

EGYETEMI DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**A VELESZÜLETETT IMMUNVÁLASZ ELEMEINEK VIZSGÁLATA  
ATOPIÁS DERMATITISBEN**

Nagy Georgina

Témavezető: Prof. Dr. Szegedi Andrea



DEBRECENI EGYETEM

PETRÁNYI GYULA KLINIKAI IMMUNOLÓGIAI ÉS ALLERGOLÓGIAI

DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2017

# **A veleszületett immunválasz elemeinek vizsgálata atopiás dermatitisben**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében a klinikai orvostudományok tudományágban.

Írta: **NAGY GEORGINA**  
okleveles biológus/orvosbiológus

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

Petrányi Gyula Klinikai Immunológiai és Allergológiai Doktori Iskola  
Debreceni Egyetem

A doktori szigorlati bizottság:

elnök:

Prof. Dr. Bodolay Edit, az MTA doktora

tagok:

Prof. Dr. Wikonkál Norbert, az MTA doktora

Dr. Benkő Szilvia, PhD

A doktori szigorlat időpontja:

Debreceni Egyetem, ÁOK,  
Belgyógyászati Intézet „C” Épület Tárgyalóterme  
2017. június 26. 10 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Bácsi Attila, PhD

Dr. Holló Péter, PhD

A bírálóbizottság:

elnök:

Prof. Dr. Bodolay Edit, az MTA doktora

tagok:

Prof. Dr. Wikonkál Norbert, az MTA doktora

Dr. Bácsi Attila, PhD

Dr. Benkő Szilvia, PhD

Dr. Holló Péter, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem, ÁOK,  
Belgyógyászati Intézet “A” épület Tanterme  
2017. június. 26. 13 óra

## **BEVEZETÉS**

Az atopiás dermatitis (AD) egy krónikus, nem fertőző, gyulladáshoz vezető bőrbetegség, lefolyása hullámzó jellegű. A tünetek nagyobb gyakorisággal jelennek meg azoknál a gyermekeknél, ahol a családban korábban már előfordult AD. Kialakulásában azonban a genetikai háttér mellett nagyon fontos szerepe van a környezeti kockázati faktoroknak.

A betegség patogenezeise komplex, számos kutatás témájaként szerepel, de még mindig sok a tisztázatlan vagy ellentmondásos terület. Az AD patogenezisének 3 fő szereplője a bőr barrier károsodása, valamint az adaptív (szerzett) és az innate (veleszületett) immunválasz eltérései. Az AD kialakulására vonatkozóan alapvetően két hipotézis létezik, egy immunológiai (inside-out) és egy bőr barrier (outside-in) hipotézis. Az immunológiai elmélet szerint a betegség primer oka olyan immunológiai diszreguláció, mely a T sejtek egyensúly eltolódását eredményezi, emiatt bőrgyulladás és következményes bőr barrier károsodás alakul ki. Az outside-in teória szerint először barrier károsodás jön létre és ez vezet immun-mediált gyulladáshoz. Az irodalmi adatok azt mutatják, hogy a két elmélet összefüggésben van egymással, nem létezik egyik a másik nélkül. Az is ismert, hogy az innate immunválasz elemei, leginkább a keratinociták jelenthetik a hidat a két elmélet között, mivel nem csupán a bőr fizikokémiai barrierjének építőelemei, hanem a bőr immunológiai barrierjének is. Amennyiben genetikai vagy szerzett okból károsodik a keratinociták fizikokémiai barrierben betöltött szerepe, ez immunológiai működésükben megnyilvánuló eltéréseket is eredményez. A veleszületett immunválasz más képviselői [dendritikus sejt (DC), invariáns natural killer T sejt (iNKT) stb.] is számos károsodást mutatnak AD-ben, mely eltérések részben okai, részben következményei a bőr fizikokémiai barrierjében mutatkozó károsodásoknak vagy a szerzett immunválaszban tapasztalt eltéréseknek és ez a 3 rendszer egymást erősítve egy olyan circulus vitiosus hoz létre, mely fenntartja az AD-ra jellemző súlyos bőrgyulladást.

Saját kutatásaink során elsősorban a veleszületett immunválasz egyes sejtjeinek (keratinocita, DC, iNKT sejt) szerepét tanulmányoztuk AD-ben szenvedő betegekben. Dolgozatom első része az interleukin (IL)-16, mint lehetséges biomarker szerepének tanulmányozása során kapott eredményeinket foglalja össze, a második rész a vérből izolált DC-kel, míg a harmadik rész az iNKT sejtekkel végzett kutatásaink eredményeit mutatja be.

### **Az atopiás dermatitis patogenezeise**

Az elmúlt évek kutatásai nyomán jelentősen gyarapodott tudásunk a betegség patomechanizmusát illetően. Alapvetően két hipotézis létezik az AD kialakulására

vonatkozóan, egy immunológia (inside-out) és egy bőr barrier (outside-in) hipotézis. Az immunológiai elmélet szerint a betegség primer oka olyan immunológiai diszreguláció, mely a T sejtek, különösen a helper T sejtek (Th1, 2, 17 és 22) és a regulatórikus T sejtek egyensúly eltolódását eredményezi. Akut AD-ben elsősorban a Th2/Th22 sejtek áramlanak a bőrbe, melynek következtében emelkedik az IL-4, -5, -13 interleukinek expressziója, bőrgyulladás alakul ki. Ennek hatására következményes bőr barrier károsodás, további gyulladásos sejt beáramlás (eozinofil, makrofág, hízósejt), gátolt Th1 sejt differenciáció és fokozott IgE termelés jön létre. Ezen elmélet szerint elsődleges az immunrendszer károsodása és következményes a bőr barrier eltérés.

A bőr barrier hipotézis szerint elsődleges lépés a bőr barrier károsodása, mely lehet genetikai vagy szerzett károsodás. Jó példa erre a filaggrin (FLG) gén mutációja, mely a betegek 30-40 %-ánál kimutatható. Az *FLG* mutációk miatt kevesebb filaggrin termelődik. Hiányában a bőr barrier károsodik, növekszik a transepidermális vízvesztés. A károsodott barrieren több allergén jut át, valamint gyulladásos citokin termelés indul el a keratinocitákból. Ezek közül legfontosabb a thymic stromal lymphopoietin (TSLP), mely a dendritikus sejteket aktiválja és Th2 típusú polarizáló képességgel ruházza fel. Megindul a Th2 típusú sejtek bevándorlása, következményes egyéb gyulladásos sejt megjelenéssel együtt. Az outside-in teória szerint tehát először barrier károsodás jön létre és ez vezet immunmediált gyulladáshoz. Feltehetően mindkét elmélet igaz, egyik betegnél az egyik útvonal, másikonál a másik dominál, így ez a két elmélet kiegészíti egymást, nem létezik egyik a másik nélkül.

#### *Az immunológiai bőr barrier (veleszületett immunválasz) sejtjeinek jelentősége AD-ben*

A fizikokémiai bőr barrier legfontosabb alkotói a keratinociták, a közöttük elhelyezkedő lipid-fehérje mátrix és az őket összekapcsoló desmosomák és tight junctionok. A keratinociták azonban nem csupán a bőr fizikokémiai barrierjének építőelemei, hanem a bőr immunológiai barrierjének is, elsősorban a veleszületett immunválasznak. Amennyiben genetikai vagy szerzett okból károsodik a keratinociták fizikokémiai barrierben betöltött szerepe, ez immunológiai működésükben megnyilvánuló eltéréseket is eredményez.

A veleszületett immunválasz más képviselői (DC, iNKT stb.) is számos károsodást mutatnak AD-ben, mely eltérések részben okai, részben következményei a bőr fizikokémiai barrierjében mutatkozó károsodásoknak vagy a szerzett immunválaszban tapasztalt eltéréseknek. A 3 rendszer között kimutatható szoros kapcsolat rámutat ugyanakkor a bőr fizikokémiai barrierjének és immunológiai barrierjének szoros összefüggéseire is. Saját

kutatásaim során elsősorban a veleszületett immunválasz adott sejtjeinek (keratinocita, DC, iNKT sejt) szerepét tanulmányoztam AD-ben szenvedő betegekben.

### *Keratinociták, IL-16*

Az elmúlt évtizedek kutatási eredményei bebizonyították, hogy a keratinociták szerepe nem merül ki a bőr fizikokémiai barrierjének kialakításában, hanem ezek a sejtek aktív szerepet játszanak az innate immunválasz indukálásában, a bőr immunológiai barrierjének működésében is. Toll-like receptoraik és egyéb patogén asszociált molekuláris mintázat (PAMP) és endogén veszély-asszociált molekuláris mintázat (DAMP) felismerő receptoraik [pl. NLR gén család által kódolt fehérjék] révén képesek különbséget tenni a patogén és nem patogén jelek között. A keratinocitákon a TLR aktiváció egy predomináns Th1 típusú immunválaszt indukál, mely I. típusú interferon (IFN) termeléssel társul. Az NLR indukció eredményeképpen más típusú proinflammatorikus jelátviteli útvonalak kapcsolnak be. A keratinociták fontos szerepet játszanak az AMP termelésben ( $\beta$ -defensinek, cathelicidinek) is. A bőr fertőzése során a keratinociták AMP termelését növelik a T sejt citokinek, különösen az IL-17A és az IL-22. A keratinociták citokineket és kemokineket is expresszálnak, tehát úgy is képesek az immunrendszert modulálni, hogy immunsejteket aktiválnak és toboroznak a bőrbe. Leírták ezen sejtek antigén prezentáló képességét is az MHCII expresszióra alapozva, bár úgy tűnik, hogy kevésbé vesznek részt a T sejtek polarizációjában, sokkal inkább a már korábban antigénnel találkozott T sejtek toborzásában és aktiválásában van szerepük.

A keratinociták szerepe kiemelten fontos az AD kialakulásában, mind a betegség iniciálásában, mind a tünetek fenntartásában. Legismertebb szerepük a TSLP nevű proinflammatorikus citokin termelése, mely normál bőrben nem detektálható, ugyanakkor mind az akut, mind a krónikus AD-s bőr léziókban nagy mennyiségben jelenik meg, és leginkább a teljesen differenciált keratinocitákhoz köthető. Az éretlen CD11c<sup>+</sup> DC-k a TSLP hatására éretté válnak, Th2 típusú polarizációt idéznek elő naiv T sejtekben, illetve olyan kemokineket (kemokin (C-C motívum) ligand (CCL)17, CCL22) termelnek, melyek a kemokin (C-C motívum) receptorhoz (CCR)4 kötődve Th2 citokineket termelő sejteket toboroznak a bőrbe. A TSLP hatást gyakorol a hízósejtekre és NKT sejtekre is. Az iNKT sejtek TSLP receptort expresszálnak és a ligand kötődésére IL-4 és -13 termeléssel reagálnak. A TSLP mellett a keratinociták számos citokint képesek termelni, ilyenek: az IL-1, IL-6, IL-10, IL-18, GM-CSF és a tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), valamint az IL-16, melyről kevés ismeretünk van AD-ben.

Az IL-16 fehérjét először 1982-ben azonosították, limfocita kemoattraktáns faktorként (LCF) írták le. A humán IL-16 gén 7 exonból és 6 intronból áll, és a teljes prekursor IL-16 molekulát kódolja. Számos fajban elvégezték az IL-16 gén szekvenálását és azt találták, hogy ez a gén nagyon konzervatív valamennyi vizsgált fajban, sőt nemcsak maga a gén konzervatív, hanem a kötő kapcsolata a CD4 receptorral is. Ebből arra következtettek, hogy az IL-16/CD4 kapcsolatnak alapvető szerepe kell legyen a sejt immunválasz szabályozásában.

Az IL-16 egy prekursor molekulaként generálódik, majd a sejt aktivációt követően hasad egy promolekulára és egy szekretált, érett komponensre. Más prekursor molekulákkal ellentétben az IL-16-nak mindkét komponense biológiailag aktív. Limfocitákban a pro-IL-16, N-terminális domén transzkripcionális represszorként funkcionál, így szabályozó szerepet tölt be a sejtciklus folyamatában. Az érett, C-terminális domén a CD4 ligandjaként szekretálódik, fontos kemoattraktáns, növekedési faktor és differenciációs faktor a gyulladásos folyamatokban részt vevő hematopoietikus sejtek számára.

Az IL-16 citokint epitél sejtek, hízósejtek, limfociták, makrofágok, synoviális fibroblasztok, eozinofil sejtek és keratinociták termelik, ugyanakkor megfigyelték, hogy a CD4<sup>+</sup> és CD8<sup>+</sup> sejtek is képesek IL-16 termelésre antigén vagy mitogén aktivációt követően. Az IL-16 expresszió elsősorban olyan gyulladásos folyamatokhoz köthető, mint: az asthma, rheumatoid arthritis, szisztémás lupus erythematosus, colitis, atopiás dermatitis, és a sclerosis multiplex.

Az IL-16-ot elsőként a CD4<sup>+</sup> T sejtek kemoattraktáns faktoraként írták le, később kimutatták, hogy az IL-16 valamennyi CD4<sup>+</sup> perifériális immunsejt számára kemoattraktáns, ilyenek a monocyták, eozinofilek és dendritikus sejtek. A CD4<sup>+</sup> T sejtek közül pedig leginkább Th1 és Treg sejt migrációt indukál, sőt képes direkt módon forkhead box P3 (FOXP3) expressziót indukálni, ezáltal emelni az indukálható Treg populáció mértékét. Szerepet játszik az IL-2 receptor (CD25, CD122) upregulációjában, mely bizonyos T sejt típusok (pl. Treg, transformált, malignus T sejtek) IL-2 és IL-15 jelenlétében való proliferációjához vezet. Továbbá HLA-DR upregulációt indukál, ezáltal facilitálja a T sejtek antigén felismerését.

**AD-ben kimutatták, hogy az IL-16 szintje emelkedett és bizonyos kutatók munkája alapján felmerült, hogy szérumszintje jól korrelál a betegség aktivitásával és súlyosságával. Azonban nem minden kutatás tudta ezt alátámasztani és nem áll rendelkezésünkre adat arra vonatkozóan sem, hogy van-e összefüggés az allergiás szenzitizáció mértéke és az IL-16 szintje között.**

## *Dendritikus sejtek szerepe AD-ben*

A DC-k a természetes immunválasz fontos szereplői, és hidat képeznek a természetes és az adaptív immunrendszer között. A DC-k az antigén prezentáció révén képesek iniciálni az adaptív immunválaszt, de képesek meghatározni annak irányultságát is. Az adott DC-re jellemző antigént kötő PRR-k minősége, az expresszált kostimuláló molekulák és az érés során termelt citokinek határozzák meg a kialakuló immunogén Th válasz típusát (Th1/Th2) és minőségét vagy adott körülmények között a tolerancia biztosítását. A vérben a myeloid DC-knek (mDC) 2 fő típusát különítjük el. Az egyik típus a  $CD1c^+$  vér dendritikus sejt antigén (BDCA)1<sup>+</sup> mDC, mely koexpresszál CD11c és CD11b markereket, míg a másik a  $CD141^+BDCA3^+$  mDC, mely CD11b negatív és kisebb mértékben expresszál CD11c-t és C-type lectin domain family 9 member A (CLEC9A)-t a sejt felszínén. A myeloid DC-k mindkét típusa negatív CD14-re és CD16-ra, így különíthetők el a monocita populációtól. A bőrben megkülönböztetünk alap állapotban (steady state) és gyulladáskor megjelenő DC típusokat. Alap állapotban az epidermiszben találhatóak a Langerhans sejtek (LC), míg a dermiszben detektálhatóak a rezidens dermális myeloid DC-k valamint a plazmocitoid DC-k (pDC). Ugyanakkor gyulladáskor a LC-k és a rezidens DC-k mellett megjelennek az inflammatórikus dendritikus epidermális sejtek (IDEC) és a myeloid dermális inflammatórikus DC-k. A dermális DC-knek (dDC) 3 fő csoportját különbözteti meg az irodalom: a  $CD1a^+/CD1a^-CD1c^+CD14^-$  DC-eket, a  $CD14^+$  DC-eket és a  $CD141^{hi}CD14^-$  DC-eket.

A  $CD1a^+CD1c^+CD14^-$  dermális DC-k koexpresszálnak még CD11c-t, HLA-DR-t és CD45-t. Megfelelő stimulus jelenlétében nagy mennyiségben expresszálnak CD80-at és 86-ot,  $CD4^+$  és  $CD8^+$  T sejteket is képesek indukálni, leginkább Th2 és Th22 irányba polarizálnak. A monociták mellett a vérben keringő DC-kről is azt tartják, hogy ők a bőrben vagy egyéb szövetekben jelen levő DC-k prekurzorai lehetnek, gyakran pre-DC-ként is hivatkoznak rájuk. Az elmúlt időszak in vitro differenciációs és gén expresszió kutatásai rávilágítottak arra, hogy a  $CD1c^+$  vérben keringő DC-k és a  $CD1c^+$  szöveti DC-k között prekurzor progenikus kapcsolat áll fenn.

AD-ben a gyulladt bőrben mind a T sejtek, mind a DC-k száma emelkedett, különösen azon DC-k száma, melyek CD11c és CD1a pozitívak. A léziós bőrben a LC-k mellett megjelennek az IDEC sejtek, melyeknek nagy része a dermiszben is megtalálható, így gyakran myeloid inflammatórikus DC-kként is hivatkoznak rájuk. Az IDEC sejtek fenotípusos analízise során kimutatták, hogy ezek a sejtek a következő sejt felszíni markereket expresszálják:

CD1a<sup>+</sup>,CD1b<sup>dim</sup>,CD1c<sup>dim</sup>,CD11b<sup>bright</sup>,CD11c<sup>+</sup>,CD23<sup>dim</sup>,CD32<sup>dim</sup>,CD36<sup>bright</sup>,CD206<sup>bright</sup>,CD209<sup>+</sup>,FcεRI<sup>bright</sup>,IgE<sup>+</sup>,HLA-DR<sup>bright</sup>.

AD-s bőrben mind a LC-k, mind az IDEC sejtek nagy mennyiségben expresszálnak FcεR1-et, ugyanakkor nagyon alacsony a CD32/FcγRII pozitivitás, ami csak az AD-s betegekben volt detektálható, más gyulladásos bőrbetegségben nem. Az AD akut fázisában a szervezetbe a nyálkahártyákon, vagy a bőrön át bejutó antigének hatására képződő IgE molekula kötődik a bőrben elhelyezkedő LC FcεRI-hez, melynek hatására a sejtek CCL2-t, (monocita kemoattraktáns protein 1-t (MCP1)), IL-16-ot és valószínűleg CXCL8-at szekretálnak. Ennek hatására monociták, eozinofilek, az IDEC sejtek előalakjai és T sejtek vándorolnak a gyulladás helyére. A károsodott barrierű bőrön át ismételt bejutó antigént már a felszíni IgE molekulával felszerelt LC várja, a kötődés következtében a sejt aktiválódik és vagy helyileg, vagy a környező nyirokcsomóba vándorolva prezentálja az antigént az antigén specifikus T sejteknek, Th2 irányú polarizációt generálva. Az LC-k felszínén nagy mennyiségben található a TSLP receptor, melynek ligandját nagy mennyiségben szekretálják a keratinociták. A TSLP kötődésének következtében az LC-k éretté válnak, aktiválódnak és a következő kemokineket termelik: CXCL8, CCL17, CCL22, CCL24 és IL-15. Ezek az ágensek hozzájárulnak a Th2 bőrbe való kivándorlásához, ahol aktiválják őket a TSLP-indukálta LC-k.

A subakut és krónikus fázisban a Th2 és Th22 dominancia mellett a Th1 irányú polarizáció is jellemzővé válik. Ebben az IDEC sejteknek van nagy szerepe, ők felelősek a krónikus léziók fenntartásáért. Az antigén aktivációt követően az IDEC sejtek CCL3-at, IL-1-et, IL-16-ot, IL12p70-et termelnek, az utóbbi kettőnek van szerepe a Th1 irányú polarizációban.

AD-ben az epidermiszben részletesen feltárt mDC-k mellett a dermális DC-k szerepe is kiemelkedően fontosnak tűnik. AD-ben még inkább jellemző, hogy a pre-DC-k nemcsak a dDC-k, hanem a bőr gyulladásos DC-k előalakjai is lehetnek. A dermiszben a dDC-k mellett a gyulladás folyamán megjelennek az ún. inflammatórikus dDC-k is, melyek a sejtfelszíni FcεRI<sup>+</sup>FcεRII<sup>+</sup>CD207<sup>-</sup>CD206<sup>+</sup>CD1b<sup>+</sup>CD1a<sup>+</sup> expresszió alapján azonosíthatóak. Jellemző, hogy ezen sejtek CCR7-et expresszálnak a felszínükön, tehát képesek a környező nyirokcsomókba kivándorolni, ugyanakkor CCL17 és CCL18 termelésük révén hozzájárulnak az atopiás bőrre jellemző Th2 dominancia kialakulásában. Az általuk termelt citokinek (IL-5, IL-13, IL-6, TNFα) olyan szöveti mikrokörnyezetet teremtenek, mely szintén részt vesz a betegségre jellemző Th2/Th22 egyensúly eltolódás fenntartásában.



Fontos felismernünk azt is, hogy a DC-k funkcióját nagyban befolyásolja az őket ért szöveti stimulus mennyisége és minősége.

**Bár a bőrbe kivándorló Th sejtek típusai és a bőrben található DC-k jól ismertek AD-ben, arra vonatkozóan kevés adat áll rendelkezésre, hogy a dermális DC-k hol és mikor nyerik el T sejt polarizáló képességüket, illetve ezen sejtek éréséről, vérben található esetleges előalakjairól nagyon kevés az adat.**

#### *Az iNKT sejtek szerepe AD-ben*

Az NKT sejtek a T sejteknek egy al csoportját képezik. A T sejtekkel közös tulajdonságuk, hogy rendelkeznek T sejt receptorral (TCR), mely egy átrendeződött V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18  $\alpha$  láncból és egy V $\beta$ 11 tartalmú  $\beta$  láncból épül fel. Ez a receptor elkülöníti őket az NK sejtektől, bár az NKT sejtek is CD161 pozitívak és az NK sejtekhez hasonlóan az NKT sejtek is képesek citotoxikus granulumokat expresszálni (perforin, granzyme).

Ugyanakkor a T sejtektől és Treg sejtektől is különböznek, mivel az NKT sejtek TCR receptorai nem képesek az MHCI és II molekulák által prezentált peptid antigéneket kötni, csak a CD1d molekula által közvetített glikolipideket ismerik fel. Újabb adatok szerint az aktiváló antigéneket 2 csoportra lehet osztani: ceramid alapú glikolipidek (glikoszfinolipidek) és glicerol alapú lipidek (membrán fosfolipidek).

Az NKT sejtek kialakulása a thymusban történik, az MHC kapcsolt T sejtekkel közös prekurzorból. Az NKT sejtek a CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> dupla pozitív T sejt csoportból differenciálódnak, elkülöníthetők CD4<sup>+</sup> vagy CD8<sup>+</sup> egyszeresen pozitív populációk és dupla negatív sejtek. Ezen túl az NKT sejteknek két típusát különítjük el, a V $\alpha$ 14<sup>+</sup> NKT sejtek alkotják az I-es típusú, invariáns NKT (iNKT) sejtek csoportját, mely csoporton belül elkülöníthetők a CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> és a CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> (dupla negatív, DN) iNKT sejtek. A másik csoportba a V $\alpha$ 14<sup>-</sup> TCR-t expresszáló, II-es típusú NKT sejtek tartoznak, melyek jellemzője, hogy nem ismerik fel az  $\alpha$ -Gal-Cer-CD1d komplexet. Emberekben, a perifériás vérben az iNKT sejtek száma 0,01-1% között van, és nagy egyedi varianciát mutat. Az elmúlt évek vizsgálatai azt mutatják, hogy összefüggés van a nemek és az iNKT sejtek gyakorisága között. Nőkben magasabb a keringő iNKT sejtek száma a férfiakhoz képest valószínűleg a nemi hormonok hatása miatt.

Az iNKT sejtek TCR-einek általános ligandja egy szintetikus glikolipid, az  $\alpha$ -galactosylceramid ( $\alpha$ -Gal-Cer). A kutatások legfrissebb eredményei alapján az iNKT sejtek azonosítására a CD161 marker helyett az  $\alpha$ -GalCer-CD1d kapcsolat detektálása javasolt. Mindemellett ahhoz, hogy a sejtek aktivációja teljes legyen, szükség van citokin stimulációra is, a TCR szignál és a citokinek együttes jelenléte szükséges a megfelelő sejtindukcióhoz. A

legjobban tanulmányozott citokin mediátor az IL-12, de az iNKT sejtek felszínén TSLP, IL-18, IL-23 és IL-25 receptort is azonosítottak. Az aktiváció hatására az iNKT sejtek gyors citokin termeléssel válaszolnak, ilyen citokinek az IFN $\gamma$ , tumor necrosis faktor (TNF), IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17, IL-21 és GM-CSF. Az eddigi adatok alapján elmondható, hogy az iNKT sejteknek kulcsszerepük van az innate és az adaptív immunválasz összehangolásában fertőzések esetén, autoimmun betegségekben, allergiában és tumoros megbetegedésekben. Összességében tehát kijelenthető, hogy fő funkciójuk a citotoxikus képesség mellett a gyulladásos és tolerogén választ indukáló citokinek termelése.

**Ugyanakkor kevés az ismeretünk az iNKT sejtek AD-ben betöltött szerepéről. A vérben keringő és a léziós bőrben azonosítható iNKT sejtek számára vonatkozó adatok ellentmondásosak az irodalomban, a funkcionális vizsgálatok száma pedig kevés. Mivel az jól ismert, hogy az iNKT sejtek képesek a veleszületett és az adaptív immunválasz között kapcsolatot képezni, az AD kialakulásának korai fázisában akár jó terápiás célpontok is lehetnek. Ehhez azonban további vizsgálatok szükségesek, hogy minél jobban feltérképezhessük ezen sejtek AD-ben betöltött pontos szerepét.**

## **CÉLKITŰZÉS**

Munkánk során az AD patogenezisében szerepet játszó veleszületett immunválasz 3 fontos elemének vizsgálatát, ezek szerepének jobb megértését tűztük ki célul. Vizsgálataink első részében az IL-16 citokin, mint lehetséges biomarker szerepét tanulmányoztuk, majd a vérben keringő mDC-k és iNKT sejtek fenotípusos és funkcionális elemzését végeztük el.

### **Az IL-16 szerepének vizsgálata AD-ben**

Bár az irodalomból már ismert volt, hogy az IL-16 szérumszintje összefüggést mutat az AD súlyosságával, arra vonatkozóan nem áll rendelkezésre adat, hogy milyen kapcsolat van az IL-16 és az allergiás szenzitizáció között. Céljainkat az alábbiak szerint határoztuk meg:

1. van-e eltérés az AD-s betegek szérumszintjében az egészséges kontrollokhoz és psoriasisos betegekhez viszonyítva,
2. a szérumszint mutat-e összefüggést a betegség súlyosságát jelző laboratóriumi paraméterekkel (Scoring Atopic Dermatitis (SCORAD), totál IgE, eozinofil sejtszám),
3. kimutatható-e összefüggés az IL-16 szintje és az allergiás szenzitizáció mértéke között,

4. a szérum totál IgE-vel összehasonlítva használható-e az IL-16 a betegség súlyosságát, és a szenzitizáció mértékét jól jelző biomarkerként?

### **A vérben keringő mDC-k szerepének vizsgálata AD-ben**

A bőrben található DC-k kulcsszerepet játszanak az atopiás bőrgyulladás kialakításában és fenntartásában, továbbá ismert az is, hogy a bőrben jelenlévő DC-k „előalakjai” a perifériás vérben keringenek. Arra voltunk kíváncsiak, hogy a keringő mDC-k AD-ben milyen fenotípusos és funkcionális eltéréseket mutatnak az egészséges kontrollokhhoz képest:

1. van-e különbség az AD-s betegek mDC-inek sejtmag morfológiájában illetve aktiváltsági állapotában a kontrollokhhoz képest,

2. milyen citokin expressziós profil jellemzi a perifériás vérből szeparált mDC-eket stimulus hiányában, illetve egy az AD-s bőrre jellemző mikrokörnyezet (Staphylococcus enterotoxin B (SEB), TSLP stimulus) jelenlétében,

3. arra is kerestük a választ, hogy hol és mikor nyerik el az mDC-k a T sejt polarizáló képességüket?

### **Az iNKT sejtek szerepének vizsgálata AD-ben**

Az iNKT sejtek nagy mennyiségben képesek mind Th1 és Th2 típusú citokineket termelni, ami arra enged következtetni, hogy ezek a sejtek szerepet játszhatnak az AD patogenezisében. Azonban kevés és ellentmondásos adat áll rendelkezésünkre az iNKT sejtek számáról és funkciójáról AD-ben, ezért a következő kérdéseket tettük fel:

1. az iNKT sejtek gyakorisága és abszolút száma mutat-e eltérést a betegekben a kontrollokhhoz képest,
2. ha az iNKT sejteket a sejtfelszíni markereik (CD4, CD8) alapján alcsoportokra bontjuk, van-e eltérés a gyakoriságban és abszolút számban a betegek és a kontrollok között,
3. az IFN $\gamma$  és IL-4 termelés alapján van-e funkcionális különbség az egyes alcsoportokban AD-s betegek és kontrollok között?

## BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

Valamennyi beteg megfelelt a Hanifin és Rajka által felállított diagnosztikai feltételeknek. A Helsinkii deklaráció irányelveinek megfelelően a résztvevők beleegyező nyilatkozatot írtak alá, a tanulmányt a Debreceni Egyetem Etikai Bizottsága is jóváhagyta. A vizsgálatba bevont betegek nem részesültek orális glükokortikoszteroid vagy más szisztémás immunmoduláns kezelésben a vizsgálatot megelőző 4 hétben. Szintén nem kaptak antihisztamint vagy topikális kortikoszteroidot a vérvételt megelőző 5 napban.

### Az IL-16 szerepének vizsgálata AD-ben

#### *Betegek*

A vizsgálatban összesen 85 AD-s beteg vett részt (46 férfi, 39 nő, átlag életkor 18,6 év, tartomány 7–49 év). A betegség súlyosságát a SCORAD indexel jellemeztük: az átlag SCORAD 32 volt (8–56 között). Valamennyi AD-s betegnél meghatároztuk a szérumban IL-16 szintet, a szérumban totál IgE-t és az eozinofil sejtszámot. Továbbá 48 AD-s betegnél mértük az allergén specifikus IgE szintet és végeztünk Prick tesztet. A specifikus IgE alapján az AD-s betegeket 2 csoportra osztottuk: 1. csoportban (nem szenzitizált, n=13) nem volt detektálható specifikus IgE, míg a 2. csoportban (szenzitizált, n= 35) 1 vagy több specifikus IgE volt kimutatható. A Prick tesztet egy standardizált protokoll szerint végeztük el. 32 különböző aeroallergént (köztük perenniális és szezonális allergéneket [házi poratka (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*), nyírfa pollen, macskaszőr, fűfélék (*Phleum pratense*)] és étel allergént teszteltünk. A Prick teszt eredményei alapján szintén két csoportot állítottunk fel. Az A csoportba (n=24) a nem szenzitizált, Prick teszt negatív betegek kerültek, míg a B csoport (n=24) volt a szenzitizált, Prick teszt pozitív betegek csoportja. Kontrollként 36 korban összeálló egészséges önkéntes és 20 psoriasisos beteg vérmintáit használtuk. A kontroll betegek krónikus plakk típusú psoriasisban szenvedtek (átlag életkor 28,2 év, Psoriasis Area Severity Index (PASI) 15,2) és nem kezelték őket lokális vagy szisztémás immunmoduláns szerekkel.

#### *Eozinofil sejtszám meghatározás*

A teljes vérben az eozinofil sejtek arányát és abszolút számát egy Advia 120 típusú hematológiai analizátorral (Siemens) határoztuk meg a betegek rutin klinikai kivizsgálásának részeként. A készülék az eozinofil sejteket azok „scatter” tulajdonságai és a myeloperoxidáz pozitivitásuk alapján azonosította.

### *Enzim-kapcsolt immunszorbens vizsgálat (ELISA)*

A minták szérum IL-16 szintjét szolid fázisú szendvics ELISA (ELISA; Biosource International Inc.) módszerrel végeztük a gyártó utasításai alapján. A vérmintákban ugyancsak vizsgáltuk a szérum totál IgE szintjét valamint a gyakori étel és aeroallergénekre specifikus IgE szintjét. A totál IgE szérum szintjét szolid fázisú szendvics ELISA (Adaltis Italia S.p.A.) módszerrel mértük a gyártó utasításai alapján. Minden mérést duplikátumokban végeztünk. A specifikus IgE szérum szintjét az ALLERgen Systems kit felhasználásával mértük, mely mérés egy immunoenzim capture rendszeren alapul (Adaltis Italia S.p.A.).

### *Statisztikai analízis*

A statisztikai elemzéseket SPSS 15.0 software segítségével végeztük. Nonparametrikus Mann-Whitney és Kruskal-Wallis tesztet alkalmaztunk az AD-s betegek, az egészséges egyének és a psoriasisos kontrollok adatainak összehasonlításához az alcsoport analízis során. A nonparametrikus Spearman rank korrelációs tesztet használtuk szérum totál IgE és szérum IL-16 szintek; a szérum totál IgE és eozinofil szintek, valamint a SCORAD értékek és a szérum IL-16 vagy szérum totál IgE szintek összehasonlításához. A  $p < 0,05$  értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. Az adatokat átlag  $\pm$  standard deviáció formában ábráztuk.

### **Az mDC-k szerepének vizsgálata AD-ben**

#### *Betegek*

A vizsgálatban 11 AD-s beteg és 8 korban megegyező egészséges önkéntes vett részt. A betegség aktivitását a szubjektív SCORAD indexel határoztuk meg, a szenzitivitás mértékét pedig a totál IgE szint alapján állapítottuk meg. Valamennyi betegnél kizártuk a Hiper IgE szindrómát a HIES klinikai score használatával.

#### *Sejt szeparálás és tenyésztés*

Az AD-s betegek és kontrollok perifériás véréből Ficoll Paque Plus (GE Healthcare Bio-Sciences AB) gradiens centrifugálással nyertük ki a mononukleáris sejteket (PBMC). Ezt követően a myeloid DC-eket CD1c (BDCA-1)+ Dendritic Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec GmbH) használatával izoláltuk a gyártó leírása alapján. Röviden a CD19+ B sejtek deplécióját követően pozitív szelekcióval különítettük el a CD1c (BDCA-1)+ sejteket. A tiszta mDC sejtpopulációt aztán 10% főtális borjú szérummal (FBS)-sel (Lonza Group Ltd.) és antibiotikummal (PAA Laboratories GmbH) kiegészített RPMI- 1640 mediumban

(Miltenyi) tenyésztettük 48 órán át, 30 ng/ml TSLP (eBioscience Inc.) és 100 ng/ml SEB (Sigma-Aldrich) jelenlétében (stimulált) vagy ezen ágensek hiányában (nem stimulált).

#### *Sejtfelszíni jelölés és citoplazmatikus citokin festés*

Olyan mDC-k által termelt citokin/kemokin kombinációkat vizsgáltunk, melyeknek jól meghatározott szerepe van a Th altípusok különböző irányú differenciációjában. A stimulált és nem stimulált sejteket a citokin festést megelőzően, a tenyésztés utolsó 6 órájában 3 µg/ml brefeldin A oldattal kezeltük, hogy megakadályozzuk a citokin szekréciót. Az inkubációt követően a sejteket összegyűjtöttük, FACS pufferrel (phosphate-buffered saline oldat 1% bovine serum albuminnal kiegészítve) mostuk és a citokin/kemokin kombinációknak megfelelő számú csövekbe adagoltuk szét. A sejteket először a sejtfelszíni marker specifikus antitestekkel jelöltük: anti-CD1c-allophycocyanin (APC) (L161, BioLegend), anti-CD83-fluorescein isothiocyanate (FITC) (HB15e, BD) és anti-CD86-phycoerythrin (PE) (IT2.2, BioLegend). A mintákat 30 percig 4°C-on sötétben inkubáltuk. A jelölt sejteket FACS pufferrel mostuk és 100 µl of IC Fixation Buffer (eBioscience) oldattal fixáltuk 20 percig sötétben, szobahőmérsékleten (RT). Ezután a sejteket 1x Permeabilisation Buffer (eBioscience) oldattal mostuk, és egy centrifugálást követően a pelletet 100 µl of 1x Permeabilisation Buffer oldatban vettük fel. Ezt követően a sejteket a következő intracellularis citokin-specifikus antitest kombinációkkal festettük: anti-IL-10-PE (JES3-19F1), anti-IL-2-PerCP-Cy5.5 (MQ1-17H12), anti-IL-4-PerCP-Cy5.5 (MP4-25D2), anti-IL-6-FITC (MAb11), anti-TNF $\alpha$ -PerCP-Cy5.5 (MQ2-13A5) (BioLegend), anti-IL-23p19-PE (23dcdp, eBioscience), anti-IL-12(p40/p70)-FITC (C11.5, BD), anti-TGF $\beta$ 1-carboxyfluorescein succinimidyl (CFS) (9016) és anti-CCL17/TARC-PE (54015) (R&D Systems). A mintákat 20 percig inkubáltuk sötétben, szobahőmérsékleten és mostuk 1x Permeabilisation Buffer oldattal, majd FACS pufferrel. A centrifugálást követően a pelleteket 30 µl FACS pufferben vettük fel, és az ibidi  $\mu$ -Slide VI (ibidi GmbH) lemez megfelelő csatornájába töltöttük. Tárolás előtt a csatornába további 150 µl FACS puffert töltöttünk, majd mérés előtt 3 µg/ml 4',6-diamidino-2-phenylindole-t (DAPI) (Sigma-Aldrich) adtunk a sejtekhez, és 20 percig szobahőmérsékleten inkubáltunk. Mivel méréseink során nem észleltünk szignifikáns eltérést a festett sejtek fluoreszcencia intenzitásában Fc receptor blokkoló (Miltenyi) jelenlétében vagy hiányában, így a festetlen sejteket tekintettük negatív kontrollnak.

## *Lézer pásztázó cytometria*

Ahhoz hogy kis sejtszámú mintán tudjunk multiparametrikus cytometriás adatelemzést végezni, az iCys Research Imaging Cytometert és a hozzá tartozó software-t alkalmaztuk (iNovator Application Development Toolkit and iBrowser Data Integration Software, Compucyte Corporation). A különböző fluorofórokkal konjugált antitestek egyenkénti gerjesztéséhez a következő lézereket alkalmaztuk „multi-track” módban: egy 405 nm-es viola dióda lézert a DAPI-hoz, egy 488 nm-es kék argon-ion lézert a FITC, CFS, PE és PerCP-Cy5.5 festékekhez, valamint egy 633 nm-es vörös hélium-neon lézert az APC-hez. A pásztázott terület  $6 \times 12 \times 1024 \times 768 \times 0,06125 \mu\text{m}^2$  volt mintánként (6x12 darab szken-terület,  $1024 \times 768$  pixel szken-területenként,  $0,25 \mu\text{m} \times 0,245 \mu\text{m}$  méret pixelenként), a képeket a cytometer egy Olympus 40x objektíven (0,75 NA) és fényelektromos sokszorozó csöveken (PMT) csöveken keresztül gyűjtötte be. A megfelelő emissziós filterek használatával a PMT-k az adott fluoreszcens csatornából származó adatokat detektálták; pl.: a DAPI-t  $463 \pm 20$  nm-en, a FITC –et és CFS-t  $530 \pm 15$  nm-en, a PE-t  $580 \pm 15$  nm-en, míg a PerCP-Cy5.5-t és APC-t  $675 \pm 25$  nm-en detektáltuk. A sejteket külön azonosítottuk, függetlenül a citokin termelésre vonatkozó jelektől, amennyiben a sejtek membránjára vonatkozó „scatter” jelek és a nucleust jelölő DAPI intenzitások együttesen meghaladták az előre beállított határértéket. Valamennyi fluorokróm fluoreszcencia intenzitását és az egyéb sejtes tulajdonságokat a meghatározott kontúrban belül detektáltuk és képek valamint citometriai adatok formájában prezentáltuk. A következő paramétereket elemeztük: az „integrált”, mely egy adott esemény pixel intenzitásainak összege, és a jelölt fehérje sejten belüli szintjéről nyújt információt; a „max pixel”, mely az adott esemény legmagasabb pixel értéke, és a jelölt protein sejten belüli legmagasabb koncentrációját mutatja; az „area-t” (terület), mely a kontúrral körülvett terület  $\mu\text{m}^2$ -ben megadva. Ezekből a paraméterekből következtethetünk a citokin termelésre, a sejt és a sejtmag méretére, a sejtciklus adott fázisára (a DNS tartalom alapján) és a DNS kondenzációjára. A citokin termelést és a sejtfelszíni markerek elemzését legalább 1000 kapuzott sejt egyenkénti és csoportos elemzésével vizsgáltuk statisztikai szoftverek (GraphPad Prism és Microsoft Excel) használatával. A kompenzációs mátrixot az iCys és a BD ajánlása alapján végeztük el BD CompBeads Set Anti-Mouse Ig,  $\kappa$  polystiren mikrogöngyök segítségével (BD Biosciences).

## *Statisztikai analízis*

Az adataink normál eloszlást mutattak, a szignifikáns eltérések detektálásához Student féle kétmintás t próbát használtunk a GraphPad Prism version 5 (GraphPad) szoftver segítségével. Az adatokat átlag  $\pm$  standard hiba (SEM) formájában adtuk meg. A p értékeket akkor tekintettük statisztikailag szignifikánsnak, ha azok kevesebb mint 0,05 (\*) vagy 0,025-nek (\*\*) adódtak.

## **Az iNKT sejtek szerepének vizsgálata AD-ben**

### *Betegek*

A vizsgálatba 41 AD-s beteget (16 nő és 25 férfi, átlag életkor  $18,59 \pm 8,9$  év) és 16 egészséges, nem atopiás önként jelentkezőt (HC) (11 nő és 5 férfi, átlag életkor  $18,9 \pm 5,9$  év) vontunk be. A betegség súlyosságát a SCORAD indexel határoztuk meg. Az átlag objektív SCORAD  $26,7 \pm 13,1$  volt. A szubjektív SCORAD-t is figyelembe véve, az átlag SCORAD  $41,2 \pm 14,6$ . A szérumban totál IgE medián értéke 584,3 kU/L volt (251,3–1245,0 kU/L között), míg a szérumban laktát dehidrogenáz (LDH) mediánja 475 U/L volt (268,1–732,4 U/L között), referencia érték: 230–460 U/L.

### *Perifériás vér mononukleáris sejt (PBMC) izoláció*

A heparinnal alvadásgátolt vérmintákat Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) oldatra rétegeztük és centrifugáltuk  $700 \times g$  30 percig, majd a mononukleáris sejtréteget összegyűjtöttük.

### *Az iNKT és CD4/CD8 iNKT sejtek számának és gyakoriságának meghatározása áramlási citometriával*

Az iNKT sejtek számát áramlási citometriával határoztuk meg 41 AD-s beteg izolált PBMC mintáiból anti-CD3 és 6B11 (a T sejt receptor  $V\alpha 24$  láncának CDR3 loopjára specifikus) monoklonális antitestek (mAb) használatával. A jelölést megelőzően a sejteket ( $1 \times 10^6$ )  $100 \mu g/mL$  tisztított humán IgG-vel (Sigma) inkubáltuk 20 percig jégen, hogy megakadályozzuk a nem specifikus Fc receptor kötődést. A festő pufferrel (foszfát puffer oldat (PBS), 5% főtális borjú szérum és 1% borjú szérum albumin, Sigma) történő 2 mosást követően, a sejteket anti-CD3-FITC-cel, 6B11-PE (BD Pharmingen), anti-CD4-PE-Texas Red-del (ECD) és anti-CD8-PE-Cyanine7-tel (PC7) (Immunotech) jelöltük 45 percig jégen. A festést követően a sejteket mostuk és mértük négy színű áramlási citometria módszerrel egy



Beckman Coulter FC500 áramlási citométeren CXP szoftverrel. Valamennyi jelölés kísérletnél használtunk izotípus kontrollt. Az abszolút szám meghatározásához a kétplatformos módszert alkalmaztuk a limfocita számot felhasználva.

#### *Az iNKT sejtek és CD4/CD8 alcsoportjainak funkcionális vizsgálata intracelluláris citokin analízissel*

10 AD-s beteg és 10 HC PBMC mintáit elemeztük. Az iNKT sejtek és CD4/CD8 alcsoportjainak intracelluláris citokin szintjeit ötszínű áramlási citometria módszerrel határoztuk meg. A PBMC mintákat 25 ng/mL PMA-val és 1 µg/mL ionomycinnel (Io) stimuláltuk 10 µg/mL Golgistop Brefeldin A (Sigma) jelenlétében. Ezt követően a sejteket mostuk és elvégeztük a sejt felszíni jelölést anti-CD3 (FITC-konjugált az IL-4-APC jelöléshez és APC-konjugált az IFN $\gamma$ -FITC festéshez, BD Pharmingen), anti-6B11, anti-CD4 és anti-CD8 antitestekkel. A sejtek fixálását követően elvégeztük a permeabilizálást Intraprep<sup>TM</sup> permeabilizációs reagenssel (Immunotech) a gyártó utasításai szerint, majd az intracelluláris citokinek jelöléséhez a sejteket anti-IFN $\gamma$ -FITC vagy anti-IL-4-APC mAb-vel (BD Pharmingen) inkubáltuk 30 percig. A mintákat kétszer mostuk festő pufferrel és a sejteket egy Beckman Coulter FC500 típusú áramlási citométerrel mértük és CXP szoftver segítségével elemeztük. Minden mintában legalább 300 000 sejtet számoltunk le. Izotípus kontrollt minden mérésnél alkalmaztunk. A PMA/Io stimulációra adott specifikus sejt választ úgy határoztuk meg, hogy a nem stimulált minták pozitív eseményeinek százalékát kivontuk a stimulált minták pozitív eseményeiből. Az eredményeket a citokin pozitív sejtek net százalékában adtuk meg.

#### *Statisztikai analízis*

Az eredményeket mediánban, IQR-ben (interkvartilis terjedelem (IQR 25–75 percentilis), és range-ben (5–95 percentilis) adtuk meg. A statisztikai elemzést SigmaPot v. 11.0 szoftver segítségével végeztük (SyStat Software Inc, USA). Nem parametrikus Mann–Whitney rank-sum tesztet vagy Student féle t próbát alkalmaztunk. A korrelációs elemzéseket Spearman's rank tesztel végeztük el. A 0,05-nél alacsonyabb p értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

## **EREDMÉNYEK**

### **IL-16 szerepének vizsgálata AD-ben**

#### *Szérum IL-16 szintek AD-s betegekben, egészséges és psoriasisos kontrollokban*

A szérum IL-16 szinteket összehasonlítottuk AD-s és psoriasisos betegekben, valamint egészséges kontrollokból származó mintákban. Az atopiás minták szérum IL-16 szintje szignifikánsan magasabbnak adódott az egészséges kontrollokhoz és a psoriasisos betegekhez viszonyítva.

#### *Összefüggés a szérum IL-16 és az AD súlyosságát jelző paraméterek között (SCORAD, a szérum totál IgE és az eozinofil sejtszám)*

A teljes vizsgált beteg populáció bevonásával vizsgáltuk a szérum IL-16 kapcsolatát a betegség súlyosságát jelző paraméterekkel (SCORAD index, szérum totál IgE, abszolút eozinofil sejtszám). A SCORAD index esetében nem volt összefüggés a szérum IL-16 és a SCORAD között, bár az  $r$  érték 0,27-nek adódott, ami nagyon közel van a szignifikancia érték határához. Ugyanakkor szignifikáns összefüggést találtunk a szérum IL-16 és a szérum totál IgE szintek között, és nem volt kimutatható összefüggés a szérum IL-16 és az abszolút eozinofil sejtszám között. Ezzel szemben pozitív korrelációt találtunk a szérum totál IgE és a SCORAD érték között, és szignifikáns összefüggést találtunk a szérum totál IgE és az eozinofil sejtek száma között.

Az eredményeink azt mutatják, hogy az IL-16 a súlyossági paraméterekkel csak kismértékű összefüggést mutat, a szérum totál IgE jobban jelzi a betegség súlyosságát, mint az IL-16.

#### *Összefüggés az IL-16 és a betegek szenzitizáltsága között*

A betegek allergiás szenzitizáltságát 2 módszer szerint vizsgáltuk, részben Prick bőrtesztel, részben IgE szérum szint vizsgálattal. A specifikus IgE (1. és 2. csoport) és a Prick teszt (A és B csoport) eredményei alapján az AD-s betegeket két csoportba osztottuk, így szenzitizált (2. és B csoport) és nem szenzitizált (1. és A csoport) alcsoportokat képeztünk. A szérum IL-16 és a szérum totál IgE szintjét tovább elemeztük az alcsoportokon belül. A szérum IL-16 szintje szignifikánsan emelkedett volt a 2. csoportban az 1. csoporthoz viszonyítva, nem volt azonban szignifikáns eltérés az A és B csoportok között. A szérum totál IgE szint mindkét szenzitizált csoportban szignifikánsan emelkedett volt a nem szenzitizált csoportokhoz képest.

Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a szérumban IL-16 bizonyos körülmények között ugyan mutat összefüggést a betegség súlyosságával és a szenzitizáltság mértékével, mégsem tűnik olyan megbízható markernek a betegség állapotának előrejelzésében, mint a szérumban totál IgE szintje.

### **Az mDC-k szerepének vizsgálata AD-ben**

#### *Az AD-s betegek mDC-inek morfológiai és fenotípusos jellemzői*

Az AD-s betegek perifériás véréből izolált mDC-ken a sejtfelszíni és citoplazmatikus citokin festéssel párhuzamosan sejtmag morfológiai vizsgálatot is végeztünk DAPI festéssel. Mind stimuláció nélkül, mind stimuláció után az atopiás betegekénél jellemzően nagyobb mennyiségben figyeltünk meg aktívabb, nagyobb méretű, dekondezált sejtmaggal rendelkező sejteket, mint az egészséges egyéneknél. Ezeket a sejteket az alacsony DAPI intenzitás alapján azonosítottuk. Alapvetően a megfigyelt citokin profilok is csak ezekhez a dekondezált sejtmaggal rendelkező sejtekhez voltak kapcsolhatók. Stimuláció hiányában az aktivációs markerek esetében nem volt kimutatható különbség az AD-s betegek és a kontroll egyének között. A stimulációt követően az AD-s betegek sejteiben szignifikánsan emelkedett a CD83 és CD86 érési és kostimulációs markerek expressziója, és további kromatin dekondezációt detektáltunk a nem stimulált sejtekhez képest, míg az egészséges kontrollok között nem volt szignifikáns emelkedés. Annak ellenére, hogy ezek a sejtmagi eltérések nagy valószínűséggel megnövekedett transzkripciós aktivitásra utalnak, az atopiás donorokból és a kontrollokból származó valamennyi mDC a sejtciklus G0/G1 fázisában maradt.

#### *Az AD-s betegek és kontrollok nem stimulált mDC sejteinek citokin profilja*

A DC-k által termelt citokineket ismert T sejt polarizáló tulajdonságaik alapján csoportosítottuk. Box 1: IL-2, CCL7, IL-6 és TNF $\alpha$ , melyek Th2 és Th22 polarizációt indukálnak; Box 2: IL-12p40/p70, mely Th1 irányba polarizál; és Box 3: IL-10, TGF $\beta$ 1 és IL-23p19, melyek Th17 és Treg irányt indukálnak. Stimuláció hiányában az AD-s betegek CD1c (BDCA-1)<sup>+</sup> mDC-i képesek voltak valamennyi általunk vizsgált T sejt polarizáló citokin termelésére, kivéve az IL-4-et. Az egészséges kontrollokkal összehasonlítva az atopiás mDC-k esetén nagyobb mennyiségű IL-2, CCL17, IL-6 és TNF $\alpha$  expressziót detektáltunk. A CCL17 és a TNF $\alpha$  esetén a különbség statisztikailag szignifikánsnak adódott. Az IL-12p40/p70, IL-10, TGF $\beta$ 1 és IL-23p19 esetén nem volt különbség a két vizsgált stimulálatlan

csoport között. Az eredmények alapján elmondható, hogy a 3 boxos felosztás az expressziós mintázat szempontjából is megfelelő volt.

*Az atopiás bőrhöz hasonló körülmények hatása az mDC-k T sejt polarizáló citokin termelésére*

A stimulációt követően szintén 3 citokin termelési mintázatot figyeltünk meg az AD-s betegek sejtjeinél a kontrollokhöz viszonyítva. Elsőként azt tapasztaltuk, hogy a korábban emelkedettnek talált Th2/Th22 polarizáló citokinek szintjei (IL-2, CCL17, IL-6, TNF- $\alpha$ ) tovább emelkedtek, és a különbségek statisztikailag szignifikánsnak adódtak, kivéve a CCL17 esetén, mikor az AD-s betegek és a kontrollok adatait összevetettük. Másodsor, az AD-s betegek mDC-inek IL-12p40/p70 termelő képessége, mely Th1 irányú polarizációra utal, szignifikánsan csökkent az egészséges kontroll sejtekéhez képest. Harmadszor, az IL-10, TGF $\beta$ 1 és IL-23p19 expressziós szintjeiben nem tapasztaltunk különbséget a beteg és egészséges sejtek között. IL-4 expressziót nem detektáltunk egyik vizsgált csoportban, egyik tenyésztési körülmény esetén sem.

### **Az iNKT sejtek szerepének vizsgálata AD-ben**

*A totál iNKT sejtek százalékos aránya és száma AD-s betegekben*

Az atopiás betegek és egészséges kontrollok perifériás véréből nyert PBMC mintákban a CD3+6B11+ sejteket azonosítottuk a keringő iNKT sejtekként. A CD3+6B11+ iNKT sejtek száma szignifikáns csökkenést mutatott az AD-s betegekben a kontrollokhöz képest. Emellett a keringő iNKT sejtek számának medián értéke szintén szignifikánsan csökkent az atopiás betegekben a kontrollokhöz képest. Mivel a T sejtek számának eltérései érinthetik az iNKT sejtek számát is, meghatároztuk a CD3+ T sejtek, CD4+, CD8+ T sejt csoportok százalékos arányát valamint a CD4/CD8 arányt mind az AD-s betegek, mind a kontrollok PBMC mintáiban. Ebben az összehasonlításban az AD-s minták nem különböztek szignifikánsan a kontroll mintáktól. Nem találtunk összefüggést az iNKT sejtek százalékos aránya és száma valamint a betegek kora, neme, a betegség súlyossága (SCORAD index alapján) vagy a totál IgE és LDH szintek között.

*Az iNKT sejtek alcsoport analízise AD-s betegekben*

A CD3/6B11 dupla-pozitív totál iNKT sejtek között 4 iNKT alcsoportot azonosítottunk a CD4 és CD8 expresszió alapján. Eredményeink azt mutatták, hogy a CD4- alcsoport (DN és

CD4–CD8+) százalékos aránya szignifikánsan csökkent AD-ben a kontrollokhöz képest. Az abszolút szám esetében az eredmények még kifejezettebb csökkenést mutattak az atopiás betegek CD4/CD8 iNKT alcsoportjaiban a kontrollokhöz viszonyítva. Pozitív korrelációt találtunk a totál iNKT sejtek gyakorisága és az alcsoportok gyakorisága között AD-ben kivéve a DP iNKT sejteket, és ezek az összefüggések még kifejezettebbek voltak, ha az abszolút számot vizsgáltuk. Mindkét vizsgált paraméter tekintetében a legerősebb összefüggést a totál iNKT és a DN iNKT alcsoport értékeinél tapasztaltuk.

#### *Az iNKT sejtek funkcionális vizsgálata AD-ben*

Az iNKT sejtek AD-ben mutatott effektor funkciójának vizsgálatához meghatároztuk a totál iNKT sejtek és az alcsoportok intracelluláris IFN $\gamma$  és IL-4 tartalmát. Amikor összehasonlítottuk 10 AD-s beteg és 10 kontroll adatait, azt találtuk, hogy az intracelluláris IFN $\gamma$  expresszió csökkent, míg az IL-4 expresszió emelkedett az AD-s betegek totál iNKT sejtjeiben a kontrollokhöz képest, bár ezek az eltérések nem érték el a statisztikai szignifikancia határát. Ezután meghatároztuk az iNKT sejtek alcsoportjainak funkcionális tulajdonságait. A DN iNKT alcsoport esetén szignifikánsan alacsonyabb IFN $\gamma$  szinteket ( $p < 0,05$ ) mértünk és szignifikánsan magasabb intracelluláris IL-4 értékeket detektáltunk ( $p < 0,01$ ). A másik 3 alcsoportot illetően nem találtunk szignifikáns eltéréseket a mért citokinek esetében AD-s betegek és kontrollok között.

## **MEGBESZÉLÉS**

Az AD az egyik leggyakoribb krónikus gyulladásos bőrbetegség, melynek komplex patogenezisében a károsodott bőr barrier és veleszületett immunválasz mellett a túlaktivált szerzett immunválasznak van kritikus szerepe. A betegség kialakulása és fejlődése során a fent felsorolt rendszerek egymást is jelentősen befolyásolják, egy ördögi körként súlyosbítva az eltérések, károsodások és funkcionális zavarok sorát, mely egyre súlyosabb klinikailag is látható gyulladást eredményez.

Jelen kutatásaink a veleszületett immunválasz eltéréseinek tanulmányozására irányultak. Ennek is három fő elemét szerettem volna elemezni. Elsőként az IL-16 szerepét tanulmányoztuk, melyet számos innate immunválaszi sejt termel, majd a DC-k és az iNKT sejtek számbeli és funkcionális eltéréseit vizsgáltuk AD-s betegek perifériás vérében.

IL-16 szintézisre számos innate sejtípus képes, mint az eozinofilek, hízósejtek, a légutakban található epitél sejtek, dendritikus sejtek és a keratinociták, de T és B limfociták is

termelhetik. IL-16 egyik legfőbb hatása, hogy kemoattraktánsként hat valamennyi CD4-et expresszáló perifériás T limfocitára, de monocitákra és dendritikus sejtekre is. Emellett az IL-16 pro-inflammatórikus citokintermelést indukál. Több adat is utal rá, hogy AD-ben patofiziológiai szerepe lehet a bőrgyulladás kialakulásában, hiszen AD-ben az allergén aktivált Langerhans sejtek IL-16-ot termelnek, melynek szerepe lehet a DC-k, T sejtek és eozinofil sejtek toborzásában és aktiválásában, így hozva létre egy lehetséges kapcsolatot az IgE-mediált, I-es típusú, azonnali immunválasz és a T sejtes, késői típusú immunválasz között, mely immunválaszok AD-ben kiemelt szerepet játszanak. AD-ben kimutatták, azt is, hogy az egyik mechanizmus, mely a betegség progressziójához vezet, az az eozinofil sejtek allergén indukált IL-16 termelése, mely további IL-4 termelő eozinofil sejtek megjelenéséhez vezet. Mind akut, mind krónikus bőr léziókban kimutatták, hogy az epidermális keratinociták és a dermális T sejtek IL-16 mRNS expressziója megemelkedett. Az IL-16 mRNS<sup>+</sup> sejtek száma szignifikánsan magasabbnak mutatkozott az akut léziókban a krónikus léziókhoz viszonyítva, és korrelált a CD4<sup>+</sup> sejtek számával mind az epidermiszben, mind a dermiszben, alátámasztva, hogy az IL-16-nak mind az atopiás bőrgyulladás kialakításában, mind annak fenntartásában kiemelkedő szerepe van. Az IL-16 és az AD súlyossága közötti kapcsolatot számos klinikai vizsgálat bizonyítja, ezért a szérumban IL-16 szint megfelelő markernek tűnhet a betegség aktivitásának mérésére. Ugyanakkor a szérumban IL-16 szint és az allergiás szenzitivizáció mértéke közötti kapcsolatot AD-ben korábban még nem írták le.

Tanulmányunkban első lépésben kimutattuk, hogy AD-s betegekben a szérumban IL-16 szint szignifikánsan magasabbnak adódott az egészséges kontrollokhoz viszonyítva. Sőt szignifikáns különbség volt az AD-s betegek és a psoriasisos betegek között is. Eredményeink összecsengenek Masuda és munkacsoportja eredményeivel, mivel ők is azt találták, hogy az AD-s betegek szérumban IL-16 szintje szignifikánsan magasabb a psoriasisban mért értékekhez képest. Ők arra a következtetésre jutottak, hogy a kifejezettebb monocita/makrofág infiltráció az atopiás betegek dermiszében az egyik lehetséges oka a magasabb szérumban IL-16 szintnek. Ezen túl a Th1/Th2 egyensúly közötti különbség a két betegségben szintén hozzájárulhat az eltérő szérumban IL-16 szintekhez.

AD-ben széles körben vizsgálták a magas szérumban IL-16 szint és a különböző klinikai és laboratóriumi paraméterek közötti összefüggéseket. Bár az IL-16 általában jól korrelál a betegség súlyosságát jelző SCORAD indexszel, az egyéb laboratóriumi paraméterekkel való összefüggésekről kapott eredmények ellentmondásosak az irodalomban. Frezzolini és munkacsoportja nem talált összefüggést a szérumban totál IgE és a szérumban IL-16 szintek között,

míg Masudáék pozitív korrelációt mutattak ki az IgE és az IL-16 között, valamint az IL-16 és az AD-s erupciós index között.

Saját vizsgálatainkban, amikor a szérumban az IL-16 szint és a súlyossági paraméterek közötti összefüggést vizsgáltuk, gyenge korrelációt állapítottunk meg a szérumban az IL-16 szint és a SCORAD index között, bár az  $r$  koefficiens értéke 0,27-nek adódott, ami nagyon közel van a statisztikai határértékhez. Ezt az eredményt az esetszám emelése valószínűleg pozitív irányban módosította volna. Szignifikáns korrelációt találtunk a szérumban az IL-16 és a szérumban a totál IgE szintek között, míg a szérumban az IL-16 szint és az eozinofil sejtszám között nem volt detektálható összefüggés. A betegek tüneteinek súlyosságát a SCORAD index jól tudja jelezni, az IgE szint és az eozinofil sejtszám ennél sokkal gyengébb jelzője a betegség súlyosságának. A szérumban a totál IgE vizsgálata során megállapítottuk, hogy pozitív, bár nem szignifikáns korreláció áll fent a szérumban a totál IgE és a SCORAD index között, ugyanakkor szignifikáns összefüggést detektáltunk a szérumban a totál IgE és az eozinofil sejtszám között.

Miután a betegség súlyosságát úgy tűnt, hogy az IL-16 szint nem tudja megfelelően jelezni, megvizsgáltuk, hogy van-e összefüggés a betegek allergiás szenzitizációjával. Specifikus IgE mérésrel és Prick teszttel határoztuk meg az allergiás szenzitizáció mértékét, és ez alapján az AD-s betegeket szenzitizált és nem szenzitizált alcsoportokra osztottuk. Az alcsoportokban tovább elemeztük a szérumban az IL-16 és a szérumban a totál IgE szinteket. Eredményeink szerint a szérumban az IL-16 szintje szignifikánsan emelkedett volt a szenzitizált alcsoportban a nem szenzitizált csoporthoz képest, de csak abban az esetben, ha a szenzitizációt a specifikus IgE-vel határoztuk meg. A szérumban a totál IgE szintje mindkét módszerrel mért szenzitizált alcsoportban szignifikánsan emelkedett volt a nem szenzitizált alcsoportokhoz képest. Eredményeink azt mutatják, hogy bár a szérumban az IL-16 mutat összefüggést az allergiás szenzitizáció mértékével, ez a kapcsolat nem olyan erős, mint ahogyan a szérumban a totál IgE esetében láttuk.

A korábbi tanulmányok leírták, hogy AD-s betegek perifériás vérében mind a  $CD4^+$ , mind a  $CD8^+$  T sejtek Th1 típusú citokin termelése károsodott és a Th2/Th22 típusú citokinek dominálnak. Akut bőr léziókban a korábban leírt Th2 dominancia mellett a Th22 sejtek jelenlétét is leírták, mely T sejt eloszlás a krónikus léziókban is fennmarad. Ugyanakkor a bőrben ezzel egy időben megfigyelhető a Th1 típusú sejtek infiltrációja is. Ezen jellegzetes T sejt megoszlásért a DC-k felelősek. A DC-k azonban nem csupán a T sejt polarizáló képességükkel, hanem saját jelentős proinflammatorikus citokin termelésükkel is hozzájárulnak az AD-s bőrben zajló gyulladás létrejöttéhez. A DC-k érése és funkciója, vagyis T sejt alcsoportokat differenciáló és citokin termelő képessége alapvetően függ DC

szöveti mikrokörnyezettől. Ennek a szöveti mikrokörnyezetnek AD-ben fontos eleme a *Staphylococcus aureus* kolonizáció, mely a betegek 80-100%-ára jellemző és korrelál a betegség súlyosságával. A SEB superantigénként viselkedik, képes penetrálni az epidermiszbe és a dermiszbe, ami poliklonális T sejt aktivációhoz és professzionális illetve nem professzionális antigénprezentáló sejtek (APC) indukálásához vezet. A SEB jelenlétében tenyésztett humán DC-k Th2 polarizációt indukálnak, valamint a SEB serkenti a CD4<sup>+</sup> T sejtek IL-22 szekrécióját. A szöveti környezet egy másik karakterisztikus vonása mind az akut, mind a krónikus ADs bőrben, hogy a keratinociták fokozottan termelnek TSLP-t, köszönhetően a diszfunkcionális barrierek és a proinflammatorikus citokinek jelenlétének. A TSLP stimuláció fő hatása, hogy Th2 immunválaszt vált ki és hozzájárul az APC-k túléléséhez és éréséhez. Az utóbbi évek kutatásai megerősítették, hogy a monocyták mellett a vér CD1c<sup>+</sup> DC-k is lehetnek a szöveti CD1c<sup>+</sup> DC-k előalakjai (preDCk). AD-ben sok adat ismert a bőrben elhelyezkedő DC-kről, de vérben keringő előalakjaikról igen kevés.

Eredményeink alapján a következő három következtetést vontunk le:

Az atopiás betegek nem stimulált, keringő mDC-i képesek az összes általunk vizsgált T sejt (Th1, 2, 17, 22) polarizáló citokin termelésére hasonlóan a kontroll sejtekhez, bár az atopiás mDC-k a Th2 (IL-2, CCL17) és Th22 (IL-6, TNF $\alpha$ ) irányba polarizáló citokineket már a keringésben is nagyobb mennyiségben expresszálták a nem atopiás mDC-khez képest, sőt a CCL17 és a TNF $\alpha$  esetében a különbségek szignifikánsnak adódtak. Azt is megfigyeltük, hogy az atopiás mDC-k nagy százalékban tartalmaztak dekondezált sejtmagot az egészséges egyénekhez képest, és általában elmondható, hogy a citokin termelésben megfigyelt változások is ezekhez a megnagyobbodott, dekondezált kromatin tartalmú sejtekhez voltak köthetőek. Ez alapján mi úgy gondoljuk, hogy ezek a sejtek ún. „preaktivált” állapotban vannak.

Másodszor, tanulmányunkban kimutattuk, hogy az AD-s betegekből származó és a kontroll mDC-k eltérően reagálnak a specifikus, AD-s bőrre jellemző szöveti mikrokörnyezetre. Amikor az mDC-eket SEB és TSLP jelenlétében tenyésztettük, mellyel egy AD-re jellemző szöveti környezetet modelleztünk, az atopiás mintákban a Th2- és Th22-polarizáló citokinek szintjeinek emelkedése statisztikailag szignifikánssá vált az egészséges kontrollokhoz viszonyítva. Fújita és munkatársai szintén megerősítették a frissen izolált bőr eredetű rezidens és inflammatorikus DC-k pluripotens Th-sejt (Th1, Th2, Th17, Th22)-polarizáló kapacitását, és kiemelték, hogy a betegség-specifikus Th sejt alcsoportok megjelenését a bőrben elsődlegesen a krónikus gyulladásra jellemző szöveti környezet határozza meg. Egy hasonló kísérleti rendszerben, Reefer és munkacsoportja kimutatta, hogy



a DC-T sejt kokultúrákban TSLP, allergén vagy SEB stimuláció hatására az AD-s mintákban a Th2-típusú citokinek jellemzőek, bár ebben a tanulmányban nem vizsgálták a Th22 citokin expressziót. Kísérleteinkben továbbá megfigyeltük, hogy a nem stimulált mDC-k mind az AD-s mintákban, mind a kontrollokban képesek Th1 irányban polarizálni, azonban ez a képesség az atopiás mDC-k esetén károsodik stimulációt követően. Hasonlóan a mi eredményeinkhez, Lebre és munkatársai azt találták, hogy a CD1c<sup>+</sup> DC-k funkciója károsodott AD-ben, mivel ezen sejtek nem képesek Th1 immunválaszt indukálni, még erőteljes Th1 stimulus jelenlétében sem.

Mivel az mDC-k alacsony számban fordulnak elő a perifériás vérben, és limitált a rendelkezésre álló vérmennyiség, különösen gyermekkorban, ezért kihívás ezeknek a sejteknek a direkt funkcionális vizsgálata a betegekben. Mégis e vizsgálatok eredményei talán jobban reflektálnak a fiziológias feltételekre. Ebből kiindulva, kísérleteinket frissen izolált perifériás vér eredetű CD1c (BDCA-1)<sup>+</sup> mDC-ken végeztük tárgylemez-alapú citometria segítségével. Harmadik megállapításunk az volt, hogy az LSC egy hasznos eszköz az mDC direkt funkcionális vizsgálatára in vitro. Tudomásunk szerint, mi vizsgáltuk először direkt módon a keringő mDC-k intracelluláris citokin profilját és aktivációját AD-s betegekben egy multiparaméteres lézer pásztázó citométer használatával. Ezzel a tárgylemez alapú technikával lehetővé válik kis sejtszámú minták ( $10^5$  vagy kevesebb) vizsgálata statisztikailag releváns eredménnyel.

Bár számos bizonyíték van az iNKT sejtek autoimmun betegségekben és fertőzésekben betöltött szerepéről, kevés adat van ezen sejtek eloszlásáról és funkciójáról atopiás betegségekben. Humán asztmában az iNKT sejtek szerepére vonatkozó adatok ellentmondásosak, mivel néhány kutató szerint az iNKT sejtek alacsony számban vannak jelen az asztmás egyének légútjaiban, míg mások ennek az ellenkezőjét állítják. Az iNKT sejtek nagy mennyiségben képesek Th1 és Th2 citokinek termelni stimulációt követően, mely arra utal, hogy szerepet játszhatnak más atopiás betegségek patogenezisében is, pl.: AD-ben. Eddig kevés és ellentmondó adat van az iNKT sejtek szerepéről AD-ben; az ellentmondásos eredmények a sejtek azonosítására használt különböző metodikák eltérő érzékenységből és specificitásából adódhatnak. Jelenleg a CD1d multimereket vagy az invariáns TCR $\alpha$  lánc specifikus 6B11 monoklonális antitesteket tartják a legmegfelelőbb markereknek az iNKT sejtek flow citometriás azonosítására.

A jelen vizsgálatban anti-CD3/6B11 mAb kombinációt használtunk az iNKT sejtek azonosítására, és kimutattuk, hogy ezen sejtek százalékos aránya és száma szignifikánsan

csökken az AD-s betegek perifériás vérében az egészséges kontrollokhoz viszonyítva. A mi vizsgálatainkban az iNKT sejtek száma a kontrollokban magasabbnak adódott, mint a más csoportok által közölt adatok. Nálunk az egészséges egyének átlagéletkora 18 év volt, ezért úgy gondoljuk, hogy a kontroll populáció fiatal kora magyarázat lehet az iNKT sejtek emelkedett számára. Másrészt a magas egyéni variancia az iNKT sejtek gyakoriságában szintén magyarázat lehet. Nem találtunk eltérést a totál T sejtek és a CD4/CD8 alcsoportok számában AD-ben, ezért az iNKT sejtek csökkent gyakorisága nem a T sejt populációk eltéréseiből adódott. Az eredményeinkkel összhangban 4 korábbi publikáció közölt adatokat az iNKT sejtek csökkent számáról AD-ben, és 2 csoport találta emelkedettnek ezen sejtek számát. Ezek az ellentmondásos eredmények arra utalnak, hogy további vizsgálatok szükségesek, mivel nemcsak az alkalmazott módszerek különbözősége okozhat eltérő iNKT számadatokat, de a kiválasztott betegek (extrinzik-intrinzik AD, enyhe-középsúlyos-súlyos AD) közötti eltérések is. Fontos hangsúlyozni, hogy a fent említett tanulmányok közül csak egy alkalmazta ugyanazt a módszert, mint mi.

Az iNKT sejtek CD4/CD8 alcsoportjainak fenotípusos elemzésével párhuzamosan azt vizsgáltuk, hogy melyik alcsoport a fő oka a csökkent iNKT sejtszámnak AD-ben. Az egészséges kontrollokban azt találtuk, hogy a  $CD4^+CD8^-$  és a dupla negatív (DN) a leggyakoribb iNKT alcsoport, és a két típus egyforma arányban fordul elő; a  $CD8^+CD4^-$  iNKT sejtek közepes arányban találhatóak meg, míg a dupla pozitív (DP) sejtek fordultak elő a legkisebb számban. Montoya és munkatársai egészséges kontrollokban hasonló eloszlásokat közöltek az iNKT alcsoportokat vizsgálva, ugyanakkor olyan tanulmányok is készültek, ahol az alcsoportok eltérő gyakoriságban fordultak elő. AD-s betegek perifériás vérében a legnagyobb eltérést a DN iNKT alcsoport esetén figyeltük meg. Bár AD-ben minden iNKT alcsoport csökkent számban fordult elő, csak a  $CD4^-$  (DN and  $CD4^-CD8^+$ ) iNKT alcsoportok értékei voltak szignifikánsan alacsonyabbak. A legerősebb pozitív korrelációt a DN iNKT és a totál iNKT sejtek között találtuk. Ezek az eredmények összecsengenek a korábbi tanulmányok eredményeivel. Takahashi és munkacsoportja vizsgálataiban a  $CD4^-CD8^+$  és a DN iNKT alcsoportok száma csökkenő tendenciát mutatott, míg Oishiék nagymértékű csökkenést detektáltak a DN iNKT alcsoport számát vizsgálva asztmás és AD-s betegekben. Ezen eredményekkel szemben néhány kutatócsoport szignifikánsan csökkent  $CD4^+$  iNKT összetételt talált az AD-s betegek perifériás vérében. A fent felsorolt ellentmondó eredmények oka ismeretlen, de egyrészt adódhat az eltérő betegcsoport választásból, másrészt az eltérő kapuzási technikából, mellyel a  $CD4^+$  és  $CD8^+$  iNKT alcsoportok el lettek választva, nevezetesen, hogy a kis mértékben pozitív sejteket is kapuzták-e.

Az iNKT alcsoportok elkülönítése azért nagyon fontos, mert a különböző alcsoportok eltérő funkcióval rendelkezhetnek; továbbá a különböző alcsoportok közötti keresztszabályozás nagyban befolyásolja a saját és idegen antigénekre adott immunválaszt.

egészséges egyénekben a keringő CD4<sup>+</sup> iNKT sejtek mind Th1, mind Th2 citokineket (IFN $\gamma$ , IL-4, és IL-13) képesek termelni, míg a DN iNKT alcsoport sejtjei főleg Th1 citokineket (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ ) expresszálnak. A patogének eliminációját és a tumor rezekciót általában a Th1-es immunválaszhoz kötik, míg az iNKT sejtek által közvetített Th2 válaszok közé a tolerogén mechanizmusok tartoznak. Mivel az iNKT sejtekre vagy éppen az alcsoportok sejt számára vonatkozó adatok funkcionális vizsgálatok nélkül hiányosak, így intracelluláris IFN $\gamma$  és IL-4 citokin méréseket is végeztünk. Az össz IFN $\gamma$  expressziója csökkent, míg az IL-4 termelést emelkedettnek adódott AD-ben az egészséges kontrollokhoz viszonyítva, bár ezek az eltérések nem voltak szignifikánsak. Másrészt, ezek a funkcionális eltérések szignifikánsnak adódtak, ha a DN alcsoportot vizsgáltuk. A DN iNKT sejtek AD-ben szignifikánsan kevesebb IFN $\gamma$ -t és szignifikánsan több IL-4-t termeltek a kontrollokhoz viszonyítva. Legjobb tudomásunk szerint, ez az első közlemény, mely kimutatta, hogy a DN iNKT sejtek citokintermelése eltér AD-s betegekben. Az iNKT sejtek csökkent számára és eltérő funkciójára vonatkozó eredményeink jó összhangban vannak a korábbi tanulmányokkal, melyek azt találták, hogy az atopiás betegek emelkedett plazma IL-18 szintje korrelál az iNKT sejtek csökkent számával és diszfunkciójával. Lind és munkatársai azt találták, hogy a megemelkedett plazma IL-18 gátolja az iNKT sejteket, és hogy ez a diszreguláció szerepet játszhat az AD patogenezisében.

Az továbbra is megválaszolendő kérdés, hogy a totál iNKT sejtek vagy az alcsoportok számának és citokin expressziójának eltérései elsődleges patogenetikus faktorok az AD kialakulásában vagy a betegség a perifériás vérben megemelkedő Th2 típusú citokinek következménye. Az iNKT sejtek csökkent száma és eltérő citokin termelése a továbbiakban vezethet a károsodott immunregulátoros kapacitásukhoz, mely hozzájárul az AD-re jellemző karakterisztikus citokin milió és a krónikus gyulladás kialakulásához.

Összefoglalva, AD-ben az iNKT sejtek szignifikánsan eltérő száma és citokin termelése arra utal, hogy ezeknek a sejteknek fontos szerepe lehet a betegség patogenezisében.

## ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk első részében az innate immunválasz egyik kulcsmolekulájának, az IL-16-nak, mint lehetséges biomarkernek a szerepét tanulmányoztuk AD-ben. Eredményeink szerint a betegek szérumában az egészségesekhez és a psoriasisos betegekhez képest a szérum IL-16 szint szignifikánsan magasabbnak adódott. Amikor az IL-16 szint és a súlyossági paraméterek (SCORAD, totál IgE, eozinofil sejtszám) közötti összefüggést vizsgáltuk, úgy tűnt, hogy az IL-16 szint nem tudja megfelelően jellemezni a betegség aktivitását, ezért megvizsgáltuk, hogy a betegek allergiás szenzitizáltságát képes-e jelezni. Azt találtuk, hogy bár a szérum IL-16 mutat összefüggést az allergiás szenzitizáció mértékével, kevésbé alkalmas marker a betegség súlyosságának és az allergiás szenzitizáció mértékének jelzésére.

A DC-kel végzett kísérleteink eredményei alapján három következtetést vontunk le: Az atopiás betegek nem stimulált, keringő mDC-i képesek az összes általunk vizsgált T sejt (Th1, 2, 17, 22) polarizáló citokin termelésére, azonban a jellegzetes Th2/Th22 polarizáló képesség már ekkor felismerhető és a sejtek egy csoportja pre-aktivált állapotban van a vérben. Egy AD-re jellemző szöveti környezetben az atopiás mintákban a Th2/Th22 polarizáló képesség tovább fokozódott, a Th1 polarizáló képesség károsodott. Harmadik megállapításunk az volt, hogy az általunk használt LSC egy hasznos eszköz az mDC direkt funkcionális vizsgálatára in vitro.

Az iNKT sejtekkel végzett kutatásaink alapján megállapítottuk, hogy ezen sejtek százalékos aránya és száma szignifikánsan csökken az AD-s betegek perifériás vérében az egészséges kontrollokhoz viszonyítva. Az iNKT sejtek CD4/CD8 alcsoportjainak fenotípusos elemzésével kimutattuk, hogy a CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> és a DN a leggyakoribb iNKT alcsoport. Ezen sejtek funkcionális vizsgálata alapján megállapítottuk, hogy az iNKT sejtek össz IFN $\gamma$  termelése csökkent, míg az össz IL-4 termelése emelkedett AD-ben a kontrollokhoz viszonyítva, ugyanakkor ezek a funkcionális eltérések csak akkor adódtak szignifikánsnak, amikor a DN alcsoportot vizsgáltuk.

Jelen vizsgálataink tehát hangsúlyozzák, hogy a veleszületett immunválasz kifejezetten károsodott AD-ben, melyről korábban azt gondolták, hogy főleg az adaptív immunválasz elemei befolyásolják.



Nyilvántartási szám: DEENK/38/2017.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Nagy Georgina  
Neptun kód: G8HUZY  
Doktori Iskola: Petrányi Gyula Klinikai Immunológiai és Allergológiai Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

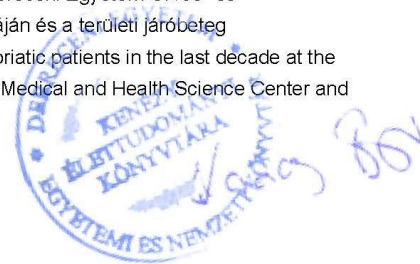
1. **Nagy, G.**, Doan-Xuan, Q. M., Gáspár, K., Mócsai, G., Kapitány, A., Töröcsik, D., Bacsó, Z., Gyimesi, E., Remenyik, É., Bíró, T., Szegedi, A.: The atopic skin-like microenvironment modulates the T-cell-polarising cytokine production of myeloid dendritic cells, as determined by laser scanning cytometry.  
*Exp. Dermatol.* 23 (4), 276-278, 2014.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/exd.12342>  
IF: 3.762
2. Gyimesi, E., **Nagy, G.**, Remenyik, É., Sipka, S., Zeher, M., Bíró, T., Szegedi, A.: Altered peripheral invariant natural killer T cells in atopic dermatitis.  
*J. Clin. Immunol.* 31 (5), 864-872, 2011.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10875-011-9551-5>  
IF: 3.077
3. **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





További közlemények

4. Kapitány, A., Béke, G., **Nagy, G.**, Doan-Xuan, Q. M., Bacsó, Z., Gáspár, K., Boros, G., Dajnoki, Z., Bíró, T., Rajnavölgyi, É., Szegedi, A.: CD1c+ Blood Dendritic Cells in Atopic Dermatitis are Premature and Can Produce Disease-specific Chemokines.  
*Acta Derm.-Venereol. [Epub ahead of print]*, 2016.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.2340/00015555-2540>  
IF: 3.638 (2015)
5. Emri, E., Mikó, E., Bai, P., Boros, G., **Nagy, G.**, Rózsa, D., Juhász, T., Hegedűs, C., Horkay, I., Remenyik, É., Emri, G.: Effects of non-toxic zinc exposure on human epidermal keratinocytes.  
*Metallomics*. 7 (3), 499-507, 2015.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/C4MT00287C>  
IF: 3.54
6. 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.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.2340/00015555-1882>  
IF: 3.638
7. Mócsai, G., Gáspár, K., **Nagy, G.**, Irinyi, B., Kapitány, A., Bíró, T., Gyimesi, E., Lajszné 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.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/bjd.12743>  
IF: 4.275
8. 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.





9. Herédi, E., Csordás, A., Clemens, M., Ádám, B., Gáspár, K., Törőcsik, 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
10. Boros, G., Mikó, E., Muramatsu, H., Weissman, D., Emri, E., Rózsa, D., **Nagy, G.**, Juhász, A., Juhász, I., Horst, G. T. J. v. d., Horkay, I., Remenyik, É., Karikó, K., Emri, G.: Transfection of pseudouridine-modified mRNA encoding CPD-photolyase leads to repair of DNA damage in human keratinocytes: a new approach with future therapeutic potential.  
*J. Photochem. Photobiol. B.* 129, 93-99, 2013.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.09.010>  
IF: 2.803
11. Törőcsik, D., **Nagy, G.**, Remenyik, É., Szegedi, A.: A psoriasis kezelésében alkalmazható jelenlegi és új szisztémás terápiás eljárások.  
*Immunol. Szle.* 3 (5), 22-26, 2011.
12. Matta, C., Juhász, T., Szíjgyártó, Z., Kolozsvári, B., Somogyi, C., **Nagy, G.**, Gergely, P., Zákány, R.: PKCdelta is a positive regulator of chondrogenesis in chicken high density micromass cell cultures.  
*Biochimie.* 93 (2), 149-159, 2011.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2010.09.005>  
IF: 3.022
13. Juhász, T., Matta, C., Mészár, Z., **Nagy, G.**, Szíjgyártó, Z., Molnár, Z., Kolozsvári, B., Bakó, É., Zákány, R.: Optimized transient transfection of chondrogenic primary cell cultures.  
*Cent. Eur. J. Biol.* 5 (5), 572-584, 2010.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.2478/s11535-010-0053-x>  
IF: 0.685
14. Gaál, J., Lakos, G., Szodoray, P., Kiss, J., Horváth, I., Horkay, E., **Nagy, G.**, Szegedi, A.: Immunological and clinical effects of alphacalcidol in patients with psoriatic arthropathy: results of an open, follow-up pilot study.  
*Acta Derm. Venereol.* 89 (2), 140-144, 2009.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.2340/00015555-0555>  
IF: 3.007





15. Juhász, T., Matta, C., Veress, G., **Nagy, G.**, Szíjgyártó, Z., Molnár, Z., Fodor, J., Zákány, R., Gergely, P.: Inhibition of calcineurin by cyclosporine A exerts multiple effects on human melanoma cell lines HT168 and WM35.  
*Int. J. Oncol.* 34 (4), 995-1003, 2009.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.3892/ijo\\_00000225](http://dx.doi.org/10.3892/ijo_00000225)  
IF: 2.447
16. Szegedi, A., Baráth, S., **Nagy, G.**, Szodoray, P., Gál, M., Sipka, S., Bagdi, E., Banham, A. H., Krenács, L.: Regulatory T cells in atopic dermatitis: epidermal dendritic cell clusters may contribute to their local expansion.  
*Br. J. Dermatol.* 160 (5), 984-993, 2009.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2133.2009.09035.x>  
IF: 4.26
17. Dobrosi, N., Tóth, I. B., **Nagy, G.**, Dózsa, A., Géczy, T., Nagy, L., Zouboulis, C. C., Paus, R., Kovács, L., Bíró, T.: Endocannabinoids enhance lipid synthesis and apoptosis of human sebocytes via cannabinoid receptor-2-mediated signaling.  
*FASEB J.* 22 (10), 3685-3695, 2008.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1096/fj.07-104877>  
IF: 7.049
18. Szegedi, A., **Nagy, G.**, Baráth, S., Gaál, J.: A D3 vitamin immunomoduláló hatása.  
*Magyar Immunol.* 6 (1-2), 4-10, 2007.
19. Gaál, J., Lakos, G., Aleksza, M., Kiss, J., Horváth, I., Horkay, E., **Nagy, G.**, Szegedi, A.: Az alfa-kalcidol psoriasisos arthropathiában: klinikai és immunológiai hatások.  
*Magyar Immunol.* 6 (5), 31-37, 2007.
20. Sárközi, S., Almássy, J., Lukács, B., Dobrosi, N., **Nagy, G.**, Jóna, I.: Effect of natural phenol derivatives on skeletal type sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase and ryanodine receptor.  
*J. Muscle Res. Cell. Motil.* 28, 167-174, 2007.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10974-007-9113-x>  
IF: 1.731

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 51,482**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre): 9,242**

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, 2017.03.01.



## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőmnek, Szegedi Andrea professzor asszonynak, aki kiemelkedő szakmai tudásával, ötleteivel, odafigyelésével munkámat az elmúlt évek során végtelen türelemmel segítette, aki mindvégig ösztönzött mind szakmailag, mind emberileg, és nélkülözhetetlen támogatást nyújtott tudományos eredményeim eléréséhez.

Szeretnék továbbá köszönetet mondani a debreceni Bőrgyógyászati Klinika igazgatóinak, Remenyik Éva professzor asszonynak és Hunyadi János professzor úrnak, az OMNINVEST Kft.-nek, hogy lehetővé tették számomra a doktori értekezésemhez szükséges kísérletek elvégzését.

Köszönettel tartozom Bőrgyógyászati Klinikai kutató laboratóriumában dolgozó munkatársaimnak és a Szegedi Andrea professzor asszony által vezetett munkacsoport tagjainak (Dr. Gáspár Krisztián, Mócsai Gábor, Dr. Kapitány Anikó, Dajnoki Zsolt, Dr. Boross Gábor, Dr. Emri Eszter, Dr. Mikó Edit) idejükért, tanácsaikért és támogatásukért.

Külön köszönet illeti a kollaborációs munkában résztvevő hazai és külföldi munkatársaimat, a Debreceni Egyetem Belgyógyászati Intézet, III. Belgyógyászati Klinika Regionális Immunológiai Laboratóriumból Dr. Baráth Sándort és Dr. Gyimesi Editet, az Immunológiai Intézetből Rajnavölgyi Éva professzor asszonyt és Nagyné Kovács Erzsébetet, az Élettani Intézetből Bíró Tamás professzor urat, Dr. Dobrosi Nórát és Dr. Tóth István Balázst, valamint a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet laborjának munkatársait, Dr. Bacsó Zsoltot és Minh Doant munkájukért, szakmai tudásukért és építő tanácsaikért.

Szeretnék köszönetet mondani Családomnak szeretetükért és támogatásukért.

Munkámat támogatta az Országos Tudományos Kutatási Alapprogram, OTKA K108421 és OTKA-PD 112077, a TÁMOP-4.2.2-08/1-2008-0019, a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-83-0023-”DEFENSE-NET”, a GINOP-2.3.2-15-2016-0050 számú projektek (A projektek az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósultak meg.), valamint a TÁMOP-4.2.2/B- 10/1-2010- 0024. - A Debreceni Egyetem tudományos képzési műhelyeinek támogatása pályázat.