

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**GENETIKAI HÁTTÉR SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA
GYULLADÁSOS REUMATOLÓGIAI KÓRKÉPEK
PATHOGENEZISÉBEN**

Készítette:

DR. SZABÓ ZOLTÁN

Programvezető:

Prof. Dr. Zeher Margit

Témavezető:

Prof. Dr. Glant Tibor, Dr. Szekanecz Zoltán

Debreceni Egyetem

Orvos- és Egészségtudományi Centrum

Belgyógyászati Intézet

III. sz. Belgyógyászati Klinika

Reumatológiai Tanszék

DEBRECEN

2007.

1. Bevezetés	3
2. Célkitűzések	6
3. Anyagok, betegek és módszerek	7
Vizsgálat I.	7
3.1. Antigének, immunizálás.....	7
3.2. Az arthritis megjelenésének (onset) és súlyosságának értékelése.....	9
3.3. A proteoglikán indukálta spondylarthropathia radiológiai megjelenése.....	9
3.4. A proteoglikán indukálta spondylarthropathia hisztopatológiai értékelése.....	10
3.5. Az antigén specifikus T- és B-sejt válaszok mérése során használt módszerek.....	12
3.6. Statisztikai analízis.....	14
Vizsgálat II.	14
3.7. A RA-es betegek klinikai adatai	14
3.8. Polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction) szekvencia specifikus primerek használatával (PCR-SSP).....	15
3.9. Statisztikai analízis (vizsgálat II.).....	15
4. Eredmények	16
4.1. A proteoglikán indukálta arthritis és spondylitis megjelenése különböző egértörzsekben az immunizálás módjától és az alkalmazott adjuvánstól függően.....	16
4.2. A PGIS „klinikai” jellemzése (BALB/c x DBA/2)F2 és (BALB/c x C3H)F2 egerekben.....	19
4.3. A PGIS immunológiai jellemzése (BALB/c x DBA/2)F2 és (BALB/c x C3H)F2 egerekben.....	22
4.4. A HLA-DRB1 allélek megoszlása RA-es betegeinkben és a kontroll csoportban.....	23
5. Megbeszélés	25
6. Új eredmények	31
7. Összefoglalás	32
8. Tárgyszavak	33
9. Köszönetnyilvánítás	34
10. Irodalmi hivatkozások	35

1. Bevezetés

A spondylitis ankylopoetica (SPA) a spondylarthropathiák prototípusa. A jól ismert patogenetikai faktorok (genetikai háttér, férfi nem, gyulladás a sacroiliacalis és más ízületekben, fokozott elcsontosodás, stb..) ellenére a betegség pontos oka továbbra is tisztázatlan. Humán SPA-ról szóló genetikai tanulmányok szerint valószínűleg a major hisztokompatibilitási komplex (MHC) áll elsődlegesen a betegségre való fogékonyság háttérében (1). Ugyanakkor a nem-MHC gének hatása szintén igen fontos bármely autoimmun betegségre való fogékonyság tekintetében (2). SPA-s családtanulmányok (genomszűrés) számos szóba jöhető kromoszóma régiót említene: MHC: 6p, nem-MHC: 2q, 10q, 11q, 16q, 17q, 19q (3;4).

Mindeddig spontán, vagy kísérletesen indukált spondylarthropathia csak kevés állatmodellben került leírásra (5-8) és úgy gondolják, hogy autoimmun mechanizmus csak a HLA-B27 transzgén rágcsálókban (9-11), valamint proteoglikán (PG) indukálta arthritisben (PGIA) ill. spondylitisben (PGIS) áll a háttérben (12-14). A csíramentes körülmények között tartott HLA-B27 transzgén állatokban nem alakul ki spondylitis. Ez arra utal, hogy a bakteriális antigénekhez kötődő molekuláris mimikri fontos patogenetikai mechanizmus lehet a transzgén rágcsálókban és talán humán vonatkozásban is (11;15). Annak ellenére, hogy ezen modellek egyike sem tökéletesen azonos a humán SPA-val, mégis utánozhatják a humán kórképben jelenlévő genetikai és/vagy patológiai rendellenességeket.

Genetikailag fogékony BALB/c vagy C3H/HeJCr (C3H) egerek immunizálása porc proteoglikán aggregáttal progresszív polyarthritis-t indukál (PGIA), melyet

gyakran kíséri spondylitis (PGIS) (13;14). A PGIA 100%-os incidenciát mutat e két fogékony egértörzs esetében, és mivel a spondylitis kialakulásának kezdete nem határozható meg pontosan in vivo az egerekben, a gerincérintettséget a PGIA kíséző jelenségének tekintették. Azonban kevert genetikai háttér esetében a PGIA megjelenését spondylitis nélkül is észleltük, illetve, vice versa, a spondylitis-es egerek egy részénél nem alakult ki (perifériás) arthritis. Ezen legutóbbi eredményeink arra utalnak, hogy két hasonló pathomechanizmusú, de különálló betegségről lehet szó (16).

A rheumatoid arthritis (RA) az ízületek krónikus gyulladással autoimmun betegsége, mely a tartós synovitis révén végső soron porc- és csontdestrukcióhoz vezet. A RA etiológiája pontosan nem ismert, azonban, az SPA-hoz hasonlóan mind genetikai, mind környezeti tényezőknek jelentős szerepet tulajdonítanak a kórkép kialakulásában (17-19). Az MHC-t az emberi genomban a human leukocita antigen (HLA) géncsoport kódolja a 6. kromoszómán (17). Az MHC II. osztályú molekulák közül számos etnikai csoportban/népcsoportban jól ismert a különböző HLA-DR allélek asszociációja a RA-re való fogékonysággal (17;19-35). Néhány HLA-DRB1 allélt pedig a RA súlyosságával és kimenetelével is összefüggésbe hoznak (19;24;36).

A betegség asszociált HLA molekulák egy közös, 5 aminosavból álló szekvenciával rendelkeznek a DRB1 lánc 3. hipervariábilis régiójában, ez az ún. "shared epitope" (SE) (17;28). A SE variánsok között a QKRAA mintázat található a DRB1*0401 és DRB1*0409 allélben; a QRRAA szekvencia a DRB1*0101, DRB1*0102, DRB1*0404, DRB1*0405, DRB1*0408, DRB1*0410, DRB1*1402 és DRB1*1406 variánsokban, míg az RRRAA motívum a DRB1*1001 altípusra specifikus (17;19;28).

Jelentős etnikai és földrajzi különbségek figyelhetők meg az egyes variánsok előfordulásában. Az észak-európai populációban a RA erős HLA-DRB1*04 kapcsoltsága jellemző (20;29), míg a mediterrán RA-es betegek inkább a DRB1*01 és DRB1*10 alléleket hordozzák(15). Ezen túlmenően, az észak-amerikai indiánok/bennszülöttek esetében a DRB1*14 asszociációja jellemző a RA-re való fogékonysággal (31). Egy legutóbbi vizsgálat eredménye szerint, magyar RA-es betegekben a HLA-DRB1*0404 altípus mutatott erős asszociációt a RA-el (25).

Általánosságban elmondható, hogy a kaukázusi populációt tekintve a HLA-DR4 allél megtalálható a RA-es betegek 75%-ában, valamint 30%-ban az egészséges népességben is. A DRB1*04 allélek között, kaukázusi populációban a DRB1*0401 és DRB1*0404 asszociációját irták le a RA-re való megnövekedett fogékonysággal kapcsolatban (19;20;32), míg japán (33) és kínai (34) betegek esetében a DRB1*0405 allél előfordulása gyakoribb. A HLA-DR1 altípusok közül, a DRB1*0101 allél asszociációt említik RA esetében, Ashkenazy zsidó (35) és különböző kaukázusi betegpopulációkban (19;20;24;25;27;29;30).

2. Célkitűzések

Vizsgálat I.: Spondylarthropathia pathogenetikai hátterének vizsgálata kísérletes állatmodellben

Munkánkat azzal a céllal végeztük, hogy minél több információhoz jussunk az általunk vizsgált autoimmun spondylitis modell (PGIS) segítségével a betegség etiológiai hátterével, patomechanizmusával kapcsolatban. A genetikai fogékonyság meghatározásának klinikai és prognosztikai vonatkozásai is vannak.

Célunk volt tehát:

- A PGIS megjelenésének és incidenciájának jellemzése PG immunizálásra fogékony egértörzsekben, ill. ezeknek rezisztens törzsekkel létrehozott F1 és F2 generációiban.
- A klinikai kép, incidencia és súlyosság valamint a meghatározott immunológiai illetve gyulladásos paraméterek összevetése.
- A genetikai háttér szerepének vizsgálata, fogékonysági és a betegség súlyosságával összefüggést mutató genetikai lokuszok feltérképezésének érdekében.

Vizsgálat II.: RA asszociációja HLA-DR1-el és HLA-DR4-el Magyarországon, saját beteganyagunk vizsgálata alapján

Vizsgálataink második részében a különböző HLA-DRB1*01 and DRB1*04 allélek előfordulását határoztuk meg saját észak-kelet magyarországi RA-es betegpopulációnkban.

Reményeink szerint, eredményeink hozzájárulhatnak egyes humán autoimmun kórképek (mint pl. az SPA és RA) patomechanizmusának jobb megértéséhez, ezáltal újabb terápiás lehetőségek feltérképezéséhez is.

3. Anyagok, betegek és módszerek

Vizsgálat I.

Proteoglikán aggregánnal történő szisztémás immunizálással PGIS-t hoztunk létre fogékony BALB/c és C3H egerekben, valamint ezeknek DBA/2 (arthritis és spondylitis rezisztens) és DBA/1 (csak kollagén indukálta arthritisre [CIA] fogékony) törzsekkel létrehozott F1 és F2 generációiban. Meghatároztuk az arthritis és spondylitis incidenciáját és súlyosságát és korrelációt kerestünk a klinikai manifesztációk, valamint az általunk mért szérum antitest titerek és citokin szintek, valamint a porc proteoglikán elleni *in vitro* T sejt válaszok között.

3.1. Antigének, immunizálás

A teljes porc extraktumot humán felnőtt porcból nyertük 4M-os guanidin klorid extrakcióval (37;38). Az extraktumot ismételt CsCl gradiens ultracentrifugálással tovább tisztítottuk disszociatív körülmények között (37;38). A tisztított PG extraktumot a glükózaminoglikán (GAG) oldalláncok eltávolítása érdekében chondroitinase ABC-vel (Seikagaku America, Falmouth, MA, USA) kezeltük (5 egység/100 mg PG 0.1 mM Tris-acetát puffer, pH 7.6, 24 h, 37 °C) (13;37;38). A PG-t ezt követően endo- β -galaktozidázzal (Seikagaku America) emésztettük (0.1 egység/100 mg PG, nátrium acetát puffer, pH 5.8) a felnőtt porcban jelenlevő keratán szulfát oldalláncok eltávolításához (37-39). Mivel a keratán szulfát és a kondroitin szulfát oldalláncok PG számos domináns/arthritisogén epitópját elfedhetik, ezen GAG oldalláncok eltávolítása kritikus fontosságú a PG központi fehérjelánc domináns/arthritisogén T sejt epitópjainak felszínre

hozásában (12;39;40). A PG extraktumot diethylaminoethyl (DEAE; Whatman, Clifton, NJ, USA) ioncserélő kromatográfiával nyertük ki (41). A meg nem kötött frakciót 0.15 M-os NaCl-al nyertük ki, és hyaluronan-Sepharose-al absorbeáltuk (42) a GAG-mentes G1 domének és a porc link protein eltávolításához (39). A mintákat vízzel szemben dializáltuk és liofilizáltuk.

A kísérleteket a chicagói Rush Egyetem Orvosi Központjának Állatgondozói és Felhasználói Bizottságának jóváhagyásával végeztük. A különböző kísérleti egércsoportokat azonos körülmények között tartottuk.

A kísérletek során a „standard” immunizálási protokollok szerint jártunk el (13;37;43;44). Arthritis, illetve spondylitis kiváltásához az egereket 12-16 hetesen, 3 hetes időközökkel intraperitoneálisan (IP) immunizáltuk, 100 µl steril PBS-ben (pH 7,4) oldott 100 µg PG proteinnel és 1 mg dimethyldioctadecylammonium bromiddal (DDA; Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA) (40), illetőleg 100 µl PBS-ben (pH 7,4) és 100 µl komplett Freund adjuvánsban emulgeált 100 µg PG protein antigénnel. A II. típusú kollagénnel (CII) történő immunizáláshoz a CII-t 0,1M ecetsavban oldottuk, PBS-el hígítva. A 100 µl-ben oldott 100 µg CII-t azonos mennyiségű CFA-ban, vagy DDA-ban emulzifikáltuk a 0. és 21. napon intradermalisan (faroktöbe) ill. 3. alkalommal IP adott injekciókhoz. Az immunizált állatok összesen 3 antigén injekciót kaptak (0., 21. és 42. nap) CFA vagy DDA adjuvánszal. A kísérleti állatcsoportok a 98. és 126. nap között kerültek leölésre.

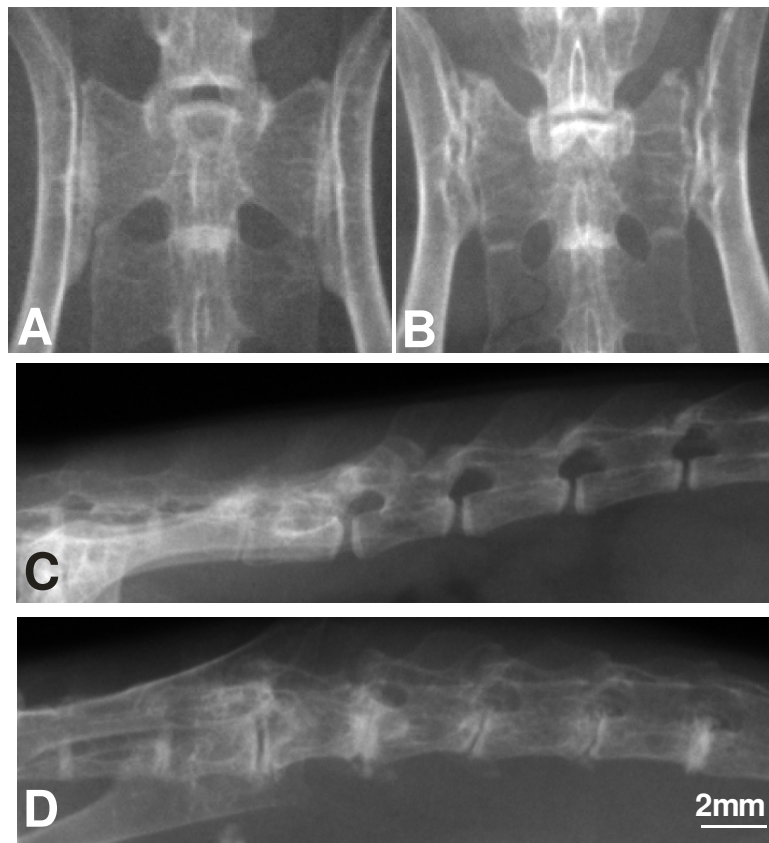
3.2. Az arthritis megjelenésének (onset) és súlyosságának értékelése

Valamennyi immunizált egér végtagjait a második antigén injekcióig (21. nap) hetente egy alkalommal, majd hetente 2 alkalommal megvizsgáltuk, hogy az arthritis kialakulását és progresszióját pontosan észlelhessük.

Az immunizálás következtében kialakult arthritis súlyosságának jellemzésére az általánosan elfogadott értékelési módszert használtuk. A vizsgált végtagon megjelenő duzzanatot 0-4 terjedő skálán értékeltük, így a lehetséges maximum pontérték (kumulatív arthritis score) 16 volt állatonként. Az első klinikai tünet (duzzanat) megjelenésének időpontját rögzítettük, mint az arthritis kialakulásának idejét (onset) és egy 6-tól (legkorábbi időpont) 0-ig (kísérlet vége) tartó empirikus skálát hoztunk létre lefedve a 60 napos időtartamot a 2. PG injekció után 10 nappal kezdődően (13;37;40).

3.3. A proteoglikán indukálta spondylarthropathia radiológiai megjelenése

A spondylitis megjelenését a gerinc és sacroiliacalis ízületi preparátumok röntgenvizsgálatával igazoltuk (Hewlett Packard Faxitron készülék, 18 sec, 65 kV, Buffalo Grove, IL), nagy felbontású filmet használva (Kodak X-omat TL, Rochester, NY). A PGIS kifejlődése során, az axialis (gerinc-) érintettség radiológiai jeleit 4-8 héttel az arthritis megjelenése után megfigyelhetjük: ízfelszínek egyenetlensége a sacroiliacalis ízületben (*sacroileitis*), intervertebralis rések beszűkülése a korai stádiumban (1. ábra). Későbbi szakban a csigolya közti porckorongok degenerációja következtében ankylosis alakul ki, mely a humán kórképhez (SPA) hasonló jelenség (1. ábra).

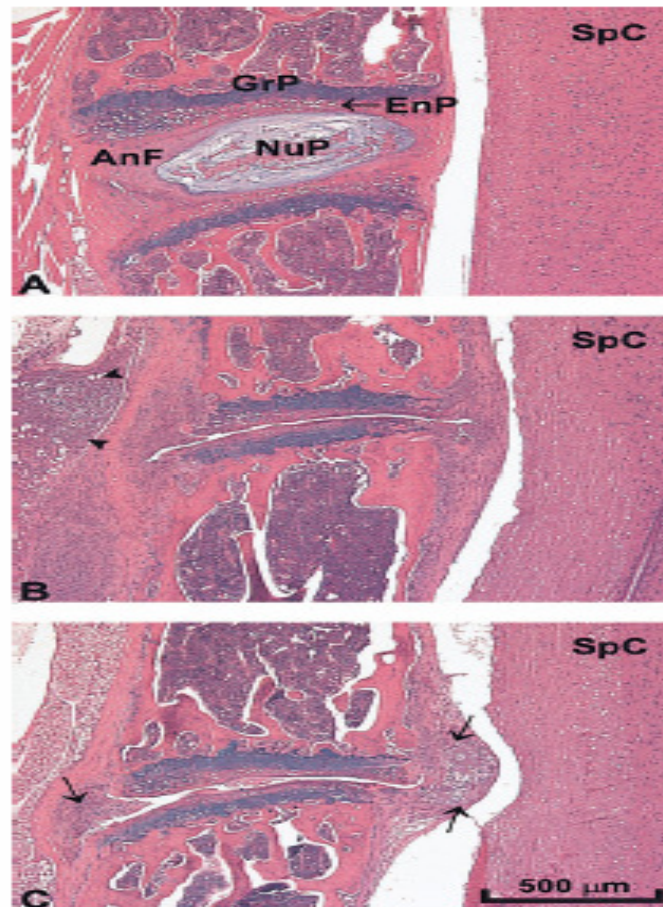


1. ábra A PGIS-re jellemző radiológiai eltérések. A: normál sacroiliacalis ízület röntgen képe; B: sacroileitis röntgen képe; C: normál gerinc radiológiai képe; D: ankylotizált csigolyák röntgen képe

3.4. A proteoglikán indukálta spondylarthropathia hisztopatológiai értékelése

A radiológiai vizsgálatot követően a spondylitises és nem spondylitises állatok gerincét kipreparáltuk, fixáltuk, dekalifikáltuk, majd paraffinba ágyazva készültek a szövettani metszetek. A metszeteket hematoxilinnal és eozinnal festettük meg hisztopatológiai vizsgálat céljára.

A PGIS súlyosságának jellemzése a szövettani eltérések alapján volt lehetséges (2.ábra).



2. ábra A proteoglikán indukálta spondylitis histológiai képe. **A:** normál csigolya közti porckorong szövettani képe; **B:** a gyulladás kezdeti jeleitől számított 2-3 hét alatt a csigolya közti porckorong teljesen felszívódott; **C:** a krónikus stádiumban ankylosis, ill. spondylophyta képződés (nyilak) látszik.

A szövettani metszetek értékelése során látott morfológiai elváltozások alapján létrehoztunk egy pontozási rendszert („scoring”), mely alapján 4 stádiumra oszthatók fel a látott elváltozások :

- I. stádium (pontérték: 1): gyulladásoos infiltráció az intervertebrális porckorong körül
- II. stádium (pontérték: 2): a porckorong kevesebb mint 50%-ának felszívódása
- III. stádium (pontérték: 3): a porckorong csaknem teljes reszorpciója (50-100%)
- IV. stádium (pontérték: 4): ankylosis

Munkánk során 1255 gerincmetszet szövettani értékelése során több mint 18000 porckorong vizsgálata és az elváltozások súlyosságának pontozása történt meg. Mivel az egyes metszetek technikai okokból nem pontosan azonos számú porckorongot jelentettek, az összehasonlíthatóság érdekében kiszámoltuk az ún. spondylitis index (SPI) értéket. (SPI: kumulatív pontérték az adott metszet esetében / vizsgált porckorongok száma.)

3.5. Az antigén specifikus T- és B-sejt válaszok mérése során használt módszerek:

Az immunizált állatoktól szérummintát gyűjtöttünk a kísérletek végén, valamint a lépsejtekből nyert szuszpenziót használva vizsgáltuk a PG specifikus T sejt válaszokat. Az antigen specifikus T-sejt proliferációt (lépsejtkultúra) az ötödik napon határoztuk meg 3H-thymidine beépülés mérésével. A sejteket 50 µg PG protein/ml hozzáadásával stimuláltuk és négy párhuzamos mintában mértünk (3×10^5 sejt/lyuk, 96 lyukú tenyésztőlemez). Az antigén specifikus IL-2 termelést (vagyis a CTLL-2 sejtek válaszát a felülúszóban levő, a lépsejtek által termelt interleukin-2-re) CTLL-2 bioassay-vel

határoztuk meg 48 órás felülúszóban. Az antigén specifikus T sejt válaszok arányát stimulációs index érték (SI) formájában fejeztük ki, mely a beépült ^3H -thymidine percenkénti beütésszámának arányát jelenti az antigén stimulált tenyészetek és a nem stimulált lyukak esetében (37;45;46).

A lépsejtek antigén specifikus citokin termelését (interferon- γ : IFN- γ ; interleukin-4: IL-4; tumor necrosis faktor- α : TNF- α) a sejtenyészet felülúszójából (3×10^6 sejt/ml) mértük a tenyésztés negyedik napján. A lépsejtek által termelt citokinek mennyiségét, a szérumban lévő citokin szinteket (TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-6), és szérumban lévő amyloid-A (SAA) szintet (akut fázis fehérje egérben) kereskedelmi forgalomban kapható ELISA kiték segítségével határoztuk meg (BD Biosciences, San Diego, CA vagy R&D Systems, Minneapolis, MN).

A PG specifikus IgG antitest szérumban lévő szintek meghatározásához szintén ELISA módszert használtunk (37;43;44;47). 96 lyukú Maxisorp tenyésztőlemezeket (Nunc, Roskilde, Denmark) fedtünk humán vagy egér porc PG-vel (0,1 μg protein/lyuk.), majd a szabadon maradt kötőhelyeket PBS-ben (pH 7,4) oldott 1%-os zsírintes tejjel blokkoltuk. Növekvő szérumban hígításokat alkalmaztunk és meghatároztuk mind a teljes anti-PG antitestek mennyiségét, mind a PG-specifikus antitestek egyes izotípusainak koncentrációját peroxidáz-konjugált kecske anti-egér IgG-vel (Accurate, Wetbury, NY, USA), vagy patkány anti-egér IgG1 és IgG2a szekunder antitestekkel (Zymed, San Francisco, CA, USA). A szérumban lévő antitest koncentrációkat a megfelelő egér IgG izotípus standardokhoz (Zymed, San Francisco, CA, USA) vagy tisztított egér IgG-hez (Sigma-Aldrich) viszonyítva határoztuk meg.

3.6. Statisztikai analízis

A statisztikai számításokat az "SPSS 10.0 for Windows" (SPSS, Chicago, IL) program segítségével végeztük. Az egyes csoportok közötti összehasonlítást a Student féle t -tesztel végeztük. A korrelációs koefficiensek meghatározásához a Spearman féle rho tesztet használtuk. 0.05-nél kisebb p értékeket tekintettünk szignifikánsnak.

Vizsgálat II.

A különböző HLA-DRB1*01 és DRB1*04 allélek előfordulási gyakoriságát vizsgáltuk magyarországi betegpopulációban, 83 saját RA-ben szenvedő betegünk bevonásával (70 nő és 13 férfi, kaukázusi rassz).

3.7. A RA-es betegek klinikai adatai

83 magyar RA-es beteget vontunk be vizsgálatunkba. A betegek mindegyike megfelelt a RA 1987-es, módosított klasszifikációs kritériumainak [American College of Rheumatology (ACR)] (48). A betegek átlagéletkora 50 ± 15 (SD) év volt (17-82 év között). A betegség átlagos fennállási ideje a vizsgálat idején 6 ± 4 év volt (0.5-től 22 évig). A betegek perifériás vérmintájából DNS izolálás történt.

55 egészséges kontroll személytől (47 nő és 8 férfi, kaukázusiak) szintén vérmintát vettünk. Az átlagéletkor hasonló volt a kontroll csoportban is (46 ± 13 év). A kontroll személyek a klinikai dolgozók, vagy látogatók közül kikerült egészséges önkéntesek voltak. Minden beteg és kontroll személy írásos beleegyezését adta a vizsgálathoz, illetve a vizsgálat Etikai Bizottsági engedélyeztetés alapján történt.

3.8. Polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction) szekvencia specifikus primerek használatával (PCR-SSP)

DNS izolálás történt etilen-diamin- tetraacetáttal (EDTA) antikoagulált perifériás vérből, QIAamp Blood Mini Kit-et (QIAGEN) használva, a gyártó cég instrukcióit követve. Ezt követően HLA-DRB genotipizálást (DRB1*01-DRB1*16) végeztünk PCR-al, szekvencia specifikus primereket használva (Olerup SSP, Genovision, Norway) (49). Minden mintát a gyártó cég instrukcióinak megfelelően dolgoztunk fel, rekombináns Taq DNS polimerázt (Invitrogen) alkalmazva. A PCR amplifikációt Hybaid PCR express thermal cycler segítségével végeztük. A HLA genotípusok meghatározása a PCR termék mintázat alapján történt 2%-os agaróz gel elektroforézis során. A DNS sávokat Alpha Imager MultiImage Light Cabinet (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, USA) alkalmazásával detektáltuk/tettük láthatóvá.

3.9. Statisztikai analízis (vizsgálat II.)

A RA-es betegek HLA-DR allél frekvenciáját az egészséges személyekben találhoz viszonyítottuk. A különböző antigényakoriságok összehasonlítását χ^2 próba segítségével, Yartes korreláció vagy Fischer féle egzakt teszt használatával végeztük, SPSS 10.0 szoftverrel (SPSS, Chicago, IL, USA). Két adatcsoport között a különbséget szignifikánsnak tekintettük, ha a p érték 0,05-nél kisebb volt.

4. Eredmények

4.1. A proteoglikán indukálta arthritis és spondylitis megjelenése különböző egértörzsekben az immunizálás módjától és az alkalmazott adjuvánstól függően

Az arthritis és spondylitis incidenciája különböző egértörzsekben és ezek F1 és F2 generációjában jelentős eltéréseket mutat, figyelembe véve az immunizálás módját [porc PG (PGIA, PGIS) és II. típusú kollagén (CIA)] és az alkalmazott adjuváns fajtáját [komplett Freund adjuváns (CFA), dimetil-dioctadecil ammóniumbromid (DDA)] is. (1. táblázat).

Egértörzs	MHC	Immun. Adjuv. protokoll	*Incidencia (spondylitis)	*Incidencia (arthritis)
BALB/c	H-2d	PGIA DDA	38/61 (62%)	60/61 (98%)
¹ BALB/c	H-2d	PGIA CFA	86/130 (66%)	127/130 (98%)
DBA/2	H-2d	PGIA DDA	2/50 (4%)	0/50 (0%)
BALB/c x DBA/2 F1	H-2d x H-2d	PGIA DDA	10/31 (32%)	0/31 (0%)
² BALB/c x DBA/2 F2	H-2d x H-2d	PGIA CFA	48/160 (30%)	38/160 (24%)
BALB/c x DBA/2 F2	H-2d x H-2d	PGIA DDA	137/223 (61%)	98/223 (44%)
DBA/1	H-2q	CIA CFA	0/42 (0%)	41/42 (97.6%)
BALB/c x DBA/1 F1	H-2d x H-2q	PGIA CFA	0/19 (0%)	8/19 (42.1%)
² BALB/c x DBA/1 F2	H-2d x H-2q	PGIA CFA	0/102 (0%)	32/102 (31.3%)
² BALB/c x DBA/1 F2	H-2d x H-2q	CIA CFA	0/115 (0%)	45/115 (39.1%)
C3H/HeJCr (NCI)	H-2k	PGIA CFA	9/13 (69.2%)	36/38 (95%)
C3H/HeJCr (Jackson)	H-2k	PGIA CFA	2/19 (10.5%)	3/28 (11%)
BALB/c x C3H/HeJCr (NCI)	H-2d x H-2k	PGIA DDA	148/212 (69.8%)	185/212 (87%)
BALB/c x C57BL/6	H-2d x H-2b	PGIA CFA	4/47 (8.5%)	5/47 (10.6%)

1. táblázat

*Az incidencia a betegség által érintett és az összes immunizált állat számának hányadosa (zárójelben %-os formában), melyet a perifériás arthritis tüneteinek rendszeres értékelése, ill. a gerinc metszetek hisztológiai értékelése alapján számoltunk.

¹ A PGIA és PGIS incidenciája ebben a csoportban korábbi munkánk eredménye(16).

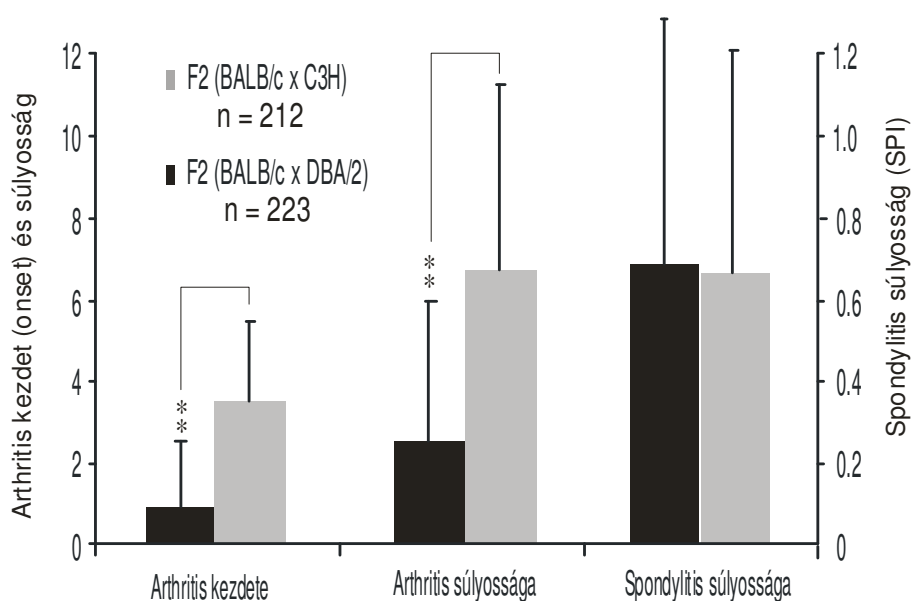
² A PGIA incidencia értékek ezen csoportokban korábbi munkák eredményei (14;37;45), míg a PGIS incidencia és súlyosság meghatározása jelen munkánk során retrospektíve történt, korábban formalinban fixált gerinc preparátumokból újonnan készült metszetek szövettani értékelésével.

Régóta ismert, hogy a proteoglikánnal immunizált BALB/c és C3H egerek 97-100%-ában fejlődik ki perifériás arthritis 2 héttel a 3. antigén injekciót követően (13;14;40). Masszív gyulladásosejtes infiltráció, pannus képződés és porc, ill. csont erosiok kialakulása jellemzi hisztológiailag az érintett ízületeket. Az 1. táblázatból kiténik, hogy sem a DBA/1 vagy DBA/2 szülők, sem a (DBA/2 x BALB/c) F1 hibridek esetében nem alakult ki arthritis a kísérleti periódus alatt.

A röntgen felvételek axialis érintettséget (sacroiliacalis ízületi rész, ill. csigolya közti rész beszűkülése) jeleztek a 3. PG + CFA injekciót követő 8. héten, míg PG + DDA esetében már 3-4 héttel a 3. injekció után. Bár a DDA felgyorsította a PGIS kialakulását, de a spondylitis még így is hetekkel a perifériás ízületi gyulladás után fejlődött ki. Fontos kiemelni, hogy spondylitis csak a PG-al immunizált állatokban alakult ki, a II. típusú kollagénnel (CII) immunizáltakban nem. Semmilyen eltérést nem lehetett észlelni egyetlen kontroll (arthritis rezisztens) állatban, ill. törzsben sem. A porcerosio legkorábban a sacroiliacalis ízületben volt megfigyelhető (16;37;43). A PGIS hasonlóan progresszív lefolyást mutatott az érintett állatokban. A sacroiliacalis ízület és a gerinc radiológiai eltérései szövettanilag is megerősítést nyertek. A gerincbetegség lefolyása során a lumbalis, proximalis thoracalis, distalis cervicalis gerincszakaszok váltak érintetté, de az egyes intervertebralis porckorongok nem egyenlő mértékben. Néhány porckorong megkíméltek, vagy csak enyhén károsodottnak tűnt ott is ahol egyébként a porckorongok nagy része felszívódott és a csigolyatestek összezsugorodtak (16).

A PG immunizált BALB/c ill. C3H egerek 62-70%-ában fejlődött ki spondylitis. Ezzel szemben csak enyhe és sporadikus csigolya érintettséget észleltünk a PG + DDA-val immunizált DBA/2 törzs esetében (4%, mindössze 2 egér). DBA/1 egerekben nem

alakult ki spondylitis semmilyen kísérleti feltételek között (PGIA, CIA, CFA, DDA) sem. A spondylitis incidenciája és súlyossága nagyon hasonló volt mindkét PGIS-ra fogékony szülői törzs esetében (BALB/c és C3H), függetlenül a használt adjuvánstól (1. táblázat). Mindemellett a DDA használata adjuvánsként korábbi kezdetű PGIS-t eredményezett a PG immunizálás során.



3. ábra Az arthritis kialakulásának kezdete (onset) valamint az arthritis és spondylitis súlyossága (BALB/c x DBA/2)F2 és (BALB/c x C3H)F2 egerekben. A perifériás ízületi érintettség szignifikánsan súlyosabb volt a 2 arthritis-re fogékony törzs (BALB/c és C3H) F2 hibridjeinek humán-PG immunizálása esetében (** = $p < 0.01$), a (BALB/c x DBA/2) F2 generációhoz képest. Ezen állatok esetében az arthritis korábban alakult ki, mint a betegségre rezisztens DBA/2 és fogékony BALB/c szülők F2 hibridjei esetében. Ezzel szemben sem a spondylitis incidenciája (1. táblázat), sem súlyossága nem különbözött lényegesen, összehasonlítva a két csoportot. SPI = spondylitis index (ld. 3.4. Anyagok és módszerek).

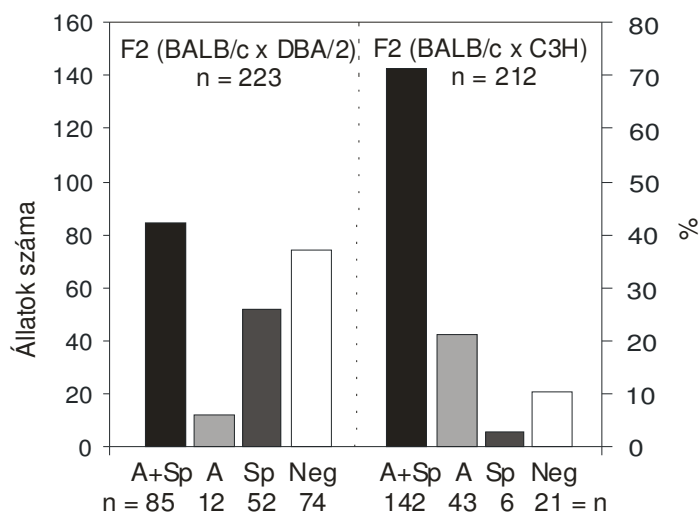
Annak ellenére, hogy a BALB/c x DBA/2 keresztezés F1 hibridjei teljesen rezisztensek voltak PGIA-ra nézve, váratlanul több mint 30%-uk esetében alakult ki PGIS. Ezzel ellentétben a (BALB/c x DBA/1) F1 egerekben egyáltalán nem alakult ki spondylitis. Ennél is meglepőbb volt, hogy a BALB/c x DBA/2 keresztezés F2 generációja (PGIS érzékeny versus rezisztens) és a (BALB/c x C3H) F2 egerek (két PGIS érzékeny szülői törzs) hasonlóan magas spondylitis incidenciát (63-70%) és súlyosságot mutattak (1. táblázat, 3. ábra), mialatt a (BALB/c x DBA/1) keresztezés egyetlen F2 hibridje sem mutatta gerincérintettség jeleit.

Ez a megfigyelés annál is inkább váratlan volt, mivel mindkét keresztezés (BALB/c x DBA/2 és BALB/c x DBA/1) F2 generációja hasonló PGIA incidenciát (1.táblázat) és súlyosságot mutatott azonos protokoll szerint immunizálva. Minthogy az MHC azonos BALB/c és DBA/2 (H-2d haplotípus), valamint az MHC tekintetében eltérő BALB/c (H-2d) és C3H (H-2k) szülők F2 hibridjei hasonlóan magas PGIS incidenciát és súlyosságot mutattak (1.táblázat, 3. ábra), a továbbiakban ezen két keresztezés esetében fókuszáltunk a PGIS alakulására.

4.2. A PGIS „klinikai” jellemzése (BALB/c x DBA/2)F2 és (BALB/c x C3H)F2 egerekben

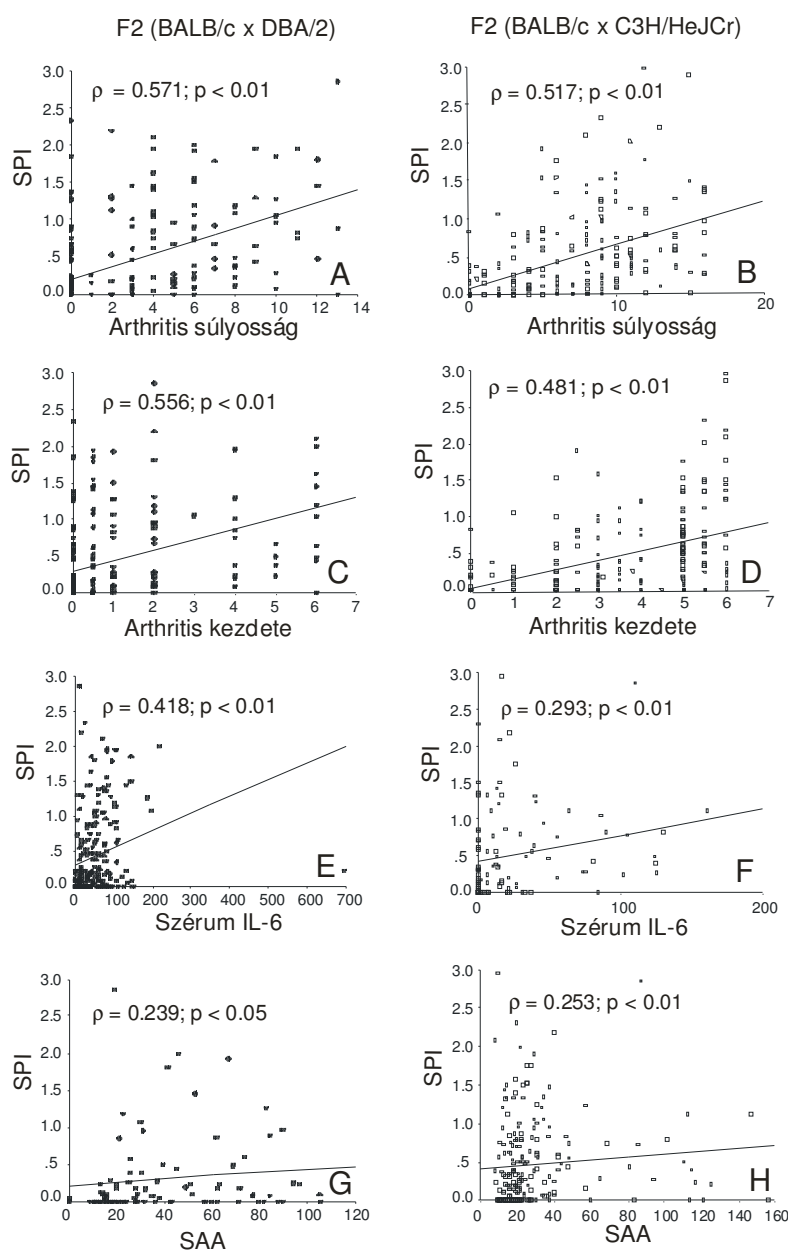
Annak ellenére, hogy az arthritis korábban alakult ki és súlyosabb volt a (BALB/c x C3H) F2 állatokban mint a (BALB/c x DBA/2) F2 hibridekben (3. ábra), a PGIA incidencia (1. táblázat), valamint a spondylitis súlyossága (3. ábra) nagyban hasonló volt a két csoportban. Vizsgálataink alapján azt találtuk, hogy 223 (BALB/c x DBA/2) F2 egerből 137 (61,4%) és 212 (BALB/c x C3H) F2 állatból 148 (69,8%) esetében fejlődött

ki PGIS (4. ábra). Az átlagos spondylitis súlyossági érték (spondylitis index) $0,69 \pm 0,63$ és $0,66 \pm 0,57$ volt a két csoportban (3. ábra). A negatívnak tekintett állatok száma, amelyekben sem arthritis, sem spondylitis nem alakult ki szignifikánsan nagyobb volt (33,2%) a (BALB/c x DBA/2) F2 csoportban, mint a (BALB/c x C3H) F2 egerek esetében (9,9%). A csak spondylitist mutató alcsoport szintén szintén szignifikánsan magasabb számú volt a (BALB/c x DBA/2) F2 hibridekben (23,3% szemben 2,8%-al) (4. ábra).



4. ábra Az arthritis (A) és spondylitis (Sp) incidenciája a PG-al immunizált (BALB/c x DBA/2) F2 és (BALB/c x C3H) F2 egerekben. A+Sp = arthritis és spondylitis együttes előfordulása. Neg = betegség által nem érintett állatok.

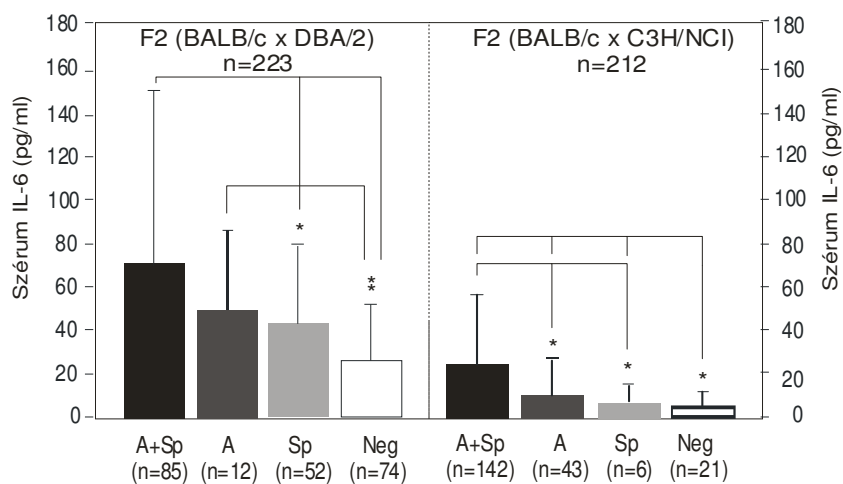
Kiemelendő továbbá, hogy amikor a PGIA és PGIS együttesen fordult elő, a progresszívebb lefolyású arthritist súlyosabb spondylitis kísérte (5. ábra A-D).



5. ábra A spondylitis súlyosságát jellemző index (SPI) korrelációi más, betegséget jellemző paraméterekkel. Szignifikáns korrelációt találtunk a spondylitis súlyosság, valamint a perifériás arthritis súlyossága és kezdet (onset) értékei között, mindkét általunk vizsgált, proteoglikánnal immunizált F2 hibrid csoportban. A szérum IL-6 és szérum amyloid-A (SAA) szintek szintén szignifikáns korrelációt mutattak a proteoglikán indukálta spondylitis súlyosságával a Spearman féle rho érték alapján.

4.3. A PGIS immunológiai jellemzése (BALB/c x DBA/2)F2 és (BALB/c x C3H)F2 egerekben

A következő evidens kérdés az volt, hogy a 4 „klinikai” alcsoport (negatív, PGIA, PGIS, PGIA + PGIS) mutat-e különbségeket a T vagy B sejt válaszok, vagy a szérumban mérhető, betegségre jellemző paraméterek tekintetében. A viszonylag kis számú csak arthritist mutató (BALB/c x DBA/2) F2, ill. negatív, vagy csak spondylitis által érintett (BALB/c x C3H) F2 egér ellenére, szignifikáns különbségeket találtunk a szérum IL-6 szintek összehasonlítása során (6. ábra). A szérum IL-6 szint nagyon magas volt az arthritis és spondylitis által együttesen érintett állatok esetében (6. ábra). Mind a szérum IL-6, mind a szérum amyloid-A (SAA) pozitív korrelációt mutatott a PGIS súlyosságával (5. ábra E-H).



6. ábra A PG-al immunizált F2 hibrid alcsoportok szérum IL-6 szintjeinek különbségei. Az arthritises (A) és/vagy spondylitises (A+Sp; Sp) állatok esetében mindkét F2 csoporton belül szignifikánsan magasabb szérum IL-6 szinteket mértünk, a betegség által nem érintett (Neg) állatokéhoz viszonyítva. Az arthritis és spondylitis által egyaránt érintett állatok szérum IL-6 értékei voltak a legmagasabbak mindkét csoportban.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Nagyon erős T- és B-sejt válaszok voltak mérhetőek mind az immunizáló humán, mind a saját egér PG ellen. Magas szérumszinteket (TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-6) találtunk az összes PG-al immunizált egér esetében és minden lehetséges kombinációt összehasonlítottunk. Annak ellenére, hogy az anti-PG antitest (auto- és heteroantitestek egyaránt), IL-6 és szérumszintek szignifikáns korrelációt mutattak a PGIS jelenlétével (BALB/c x C3H) F2 egerekben, csak a szérumszintek voltak szignifikánsan magasabbak a spondylitises (BALB/c x DBA/2) F2 állatokban (5. ábra E és G). Ugyanakkor ez a különbség lehet a korábbi kezdetű és súlyosabb arthritis következtében is, nem szükségszerűen áll kapcsolatban a spondylitissel (BALB/c x C3H) F2 egerekben (3. ábra).

4.4. A HLA-DRB1 allélek megoszlása RA-es betegeinkben és a kontroll csoportban.

A HLA-DR antigének megoszlását a vizsgált populációban a 2. táblázat mutatja. HLA-DR1 (HLA-DRB1*01) allélt a RA-es betegek 32,5%-ában lehetett kimutatni, szemben a kontroll csoportban talált 18%-kal. Azonban ez a különbség statisztikailag nem volt szignifikáns ($p=0,06$). HLA-DR4 (HLA-DRB1*04) allél expressziót szignifikánsan több beteg esetében (31%) láttunk, mint kontroll személynél (11%) ($p<0,05$). A HLA-DR12 (HLA-DRB1*12) szignifikánsan kisebb gyakoriságú volt a RA-es betegek esetében, összehasonlítva a kontroll csoporttal (0% vs 18%) ($p<0,05$). Nem találtunk különbséget a RA-es betegek és kontroll csoport között a HLA-DR3, DR7-11 és DR13-16 allélek gyakoriságai között (2. táblázat).

HLA-DR	RA n (%) (n=83)	kontroll n (%) (n=55)	Szignifikancia
DR1	27 (32,5)	10 (18,1)	NS (p=0.06)
DR3	15 (18,1)	14 (25,4)	NS
DR4	26 (31,3)	6 (10,9)	S (p<0.05)
DR7	17 (20,4)	12 (21,8)	NS
DR8	4 (4,8)	2 (3,6)	NS
DR9	3 (3,6)	2 (3,6)	NS
DR10	3 (3,6)	2 (3,6)	NS
DR11	23 (27,7)	19 (34,5)	NS
DR12	0 (0)	10 (18,1)	S (p<0.05)
DR13	13 (15,6)	9 (16,3)	NS
DR14	3 (3,6)	3 (5,4)	NS
DR15	11 (13,2)	8 (14,5)	NS
DR16	8 (9,6)	9 (16,3)	NS

2. táblázat A különböző HLA-DR allélek megoszlása RA-es betegekben és a kontroll csoportban. A HLA-DR4 szignifikánsan gyakrabban fordult elő a betegcsoportban, mint a kontroll csoportban. A HLA-DR1 előfordulása is nagyobb gyakoriságra utaló tendenciát mutatott a betegek között, de ez a különbség nem volt szignifikáns. A HLA-DR12 allél a betegeink esetében nem fordult elő.

Rövidítések: n=elemszám; S=szignifikáns; NS=nem szignifikáns

5. Megbeszélés

Munkánk során a PGIA-ra fogékony egértörzsekben és ezek F1, valamint F2 hibridjeiben létrehozható arthritis és spondylitis összefüggéseit vizsgáltuk. Annak ellenére, hogy a spondylitis, mint a PGIA kísérő jelensége, a modell első leírása óta ismert (13;40), ez az első tanulmány, amely az antigének, adjuvánsok és genetikai háttér hatásait részleteiben vizsgálja. Összehasonlítottuk nemcsak a spondylitis-re fogékony BALB/c és C3H törzsek, hanem ezek MHC-azonos és nem MHC azonos F1 és F2 generációit is, melyeket arthritis-re (CIA) fogékony (DBA/1) és arthritis rezisztens (DBA/2) törzsekkel keresztezve hoztunk létre.

A PGIS kifejlődéséhez, ugyanúgy mint a PGIA esetében az immunizáláshoz használt humán porc proteoglikán és a saját (egér) PG közötti keresztreaktív (T- és B-sejtek egyaránt) immunválasz szükséges. Az intervertebralis discus (IVD) nucleus pulposusa és annulus fibrosusa nagy mennyiségben tartalmazza a proteoglikán aggregátumot (50), hasonlóan az ízületi porchoz. Minthogy a humán és egér PG jelentős homológiát mutat (51;52), nem meglepő, hogy humán porc proteoglikánnal immunizált egerekben immunválasz jön létre az ízületek és intervertebralis porckorongok porcos struktúrája ellen. Mindez azonban csak meghatározott genetikai háttér esetében alakul ki ami amellettszól, hogy az arthritisre való fogékonyság önmagában nem elégséges spondylitis kialakulásához. Amint leírásra került a DBA/1 egerek kifejlesztenek arthritist, spondylitist azonban nem, semmilyen kísérleti körülmények között sem, legyen akár hím, akár nőstény állatokról szó, történjen az immunizálás akár proteoglikánnal, akár humán II. típusú kollagénnel (CII) CFA, vagy DDA adjuvánst használva. Habár a (BALB/c x DBA/1) keresztezés F1 és F2 generációjában 30-40%-ban fejlődött ki arthritis, akár PG-

al, akár CII-el immunizáltunk, az intervertebralis discusok körül gyulladásoos sejteket nem lehetett észlelni sem az arthritises, sem a nem arthritises állatokban a több mint 230 gerincmetszet csaknem 3500 porckorongjának hisztológiai értékelése során. Ez a megfigyelés azt sugallja, hogy a DBA/1 törzs valószínűleg igen erős protektív gént, vagy géneket hordoz a spondylitis tekintetében.

A DBA/2 törzsön belül, amely teljesen rezisztens volt PGIA-re és csaknem teljesen PGIS-re is, a PGIS-re fogékony BALB/c törzsszel létrehozott F1 hibridek mintegy 30%-a meglehetősen súlyos spondylitist fejlesztett ki (SPI : $0,13 \pm 0,06$) PG-al immunizálva. DBA/2 x BALB/c F2 generációban a spondylitis incidenciája (61%) és súlyossága (SPI : $0,69 \pm 0,63$) pedig elérte a BALB/c szülői törzsben talált magas értékeket PG + DDA-val immunizálva (1. táblázat). Ennek megfelelően a DBA/2 genom erős supportiv gént, vagy géneket kell hordozzon, amelyek "némák" ("inaktívak") az eredeti DBA/2 törzsben. A BALB/c és DBA/2 genetikai kombinációkkal talált jelen megfigyelések az első bizonyítékok arra nézve, hogy a PGIA és PGIS valószínűleg két különálló betegség (16). A BALB/c és DBA/2 törzsek ugyanazt a H2-d allélt hordozzák. Ez azt mutatja, hogy az MHC önmagában (pl. a DBA/2 törzsben) nem elégséges a PGIS-re való fogékonyság meghatározásában. Ezt támasztották alá a (BALB/c x DBA/1) F2 generációval kapcsolatos megfigyeléseink, ahol az immunizált egerek kb. 25%-a homozigóta volt a H2-d allélra nézve (45), de egyetlen F2 hibridben sem alakult ki spondylitis (1. táblázat).

Ezzel szemben, amikor 2 spondylitisre fogékony törzset kereszteztünk (BALB/c és C3H), a PGIS incidencia az F2 generációban végeredményben megegyezett bármely szülői törzsben észlellyel. Ez alapján valószínű, hogy sem a BALB/c, sem a C3H törzs

nem hordoz olyan további genetikai információt, mely akár csökkentené (mint a (BALB/c x DBA/1) F2 esetében) vagy növelné (mint a (BALB/c x DBA/2) F2 hibridekben) a PGIS-re való fogékonyságot. Ez nem is meglepő, ha figyelembe vesszük, hogy a C3H és BALB/c törzsek közös elődje ugyanaz a nőstény Bagg albínó (53). Így a spondylitisre való fogékonyság génjei jelen lehettek a Bagg albínókban mielőtt a BALB/c és C3H vonalak leváltak volna mint beltenyésztett törzsek. Mivel mindeddig semmilyen más egértörzset nem találtak fogékonynak spondylitisre nézve (12;37;40), úgy gondoljuk, csupán néhány gén határozza meg a spondylitisre való fogékonyságot és ezen gének valószínűleg azonosak a BALB/c és C3H törzsekben. 223 (BALB/c x DBA/2) F2 hibrid egér genomszűrési vizsgálatainak előzetes eredményei valóban mindössze két domináns nem-MHC lókuszt (2-es és 18-as kromoszóma) és négy további lókuszt jeleznek szuggesztív szignifikancia szinten (11-es, 12-es, 15-ös, 19-es kromoszóma) melyek összefüggést mutatnak a PGIS-el ebben az MHC azonos generációban (54).

Autoimmun arthritis létrehozásához genetikailag fogékony rágcsálókban, CFA bázisú protokollokat alkalmazva, legalább 1 antigén (PG vagy CII) + CFA injekció szükséges. Ez azt mutatja, hogy veleszületett („innate”) immunitás stimulálása mycobacterialis komponensekkel legalább olyan lényeges, mint a szerzett („adaptív”) immunitás aktiválása az antigénnel. A mycobacterialis összetevők, mint pl. hőszokk proteinek, ismert nem specifikus cellularis stimuláló anyagok (55). A muramil-dipeptid (egy peptidoglikán) és trehalózdimikolát (egy glikolipid, mely az *Escherichia coli* lipopoliszacharidjának felel meg) (43;56) szerepet játszhat a saját antigének elleni immunreakció felerősítésében autoimmun modellekben. Újabb vizsgálataink során azt találtuk, hogy egy hidrofil/lipofil tulajdonságú kvaterner ammónium bázis, a DDA, mely

az antigéneket egy liposomal micellába zárja (57), ugyanolyan hatásos adjuváns, mint a CFA a PGIA vagy CIA indukciója során. Ugyanakkor a DDA mentes a CFA mellékhatásaitól (43). A CFA és a DDA egyformán jól stimulálja az „innate” immunitást és az „adaptív” immunitás antigén specifikus effektor és regulatórikus T-helper 1 (Th1) vonalát (43).

Munkánk során összehasonlítottuk a CFA és DDA adjuváns hatását PGIS-ben. Mint korábban leírásra került (43), a DDA proteoglikánnal együtt arthritist és spondylitist képes kiváltani BALB/c és C3H egerekben. Ezen két szülői törzs esetében nem találtunk különbséget CFA-t vagy DDA-t használva a proteoglikánnal (1. táblázat). Ugyanakkor a DDA erősebb adjuvánsnak bizonyult a CFA-nál a (BALB/c x DBA/2) F2 hibridek esetében. Csaknem kétszeres PGIS és PGIA incidencia növekedést találtunk, amikor a (BALB/c x DBA/2) F2 generáció egyedeit PG + DDA alkalmazásával immunizáltuk PG + CFA helyett (1. táblázat). Azonban, ha egy törzs rezisztens volt PGIA, CIA, vagy PGIS szempontjából az antigén DDA adjuvánssal sem volt elégséges a szövetspecifikus gyulladás kiváltására. Következésképpen, annak ellenére, hogy a DDA, mint a CFA-nál erőteljesebb adjuváns befolyásolhatja a spondylitis incidenciáját fogékony egerekben, a szövet-/szervspecifikus (PG) autoimmun válasz és a genetikai háttér (megfelelő MHC) a legkritikusabb faktorok a spondylitis kialakulásában. Az MHC általánosságban a legerősebb genetikai összetevő az autoimmun betegségekben. A HLA-B27 és a spondylitis ankylopoetica (SPA) közötti összefüggés, mint az SPA autoimmun etiológiájának bizonyítéka több mint 30 évvel ezelőtt került először leírásra (58). Úgy találták, hogy a HLA-B27 kombinációja más HLA allélekkel (HLA-B60 és HLA-B35) fokozza a genetikai predispozíciót SPA-ra (59;60), és genomszűrési vizsgálatok

eredményei a betegség poligénes természete mellett szólnak (3;4). Az ezen területen folyó intenzív kutatások ellenére az SPA pontos patogenezise ismeretlen. A feltételezett autoantigénekről szóló tanulmányok számos molekula szerepét felvetették keresztreaktív immunválasz kiváltásában (molekuláris mimikri), mint pl. *Klebsiella* antigének (61;62), *Yersinia* antigének (63;64) idegenként felismert HLA-B27 (64-66), ill. porc proteoglikán (67-70), vagy verzikán (71) epitópok. További kutatásokat igényel annak megválaszolása, hogy az egér H-2 lokuszon belül mely subdomének lehetnek felelősek a PGIS-re való genetikai fogékonyágért a BALB/c x C3H, vagy BALB/c x DBA/2 keresztezés F2 hibridjeiben.

A PGIS ugyanazon egértörzsekben jelentkezik, melyek PGIA-ra is fogékonyak. Ennek ellenére a genetikai, klinikai és laboratóriumi jellemzők eltérnek a PGIA és PGIS esetében (16). Ezek az eltérések talán csak kvantitatív különbségeket tükröznek a mindkét betegség által érintett állatok esetében. Azonban az arthritisre, vagy spondylitisre, vagy mindkettőre való teljes rezisztencia a különböző genetikai kombinációk esetében, azt sugallja, hogy a PGIA és a PGIS két különálló kórkép. Habár nagyon sok immunológiai és laboratóriumi jellemvonás (köztük az antigén-specifikus T sejt válaszok, PG-specifikus IgG izotípus arányok, és IFN- γ , IL-1 β , vagy TNF- α szintek) alapján lehet különbséget tenni arthritises és nem arthritises állatok között, a spondylitis jelenlétével csak a magas szérum IL-6 szint mutatott szoros összefüggést a PG-al immunizált állatokban.

Annak ellenére, hogy számos genetikai lókuszt szerepe felmerült az autoimmun/kísérletes arthritis különböző formáiban (40;72) és rheumatoid arthritisben (72-74), csak nagyon kevés, valószínűleg mindössze 2 domináns, nem-MHC lókuszt (2-es

és 18-as kromoszóma) tehető felelőssé a spondylitisre való fogékonyság meghatározásában (BALB/c x DBA/2) F2 hibrid egerekben (54). Lényeges, hogy mindkét leírt genetikai lókuszt megfeleltethető az SPA-ban szenvedő betegekben találtaknak (1;3;4;75). Következésképpen az egerekben kísérletesen kiváltott spondylarthropathia modell alkalmas lehet a spondylitis kialakulását meghatározó genetikai, immunológiai és egyéb komponensek tanulmányozására.

Második vizsgálatunk során a HLA-DRB1 allélek megoszlását határoztuk meg észak-kelet magyarországi RA-es betegpopulációinkban, egészséges kontroll személyekhez viszonyítva. A HLA-DR4 szignifikánsan gyakrabban fordult elő a RA-es betegekben, mint a kontroll csoportban. Ezen túlmenően a HLA-DR1 előfordulása is nagyobb gyakoriságra utaló tendenciát mutatott a betegek között. Jelentős földrajzi különbségek vannak ebben a tekintetben. Eredményeinkhez hasonlóan, a HLA-DR4 erős asszociációja jellemző RA-el Észak Európában, az Egyesült Államokban, Németországban és Argentínában (20;22;24;29;36). Saját eredményeinkhez hasonlóan, a HLA-DR4 és a HLA-DR1, egy legutóbbi magyar tanulmány szerint is kapcsoltságot mutat RA-el (25). Azonban például, mediterrán RA-es betegekben a HLA-DR1 és HLA-DR10 hordozása jellemző inkább, mint a HLA-DR4 hordozás (30). Az észak-amerikai bennszülött indiánok esetében pedig HLA-DR14 hordozás jellemző (31). Ennélfogva, a HLA-DRB1 és RA asszociációja szempontjából, magyarországi RA-es betegcsoportunk inkább az észak- és nyugat-európai, mintsem a dél-európai RA-es betegekhez mutat hasonlóságot.

Eredményeink alapján a HLA-DR12 kisebb gyakoriságú volt RA-es betegeink között, mint a kontroll személyekben. Egy finn tanulmány szintén a HLA-DR12 protektív szerepét veti fel RA-ben (20).

6. Új eredmények

Vizsgálataink során a porc proteoglikán aggregátum által kiváltott autoimmun spondylarthropathia jellemzése volt a célunk. Annak ellenére, hogy a gerincérintettség a PGIA állatmodell első leírása óta ismert, az eredmények azt mutatják, hogy PG immunizálás hatására kialakuló arthritis és spondylitis két különálló kórkép.

Elsőként jellemeztük ezen autoimmun spondylitis (PGIS) előfordulását a genetikai háttér, immunizálási protokoll, illetőleg az alkalmazott adjuváns függvényében a különböző egértörzsekben.

A spondylitis súlyosságának hisztológiai értékelésére pontrendszert dolgoztunk ki, melynek segítségével az egyes vizsgált csoportok eredményei összehasonlíthatóvá váltak.

Meghatároztuk a spondylitis kialakulása során végbemenő immunológiai folyamatok jellemzőit, valamint összefüggéseket kerestünk a spondylitis súlyossága és ezen paraméterek között. Ennek során a szérum IL-6 és SAA szintek korreláltak szignifikánsan a PGIS súlyosságával.

A PG immunizálás által kiváltott betegségre genetikailag fogékony és rezisztens törzsek keresztezése révén nyert F1 és F2 generációk felhasználásával újabb információkhoz jutottunk a genetikai meghatározottság vonatkozásában. Vizsgálataink

alapján feltételezzük, hogy a spondylitisre való fogékonyság háttérében csupán kevés nem-MHC gén hatása játszik szerepet.

Vizsgálataink eredményei megteremtették az alapját az autoimmun spondylitis genetikai háttérével foglalkozó átfogó kutatási projektnek.

7. Összefoglalás

Munkánk során célul tűztük ki a kísérletesen indukált spondylarthropathia jellemzését arthritisre fogékony egértörzsekben és ezeknek fogékony, valamint rezisztens törzsekkel létrehozott F1 és F2 generációiban.

Porc proteoglikán aggregánnal történő szisztémás immunizálással spondylitist indukáltunk fogékony BALB/c és C3H egerekben, valamint ezeknek arthritis és/vagy spondylitis rezisztens DBA/2 és DBA/1 szülői törzsekkel létrehozott keresztezésének F1 és F2 hibridjeiben. A proteoglikán indukálta spondylarthropathia incidenciáját és súlyosságát hisztológiailag értékeltük. A gerincérintettség pontértékeit a szérum antitest és citokin szintekkel, valamint a porc PG-ra adott *in vitro* T sejt válaszok eredményeivel korreláltattuk.

A PGIS-t a porc PG és adjuváns szisztémás adásával idéztük elő. A fogékony egértörzsekhez tartozó egerek és ezek F2 hibridjeinek 60-70%-ában alakult ki spondylitis arthritisszel, vagy anélkül. A veleszületett („innate”) immunrendszert Th1 dominancia irányába aktiváló adjuvánsok jelentős hatással bírtak a spondylitis kimenetelére és progressziójára. A DBA//1 törzs, úgy tűnik, olyan géneket hordoz, melyek megvédik ezt a törzset valamint F1 és F2 hibridjeit a spondylitisszel szemben. A DBA/2 törzs pedig, miközben maga rezisztens PGIS-re, olyan géneket hordoz, melyek „megengedik” a PGIS

kialakulását a hibrid generációkban. Az arthritis és/vagy spondylitis érzékeny BALB/c és C3H szülői törzsek és F2 hibridjeik esetében találtuk a legmagasabb spondylitis incidenciát és súlyosságot.

A PGIS, az autoimmun spondylitis egérmodellje, mely számos hasonlóságot mutat a humán SPA-val. A PG indukálta arthritisre és spondylitisre való fogékonyság különválása különböző genetikai konstellációk esetében, arra utal, hogy a PGIA és a PGIS különálló betegségek. Ennélfogva ez a modell lehetővé teszi a spondylitis etiopatogenezisében szerepet játszó genetikai komponensek vizsgálatát, függetlenül a PGIA-ra való fogékonyságot befolyásoló tényezőktől.

A HLA-DRB1 genotípus gyakoriságokat vizsgálva saját észak-kelet magyarországi RA-es betegeinkben azt találtuk, hogy a HLA-DR4 szignifikánsan gyakrabban fordul elő a betegekben, a kontroll csoporthoz képest. Emellett a HLA-DR1 esetében is a nagyobb gyakoriságra utaló tendencia volt látható RA-ben.

8. Tárgyszavak:

spondylitis ankylopoetica; proteoglikán indukálta spondylitis; fogékonysági gének; rheumatoid arthritis; HLA-DR kapcsoltság; allélgyakoriság

Keywords: ankylosing spondylitis; proteoglycan induced spondylitis; susceptibility genes; rheumatoid arthritis; HLA-DR association; allele frequency

9. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Glant Tibor professzor úrnak és Dr. Szekanecz Zoltán tanár úrnak, akik kutatómunkámat irányították, a témaválasztásban és a munka gyakorlati megvalósításában nélkülözhetetlenül fontos segítséget nyújtottak.

Köszönöm Dr. Zehér Margit professzor asszonynak, aki programvezetőként e munka elkészültét lehetővé tette. Köszönetemet fejezem ki Dr. Szegedi Gyula és Dr. Sipka Sándor professzor uraknak, akik munkámhoz és a kutatáshoz szükséges immunológiai ismereteimet formálták éveken keresztül.

Köszönetet mondok Dr. Szántó Sándornak, aki a kutatómunka során alkalmazott módszerek rejtelseibe nagy szakértelemmel bevezetett. Köszönet minden kollégámnak és barátomnak, hogy tanácsaikkal, támogatásukkal hozzájárultak munkámhoz.

Hálás vagyok családom támogatásáért és szerető buzdításáért, mely lehetővé tette, hogy munkámat nyugodt körülmények között végezhessem.

10. Irodalmi hivatkozások

- (1) Zhang G, Luo J, Bruckel J, Weisman MA, Schumacher HR, Khan MA et al. Genetic studies in familial ankylosing spondylitis susceptibility. *Arthritis Rheum* 2004; 50:2246-2254.
- (2) Theofilopoulos AN. The basis of autoimmunity: Part II. Genetic predisposition. *Immunol Today* 1995; 16:150-159.
- (3) Brown MA, Pile KD, Kennedy LG, Campbell D, Andrew L, March R et al. A genome-wide screen for susceptibility loci in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 1998; 41(4):588-595.
- (4) Laval SH, Timms A, Edwards S, Bradbury L, Brophy S, Milicic A et al. Whole-genome screening in ankylosing spondylitis: evidence of non-MHC genetic-susceptibility loci. *Am J Hum Genet* 2001; 68:918-926.
- (5) Lipson SJ, Muir H. Vertebral osteophyte formation in experimental disc degeneration. Morphologic and proteoglycan changes over time. *Arthritis Rheum* 1980; 23:319-324.
- (6) Mahowald ML, Krug H, Taurog J. Progressive ankylosis in mice. An animal model of spondylarthropathy. I. Clinical and radiographic findings. *Arthritis Rheum* 1988; 31:1390-1399.
- (7) Moskowitz RW, Ziv I, Denko CW, Boja B, Jones PK, Adler JH. Spondylosis in sand rats: a model of intervertebral disc degeneration and hyperostosis. *J Orthop Res* 1990; 8:401-411.
- (8) Ho AM, Johnson MD, Kingsley DM. Role of the mouse *ank* gene in control of tissue calcification and arthritis. *Science* 2000; 289:265-270.
- (9) Taurog JD, Maika SD, Satumtira N, Dorris ML, McLean IL, Yanagisawa H et al. Inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *Immunol Rev* 1999; 169:209-223.
- (10) Hammer RE, Maika SD, Richardson JA, Tang JP, Taurog JD. Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human b₂m: an animal model of HLA-B27-associated human disorders. *Cell* 1990; 63:1099-1112.
- (11) Khare SD, Luthra HS, David CS. Spontaneous inflammatory arthritis in HLA-B27 transgenic mice lacking b₂-microglobulin: a model of human spondyloarthropathies. *J Exp Med* 1995; 182:1153-1158.

- (12) Mikecz K, Glant TT, Poole AR. Immunity to cartilage proteoglycans in BALB/c mice with progressive polyarthritis and ankylosing spondylitis induced by injection of human cartilage proteoglycan. *Arthritis Rheum* 1987; 30:306-318.
- (13) Glant TT, Mikecz K, Arzoumanian A, Poole AR. Proteoglycan-induced arthritis in BALB/c mice. Clinical features and histopathology. *Arthritis Rheum* 1987; 30:201-212.
- (14) Glant TT, Bárdos T, Vermes C, Chandrasekaran R, Valdéz JC, Otto JM et al. Variations in susceptibility to proteoglycan-induced arthritis and spondylitis among C3H substrains of mice. Evidence of genetically acquired resistance to autoimmune disease. *Arthritis Rheum* 2001; 44:682-692.
- (15) Taurog JD, Richardson JA, Croft JT, Simmons WA, Zhou M, Fernandez-Sueiro JL et al. The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in *HLA-B27* transgenic rats. *J Exp Med* 1994; 180:2359-2364.
- (16) Bardos T, Szabo Z, Czipri M, Vermes C, Tunyogi-Csapo M, Mikecz K. Longitudinal study on an autoimmune murine model for ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2005; 64(7):981-987.
- (17) Gregersen PK, Silver J, Winchester RF. The shared epitope hypothesis: an approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1987; 30:1205-1213.
- (18) Harris EDJr. Rheumatoid arthritis: pathophysiology and implications for therapy. *N Engl J Med* 1990; 332:1277-1287.
- (19) Weyand CM, Hicok KC, Conn DL, Goronzy JJ. The influence of HLA-DRB1 genes on disease severity in rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med* 1992; 117:801-806.
- (20) Laivoranta-Nyman S, Mottonen T, Hermann R, Tuokko J, Luukkainen R, Hakala M et al. HLA-DR-DQ haplotypes and genotypes in Finnish patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2004; 63:1406-1412.
- (21) Lee HS, Lee KW, Song GG, Kim HA, Kim SY, Bae SC. Increased susceptibility to rheumatoid arthritis in Koreans heterozygous for HLA-DRB1*0405 and *0901. *Arthritis Rheum* 2004; 50:3468-3475.
- (22) Gorman JD, David-Vaudey E, Pai M, Lum RF, Criswell LA. Particular HLA-DRB1 shared epitope genotypes are strongly associated with rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 2004; 50:3476-3484.
- (23) Agrawal S, Aggarwal A, Dabadghao S, Naik S, Misra R. Compound heterozygosity of HLA-DR4 and DR1 antigens in Asian Indians increases the

- risk of extra-articular features in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1995; 34:41-44.
- (24) Seidl C, Koch U, Buhleier T, Frank R, Möller B, Markert E et al. HLA-DRB1*04 subtypes are associated with increased inflammatory activity in early rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1997; 36:941-944.
- (25) Varga É, Palkonyai É, Temesvári P, Tóth F, Petri IB. The role of HLA-DRB1*04 alleles and their association with HLA-DQB genes in genetic susceptibility to rheumatoid arthritis in Hungarian patients. *Acta Microbiol Immunol Hung* 2003; 50:33-41.
- (26) Hameed K, Bowman S, Kondeatis E, Vaughan R, Gibson T. The association of HLA-DRB genes and the shared epitope with rheumatoid arthritis in Pakistan. *Br J Rheumatol* 1997; 36:1184-1188.
- (27) Van Jaarsveld CHM, Otten HG, Jacobs JWG, Kruize AA, Brus HLM, Bijlsma JWJ. Association of HLA-DR with susceptibility to and clinical expression of rheumatoid arthritis: re-evaluation by means of genomic tissue typing. *Br J Rheumatol* 1998; 37:411-416.
- (28) Hong GH, Park MH, Takeuchi F, Oh MD, Song YW, Nabeta H et al. Association of specific amino acid sequence of HLA-DR with rheumatoid arthritis in Koreans and its diagnostic value. *J Rheumatol* 1996; 23:1699-1703.
- (29) Stastny P. Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 1978; 298:896-871.
- (30) Boki KA, Panayi GS, Vaughan RW, Drosos AA, Moutsopoulos HM, Lanchbury JS. HLA class II sequence polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis in Greeks: the HLA-DR shared-epitope hypothesis accounts for the disease in only a minority of Greek patients. *Arthritis Rheum* 1992; 35:749-755.
- (31) Willkens RF, Nepom GT, Marks CR, Nettles JW, Nepom BS. Association of HLA-Dw16 with rheumatoid arthritis in Yakima Indians. Further evidence for the "shared epitope" hypothesis. *Arthritis Rheum* 1991; 34:43-47.
- (32) Wordsworth BP, Lanchbury JS, Sakkas LI, Welsh KI, Panayi GS, Bell JI. HLA-DR4 subtype frequencies in rheumatoid arthritis indicate that DRB1 is the major susceptibility locus within the HLA class II region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86:10049-10053.
- (33) Watanabe Y, Tokunaga K, Matsuki K, Takeuchi F, Matsuta K, Maeda H et al. Putative amino acid sequence of HLA-DRB chain contributing to rheumatoid arthritis susceptibility. *J Exp Med* 1989; 169:2263-2268.

- (34) Molkenstin J, Gregersen PK, Lin X, Zhu N, Wang Y, Chen S et al. Molecular analysis of HLA-DR beta and DQ beta polymorphism in Chinese with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1993; 52:610-612.
- (35) de Vries N, Ronningen KS, Tilanus MG, Bouwens-Rombouts A, Segal R, Egeland T et al. HLA-DR1 and rheumatoid arthritis in Israeli Jews: sequencing reveals that DRB1*0102 is the predominant HLA-DR1 subtype. *Tissue Antigens* 1993; 41:26-30.
- (36) Citera G, Padulo LA, Fernandez G, Lazaro MA, Rosemffet MG, Cocco A.M. Influence of HLA-DR alleles on rheumatoid arthritis: susceptibility and severity in Argentine patients. *J Rheumatol* 2001; 28:1486-1491.
- (37) Glant TT, Cs-Szabó G, Nagase H, Jacobs JJ, Mikecz K. Progressive polyarthritis induced in BALB/c mice by aggrecan from human osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum* 1998; 41:1007-1018.
- (38) Glant TT, Mikecz K, Poole AR. Monoclonal antibodies to different protein-related epitopes of human articular cartilage proteoglycans. *Biochem J* 1986; 234:31-41.
- (39) Glant TT, Buzás EI, Finnegan A, Negroiu G, Cs-Szabó G, Mikecz K. Critical role of glycosaminoglycan side chains of cartilage proteoglycan (aggrecan) in antigen recognition and presentation. *J Immunol* 1998; 160:3812-3819.
- (40) Glant TT, Finnegan A, Mikecz K. Proteoglycan-induced arthritis: immune regulation, cellular mechanisms and genetics. *Crit Rev Immunol* 2003; 23:199-250.
- (41) Antonopoulos CA, Axelsson I, Heinegård D, Gardell S. Extraction and purification of proteoglycans from various types of connective tissue. *Biochim Biophys Acta* 1974; 338:108-119.
- (42) Bárdos T, Kamath RV, Mikecz K, Glant TT. Anti-inflammatory and chondroprotective effect of TSG-6 (tumor necrosis factor- α -stimulated gene-6) in murine models of experimental arthritis. *Am J Pathol* 2001; 159:1711-1721.
- (43) Hanyecz A, Berlo SE, Szanto S, Broeren CPM, Mikecz K, Glant TT. Achievement of a synergistic adjuvant effect on arthritis induction by activation of innate immunity and forcing the immune response toward the Th1 phenotype. *Arthritis Rheum* 2004; 50:1665-1676.
- (44) Glant TT, Mikecz K. Proteoglycan aggrecan-induced arthritis: a murine autoimmune model of rheumatoid arthritis. *Methods Mol Med* 2004; 102:313-338.

- (45) Adarichev VA, Valdez JC, Bárdos T, Finnegan A, Mikecz K, Glant TT. Combined autoimmune models of arthritis reveal shared and independent qualitative (binary) and quantitative trait loci. *J Immunol* 2003; 170:2283-2292.
- (46) Otto JM, Chandrasekaran R, Vermes C, Mikecz K, Finnegan A, Rickert SE et al. A genome scan using a novel genetic cross identifies new susceptibility loci and traits in a mouse model of rheumatoid arthritis. *J Immunol* 2000; 165:5278-5286.
- (47) Glant TT, Adarichev VA, Nesterovitch AB, Szanto S, Oswald JP, Jacobs JJ et al. Disease-associated qualitative and quantitative trait loci in proteoglycan-induced arthritis and collagen-induced arthritis. *Am J Med Sci* 2004; 327:188-195.
- (48) Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31:315-324.
- (49) RulesOllerup O, Zetterquist H. HLA typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 1992; 39:225-235.
- (50) Pearce RH, Grimmer BJ, Adams ME. Degeneration and the chemical composition of the human lumbar intervertebral disc. *J Orthop Res* 1987; 5:198-205.
- (51) Doege KJ, Sasaki M, Kimura T, Yamada Y. Complete coding sequence and deduced primary structure of the human cartilage large aggregating proteoglycan, aggrecan. Human-specific repeats, and additional alternatively spliced forms. *J Biol Chem* 1991; 266:894-902.
- (52) Walcz E, Deák F, Erhardt P, Coulter SN, Fülöp C, Horváth P et al. Complete coding sequence, deduced primary structure, chromosomal localization and structural analysis of murine aggrecan. *Genomics* 1994; 22:364-371.
- (53) Staats J. The laboratory mouse. In: Green EL, editor. *Biology of the Laboratory Mouse*. New York: McGraw-Hill, 1966: 1-9.
- (54) Vegvari A, Szabo Z, Szanto S, Nesterovitch AB, Mikecz K, Glant TT et al. Two major interacting chromosome loci control disease susceptibility in murine model of spondyloarthritis. *J Immunol* 2005; 175:2475-2483.
- (55) Anderton SM, van der Zee R, Prakken B, Noordzij A, van Eden W. Activation of T cells recognizing self 60-kD heat shock protein can protect against experimental arthritis. *J Exp Med* 1995; 181:943-952.

- (56) Billiau A, Matthys P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *J Leukoc Biol* 2001; 70:849-860.
- (57) Klinguer-Hamour C, Libon C, Plotnicky-Gilquin H, Bussat MC, Revy L, Nguyen T et al. DDA adjuvant induces a mixed Th1/Th2 immune response when associated with BBG2Na, a respiratory syncytial virus potential vaccine. *Vaccine* 2002; 20:2743-2751.
- (58) Schlosstein L, Terasaki PI, Bluestone R, Pearson CM. High association of an HL-A antigen, W27, with ankylosing spondylitis. *N Engl J Med* 1973; 288:704-706.
- (59) Robinson WP, van der Linden SM, Khan MA, Rentsch HU, Cats A, Russell A et al. HLA-Bw60 increases susceptibility to ankylosing spondylitis in HLA-B27+ patients. *Arthritis Rheum* 1989; 32(9):1135-1141.
- (60) Said-Nahal R, Miceli-Richard C, Berthelot JM, Duche A, Dernis-Labous E, Le Blevet G et al. The familial form of spondylarthropathy: a clinical study of 115 multiplex families. Groupe Francais d'Etude Genetique des Spondylarthropathies. *Arthritis Rheum* 2000; 43:1356-1365.
- (61) Ebringer RW, Cawdell DR, Cowling P, Ebringer A. Sequential studies in ankylosing spondylitis. Association of *Klebsiella pneumoniae* with active disease. *Ann Rheum Dis* 1978; 37:146-151.
- (62) Hermann E, Sucké B, Droste U, Zum Büschenfelde K-HM. *Klebsiella pneumoniae*-reactive T cells in blood and synovial fluid of patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 1995; 38:1277-1282.
- (63) Nickerson CL, Hogen KL, Luthra HS, David CS. Effect of H-2 genes on expression of HLA-B27 and *Yersinia*-induced arthritis. *Scand J Rheumatol* 1990; 87:85-90.
- (64) Ugrinovic S, Mertz A, Wu P, Braun J, Sieper J. A single nonamer from the *Yersinia* 60-kDa heat shock protein is the target of HLA-B27-restricted CTL response in *Yersinia*-induced reactive arthritis. *J Immunol* 1997; 159:5715-5723.
- (65) Schwimbeck PL, Yu DTY, Oldstone MBA. Autoantibodies to HLA B27 in the sera of HLA B27 patients with ankylosing spondylitis and Reiter's syndrome. *J Exp Med* 1987; 166:173-181.
- (66) Gonzalez-Roces S, Alvarez MV, Gonzalez S, Dieye A, Makni H, Woodfield DG et al. HLA-B27 polymorphism and worldwide susceptibility to ankylosing spondylitis. *Tissue Antigens* 1997; 49:116-123.
- (67) Mikecz K, Glant TT, Baron M, Poole AR. Isolation of proteoglycan specific T-cells from patients with ankylosing spondylitis. *Cell Immunol* 1988; 112:55-63.

- (68) Jobanputra P, Choy EHS, Kingsley GH, Sieper J, Palacios-Boix AA, Heinegård D et al. Cellular immunity to cartilage proteoglycans: relevance to the pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 1992; 51:959-962.
- (69) Zou J, Zhang Y, Thiel A, Rudwaleit M, Shi SL, Radbruch A et al. Predominant cellular immune response to the cartilage autoantigenic G1 aggrecan in ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2003; 42:846-855.
- (70) Kuon W, Kuhne M, Busch DH, Atagunduz P, Seipel M, Wu P et al. Identification of novel human aggrecan T cell epitopes in HLA-B27 transgenic mice associated with spondyloarthritis. *J Immunol* 2004; 173:4859-4866.
- (71) Shi S, Ciurli C, Cartman A, Pidoux I, Poole AR, Zhang Y. Experimental immunity to the G1 domain of the proteoglycan versican induces spondylitis and sacroiliitis, of a kind seen in human spondylarthropathies. *Arthritis Rheum* 2003; 48:2903-2915.
- (72) Marrack P, Kappler J, Kotzin BL. Autoimmune disease: why and where it occurs. *Nat Med* 2001; 7:899-905.
- (73) Gregersen PK. Genetics of rheumatoid arthritis: confronting complexity. *Arthritis Res* 1999; 1:37-44.
- (74) Wanstrat A, Wakeland E. The genetics of complex autoimmune diseases: non-MHC susceptibility genes. *Nat Immunol* 2001; 2:802-809.
- (75) Brown MA, Brophy S, Bradbury L, Hamersma J, Timms A, Laval S et al. Identification of major loci controlling clinical manifestations of ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 2003; 48:2234-2239.

Közlemények

Az értekezést megalapozó közlemények jegyzéke:

- 1) **Szabo, Z.**, Szanto, S., Vegvari, A., Szekanecz, Z., Mikecz, K., Glant, T.T.: Genetic control of experimental spondylarthropathy. *Arthritis and Rheumatism*, 2005, 52(8): 2452-2460. **IF: 7.41**
- 2) Bardos T, **Szabo Z**, Czipri M, Vermes C, Tunyogi-Csapo M, Urban RM, Mikecz K, Glant TT.: A longitudinal study on an autoimmune murine model of ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2005, 64(7): 981-987. Epub 2005 Jan 7. **IF: 3.82**
- 3) Kapitány, A., Zilahi, E., Szántó, S., Szűcs, G., **Szabó, Z.**, Végvári, A., Rass, P., Sipka, P., Szegedi, G., Szekanecz, Z.: Association of rheumatoid arthritis with HLA-DR1 and HLA-DR4 in Hungary. *Ann NY Acad Sci.* 2005. Jun; 1051:263-70. **IF:1.892**

Az értekezés témájához kapcsolódó egyéb közlemények jegyzéke:

- 1) Szanto S, Bardos T, **Szabo Z**, David CS, Buzas EI, Mikecz K, Glant TT.: Induction of arthritis in HLA-DR4-humanized and HLA-DQ8-humanized mice by human cartilage proteoglycan aggrecan but only in the presence of an appropriate (non-MHC) genetic background. *Arthritis Rheum* 2004; 50:1984-95. **IF: 7.19**
- 2) Vegvari, A., **Szabo, Z.**, Szanto, S., Nesterovitch, A.B., Mikecz, K., Glant, T.T., Adarichev, V.A.: Two major interacting chromosome loci control disease susceptibility in murine model of spondylarthropathy. *J Immunol*, 2005, 175(4):2475-2483. **IF: 6.48**
- 3) Tibor T. Glant, **Zoltán Szabó**, Anikó Végvári, Sándor Szántó, and Katalin Mikecz: A TSG-6/Tnfp6 gyulladásgátló hatása arthritisben. *Magyar reumatológia*, 2005, 46: 5-13.
- 4) Murad, Y.M., **Szabo, Z.**, Ludanyi, K., Glant, T.T.: Molecular manipulation with the arthritogenic epitopes of the G1 domain of human cartilage proteoglycan aggrecan. *Clin Exp Immunol* 2005 Nov; 142(2):303-11. **IF: 2.51**
- 5) Kapitány, A., **Szabó, Z.**, Lakos, G., Aleksza, M., Végvári, A., Soós, L., Karányi, Zs., Sipka, S., Szegedi, Gy., Szekanecz, Z.: Associations between serum anti-CCP antibody, rheumatoid factor levels and HLA-DR4 expression in patients with rheumatoid arthritis J. *Rheumatol* (submitted)

Az értekezés témájához szorosan nem kapcsolódó közlemények jegyzéke:

- 1) Brugos, L., Sipka, S., Szilasi, M., **Szabo, Z.**, Lakos, G., Antal, P., Edes, I., Szegedi, G.: Effects of fish liver oil treatment on patients with ragweed induced seasonal allergic rhino-conjunctivitis. [Hungarian]. *Allergy and Clinical Immunology* 2: 42-47 (1999)

- 2) **Szabo, Z.**, Szilasi, M., Brugos, L., Szanto, S., Kovacs, I., Szeles, M., Lakos, G., Antal-Szalmas, P., Edes, I., Sipka, S.: Differences in the changes of allergen-specific IgE serum levels and the chemiluminescence of peripheral blood phagocytes in patients with allergic rhinoconjunctivitis during the ragweed season. *Immunol Lett.* 74 (2000): 201-205.
IF:1.7
- 3) Pákozdi, A., Rass, P., Lakatos, P., **Szabó, Z.**, Végvári, A., Szántó, S., Szegedi, G., Bakó, G., Szekanecz, Z.: D-vitamin receptor gén BsmI polimorfizmusa rheumatoid arthritisben és társuló osteoporosisban. I. Irodalmi áttekintés. *Ca és csont*, 2002;5 (1-2): 13-22.
- 4) Rass, P., Pákozdi, A., Lakatos, P., **Szabó, Z.**, Végvári, A., Szántó, S., Szegedi, G., Bakó, G., Szekanecz, Z.: D-vitamin receptor gén BsmI polimorfizmusa rheumatoid arthritisben és társuló osteoporosisban. II. Kísérleti adatok, *Ca és Csont*. 2002;5 (1-2): 23-30.
- 5) Szücs, G., Szekanecz, Z., Zilahi, E., Kapitány, A., Baráth, S., Szamosi, Sz., Végvári, A., **Szabó, Z.**, Szántó S., Czirják L., Kiss, C. Gy.: Systemic sclerosis-rheumatoid arthritis overlap syndrome: a unique combination of features suggests a distinct genetic, serological and clinical entity. *Rheumatology (Oxford)* 2007 Mar 23; [Epub ahead of print] **IF: 4.1**

Az értekezés alapjául szolgáló publikált, idézhető absztraktok:

1. **Szabó, Z.**, Végvári, A., Szántó, S., Adarichev, V.A., Nesterovich, A.B., Tunyogi-Csapo, M., Glant, T.T.: Spondylitis induced by systemic immunization with cartilage proteoglycan aggrecan in genetically susceptible inbred strains and their F1 and F2 hybrids. *Arthritis Rheum.* 2004; S50, 9:212. (ACR 2004, poszter)
2. **Szabó, Z.**, Szántó, S., Végvári, A., Szekanecz, Z., Adarichev, V.A., Mikecz, K., Glant, T.T.: Clinical and immunological characterization of spine involvement according to genetic background and differentially activated innate immunity in a murine model of spondylarthropathy. *Ann Rheum Dis.* 2005. (EULAR, poszter)
3. **Szabo, Z.**, Szanto, S., Vegvari, A., Szekanecz, Z., Adarichev, V.A., Mikecz, K., Glant, T.T.: Characterisation of proteoglycan induced spondylarthropathy. *Allergology and Clinical Immunology (Hungarian)*, 2005;8:84.

Lektorált folyóiratban megjelent idézhető kongresszusi absztraktok:

1. **Szabo, Z.**, Kiss, E., Szeles, M., Aleksza, M., Antal, P., Szegedi, G., Sipka, S.: Measurement of glucocorticosteroid sensitivity in patients with systemic lupus erythematosus by a new laboratory method in vitro. *Immunol Lett.* 73 (2000) : 245 (EFIS, előadás)
2. **Szabo, Z.**, Bodolay, E., Aleksza, M., Sipka, S., Szegedi, G.: Difficulties in the diagnosis and therapy of Henoch-Schonlein purpura. Case report. [Hungarian]. *Magyar Belorv Arch Suppl* (2/2000) 53: 8,2000.
3. Szekanecz, Z., Szanto, S., **Szabo, Z.**, Kovacs, I., Kulcsar, A., Lakos, G., Aleksza, M., Antal-Szalmás, P., Sipka, S., Szegedi, G.: Biochemical and inflammatory markers in osteopenia associated with rheumatoid arthritis [Hungarian]. *Magyar Belorv Arch Suppl* (2/2000) 53: 10,2000.
4. Szomjak, E., Soltesz, P., Varoczy, L., Gergely, L., Veres, K., **Szabo, Z.**, Szegedi, G.: Diagnostical and therapeutical lessons of two cases with HIV-associated pneumonia. [Hungarian]. *Magyar Belorv Arch Suppl* (2/2000) 53: 47, 2000.
5. Szekanecz, Z., Rass, P., Pákozdi, A., **Szabó, Z.**, Végvári, A., Szántó, S., Szűcs, G.: Vitamin D and estrogen receptor gene polymorphism in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 1 Suppl, 57, 2002.
6. Végvári, A., Illés, A., Szeles, M., Aleksza, M., Lakos, G., Antal-Szalmás, P., **Szabó, Z.**, Csiki, Z., Szántó, S., Sipka, S., Szegedi, G., Szekanecz, Z.: Effects of isoprinosine on parameters of cellular and humoral immunity in patients with rheumatoid arthritis and Hodgkin's disease. *Ann Rheum Dis* 2002; S61:171. (EULAR 2002, poszter)
7. Szekanecz, Z., Rass, P., Pákozdi, A., Szántó, S., **Szabó, Z.**, Végvári, A., Bakó, G., Szegedi, G.: Vitamin D and estrogen receptor gene polymorphism in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2002; S61:282. (EULAR 2002, poszter)
8. **Szabo, Z.**, Soltesz, P., Szucs G., Aleksza, M., Csiki, Z., Szanto, S., Lakos, G., Antal-Szalmás, P., Szamosi, S., Szekanecz, Z.: Plasmapheresis and high-dose intravenous immunoglobulin treatment of systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2002.
9. Vegvari, A., Illes, A., Aleksza, M., Antal-Szalmás, P., Lakos, G., **Szabo, Z.**, Sipka, S., Szekanecz, Z.: Effects of isoprinosine on cellular and humoral immunity in [Hungarian] *Magyar Belorv Arch.* 2/2002 Suppl: 38, 2002.
10. **Szabo, Z.**, Soltesz, P., Sziics G., Veres, K., Aleksza, M., Csiki, Z., Szanto, S., Lakos, G., Antal-Szalmás, P., Szamosi, Sz., Szekanecz, Z.: Plasmapheresis and high-dose intravenous immunoglobulin treatment in systemic sclerosis - a case report [Hungarian]. *Magyar Belorv Arch* 2/2002 Suppl: 39,2002.

11. Végvári, A., **Szabó, Z.**, Adarichev, V.A., Glant, T.T.: Genome-wide screening of experimentally induced spondylitis in mice. *Arthritis Rheum.* 2004; S50, 9:703. (ACR 2004, előadás).
12. Bajnok, É., Gál, I., Szántó, S., **Szabó, Z.**, Glant, TT., Mikecz, K.: Differential effects of CD44 deficiency and antagonists of CD44 mediated cell adhesion on leukocyte traffic to joints in murine arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004; S50, 9:261. (ACR 2004, előadás)
13. Murad, Y., **Szabó, Z.**, Glant, TT.: Genetic manipulation with the TCR and MHC binding sites of arthritogenic T cell epitopes in proteoglycan-induced arthritis (PGIA). *Arthritis Rheum.* 2004; S50, 9:545. (ACR 2004, poszter)
14. Sarraj, B., Szántó, S., Gál, I., **Szabó, Z.**, Glant, TT., Mikecz, K.: Requirement for CD44 and L-selectin for T cell activation and disease progression in proteoglycan-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004; S50, 9:271. (ACR 2004, előadás)
15. Végvári, A., **Szabó, Z.**, Szántó, S., Nesterovich, A.B., Adarichev, V.A., Szekanecz, Z., Glant, T.T.: Mapping genes controlling spondylitis susceptibility in (BALB/c x DBA/2) F2 hybrid mice. *Ann Rheum Dis.* 2005. (EULAR, előadás)

Egyéb absztraktok, előadások:

1. **Szabo, Z.**, Szanto, S., Bardos, T., Hanyecz, A., David, CS., Glant, TT.: Human MHC class II transgenic mice (HLA-DR4 and HLA-DQ8) recognize peptide epitopes of human cartilage proteoglycan (PG), but develop arthritis only in a genetically susceptible background. Rush University Forum for Research, Chicago, IL 2004.
2. Végvári A., Soltész P., Veres K., **Szabó Z.**, Szűcs G., Surányi P., Szekanecz Z.: Idegrendszeri manifesztációk rheumatoid arthritisben I. Rheumatoid arthritis és Guillain-Barré szindróma társulása. Magyar Reumatológusok Egyesülete Északkelet-Magyarországi Szekció XV. Tudományos Ülése, Tiszaújváros, 2003.
3. Adarichev V. A., Szanto S., Bardos T., Nesterovitch A. B., Gonda A., **Szabo Z.**, Vegvari A., Glant T. T.: Quantitative trait loci (QTLs) on chromosome 15 play crucial role in male and female susceptibility of proteoglycan induced arthritis (PGIA). Rush University, Forum for research and clinical investigation, 2004, Chicago.

In extenso megjelent vagy elfogadott közlemények száma: 12

Összesített impakt faktor: 35,1