

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

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

Dr. Szabó Zoltán

Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum

Belgyógyászati Intézet

III. sz. Belgyógyászati Klinika

Reumatológiai Tanszék

DEBRECEN

2007.

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

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

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.

## Bevezetés

A spondylitis ankylopoetica (SPA) a spondylarthropathiák prototípusa. A jól ismert patogenetikai faktorok (genetikai háttér, férfi nem, környezeti tényezők, 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. Ugyanakkor a nem-MHC gének hatása szintén igen fontos bármely autoimmun betegségre való fogékonyság tekintetében. SPA-s családtanulmányok (genomszűrés) számos szóba jöhető kromoszóma régiót említenek: MHC: 6p, nem-MHC: 2q, 10q,11q, 16q,17q,19q.

Mindeddig spontán, vagy kísérletesen indukált spondylarthropathia csak kevés állatmodellben került leírásra és úgy gondolják, hogy autoimmun mechanizmus csak a HLA-B27 transzgén rágcsálókban, valamint proteoglikán (PG) indukálta arthritisben (PGIA) ill. spondylitisben (PGIS) áll a háttérben. 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. 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 aggregánnal progresszív polyarthritis-t indukál (PGIA), melyet gyakran kísér spondylitis (PGIS). 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 kísérő 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.

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

A betegség asszociált HLA molekulák egy közös, 5 aminosavból álló szekvenciával rendelkeznek a DRB lánc 3. hipervariábilis régiójában, ez az ún. "shared epitope" (SE). 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.

Jelentős etnikai és földrajzi különbségek figyelhetők meg az egyes variánsok előfordulásában. Az észak-európai populációban a RA erős HLA-DRB1\*04

kapcsoltsága jellemző, míg a mediterrán RA-es betegek inkább a DRB1\*01 és DRB1\*10 alléleket hordozzák. Ezen túlmenően, az észak-amerikai indiánok/bennszülöttek esetében a DRB1\*14 asszociációja jellemző a RA-re való fogékonysággal. Egy legutóbbi vizsgálat eredménye szerint, magyar RA-es betegekben a HLA-DRB1\*0404 altípus mutatott erős asszociációt a RA-el.

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, míg japán és kínai betegek esetében a DRB1\*0405 allél előfordulása gyakoribb. A HLA-DR1 altípusok közül, a DRB1\*0101 allél asszociációt említik RA esetében, Ashkenazy zsidó és különböző kaukázusi betegpopulációkban.

## 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 gyulladáshoz kapcsolódó 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 betegpopulációinkban.

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

## **Anyagok, betegek és módszerek**

### **Vizsgálat I.:**

Proteoglikán aggregáttal 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.

### ***Antigének, immunizálás***

A teljes porc extraktumot humán felnőtt porcból nyertük 4M-os guanidin klorid extrakcióval. Az extraktumot ismételt CsCl gradiens ultracentrifugálással tovább tisztítottuk disszociatív körülmények között. 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) (9;13;14). A PG-t ezt követően endo- $\beta$ -galaktozidázzal (Seikagaku America) emésztettük (0.1 egység/100 mg PG, nátrium acetát puffer, pH 5.8) a felnőtt porcban jelenlevő keratán szulfát oldalláncok eltávolításához. 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. A PG

extraktumot diethylaminoethyl (DEAE; Whatman, Clifton, NJ, USA) ioncserélő kromatográfiával nyertük ki. A meg nem kötött frakciót 0.15 M-os NaCl-al nyertük ki, és hyaluronan-Sepharose-al absorbeáltuk a GAG mentes G1 domének és a porc link protein eltávolításához. 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. 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) (16), 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 (faroktőbe) ill. 3. alkalommal IP adott injekciókhoz. Az immunizált állatok összesen 3 antigén injekciót kaptak (0., 21. és 42. nap) CFA vagy DDA adjuvánssal. A kísérleti állatcsoportok a 98. és 126. nap között kerültek leölésre.

### ***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.

#### ***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: ízfelszínnek egyenetlensége a sacroiliacalis ízületben (*sacroileitis*), intervertebrális rések beszűkülése a korai stádiumban. Későbbi szakban a csigolya közti porckorongok degenerációja következtében ankylosis alakul ki, mely a humán kórképhez (SPA) hasonló jelenség.

#### ***A proteoglikán indukálta spondylarthropathia hisztopatológiai értékelése***

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

eltérések alapján volt lehetséges. 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): gyulladáshoz vezető 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.)

#### ***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 antigén specifikus T-sejt proliferációt (lépsejtkultúra) az ötödik napon határoztuk meg <sup>3</sup>H-thymidine beépülés mérésével. A sejteket 50 µg PG protein/ml hozzáadásával stimuláltuk és négy párhuzamos mintában mértünk ( $3 \times 10^5$  sejt/lyuk, 96 lyukú tenyésztőlemez). Az antigén specifikus IL-2 termelést (vagyis a CTLL-2 sejt 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  $^3\text{H}$ -thymidine perenkénti beütésszámának arányát jelenti az antigén stimulált tenyészetek és a nem stimulált lyukak esetében.

A lépsejtek antigén specifikus citokin termelését (interferon- $\gamma$ : IFN- $\gamma$ ; interleukin-4: IL-4; tumor necrosis faktor- $\alpha$ : TNF- $\alpha$ ) a sejtenyészet felülúszójából ( $3 \times 10^6$  sejt/ml) mértük a tenyésztés negyedik napján. A lépsejtek által termelt citokinek mennyiségét, a szérumban citokin szinteket (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6), és szérumban 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 szintek meghatározásához szintén ELISA módszert használtunk. 96 lyukú Maxisorp tenyésztőlemezeket (Nunc, Roskilde, Denmark) fedtünk humán vagy egér porc PG-vel (0,1  $\mu\text{g}$  protein/lyuk.), majd a szabadon maradt kötőhelyeket PBS-ben (pH 7,4) oldott 1%-os zsírmentes tejpörrel 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 antitest koncentrációkat a megfelelő egér IgG izotípus standardokhoz (Zymed, San Francisco, CA, USA) vagy tisztított egér IgG-hez (Sigma-Aldrich) viszonyítva határoztuk meg.

### ***Statisztikai analízis***

A statisztikai számításokat az "SPSS 10,0 for Windows" (SPSS, Chicago, IL, USA) program segítségével végeztük. Az egyes csoportok közötti összehasonlítást a Student féle *t*-teszttel 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).

### ***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)]. A betegek átlagéletkora  $50 \pm 15$  (SD) év volt (17-82 év között). A betegség átlagos fennállási ideje a vizsgálat idején  $6 \pm 4$  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 ( $46 \pm 13$  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.

***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). 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.

***Statisztikai analízis (2. vizsgálat)***

A RA-es betegek HLA-DR allél frekvenciáját az egészséges személyekben találhoz viszonyítottuk. A különböző antigényakoriságok összehasonlítását  $\chi^2$  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.

## Eredmények

### *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.

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. Masszív gyulladássos sejtes infiltráció, pannus képződés és porc, ill. csont erosiók kialakulása jellemzi hisztológiailag az érintett ízületeket. Az 1. táblázatból kitűnik, 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 rés , ill. csigolya közti rés 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. 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.

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. Mindemellett a DDA használata adjuvánsként korábbi kezdetű PGIS-t eredményezett a PG immunizálás során.

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, 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 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, a továbbiakban ezen két keresztezés esetében fókuszáltunk a PGIS alakulására.

#### ***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, a PGIA incidencia, valamint a spondylitis súlyossága 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. Az átlagos spondylitis súlyossági érték (spondylitis index)  $0,69 \pm 0,63$  és  $0,66 \pm 0,57$  volt a két csoportban. 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). Kiemelendő továbbá, hogy amikor a PGIA és PGIS együttesen fordult elő, a progresszívebb lefolyású arthritist súlyosabb spondylitis kísérte.



### ***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. A szérum IL-6 szint nagyon magas volt az arthritis és spondylitis által együttesen érintett állatok esetében. Mind a szérum IL-6, mind a szérum amyloid-A (SAA) pozitív korrelációt mutatott a PGIS súlyosságával.

Nagyon erős T- és B-sejt válaszok voltak mérhetőek mind az immunizáló humán, mind a saját egér PG ellen. Magas szérum citokin szinteket (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , 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 szérum TNF- $\alpha$  szintek szignifikáns korrelációt mutattak a PGIS jelenlétével (BALB/c x C3H) F2 egerekben, csak a szérum IL-6 és SAA szintek voltak szignifikánsan magasabbak a spondylitises (BALB/c x DBA/2) F2 állatokban. 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.

### ***A HLA-DRB1 allélek megoszlása***

A 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.

### **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, 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 intervertebrális discus (IVD) nucleus pulposus és annulus fibrosus nagy mennyiségben tartalmazza a proteoglikán aggregátumot,

hasonlóan az ízületi porchoz. Minthogy a humán és egér PG jelentős homológiát mutat, nem meglepő, hogy humán porc proteoglikánnal immunizált egerekben immunválasz jön létre az ízületek és intervertebrális porckorongok porcos struktúrája ellen. Mindez azonban csak meghatározott genetikai háttér esetében alakul ki ami amellet szól, hogy az arthritisre való fogékonyság önmagában nem elégséges spondylitis kialakulásához. Amint leírásra került a DBA/1 egerek kifejlesztnek 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 intervertebrális discusok körül gyulladásos 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 törzssel 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. Ennek megfelelően a DBA/2 genom erős szupportív 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. 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, de egyetlen F2 hibridben sem alakult ki spondylitis.

Ezzel szemben, amikor 2 spondylitisre fogékony törzset kereszteztünk (BALB/c és C3H), a PGIS incidencia az F2 generációban végeredményben megegyezett bármely szülői törzsben észlelten. 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. 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, 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.

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. A muramil-dipeptid (egy peptidoglikán) és trehalózdimikolát (egy glikolipid, mely az *Escherichia coli* lipopoliszacharidjának felel meg) 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, ugyanolyan hatásos adjuváns, mint a CFA a PGIA vagy CIA indukciója során. Ugyanakkor a DDA mentes a CFA mellékhatásaitól. 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.

Munkánk során összehasonlítottuk a CFA és DDA adjuváns hatását PGIS-ben. Mint korábban leírásra került, 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. 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. Azonban, ha egy törzs rezisztens volt PGIA, CIA, vagy PGIS szempontjából az antigén DDA adjuvánsal 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. Úgy találták, hogy a HLA-B27 kombinációja más HLA allélekkel (HLA-B60 és HLA-B35) fokozza a genetikai predispozíciót SPA-ra, és genomszűrési vizsgálatok eredményei a betegség poligénes természetét mellett szólnak. Az ezen területen folyó intenzív kutatások ellenére az SPA pontos pathogenezise ismeretlen. A feltételezett autoantigénekről szóló tanulmányok számos molekula szerepét felvetették keresztreaktív immunválasz kiváltásában (molekuláris mimikri), mint pl. *Klebsiella* antigének, *Yersinia* antigének, idegenként felismert HLA-B27, ill. porc proteoglikán, vagy verzikán epitópok. További kutatásokat igényel annak megválaszolása, hogy az egér H-2 lokuszon belül mely subdomének lehetnek felelősek a PGIS-re való genetikai fogékonyságért 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. 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- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , vagy TNF- $\alpha$  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 és rheumatoid arthritisben, 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. Lényeges, hogy mindkét leírt genetikai lókuszt megfeleltethető az SPA-ban szenvedő betegekben találtaknak. 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 allélok 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. Saját eredményeinkhez hasonlóan, a HLA-DR4 és a

HLA-DR1, egy legutóbbi magyar tanulmány szerint is kapcsoltságot mutat RA-el. Azonban például mediterrán RA-es betegekre a HLA-DR1 és HLA-DR10 hordozása jellemző inkább, mint a HLA-DR4 hordozás. Az észak-amerikai bennszülött indiánok esetében pedig HLA-DR14 hordozás jellemző. 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.

### **Összefoglalás, új eredmények**

1. Porc proteoglikán aggregáttal 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.
2. Elsőként jellemeztük ezen autoimmun spondylitis (PGIS) előfordulását a genetikai háttér, immunizálási protokoll, illetőleg az alkalmazott adjuváns függvényében a különböző egértörzsekben.
3. A PGIS incidenciáját és súlyosságát szövettanilag értékeltük. A spondylitis súlyosságának hisztológiai értékelésére pontrendszert dolgoztunk ki, melynek segítségével az egyes vizsgált csoportok eredményei összehasonlíthatóvá váltak.



4. Meghatároztuk a spondylitis kialakulása során végbemenő immunológiai folyamatok jellemzőit, valamint összefüggéseket kerestünk a spondylitis súlyossága és ezen paraméterek között. A gerincérintettség pontértékei, a klinikai manifesztációk, valamint az általunk mért szérumban lévő antitest titerek és citokin szintek, valamint a porc proteoglikán elleni *in vitro* T sejt válaszok között kerestünk korrelációt. Ennek során a szérumban lévő IL-6 és SAA szintek korreláltak szignifikánsan a PGIS súlyosságával.

5. Vizsgálataink során a következő új megállapításokat tettük:

- A fogékony egértörzsekhez tartozó egerek és ezek F2 hybridjeinek 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 progressiójára.
- 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.

Mindezek új információt jelentenek a genetikai meghatározottság vonatkozásában. Vizsgálataink alapján feltételezzük, hogy a spondylitisre való fogékonyság hátterében csupán kevés nem-MHC gén hatása játszik szerepet. Munkánk eredményei megteremtették az alapját az autoimmun spondylitis genetikai hátterével foglalkozó átfogó kutatási projektnek.

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.

## 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**