prof. Dr. Szegedi Andrea**



**DEBRECENI EGYETEM**

**PETRÁNYI GYULA KLINIKAI IMMUNOLÓGIAI ÉS ALLERGOLÓGIAI**

**DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2015**

# TARTALOMJEGYZÉK

<b>Rövidítések jegyzéke .....</b>	<b>5</b>
<b>1. Bevezetés .....</b>	<b>7</b>
<b>2. Irodalmi áttekintés .....</b>	<b>8</b>
2.1. Atópiás dermatitis (AD) .....	8
2.1.1. Etiológia, epidemiológia, genetika .....	8
2.1.2. Környezeti faktorok hatása .....	12
2.1.3. Patogenezis .....	16
2.1.3.1. Bőr fiziko-kémiai barrierje és diszfunkciói .....	17
2.1.3.2. Szöveti átépülés (remodelling) és az AD .....	21
2.1.3.3. Immunológiai mechanizmusok változásai .....	22
2.1.3.3.1. Az adaptív immunitás változásai .....	22
2.1.3.3.2. Immuntolerancia .....	25
2.1.3.3.2.1. Centrális és perifériás tolerancia .....	25
2.1.3.3.2.2. Regulatív T sejtek .....	26
2.1.3.3.2.3. Az nTreg sejtek .....	27
2.1.3.3.2.4. Az nTreg-ek AD-ben .....	29
2.1.3.3.3. A természetes immunitás változásai AD-ben .....	30
2.1.3.3.4. Kemokinek és szerepük AD-ben .....	31
2.1.4. Az AD klinikai tünete és diagnosztikája .....	33
2.1.5. Az AD terápiája .....	35
2.2. Célkitűzések .....	37
2.2.1. Az nTreg sejtek szerepének vizsgálata AD-ben .....	37
2.2.2. Szöveti átépülés vizsgálata AD-ben .....	37
<b>3. Betegek és módszerek .....</b>	<b>38</b>
3.1. Betegek .....	38
3.2. Sejtkultúrák .....	38
3.3. Szérum IgE szint mérése .....	39
3.4. Áramlási citometriás vizsgálatok .....	39
3.4.1. Az nTreg-ek tanulmányozása áramlási citométerrel .....	39
3.4.2. Kemokin receptorok kimutatása fibroblasztokon áramlási citométerrel .....	40

3.5. Sejt szuppressziós teszt .....	41
3.6. Quantitatív real-time RT- polimeráz láncreakció (PCR) (TaqMan) analízis .	42
3.7. Szövetteni vizsgálatok .....	42
3.8. Immunfluoreszcens vizsgálatok .....	42
3.8.1. Immunfluoreszcens vizsgálatok bőrben .....	43
3.8.2. Immunfluoreszcens vizsgálatok NHDF-n .....	43
3.9. Funkcionális vizsgálatok NHDF sejteken .....	44
3.9.1. <i>In vitro</i> „reparáció” .....	44
3.9.2. Fibroblaszt migráció 3D kollagén mátrixon .....	44
3.9.3. Kalcium-imaging konfokális mikroszkóppal .....	44
3.9.4. BrdU sejtproliferációs assay .....	45
3.10. Statisztikai módszerek .....	45
<b>4. Eredmények .....</b>	<b>46</b>
4.1. Az nTreg sejtek vizsgálata .....	46
4.1.1. Az nTreg populáció meghatározása AD betegek perifériás vérében CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>bright</sup> CD127 <sup>-/low</sup> FOXP3 <sup>+</sup> jelöléssel (négyes kombináció) .....	46
4.1.2. Az nTreg sejtek számának meghatározása AD betegek perifériás vérében CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>bright</sup> FOXP3 <sup>+</sup> jelöléssel (hármás kombináció) .....	46
4.2. Összefüggések az nTreg sejtek laboratóriumi paramétereit és a klinikai tünetek között .....	47
4.3. Az nTreg sejtek <i>in vitro</i> funkcionális vizsgálata .....	47
4.3.1. Az nTreg-ek szuppresszor aktivitásának változása SEB hatására .....	47
4.3.2. Az nTreg szuppresszor aktivitás dózisfüggő változása SEB hatására ....	49
4.4. Szöveti átépülés vizsgálata atópiás bőrgyulladás során .....	50
4.5. Humán fibroblasztok kemokin receptor expressziós mintázatának vizsgálata <i>in vitro</i> és <i>in vivo</i> körülmények között .....	51
4.6. CCR3 kemokin receptor és ligandjai expressziójának vizsgálata AD-ben ...	52
4.6.1. <i>In vitro</i> mRNS expressziók .....	52
4.6.2. <i>In vivo</i> szöveti expressziók .....	54
4.7. CCR3 és CCL26 regulációjának vizsgálata <i>in vivo</i> és <i>in vitro</i> körülmények között .....	55
4.7.1. CCR3 és CCL26 expressziós kinetikája atópiás bőrben .....	55

4.7.2. CCL26 expresszió regulációja primer keratinocytákban és NHDF sejtekben .....	56
4.8. <i>In vitro</i> funkcionális vizsgálatok CCR3 tekintetében .....	58
4.8.1. CCL26 hatása az intracelluláris Ca <sup>2+</sup> mobilizációra .....	58
4.8.2. CCL26 biológiai hatása dermális fibroblaszt sejteken .....	58
<b>5. Megbeszélés .....</b>	<b>61</b>
5.1. Az nTreg sejtek vizsgálata AD betegek perifériás vérében .....	61
5.2. Szöveti átépülés vizsgálata AD betegekben .....	65
<b>6. Összefoglalás/Summary .....</b>	<b>68</b>
<b>7. Irodalomjegyzék .....</b>	<b>70</b>
7.1. Hivatkozott közlemények jegyzéke .....	70
7.2. Saját közlemények jegyzéke .....	81
<b>8. Tárgyszavak/keywords .....</b>	<b>86</b>
<b>9. Köszönetnyilvánítás .....</b>	<b>87</b>
<b>10. Függelék .....</b>	<b>88</b>

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

<b>AD</b>	atópiás dermatitis
<b>AMP</b>	antimikrobiális peptid
<b>APC</b>	antigén prezentáló sejt
<b>APT</b>	atópiás ráhelyezési teszt (atopy patch test)
<b>BCL2A1</b>	BCL2-kapcsolt fehérje A1
<b>BDNF</b>	agyi neutrofil faktor (brain-derived neutrophilic factor)
<b>CCL</b>	kemokin (C-C motívum) ligand
<b>CCR</b>	kemokin (C-C motívum) receptor
<b>CD</b>	differenciációs klaszter (Cluster of Differentiation)
<b>CSF</b>	kolónia stimuláló faktor (colony stimulating factor)
<b>CLA</b>	bőr (cutan) lymphocyta-asszociált antigén
<b>DC</b>	dendritikus sejt (dendritic cell)
<b>dDC</b>	dermális dendritikus sejt
<b>DNS</b>	deoxyribonukleinsav
<b>ELISA</b>	enzim-kapcsolt immunszorbens teszt (enzyme-linked immunosorbent assay)
<b>FcεRI</b>	immunglobulin E receptor I. típus
<b>FITC</b>	fluoreszcein izotiocianát
<b>FLG</b>	filaggrin
<b>FOXP3</b>	forkhead box P3
<b>FSP</b>	fibroblaszt felszíni fehérje (fibroblast surface protein)
<b>GATA3</b>	GATA-kötő fehérje 3
<b>GSTP</b>	glutation S-transzferáz
<b>HBD</b>	human-β-defensin
<b>HIES</b>	Hyper IgE szindróma
<b>IDEC</b>	inflammatórikus dendritikus epidermális sejt
<b>IFN</b>	interferon
<b>Ig</b>	immunglobulin
<b>IL</b>	interleukin
<b>KLK</b>	kallikrein

<b>LEKTI</b>	lymphoepitheliális Kazal-típusú tripszin inhibitor
<b>LC</b>	Langerhans sejt
<b>mDC</b>	myeloid dendritikus sejt
<b>MHC</b>	major hisztokompatibilitási komplex
<b>MMP</b>	mátrix metalloproteinázok
<b>mRNS</b>	messenger ribonukleinsav
<b>NHDF</b>	normál humán dermális fibroblaszt
<b>NMF</b>	természetes hidratáló faktor (natural moisturizing factor)
<b>NOD</b>	nukleotidkötő oligomerizációs domén
<b>nTreg</b>	természetes regulatív T
<b>PAR-2</b>	plazminogén aktivátor receptor 2-es típus
<b>PBMC</b>	perifériás vér mononukleáris sejt
<b>PBS</b>	foszfát puffer oldat
<b>PCR</b>	polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)
<b>pDC</b>	plasmacytoid dendritikus sejt
<b>PE</b>	fikoeritrin
<b>PRR</b>	mintázatfelismerő receptor (pattern recognition receptor)
<b>SCORAD</b>	atópiás dermatitis pontozása (Scoring Atopic Dermatitis)
<b>SEB</b>	staphylococcus enterotoxin B
<b>SOCS</b>	citokin-szigál szuppresszor (suppressor of cytokine signaling)
<b>SPINK</b>	Kazal-típusú szerin proteáz inhibitor
<b>TCI</b>	helyi calcineurin inhibitor
<b>TCS</b>	helyi glükokortikoszteroid
<b>TCR</b>	T sejt receptor
<b>TEWL</b>	transzepidermális vízvesztés (transepidermal water loss)
<b>TGF</b>	transzformáló növekedési faktor (transforming growth factor)
<b>Th</b>	T segítő (T helper)
<b>TLR</b>	Toll-szerű receptor (Toll-like receptor)
<b>TNF</b>	tumor nekrozis faktor
<b>Tr1</b>	1. típusú reguláló T
<b>TSLP</b>	thymus stromális lymphopietin (thymic stromal lymphopietin)
<b>UV</b>	ultraibolya

## 1. BEVEZETÉS

Az atópiás dermatitis (AD) egy igen gyakori, krónikus lefolyású, remissziókkal és fellángolásokkal járó gyulladós bőrbetegség, melyet a bőr szárazsága, és kifejezett viszketése, valamint a legsúlyosabb formában annak szöveti átépülése (remodelling) jellemez. A betegség jelentős mértékben hozzájárul az életminőség romlásához és nagy gazdasági teherrel is járhat, nemcsak a betegekre és családjukra, de a társadalomra nézve egyaránt.

Számos vizsgálat segített a betegség patofiziológiájának megértésében, de a pontos részletek máig sem teljesen tisztázottak. Az AD multifaktoriális betegség, hátterében genetikai predispozíció játszik szerepet, a fiziko-kémiai bőrbarrier sérülésével, és a természetes és szerzett immunválasz zavarával, melyet súlyosbíthatnak a különböző környezeti faktorok. A megváltozott immunválasz hátterében állhatnak az immuntolerancia elváltozásai, melynek fontos elemei a regulatív tulajdonsággal rendelkező T sejtek. Az egyik ilyen sejtcsoport a forkhead box P3 (FOXP3)-t expresszáló  $CD4^+CD25^{bright}FOXP3^+$  természetes regulatív T (nTreg) sejtek csoportja, melyek szerepe intenzív kutatások tárgya AD-ben is. Ugyanakkor az nTreg funkciók jellemzőinek vizsgálati eredményei ellentmondásosak.

Az immunológiai eltérések mellett a bőr barrier károsodása is kiemelt szereppel bír. További jellegzetes folyamat az AD krónikus, súlyos, terápia-rezisztens formájában a szöveti átépülés, amit a bőr strukturális elváltozásai jellemeznek, de a hátterében lejátszódó mechanizmusok részleteiben nem ismertek. A proinflammatorikus citokinek, valamint a kemokin szupercsalád egyes tagjai nemcsak az AD-re jellemző gyulladás elindításában, fenntartásában és szabályozásában, hanem a szöveti átépülésben is szerepet játszhatnak. Ez utóbbi folyamat (szöveti átépülés kemokinek általi szabályozása atópiás bőrgyulladásban) feltételezett hátteréről azonban nem állnak rendelkezésre irodalmi adatok.

Dolgozatom első része az immunregulációs zavarok AD-ben betöltött szerepének kutatása során kapott eredményeimet foglalja össze, míg a második rész az atópiás bőr szöveti átépülésének kemokin által mediált egyik lehetséges kommunikációs útját feltáró vizsgálataim eredményeit mutatja be.

## **2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS**

### **2.1. Atópiás dermatitis**

Az atópiás dermatitis (AD) egy krónikus, remissziókat és relapszusokat mutató, kifejezett viszketéssel járó, nem fertőző, gyulladásos bőrbetegség, mely gyakran társultan jelentkezik egyéb atópiás betegségekkel (pl. asthma bronchiale és allergiás rhinoconjunctivitis). Az atópia a bőr, illetve a nyálkahártya ártalmatlan környezeti faktorokkal szembeni hiperszenzitivitását jelenti, és a betegek nagy részének szérumában emelkedett teljes és specifikus immunglobulin (Ig) E szint mérhető (1, 2).

A sokszínű, egymással szoros összefüggésben lévő biológiai folyamatok terén szerzett növekvő ismereteink segítenek megérteni a betegség kialakulásának hátterében álló, klinikailag is releváns patofiziológiai eseményeket (pl. az epidermális barrier funkció és az immunvédekezés szabályozásának zavara).

Az AD az elmúlt évtizedekben a bőrgyógyászati kutatások középpontjába került. A nemzetközi irodalom gyűjteményét (PubMed) böngészve és a betegségekre rákeresve, a cikkek számában exponenciális növekedési tendencia látható. Észrevehető, hogy amíg 20 évvel ezelőtti időszakból alig több mint ötezer cikket találhattunk az adatbázisban, addig ez a szám tíz évvel ezelőttre megduplázódott, míg napjainkra elérte a húszezres számot. A nagyfokú érdeklődés hátterében állhat az a tény, hogy sok embert érintő betegségről van szó, valamint az is, hogy a kórkép jelentősen ronthatja az életminőséget is. További fontosságát szisztémás betegséggént való megközelítése adja. Az egyéb atópiás betegséggel való szoros kapcsolatát támasztja alá az úgynevezett „atópiás menetelés” jelensége is. A folyamat során a csecsemőkorban kialakult AD után a betegség természetes progressziójaként a súlyos AD-es betegek csaknem felében alakulhat ki asthma, és a betegek a késői életszakaszokban sokkal fogékonyabbak az allergiás rhinitis kialakulására is (3, 4). A betegség hátterében álló folyamatok és a provokáló faktorok mielőbbi felismerése és leírása tehát kiemelkedő szerepet játszik a betegség kezelésére irányuló kutatásokban is (5).

#### **2.1.1. Etiológia, epidemiológia, genetika**

Az AD egy multifaktoriális betegség, mely kialakulásában környezeti és genetikai tényezők játszanak szerepet, magába foglalva komplex gén-gén és gén-környezet

interakciókat (1). A bőr fiziko-kémiai barrierjének, illetve a szervezet természetes és adaptív immunválaszának működései olyan genetikailag jól meghatározott folyamatok, melyekre közvetlenül hatnak a specifikus és aspecifikus környezeti tényezők, és ezek együttes változása járul hozzá a betegség kialakulásához (6-9).

A betegség prevalenciája a múlt század hetvenes éveitől folyamatosan nő (10), de előfordulási gyakorisága a földrajzi területek függvényében igen nagy különbségeket mutat. A kilencvenes években egy 56 országot érintő átfogó felmérésben két gyermek korosztály (6-7 évesek: 256000 gyermek, és 13-14 évesek: 458000 gyermek) 1 éves prevalencia adatait vizsgálták. A 6-7 évesek között Iránban 2%, Japánban és Svédországban 16% gyakoriságot találtak, míg 13-14 évesek között a legalacsonyabb prevalenciát Albániában mutatták (1%), és a legmagasabbat az Egyesült Királyságban és Nigériában (17%) (11). Ugyanez a munkacsoport hasonló nagy vizsgálat keretében egy évtizeddel később azt az eredményt kapta, hogy a 13-14 éves korosztály esetében a korábban magas prevalenciát mutató iparilag fejlett országokban a növekedés megállt, esetleg csökkent (pl. Nagy-Britannia, Új-Zéland), ugyanakkor a fejlődő országokban nőtt a prevalencia (10). Ebben a korosztályban, egy másik vizsgálat során Indiában igen alacsony (<1%), Ecuadorban (22%) és Ázsiában (15%), valamint Latin-Amerikában (24%) magas prevalenciát írtak le (12). A 6-7 éves korosztály adatait összegezve azonban azt figyelték meg, hogy minden földrajzi területen nőtt a prevalencia (10), Kínában volt a legalacsonyabb (<1%), Kolumbiában a legmagasabb (24%) (12). A földrajzi eltérések még egy országon belül is megjelenhetnek, mely folyamatok az exogén faktorok szerepét erősítik. Például az Egyesült Államok adatait elemezve az egyes földrajzi területek igen változatos eltérést mutattak (2003-ban az AD prevalencia az USA-ban a 17 év alatti populációban 8-18% között volt az egyes államokban) (13). Magyarországon egy 2006-ban publikált felmérés szerint, mely Kelet-Magyarországon csaknem 1200 gyermek bevonásával történt, a 19 év alatti korosztályban a betegség prevalenciája 17% volt (14).

A betegség dinamikáját vizsgálva megfigyelhető, hogy az érintett gyermekek 45 %-ában az első 6 hónapban, 60 %-ában az első évben, 85-95 %-ában 5 éves kor előtt kezdődik a betegség (1). A kórkép lefolyásában észrevehető az a tendencia, hogy a betegek mintegy 40 %-a 14 éves korra „kinövi” a betegséget, és 20 éves korra további 20 % esetében szűnik meg a betegség (1). A betegek harmadában azonban felnőtt

korban is perzisztálnak a tünetek. Mindemellett azonban előfordulnak felnőtt korban kezdődő formák is. Bár a gyermekkori magas adatokhoz képest a felnőtt lakosságban a betegség prevalenciája alacsonyabb (1-3%), mégis az elmúlt évtizedekben növekvő tendenciájú (1, 15).

A genetikai faktorok kiemelt szerepére ikertanulmányok hívták fel először a figyelmet. Egypetéjű ikrekben magasabb volt a konkordancia ráta (0.77-0.86), mint a kétetéjű ikrekben (0.15-0.5), továbbá a betegeknel tapasztalt gyakori pozitív családi anamnézis is alátámasztotta a genetikai faktorok szerepét. Egyes számítások szerint a betegség rizikója megduplázódik ha az egyik, és megtriplázódik ha mindkét szülő szenved a betegségben (1, 7, 16, 17).

A genomikai vizsgálatok számos, az AD-hez társított lokuszt azonosítottak (7, 18). Barnes munkacsoportja 81 lehetséges gént értékelt, melyek fele az AD-ben tapasztalható immun-diszregulációhoz asszociált (18). Ezen gének termékei szerepet játszanak az antigén prezentációban, sejtes és humorális immunválaszban [monocyta differenciációs antigén (*CD14*), GATA-kötő fehérje 3 (*GATA3*), interleukin-4 (*IL-4*), *IL-18* (polimorfizmusa T helper (Th) 2 predominanciát eredményezhet a betegség kezdeti fázisában), nukleotidkötő oligomerizációs domén 1 (*NOD1*), és a Toll-szerű receptor 2 (*TLR2*)], valamint szignál útvonalakban, sejt-sejt interakciókban, sejtmozgásban [BCL2-kapcsolt fehérje A1 (*BCL2A1*), agyi neutrofil faktor (brain-derived neutrophilic factor) (*BDNF*), kemokin C-C motívum ligand (*CCL*) 5, kolónia stimuláló faktor 2 (*CSF2*), glutation S-transzferáz 1 (*GSTP1*), *IL5*, *IL12B*, *IL12RB1*, és a citokin-szignál szuppresszor 3 (suppressor of cytokine signaling 3 - *SOCS3*)] (18) (1. táblázat). Újabb vizsgálatok az IL-13-t kódoló régió variánsait (5q31-33), a CCL5 promóter régió funkcionális mutációit (17q11), és az IL-4R funkciónyerő polimorfizmusait (16q12) is leírták, mely változások az IgE szenzitizáció nélkül megjelenő nem-atópiás (intrinsic) AD kialakulásának hátterében állhatnak (1).

Az immunválasz működését irányító gének mellett az utóbbi időben derült fény arra, hogy az AD kialakulásában az epidermális barrier szerkezetét és funkcióját meghatározó gének is rendkívül fontosak (1. táblázat).

Az epidermális homeosztázist reguláló gének nagyrészt egy klaszterben, az 1q21 régióban található. Ezeket a géneket együttesen epidermális differenciációs komplexnek hívjuk, és a közös gén- és fehérjestrúktúrák alapján 3 nagy csoportra

oszthatjuk (19): szaruboríték (cornified envelop) prekursor gének (pl. involucrin, loricrin, kis prolin-gazdag fehérjék); S100 fehérje gének (pl. psoriasin, koebnerisin, calprotectin); és fúziós gének (pl. cornulin, repetin, hornerin).

Immun diszregulációban résztvevő gének		Bőr barrier diszfunkcióban résztvevő gének
Antigén prezentáció, sejtes és humorális immunválasz	Szignálútvonalak, sejt interakciók, sejtmozgás	
CD14 (monocyta differenciációs antigén)	BCL2A1	FLG
GATA3	BDNF	TSLP
IL-4	CCL5	TSLPR
IL-18	CSF2	IL-7R
NOD1	GSTP1	szaruboríték prekursorok
TLR2	IL-5	S100
	IL-12B	SPINK5
	IL-12RB1	KLK7
	SOCS3	Claudin-1

**1. táblázat** AD-asszociált gének (1, 7, 18-22). (SPINK: Kazal-típusú szerin proteáz inhibitor; KLK: kallikrein, további rövidítésmagyarázat és megbeszélés a dolgozatban)

Ez utóbbi gének egyik fontos tagja az azonos nevű fehérjét kódoló *filaggrin* (*FLG*) gén (1, 23). Először a kifejezett bőrszárazsággal járó ichthyosis vulgaris betegségében írtak le major (R501X, 2282del4) és minor (S3247X, R2447X, 3702delG) *FLG* null-mutációkat. 2006-ban egy nagy áttörésnek számító vizsgálat eredményeit publikálták Palmer és munkatársai, miszerint a kaukázusi AD populációban a fehérjetranszlációt leállító *FLG* homozigóta nonszensz mutációk (R501X, 2282del4) jelenléte szoros összefüggést mutat AD-szel. Egy génmutáció (*FLG*) és egy fenotípus megjelenése közti ilyen szoros kapcsolat poligénes betegségben ritkán látható. A fenti mutációkat AD-ben, mint a betegség kialakulására predisponáló faktorokat definiálták és eddig már mintegy 45 mutációt azonosítottak (24).

A kaukázusi AD populáció leggyakoribb *FLG* mutációi a 2282del4 és az R501X. Ezen két mutáció gyakorisága az AD populációban 20-60% (7, 25, 26). A mutációkat vizsgálva pozitív korrelációt írtak le azok jelenléte és az AD életkor szerinti kialakulása, valamint az allergén szenzitizáció mértéke között (27, 28). Azonban a mutációk

jelenléte, mint önálló faktor önmagában nem hordozza a betegség súlyosságára való hajlamot. Munkacsoportunk egyik legújabb eredménye szerint ugyanis mind a *FLG* mutációkat hordozó, mind a vad-típusú fehérjét hordozó betegek esetében kimutatható a súlyos bőrgyulladás és a betegség súlyosságával való pozitív korreláció abban az esetben, ha jelen van a bőr barrier akár veleszületett, akár szerzett károsodása (29). Ugyanakkor a *FLG* mutációt hordozó betegek esetében az állandóan jelen lévő barrier deficiencia, a vad-típusú fehérjét hordozó betegek csoportjával összehasonlítva, az allergiás szenzitivizációk megnövekedett rizikóját eredményezi (29).

Az epidermális barrier létrehozásában szerepet játszó és a normál bőr funkciójához elengedhetetlen fehérjéket kódoló további gének között fontosak a Kazal-típusú szerin proteáz inhibitor 5 (*SPINK5*) és a kallikrein 7 (*KLK7*) gének (1. táblázat). AD-ben a *KLK7* funkciónyerő mutációi és a *SPINK5* gén funkcióvesztő mutációi (utóbbi az inhibitor funkcióval rendelkező lymphoepitheliális Kazal-típusú tripszin inhibitor (LEKTI) regulátor molekula aktivitásának csökkenését okozza) következtében megnövekedett szerin proteáz aktivitás tapasztalható, mely barrier diszfunkcióhoz vezet. (22). Emellett szignifikáns asszociációt találtak számos vizsgált populációban a thymus strómális lymphopietin (*TSLP*) és receptorai (*TSLPR*, *IL-7R*) génjeinek, valamint a szoros sejt-sejt közti kapcsolatok (tight junctions) létrehozásában szerepet játszó adhéziós fehérje, a *claudin-1* génjének polimorfizmusai és az AD rizikó, továbbá az AD-ben előforduló ekcéma herpetikum között (1. táblázat) (20, 30, 31).

### **2.1.2. Környezeti faktorok hatása**

Az allergiás megbetegedések, köztük az AD, egyike azon multifaktoriális betegségeknek, ahol valóban kimutatható a környezeti faktorok provokáló szerepe. Az AD patogenezisében a genetikai hajlam talaján a környezeti faktorok hatására manifesztálódhat a betegség, megjelenhetnek a jellegzetes klinikai tünetek, melyek súlyossága a kiváltó faktorok erősségétől is függ. A környezeti faktorokat két nagy csoportra oszthatjuk. Ezek a specifikus, és a nem-specifikus faktorok. A specifikus provokáló faktorok közé tartoznak az allergének (inhalatív, nutritív, kontakt, illetve autoallergének) és a mikrobák (baktériumok, pl. *Staphylococcus aureus*; vírusok, pl. humán herpeszvírus-1; gombák, pl. pityrosporum), míg a nem-specifikusak közé a

mechanikai irritációk (pl. vakarás), klimatikus viszonyok, környezeti hőmérséklet változásai (meleg-hideg), napfény, stressz, gyógyszerek, terhesség (9, 32).

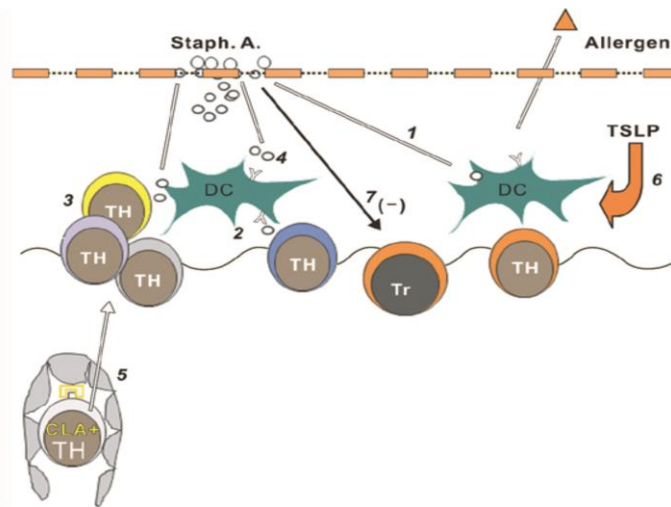
Az egészséges emberi bőrön számos mikroorganizmus kolonizálódik, de a toxintermelő *S. aureus* nem része a normál bőr mikrobiomnak. Az AD-ben szenvedő betegek igen nagy részében (kb. 90 %) mind a lézionális, mind a nem-lézionális bőrön kimutatható a *S. aureus* kolonizációja (szemben a normál egyének 5-10 %-val) (33), melynek foka korrelál a betegség súlyosságával és a klinikai tünetek antibiotikum alkalmazásának hatására javulnak (34). Számos oka lehet a megnövekedett bakteriális kolonizációnak. Az atópiás bőrben végbemenő változások, pl. fiziko-kémiai barrier diszfunkció (8, 35, 36), csökkent természetes immunválasz aktivitás (37), valamint a szerzett immunitás sejtei által termelt citokinek és kemokinek által okozott gyulladásos Th2 túlsúly és Th2 effektor citokinek termelése (34, 38) mind kedveznek ennek a folyamatnak (33). Bár a megnövekedett transepidermális vízvesztés (transepidermal water loss – TEWL) kedvezőtlen körülményeket jelenthet a baktériumoknak (34, 39), a megnövekedett pH fokozott szerin proteáz aktivitással is jár és ez az állapot növeli az infekcióhajlamot (40).

Az atópiás bőrön kolonizálódott baktérium és toxinjai (enterotoxin A-D) széles biológiai aktivitási spektrummal rendelkeznek és részt vesznek az atópiás bőrgyulladás súlyosbításában. A bakteriális szuperantigének [pl. *Staphylococcus* enterotoxin B (SEB)] közvetlenül képesek specifikus T sejt válasz kiváltására, valamint egyéb gyulladásos és strukturális sejtek (pl. eosinophil granulocytá, Langerhans sejt (LC), makrofág, keratinocytá) stimulálására. A szuperantigéneket az antigén prezentáló sejtek (APC) és a major hisztokompatibilitási komplex (MHC)-II egysége mutatja be a T sejtek felé. Ezek a T sejt receptorhoz (TCR) kötődve stimulálják azokat, és növelik a bőrbe való vándorlási képességgel rendelkező kután lymphocytá-asszociált antigén (cutaneous lymphocyte associated antigen – CLA)<sup>+</sup> T sejtek számát is (7, 34, 41).

A baktérium által indukált eseményeket a 1. ábra (1) és a 2. táblázat mutatja be (38).

A betegségben szenvedő felnőtt populáció kb. 80 %-ban mutatható ki szenzibilizáció szezonális és/vagy perenniális aero- illetve ritkábban élelmiszerallergénekkal szemben. Ezt az emelkedett szérum teljes és specifikus IgE szint, pozitív Prick teszt vagy atopy patch teszt (APT) jelzi (42). Szenzibilizált betegekben az allergének légúti, orális és kután expozíció révén azonnali, illetve késői típusú allergiás reakciót is kiválthatnak (5).

A betegeknél a vezető allergén a házipor atka, mely esetében igen magas a szenzitizációs arány (43, 44).



**1. ábra** A *S. aureus* biológiai aktivitásának spektruma. Számozott folyamatok: 1. a DC sejteken keresztül Th2 sejtválasz indukálása; 2. adjuváns hatás az allergén specifikus T sejt stimulációban; 3. T sejtek poliklonális stimulációja; 4. szuperantigén-specifikus IgE szenzitizáció indukálása; 5. T sejt toborzás; 6. TSLP indukálás; 7. Treg sejtek funkciójának módosítása (Forrás: Bieber T. Atopic dermatitis. *Ann Dermatol* 2010;22(2):125-37.) (1, 34, 45).

Mediátor	AD bőrön való hatás	Th2 citokin hatás
Alfa toxin (A)	Megnövekedett keratinocita sejthalál; fokozott citokin produkció; bőrtünetek romlása	Megnövekedett toxicitás a FLG és a savas sphingomyelináz gátlása által
Delta toxin (D)	Fokozott hízósejt degranuláció; bőrtünetek romlása	Fokozott hatás emelkedett IgE termelés útján
Szuperantigének	Fokozott hízósejt degranuláció; fokozott citokin produkció; bőrtünetek romlása	Fokozott hatás emelkedett IgE termelés útján
Staphylococcus A fehérje	Ismeretlen hatás; fokozott gyulladás	Nem ismert
Lipoteichoïn sav	Fokozott gyulladás; bőrtünetek romlása	Nem ismert

**2. táblázat** Az AD tüneteinek és a Th2 citokinek szerepének módosítása a staphylococcus produktumai által (Forrás: Travis JB. Toxic interaction between Th2 cytokines and *Staphylococcus aureus* in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 2014;134:2069-71.) (38, 46-51).

A házipor atkák között a *Dermatophagoides pteronyssinus* és a *Dermatophagoides farinae* (testrészei és széklete) a leggyakoribb allergénforrások az AD kialakulása szempontjából. Ezen allergének (több, mint 22-t írtak le eddig) legtöbbször proteolitikus aktivitással rendelkező enzim, melyek között a legfontosabb a Der p1 és Der p2 (*D. pteronyssinus* allergénjei), valamint Der f1 és Der f2 (*D. farinae* allergénjei) allergének (52). A házipor atkák jelentősége az AD betegek patogenezisében egyrészt abban áll, hogy kimutathatók a betegek bőrén, életterében (ruha, ágy), másrészt abban, hogy ismert ezen inhalatív allergének bőrön keresztüli szenzitizációjának és ezáltal allergiás tünetek kialakításának lehetősége is (53, 54). Ennek számos mechanizmusa lehet.

A házipor atka allergének direkt proteolitikus enzim-aktivitása például következményes barrier károsítást és elhúzódó barrier-helyreállítást okoz AD-ben szenvedő betegekben (55). Az allergének enzimatisma tulajdonságaik révén az epidermális keratinocyták közötti tight junction kapcsolatokat direkt károsítják, továbbá eosinophil degranulációt, fokozott citokin termelést (pl. IL-6, IL-8) okozó keratinocyták aktivációt váltanak ki (56, 57). Ezen túlmenően az endogén szerin proteázok és inhibitoraik kapcsolatát is felborítják, ezáltal vezetve a barrier károsodásához, helyi gyulladáshoz és késleltetett barrier-helyreállításhoz (57, 58).

Emellett a házipor atkák allergénjeinek hatására a keratinocyták és a dermális myelin hüvely nélküli idegrostok felszínén lévő 2-es típusú plazminogén aktivátor receptor (PAR-2) direkt, hosszantartó aktiválása epidermális diszfunkcióhoz, krónikus viszketéshez, és elhúzódó barrier regenerációhoz vezethet (56, 59).

Továbbá az allergének IgE-hez való direkt kötődése a klasszikus I-es típusú hyperszenzitivitási folyamatot indítja be. Ennek során a szenzitizációt követően az allergénnel való ismételt találkozás után a hízósejtekből és basophil granulocytákból felszabaduló hisztamin, és hisztamin-szerű anyagok szöveti károsodáshoz, kifejezett viszketéshez vezetnek (42, 57). Kimutatták, hogy az atka-specifikus IgE szint lineáris korrelációt mutat az AD klinikai súlyosságával (60).

Az allergén szenzitizáció kimutatására alkalmazott *in vivo* bőrtesztek a prick teszt és az APT. Az utóbbi teszt során AD betegek aeroallergénekre adott IgE válaszát és klinikailag a betegnél a vizsgált fehérjére adott gyulladáshoz vezető választ észlelhetjük késői (IV) típusú hyperszenzitivitási reakció formájában (61). Egy korábbi vizsgálatunk során

46 AD-s beteg 63 %-ban észleltünk késői APT pozitivitást, mely eredmény jól korrelál az irodalmi adatokkal is (44).

Az AD patogenezisében és az allergén szenzitizáció kialakulásában, az oki provokáló specifikus környezeti allergének mellett fontosak még a nem-specifikus környezeti faktorok is (62). Ide tartoznak pl. a szennyezőanyagok (kén-dioxid, szén-monoxid, dohányfüst, stb.), vagy a fejlett ipari társadalmak „nyugati életstílusa”, melyek bizonyítottan növelik az allergiás betegségek kialakulásának rizikóját és prevalenciáját (63). A klimatikus, illetve fizikai változók nemcsak direkt hatással lehetnek a már manifesztálódott AD betegekre (pl. napfény hatása a klinikai tünetekre), hanem indirekt módon is kihatnak a betegség kialakulására. Például a pollenszezon megnyúlásában, a megnövekedett pollen koncentrációban, az új pollenek megjelenésében, és a megváltozott pollenszerkezet kialakulásában nyilvánulhatnak meg (62, 64).

### **2.1.3. Patogenezis**

Az AD jól karakterizálható klinikai tünetei mögött bonyolult patomechanizmus rejtőzik. A háttérben megfigyelhető az élettani körülmények közt komplex módon, egymásra utaltan együttműködő epidermális barrierfunkciók és összetett immunmechanizmusok folyamatainak abnormalitása. Azaz önmagában egy dolog nem tehető felelőssé a betegség kialakulásáért és a klinikai tünetek megjelenéséért. Az AD létrejötténél a bőr barrier és az immunválasz olyan, a betegségnek kedvező környezeti miliőben kialakult elváltozásai láthatók, mely miatt az arra hajlamos egyének epidermise nem képes ellenállni a mindennapi behatásoknak, és az ártalmatlan környezeti anyagokra is hiperszenzitivitási reakcióval válaszol (40).

A betegségben tehát két, egymással szoros összefüggésben álló és egymástól nem függetleníthető rendszer elváltozásai láthatók: az immunológiai folyamatok zavara (természetes és adaptív immunitás elemeinek, effektor és regulatórikus T sejtek egyensúlyának, funkciójának zavara), és a bőr fiziko-kémiai barrierjének diszfunkciója, melyeket genetikai és környezeti faktorok befolyásolnak.

A patomechanizmusban résztvevő sejtes elemeket könnyen megismerhetjük a betegségre jellemző hisztopatológiai kép elemzésével is. Szövettanilag az akut bőrléziókban epidermális hyperplasia, intercelluláris oedema és parakeratosis, valamint dermális diffúz T sejtes és monocyta-makrofág infiltráció látható. A lymphocytás

infiltrátum aktivált memória T sejteket tartalmaz (ezek CD3, CD4, HLA-DR, CD25, CD45RO pozitívak lehetnek), melyek közt a leggyakoribbak a Th2 sejtek. Emellett a hízósejtek a degranuláció különböző fázisaiban lehetnek jelen. A krónikus, lichenifikált léziók szövettani képe epidermális acanthosist, illetve hyper- és parakeratosist mutat, valamint a bazális membrán megvastagodása és a dermális endotheliális hyperplasia mellett emelkedett számban vannak jelen IgE kötő dendritikus sejtek (dendritic cell – DC) és makrofágok, hízósejtek, eosinophilek. Továbbá az effektor T sejtek között akut fázisban Th1, Th17, Th22, krónikus fázisban inkább Th1 dominancia látható (1, 65, 66).

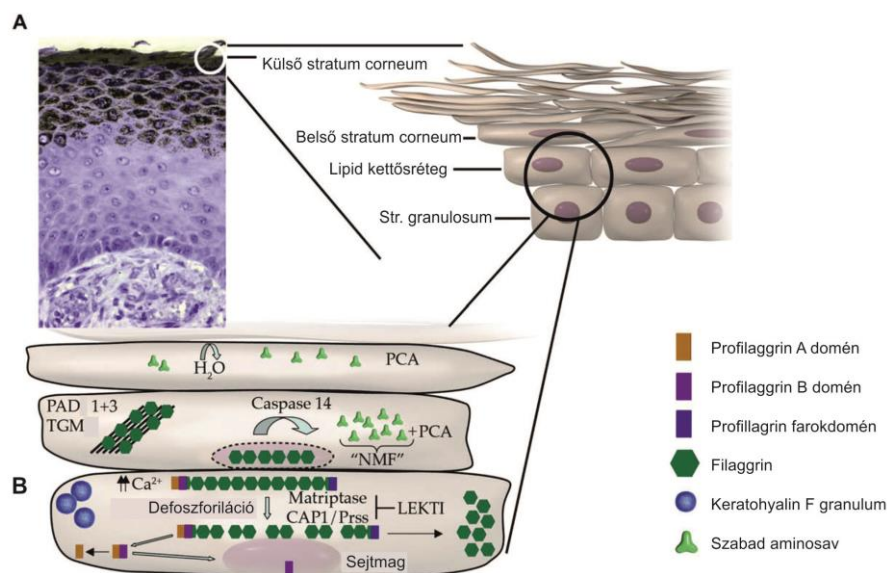
### ***2.1.3.1. A bőr fiziko-kémiai barrierje és diszfunkciói***

Az emberi bőr barrier nem egy élettelen váz, hanem egy metabolikusan aktív, élettanilag fontos szerepet játszó réteg, melynek feladata a fizikai és kémiai védelem a külvilágból érkező ingerekkel szemben, valamint a TEWL megakadályozása (40, 67). A bőr fiziko-kémiai barrierje hisztológiailag két fő komponensből áll, a stratum corneum alsó és a stratum granulosum néhány felső sejtrétegéből. A barrier alkotói a keratinocyták (corneocyták), a struktúrfehérjék, a létrejövő sejt-sejt kapcsolatok, és az intercelluláris lipidek (pl. ceramid, koleszterol, szabad zsírsavak) (68), melyek a keratinocyták által létrehozott, komplex, és különlegesen szabályozott folyamat végeredményeként létrejött szaruborítékot veszik körbe (69).

A szaruboríték a hámsejtek fő strukturális fehérjéivel is kapcsolatban áll, melyek közül kiemelkedő jelentőségű molekula a FLG (39, 70-72). A fehérje a stratum granulosumban lévő profilaggrinból defoszforilációs és proteolitikus lépések után keletkezik (2. ábra), mely folyamatokat többek között a kalcium ion koncentráció és egyes szerin proteázok, valamint a gátló hatású LEKTI fehérje regulálnak (23, 40, 70). A FLG feladata a keratin intermedier filamentumok keresztkötése és makrofibrillumokká alakítása, ezáltal egy oldhatatlan keratin mátrix létrehozása; továbbá a FLG rögzíti a keratin mátrixot a szaruborítékhoz, mely fizikai erősséget biztosít a barrier számára (23).

A mechanikai vázszerkezetet biztosító jelentősége mellett a FLG fontos szerepet játszik abban is, hogy a stratum corneum külső részei felé haladva aminosavakká (pl. urokánsav, pyrrolidin karboxilsav, alanin) degradálódva létrehozza a természetes hidratáló faktort (natural moisturizing factor – NMF) (40), mely központi szerepet

játszik a bőr hidratáltság (TEWL inhibíció), illetve a savas pH fenntartásában (pl. a transz-urokánsav segít fenntartani az epidermis pH grádiensét), továbbá regulálja a proteázok aktivitását, a barrier permeabilitását és a bőr antimikrobiális védelmét (7, 39, 70).



**2. ábra** A FLG expressziója és szerepe a bőr fiziko-kémiai barrier kialakításában. A profilaggrin a keratohyalin granulumokban található (stratum granulosum), míg a FLG a stratum corneumban (A). A FLG homeosztázis molekuláris kontrolljának folyamata (B). (Forrás: O'Regan GM et al. Filaggrin in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2008;122(4):689-93.) (70).

A FLG deficiencia tehát nemcsak a stratum corneum integritására hat, hanem az NMF szintjének csökkenését is okozza, mely folyamatok együttesen fokozott TEWL-hez és a bőr dehidrációjához vezetnek (73).

A barrier létrehozó lipid- és fehérjestruktúrák expressziója szigorúan irányított. Igen fontosak a barrier kialakításában a kimotripszin-szerű szerin endopeptidáz enzimek családjába tartozó, az epidermisben expresszálódó proteázok, a humán szöveti KLK-k (39). A KLK5, KLK7, KLK13 és KLK14 a corneodesmosomákat degradálják, melyek fenntartják az adhéziót a környező corneocytákkal és így kulcsfontosságúak az epidermális hámlásban (39). A folyamatot a LEKTI (*SPINK5* gén terméke) szabályozza (36).

Az AD háttérben megfigyelhető a fiziko-kémiai barrier károsodása, és a következményes, a betegség súlyosságával is korrelációt mutató, fokozott TEWL, valamint eredményeként a bőrszárazság (29). Ugyanakkor a barrier nemcsak belülről átjárható, hanem kívülről is, így ez az állapot elősegítheti a nagy molekulatömegű struktúrák (allergének, baktériumok és vírusok) átjutását is a bőrön. A barrier károsodásának eredete lehet genetikai, vagy szerzett (39, 74). A genetikai eredetű bőrbarrier károsodások közül AD-ben a legismertebb a korábbiakban már ismertetett *FLG* gén mutációja. A mutációk jelenléte kiemelkedő kockázattal jár a fiatal életkorban kialakuló, súlyos, egész életen át tartó, asthmával/szénanáthával társuló, gyakori bőrfertőzésekkel járó ekcéma kialakulására (75). A barrier károsodásakor a FLG mellett a nedvességmegtartó képességgel rendelkező zsírtartalmú molekulák, a ceramidok száma is csökken, és a stratum corneum pH-ja is megváltozik, mely hatására a proteáz aktivitás-inhibíció egyensúlya is zavart szenvedhet (1, 22, 26).

AD-ben a szerin proteázok aktivitása is emelkedett. Ennek háttérben veleszületett, és szerzett okok állhatnak (22). A bőr barrier felépítő rendszert és annak AD-ben történő változásait a 3. táblázat foglalja össze. A veleszületett változások közé tartozik a *KLK7* funkcióvesztő mutációja és a *SPINK5* inhibitor funkcióvesztő mutációja, melyekről az AD genetikáját taglaló fejezet ír bővebben. Mindkét gén esetén, a genetikai polimorfizmusok következtében fokozott szerin proteáz aktivitás alakul ki AD-ben. Emellett az emelkedett pH hatására is bekövetkezhet fokozott szerin proteáz aktivitás, melynek következtében a barrier létrejöttében résztvevő fehérjék destrukciója, illetve az intercelluláris lipid membrán integritásának zavara és fokozott Th2 gyulladás jelentkezik következményes barrier diszfunkcióhoz vezetve (22). Az IL-4 a barrier komponenseire közvetlen hatással van, pl. csökkenti a ceramid, a loricrin, a desmoglein-3 és a FLG termelését (76). A corneodesmosomák degradációja fokozódik, valamint a PAR-2 aktiválásával és a lamelláris testek szekréciójának csökkentésével a stratum corneum lipidjeinek mennyisége is csökken (36, 39). Ha a stratum corneum károsodik, proteáz-aktív allergének és kontrollálatlan intrinzik proteázok szabadulnak fel, melyek hatása a keratinocytákban elősegíti a tumornekrózis factor alfa (TNF $\alpha$ ), IL-1 és TSLP termelést, mely LC aktiválódáshoz és IL-4, IL-5, IL-13, CCL17, CCL22 termeléshez, valamint következményes Th2, hízósejt, és természetes ölősejt aktiváláshoz vezethet (26, 77, 78), sőt a károsodott barrieren keresztül történhet meg az allergénszenzitizáció

is (77). Látható tehát, hogy a fiziko-kémiai és az immunológiai barrier közti szoros kapcsolat meghatározza a barrier egészének működését, illetve károsodását.

	<b>Veleszületett</b>	<b>Szerzett</b>
<b>Corneocyták</b>	FLG, S-100, Claudin-1 mutációk	pH↑ → szerin proteázok↑ → IL-1a → TH2 → IL-4, IL-13 → FLG, loricrin, involucrin↓
<b>Intercelluláris kapcsolatok</b>	Proteáz (KLK7), proteáz inhibitor (SPINK5) tight junction (claudin-1) mutációk	pH ↑, detergenssek, exogén proteázok↑, proteáz inhibitorok↓ → corneodesmosoma degradáció
<b>Lipidek</b>	Proteáz (KLK7), proteáz inhibitor (SPINK5) mutációk	pH↑ → szerin proteázok↑ → lipid-feldolgozó enzimek degradációja + PAR2 aktiváció → ceramidok↓

**3. táblázat** Az epidermális barrier elváltozásai AD-ben (7, 18-22, 26, 36, 39) (magyarázat a szövegben).

A corneocyták közti teret a ceramidok, koleszterin, és szabad zsírsavak által kialakított lamelláris lipidstruktúra tölti ki, mely állapota igen fontos az ép lipidbarrier létrehozásában. A lipidek extracelluláris érési folyamataiban többek közt glükocerebrozidáz és szfingomielináz enzimek játszanak szerepet. Az enzimeket kódoló gének mutációja esetén létrejött súlyos barrierkárosodás következtében ichthyosis egyes formái, vagy ichthyosis-szerű bőrtünetek jelenhetnek meg (79).

A stratum corneum mellett fontos tényezők a barrier létrehozásában a stratum granulosum alsó sejtrétegében lévő intercelluláris kapcsolatok, a tight junction-k, melyek komplex adhezív és támasztó tulajdonságaik révén kontrollálják a paracellularis folyadékáramlást is (21). A tight junction létrehozásában résztvevő fehérjék közt fontos szerepet játszik többek közt a claudin-1. A fehérje alacsony expressziója növeli a TEWL-t, valamint elősegíti a Th2 polarizációt is (30), melynek következtében a bőr herpeszvírus fertőzésre való fogékonysága is nőhet (31).

A genetikai tényezők mellett a szerzett barrierkárosodás létrejöttének okai lehetnek a testfelszínen megjelenő kórokozók, vagy irritáló hatású kémiai anyagok, detergenssek,

szapannok. A szerzett barrierkárosodás következményeként aktivált Th2 és Th22 sejtek által termelt citokinek is modulálhatják az epidermális fehérjéket, mely folyamat alacsony FLG szinthez vezethet (9, 39). A strukturális fehérjék genetikai, vagy szerzett abnormalitása azonban nonspecifikus gyulladást is indukálhat, mely további barrier károsodással járhat.

### ***2.1.3.2. Szöveti átépülés (remodelling) és az AD***

A bőr fiziko-kémiai barrierjének strukturális és funkcionális változása és az állandóan jelenlévő gyulladás eredményeként egyéb szerkezeti átalakulások is végbemehetnek az atópiás bőrben. AD-ben a proinflammatorikus citokinek nemcsak a bőrgyulladás elindításáért és fenntartásáért felelősek, de részt vehetnek a remodelling patogenezisében is (6).

Az atópiás bőr remodelling jelenségének fontosságát jobban megérthetjük az atópiás asthmában már leírt szöveti átépülés folyamatának megértésével. Az asthma pathogenezisében a krónikus gyulladás mellett a légutak remodellingje fontos folyamat, mely a klinikailag súlyos, szteroid-kezelésre refrakter betegekben alakul ki. A szöveti átépülést mutató esetekben nő a morbiditás is (80).

Az AD kezeletlen, krónikus formájában is tapasztalható, a dermálisan végbemenő szöveti átépülés folyamata, mely párhuzamba állítható a humán sebgyógyulás végső, 3. szakaszában lezajló remodelling eseményeivel. A fiziológiás sebgyógyulásban sejtek (pl. keratinocyták, fibroblasztok, inflammatorikus sejtek), és humorális elemek (pl. citokinek, kemokinek, véralvadási faktorok) játszanak fontos szerepet. A sebgyógyulás (3 fő szakasza időrendi sorrendben a gyulladás, proliferáció és az érés) végső szakaszában látható a granulációs szövet kialakulása, és a dermális regeneráció folyamata, mely háttérben apoptotikus események is lejátszódnak. A létrejövő új szövet az extracelluláris mátrix fehérjéiből és a keratinocyták, endothel sejtek, fibroblasztok által termelt mátrix metalloproteinázok (MMP) hatására átépült kollagénből áll.

A sebgyógyulás folyamatainak eredményeként létrejövő elváltozásokhoz hasonló hisztopatológiai eltérések figyelhetők meg krónikus atópiás bőrben is, mint például a fibrogenikus és a fibrózis-asszociált citokinek (transforming growth factor-beta – TGF- $\beta$ 1, továbbá IL-11, IL-17) mennyiségének emelkedése a normál, és a nem-lézionális

atópiás bőrhöz viszonyítva (81). Leírták továbbá, hogy a MMP-k és inhibitoraik is részt vehetnek a gyulladás-indukált szöveti szétesésben és átépülésben az atópiás bőrben (82), valamint összefüggést találtak a szöveti eosinophilia és a remodelling elemeinek jelenléte között is (83).

A bőr szöveti átépülése tehát igen fontos patofiziológiai folyamat krónikus AD-ben (82, 84, 85), ám a mechanizmus háttere, valamint a résztvevő sejtes és humorális elemek (pl. kemokinek) feladatai részleteiben nem ismertek.

### ***2.1.3.3. Immunológiai mechanizmusok változásai***

Az immunválasz szabályozásának zavarai, pl. a Th2 effektor sejtek irányába eltolódott folyamatok felerősödése, az allergiás szenzitizáció jelenlétének növekedése a betegekben, a károsodott immuntolerancia és természetes immunitás, mind nagyon fontos, integrált szerepet játszanak az AD patomechanizmusában, szoros kapcsolatban a korábban részletesen ismertetett megváltozott barrierfunkció elemeivel.

#### ***2.1.3.3.1. Az adaptív immunitás változásai***

Az AD immunológiájának megértéséhez elengedhetetlen a szerzett immunválaszban résztvevő elemek ismerete. A T sejtek központi szerepet játszanak a betegség lefolyásában. A bőrt infiltráló T sejtek között nagy számban találjuk a CLA<sup>+</sup> memória T sejteket, melyek mellett a betegség akut fázisában a bőrben az IL-5 és IL-13 termelő memória sejtek és a kialakult barrier defektus következtében hosszan fenntartott Th2 túlsúly (IL-4, IL-5, IL-13 effektor citokinek termelésével) látható (81, 86, 87). A fizikokémiai barrier és a Th2 túlsúly kapcsolata tehát kettős: a gyulladás fokozza a barrier károsodását, míg a sérült barrieren keresztül átjutó, kifejezett allergén expozíció a Th2 túlsúlyt fokozza. Ez utóbbi esetén csökken az antimikrobiális peptidek (AMP) mennyisége is (ennek jelentősége lentebb részletezve). A Th2 sejtek által termelt IL-4 és IL-13 felerősítik az adhéziós molekulák expresszióját az endothelsejteken, valamint a B sejtekben IgE termelést indukálnak, továbbá fokozzák a CCL18 szekrécióját (ez további CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T sejteket, valamint B sejteket vonz a gyulladásos területre), míg az IL-5 egyéb kemokinekkel együtt (pl. CCL11, CCL26) fokozza az eosinophil granulocyták gyulladásos területre toborzását. További citokinek szerepét vizsgálva, az atópiás betegekben mért, egészségesekhez és psoriasisos betegekhez viszonyított,

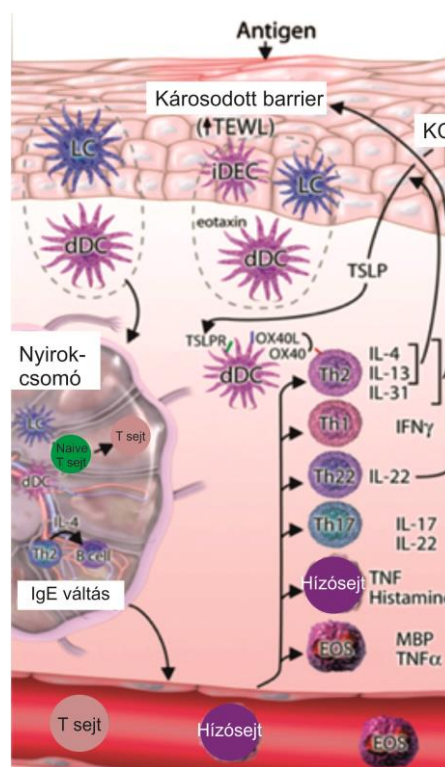
emelkedett szérumszintje jelentőségét kutatva korábbiakban leírtuk, hogy a citokin szintje korrelál a specifikus IgE jelenlétével jellemzett szenzitizáció mértékével (88). Az IL-17A AD-ben játszott pontos szerepe még vitatott, bár az eddigi eredmények szerint az akut gyulladásos folyamatok Th2 irányba történő aktiválását mozdíthatja elő. Egy friss, egér modelleken végzett kutatás eredményei szerint az IL-17A indukáló, vagy modifikáló szerepkörben a T sejteket egy külső haptén inger hatására (pl. *S. aureus* szuperantigén) Th2 irányba mozdítja el az akut bőrgyulladás kezdetén (89).

Az AD krónikus fázisa során a bőrben már nem látható Th2 dominancia, hanem mellette fontos szerepet játszanak az interferon (IFN)- $\gamma$ , IL-12, IL-5, granulocytamakrofág-CSF, illetve IL-22 termelést mutató Th1 és Th22 sejtek is. Ez a mintázat APT vizsgálat során is megfigyelhető (az allergén bevitele után 24 órával az IL-4 messenger ribonukleinsav (mRNS) expressziója fokozott, míg 48-72 órával később az IFN- $\gamma$  mRNS expressziója) (1, 87, 90). Leírták azt is, hogy az IL-22 csökkenti a terminális keratinocyták differenciálódását, és a FLG-t és profilaggrint átalakító enzimeket is (16, 32). A vérben a bifázisos Th eloszlás a bőrrel ellentétben nem látható.

Az AD patogenezisének hátterében álló immunmechanizmusokat a 3. ábra mutatja be (87). A regulatív hatású T sejteket (9, 91-93) külön fejezet részletezi.

Fontos szerepet töltenek be az immunválaszban az APC-k, melyek bemutatják az idegen antigéneket az effektor sejteknek (1). A DC-k kapocsként működve a természetes és az adaptív immunválasz között, a természetes immunválasz egyensúlyát kontrollálják és elengedhetetlenek a tolerancia és immunitás egyensúlyának fenntartásában is (8, 94). Az AD-s bőrléziók epidermisében kétféle DC mutatható ki: a myeloid DC (mDC) és a plasmacytoid DC (pDC). Az mDC-k közé tartozó LC (a normál bőrben van jelen) és az inflammatórikus dendritikus epidermális sejt (IDEC, mely a gyulladt bőrben központi szerepet játszik az antigén/allergén felvételében és bemutatásában) felszínén megjelenik a Fc $\epsilon$ RI receptor (94, 95). A receptor stimulációja az IDEC-en annak internalizációját okozza, majd az allergén a feldolgozása után a DC felszínére jutva antigéningerként szolgál a Th sejt válaszhoz, és nagy mennyiségű proinflammatorikus citokin felszabadulásához vezet (1). Az LC-k fontos szerepe a gyulladás elindításában és fenntartásában van az allergiás folyamat szenzitizációs fázisában. Az mDC-k T sejt polarizáló képességét vizsgálva AD betegekben és egészséges kontrollokban azt találtuk, hogy a betegekből izolált sejtek pluripotens T sejt polarizáló kapacitással

rendelkeztek, és a bőr mikrokörnyezete meghatározó volt a betegségre specifikus mDC aktivitás létrejöttéért (96).



**3. ábra** Immunmechanizmusok AD patogenezisében. A károsodott barrieren keresztül bejutott allergéneket a dendritikus sejtek (LC, IDEC, dermális DC - dDC) prezentálják, a környéki nyirokcsomókba érve aktiválják az effektor T sejtek termelését és az IgE izotípusváltást. A termelődött IL-4, IL-13 a keratinocytákban TSLP termelést stimulál, ami a dDC-k indukálásával további Th2 sejteket aktivál. A citokinek, és kemokinek további effektor T sejteket stimulálnak, melyek erősítik a gyulladásos folyamatokat és infiltrálják a bőrt. (Forrás: Gittler JK et al. Atopic dermatitis results in intrinsic barrier and immune abnormalities: implications for contact dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2012;131(2):300-13.) (87).

AD-ben a virális infekciók elleni védelemben szerepet játszó, I-es típusú IFN-t termelő pDC-k száma a bőrben csökken (a vérben nem), így fogékonyabbá teszi a szervezetet a bőrfertőzésekre (1, 9, 97, 98), emellett a DC felszínén megjelennek a mintázatfelismerő TLR-k is (45).

Az eddig említett citokinek mellett további fontos citokin a T sejtek által termelt IL-31, mely a pruritus kialakulásáért felelős, de proinflammatorikus hatásuk is ismert a

monocytaikon és a makrofágokon. Emellett az mDC-k által termelt IL-25 csökkenti a FLG szintézisét a keratinocytaikban, így hozzájárul a barrierfunkció romlásához (94, 99). Az IL-7-szerű TSLP citokint elsősorban epitheliális sejtek termelik. A citokin produkcióját a bőrt érő mechanikai ingerek (pl. vakarás) fokozzák, és ez Th2 választ indukál (CCL17, CCL20 termelés által) (32, 34, 94). A TSLP mellett szintén a Th2 polarizációt elősegítő citokin, illetve kemokin a hámsejtek által termelt IL-33 és CCL27, melyek működését munkacsoportunk is vizsgálta (Dajnoki és mtsai 2014. bírálat alatt). A TSLP DC-eket aktivál, melyek a Th sejteket pro-allergén citokinek (IL-4, IL-5, IL-13 és TNF $\alpha$ ) termelésére serkentik, így a citokin fontos mediátora a kontrollálatlan allergiás gyulladásnak (3. ábra) (77, 87, 94). A kemotaktikus citokinekről (kemokinek) külön fejezet szól.

#### **2.1.3.3.2. Immuntolerancia**

Alapvető fontosságú feladat, hogy a jól működő immunrendszer felismerje a saját és az idegen antigénstruktúrákat, valamint megkülönböztesse az ártalmas és az ártalmatlan behatásokat. A szervezet immunhomeosztázisának fenntartása érdekében az immunrendszernek az idegen struktúrák ellen védelmet kell nyújtania, míg a saját struktúrákat tolerálnia kell.

##### **2.1.3.3.2.1. Centrális és perifériás tolerancia**

Az immunrendszer antigénspecifikus, elsősorban a saját antigének irányában megmutatkozó válaszképtelensége az immuntolerancia, mely kialakításában pozitív és negatív szelekciós folyamatok vesznek részt. A centrális tolerancia kialakulása a csontvelőben, illetve a csecsemőmirigyben zajlik. A pozitív szelekció olyan funkcionális T sejteket eredményez, melyek mind a saját, mind az idegen antigének felismerésére képesek. A negatív szelekció során (klonális deléció, illetve klonális anergia) elpusztulnak azok a lymphocyták, amelyek nagy affinitással kötődnek „saját MHC – saját peptid” komplexekhez (100). A megfelelően működő centrális tolerancia eredményeként olyan immunsejtek kerülnek ki a perifériára, melyek a saját antigénnel szemben alacsony receptor aviditásúak. A folyamat károsodása, vagy hiánya esetén a perifériára került autoreaktív sejtek autoimmun folyamatokat indukálhatnak (101).

A perifériára kijutott T lymphocytaikat a perifériás tolerancia mechanizmusai folyamatosan kontroll alatt tartják (az idegen antigénekkal szemben kialakuló perifériás tolerancia, és a B sejt tolerancia kialakulásának folyamatait jelen tanulmányban nem tárgyaljuk).

A perifériás tolerancia folyamatának egyik fontos mechanizmusa az anergia kialakulása, mely válaszképtelenség akkor keletkezik, ha egy naív T sejt egy saját antigénnel találkozik, és nem alakulnak ki a T sejt aktivációhoz elengedhetetlen ko-stimulációs kapcsolatok. Hasonló elv szerint szintén anergiához vezet az éretlen dendritikus sejtekkel való találkozás is (101).

Fontos esemény továbbá a perifériás toleranciában az ignorancia, amikor egy lymphocytát figyelmen kívül hagy egy antigént. Ennek hátterében állhat az, ha a sejtnél kicsi a TCR aviditása a saját antigének epitópjai felé, illetve ha nem vesz tudomást a kis koncentrációban jelen lévő autoantigénekről. Ezt az immunológiai ignoranciát azonban különböző folyamatok áttörhetik. Ilyenek a gyulladásos állapotok, illetve a korábban intracellulárisan előforduló antigének megjelenése a sejteken kívül (101).

Az immunválasz folyamatának végén csak kisszámú memória sejt marad jelen, és az autoantigének TCR-hez való kapcsolódása sejthalált (apoptózis) indukálhat, mely klonális kimerüléshez, az autoreaktív sejtek pusztulásához vezethet (101).

A perifériás immuntolerancia kialakulásának fontos példája az immunprivilegizált területeken (pl. szem, here) lévő szövetek védelme (antigén szegregáció), valamint a jellegzetes tolerogén citokinek megjelenése (IL-10, TGF $\beta$ ). A reguláló T sejtek is kulcsfontosságúak a perifériás tolerancia fenntartásában (ezeket a sejteket külön fejezetben tárgyaljuk).

#### **2.1.3.3.2.2. Regulatív T sejtek**

Az immunválaszok kontrollálása, és szükség esetén „kikapcsolása” fontos feladat, hiszen ezen folyamatok nélkül patológias immunreakciók mehetnek végbe a szervezetben. A regulatív T sejtek a perifériás immuntolerancia fontos elemei, melyek funkciói közé tartozik az autoreaktív sejtek működésének szuppresszálása, immunológiai tolerancia kialakítása szervtranszplantáltakban, allergiás betegekben (102).

A regulatív T sejteknek 3 fő alcsoportja ismert: a TGF $\beta$ <sup>+</sup>FOXP3<sup>-</sup> Th3 sejtek, az 1. típusú IL-10<sup>+</sup>FOXP3<sup>-</sup> reguláló T (Tr1) sejtek, valamint a CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>FOXP3<sup>+</sup>

természetes regulatív T (nTreg) sejtek (101, 103). Ez utóbbi sejtek részt vesznek az allergénspecifikus immunválasz, így az immunhomeosztázis szabályozásában és az APC-k, effektor T sejtek és hízósejtek gátlásában is (91, 104, 105). A FOXP3 a szignál transzducer és transzkripcióaktivátor-6 – függő Th2 polarizációt is kontrollálja (106), valamint *in vitro* gátolja az effektor T sejt proliferációt, és *in vivo* megakadályozza a szisztémás, T sejt által mediált autoimmun betegségek kialakulását és progressióját (102). A Treg sejtek egészséges felnőttekben a CD4<sup>+</sup> sejtek 5-10%-t teszik ki. Jellemző sejtfelszíni markerei többek közt a CD28, TNF receptorok, kemokin receptorok (CCR2, CCR4-8, CXCR3-4), TLR-k (TLR1-2, TLR4-8), emellett a sejtek IL-10-t, TGFβ-t termelnek (102, 107).

A perifériás immuntolerancia kialakításában fontos reguláló sejtek még a természetes ölő T sejtek és a CD8<sup>+</sup> szuppresszor T sejtek, melyekkel a dolgozat nem foglalkozik részletesen.

#### **2.1.3.3.2.3. Az nTreg sejtek**

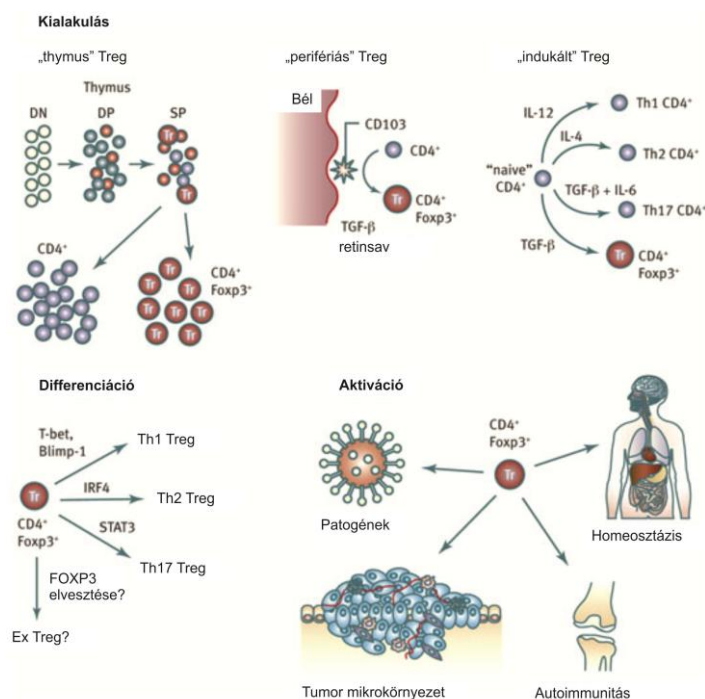
Az nTreg sejtek fontos szerepet játszanak az allergénekre adott T sejtés válaszok kontrollálásában/szuppresszáálásában (108, 109). A regulatív tulajdonsággal rendelkező CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> sejtek FOXP3-t is expresszálnak. Általánosságban elmondható, hogy a CD25<sup>bright</sup> sejtek magasabb szinten expresszálják a FOXP3-t, mint a CD25<sup>low</sup> sejtek, valamint, hogy csak a CD25<sup>bright</sup> sejtek rendelkeznek szuppresszív tulajdonságokkal, de a CD25<sup>+</sup> sejtek között lehetnek effektor funkciókkal bíró sejtek is. A regulatív funkció kimutatása igen nagy technikai kihívás, mely során fontos metodikai lépés volt a FOXP3 locus demetiláltság detektálásának bevezetése, mely nem egyszerűen a FOXP3 jelenlétét mutatja, hanem identifikálja a szuppresszor funkcióval rendelkező sejteket (110). Amíg egérben a FOXP3 egyik kulcsregulátora a nTreg sejtek polarizációjának, létrejöttének és funkciójának, addig emberben a FOXP3 önmagában kevésbé meghatározó a regulatív tulajdonsággal bíró sejtek kimutatásában (102). Egyéb fontos markerek a regulatív sejtek kimutatására a CD127, mely alacsonyan expresszáldódik a reguláló sejteken, továbbá a lymphocita aktivációs gén-3 és a citotoxikus T lymphocita asszociált antigén-4, ám egyik sem kizárólagos és nem specifikus nTreg sejtekre. Nemrégiben írták le az nTreg sejteken expresszáldó glikoprotein A repetíciós predománns sejtfelszíni molekulát, mely szelektíven identifikálja az aktivált humán

FOXP3<sup>+</sup> nTreg sejteket, valamint regulálja a *FOXP3* génexpressziót is (110). Az nTreg sejtek létrejötte a thymusban kétlépcsős folyamat eredménye. Először a T sejt receptor szignál (együtt a ko-stimulációs molekulák aktiválódásával) CD25 upregulációt okoz létrehozva az nTreg prekursorokat, majd az IL-2 szignál a FOXP3 expressziójához vezet (102).

Ismert még a T sejtek plaszticitása a megváltozott gyulladási milieu-ben, azaz a mikrokozonyozattól függően az nTreg sejtek képesek akár Th2 sejté konvertálódni a FOXP3 expresszió csökkenése által (111), sőt a folyamat fordítva is végbemehet, valamint egyéb effektor T sejtek irányába is lejátszódhat. A folyamatban központi szerepet játszik a TGFβ. Egyrészt részt vesz az nTregok homeosztázisának fenntartásában, másrészt felelős a konvencionális CD4<sup>+</sup> sejtek szuppressziós aktivitásának indukálásáért (102). Az így létrejött Treg fenotípus azonban igen instabil, és a citokin hiányában a sejtek elveszítik FOXP3 expressziójukat, és szuppresszor funkciójukat. Az nTreg sejtek kialakulását és biológiáját az 4. ábra mutatja be (a tanulmányok többségét transzgen egereken végezték) (108). Az nTreg sejtek nagyrészt a thymusban kialakult „thymus” Treg-ek adják (4. ábra *felső panel bal oldal*). Ugyanez az átalakulás a periférián is végbemehet, pl. a bélben a mikrobiális/étel allergéneket bemutató CD103<sup>+</sup> DC hatására (TGFβ és retinsav-függő folyamat során) létrejönnek a „perifériás” Treg-ek (4. ábra *felső panel közepén*). A CD4<sup>+</sup> T sejtek TGFβ jelenlétében a TCR stimuláció hatására „indukált” Treg-eket hozhatnak létre *in vitro* (4. ábra *felső panel jobb oldal*), mely folyamat az effektor T sejtek citokin indukált differenciációjához analóg módon történik (az indukált Treg létrejötte egérben már bizonyított, emberben még nem). A Treg differenciációban ugyanazokat a transzkripciósi faktorokat írták le, mint az effektor T sejtek létrejötténél. Az így létrejött differenciált Treg-ek a fenotípusban hasonló T effektor sejtet regulálják. Az nTreg-ek a FOXP3<sup>+</sup> elvesztésével ún. exTreg-ek lesznek, mely sejtek autoaggresszív tulajdonságokkal rendelkeznek (4. ábra *alsó panel bal oldal*) (112).

Az nTreg sejtek gátolják a T sejtek differenciációját, aktivációját, proliferációját, citokin szekrécióját, migrációját. Az nTreg sejtek általi reguláló mechanizmusokban a T sejtek direkt, illetve APC-n keresztüli szuppressziója játszik döntő szerepet, mely folyamatokban fontos, többek között, az IL-10 és a TGFβ is (102, 104, 110, 113). Az aktív nTreg-ek feladata az autoaggresszív lymphoproliferatív betegségek kialakulásának

megelőzése, a normál immunhomeosztázis fenntartása, az immunválaszok modulálása infékción, autoimmun folyamatok, malignus betegségek kialakulása során (4. ábra *alsó panel jobb oldal*) (112).



**4. ábra** A regulatív T sejtek kialakulásának útvonalai (magyarázat a szövegben). (Forrás: Caton AJ, Weissler KA. Regulatory cells in health and disease. Immunol Rev 2014;259:5-10.) (112).

#### 2.1.3.3.2.4. Az nTreg-ek AD-ben

A Treg-ek emberben fízológias körülmények között nemcsak a perifériás vérben és a nyirokszervekben fordulnak elő, hanem számos olyan struktúrát hordoznak (CCR4, CCR6, CLA), melyek a bőrbe való vándorlásukat (homing) segítik elő, ezáltal mintegy sugallva szerepüket az immunszabályozásban atópiás bőrgyulladás során. Ugyanakkor mégis kevés ismerettel rendelkezünk az nTreg sejtek szerepéről és funkciójáról atópiás bőrben. Érdekes megfigyelés, hogy a *FOXP3* gén mutációja esetén, az nTreg-ek hiányában immundiszreguláció, polyendokrinopathia, enteropathia, X-kötött szindróma alakul ki, ahol AD-szerű tünetek (súlyos eczema, eosinophilia, emelkedett IgE szint, allergiás légúti betegségek, ételallergia) is megjelennek (114). A betegség megfigyelése vezetett ahhoz a kérdéshez, hogy vajon az nTreg-ek számának csökkenése, illetve

esetleges funkcióbeli változásai szerepet játszanak-e az AD patomechanizmusában (7, 102, 103)?

Egyes vizsgálatok az emelkedett nTreg sejtek protektív hatását írták le fiatal életkorban, ahol atópiás gyermekekben allergén-specifikus tolerancia alakult ki a magas nTreg sejtszám hatására (115). A „párhuzamos erősítés” teóriája is feltételezi, hogy a gyulladásoz folyamatokban megjelenő fokozott effektor T sejt szám regulálása érdekében emelkedik az nTreg sejtszám is. A felnőtt AD populációban számos vizsgálat a keringő CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>FOXP3<sup>+</sup> nTreg sejtek magasabb számát írta le és feltételezik, hogy ezek a sejtek nem működnek megfelelően (92, 93). Korábbi vizsgálataink során mi is leírtuk a CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>FOXP3<sup>+</sup> nTreg sejtek szignifikánsan emelkedett számát AD bőrben, és emelkedett tendenciáját az AD betegek vérében (116). Azonban funkcionális karakterizálást, illetve AD betegek perifériás vérében az nTreg-ek számbeli és funkcionális változásainak egyidejűleg történő vizsgálatát csak néhány kutatócsoport végezte eddig, és azok eredményeiben is felfedezhetők ellentmondások (117-119).

#### **2.1.3.3.3. A természetes immunitás változásai AD-ben**

Az adaptív immunválasz fokozott és károsodott működése mellett AD-re jellemző a természetes immunválasz diszregulatív működése. A természetes immunitás egyik fő feladata a jellegzetes mikrobiális struktúrák felismerése. Ezen struktúrák a patogén-asszociált molekuláris mintázatok (pathogen-associated molecular pattern), és az ezeket felismerő molekulák a mintázatfelismerő receptorok (pattern recognition receptors – PRR). A PRR kötődések kialakulása után megindul a mikrobiális eredetű molekulák eliminációja. Ebben a folyamatban vesznek részt az AMP-k is. Az AMP-k aktivitása baktériumok, vírusok, gombák ellen kifejezett és a mikroorganizmusok behatolása után az epidermisben (és a nyálkahártyában is) képződhetnek (pl. human- $\beta$ -defensin-2 (HBD-2), HBD-3, cathelicidin). A közvetlen mikrobiális ölü mechanizmusok, a kemotaxis, és a gyulladásoz válasz módosítása révén megakadályozzák a patogén kolonizációt. A HBD-2 a Gram negatív baktériumok és gombák ellen hatásos, míg a HBD-3 és a cathelicidin széles spektrumú antibiotikus hatásúak, ezért hatékonyak a Gram negatív és pozitív kórokozókkal szemben is (kulcsszereplők a *S. aureus* elleni védelemben) (1, 34, 39).

AD-ben a TLR2, CD14, NOD1 polimorfizmusok létrejötte miatt (1. táblázat) a mikroorganizmusok felismerése zavart szenved, melynek következménye a sérült természetes immunitás. A kifejezett Th2 túlsúly eredményeként is jelentősen csökken az AMP-k termelése AD-ben (76). Ezen változások, együtt az AMP deficienciájával és a barrier funkciók elégtelenségével, a bőr bakteriális kolonizációjához, a védekezési mechanizmusok zavarához és következményes infekcióhoz vezethetnek (1, 16, 26, 76, 120). Korábbi megfigyeléseink szerint az ismétlődő bakteriális infekciók a természetes immunválasz megváltozásához, a monocyták felszínén létrejövő szignifikáns TLR2, TLR4 és a granulocytákon megjelenő TLR2, CD14 túlprodukcióhoz vezethetnek (121). Emellett bizonyos TLR2 polimorfizmus (TLR2 R753Q allélt érintve) esetén a betegek magasabb szérum teljes IgE és szuperantigén-specifikus IgE szintet mutatnak, melyhez súlyosabb klinikai tünetek és allergén szenzitizáció is társulnak (122), illetve akut és krónikus atópiás bőrléziókban az LL-37 (a cathelicidin katabolizmusával keletkezik) és a HBD-2 szintek alacsonyabbak, mint normál bőrben és ez emelkedett Th2–mediált gyulladáshoz vezethet (123).

#### ***2.1.3.3.4. Kemokinek és szerepük AD-ben***

A kemokinek kicsiny, citokin-szerű, kemoattraktáns fehérjék, amik a leukocyták mozgását szabályozzák homeosztatis és gyulladáshoz vezető körülmények között (124, 125). A kemokinek szerkezeti hasonlóságot mutatnak egymással, és az általuk indított jelátviteli folyamatok a 7 transzmembrán régiót tartalmazó G fehérje-kötött receptorokon keresztül valósulnak meg. A kemokinek (46 ligand) 4 csoportba oszthatók az N-terminális végen lévő ciszteinek egymáshoz való viszonya alapján, és ezen alcsaládok 4 receptor-család tagjaihoz (19 receptor) kötődhetnek. Ha a két cisztein egymás mellett van, akkor a CC alcsaládról beszélünk, melynek 28 tagja (ligand) (CCL1-28) van, és ezek a CCR receptorokhoz (CCR1-10) kötődnek. Ha a 2 ciszteint valamilyen másik aminosav választja el, akkor CXC alcsaládról beszélünk, amelybe 17 ligand tartozik (CXCL1-17). Ezek hatásukat a CXCR receptorokon keresztül (CXCR1-7) fejtik ki. A maradék 2 alcsalád 1-1 ligandot tartalmaz, ezek esetében a 2 cisztein között 3 aminosav lehet (CX3CL1), vagy 1 cisztein mellett egy másik aminosav állhat (XCL1). Ezek receptorai a CX3CR1, illetve az XCR1 (125).

A kemokinek feladata a különböző fehérvérsejt alcsoportok szervspecifikus gyulladós területre vezérlése. A kemokinek fő forrásai a gyulladós sejtek mellett a bőr strukturális rezidens sejtei (keratinocyták, fibroblasztok) is. Nemcsak élettani körülmények között, de proinflammatorikus citokinek hatására is nagymértékben termelődnek, és az endothélen keresztül transzportálódva megjelennek azok felszínén is, így fontos szerepet játszanak a leukocyták gyulladós területre hívásában (6). A Th1 sejtek CCR5 és CXCR3 receptor expressziót mutatnak, míg a Th2 sejtek a CCR3, CCR4, és CCR8 receptorokat expresszálják a sejt felszínükön. A bőr dendritikus sejtjei és a macrophagok mint az immunrendszer őrszemei vesznek részt a folyamatokban és a prekursoraik a postkapilláris venulákon keresztül a bőrben megjelenve a CCR1, CCR2, CCR5, CCR6, CXCR4, és CX<sub>3</sub>CR1 receptorokat expresszálják felszínükön.

A citokinek mellett a kemokin szupercsalád egyes tagjairól is leírták, hogy aktív szerepet játszanak az atópiás bőrgyulladásban (126-128). Nemrégiben számos kemokinről bizonyították (CCL1-5, CCL11, CCL13, CCL17, CCL18, CCL20, CCL22, CCL26, CCL27, CX<sub>3</sub>CL1), hogy részt vesznek az atópiás bőrgyulladás elindításában és fenntartásában (6, 26, 129). Ezen kemokin ligandok elsődleges celluláris forrásai a keratinocyták, az endothél sejtek, és esetlegesen a bőr rezidens T sejtek, DC-k, macrofágok. Az AD-ben szerepet játszó, thymusban termelt CCL17-t és a DC és macrofágok által termelt CCL22-t például Th2 kemokineknek is hívják, mert a CCR4-t (közös receptora az említett két kemokinnek) expresszáló Th2 sejteket vonzák a bőrből a gyulladás helyére (130). Ehhez hasonlóan ismert Th1 kemokin is, a CCL20, ami az atópiás bőr basalis hámsejtjeiben IL-1 és TNF $\alpha$  hatására, a normál bőrhöz képest kifejezettebb mértékben termelődik. Ez a kemokin a CCR6 receptort expresszáló Th1 sejtek mellett a DC-ket vonzza a gyulladás helyére a dermisbe (130). Továbbá leírták, hogy az előbbi kemokinek mellett a CCL11, CCL26, CCL27, CX<sub>3</sub>CL1 szérumszintjei is emelkedtek AD-ben egészséges kontrollokhoz viszonyítva, és a kemokinek szintjének emelkedése direkt korrelációt mutat a betegség aktivitásával és súlyosságával, ami a kemokinek fontos szerepére utal az AD patogenezisében (126, 129, 131).

A kemokinek itt felsorolt sokrétű funkcióján túlmenően feltételezhető az is, hogy a korábban leírt szöveti átépülés atópiás bőrben végbemenő folyamatainak egyes

részleteiben is szerepet játszhatnak, de ennek megerősítésére vonatkozóan semmilyen irodalmi eredmény nem áll rendelkezésünkre.

#### **2.1.4. Az AD klinikai tünetei és diagnosztikája**

A betegség klinikai lefolyásában megkülönböztetünk akut, szubakut és krónikus stádiumokat, melyeket jellegzetes klinikai tünetek karakterizálnak. Akut folyamatban váladékozó, erodált, excoriált, esetleg oedemás, erythemás papulák és plakkok láthatók, míg szubakut, krónikus stádiumban inkább száraz, lichenifikált, hámló plakkok jelennek meg. A vezető panaszok a bőr szárazsága (xerosis cutis), és a viszketés (1, 132).

Csecsemőkorban a betegség első jelei 2 hónapos kor körül jelentkeznek, leggyakrabban a fejtetőn és orcákon, excoriációk, nedvező erosiók formájában. A folyamatos viszketés miatt a csecsemő nyugtalan, nehezen táplálható, alvása felületes, rövid. Később a végtagok feszítő felszíne és a törzs is érintettek lehetnek. Az esetek 20-30%-ában a tünetek a második életév végére elmúlhatnak, de a beteg atópiás társbetegségek kialakulására való hajlama megmaradhat. Az esetek kb. felében ebben az életkorban még nincs jelen az IgE mediált szenzitizáció (1). Később, gyermekkorban a tünetek elsősorban a tipikus predilekciós helyeken, a hajlító felszíneken jelennek meg (könyökhajlat, kéztő, térdhajlat, boka), valamint a tarkó, a talp, a kezek területén. Ezek a léziók *de novo* is létrejöhetnek, vagy egy korábbi fázisból fejlődhetnek tovább. Az elsődleges elemi jelenségeken túl (papula, plakk), számos másodlagos elemi jelenség látható, erosio, excoriáció, lichenifikáció, illetve prurigos göbcsék formájában. 16-20 éves korra az esetek 60-70 %-ában regrediálhatnak a tünetek. Felnőttként az AD létrejöhet a gyerekkori tünetek perzisztálásának eredményeként, vagy *de novo*.

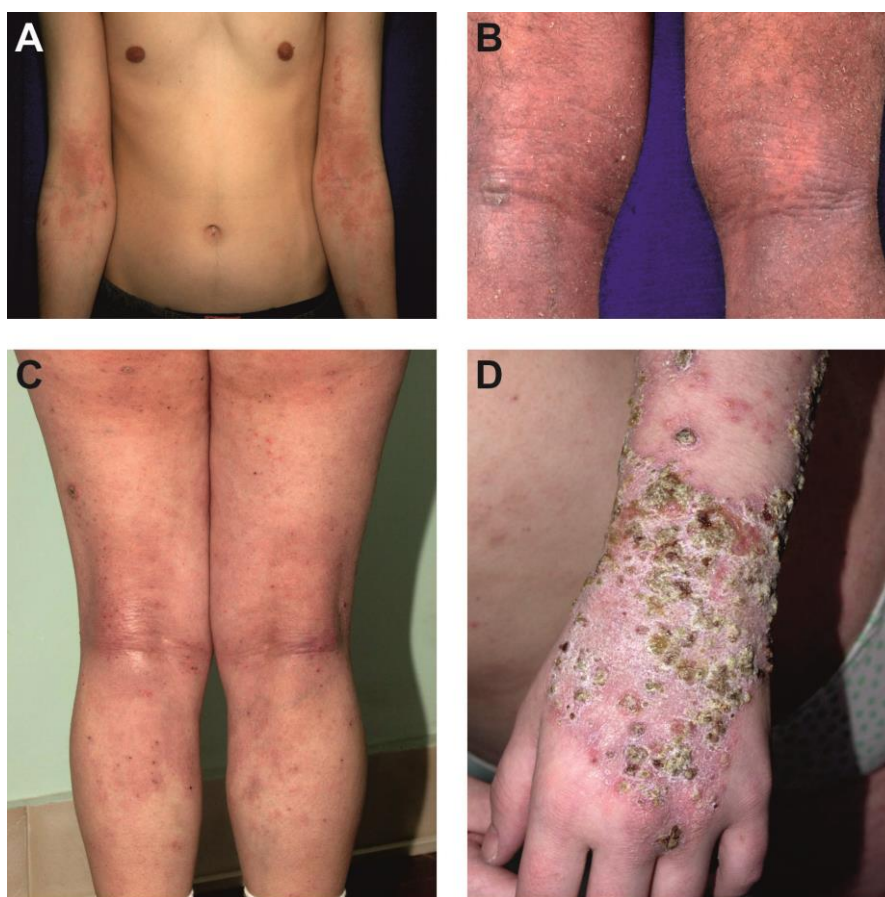
A léziók fő lokalizációja a fej (homlok, periorbitális és periorális régiók) és a nyak, valamint a végtagok hajlító felszínei (5A-C. ábra) (133).

Az AD legsúlyosabb komplikációi a bőr másodlagos bakteriális (pl. impetigo, 5D. ábra) és virális (pl. herpes simplex okozta ekcéma herpeticum) felülfertőződései, melyek hátterében a korábban említett csökkent veleszületett immunitás és az AMP-k deficienciája áll (1).

A betegség diagnózisa a beteg saját és családi anamnézisének, valamint a klinikai tüneteken nyugszik. Hanifin és Rajka évtizedekkel ezelőtt alkotta meg a 4 major (pruritus; tipikus klinikai morfológia és eloszlás; krónikus relapszusokat mutató

dermatitis; pozitív atópiás egyéni, vagy családi kórelőzmény) és 23 minor (többek között a leggyakoribbak a fehér dermatographismus, mamilla- vagy szemhéjeczema, cheilitis, emelkedett szérum IgE, korai betegségkezdés, pityriasis alba, recidiváló conjunctivitis, Dennie-Morgan jel, stb.) klinikai tünet alapján a betegség diagnosztikus kritériumait (1, 134, 135), melyben legalább 3 major és 3 minor kritériumnak kell egyidejűleg jelen lennie a betegség diagnosztizálásához.

Az első meghatározás óta számos, nemzetközi, vagy nemzeti társaságok által kimunkált finomításon és validált módosításon ment át a kritériumrendszer, mely által még pontosabbá vált a betegség klinikai diagnózisa (136, 137).



**5. ábra** Az AD klinikai tünetei. Hámló, excoriált, erythemás, közepesen infiltrált plakkok a hajlító felszíneken (A-C). Impetiginizált klinikai tünetek (D). (Forrás: Debreceni Egyetem Klinikai Központ Bőrgyógyászati Klinika fotógyűjteménye).

Emellett a szenitizáció jelenléte szerint korábban elkülönítettek extrinsic (szenzibilizált betegek, akiknél specifikus IgE jelenléte kimutatható) és intrinsic (szenitizáció

jelenléte nem bizonyítható. A definíció az irodalomban ellentmondásos, egyesek nem-atópiás dermatitisnek hívják) AD formákat (134).

A betegség súlyossága különböző pontrendszerekkel értékelhető. A leggyakrabban alkalmazott a Scoring Atopic Dermatitis (SCORAD) index, amely a betegség kiterjedése (A) mellett figyelembe veszi az erythema, infiltráció, oedema, excoriáció, lichenifikáció, és nedvezés mértékét (együtt B), valamint a beteg által jelzett szubjektív tüneteket (pruritus, insomnia) (C) is, és a következő képletet alkalmazza:  $A/5 + 7 \times B/2 + C$ . (1, 132). Az értékelés során 18 pont alatt az AD enyhe, 18-35 pont között mérsékelt, 35-60 pont között súlyos, és 60 pont felett nagyon súlyos formájáról beszélünk.

A bőrtesztek (Prick teszt, APT) és a laboratóriumi vizsgálatok (szérum specifikus IgE, eosinophilia, anti-streptolysin O, laktát dehidrogenáz meghatározása), a beteg anamnézisével összhangban, segítséget nyújthatnak a specifikus provokáló faktorok felderítésében (138).

### ***2.1.5. Az AD terápiaja***

Az epidermális és immunológiai folyamatok jobb megismerése, a betegség hátterének pontosabb feltárása segíti a megfelelő terápiák kifejlesztését és alkalmazását.

A betegség kezelése igen összetett, és akár élethosszig tartó, komplex terápiát is igényelhet (139). Ebben elsődleges cél a bőr barrierfunkciójának javítása, továbbá a gyulladás csökkentése/megszüntetése és a különböző provokáló/súlyosbító faktorok (pl. mikrobiális kolonizáció, kifejezett allergén expozíció) eliminálása, vagy kontrollálása. Elengedhetetlen továbbá a beteg pszichoszociális vezetése is. A gyógyszeres terápia mellett igen fontos a betegoktatás, illetve gyerekek esetén a szülők felvilágosítása a betegségről, mely által a beteg compliance, illetve adherencia is növelhető (1, 140).

Az AD hazai terápiajában a tünetek kiterjedésétől és súlyosságától függően lokális kezelések, fényterápia, és szisztémás terápia, valamint ezek kombinációja alkalmazhatók (4. táblázat). A megfelelően, egyénre szabottan kiválasztott, biztonságos és kevés mellékhatással járó terápia végső célja a tünetmentesség elérése és az életminőség javítása.

A helyi kezelésben alapvető a bázisterápia, a rendszeres hidratálás alkalmazása, mely pótolja a hiányzó esszenciális zsírsavakat, valamint növeli a bőr rugalmasságát, csökkenti a feszülő, viszkető érzést. Az előírászerűen (napi 2-4 alkalommal) használt

bázisterápiával csökkenthető a lokális kortikoszteroid igény, és növelhető annak hatékonysága is (141-143). Igen fontos a bakteriális kolonizáció kontrollja, mely helyi antiszeptikumokkal (pl. fuzidinsav) érhető el. Kiterjedt bakteriális felülfertőződés, impetigo, pyoderma esetén szisztémás antibiotikus kezelés kezdhető (1), de hosszútávú alkalmazása kontraindikált a rezisztencia kifejlődése miatt (141, 142, 144).

Kezelés formája	Név	Hatás	Adagolás útja	Adag	Egyéb megjegyzés
Helyi kezelés	Kortikoszteroid	Immunszuppresszív Gyulladáscsökkentő Antiproliferatív	Lokális	Napi 1 x	Proaktív kezelés során heti 2x alkalmazható
	Calcineurin inhibitor	Immun-moduláló	Lokális	Napi 2 x	Proaktív kezelés során heti 2x alkalmazható
	Helyi antibiotikum, antiszeptikus szer	Antibakteriális	Lokális	Napi 1x	Impetigo esetén kötésben
Fénykezelés	311 nm UVB	Immunszuppresszív Gyulladáscsökkentő Bakteriális kolonizációt csökkenti	Fényforrás	Heti 3-5x	
	UVA1		Fényforrás	Heti 3-5x	Akut fellángolás esetén is alkalmazható
	PUVA (psoralen + UVA)		Fényforrás (psoralen per os, vagy lokálisan)	Heti 2-3x	Gyermekkorban nem alkalmazandó
Szisztémás kezelés	Kortikoszteroid	Immunszuppresszív Gyulladáscsökkentő Antiproliferatív	Per os	Napi 0.5 mg/tskg	
	Cyclosporin A	Immunszuppresszív	Per os	Napi 3-5 mg/tskg (2 részletben)	
	Azathioprin, methotrexát	Immunszuppresszív	Per os	Változó	Off-label alkalmazás Terápia-refrakter esetekben

#### 4. táblázat Az AD kezelésének összefoglalója (bázisterápia nélkül) (UV: ultraibolya).

A folyamatos hidratálás mellett elengedhetetlen a gyulladáscsökkentő kezelés (145). Alkalmazhatók helyi calcineurin inhibitorok (TCI) és helyi glükokortikoszteroidok (TCS) (42, 132, 146, 147). A TCI tartalmú kezelést napi 2x, a TCS tartalmú externákat naponta egyszer javasoljuk. A TCI, illetve a TCS kezelést azonban annak ellenére is folytatni érdemes (heti 2 alkalommal), ha az érintett területeken éppen nincs gyulladás (proaktív kezelés), ugyanis a klinikailag „normális” bőrön a sub-klinikus gyulladás ilyenkor is megfigyelhető (148-151). Kiterjedt, súlyos AD esetén fototerápia, illetve szisztémás kezelés indítható (151, 152). Ezek lehetőségeit az 4. táblázat foglalja össze (132, 141, 142, 147, 153). A súlyos, terápia-refrakter AD kezelésében off-label indikációk (azathioprine, methotrexate, biológiai terápia) is megpróbálhatók (146, 154).

## 2.2. CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során az AD patogenezisében lejátszódó két fontos mechanizmus háttérének részletesebb megismerése volt a célunk. A vizsgálat egyik részében a regulatív T sejteket és az immuntolerancia folyamatát kutattuk, a másik részben az atópiás bőrgyulladásokban szerepet játszó szöveti átépülés háttérének pontosabb feltárására törekedtünk.

### 2.2.1. Az *nTreg* sejtek szerepének vizsgálata AD-ben

Az irodalomban egymásnak ellentmondó eredmények miatt tanulmányoztuk a perifériás *nTreg* sejtek AD-ben betöltött szerepét. Céljainkat az alábbiak szerint határoztuk meg:

1. milyen változást mutatnak az AD betegek perifériás vérében keringő  $CD4^+CD25^{\text{bright}}FOXP3^+CD127^-$  *nTreg* sejtek és azon belül a bőrbe visszatérő sejtek funkcionális és mennyiségi tulajdonságai az egészséges kontrollokhoz képest,
2. milyen funkcionális változásokat tapasztalhatunk az *nTreg* sejtek szuppresszor képességében *in vitro* funkcionális teszttel; a kapott eredmények összehasonlítása a betegek és az egészséges kontrollok között; milyen hatással van a sejtekre a SEB,
3. milyen összefüggés van az *nTreg* szám és a klinikai adatok közt.

### 2.2.2. Szöveti átépülés vizsgálata AD-ben

A kemokinek kulcsszerepet játszanak az atópiás bőrgyulladásban, ezért arra voltunk kíváncsiak, vajon közvetlenül hatnak-e a normál humán dermális fibroblasztokra (NHDF) és részt vesznek-e a szöveti átépülésben. Célunk volt meghatározni a kemokin-mediált kommunikációs útvonalakat atópiás bőrgyulladás szöveti átépülése során:

1. milyen kemokin receptor repertoárt mutatnak a humán dermális fibroblasztok, és mi jellemzi a legerősebben expresszált sejtfelszíni CCR3 kemokin receptort,
2. milyen eloszlást mutat a CCR3 ligandok (CCL5, CCL8, CCL11, CCL24 és CCL26) mRNS expressziója krónikus bőrgyulladásokban és *in vivo* atópiás bőrben,
3. milyen a CCL26 kemokin expressziós mintázat, és annak regulációja,
4. hogyan hat a CCL26 a sejtek migrációjára, reparációs aktivitására fibroblasztokon végzett funkcionális vizsgálatok során.

### **3. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK**

#### **3.1. Betegek**

A nTreg sejtek vizsgálatához 27, magas IgE szinttel (>1000 U/ml) rendelkező, középsúlyos-súlyos AD-ben szenvedő, tünetes beteg és 11 egészséges, azonos korú és nemű önkéntes perifériás vérért használtuk.

A szöveti átépülés vizsgálatában 6 milliméter átmérőjű bőrbioopsziákat nyertünk AD-s betegektől (29 tünetmentes területről nyert és 65 lézionális területről származó biopszia), psoriasisos betegektől (9 biopszia tünetmentes területről, 37 tünetes területről), és prurigo nodularisban szenvedőktől (46 beteg), továbbá 29 egészséges önkéntestől.

Az APT-t házipor atka keverékkel (Stallergen SA, Antony, Franciaország) 17, Prick teszttel bizonyítottan házipor atkákra érzékeny AD-s betegen végeztük el. Az APT 7 betegnél volt pozitív (2, 6, és 48 órás értékelés során), akiknél a teszttel fedett bőrterületből nyertünk biopsziát.

Az atópiás betegek diagnózisának felállításában a Hanifin és Rajka által létrehozott kritériumrendszert követtük, míg a betegség súlyosságának meghatározásában a SCORAD indexet használtuk (134). A magas szérumszinttel rendelkező betegek esetében kizártuk a Hyper IgE szindróma (HIES) lehetőségét a HIES klinikai pontrendszer alkalmazásával (155).

A vizsgálatokba választott betegek nem részesültek szisztémás glükokortikoid vagy egyéb immunmoduláns kezelésben 4 héttel, míg TCS kezelésben 4 nappal a mintavételek előtt.

A helyi etikai bizottság által engedélyezett vizsgálatokba bevont személyek részletes tájékoztatás után írásban egyeztek bele. A kísérletek a Helsinkai Nyilatkozat előírásainak megfelelően történtek.

#### **3.2. Sejtkultúrák**

A vizsgálatainkban alkalmazott humán primer epidermalis keratinocytákat és az NHDF sejteket a forgalmazó által előírt médiumokban tenyésztettük (mind a sejtek, mind a tápfolyadékok Clonetics, San Diego, CA, USA).

### **3.3. Szérum IgE szint mérése**

A szérum teljes IgE szinteket a gyártó által (Radim SpA, Pomezia-Róma, Olaszország) előírt formában enzim-kötött immunszorbens teszttel (ELISA) határoztuk meg.

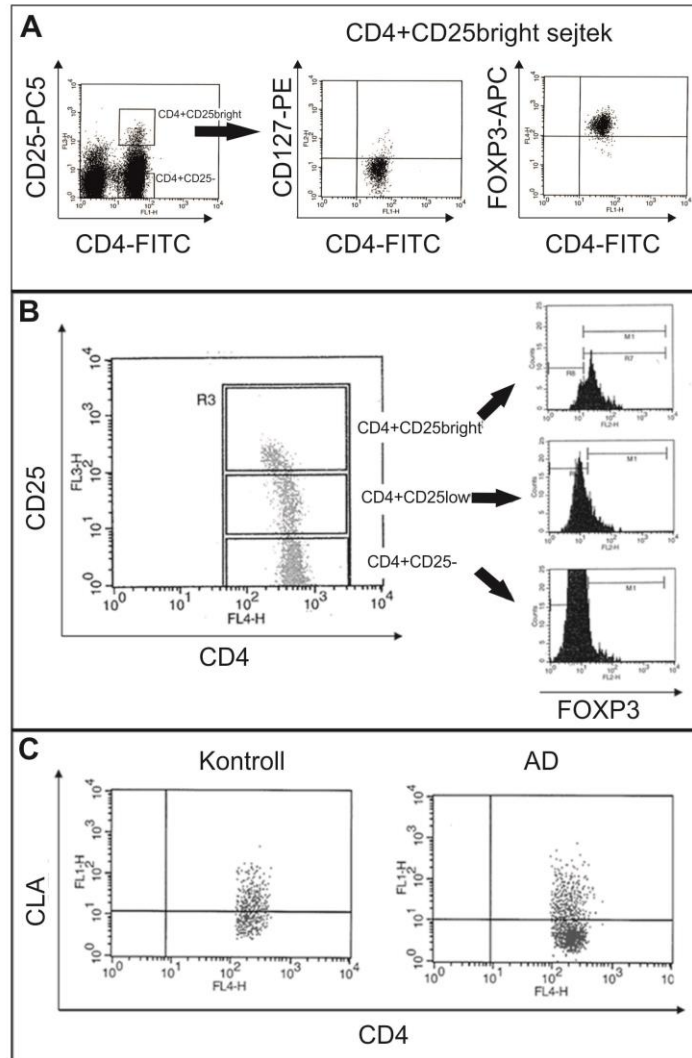
### **3.4. Áramlási citometriás vizsgálatok**

#### **3.4.1. Az nTreg-ek tanulmányozása áramlási citométerrel**

A perifériás vér mononukleáris sejteket (PBMC) Ficoll (Sigma-Aldrich, München, Németország) gradiens centrifugálással izoláltuk heparinizált vérből, majd a CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T sejteket PBMC-ből különítettük el Miltenyi Regulatory T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Németország) felhasználásával, a gyártó által leírt protokollt követve. Ezután áramlási citometriával határoztuk meg a CLA<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>FOXP3<sup>+</sup> nTreg sejteket az AD betegek és az egészségesek vérében. A felhasználható antigének számának korlátai (4-színű áramlási citométer) miatt először a CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup> sejtek vizsgálata során bebizonyítottuk, hogy csaknem kizárólagosan FOXP3 pozitívak és CD127 negatívak (97.3% ± 2.0%) (6A. ábra). A további vizsgálatok kivitelezése során a CD127 antitestet elhagyhattuk, és negyedik jelölésként anti-CLA antitestet alkalmazhattunk. A CLA pozitivitást a kapuzott CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>FOXP3<sup>+</sup> T sejteken vizsgáltuk (6B-C. ábra).

A sejt felszíni és intracelluláris festések során a gyártók útmutatásait követtük. A PBMC előkészítése során nyert T sejteket foszfát puffer oldatban (PBS) mostuk 3 alkalommal, majd sejt felszíni festéseket végeztünk CD4-allophycocyanin, vagy CD4-fluoreszcein izotiocianát (FITC), CD127-allophycocyanin, CLA-FITC (mind BD Pharmingen, Heidelberg, Németország), és CD25-fikoeritrin (PE)-Cy5 (Immunotech, Marseille, Franciaország) antitestekkel (30 perc, 4°C). Ezután a sejteket hideg Flow Cytometry Staining Buffer oldatban mostuk, majd reszuszpendáltuk azokat Fixation/Permeabilisation munkaoldatban (eBioscience, San Diego, CA, USA). Ezt követően a mintákat 30 perig 4°C-on inkubáltuk és 1X Permeabilizációs Puffer oldattal mostuk (eBioscience, San Diego, CA, USA), majd anti-human FOXP3-PE (clone PCH101; eBioscience, San Diego, CA, USA) antitestet adtunk a szuszpenzióhoz. Újabb, sötétben történt 4°C-os 30 perces inkubációt követően mosási és reszuszpenziós lépések következtek. A mintákat BD FACSCalibur flow cytometerrel analizáltuk, és az

adatokat CellsQuest software-rel (BD Pharmingen, Heidelberg, Németország) dolgoztuk fel.



**6. ábra** Az nTreg sejtek meghatározása áramlási citométerrel. A CD4 és CD25 sejtfelszíni molekulákat monoclonális antitestekkel festettük. A FOXP3 meghatározása a CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup> és CD127<sup>-/low</sup>- populációban (A) és a CD25<sup>bright</sup>, CD25<sup>low</sup>- és CD25<sup>-</sup> populációban (B) történt. Egy reprezentatív “dot-plot” mérés egy AD beteg és egy egészséges kontroll CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>FOXP3<sup>+</sup> nTreg sejtek CLA expressziójáról (C).

### 3.4.2. Kemokin receptorok kimutatása fibroblasztokon áramlási citométerrel

A NHDF-kat a tenyésztő edényből a 80-90%-os konfluencia elérése után StemPro Accutase (Invitrogen, Karlsruhe, Németország) sejt leválasztó oldattal távolítottuk el,

majd többszöri mosási lépést követően PBS-ben reszuszpendáltuk és FACS csövekbe helyeztük a további festési lépések előtt. A sejtek felszínén expresszált kemokin receptorokat áramlási citometriával PE-konjugált antitestekkel mutattuk ki [CCR1-10, CXCR1-6 és izotípus kontroll (mind R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)]. A CCR3 kimutatásához patkány anti-humán anti-CCR3-PE (IgG2a) antitestet alkalmaztunk (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA). A sejt felszíni festés után a mintákat Fixation/Permeabilisation munkaoldattal (eBioscience, San Diego, CA, USA) fixáltuk. A minták vizsgálata BD FACS Calibur áramlási citométerrel, kiértékelése CellsQuest software (BD Pharmingen, Heidelberg, Németország) segítségével történt.

### ***3.5. Sejt szuppressziós teszt***

A  $CD4^+CD25^+$  T sejteket perifériás, heparinnal alvadásgátolt vérből Ficoll grádiens segítségével szeparált PBMC-ből izoláltuk Miltenyi Regulatory T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Németország) felhasználásával, a gyártó által leírt protokoll szerint. Azért ezt a technikát választottuk, mert „sorter” általi szeparálásra nem volt lehetőség, és ez a kit biztosította a legtöbb sejtet az izolálás végére a további vizsgálatok elvégzéséhez. A perifériás vérből izolált sejt populációk tisztasága a  $CD4^+CD25^-$  sejtek esetén 95 % feletti, a  $CD4^+CD25^+$  sejtek esetén 85-95 % volt. A szuppresszor aktivitás kimutatásának érdekében a  $CD4^+CD25^+$  és  $CD4^+CD25^-$  T sejteket 1:1 arányú kevert kultúrában tenyésztettük 72 órán keresztül. A poliklonális stimuláció szimulálására az általánosan alkalmazott anti-CD3/CD28 T sejt expander mikrogyöngyöket (Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norvégia) használtuk kizárólagosan, vagy az AD-es vizsgálatokban elfogadott SEB (Sigma-Aldrich, München, Németország) jelenlétében. Mivel a funkcionális vizsgálatok előkészítése során az izolációs kit technikával nem lehetséges a  $CD4^+CD25^{bright}$  sejteket elkülöníteni, ezért a  $CD4^+CD25^+$  populációt nemcsak kevert kultúrában, hanem önmagában is stimuláltuk, majd a kapott eredményre korrigáltuk a kevert lymphocytá reakció (MLR – mixed lymphocyte reaction) során kapott értékeket (lásd lentebb). Az alapkísérlet során 1 egység (gyöngy/sejt) anti-CD3/CD28 T sejt expandert és 1 pg/ml SEB-t alkalmaztunk. SEB által stimulált effektor T sejtek szuppresszióját okozó Treg sejtek szelektív defektusának bizonyítására dózis-függő kísérletsort alakítottunk ki. A tesztet először standard 1 pg/ml SEB koncentráció mellett emelkedő effektor : regulatív T sejt arány

(1:2, 1:1, 3:1), majd 1:1 sejtarány mellett növekvő SEB koncentrációval (1 – 500 – 5000 pg/ml) végeztük el. A sejtproliferációt EZ4U kolorimetriás kittel (BioMedica, Bécs, Ausztria) vizsgáltuk, és az aktivitást az optikai denzitás (OD) értékekből számítottuk, melyet 450 nm-es hullámhosszon Labsystems Multiscan MS készülékkel (MTX Lab Systems Inc, Vienna, VA, USA) detektáltunk. A kevert lymphocyták OD értékeit korigáltuk a tiszta CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T sejt tenyészetek OD értékeivel. A szuppresszor aktivitást a CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T sejt kultúrák és a kevert kultúrák korigált OD értékei hányadosa alapján számoltuk a  $OD_{CD25^-}/(OD_{MLR}-OD_{CD25^+})$  képlet szerint.

### ***3.6. Quantitatív real-time RT-polimeráz láncreakció (PCR) (TaqMan) analízis***

A 6-lyukú tálcán tenyésztett humán primer keratinocyták és dermális fibroblaszt sejtkultúrákban a génexpressziós szinteket kezeletlen állapotban, illetve keratinocyták esetén 6 és 24 óráig, NHDF esetén 24 óráig kezelés után vizsgáltuk [TNF- $\alpha$  és IL-1 $\beta$ , vagy IFN- $\gamma$ , vagy IL-13, vagy IL-4 (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA), vagy h-granulocyták-makrofág-CSF (Schering-Plough Research Institute, Kenilworth, NJ, USA)]. A bőrbioptizás minták vizsgálatához a szöveteket Mikro-DismembratorU készülék (Braun Biotech, San Diego, CA, USA) segítségével homogenizáltuk. Mind a sejtkultúrák, mind a bőrszövet esetében TRIzol (Invitrogen, Karlsruhe, Németország) reagenst alkalmazva RNS izolálást hajtottunk végre. Ezután az RNS-t DNase I (Boehringer, Mannheim, Németország) enzimkezelésnek vetettük alá, majd a reverz transzkripció következett. Az így nyert komplementer dezoxiribonukleinsav (cDNS) mintákban a kemokin ligandok (sejtkultúrában CCL11, CCL24, CCL26; bőrben CCL5, CCL8, CCL11, CCL24, CCL26) és receptor (bőrben CCR3) génexpressziós szintjét qRT-PCR méréssel mutattuk ki [ABI PRISM 7000 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems, Darmstadt, Németország) folyamatosan 40 ciklus]. A primer assay-t az Applied Biosystems (Darmstadt, Németország) cégtől rendeltük. A célgének expresszióját a 18S RNS normalizáló gén expressziójához viszonyítottuk.

### ***3.7. Szöveti vizsgálatok***

A szöveti átépülés és a dermális változások bemutatása érdekében először rutin szöveti vizsgálatokat végeztünk egészségesek és AD-es betegek bőréből származó

biopsziás mintákon. A metszeteket elastica van Giesson, és Masson-féle trikróm festési módszerekkel festettük.

### **3.8. Immunfluoreszcens vizsgálatok**

#### **3.8.1. Immunfluoreszcens vizsgálatok bőrben**

A CCL26 fehérje expresszió bemutatásához immunfluoreszcens vizsgálatokat végeztünk egészségesek, és AD-s betegek bőréből származó acetonnal fixált fagyasztott metszeteken. A metszeteket PBS + 2% szamár-szérum oldata általi blokkolás után 16 órán át kecske anti-humán CCL26 antitesttel inkubáltuk, izotípus kontroll mellett (kecske IgG; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Németország; izotípus Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA). Ezután a metszeteket AlexaFluor 555-jelzett szamár anti-kecske antitesttel inkubáltuk (R&D Systems, Mineapolis, MN, USA). A fibroblasztokat identifikáló fibroblaszt felszíni fehérje (fibroblast surface protein – FSP) és a vizsgált CCR3 lokalizációjának kimutatásához a kettős immunfluoreszcencia módszerét alkalmaztuk egészséges kontrollokból (n=10) és AD-s betegekből (n=10) származó fagyasztott bőrmintákon. Az FSP jelzése anti-FSP-vel (egér IgG; Sigma, Taufkirchen, Németország) történt [másodlagos antitestként fluoreszcens egér elleni IgG Ab (R&D Systems, Mineapolis, MN, USA) alkalmaztunk], míg a CCR3 kimutatása anti-CCR3 (kecske IgG; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Németország) segítségével készült, ahol másodlagos fluoreszcens antitestként kecske elleni IgG Ab-t (R&D Systems, Mineapolis, MN, USA) használtunk. A sejtmagi festéshez mindenkor DAPI-t (Invitrogen, Karlsruhe, Németország) alkalmaztunk. A metszetekről képeket Zeiss Cell Observer System (Zeiss, Oberkochen, Németország) által rögzítettünk.

#### **3.8.2 Immunfluoreszcens vizsgálatok NHDF-n**

Az *in vitro* immunfluoreszcens vizsgálatokhoz az NHDF sejteket tárgylemezen történő tenyésztés után fixáltuk, és előkészítés után a festéseket először primer antitestekkel, anti-humán CCR3 (kecske IgG; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Németország) és az izotípus kontrollhoz kecske IgG (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA), majd a másodlagos kötődést nyúl anti-kecske fluoreszcens antitesttel (1:200; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) végeztük. A sejtmagi festéshez DAPI-t (Invitrogen, Karlsruhe, Németország) alkalmaztunk. A metszeteket Zeiss Axiovert2

MOT mikroszkóppal vizsgálatuk, és a Zeiss AxioCam MRc, Zeiss AxioVision 4.6 Software segítségével értékeltük (Zeiss, Oberkochen, Németország).

### **3.9. Funkcionális vizsgálatok NHDF sejteken**

#### **3.9.1. In vitro „reparáció”**

A fibroblasztok reparációs tulajdonságainak vizsgálatához, az NHDF sejtek egyszeres sejtrétegben 80 % konfluenciáig történő tenyésztése után steril pipetta hegyével felszínes, egyszerű „sebzést” hoztunk létre. Mosási lépés után a sejteket vagy kezeletlenül hagytuk, vagy 100 ng/ml CCL26-t adtunk hozzájuk. A neutralizációs kísérletekben a CCL26 beadása előtt 30 percig egér anti-humán CCR3-mal (2 µg/ml) előkezeltük a sejteket (mind R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA). Minden kísérletet 3 alkalommal végeztünk el (triplicate). A „sebzési” területet time-lapse video-mikroszkóppal rögzítettük 15 órán át (Inverz Leitz Mikroszkóp Inkubátor, Zeiss AxioCam HRc, Zeiss AxioVision Software, Carl Zeiss, Oberkochen, Németország).

#### **3.9.2. Fibroblaszt migráció 3D kollagén mátrixon**

A fibroblasztok migrációs kapacitásának méréséhez először NHDF szferoidokat hoztunk létre agaróz gélen (Agarose TypVII Low Gelling, Sigma, Taufkirchen, Németország) 24 órás tenyésztéssel, majd Matrigélre (BD Bioscience, Erembodegem, Németország) helyeztük azokat (1 szferoid/lyuk) 24-lyukú sejttenyésztő tálcán. Ezt követően vagy 100 ng/ml CCL26-t tettünk a lyukakba, vagy kezeletlenül hagytuk a szferoidokat. A kísérletet négyszer ismételtük (quadruplicate). A sejtek migrációs aktivitását a 0. és 6. napon értékeltük a szferoidok nagyságának mérésével. Random választott sejtek motilitását is összehasonlítottuk. A rögzítést digitális kamerával (Olympus, Hamburg, Németország) az értékelést Zeiss AxioVision szoftver (Carl Zeiss, Oberkochen, Németország) segítségével végeztük.

#### **3.9.3. Kalcium-imaging konfokális mikroszkóppal**

Az aktivációra kialakuló intracelluláris kalciumszint ( $[Ca^{2+}]_i$ ) változásait fluorimetriás  $Ca^{2+}$ -imaging technikával detektáltuk. A méréseket megelőzően az NHDF sejteket tárgylemezre helyeztük a pre-konfluens állapot eléréséig. Másnap a sejteket Hank oldatban (Sigma, Taufkirchen, Németország), 37°C-on 40 percig inkubáltuk 1% szérum

albumin, 2.5 mM Probenecid (mindkettő Sigma, Taufkirchen, Németország) és 2  $\mu$ M Fluo-4 AM (Invitrogen, Karlsruhe, Németország) indikátor jelenlétében. Mosás után, ismételt inkubálást (Hank oldattal) követően a tárgylemezt lefedtük, majd a változások detektálására LSM 510 laser scanning konfokális mikroszkópot (Zeiss, Oberkochen, Németország) alkalmaztunk. A vizsgálat során a sejteket 100 ng/ml CCL26 (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA) kezeltük, illetve a neutralizáció során egér anti-humán CCR3 előkezelést (2  $\mu$ g/ml) alkalmaztunk. Egy kezelés alkalmával 200 képet rögzítettünk 987 ms alatt (20x objektívvel) argon-ion lézer (488 nm; 10% lézer intenzitás) segítségével. A képeket avi formátumba konvertáltuk (Zeiss LSM Image Browser 4.2.0.121, Zeiss, Oberkochen, Németország), majd a sejtek relatív fluoreszcens intenzitását ImageJ programmal határoztuk meg (NIH, Bethesda MD, USA).

#### **3.9.4. BrdU sejtproliferációs assay**

A fibroblasztok proliferációjának kimutatásához a NHDF sejteket 96-lyukú tálcán tenyésztettünk CCL26 (10, vagy 100, vagy 1000 ng/ml) jelenlétében, vagy anélkül. 24 órás inkubáció után 20  $\mu$ l BrdU-t helyeztünk a lyukakba, majd további inkubáció után DNS szintézist detektáltunk sejtproliferációs ELISA, BrdU (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN, USA) technikával a gyártó ajánlása szerint. Az újonnan szintetizált BrdU-DNS mennyiségét ELISA-readerrel (BioRad, 450 nm) mértük.

#### **3.10. Statisztikai módszerek**

Az adatok statisztikai feldolgozása során SPSS v.12.0 szoftvert (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) alkalmaztunk. A normál eloszlás vizsgálatát Kolmogorov-Smirnov teszttel végeztük el, majd meghatároztuk az átlag  $\pm$  standard deviáció értékeket és a kiértékeléséhez kétmintás t-próbát végeztünk. Nem-normál eloszlás esetén medián, valamint minimum és maximum értékeket kalkuláltunk, és Mann-Whitney próbát vagy Kruskal-Wallis tesztet alkalmaztunk. A variancia-analízisben F tesztet végeztünk. A korrelációs számítások során ( $CD4^+CD25^{bright}FOXP3^+$  és  $CLA^+CD4^+CD25^{bright}FOXP3^+$  sejtek százalékos arányai, valamint az IgE szint és SCORAD között) normál eloszlás esetén a Pearson-féle korrelációs koefficienset határoztuk meg. A statisztikai próbák értékelésénél a  $p < 0,05$  értéket tekintettük szignifikánsnak (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.005$ ).

## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1. Az nTreg sejtek vizsgálata

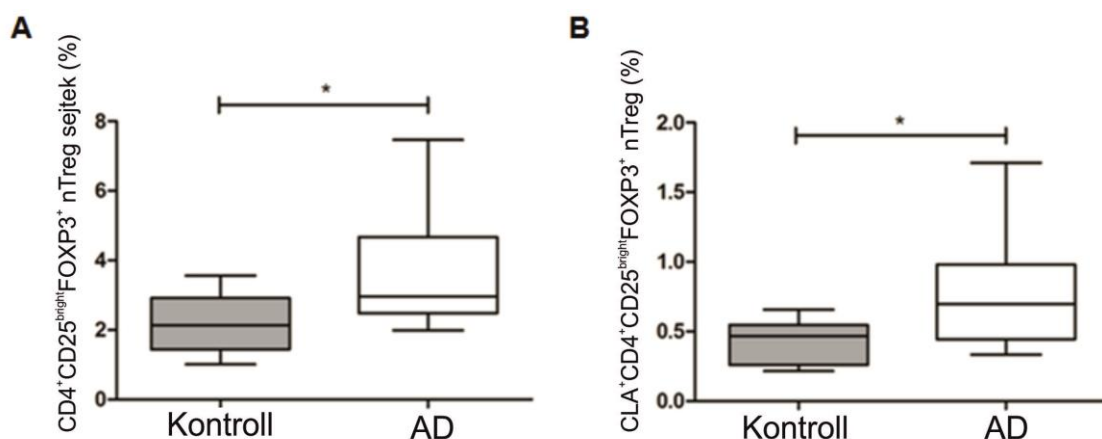
#### 4.1.1. Az nTreg populáció meghatározása AD betegek perifériás vérében CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>CD127<sup>-low</sup>FOXP3<sup>+</sup> jelöléssel (négyes kombináció)

A regulatív tulajdonságokkal rendelkező CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> sejtek identifikálásában számos sejtfelszíni marker jelenléte, vagy hiánya segíthet. Ennek kimutatására az irodalomban nincs egységes módszer. Először arra voltunk kíváncsiak, hogy a FOXP3 megjelenése, illetve a CD127 hiánya a sejtfelszínen milyen mértékben alkalmazható az nTreg sejtek kizárólagos meghatározásában. Ehhez 4 színű áramlási citometriás jelölést használtunk, ahol a CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>CD127<sup>-low</sup>FOXP3<sup>+</sup> nTreg sejteket vizsgáltuk AD betegekben (n=3). A vizsgálat bizonyította, hogy a CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup> sejtek szinte kizárólag FOXP3 pozitívak (95.3% ± 3.4%), vagy CD127 negatívak (93.4% ± 4.1%) (6A. ábra), és a CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup> sejtek 97.3% ± 2.0% volt egyszerre FOXP3<sup>+</sup> és CD127<sup>-low</sup> is. Mivel technikailag a citométer 4 szín vizsgálatát tette lehetővé, és a fenti eredmények igazolták, hogy a CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>FOXP3<sup>+</sup> sejtekkel a regulatív sejtek jól azonosíthatók, így a későbbiekben a CD127 jelölést nem volt szükséges alkalmazni, és helyette újabb sejtfelszíni markert (CLA) vizsgálhattunk (lásd lentebb). A számbeli vizsgálatoknál tehát a CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>FOXP3<sup>+</sup> fenotípusú sejteket azonosítottuk az nTreg sejtekkel, míg a funkcionális vizsgálatokban a CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> sejteket használtuk, mint nTreg sejteket, ahogyan azt az irodalom is számos esetben alkalmazza.

#### 4.1.2. Az nTreg sejtek számának meghatározása AD betegek perifériás vérében CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>FOXP3<sup>+</sup> jelöléssel (hármás kombináció)

Áramlási citométerrel határoztuk meg a CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>FOXP3<sup>+</sup> és a CLA<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>FOXP3<sup>+</sup> nTreg sejtek előfordulási frekvenciáját a CD4<sup>+</sup> T sejtek közt magas IgE szinttel rendelkező AD betegek (n=27) és életkorra illetve nemre illesztett egészségesek (n=11) perifériás vérében (7. ábra). A perifériás CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>FOXP3<sup>+</sup> nTreg sejtek arányát, az összes CD4<sup>+</sup> T sejt tükrében vizsgálva, szignifikánsan emelkedettnek mértük az AD betegekben az egészségesek adataihoz viszonyítva (AD: 3.62% ± 1.55; kontroll: 2.19% ± 0.84; p=0.014) (7A. ábra). Az nTreg sejtek fenotípusa meghatározza a sejtek bőrbe való migrációjának képességét, ezért

kíváncsiak voltunk a bőrbe vándorló, CLA-t expresszáló CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>FOXP3<sup>+</sup> nTreg sejtek arányára a CD4<sup>+</sup> T sejtek között. A CLA<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>FOXP3<sup>+</sup> nTreg sejtek százalékos arányát szignifikánsan magasabbnak mértük az AD betegek perifériás vérében az egészséges kontrollokéhoz viszonyítva (AD: 0.78% ± 0.46; kontroll: 0.43% ± 0.17; p=0.048) (7B. ábra).



**7. ábra** A CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>FOXP3<sup>+</sup> nTreg (A) és a CLA<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>FOXP3<sup>+</sup> nTreg sejtek (B) százalékos aránya a teljes CD4<sup>+</sup> T sejtek közt AD betegekben (n=27) és egészséges kontrollokban (n=11). Az ábrán az átlagokat és a szórásokat tüntettük fel. A szignifikáns különbségeket (\*)-gal jelöltük (\*p<0.05).

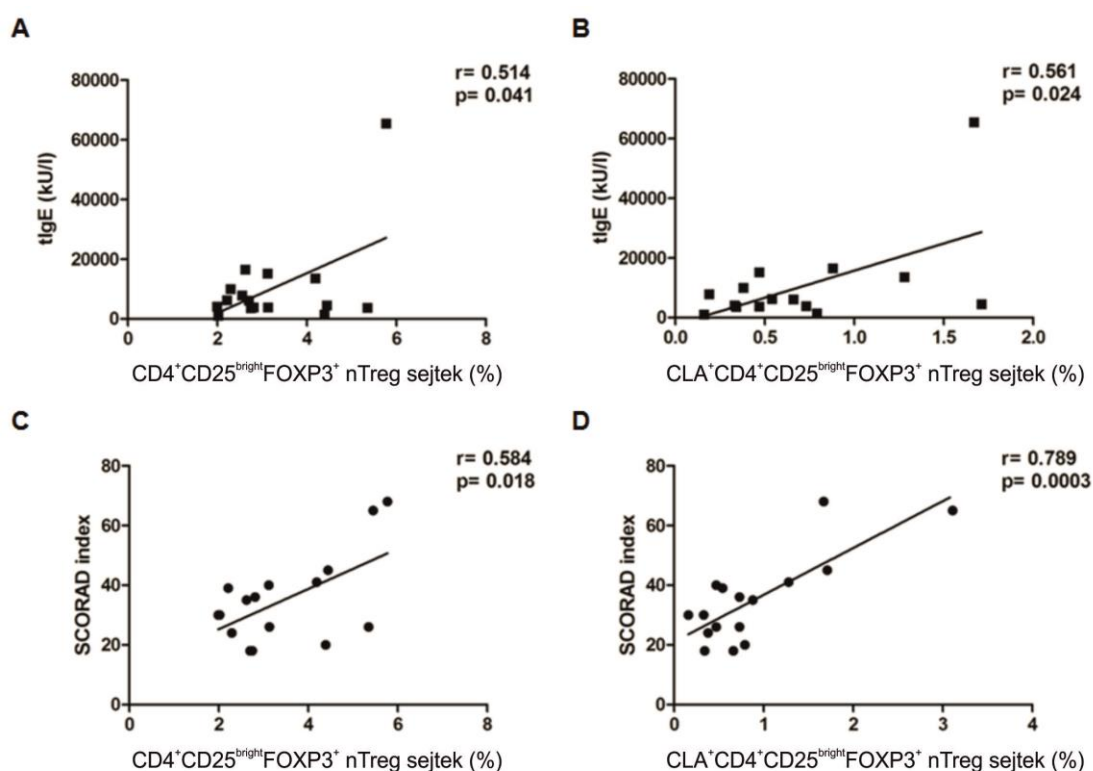
#### 4.2. Összefüggések az nTreg sejtek laboratóriumi paramétereit és a klinikai tünetek között

Az eredmények statisztikai feldolgozása során pozitív korrelációt találtunk a betegekben a CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>FOXP3<sup>+</sup> nTreg sejtek százalékos aránya, valamint a szérumban IgE szint (r= 0.514, p= 0.041, 8A. ábra) vagy a SCORAD index (r= 0.584, p= 0.018, 8C. ábra) között. Pozitív korrelációt találtunk a bőrbe vándorló CLA<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>FOXP3<sup>+</sup> nTreg sejtek, valamint az IgE szint (r= 0.561, p= 0.024, 8B. ábra) és a SCORAD (r= 0.789, p= 0.0003, 8D. ábra) között is.

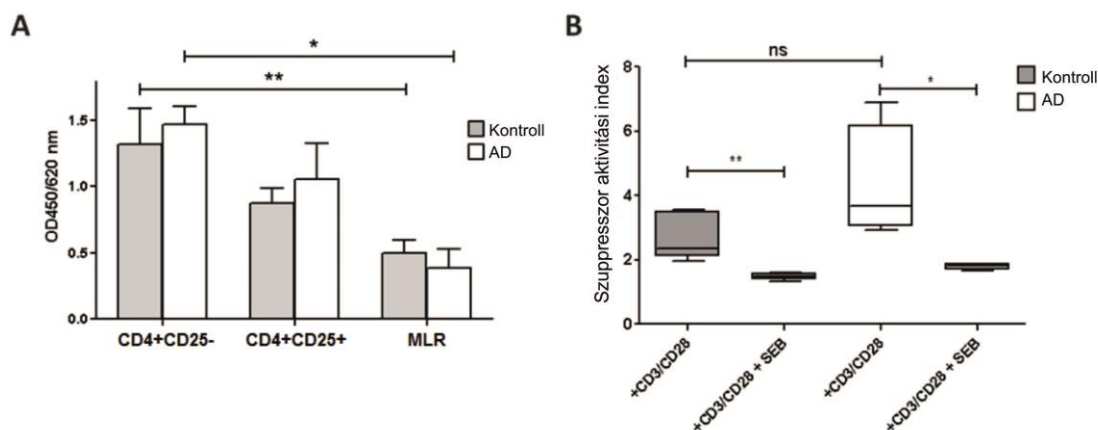
#### 4.3. Az nTreg sejtek in vitro funkcionális vizsgálata

##### 4.3.1. Az nTreg-ek szuppresszor aktivitásának változása SEB hatására

Az *in vitro* funkcionális teszthez véletlenszerűen kiválasztottunk 11 AD beteget, illetve 11 egészséges személyt. A szuppresszor aktivitás méréséhez a nemzetközi irodalomban is elfogadott módszerrel, a CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (regulatív) és a CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (effektor) T sejteket együtt vizsgáltunk anti-CD3/CD28 és/vagy SEB jelenlétében. A CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>/CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> sejtek kevert lymphocytá reakció (MLR) kultúrájában az utóbbi sejtek jelenléte szignifikánsan csökkentette a CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> effektor T sejtek proliferációját (9A. ábra). A sejtek szuppresszor funkcióját a szuppresszor aktivitási index-szel jellemeztük. A SEB stimulációban nem részesülő CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T sejtek szuppresszor aktivitása magasabb volt az AD betegekben, mint az egészséges kontroll csoportban (AD: 4.30 +/- 1.79; control: 2.71 +/- 0.72), de a különbség nem volt szignifikáns. SEB jelenlétében azonban a CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T sejtek szuppresszor aktivitása szignifikánsan csökkent mind a beteg, mind az egészséges csoportban (AD: 1.79 +/- 0.09; kontroll: 1.49 +/- 0.10) (9B. ábra).



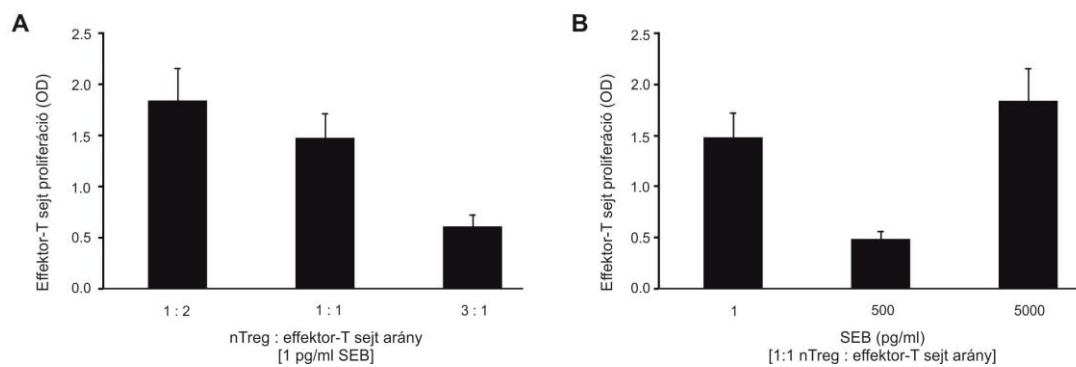
**8. ábra** Pozitív korrelációk a szérumban IgE szint és az nTreg sejtek százalékos megjelenése [CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>FOXP3<sup>+</sup> nTreg (A), CLA<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>FOXP3<sup>+</sup> nTreg (B)] között, és korrelációk a SCORAD index és az nTreg sejtek százalékos megjelenése [CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>FOXP3<sup>+</sup> nTreg (C), CLA<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>FOXP3<sup>+</sup> nTreg (D)] között AD betegekben (n=16). \*p<0.05.



**9. ábra** CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> és CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>/CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> MLR proliferáció anti-CD3/CD28 jelenlétében (MLR esetében a CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-korrigált optikai denzitást tüntettük fel) (A). CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatív T sejtek szuppresszor aktivitási indexének változása anti-CD3/CD28 és/vagy SEB (1 pg/ml) stimuláció hatására AD betegekben (n=11) és egészséges kontrollokban (n=11) (B). Az átlagértékeket és a szórásokat tüntettük fel, a szignifikáns különbséget (\*p<0.05, \*\*p<0.01) jelöli.

#### 4.3.2. Az nTreg szuppresszor aktivitás dózisfüggő változása SEB hatására

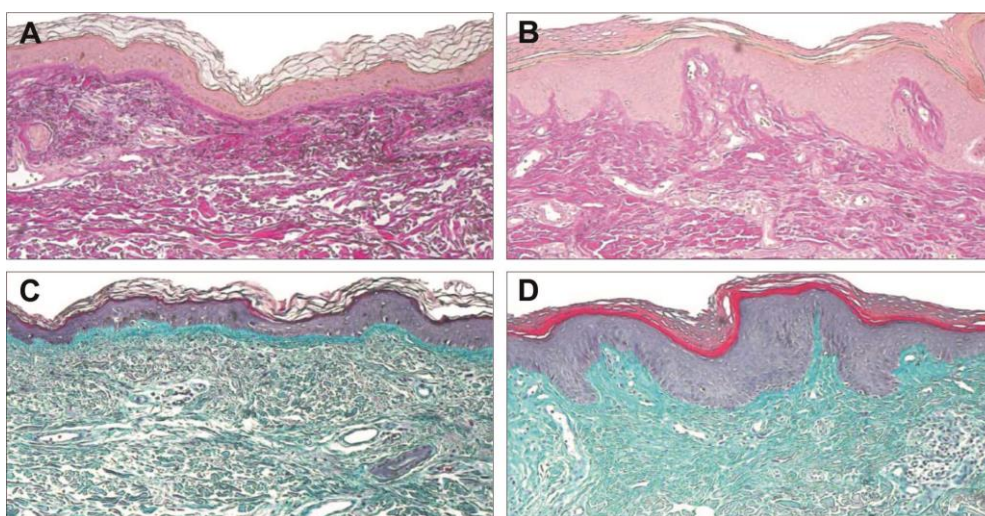
SEB által stimulált effektor T sejtek szuppresszióját okozó nTreg sejtek szelektív defektusának bizonyítására dózis-függő kísérletet végeztünk. Ennek során először standard SEB koncentráció (1 pg/ml) mellett emelkedő effektor-T sejt : nTreg arányt (1:2, 1:1, 3:1) alkalmaztunk. Azt tapasztaltuk, hogy ahogyan növeltük az nTreg sejtek arányát (növekvő nTreg : effektor-T sejt arány), úgy nőtt az nTreg sejtek szuppresszív hatása az effektor-T sejtekre (20-60% csökkenés a szuppresszor aktivitási indexben) (10A. ábra). Ezután állandó, 1:1 effektor-T sejt : nTreg arány mellett növekvő SEB koncentrációt (1 pg/ml, 500 pg/ml, 5 ng/ml) használva is hasonló eredményeket kaptunk. Ugyanakkor azt tapasztaltuk, hogy igen magas SEB koncentrációk (≥500 pg/ml) teljesen kioltották az nTreg sejtek szuppresszor aktivitását, következményes emelkedő effektor T sejtek proliferációt okozva (10B. ábra).



**10. ábra** A CD4<sup>+</sup> effektor-T sejtek proliferációja AD betegekben (n=3) anti-CD3/CD28 és SEB stimuláció hatására CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup> regulatív T sejtek jelenlétében dózis-válasz kísérletek során. Az effektor-T sejtek proliferációját vizsgáltuk először 1 pg/ml SEB jelenlétében emelkedő nTreg : effektor-T sejt arány (1:2, 1:1, 3:1) esetén (**A**), majd 1:1 nTreg : effektor-T sejt arány mellett emelkedő SEB koncentráció (1 pg/ml, 500 pg/ml, 5000 pg/ml) esetén (**B**). (Három mérés átlagának eredményei vannak feltüntetve).

#### 4.4. Szöveti átépülés vizsgálata atópiás bőrgyulladás során

A krónikus atópiás bőrgyulladások által okozott dermiszben végbemenő változások kimutatása érdekében szövettani vizsgálatokat végeztünk AD betegekből származó mintákon (n=37) és azokat egészséges önkéntesek bőrbíopsziáiból (n=10) származó mintákkal hasonlítottuk össze. Az elasztik van Giesson festés az elasztikus rostok mennyiségének csökkenését mutatta AD betegekből (11B. ábra) az egészségesekhez (11A. ábra) viszonyítva.



**11. ábra** Elasztik van Giesson (**A-B**), és Masson féle trikróm festés (**C-D**) egészséges (**A, C**) és AD bőrben (**B, D**).

Továbbá a Masson-féle trikróm festés megmutatta, hogy a papilláris dermiszre lokalizálódó kollagén rostok mennyisége jelentősen nőtt atópiásokban (11D. ábra) egészségesekhez (11C. ábra) hasonlítva. Mindezek arra utalnak, hogy a szöveti átalakulás fontos folyamat a krónikus atópiás bőrgyulladás mechanizmusában.

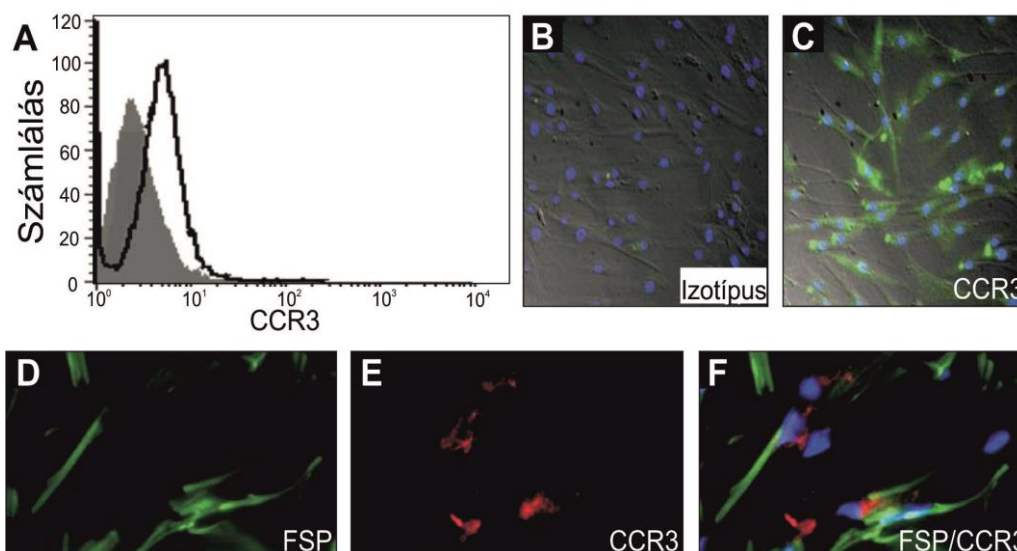
#### ***4.5. Humán fibroblasztok kemokin receptor expressziós mintázatának vizsgálata in vitro és in vivo körülmények között***

A kemokinek kulcsszerepet játszanak az atópiás bőrgyulladások elindításában és fenntartásában, ezért arra voltunk kíváncsiak, vajon a kemokinek közvetlenül hatnak-e a NHDF sejtekre és részt vesznek-e a szöveti átépülésben. Ehhez a kemokin receptor repertoárt szisztematikusan vizsgáltuk tenyésztett NHDF sejteken (5. táblázat).

<b>Kemokin receptor</b>	<b>Fibroblaszt</b>
<b>CCR1</b>	-
<b>CCR2</b>	-
<b>CCR3</b>	+
<b>CCR4</b>	+
<b>CCR5</b>	-
<b>CCR6</b>	-
<b>CCR7</b>	-
<b>CCR8</b>	-
<b>CCR9</b>	-
<b>CCR10</b>	+
<b>CXCR1</b>	-
<b>CXCR2</b>	-
<b>CXCR3</b>	-
<b>CXCR4</b>	-
<b>CXCR5</b>	-
<b>CXCR6</b>	-

**5. táblázat** *In vitro* tenyésztett NHDF sejtek kemokin receptor repertoárja áramlási citometriával vizsgálva.

Vizsgálatainkban azt találtuk, hogy az NHDF sejtek nagymértékben expresszáltak CCR3-t a sejtfelszínen (12A. ábra). A receptor jelenlétét fibroblasztokon immunfluoreszcens technikával is megerősítettük *in vitro* NHDF sejteken (12B-C. ábra) és *in vivo* FSP-pozitív dermális fibroblasztokon atópiás bőrbetegekben (12D-F. ábra).



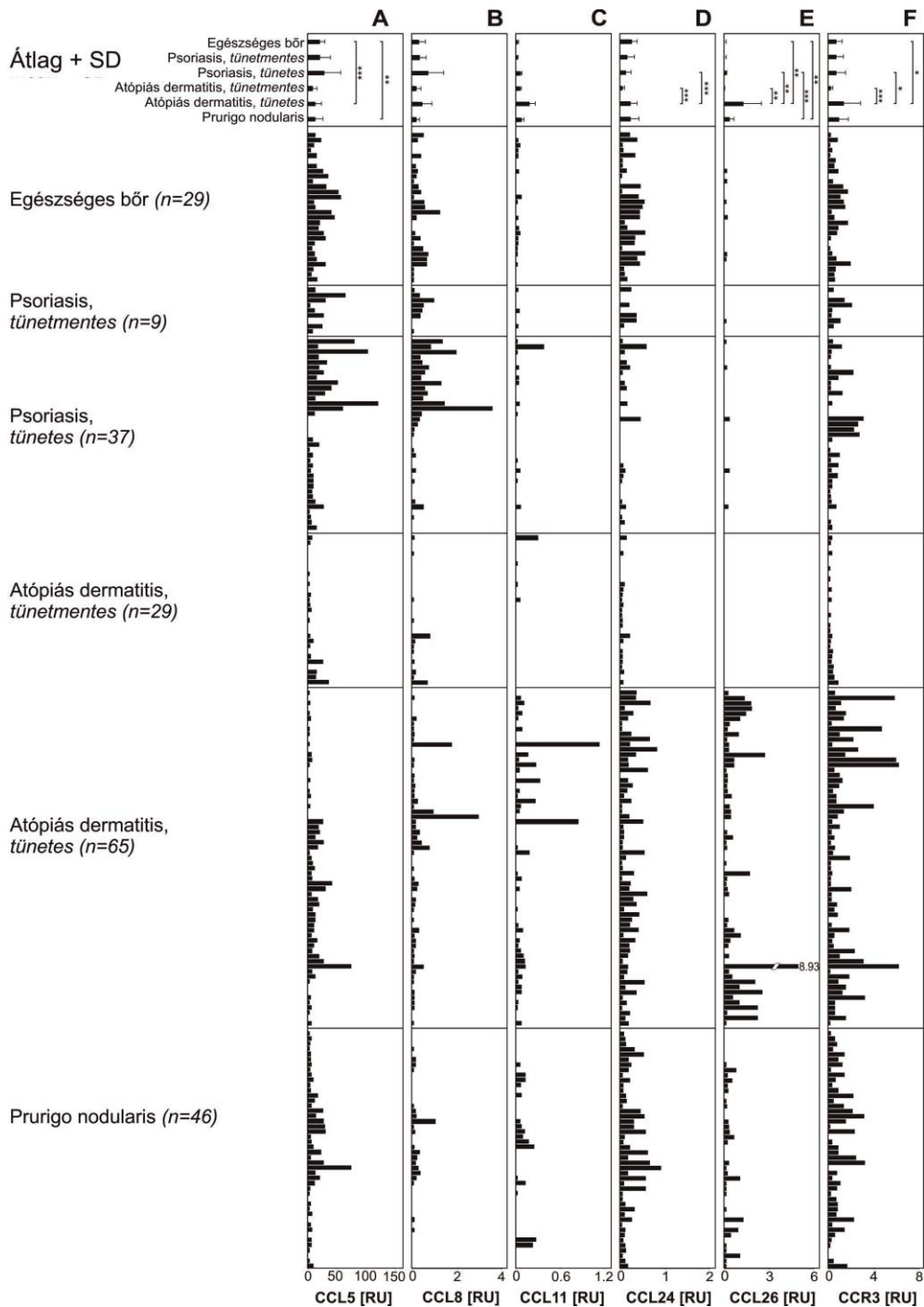
**12. ábra** Az áramlási citometriás vizsgálat (A) CCR3 jelenlétét mutatja NHDF sejteken (fekete hisztogram; izotípus kontroll: szürke hisztogram). Immunfluoreszcens mikroszkópia: CCR3 jelenléte NHDF sejtenyészetben (C) (B: izotípus kontroll); a fibroblasztok felszínén CCR3 látható AD beteg tünetes bőrből származó biopszián [D-Fibroblaszt (FSP, zöld); E-CCR3 (vörös); F-átfedés].

#### 4.6. CCR3 kemokin receptor és ligandjai expressziójának vizsgálata AD-ben

##### 4.6.1. *In vitro* mRNS expressziók

Csak limitált információ áll rendelkezésünkre a kemokinek expressziójáról AD bőrben, illetve egyéb szöveti átépüléssel járó krónikus gyulladásos kórképben, ezért célul tűztük ki, hogy krónikus gyulladásos bőrgyógyászati kórképekben is megvizsgáljuk a CCR3 és ligandjai (CCL5, CCL8, CCL11, CCL24 és CCL26) expresszióját. 65 lézionális és 29 nem-lézionális AD betegből származó, 37 lézionális és 9 nem-lézionális psoriasisos betegből származó, 46 prurigo nodularisban szenvedő betegből (a betegségre jellemző a kifejezett kínzó viszketés, és az erythemás, gyulladásos infiltrációt és jellegzetes karakterű, fibrosist mutató nodulusok kialakulása a bőrben) származó és 29 egészséges

kontrollból nyert bőrmintát vizsgáltunk. A qPCR vizsgálatok megmutatták, hogy a CCL26 volt a leginkább AD-specifikus CCR3 ligand (13E. ábra).



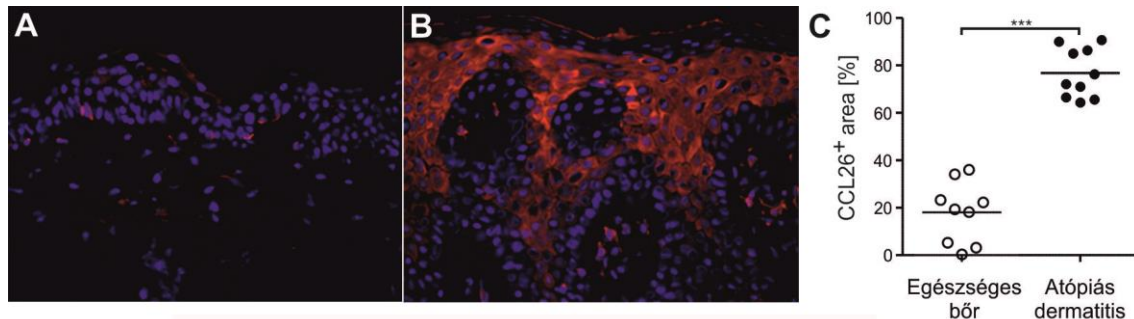
**13. ábra** CCL5 (A), CCL8 (B), CCL11 (C), CCL24 (D), CCL26 (E), és CCR3 (F) expressziók kvantitatív real-time PCR analízise egészséges bőrben, lézionális és nem-lézionális psoriasisos és AD bőrben, valamint lézionális prurigo nodularis bőrben. Az értékeket relatív egységekben (RU) adtuk meg. Az egyedi minták eredményei és az átlag + szórás megadva.

A CCL26 mRNS expressziója átlagosan 150x volt magasabb lézionális AD bőrben, mint nem-lézionális AD, vagy egészséges bőrben, és 15x magasabb, mint lézionális psoriasisos bőrben (\*\* $p < 0.01$ ). A CCL26 prurigo nodularisban is magasabb expressziót mutatott psoriasisos (\*\* $p < 0.005$ ), vagy egészséges bőrhöz (\*\* $p < 0.01$ ) viszonyítva. Érdekes módon az irodalomban leginkább tanulmányozott CCR3 ligand, a CCL11 nem mutatott domináns expressziós különbséget atópiás és psoriasisos minták összehasonlítása esetén, de lézionális AD bőrben 4x nagyobb expressziót mutatott, mint nem-lézionális AD, lézionális psoriasisos vagy egészséges bőrben, igaz az eredmény nem volt statisztikailag szignifikáns (13C ábra,  $p > 0.05$ ). Emellett a CCL24 szintek, bár alacsonyak voltak, mégis szignifikánsan magasabb expressziót mutattak lézionális AD mintákban, mint nem-lézionális AD, vagy lézionális psoriasisos mintákban (13D. ábra, \*\*\* $p < 0.005$ ). Ezzel ellentétben a CCL5 és a CCL8 elsősorban psoriasisos mintákban mutatott magasabb expressziót, nem a lézionális AD mintákban, ahol alacsonyabb expressziót tudunk kimutatni a kontrollhoz viszonyítva (13A-B. ábra). A ligandok receptora, a CCR3 a legmagasabb expressziót leginkább lézionális AD, valamint emellett a prurigo nodularis bőrből származó mintákban mutatta, mely szignifikánsan magasabb volt, mint a nem-lézionális AD, lézionális psoriasisos, vagy egészséges bőrből származó mintákban (13F. ábra). Összességében kimutattuk, hogy a CCR3 ligandjai közül a CCL26 mutatta a legerősebb asszociációt AD-szel.

#### **4.6.2. *In vivo* szöveti expressziók**

Azért, hogy jobban megismerjük a CCL26 sejtszintű termelésének forrását a bőrben, egészségesektől és AD betegektől származó mintákban vizsgáltuk a kemokin *in vivo* expresszióját (izotípus kontroll mellett) immunfluoreszcens módszerrel (14A-B. ábra). A vizsgálat során a CCL26 kifejezett expresszióját találtuk a lézionális AD bőr epidermisében (14B. ábra). A szövettani minták számítógép-asszisztált képanalízise megmutatta, hogy az epidermisben a CCL26 fehérje szignifikánsan túlexpresszált AD-ben ( $n=10$ ), egészséges bőrből ( $n=9$ ) származó mintákhoz viszonyítva (14C. ábra, \*\*\* $p < 0.005$ ; Student-féle  $t$  próba). Vizsgálatunk azt is bizonyította, hogy az atópiás bőrgyulladás során a CCL26 termelés elsődleges helye az epidermis basalis és suprabasalis sejtrétegének keratinocytái (14B. ábra), továbbá kisebb mértékben a superficiális dermális plexusban lévő endotél sejtek mutattak CCL26 fehérje

immunreaktivitást (14A-B. ábra). Az izotípus kontrollok minden esetben negatívak voltak (ábra nélkül).

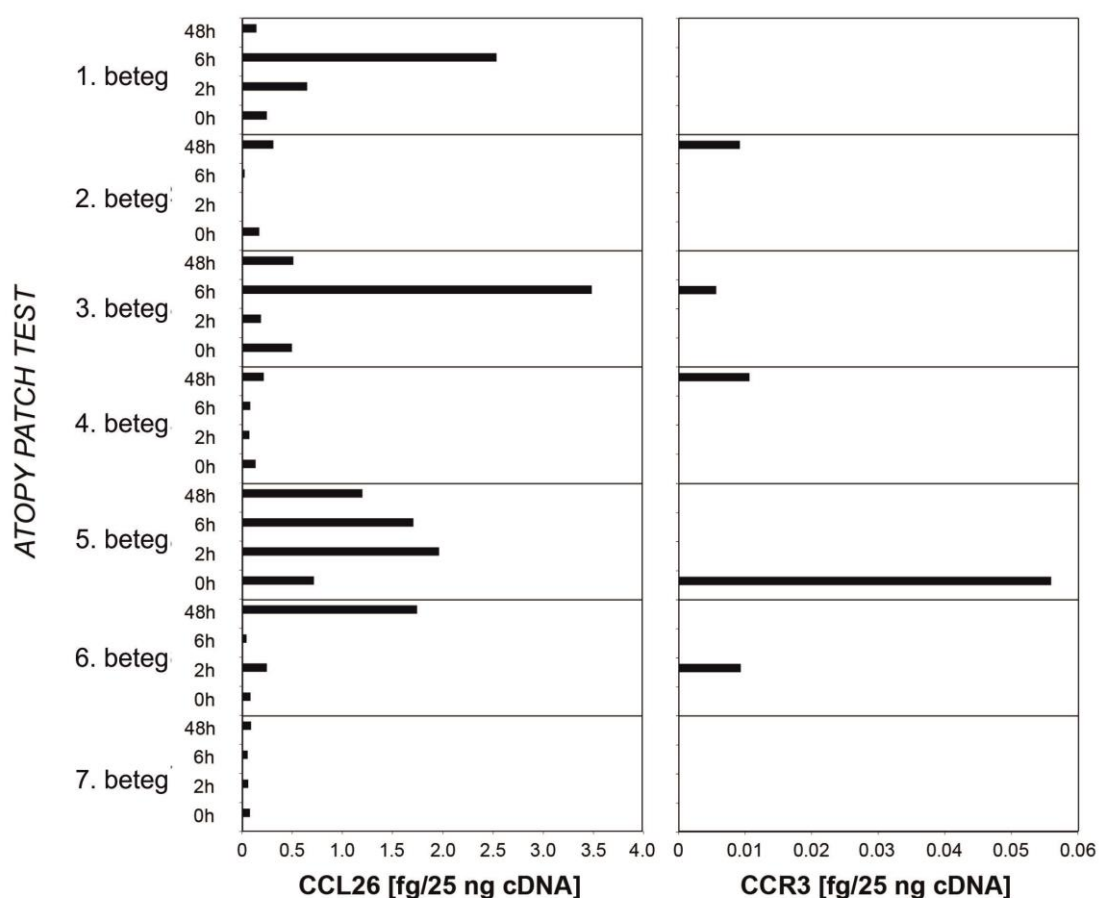


**14. ábra** A CCL26 expressziója egészséges bőrben (A) és lézionális AD bőrben (B) (immunofluorescens analízis, vörös: CCL26, kék: DAPI; 400x nagyítás). A CCL26 fehérje expresszió számítógép-asszisztált kvantifikációja egészséges bőrben (n=9) és AD bőrben (n=10) (C).\*\*\*P value < 0.005; Student-féle t próba.

#### 4.7. CCR3 és CCL26 regulációjának vizsgálata *in vivo* és *in vitro* körülmények között

##### 4.7.1. CCR3 és CCL26 expressziós kinetikája atópiás bőrben

A CCL26 ligand és a CCR3 receptor atópiás bőrgyulladásban történő regulációjának és expressziós kinetikájának további vizsgálata céljából APT végeztünk 17 AD betegen, melyből 7 beteg anamnesztikusan, klinikailag és APT-ben is pozitív eredményt mutatott házipor atka allergiára nézve. A ligand és a receptor mRNA expressziót az APT 2., 6., 48. órájában végzett bőrbiopsziás mintákban és egészséges bőrben vizsgáltuk (15. ábra). A vizsgált betegek (n=7) közül 6 mutatott több mint 2x növekedést a CCL26 expressziójában az APT ideje alatt. A legmagasabb CCL26 expressziót az allergén expozíciót követő korai vizsgálati időpontokban tapasztaltuk (2-6 óra; 3 betegnél). Azoknál a betegeknél, akik a csúcsexpressziót az allergén expozíció után 48 órával mutatták, átlagosan alacsonyabb mRNA expressziós szinteket mértünk (15. ábra *bal oszlop*). A CCR3 mRNA expresszió tekintetében 4/6 beteg mutatott a CCL26 expresszióját követő CCR3 expressziós mintázatot, mely a ligand és receptora összehangolt transzkripciójára utal az allergén expozíció után a szenzitizált betegeknél (15. ábra *jobb oszlop*).

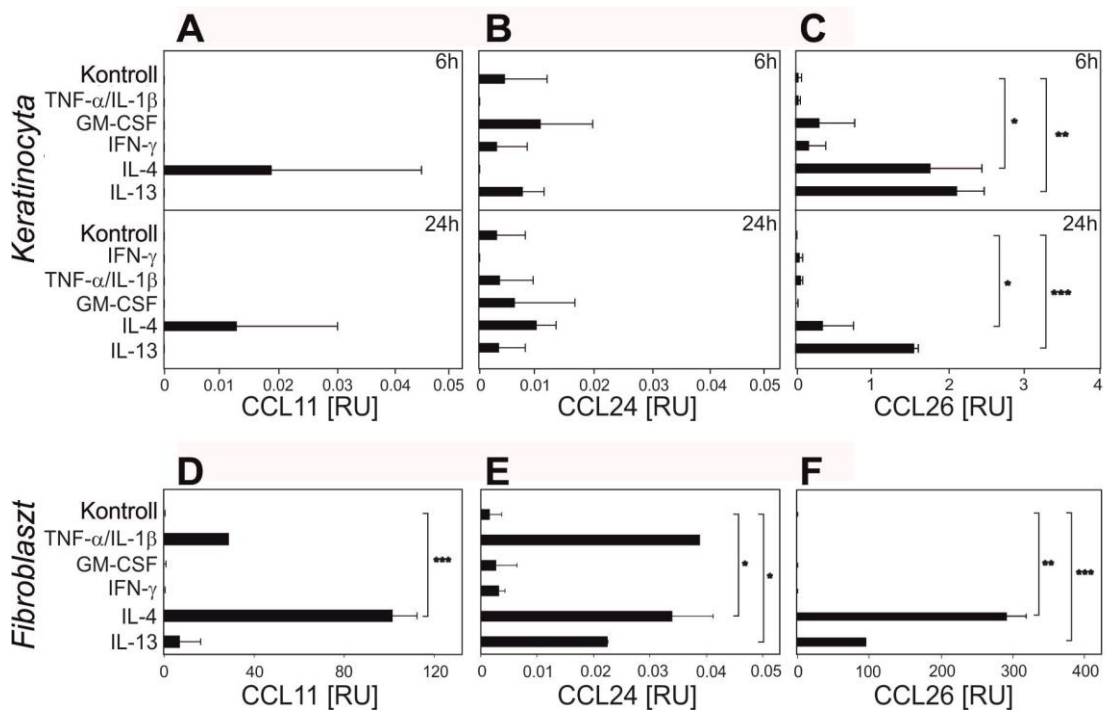


**15. ábra** CCL26 (bal oszlop) és CCR3 (jobb oszlop) mRNA expressziók mérése házipor atka allergénnel végzett APT-ből származó bőrbioptziákban kvantitatív real-time PCR analízissel. A bőrbioptziákat az allergén expozíció előtt és után (2, 6, és 48 órával) nyertük. Klinikailag mind a 7 beteg pozitív teszt reakciókat mutatott és a vehikulummal végzett teszt minden esetben negatív volt. Az értékeket a célgén esetében fg/25 ng teljes cDNS hányadosaként adtuk meg.

#### 4.7.2. CCL26 expresszió regulációja primer keratinocytákban és NHDF sejtekben

A CCL26, és egyéb, az eotaxin családba tartozó kemokin (CCL11, CCL24), regulációjának pontosabb megértése érdekében humán primer epidermalis keratinocytákat és NHDF sejteket kezeltünk proinflammatorikus (TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ ), és effektor Th sejt citokinekkal (IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-13), melyek köztudottan fontos szerepet játszanak az atópiás gyulladások elindításában és fenntartásában (84). A qPCR vizsgálatok megmutatták, hogy alapállapotban a keratinocyták alacsony szinten

expresszálják a CCL26-t, de IL-4 és IL-13 citokin stimulusok után 6, illetve 24 órával jelentősen megnő annak az expressziója (16C. ábra).



**16. ábra** Kezeletlen, és citokinekkal kezelt humán epidermalis keratinocyták (6 és 24 órás stimuláció) (A-C) és NHDF sejtek (24 órás stimuláció) (D-F) CCL11 (A, D), CCL24 (B, E), és CCL26 (C, F) expressziójának mérése kvantitatív real-time PCR módszerrel. Az értékeket relatív egységekben (RU) adtuk meg.

Az egyes kemokin ligandok mRNS expresszióját összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy a keratinocyták a CCL26-t 100x nagyobb szinten expresszálták, mint a CCL11-t, vagy a CCL24-t, mely a CCL26 domináns szerepét erősíti az epidermalis sejtek által termelt CCR3 ligandok között. NHDF sejteket vizsgálva a CCL26 mRNS alapexpresszió igen alacsony volt, de 24 órás IL-4, vagy IL-13 stimulus hatására szignifikánsan nőtt a ligand expressziója (16F. ábra). A CCL26 expresszióhoz hasonlóan a nyugvó NHDF sejtek alacsony CCL11 mRNS expressziót mutattak (16D. ábra). Érdekes, hogy homeosztatis körülmények között a keratinocyták nem expresszálták a CCL11 mRNS-t, mely azt jelzi, hogy a CCL11 inkább a fibroblasztok domináns CCR3 ligandja (16A. ábra). Az IL-13 stimulus nem, de az IL-4 hatás mindkét sejt típusban szignifikáns CCL11 expresszió növekedést okozott (fibroblasztokban 400x magasabb CCL11 expresszió a keratinocytákhoz képest). Az NHDF által expresszált ligand profilt

megvizsgálva látható, hogy a CCL11 homeosztatisz körülmények közt is erősen expresszált, és mind a CCL11, mind a CCL26 expresszió szignifikánsan emelkedik Th2 citokinek általi stimulusra. A CCL24 tekintetében megfigyelhető, hogy elhanyagolható a keratinocyták vagy a fibroblasztok általi expressziója, de IL-4 és IL-13 hatására NHDF sejtekben növekszik a CCL24 kifejeződése (16B. és 16E. ábra). Mindezek alapján kirajzolódik az a kép, mely szerint a Th2 citokinek fokozzák a CCL11 és CCL26 expresszióját a bőr strukturális rezidens sejtjeiben, és közülük a CCL26 bizonyult a fő CCR3 ligandnak az epidermális kompartmentben.

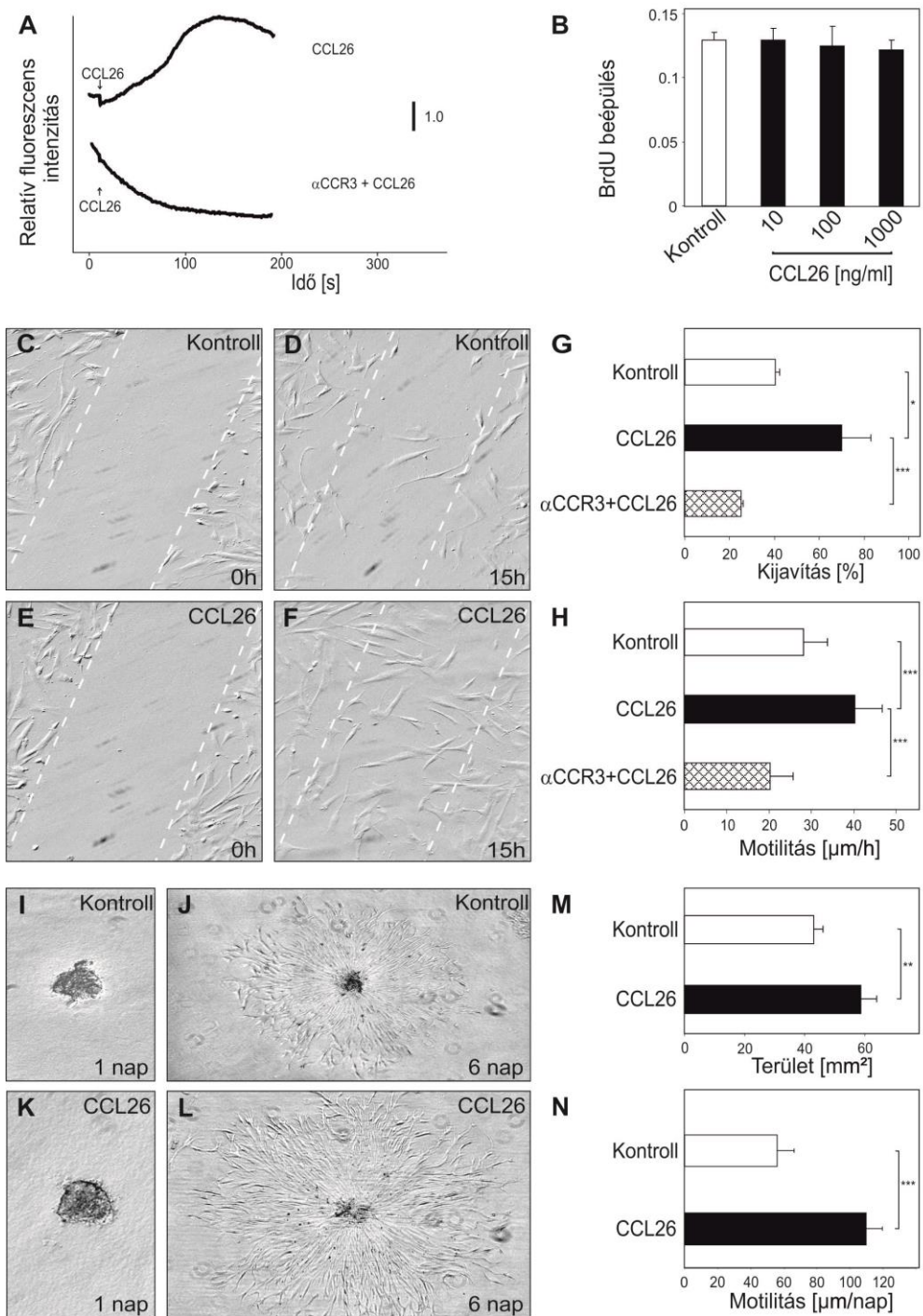
#### **4.8. *In vitro* funkcionális vizsgálatok CCR3 tekintetében**

##### **4.8.1. CCL26 hatása az intracelluláris $Ca^{2+}$ mobilizációra**

A CCR3 receptor funkcionális aktivitását NHDF sejteken először  $Ca^{2+}$  mobilizációs tesztekkel vizsgáltuk. Ennek során a CCL26 (100 ng/ml) stimulus hatására állandó cytoszolisz  $Ca^{2+}$  emelkedést tapasztaltunk, mely a kalcium-flux primer rezidens sejtben kemokin stimulusra történő kialakulását bizonyította (17A. ábra, *felső panel*). A sejtek neutralizáló anti-CCR3 antitesttel történő előkezelése gátolta a CCL26 stimulatorikus hatását, mely a CCR3 funkcionális aktivitását bizonyította NHDF sejteken (17A. ábra, *alsó panel*).

##### **4.8.2. CCL26 biológiai hatása dermális fibroblaszt sejteken**

Ezek után a CCR3 szignalizációs útvonal biológiai jelentőségét vizsgáltuk a fibroblaszt proliferáció és migráció tekintetében (17B-N. ábra). A fibroblaszt proliferáció fontos lépés a szöveti átépülés során, ezért *in vitro* körülmények között vizsgáltuk a CCL26 hatását az NHDF sejtek proliferációjára. Érdekes módon a növekvő dózisú CCL26 stimuláció nem okozott változást a fibroblasztok proliferációjában (17B. ábra). Ugyanakkor a kemokin NHDF-sejtmigrációra való hatását is vizsgáltuk. Az *in vitro* sebgyógyulási modellben a CCL26 hatására markánsan nőtt a fibroblasztok reparációs (kijavító) kapacitása a 15 órás megfigyelési periódus alatt (a stimulálatlan kontroll esetében  $40.37\% \pm 1.84\%$  volt a reparáció mértéke, míg a CCL26 esetében  $70.06\% \pm 12.86\%$ ;  $*p < 0.05$ ) (17C-H. ábra). A sejtek neutralizáló anti-CCR3 antitesttel történő előkezelése teljesen blokkolta a CCL26 *in vitro* reparációt serkentő hatását, mely bizonyította a CCR3 szignalizáció elengedhetetlen szerepét a folyamatban (17G. ábra).



**17. ábra** CCL26 funkcionális hatása NHDF sejtekre. Kalcium mobilizáció CCL26 stimuláció után (**A**, felső panel) (**A**, alsó panel: anti-CCR3 antitest előkezelés után). Sejtproliferációra gyakorolt hatás (**B**). Reparációra (kijavítás) (**G**) és motilitásra (**H**) való hatás CCL26 és anti-CCR3 nélkül (kontroll, **C-D**), vagy annak jelenlétében (**E-F**). Migrációs hatások (**M-N**) szferoidon CCL26 jelenlétében (**K-L**), vagy anélkül (**I-J**).

További bizonyítékokkal támasztotta ezt alá a CCL26 jelenlétében, vagy anélkül elvégzett NHDF-szferoid 3D migrációs tesztünk. Ennek során a 100 ng/ml koncentrációjú CCL26 a fibroblasztok szferoidból történő kivándorlása által a szferoid teljes méretét (36.5 % növekedés; \*\* $p < 0.01$ ; 17M. ábra), és a sejtek átlagos motilitását is (95.7 % növekedés; \*\*\* $p < 0.005$ ; 17N. ábra) szignifikánsan növelték a kezeletlen kontrollhoz képest (17I-N. ábra). Eredményeink tehát bizonyították a CCL26 közvetlen hatását a fibroblaszt migrációra.

## 5. MEGBESZÉLÉS

### *5.1. Az nTreg sejtek vizsgálata AD betegek perifériás vérében*

A regulatív T sejtek, mint a TGF- $\beta$  termelő Th3 sejtek, az IL-10 termelő Tr1 sejtek, és a CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>FOXP3<sup>+</sup> nTreg sejtek, fontos kontroll funkciókat töltenek be az immunológiai folyamatokban (156), habár pontos feladatuk AD-ben még nem teljesen tisztázott (157). Az allergiás, autoimmun és krónikus gyulladásos kórképeket félresiklott effektor T sejt mediált immunválaszok jellemzik, melyeket részlegesen magyarázhatnak az nTreg sejtek mennyiségi és/vagy funkcionális elváltozásai is. A regulatív sejtek heterogenitása és a specifikus sejtmarkerek hiánya miatt azonban a különböző vizsgálatok nTreg-ek karakterizálására vonatkozó eredményei nehezen összehasonlíthatók (102, 103, 158-161). Bár az irodalmi bizonyítékok azt mutatják, hogy AD betegek perifériás vérében az nTreg sejtek száma normális, vagy emelkedett lehet, csak néhány olyan tanulmány született, ahol egyszerre vizsgálták az nTreg-ek számbeli és funkcionális elváltozásait (117, 118).

A jelen PhD munka egyik célja az volt, hogy karakterizálja az nTreg-ek, ezen belül a speciális, bőrbe „homingoló” nTreg sejtek komplex mennyiségi és funkcionális változásait közepsúlyos-súlyos klinikai tüneteket, és magas IgE szintet mutató AD betegekben. További cél volt meghatározni a kapcsolatot a bőrbe vándorló (CLA<sup>+</sup>) nTreg sejtek és a betegség súlyossága között, mely rávilágíthat a nTreg-ek fontos patofiziológiai szerepére az AD kialakulásában.

Korábban munkacsoportunk már leírta a bőrben a CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>FOXP3<sup>+</sup> nTreg sejtek magas számát és kapcsolatát a dendritikus sejtekkel APT pozitív AD betegek biopsziáiban (116). Ezen sejtek magas száma AD-ben azonban önmagában nem utal kizárólagosan regulatív funkciókra, hisz a FOXP3 pozitivitás a humán CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup> T sejtekben nem csak az nTreg sejtpopulációt jelölheti (162). AD-ben a CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>FOXP3<sup>+</sup> és a CLA<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>FOXP3<sup>+</sup> sejtek egy része Th2-szerű effektor funkciót is felvehet specifikus triggererek (pl. bakteriális szuperantigének hatása) hatására (118, 119).

Az nTreg-ek megfelelő karakterizálása érdekében ezért a jelen munka során először a regulatív funkcióval rendelkező CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>CD127<sup>-/low</sup>FOXP3<sup>+</sup> T sejt populációt határoztuk meg. Az eredmények értékelése során kiderült, hogy az áramlási citometriai

vizsgálatban a kapuzott CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup> sejtek csaknem teljessége FOXP3 pozitívnak és CD127 negatívnak bizonyult (97.3% ± 2.0%). Ezek alapján az nTreg sejteket azonosítani tudtuk a CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>FOXP3<sup>+</sup> sejtekkel, melyek százalékos előfordulása szignifikánsan emelkedett volt AD betegek perifériás vérében az egészséges kontrollokhöz képest. Majd meghatároztuk a specifikus, CLA<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>FOXP3<sup>+</sup>, bőrbe vándorló nTreg alcsoportot, melyek százaléka szintén szignifikánsan magasabb volt AD betegekben egészségesekhez viszonyítva. Eredményeink összhangban voltak az irodalom korábbi közléseivel (163).

Leírták már korábban a CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>FOXP3<sup>+</sup> nTreg sejtek és a SCORAD közti pozitív korrelációt (105, 118, 163), de a szérum IgE szint és a CLA<sup>+</sup> nTreg-ek összefüggéseit a betegség súlyosságával korábban még nem jellemezték (164). Vizsgálataink során először mutattuk be, hogy AD betegekben szignifikáns korreláció van mind az nTreg sejtek, mind a CLA<sup>+</sup> nTreg-ek és a betegség SCORAD és IgE szint által jellemzett súlyossága és a szenzitizáció jelenléte között.

Korábban kérdéses eredmények jelentek meg az irodalomban az nTreg sejtek antigén stimulusra adott válaszáról AD-ben. Nem megfelelő nTreg funkciót írtak le allergének (158) és a bőrt kolonizáló mikroorganizmusok hatására. Beszámoltak az nTreg sejtek anergiájáról is (165), például házipor atka antigén stimulusra, mind egészségesekben, mind AD betegekben. Továbbá a betegek nagy százalékában írtak le *S. aureus* kolonizációt, és azt találták, hogy SEB jelenlétében az nTreg-ek elvesztették az effektor T sejteken való szuppresszív hatásukat (117).

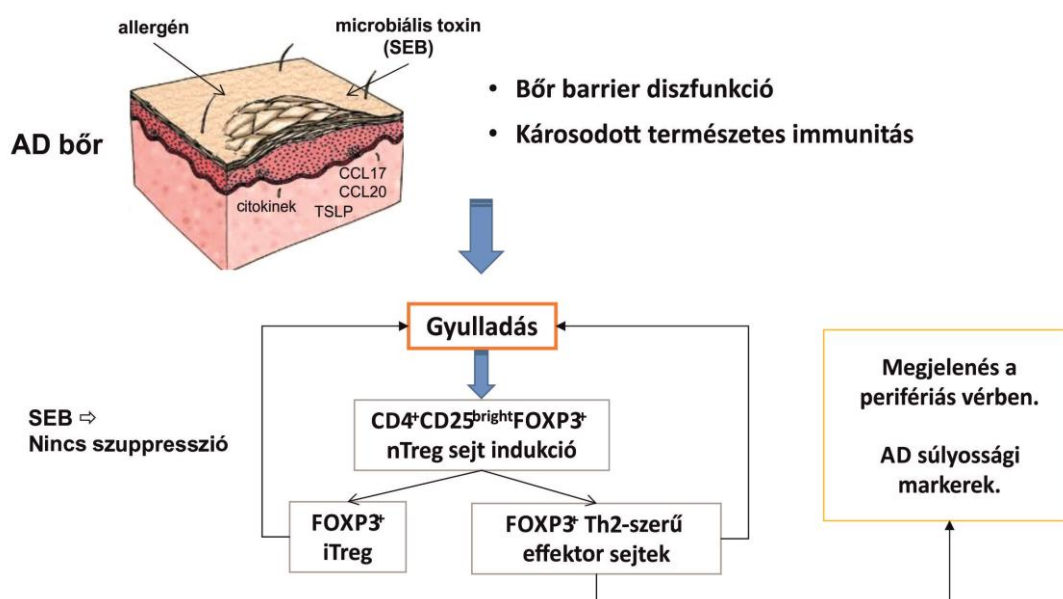
Vizsgálatainkban egy korábban már alkalmazott módszer módosított formáját használva a SEB hatását tanulmányoztuk az AD patogenezisére és progressziójára az nTreg funkcióra történő SEB-mediálta szuppresszió jelenlétének bemutatása által. A funkcionális tesztek bizonyították, hogy az anti-CD3/CD28 hatás mellett az AD betegek perifériás vérében lévő nTreg sejtek megtartották szuppresszor aktivitásukat. Amikor azonban további SEB stimulust is alkalmaztunk, a sejtek elvesztették szuppresszív képességüket mind az AD betegekben, mind az egészségesekben, mely azt mutatja, hogy AD-ben az nTreg sejtek primer funkciója megtartott és nem különbözik az egészségesekétől. Ugyanakkor AD esetén a beteget körülvevő mikroökönyezet jelenti a legnagyobb különbséget az egészségesekhez viszonyítva. Mivel AD-ben a SEB szinte folyamatosan jelen van a betegek bőrén (34), ez okoz másodlagos úton funkciózavart az

nTreg sejtekben. Az AD betegek több, mint 90 %-ban mind a lézionális, mind a nem-lézionális bőrön kimutatható a *S. aureus* kolonizációja, amely mértéke korrelál a betegség súlyosságával (34). Számos oka lehet a megnövekedett *S. aureus* kolonizációnak a bőrön. Az egyik a károsodott barrier funkció (abnormális keratinocita differenciáció, fehérje maturáció, defektív lipid lamellák) (8, 35, 36). Emellett a természetes (nem megfelelő AMP, pl dermcidin,  $\beta$ -defensin, cathelicidin szint és funkció)(37) és a szerzett immunitás is zavart szenved. Utóbbiban a KC-k és a gyulladást termelő sejtek által termelt citokinek és kemokinek (pl. TSLP, CCL17, CCL20) elősegítik a további gyulladást, Th2 sejt polarizációt, emelkedett Th2 effektor citokin termelést, mely folyamatok együttesen csökkentik a filaggrin és AMP termelést, következményes mikrobiális kolonizációt elősegítve (34).

A *S. aureus* több útvonalon is elősegítheti az AD bőrgyulladás felerősödését. Először is megfigyelhető a bakteriális sejtfalat felismerő TLR2 polimorfizmus előfordulása és szoros kapcsolata a súlyos AD-es tünetekkel és a nem megfelelően szabályozott citokin expresszióval. Továbbá a baktérium által termelt alfa-toxin citotixikus hatása a KC-ra és fokozza a lymphocita apoptózist. Ezen túlmenően a bakteriális szuperantigének a T sejtekhez direkt kötődve poliklonális T sejt aktivációt, lymphocyták általi IL-31 indukciót és szuperantigén-specifikus IgE termelést okozhatnak (34). Valamint, ahogy azt kísérleteinkben is bizonyítottuk, a SEB további fontos hatással bír az AD pathogenezisében és progressiójában. A korábbiakban megkérdőjelezhető eredmények születtek az antigénstimulusra adott Treg válaszokról AD-ben. Leírták, hogy Der p1 antigének általi stimuláció hatására a Treg-ek anergiásak maradtak mind egészséges kontrollokban, mind AD betegekben (165). Ugyanakkor egy másik vizsgálat, a miénkhez hasonlóan, azt a megfigyelést tette, hogy SEB hatására a Treg-ek nem maradtak anergiásak, hanem „válaszoltak” a stimulusra (117). Cardona és mtsai ezt a fenomént *in vitro* a monocytákon megjelenő stimulált glucocorticoid-indukált TNF-receptor-kapcsolt fehérje ligand expresszió megjelenésével magyarázták, mely Treg proliferációhoz és T effektor sejt szuppresszióhoz vezetett (166).

Összességében az eddig közölt tudományos eredmények, valamint a korábbi és jelen eredményeink alapján egy hipotézis állítható fel, mely szerint az állandóan jelenlévő allergén és bakteriális stimulusok a KC-k, DC-k és hízósejtek által közvetítve szignifikáns effektor T sejt aktivációhoz vezet az AD betegek bőrében (167). A

bőrgyulladás kialakulása során a FOXP3<sup>+</sup> T sejtek helyi indukciója figyelhető meg, habár a sejtek funkciója még nem teljesen tisztázott (104, 168, 169). Ha ezek a sejtek FOXP3<sup>+</sup> indukált Treg-ek regulatív funkciójával (ahogy mi azt be is mutattuk eredményeinkben), akkor az AD-ben tapasztalt folyamatos SEB jelenlét elnyomja funkciójukat további intenzív bőrgyuladáshoz vezetve (18. ábra). Ha ezek a sejtek átmeneti FOXP3<sup>+</sup> Th2-szerű effector sejtek, akkor önmagukban is képesek az atópiás bőrgyulladás elősegítésére. Ezek a FOXP3<sup>+</sup> sejtek a periférián megjelenve mérhetőek, és információt adnak a betegség súlyosságáról (118, 119).



**18. ábra** Hipotézisünk a CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>FOXP3<sup>+</sup> nTreg sejtek szerepéről AD-ben (118, 119).

Vizsgálatainkban bizonyítottuk, hogy a középsúlyos-súlyos tünetekkel rendelkező AD betegek perifériás vérében emelkedett százalékban fordulnak elő a CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>FOXP3<sup>+</sup> és a CLA<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>FOXP3<sup>+</sup> nTreg sejtek, és ezek mennyisége pozitív korrelációt mutat a betegség súlyosságával és az IgE szinttel, mely a FOXP3<sup>+</sup> nTreg sejtek AD kialakulásában betöltött patogenetikai szerepére utal. Továbbá igazoltuk, hogy az nTreg funkció homeosztatis körülmények között AD betegekben megtartott, de dóziszfüggő SEB stimuláció hatására károsodik. Ez alapján

kijelenthető, hogy a  $CD4^+CD25^{bright}FOXP3^+$  és a  $CLA^+CD4^+CD25^{bright}FOXP3^+$  nTreg sejtek vizsgálata a betegség súlyosságának fontos markere AD betegekben.

## **5.2. Szöveti átépülés vizsgálata AD betegekben**

A szöveti átépülés fontos patofiziológiai esemény krónikus atópiás bőrgyulladásban, habár a folyamat pontos háttere nem ismert. A bőrben jól karakterizálható változásokat láthatunk, úm. epidermális hyperplasia a hámpapillák irreguláris megnyúlásával, fokális hypergranulosis, megvastagodott bazális membrán, dermális perineurális és papilláris fibrózis, megnövekedett számú dermális macrofágok és fibroblasztok, csökkent elasztikus rost mennyiség, szuperficiális perivascularis lymphocytás és eosinophil sejtes gyulladós infiltrátum, kifejezett extracelluláris mátrix depozitumok (81, 82).

Jelenleg úgy gondoljuk, hogy a gyulladós sejtek, (különösen az eosinophil granulocyták) részvétele, a mikrovaszkulátúra megváltozása, valamint a rezidens mesenchymális sejtek összegyűlése és aktivációja mind szerepet játszhat az átalakulásokban (170). Ezt a fibroblaszt-eosinophil sejt-sejt interakciót pedig fontos kommunikációs útvonalak regulálhatják, melyek végezetül a dermális átépüléshez vezethetnek.

Vizsgálatainkban az volt a cél, hogy a szöveti rezidens sejtek (epitelialis sejtek, dermalis sejtek) közti kemokin vezérelte útvonalakat vizsgáljuk atópiás bőrben, hisz a kemokin szignalizáció számos biológiai folyamatban (pl. migráció, invázió, proliferáció, gén expresszió) fontos szerepet játszik (6, 125).

Először a NHDF sejtek kemokin receptor repertoárját analizáltuk. A kemokin receptorok szisztematikus vizsgálata humán dermális fibroblasztokon igen hiányos. Korábban leírták, hogy diffúz kután szisztémás sclerosisban szenvedő betegek bőrből származó fibroblasztok kifejezett CCR2 expressziót mutattak *in vivo* és *in vitro* vizsgálatokban, mely a betegség kezdeti szakaszában mutatott kifejezett profibrogenikus fenotípusra utalt, ugyanakkor az egészséges bőrből származó sejtek nem expresszálták ezt a receptort. Kimutatták továbbá, hogy a fibroblasztok CCR2-n keresztüli szignálja megnövelte a CCL2 expressziót, melyből egy autokrin profibrogenikus reguláló útvonal jelenlétére következtettek (171).

Vizsgálataink során a CCR3-t, mint legerősebben expresszált receptort identifikáltuk a dermális fibroblasztokon. A további kísérletekben bebizonyítottuk, hogy a fibroblasztok

a CCR3 funkcionálisan aktív formáját *in vitro*, és *in vivo* AD bőrben is expresszálják. Hasonló eredményeket mutattak humán tüdő fibroblasztokon végzett vizsgálatok, ahol a sejtek szintén erős és funkcionálisan aktív CCR3 expressziót mutattak, valamint kifejezett sejtproliferációt és kollagén produkciót detektáltak eotaxin kemokinek hatására a receptoron keresztül (172, 173).

A tanulmányunk eredményei elsőként bizonyították, hogy a CCR3-mediálta útvonalak fontos szerepet játszanak a fibroblasztok aktiválásában és a bőrben történő szöveti átépülésben.

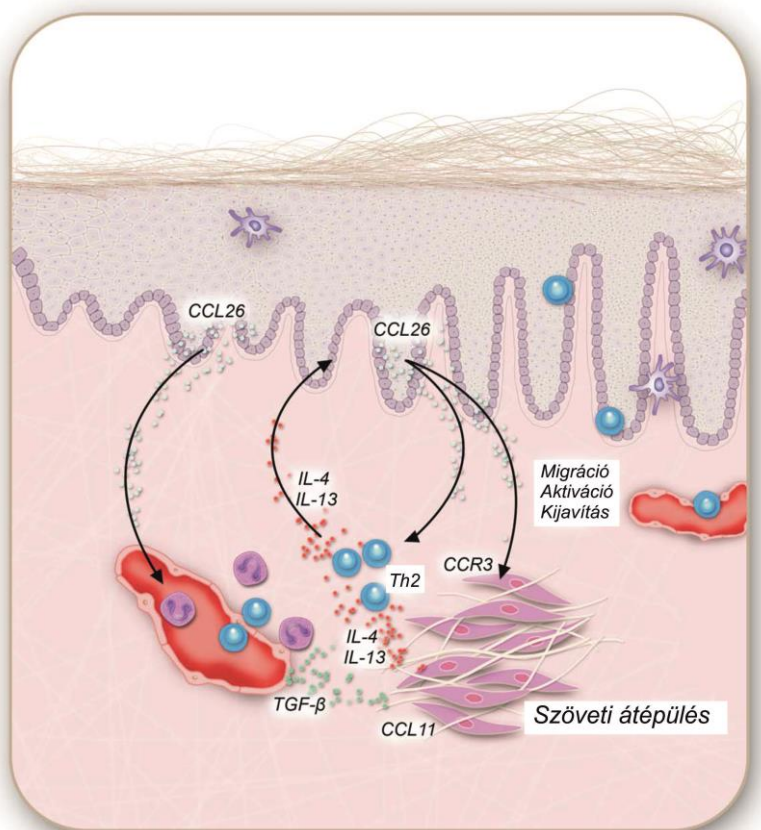
A CCR3 receptorhoz számos ligand kötődhet. Vizsgálatainkban krónikus gyulladásos és autoimmun kórképek esetén elemeztük ezen ligandok expressziós profilját, melyek között a keratinocyta eredetű CCL26 szignifikáns, erőteljes, és szelektív expressziót mutatott AD betegek lézionális bőrmintáiban a psoriasisos betegekhez, vagy az egészségesekhez viszonyítva. Mindezek alapján látható, hogy a CCL26, mint gyulladásos és atópiához szorosan kötött és AD során emelkedett expressziót mutató kemokin fontos szerepet játszik a betegség patogenezisében. Ezt megerősítik a nemzetközi irodalom eredményei is (174, 175).

Tanulmányunkban igazoltuk továbbá, hogy a CCL26 kemokin ligand általi direkt CCR3 stimuláció intracelluláris kalcium mobilizációt okoz NHDF sejtekben, mely erőteljes és szelektív migrációs, inváziós és reparációs aktivációt vált ki, de a sejt proliferációra való hatását nem tudtuk detektálni.

Az AD patogenezisében fontos tényező a szöveti eosinophilia jelenléte is. Ezek a sejtek profibrogenikus szignálokat termelnek, amik a szöveti átépülésben szerepet játszó fibroblasztokat aktiválják. Egy nemzetközi tanulmányban bemutatták, hogy a transzdermálisan bejutó allergének által provokált szöveti eosinophilia során ezen gyulladásos sejtek fibroblaszt aktivációt, myofibroblaszt-szerű sejtek létrejöttét, és emelkedett mátrix protein expressziót indukáltak a bőrben (83). Más leírások szerint a CCR3 útvonal szerepet játszik a szöveti eosinophilia létrejöttében atópiás bőrben, azaz a CCR3 kemokinek a gyulladt bőrterületbe vezetik az eosinophil sejteket, melyek jelenlétükkel serkentik a szöveti remodelációt (176). Ezen túlmenően a CCR3 szignál a Th2 effektor sejteket is a gyulladásos területre hívja (177, 178), amelyekből felszabaduló citokinek (IL-4, IL-13), ahogy azt *in vitro* eredményeinkben ismertettük, a rezidens sejtek által termelt CCL26 fontos regulátorai. Ezek a citokinek emellett, mint

kollagén homeosztázis profibrogenikus szignáljai a szöveti átépülésben is szerepet játszanak (179, 180).

Eredményeink alapján látható, hogy a fehérvérsejtek gyulladással területre történő összegyűjtésében és a szöveti átépülésben szerepet játszó regulátorok gyűjteményében fontos szerep jut a kemokinek által szabályozott kommunikációs útvonalaknak, amik egy speciális profibrogenikus mikrokörnyezetet („niche”) hoznak létre, melyben fontosak a keratinocyták, fibroblasztok, eosinophilek, Th2 lymphocyták (19. ábra). Az atópiához kötött, keratinocyták által termelt CCL26 gyulladással sejteket vonz (Th2 és eosinophil sejtek) a bőrbe. A megjelenő Th2 sejtek a gyulladással területen termelt citokinjeik által a további CCL26 (és CCL11) termelést segítik elő, mely ligandok felerősítik és állandósítják a gyulladással folyamatot az eosinophilek által termelt TGF $\beta$  segítségével az atópiás dermális szöveti átépülés során és ezáltal a szöveti átépülés elősegítéséhez vezetnek. Emellett a CCL26 serkenti a CCR3 receptort expresszáló rezidens fibroblasztok megjelenését és migrációs aktivitását a gyulladással területén.



**19. ábra** Feltételezett CCR3-CCL26 kemokin receptor-ligand interakció atópiás bőrgyulladásban.

## 6. ÖSSZEFOGLALÁS

A vizsgálataink során az immunregulációs zavarokat és a bőr szöveti átépülésének kemokinek által mediált útjait tanulmányoztuk atópiás dermatitisben (AD).

Munkánk eredményei szerint a betegek szérumában az egészségesekhez képest szignifikánsan magasabb százalékban fordult elő a regulatív tulajdonsággal rendelkező CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>CD127<sup>-/low</sup>FOXP3<sup>+</sup> és a bőrbe vándorló CLA<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>FOXP3<sup>+</sup> T sejt populáció. Kimutattuk ezen sejtek számának a betegség súlyosságával való szoros összefüggését, mely a FOXP3<sup>+</sup> nTreg sejtek AD kialakulásában betöltött patogenetikai szerepére utal. Funkcionális tesztekkel bizonyítottuk, hogy az AD betegek perifériás vérében lévő nTreg sejtek primeren megtartották szuppresszor aktivitásukat, de SEB stimulus hatására az egészségesekhez hasonlóan elvesztették szuppresszív képességüket. Kísérleteink alapján látható, hogy az egészségesekkel ellentétben, AD esetén a regulatív sejtek funkciójára a legnagyobb mértékű befolyással a beteget körülvevő mikroökönyezet van.

További kísérleteinkben az AD során kialakuló szöveti átépülést vizsgáltuk. Korábbi feltételezések szerint a gyulladásoos és a rezidens sejtek aktivációja szerepet játszhat az átalakulásokban, de a fontos szabályozó útvonalak nem ismertek. Munkánk során meghatárooztuk az NHDF sejteken a legerősebben expresszált kemokin receptort (CCR3). A receptor *in vitro* és *in vivo* expresszióját és a receptoron keresztül vezérelt útvonalat elemeztünk. A receptor ligandjai között a CCL26 szignifikáns és specifikus túlprodukción mutatott egészségesekhez, vagy egyéb bőrgyulladásokhoz viszonyítva AD-ben. *In vivo* vizsgálataink szerint az epidermális keratinocyták mutatták a legerősebb CCL26 fehérje expressziót AD lézionális bőrben. Strukturális bőr rezidens sejtekben vizsgálva megállapítottuk, hogy a Th2 citokinek (IL-4 és IL-13) okozták a legerősebb CCL26 expressziót. Igazoltuk, hogy dermális fibroblaszokban a CCL26 által mediált CCR3 receptoron keresztüli szignál intracelluláris Ca<sup>2+</sup> mobilizációt eredményezett, és a direkt stimuláció a fibroblaszokon migrációs, inváziós és reparációs aktivációt váltott ki, mint a szöveti remodelling fontos lépései AD bőrben.

Az AD-szel kapcsolatos vizsgálataink eredményei megmutatták, hogy az nTreg sejtek fontos indikátorai a betegség súlyosságának, valamint a CCR3 mediált szignálút vonal hozzájárul a szöveti átépüléshez az atópiás bőrgyulladás során.

## SUMMARY

We investigated the immunoregulatory alterations and the chemokine-mediated communication pathways in cutaneous remodeling during atopic dermatitis (AD).

According to our results the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>CD127<sup>-/low</sup>FOXP3<sup>+</sup> and the skin homing CLA<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>FOXP3<sup>+</sup> T cell populations with regulative characteristics occur in a significantly higher percentage in the sera of AD patients when compared with healthy volunteers. We demonstrated the strong connection between the percentage of these cell populations and the severity of the disease that may indicate an important pathogenic role of these nTregs in AD. Furthermore by functional tests we proved that the nTregs in the peripheral blood of AD patients primarily maintained their suppressor activity, however, when stimulated with SEB, they lost their suppressive ability similar to normal controls. We concluded from our experiments that unlike in healthy people the main distinctive factor in AD is the surrounding environment of the skin due to the nearly continuous presence of SEB.

Next we investigated the cutaneous remodeling during atopic skin inflammation. It was previously postulated that activated inflammatory and resident skin cells may play crucial role in remodeling, however the regulating pathways have not yet been investigated. In our work we characterized the most significantly expressed chemokine receptor on NHDF cells *in vitro* and *in vivo* and then we analyzed the chemokine-mediated communication routes via CCR3 receptor. Among its corresponding ligands CCL26 demonstrated a significant and specific up-regulation in atopic when compared to healthy skin or other skin inflammations. *In vivo*, epidermal keratinocytes showed most abundant CCL26 protein expression in lesional atopic skin. In structural cells of the skin, Th2-cytokines such as IL-4 and IL-13 were dominant inducers of CCL26 expression. We proved that in dermal fibroblasts, CCL26 induced CCR3 signaling resulting in intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization, as well as enhanced fibroblast migration, invasion and repair capacity that are inevitable processes in the remodeling during atopic skin inflammation.

Our investigations in AD clarified that the nTregs are important indicators of the severity of the disease and proved that the participation of CCR3-mediated pathways in tissue remodeling during atopic skin inflammation is crucial.

## 7. IRODALOMJEGYZÉK

### 7.1. Hivatkozott közlemények jegyzéke

1. Bieber T. Atopic dermatitis. *Ann Dermatol* 2010;22(2):125-37.
2. Johansson SG, Bieber T, Dahl R, Friedmann PS, Lanier BQ, Lockey RF, et al. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113(5):832-6.
3. Darlenski R, Kazandjieva J, Hristakieva E, Fluhr JW. Atopic dermatitis as a systemic disease. *Clin Dermatol* 2014;32(3):409-13.
4. Hogan MB, Peele K, Wilson NW. Skin barrier function and its importance at the start of the atopic march. *J Allergy (Cairo)* 2012;2012:901940.
5. Novak N. Allergen specific immunotherapy for atopic dermatitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007;7(6):542-46.
6. Homey B, Steinhoff M, Ruzicka T, Leung DY. Cytokines and chemokines orchestrate atopic skin inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118(1):178-89.
7. Boguniewicz M, Leung DY. Atopic dermatitis: a disease of altered skin barrier and immune dysregulation. *Immunol Rev* 2011;242(1):233-46.
8. Rupec RA, Boneberger S, Ruzicka T. What is really in control of skin immunity: lymphocytes, dendritic cells, or keratinocytes? facts and controversies. *Clin Dermatol* 2010;28(1):62-6.
9. Eyerich K, Novak N. Immunology of atopic eczema: overcoming the Th1/Th2 paradigm. *Allergy* 2013;68(8):974-82.
10. Williams H, Stewart A, von Mutius E, Cookson W, Anderson HR. Is eczema really on the increase worldwide? *J Allergy Clin Immunol* 2008;121(4):947-54 e15.
11. Williams H, Robertson C, Stewart A, Ait-Khaled N, Anabwani G, Anderson R, et al. Worldwide variations in the prevalence of symptoms of atopic eczema in the International Study of Asthma and Allergies in Childhood. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103(1 Pt 1):125-38.
12. Odhiambo JA, Williams HC, Clayton TO, Robertson CF, Asher MI. Global variations in prevalence of eczema symptoms in children from ISAAC Phase Three. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124(6):1251-8 e23.
13. Shaw TE, Currie GP, Koudelka CW, Simpson EL. Eczema prevalence in the United States: data from the 2003 National Survey of Children's Health. *J Invest Dermatol* 2011;131(1):67-73.
14. Kuhnyar A, Egyud K, Szabo I, Hunyadi J, Kosa L. Prevalence of atopic dermatitis among children under 19 in an East-Hungarian agricultural county. *Clin Dev Immunol* 2006;13(2-4):395-9.
15. Plotz SG, Ring J. What's new in atopic eczema? *Expert Opin Emerg Drugs* 2010;15(2):249-67.
16. Bieber T. Many ways lead to Rome: a glance at the multiple immunological pathways underlying atopic dermatitis. *Allergy* 2014;68(8):957-8.
17. Ring J, Mohrenschlager M, Weidinger S. Molecular genetics of atopic eczema. *Chem Immunol Allergy* 2012;96:24-9.
18. Barnes KC. An update on the genetics of atopic dermatitis: scratching the surface in 2009. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125(1):16-29 e1-11; quiz 30-1.

19. Kyriiotou M, Huber M, Hohl D. The human epidermal differentiation complex: cornified envelope precursors, S100 proteins and the 'fused genes' family. *Exp Dermatol* 2012;21(9):643-9.
20. Gao PS, Rafaels NM, Mu D, Hand T, Murray T, Boguniewicz M, et al. Genetic variants in thymic stromal lymphopoietin are associated with atopic dermatitis and eczema herpeticum. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125(6):1403-1407 e4.
21. Niessen CM. Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol* 2007;127(11):2525-32.
22. Levin J, Friedlander SF, Del Rosso JQ. Atopic dermatitis and the stratum corneum: part 2: other structural and functional characteristics of the stratum corneum barrier in atopic skin. *J Clin Aesthet Dermatol* 2013;6(11):49-54.
23. Kawasaki H, Kubo A, Sasaki T, Amagai M. Loss-of-function mutations within the filaggrin gene and atopic dermatitis. *Curr Probl Dermatol* 2011;41:35-46.
24. Palmer CN, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Zhao Y, Liao H, Lee SP, et al. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet* 2006;38(4):441-6.
25. Irvine AD, McLean WH, Leung DY. Filaggrin mutations associated with skin and allergic diseases. *N Engl J Med* 2011;365(14):1315-27.
26. Maintz L, Novak N. Modifications of the innate immune system in atopic dermatitis. *J Innate Immun* 2011;3(2):131-41.
27. Brown SJ, Sandilands A, Zhao Y, Liao H, Relton CL, Meggitt SJ, et al. Prevalent and low-frequency null mutations in the filaggrin gene are associated with early-onset and persistent atopic eczema. *J Invest Dermatol* 2008;128(6):1591-4.
28. Weidinger S, Illig T, Baurecht H, Irvine AD, Rodriguez E, Diaz-Lacava A, et al. Loss-of-function variations within the filaggrin gene predispose for atopic dermatitis with allergic sensitizations. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118(1):214-9.
29. Mocsai G, Gaspar K, Nagy G, Irinyi B, Kapitany A, Biro T, et al. Severe skin inflammation and filaggrin mutation similarly alter the skin barrier in patients with atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 2014;170(3):617-24.
30. De Benedetto A, Rafaels NM, McGirt LY, Ivanov AI, Georas SN, Cheadle C, et al. Tight junction defects in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127(3):773-86 e1-7.
31. De Benedetto A, Slifka MK, Rafaels NM, Kuo IH, Georas SN, Boguniewicz M, et al. Reductions in claudin-1 may enhance susceptibility to herpes simplex virus 1 infections in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2011;128(1):242-246 e5.
32. Novak N, Leung DY. Advances in atopic dermatitis. *Curr Opin Immunol* 2011;23(6):778-83.
33. Lin YT, Wang CT, Chiang BL. Role of bacterial pathogens in atopic dermatitis. *Clin Rev Allergy Immunol* 2007;33(3):167-77.
34. Ong PY, Leung DY. The infectious aspects of atopic dermatitis. *Immunol Allergy Clin North Am* 2010;30(3):309-21.
35. Fonacier LS, Dreskin SC, Leung DY. Allergic skin diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125(2 Suppl 2):S138-49.
36. Cork MJ, Danby SG, Vasilopoulos Y, Hadgraft J, Lane ME, Moustafa M, et al. Epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 2009;129(8):1892-908.
37. Ong PY. Is/are pattern recognition receptor(s) for *Staphylococcus aureus* defective in atopic dermatitis? *Dermatology* 2006;212(1):19-22.

38. Travers JB. Toxic interaction between Th2 cytokines and *Staphylococcus aureus* in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 2014;134(8):2069-71.
39. Wolf R, Wolf D. Abnormal epidermal barrier in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Clin Dermatol* 2012;30(3):329-34.
40. Levin J, Friedlander SF, Del Rosso JQ. Atopic dermatitis and the stratum corneum: part 1: the role of filaggrin in the stratum corneum barrier and atopic skin. *J Clin Aesthet Dermatol* 2013;6(10):16-22.
41. Alomar A. Can microbial superantigens influence atopic dermatitis flares? *Chem Immunol Allergy* 2012;96:73-6.
42. Novak N. New insights into the mechanism and management of allergic diseases: atopic dermatitis. *Allergy* 2009;64(2):265-75.
43. Darsow U, Laifaoui J, Kerschenlohr K, Wollenberg A, Przybilla B, Wuthrich B, et al. The prevalence of positive reactions in the atopy patch test with aeroallergens and food allergens in subjects with atopic eczema: a European multicenter study. *Allergy* 2004;59(12):1318-25.
44. Paragh L, Nagy L, Janka E, Gáspár K, Remenyik E, Szegedi A, et al. Az atopy patch teszt szerepe az atópiás dermatitis diagnózisában. *Bőrgyógy Venereol Szemle* 2014;90:81-8.
45. Bieber T. Atopic dermatitis. *N Engl J Med* 2008;358(14):1483-94.
46. Brauweiler AM, Bin L, Kim BE, Oyoshi MK, Geha RS, Goleva E, et al. Filaggrin-dependent secretion of sphingomyelinase protects against staphylococcal alpha-toxin-induced keratinocyte death. *J Allergy Clin Immunol* 2013;131(2):421-7 e1-2.
47. Brauweiler AM, Goleva E, Leung DY. Th2 cytokines increase *Staphylococcus aureus* alpha toxin-induced keratinocyte death through the signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6). *J Invest Dermatol* 2014;134(8):2114-21.
48. Nakamura Y, Oscherwitz J, Cease KB, Chan SM, Munoz-Planillo R, Hasegawa M, et al. *Staphylococcus delta*-toxin induces allergic skin disease by activating mast cells. *Nature* 2013;503(7476):397-401.
49. Leung DY, Harbeck R, Bina P, Reiser RF, Yang E, Norris DA, et al. Presence of IgE antibodies to staphylococcal exotoxins on the skin of patients with atopic dermatitis. Evidence for a new group of allergens. *J Clin Invest* 1993;92(3):1374-80.
50. Giai C, Gonzalez C, Ledo C, Garofalo A, Di Genaro MS, Sordelli DO, et al. Shedding of tumor necrosis factor receptor 1 induced by protein A decreases tumor necrosis factor alpha availability and inflammation during systemic *Staphylococcus aureus* infection. *Infect Immun* 2013;81(11):4200-7.
51. Travers JB, Kozman A, Mousdicas N, Saha C, Landis M, Al-Hassani M, et al. Infected atopic dermatitis lesions contain pharmacologic amounts of lipoteichoic acid. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125(1):146-52 e1-2.
52. Fuiano N, Incorvaia C. Dissecting the causes of atopic dermatitis in children: less foods, more mites. *Allergol Int* 2012;61(2):231-43.
53. Bessot JC, Pauli G. [House dust mites allergens]. *Rev Mal Respir* 2011;28(4):475-95.
54. Bessot JC, Pauli G. [House dust mites and their allergens]. *Rev Mal Respir* 2011;28(2):227-39.
55. Nakamura T, Hirasawa Y, Takai T, Mitsuishi K, Okuda M, Kato T, et al. Reduction of skin barrier function by proteolytic activity of a recombinant house dust mite major allergen Der f 1. *J Invest Dermatol* 2006;126(12):2719-23.

56. Kato T, Takai T, Fujimura T, Matsuoka H, Ogawa T, Murayama K, et al. Mite serine protease activates protease-activated receptor-2 and induces cytokine release in human keratinocytes. *Allergy* 2009;64(9):1366-74.
57. Werfel T. The role of leukocytes, keratinocytes, and allergen-specific IgE in the development of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 2009;129(8):1878-91.
58. Takai T, Ikeda S. Barrier dysfunction caused by environmental proteases in the pathogenesis of allergic diseases. *Allergol Int* 2011;60(1):25-35.
59. Steinhoff M, Neisius U, Ikoma A, Fartasch M, Heyer G, Skov PS, et al. Proteinase-activated receptor-2 mediates itch: a novel pathway for pruritus in human skin. *J Neurosci* 2003;23(15):6176-80.
60. Schafer T, Heinrich J, Wjst M, Adam H, Ring J, Wichmann HE. Association between severity of atopic eczema and degree of sensitization to aeroallergens in schoolchildren. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104(6):1280-4.
61. Ring J, Darsow U, Gfesser M, Vieluf D. The 'atopy patch test' in evaluating the role of aeroallergens in atopic eczema. *Int Arch Allergy Immunol* 1997;113(1-3):379-83.
62. Behrendt H, Ring J. Climate change, environment and allergy. *Chem Immunol Allergy* 2012;96:7-14.
63. Ring J. Allergy and modern society: does 'Western life style' promote the development of allergies? *Int Arch Allergy Immunol* 1997;113(1-3):7-10.
64. Fitter AH, Fitter RS. Rapid changes in flowering time in British plants. *Science* 2002;296(5573):1689-91.
65. Thomsen SF. Atopic dermatitis: natural history, diagnosis, and treatment. *ISRN Allergy* 2014;2014:354250.
66. Grewe M, Walther S, Gyufko K, Czech W, Schopf E, Krutmann J. Analysis of the cytokine pattern expressed in situ in inhalant allergen patch test reactions of atopic dermatitis patients. *J Invest Dermatol* 1995;105(3):407-10.
67. Proksch E, Brandner JM, Jensen JM. The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol* 2008;17(12):1063-72.
68. Jungersted JM, Scheer H, Mempel M, Baurecht H, Cifuentes L, Hogh JK, et al. Stratum corneum lipids, skin barrier function and filaggrin mutations in patients with atopic eczema. *Allergy* 2010;65(7):911-8.
69. Mócsai G, Dajnoki Z, Irinyi B, Gáspár K, Szegedi A. A bőr barrierkárosodások non-invazív mérési lehetőségei. *Bőrgyógy Venereol Szemle* 2014;90:89-93.
70. O'Regan GM, Sandilands A, McLean WH, Irvine AD. Filaggrin in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2008;122(4):689-93.
71. Novak N, Simon D. Atopic dermatitis - from new pathophysiologic insights to individualized therapy. *Allergy* 2011;66(7):830-9.
72. Kim BE, Leung DY. Epidermal barrier in atopic dermatitis. *Allergy Asthma Immunol Res* 2012;4(1):12-6.
73. Kezic S, Kemperman PM, Koster ES, de Jongh CM, Thio HB, Campbell LE, et al. Loss-of-function mutations in the filaggrin gene lead to reduced level of natural moisturizing factor in the stratum corneum. *J Invest Dermatol* 2008;128(8):2117-9.
74. Maintz L, Novak N. Getting more and more complex: the pathophysiology of atopic eczema. *Eur J Dermatol* 2007;17(4):267-83.
75. Mócsai G, Markó L, Remenyik E, Szegedi A. A bőr barrier felépítése, különös tekintettel a keratinocytákra és a sejtközötti kapcsolatokra - Az atópiás dermatitis kialakulásában játszott szerepük. *Bőrgyógy Venereol Szemle* 2012;88:72-6.

76. Levin J, Fallon Friedlander S, Del Rosso JQ. Atopic dermatitis and the stratum corneum: part 3: the immune system in atopic dermatitis. *J Clin Aesthet Dermatol* 2013;6(12):37-44.
77. Kubo A, Nagao K, Amagai M. Epidermal barrier dysfunction and cutaneous sensitization in atopic diseases. *J Clin Invest* 2012;122(2):440-7.
78. Takai T. TSLP expression: cellular sources, triggers, and regulatory mechanisms. *Allergol Int* 2012;61(1):3-17.
79. Markó L, Mócsai G, Szegedi A, Remenyik E. Lipidek szerepe az epidermális barrier kialakulásában. *Bőrgyógy Venereol Szemle* 2012;88:103-9.
80. Ijaz T, Pazdrak K, Kalita M, König R, Choudhary S, Tian B, et al. Systems biology approaches to understanding Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) in mucosal remodeling and signaling in asthma. *World Allergy Organ J* 2014;7(1):13.
81. Toda M, Leung DY, Molet S, Boguniewicz M, Taha R, Christodoulopoulos P, et al. Polarized in vivo expression of IL-11 and IL-17 between acute and chronic skin lesions. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111(4):875-81.
82. Katoh N, Hirano S, Suehiro M, Ikenaga K, Yasuno H. Increased levels of serum tissue inhibitor of metalloproteinase-1 but not metalloproteinase-3 in atopic dermatitis. *Clin Exp Immunol* 2002;127(2):283-8.
83. Phipps S, Ying S, Wangoo A, Ong YE, Levi-Schaffer F, Kay AB. The relationship between allergen-induced tissue eosinophilia and markers of repair and remodeling in human atopic skin. *J Immunol* 2002;169(8):4604-12.
84. Leung DY, Bieber T. Atopic dermatitis. *Lancet* 2003;361(9352):151-60.
85. Leung DY. Immunopathology of atopic dermatitis. *Springer Semin Immunopathol* 1992;13(3-4):427-40.
86. Laberge S, Ghaffar O, Boguniewicz M, Center DM, Leung DY, Hamid Q. Association of increased CD4+ T-cell infiltration with increased IL-16 gene expression in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102(4 Pt 1):645-50.
87. Gittler JK, Krueger JG, Guttman-Yassky E. Atopic dermatitis results in intrinsic barrier and immune abnormalities: implications for contact dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2012;131(2):300-13.
88. Nagy G, Gaspar K, Irinyi B, Gal M, Tumpek J, Gyimesi E, et al. Association between serum IL-16 levels and the degree of sensitization in patients with atopic dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol* 2011;156(1):69-74.
89. Nakajima S, Kitoh A, Egawa G, Natsuaki Y, Nakamizo S, Moniaga CS, et al. IL-17A as an inducer for Th2 immune responses in murine atopic dermatitis models. *J Invest Dermatol* 2014;134(8):2122-30.
90. Harskamp CT, Armstrong AW. Immunology of atopic dermatitis: novel insights into mechanisms and immunomodulatory therapies. *Semin Cutan Med Surg* 2013;32(3):132-9.
91. Akdis M, Blaser K, Akdis CA. T regulatory cells in allergy: novel concepts in the pathogenesis, prevention, and treatment of allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116(5):961-8; quiz 969.
92. Romagnani S. The increased prevalence of allergy and the hygiene hypothesis: missing immune deviation, reduced immune suppression, or both? *Immunology* 2004;112(3):352-63.
93. Palomares O, Yaman G, Azkur AK, Akkoc T, Akdis M, Akdis CA. Role of Treg in immune regulation of allergic diseases. *Eur J Immunol* 2010;40(5):1232-40.

94. Bieber T, Novak N, Herrmann N, Koch S. Role of dendritic cells in atopic dermatitis: an update. *Clin Rev Allergy Immunol* 2011;41(3):254-8.
95. Novak N, Bieber T. FcepsilonRI-Toll-like receptor interaction in atopic dermatitis. *Curr Probl Dermatol* 2011;41:47-53.
96. Nagy G, Doan-Xuan QM, Gaspar K, Mocsai G, Kapitany A, Torocsik D, et al. The atopic skin-like microenvironment modulates the T-cell-polarising cytokine production of myeloid dendritic cells, as determined by laser scanning cytometry. *Exp Dermatol* 2014;23(4):276-8.
97. Novak N, Koch S, Allam JP, Bieber T. Dendritic cells: bridging innate and adaptive immunity in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125(1):50-9.
98. Novak N. An update on the role of human dendritic cells in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2012;129(4):879-86.
99. Deleuran M, Hvid M, Kemp K, Christensen GB, Deleuran B, Vestergaard C. IL-25 induces both inflammation and skin barrier dysfunction in atopic dermatitis. *Chem Immunol Allergy* 2012;96:45-9.
100. McCaughy TM, Hogquist KA. Central tolerance: what have we learned from mice? *Semin Immunopathol* 2008;30(4):399-409.
101. Buzás E. Immuntolerancia. In: Falus A, Buzás E, Rajnavölgyi É (szerk.): *Az immunológia alapjai* 169-172. Semmelweis Kiadó, Budapest, 2007.
102. Loser K, Beissert S. Regulatory T cells: banned cells for decades. *J Invest Dermatol* 2012;132(3 Pt 2):864-71.
103. Romagnani S. Regulatory T cells: which role in the pathogenesis and treatment of allergic disorders? *Allergy* 2006;61(1):3-14.
104. Honda T, Miyachi Y, Kabashima K. Regulatory T cells in cutaneous immune responses. *J Dermatol Sci* 2011;63(2):75-82.
105. Samochocki Z, Alifier M, Boder P, Jeziorkowska R, Rosiak E, Jurkiewicz B, et al. T-regulatory cells in severe atopic dermatitis: alterations related to cytokines and other lymphocyte subpopulations. *Arch Dermatol Res* 2012;304(10):795-801.
106. Lin W, Truong N, Grossman WJ, Haribhai D, Williams CB, Wang J, et al. Allergic dysregulation and hyperimmunoglobulinemia E in Foxp3 mutant mice. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116(5):1106-15.
107. Smigiel KS, Srivastava S, Stolley JM, Campbell DJ. Regulatory T-cell homeostasis: steady-state maintenance and modulation during inflammation. *Immunol Rev* 2014;259(1):40-59.
108. Shevach EM. From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity* 2006;25(2):195-201.
109. Hori S. Lineage stability and phenotypic plasticity of Foxp3(+) regulatory T cells. *Immunol Rev* 2014;259(1):159-72.
110. Agrawal R, Wisniewski JA, Woodfolk JA. The role of regulatory T cells in atopic dermatitis. *Curr Probl Dermatol* 2011;41:112-24.
111. Wan YY, Flavell RA. Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. *Nature* 2007;445(7129):766-70.
112. Caton AJ, Weissler KA. Regulatory cells in health and disease. *Immunol Rev* 2014;259(1):5-10.
113. Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 2008;8(7):523-32.

114. Wildin RS, Smyk-Pearson S, Filipovich AH. Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. *J Med Genet* 2002;39(8):537-45.
115. Shreffler WG, Wanich N, Moloney M, Nowak-Wegrzyn A, Sampson HA. Association of allergen-specific regulatory T cells with the onset of clinical tolerance to milk protein. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123(1):43-52 e7.
116. Szegedi A, Barath S, Nagy G, Szodoray P, Gal M, Sipka S, et al. Regulatory T cells in atopic dermatitis: epidermal dendritic cell clusters may contribute to their local expansion. *Br J Dermatol* 2009;160(5):984-93.
117. Ou LS, Goleva E, Hall C, Leung DY. T regulatory cells in atopic dermatitis and subversion of their activity by superantigens. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113(4):756-63.
118. Reefer AJ, Satinover SM, Solga MD, Lannigan JA, Nguyen JT, Wilson BB, et al. Analysis of CD25hiCD4+ "regulatory" T-cell subtypes in atopic dermatitis reveals a novel T(H)2-like population. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121(2):415-422 e3.
119. Lin YT, Wang CT, Chao PS, Lee JH, Wang LC, Yu HH, et al. Skin-homing CD4+ Foxp3+ T cells exert Th2-like function after staphylococcal superantigen stimulation in atopic dermatitis patients. *Clin Exp Allergy* 2011;41(4):516-25.
120. Schitteck B. The antimicrobial skin barrier in patients with atopic dermatitis. *Curr Probl Dermatol* 2011;41:54-67.
121. Sumegi A, Szegedi A, Gal M, Hunyadi J, Szegedi G, Antal-Szalmas P. Analysis of components of the CD14/TLR system on leukocytes of patients with atopic dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol* 2007;143(3):177-84.
122. Ahmad-Nejad P, Mrabet-Dahbi S, Breuer K, Klotz M, Werfel T, Herz U, et al. The toll-like receptor 2 R753Q polymorphism defines a subgroup of patients with atopic dermatitis having severe phenotype. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113(3):565-7.
123. Ong PY, Ohtake T, Brandt C, Strickland I, Boguniewicz M, Ganz T, et al. Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N Engl J Med* 2002;347(15):1151-60.
124. Luther SA, Bidgol A, Hargreaves DC, Schmidt A, Xu Y, Paniyadi J, et al. Differing activities of homeostatic chemokines CCL19, CCL21, and CXCL12 in lymphocyte and dendritic cell recruitment and lymphoid neogenesis. *J Immunol* 2002;169(1):424-33.
125. Homey B, Bunemann E. Chemokines and inflammatory skin diseases. *Ernst Schering Res Found Workshop* 2004(45):69-83.
126. Homey B, Alenius H, Muller A, Soto H, Bowman EP, Yuan W, et al. CCL27-CCR10 interactions regulate T cell-mediated skin inflammation. *Nat Med* 2002;8(2):157-65.
127. Pivarsci A, Gombert M, Dieu-Nosjean MC, Lauerma A, Kubitza R, Meller S, et al. CC chemokine ligand 18, an atopic dermatitis-associated and dendritic cell-derived chemokine, is regulated by staphylococcal products and allergen exposure. *J Immunol* 2004;173(9):5810-7.
128. Gombert M, Dieu-Nosjean MC, Winterberg F, Bunemann E, Kubitza RC, Da Cunha L, et al. CCL1-CCR8 interactions: an axis mediating the recruitment of T cells and Langerhans-type dendritic cells to sites of atopic skin inflammation. *J Immunol* 2005;174(8):5082-91.

129. Homey B, Meller S, Savinko T, Alenius H, Lauerma A. Modulation of chemokines by staphylococcal superantigen in atopic dermatitis. *Chem Immunol Allergy* 2007;93:181-94.
130. Yamanaka K, Mizutani H. The role of cytokines/chemokines in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Curr Probl Dermatol* 2011;41:80-92.
131. Gros E, Bussmann C, Bieber T, Forster I, Novak N. Expression of chemokines and chemokine receptors in lesional and nonlesional upper skin of patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124(4):753-60 e1.
132. Eichenfield LF, Tom WL, Berger TG, Krol A, Paller AS, Schwarzenberger K, et al. Guidelines of care for the management of atopic dermatitis: Section 2. Management and treatment of atopic dermatitis with topical therapies. *J Am Acad Dermatol* 2014;71(1):116-32.
133. Pónyai G, Temesvári E, Kárpáti S. Atópiás dermatitis felnőttkorban: epidemiológia, klinikai jellemzők, provokáló és prognosztikai faktorok. *Orv Hetil* 2007;148:21-6.
134. Hanifin JM. Diagnostic criteria for atopic dermatitis: consider the context. *Arch Dermatol* 1999;135(12):1551.
135. Rudzki E, Samochocki Z, Rebandel P, Saciuk E, Galecki W, Raczka A, et al. Frequency and significance of the major and minor features of Hanifin and Rajka among patients with atopic dermatitis. *Dermatology* 1994;189(1):41-6.
136. Williams HC, Burney PG, Pembroke AC, Hay RJ. Validation of the U.K. diagnostic criteria for atopic dermatitis in a population setting. U.K. Diagnostic Criteria for Atopic Dermatitis Working Party. *Br J Dermatol* 1996;135(1):12-7.
137. Eichenfield LF, Tom WL, Chamlin SL, Feldman SR, Hanifin JM, Simpson EL, et al. Guidelines of care for the management of atopic dermatitis: section 1. Diagnosis and assessment of atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 2014;70(2):338-51.
138. Pónyai G, Máté B, Németh I, Kárpáti S, Temesvári E. Az inhalatív atopy patch teszt szerepe az atópiás dermatitis diagnózisában. *Bőrgyógy Venereol Szemle* 2011;87:84-90.
139. Paller AS. Latest approaches to treating atopic dermatitis. *Chem Immunol Allergy* 2012;96:132-40.
140. Baron SE, Cohen SN, Archer CB. Guidance on the diagnosis and clinical management of atopic eczema. *Clin Exp Dermatol* 2012;37 Suppl 1:7-12.
141. Ring J, Alomar A, Bieber T, Deleuran M, Fink-Wagner A, Gelmetti C, et al. Guidelines for treatment of atopic eczema (atopic dermatitis) part I. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2012;26(8):1045-60.
142. Ring J, Alomar A, Bieber T, Deleuran M, Fink-Wagner A, Gelmetti C, et al. Guidelines for treatment of atopic eczema (atopic dermatitis) Part II. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2012;26(9):1176-93.
143. Darsow U, Wollenberg A, Simon D, Taieb A, Werfel T, Oranje A, et al. ETFAD/EADV eczema task force 2009 position paper on diagnosis and treatment of atopic dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2010;24(3):317-28.
144. BuBmann C, Bieber T, Novak N. Systemic therapeutic options for severe atopic dermatitis. *J Dtsch Dermatol Ges* 2009;7(3):205-19.
145. Schneider L, Tilles S, Lio P, Boguniewicz M, Beck L, LeBovidge J, et al. Atopic dermatitis: a practice parameter update 2012. *J Allergy Clin Immunol* 2013;131(2):295-9 e1-27.

146. Chase EP, Armstrong AW. Advances in management of atopic dermatitis: new therapies and novel uses of existing treatments. *Semin Cutan Med Surg* 2012;31(1):17-24.
147. Sidbury R, Davis DM, Cohen DE, Cordoro KM, Berger TG, Bergman JN, et al. Guidelines of care for the management of atopic dermatitis: Section 3. Management and treatment with phototherapy and systemic agents. *J Am Acad Dermatol* 2014.
148. Wollenberg A, Bieber T. Proactive therapy of atopic dermatitis--an emerging concept. *Allergy* 2009;64(2):276-8.
149. Wollenberg A, Reitamo S, Girolomoni G, Lahfa M, Ruzicka T, Healy E, et al. Proactive treatment of atopic dermatitis in adults with 0.1% tacrolimus ointment. *Allergy* 2008;63(7):742-50.
150. Hanifin J, Gupta AK, Rajagopalan R. Intermittent dosing of fluticasone propionate cream for reducing the risk of relapse in atopic dermatitis patients. *Br J Dermatol* 2002;147(3):528-37.
151. Simon D, Bieber T. Systemic therapy for atopic dermatitis. *Allergy* 2014;69(1):46-55.
152. Simon D. Systemic therapy of atopic dermatitis in children and adults. *Curr Probl Dermatol* 2011;41:156-64.
153. Roekevisch E, Spuls PI, Kuester D, Limpens J, Schmitt J. Efficacy and safety of systemic treatments for moderate-to-severe atopic dermatitis: a systematic review. *J Allergy Clin Immunol*;133(2):429-38.
154. Schakel K, Dobel T, Bosselmann I. Future treatment options for atopic dermatitis - small molecules and beyond. *J Dermatol Sci* 2014;73(2):91-100.
155. Grimbacher B, Schaffer AA, Holland SM, Davis J, Gallin JI, Malech HL, et al. Genetic linkage of hyper-IgE syndrome to chromosome 4. *Am J Hum Genet* 1999;65(3):735-44.
156. Beissert S, Schwarz A, Schwarz T. Regulatory T cells. *J Invest Dermatol* 2006;126(1):15-24.
157. Bluestone JA. Mechanisms of tolerance. *Immunol Rev* 2011;241(1):5-19.
158. Ling EM, Smith T, Nguyen XD, Pridgeon C, Dallman M, Arbery J, et al. Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet* 2004;363(9409):608-15.
159. Verhagen J, Akdis M, Traidl-Hoffmann C, Schmid-Grendelmeier P, Hijnen D, Knol EF, et al. Absence of T-regulatory cell expression and function in atopic dermatitis skin. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117(1):176-83.
160. Karlsson MR, Rugtveit J, Brandtzaeg P. Allergen-responsive CD4+CD25+ regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy. *J Exp Med* 2004;199(12):1679-88.
161. Lesiak A, Smolewski P, Sobolewska-Sztychny D, Sysa-Jedrzejowska A, Narbutt J. The role of T-regulatory cells and Toll-like receptors 2 and 4 in atopic dermatitis. *Scand J Immunol* 2012;76(4):405-10.
162. Stelmaszczyk-Emmel A, Zawadzka-Krajewska A, Szypowska A, Kulus M, Demkow U. Frequency and activation of CD4+CD25 FoxP3+ regulatory T cells in peripheral blood from children with atopic allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 2013;162(1):16-24.

163. Ito Y, Adachi Y, Makino T, Higashiyama H, Fuchizawa T, Shimizu T, et al. Expansion of FOXP3-positive CD4+CD25+ T cells associated with disease activity in atopic dermatitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2009;103(2):160-5.
164. Hirahara K, Liu L, Clark RA, Yamanaka K, Fuhlbrigge RC, Kupper TS. The majority of human peripheral blood CD4+CD25highFoxp3+ regulatory T cells bear functional skin-homing receptors. *J Immunol* 2006;177(7):4488-94.
165. Vukmanovic-Stejic M, McQuaid A, Birch KE, Reed JR, Macgregor C, Rustin MH, et al. Relative impact of CD4+CD25+ regulatory T cells and tacrolimus on inhibition of T-cell proliferation in patients with atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 2005;153(4):750-7.
166. Cardona ID, Goleva E, Ou LS, Leung DY. Staphylococcal enterotoxin B inhibits regulatory T cells by inducing glucocorticoid-induced TNF receptor-related protein ligand on monocytes. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117(3):688-95.
167. Carmi-Levy I, Homey B, Soumelis V. A modular view of cytokine networks in atopic dermatitis. *Clin Rev Allergy Immunol* 2011;41(3):245-53.
168. Pillai V, Karandikar NJ. Human regulatory T cells: a unique, stable thymic subset or a reversible peripheral state of differentiation? *Immunol Lett* 2007;114(1):9-15.
169. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008;133(5):775-87.
170. Trojanowska M, LeRoy EC, Eckes B, Krieg T. Pathogenesis of fibrosis: type 1 collagen and the skin. *J Mol Med (Berl)* 1998;76(3-4):266-74.
171. Carulli MT, Ong VH, Ponticos M, Shiwen X, Abraham DJ, Black CM, et al. Chemokine receptor CCR2 expression by systemic sclerosis fibroblasts: evidence for autocrine regulation of myofibroblast differentiation. *Arthritis Rheum* 2005;52(12):3772-82.
172. Puxeddu I, Bader R, Piliponsky AM, Reich R, Levi-Schaffer F, Berkman N. The CC chemokine eotaxin/CCL11 has a selective profibrogenic effect on human lung fibroblasts. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117(1):103-10.
173. Kohan M, Puxeddu I, Reich R, Levi-Schaffer F, Berkman N. Eotaxin-2/CCL24 and eotaxin-3/CCL26 exert differential profibrogenic effects on human lung fibroblasts. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2010;104(1):66-72.
174. Owczarek W, Paplinska M, Targowski T, Jahnz-Rozyk K, Paluchowska E, Kucharczyk A, et al. Analysis of eotaxin 1/CCL11, eotaxin 2/CCL24 and eotaxin 3/CCL26 expression in lesional and non-lesional skin of patients with atopic dermatitis. *Cytokine* 2010;50(2):181-5.
175. Kagami S, Kakinuma T, Saeki H, Tsunemi Y, Fujita H, Nakamura K, et al. Significant elevation of serum levels of eotaxin-3/CCL26, but not of eotaxin-2/CCL24, in patients with atopic dermatitis: serum eotaxin-3/CCL26 levels reflect the disease activity of atopic dermatitis. *Clin Exp Immunol* 2003;134(2):309-13.
176. Yawalkar N, Uguccioni M, Scharer J, Braunwalder J, Karlen S, Dewald B, et al. Enhanced expression of eotaxin and CCR3 in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 1999;113(1):43-8.
177. Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A. Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. *Science* 1997;277(5334):2005-7.
178. Wang CR, Chen PC, Liu MF. Increased circulating CCR3+ type 2 helper T cells in house dust mite-sensitive Chinese patients with allergic diseases. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2003;21(4):205-10.

179. Oriente A, Fedarko NS, Pacocha SE, Huang SK, Lichtenstein LM, Essayan DM. Interleukin-13 modulates collagen homeostasis in human skin and keloid fibroblasts. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;292(3):988-94.
180. Matsushita M, Yamamoto T, Nishioka K. Upregulation of interleukin-13 and its receptor in a murine model of bleomycin-induced scleroderma. *Int Arch Allergy Immunol* 2004;135(4):348-56.

## 7.2. Saját közlemények jegyzéke



DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



Nyilvántartási szám: DEENK/36/2015.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Gáspár Krisztián  
Neptun kód: Z23VEW  
Doktori Iskola: Petrányi Gyula Klinikai Immunbiológiai és Allergológiai Doktori Iskola  
MTMT azonosító: 10043775

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Gáspár, K.**, Baráth, S., Nagy, G., Mócsai, G., Gyimesi, E., Szodoray, P., Irinyi, B., Zeher, M., Remenyik, É., Szegedi, A.: Regulatory T-cell Subsets in Atopic Dermatitis: Important Indicators of Disease Severity with Acquired Functional Impairment. *Acta Derm. Venereol.* 95 (2), 151-155, 2015.  
IF:4.244 (2013)
2. **Gáspár, K.**, Kukova, G., Bunemann, E., Buhren, B.A., Sonkoly, E., Szöllösi, A.G., Müller, A., Savinko, T., Lauerma, A.I., Alenius, H., Kemény, L., Dieu-Nosjean, M., Stander, S., Fischer, J.W., Ruzicka, T., Zlotnik, A., Szegedi, A., Homey, B.: The chemokine receptor CCR3 participates in tissue remodeling during atopic skin inflammation. *J. Dermatol. Sci.* 71, 12-21, 2013.  
IF:3.335



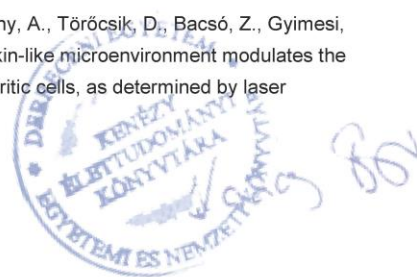
Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. □ Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 39. □ Tel.: (52) 410-443  
E-mail: [publikaciok@lib.unideb.hu](mailto:publikaciok@lib.unideb.hu) □ Honlap: [www.lib.unideb.hu](http://www.lib.unideb.hu)



---

További Közlemények

3. Paragh L., Nagy L., Janka E., **Gáspár K.**, Remenyik É., Szegedi A., Irinyi B.: Az atopy patch teszt szerepe az atopiás dermatitis diagnózisában =Role of atopy patch test in the diagnosis of atopic dermatitis.  
*Bőrgyógyász. Venerol. Szle. 90 (3), 81-88, 2014.*  
DOI: <http://dx.doi.org/10.7188/bvsz.2014.90.3.3>
4. Mócsai G., Dajnoki Z., Irinyi B., **Gáspár K.**, Szegedi A.: A bőr barrierkárosodások non-invazív mérési lehetőségei =The non-invasive measurements of skin barrier disruption.  
*Bőrgyógyász. Venerol. Szle. 90 (3), 89-93, 2014.*  
DOI: <http://dx.doi.org/10.7188/bvsz.2014.90.3.4>
5. Kiss B., Bíró T., Bai P., **Gáspár K.**, Bodnár E., Kertész Z., Szikszai Z., Juhász I., Remenyik É., Hunyadi J., Kiss Á.Z.: A fizikai fényvédők biológiai hatásainak áttekintése =Overview of the biological effects of physical sunscreens.  
*Bőrgyógyász. Venerol. Szle. 90 (3), 94-99, 2014.*  
DOI: <http://dx.doi.org/10.7188/bvsz.2014.90.3.5>
6. Molnár, S., Farkas, G., Rögler, G., Bacsa, P., Péteri, L., **Gáspár, K.**: Practical medical guide for wrestling competitions local, regional or younger age competitions.  
*Int. J. Wrestl. Sci. 4 (2), 33-36, 2014.*
7. Varga S., Herédi E., Csordás A., Szilágyi B., **Gáspár K.**, Szegedi A.: Az enyhe és középsúlyos súlyos psoriasisos betegek összehasonlító jellemzése hazánkban =Comparative description of mild and moderate-to-severe psoriatic patients in Hungary.  
*Bőrgyógyász. Venerol. Szle. 90 (2), 43-47, 2014.*  
DOI: <http://dx.doi.org/10.7188/bvsz.2014.90.2.1>
8. Nagy, G., Doan-Xuan, Q., **Gáspár, K.**, Mócsai, G., Kapitány, A., Töröcsik, D., Bacsó, Z., Gyimesi, E., Remenyik, É., Bíró, T., Szegedi, A.: The atopic skin-like microenvironment modulates the T-cell-polarising cytokine production of myeloid dendritic cells, as determined by laser scanning cytometry.  
*Exp. Dermatol. 23 (4), 276-278, 2014.*  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/exd.12342>  
IF:4.115 (2013)





9. Mócsai, G., **Gáspár, K.**, Nagy, G., Irinyi, B., Kapitány, A., Bíró, T., Gyimesi, E., Tóth, B., Maródi, L., Szegedi, A.: Severe skin inflammation and filaggrin mutation similarly alter skin barrier in atopic dermatitis patients.  
*Br. J. Dermatol.* 170 (3), 617-624, 2014.  
IF:4.1 (2013)
10. **Gáspár K.**, Nagy M., Herédi E., Nagy G., Szegedi A.: A psoriasisos betegek kezelésében megfigyelhető változások az elmúlt évtizedben a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Bőrgyógyászati Klinikáján és a területi járóbeteg szakrendeléseken =Changes in the treatment of psoriatic patients in the last decade at the Department of Dermatology, University of Debrecen Medical and Health Science Center and at the outpatient clinics.  
*Bőrgyógyász. Venerol. Szle.* 89 (4), 99-104, 2013.
11. Herédi, E., Csordás, A., Clemens, M., Ádám, B., **Gáspár, K.**, Töröcsik, D., Nagy, G., Ádány, R., Gaál, J., Remenyik, É., Szegedi, A.: The prevalence of obesity is increased in patients with late compared with early onset psoriasis.  
*Ann. Epidemiol.* 23 (11), 688-692, 2013.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.annepidem.2013.08.006>  
IF:2.145
12. **Gáspár K.**: A pikkelysömör terápiás lehetőségei:biológiai terápia nélkül.  
*Háziorv. Továbbk. Szle.* 18, 257-260, 2013.
13. Mihály, J., Gericke, J., Töröcsik, D., **Gáspár, K.**, Szegedi, A., Rühl, R.: Reduced lipoxygenase and cyclooxygenase mediated signaling in PBMC of atopic dermatitis patients.  
*Prostaglandins Other Lipid Mediat. Article in press*, 2013.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2013.03.003>  
IF:2.862
14. **Gáspár K.**: A psoriasis biológiai terápiája.  
*Háziorv. Továbbk. Szle.* 16 (9), 470-473, 2011.
15. **Gáspár K.**, Szegedi A.: Autoimmun hepatitiszes psoriasisos beteg sikeres kezelése ustekinumabbal.  
*Bőrgyógyász. Venerol. Szle.* 87 (5), 169-172, 2011.





16. Nagy, G., **Gáspár, K.**, Irinyi, B., Gál, M., Tumpek, J., Gyimesi, E., Sipka, S., Remenyik, É., Szodoray, P., Szegedi, A.: Association between Serum IL-16 Levels and the Degree of Sensitization in Patients with Atopic Dermatitis.  
*Int. Arch. Allergy Immunol.* 156 (1), 69-74, 2011.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1159/000321959>  
IF:2.403
17. Gontier, E., Ynsa, M., Biró, T., Hunyadi, J., Kiss, B., **Gáspár, K.**, Pinheiro, T., Silva, J., Filipe, P., Stachura, J., Dabros, W., Reinert, T., Butz, T., Moretto, P., Surlève-Bazeille, J.: Is there penetration of titania nanoparticles in sunscreens through skin?: A comparative electron and ion microscopy study.  
*Nanotoxicology.* 2 (4), 218-231, 2008.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/17435390802538508>  
IF:3.72
18. **Gáspár, K.**, Veres, I., Hunyadi, J., Juhász, I.: Muir-Torre syndrome: A case of two brothers.  
*Int. J. Dermatol.* 45 (9), 1124-1126, 2006.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-4632.2006.02915.x>  
IF:0.998
19. **Gáspár, K.**, Erdei, I., Péter, Z., Dezső, B., Hunyadi, J., Juhász, I.: Role of acellular dermal matrix allograft in minimal invasive coverage of deep burn wound with bone exposed: Case report and histologic evaluation.  
*Int Wound J.* 3 (1), 51-58, 2006.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4801.2006.00186d.x>
20. Gontier, E., Barberet, P., Barbotteau, Y., **Gáspár, K.**, Habchi, C., Hunyadi, J., Incerti, S., Kiss, B., Mavon, A., Moretto, P., Pouthier, T., Rosdy, M., Surlève-Bazeille, J., Ynsa, M.: Micro-PIXE characterization of different skin models.  
*X-ray Spectrom.* 34 (4), 381-388, 2005.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/xrs.852>  
IF:1.372
21. **Gáspár, K.**, Bálint, K., Veres, I., Hunyadi, J., Juhász, I.: In vivo cc. basocelluláris modellel szerzett tapasztalatok.  
*Bőrgyógyász. Venerol. Szle.* 80 (3), 129-132, 2004.





22. Erdei I., Füleddi B., **Gáspár K.**, Hunyadi J., Juhász I.: Súlyos Lyell szindrómás betegek kezelése égési intenzív osztályon.  
*Bőrgyógyász. Venerol. Szle.* 80, 143-147, 2004.

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 29,294**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 7,579**

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, 2015.02.20.



## **8. TÁRGYSZAVAK**

atópiás dermatitis, regulatív T sejtek, *Staphylococcus* enterotoxin B, kemokinek, fibroblaszt, CCR3, szöveti átépülés

## **KEYWORDS**

atopic dermatitis, regulatory T cells, *Staphylococcus* enterotoxin B, chemokines, fibroblast, CCR3, remodelling

## 9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet, és mély hálámat fejezem ki témavezetőmnek, mentoromnak, és legközelebbi patronusomnak Szegedi Andrea professzor asszonynak mindenkori szakmai vezetéséért, ötleteiért, tanácsaiért, türelméért, szeretetéért, figyelméért, anyagi és professzionális támogatásáért, önzetlenségéért, ahogy végig ösztönözve tudományos eredményeim eléréséhez és azok megjelenéséhez, interpretálásához segített.

Köszönet és hála a debreceni Bőrgyógyászati Klinika igazgatóinak, Hunyadi János professzor úrnak és Remenyik Éva professzor asszonynak, akik figyelemmel kísérték munkámat, és lehetővé tették számomra a kísérletek elvégzését, biztosítva a nyugodt háttért, valamint köszönet néhai Bégány Ágnes tanárnőnek és Juhász István professzornak, akik először megszeretették velem a csodálatos bőrgyógyászatot.

Külön köszönet illeti a kollaborációs munkában résztvevő hazai és külföldi munkatársaimat, a debreceni klinika Regionális Immunlabor (külön kiemelve dr. Baráth Sándort) és Élettani Intézet (külön kiemelve dr. Szöllösi Attilát és Bíró Tamást) dolgozóit, valamint a düsseldorfi Bőrklínika laborjának munkatársait, Bernhard Homey professzor úr vezetésével (és Thomas Ruzicka professzor úr hathatós segítségével), aki biztosította számomra a zavartalan munkát és bevezetett az alap kutatás rejtelmeibe, megismerve annak minden nehézségét, buktatóit és szépségeit.

Köszönetet mondok továbbá a Szegedi Andrea professzor asszony által vezetett munkacsoport tagjainak (Béke Gabriella, Dajnoki Zsolt, Dr. Irinyi Beatrix, Dr. Kapitány Anikó, Mócsai Gábor, Nagy Georgina), akik közvetlen munkatársaim voltak a kutatások során, és a kritikai észrevételeikkel, az ábrák elkészítésében nyújtott segítségükkel, a javító tanácsaikkal folyamatosan segítették munkám megvalósulását. Emellett köszönöm a Bőrgyógyászati Klinika minden dolgozójának segítségét, akik támogattak doktori munkám elkészültében.

Végül, de mégis elsősorban köszönöm a feleségemnek, szerelmemnek, Beának a szeretetét, támogatását, türelmét, biztatását, gyakori egyedüli helytállását a családi kihívásokban, a gyermekeink (Adél, Abigél, Jonatán) nevelésében, mellyel biztosította, hogy kizárólag munkámra figyelhessek. Valamint hálás vagyok szüleimnek felnevelésemért, folyamatos biztatásukért, támogatásukért.

## **10. FÜGGELÉK**

Az értekezés alapjául szolgáló saját publikációk.