

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

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

Dr. Gáspár Krisztián

Témavezető: Prof. Dr. Szegedi Andrea



DEBRECENI EGYETEM

Petrányi Gyula Klinikai Immunológiai és Allergológiai Doktori Iskola

Debrecen, 2015

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

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzésért, klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Gáspár Krisztián, orvos

Készült a Debreceni Egyetem Petrányi Gyula Klinikai Immunológiai és Allergológiai Doktori
Iskolában

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

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Balla György, az MTA doktora

tagok: Dr. Bácsi Attila, PhD

Dr. Pónyai Györgyi, PhD

A doktori szigorlat időpontja: DE ÁOK Gyermekklinika Könyvtára, 2015. április 14. 11 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Bata-Csörgő Zsuzsanna, az MTA doktora

Prof. Dr. Bodolay Edit, az MTA doktora

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Balla György, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Bata-Csörgő Zsuzsanna, az MTA doktora

Prof. Dr. Bodolay Edit, az MTA doktora

Dr. Bácsi Attila, PhD

Dr. Pónyai Györgyi, PhD

Az értekezés védésének időpontja és helye:

DE ÁOK Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme, 2015. április 14. 13 óra

1. BEVEZETÉS

Az atópiás dermatitis (AD) egy igen gyakori, krónikus lefolyású, remissziókkal és fellángolásokkal járó gyulladásos bőrbetegség, melyet a bőr szárazsága, és kifejezett viszketése, valamint a legsúlyosabb formában annak szöveti átépülése (remodelling) jellemez. Számos vizsgálat segített a betegség patofiziológiájának megértésében, de a pontos részletek máig sem teljesen tisztázottak. A megváltozott immunválasz hátterében állhatnak az immuntolerancia elváltozásai, melynek fontos elemei a regulatív tulajdonsággal rendelkező T sejtek. Az egyik ilyen sejtcsoport a forkhead box P3 (FOXP3)-t expresszáló $CD4^+CD25^{bright}FOXP3^+$ természetes regulatív T (nTreg) sejtek csoportja, melyek szerepe intenzív kutatások tárgya AD-ben is. Ugyanakkor az nTreg funkciók jellemzőinek vizsgálati eredményei ellentmondásosak.

További jellegzetes folyamat az AD krónikus, súlyos formájában előforduló szöveti átépülés, amit a bőr strukturális elváltozásai jellemeznek, de a hátterében lejátszódó mechanizmusok részleteiben nem ismertek. A proinflammatorikus citokinek, valamint a kemokin szupercsalád egyes tagjai nemcsak az AD-re jellemző gyulladás elindításában, fenntartásában és szabályozásában, hanem a szöveti átépülésben is szerepet játszhatnak, melynek feltételezett hátteréről nem állnak rendelkezésre irodalmi adatok.

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

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS – ATÓPIÁS DERMATITIS

2.1. AD – etiológia, genetika, epidemiológia, környezeti faktorok hatása

Az AD kialakulásában környezeti és genetikai tényezők játszanak szerepet, magába foglalva komplex gén-gén és gén-környezet interakciókat. A bőr fiziko-kémiai barrierjének, illetve a szervezet természetes és adaptív immunválaszának működései olyan genetikailag jól meghatározott folyamatok, melyekre közvetlenül hatnak a specifikus és aspecifikus környezeti tényezők, és ezek együttes változása járul hozzá a betegség kialakulásához.

A betegség prevalenciája a múlt század hetvenes éveitől egyes gyermek korcsoportokban folyamatosan nő, de előfordulási gyakorisága a földrajzi területek függvényében igen nagy

különbségeket mutat. A gyermekkori magas adatokhoz képest a felnőtt lakosságban a betegség prevalenciája alacsonyabb (1-3%).

A genomikai vizsgálatok számos, az AD-hez társított lokuszt azonosítottak. Az immunválasz működését irányító gének mellett az utóbbi időben derült fény arra, hogy az AD kialakulásában az epidermális barrier szerkezetét és funkcióját meghatározó gének is rendkívül fontosak. Ez utóbbi gének egyike az azonos nevű fehérjét kódoló filaggrin (*FLG*) gén.

Az AD-ben a genetikai hajlam talaján a környezeti faktorok hatására manifesztálódhat a betegség. A környezeti faktorokat két nagy csoportra oszthatjuk. Ezek a specifikus (allergének és mikrobák), és a nem-specifikus (mechanikai irritációk, klimatikus paraméterek, stressz, gyógyszerek, terhesség) faktorok.

Az egészséges emberi bőrön számos mikroorganizmus kolonizálódik, de a toxintermelő *S. aureus* nem része a normál bőr mikrobiomnak. Az AD-ben szenvedő betegek igen nagy részében (kb. 90 %) mind a lézionális, mind a nem-lézionális bőrön kimutatható a *S. aureus* kolonizációja (szemben a normál egyének 5-10 %-val), melynek foka korrelál a betegség súlyosságával és a klinikai tünetek antibiotikum alkalmazására javulnak. Az atópiás bőrön kolonizálódott baktérium és toxinjai (enterotoxin A-D) széles biológiai aktivitási spektrummal rendelkeznek és részt vesznek az atópiás bőrgyulladás súlyosbításában.

2.2. AD patogenezeise

Az AD jól karakterizálható klinikai tünetei mögött bonyolult patomechanizmus rejtőzik. A háttérben megfigyelhető az epidermális barrierfunkciók és az összetett immunmechanizmusok folyamatainak abnormalitása. Az AD létrejötténél a bőr barrier és az immunválasz olyan elváltozásai láthatók, mely miatt az arra hajlamos egyének epidermise nem képes ellenállni a behatásoknak, és az ártalmatlan környezeti anyagokra is hiperszenzitivitással válaszol.

Barrierkárosodás AD-ben

Az emberi bőr barrier nem egy élettelen váz, hanem egy metabolikusan aktív, élettanilag fontos szerepet játszó réteg, melynek feladata a fizikai és kémiai védelem a külvilágból érkező ingerekkel szemben, valamint a transzepidermális vízvesztés (TEWL) megakadályozása. A barrier alkotói a keratinocyták (corneocyták), a struktúrfehérjék, a létrejövő sejt-sejt kapcsolatok, és az intercelluláris lipidek. A szaruboríték a hámsejtek fő strukturális fehérjéivel is kapcsolatban áll, melyek közül kiemelkedő jelentőségű molekula a FLG. Ez a FLG mechanikai vázszerkezetet biztosít, termékei létrehozzák a természetes

hidratáló faktort, központi szerepet játszik a bőr hidratáltság, a savas pH fenntartásában, regulálja a proteázok aktivitását, a barrier permeabilitását és a bőr antimikrobiális védelmét.

A barrier károsodás oka AD-ben lehet genetikai, vagy szerzett. A genetikai okok közül a legismertebb a FLG gén mutációja, míg a szerzett barrierkárosodás létrejöttének okai lehetnek a testfelszínen megjelenő kórokozók, vagy irritáló hatású kémiai anyagok.

Szöveti átépülés (remodelling) és az AD

A bőr fiziko-kémiai barrierjének strukturális és funkcionális változása és az állandóan jelenlévő gyulladás eredményeként egyéb szerkezeti átalakulások is végbemehetnek az atópiás bőrben. AD-ben a proinflammatorikus citokinek nemcsak a bőrgyulladás elindításáért és fenntartásáért felelősek, de részt vehetnek a remodelling patogenezisében is. Az AD kezeletlen, krónikus formájában tapasztalható szöveti átépülés folyamatának eseményei, a mechanizmus háttere, valamint a résztvevő sejtes és humorális elemek (pl. kemokinek) feladatai részleteiben nem ismertek.

Immunológiai mechanizmusok változásai AD-ben

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

Az AD immunológiájának megértéséhez elengedhetetlen a szerzett immunválaszban résztvevő elemek ismerete. A T sejtek központi szerepet játszanak a betegség lefolyásában. A betegség akut fázisában a bőrben az IL-5 és IL-13 termelő memória sejtek és hosszan fenntartott Th2 túlsúly látható. A fiziko-kémiai barrier és a Th2 túlsúly kapcsolata kettős: a gyulladás fokozza a barrier károsodását, míg a sérült barrieren keresztül átjutó, kifejezett allergén expozíció a Th2 túlsúlyt fokozza. Ez utóbbi esetén csökken az antimikrobiális peptidek (AMP) mennyisége is, valamint a Th2 sejtek által termelt IL-4 és IL-13 felerősítik az adhézis molekulák expresszióját az endothelsejteken, a B sejtekben IgE termelést indukálnak, míg a CCL11, CCL26 kemokinek fokozzák az eosinophil granulocyták gyulladásos területre toborzását. Az AD krónikus fázisa során a bőrben már nem látható Th2 dominancia, hanem fontos szerepet játszanak az interferon (IFN)- γ , IL-12, IL-5, granulocytamakrofág-CSF, illetve IL-22 termelést mutató Th1 és Th22 sejtek is.

Alapvető fontosságú, hogy a jól működő immunrendszer felismerje a saját és az idegen antigénstruktúrákat, valamint megkülönböztesse az ártalmas és az ártalmatlan behatásokat. Az

immunhomeosztázis fenntartása érdekében az immunrendszernek az idegen struktúrák ellen védelmet kell nyújtania, míg a saját struktúrákat tolerálnia kell. Az immunrendszer antigénspecifikus, elsősorban a saját antigének irányában megmutatkozó válaszképtelensége az immuntolerancia, mely kialakításában pozitív és negatív szelekciós folyamatok vesznek részt. A perifériára kijutott T lymphocytákat a perifériás tolerancia mechanizmusai folyamatosan kontroll alatt tartják. A reguláló T sejteknek, melyek kulcsfontosságúak a perifériás tolerancia fenntartásában, 3 fő alcsoportja ismert: a $TGF\beta^+FOXP3^-$ Th3 sejtek, az 1. típusú $IL-10^+FOXP3^-$ reguláló T (Tr1) sejtek, valamint a $CD4^+CD25^{bright}FOXP3^+$ természetes regulatív T (nTreg) sejtek.

Az nTreg sejtek fontos szerepet játszanak az allergénekre adott T sejt válaszok kontrollálásában. A regulatív tulajdonsággal rendelkező $CD4^+CD25^{bright}$ sejtek magas szinten expresszálják a FOXP3-t és csak ezek rendelkeznek szuppresszív tulajdonságokkal. Gátolják a T sejtek differenciációját, aktivációját, proliferációját, citokin szekrécióját, migrációját, valamint feladatuk az autoaggresszív lymphoproliferatív betegségek kialakulásának megelőzése, a normál immunhomeosztázis fenntartása, az immunválaszok modulálása.

Kevés ismerettel rendelkezünk azonban az nTreg sejtek szerepéről és funkciójáról atópiás bőrben. Egyes vizsgálatok az emelkedett nTreg sejtek protektív hatását írták le fiatal életkorban, ahol atópiás gyermekekben allergén-specifikus tolerancia alakult ki a magas nTreg sejtszám hatására. A felnőtt AD populációban is számos vizsgálat a keringő $CD4^+CD25^{bright}FOXP3^+$ nTreg sejtek magasabb számát írta le, azonban funkcionális karakterizálást, illetve AD betegek perifériás vérében az nTreg-ek számbeli és funkcionális változásainak egyidejűleg történő vizsgálatát csak néhány kutatócsoport végezte eddig, és azok eredményeiben is felfedezhetők ellentmondások.

Az adaptív immunválasz fokozott és károsodott működése mellett AD-re jellemző a természetes immunitás diszregulatív működése is. Ennek egyik fő feladata a jellegzetes mikrobiális struktúrák felismerése. Ezen struktúrák a patogén-asszociált molekuláris mintázatok és az ezeket felismerő molekulák a mintázatfelismerő receptorok (pattern recognition receptors – PRR). A PRR kötődések kialakulása után megindul a mikrobiális eredetű molekulák eliminációja. AD-ben a TLR2, CD14, NOD1 polimorfizmusok létrejötte miatt a mikroorganizmusok felismerése zavart szenved, melynek következménye a sérült természetes immunitás. Ezen változások, együtt az antimikrobiális peptidek deficienciájával és a barrier funkciók elégtelenségével, a bőr bakteriális kolonizációjához, a védekezési mechanizmusok zavarához és következményes infekcióhoz vezethetnek.

Kemokinek és szerepük AD-ben

A kemokinek (46 ligand és 19 receptor) kicsiny, citokin-szerű, kemoattraktáns fehérjék, amik a leukocyták mozgását szabályozzák homeosztatikus és gyulladásos körülmények között. A kemokinek fő forrásai a gyulladásos sejtek mellett a bőr strukturális rezidens sejtei; nemcsak élettani körülmények között, de proinflammatorikus citokinek hatására is nagymértékben termelődnek, és az endothélen keresztül transzportálódva megjelennek azok felszínén is, így fontos szerepet játszanak a leukocyták gyulladásos területre hívásában.

A kemokin szupercsalád egyes tagjairól leírták, hogy aktív szerepet játszanak az atópiás bőrgyulladásban. A kemokinek sokrétű ismert funkcióján túlmenően feltételezhető, hogy a szöveti átépülés atópiás bőrben végbemenő folyamatainak egyes részleteiben is szerepet játszhatnak, de ennek megerősítésére irodalmi eredmény nem áll rendelkezésünkre.

2.3. Az AD klinikai tünetei, diagnosztikája és terápiája

A betegség klinikai lefolyásában megkülönböztetünk akut, szubakut és krónius stádiumokat, melyeket jellegzetes klinikai tünetek karakterizálnak. A vezető panaszok a bőr szárazsága és a viszketés. Az AD legsúlyosabb komplikációi a bőr másodlagos bakteriális és virális felülfertőződései. A betegség kezelése komplex terápiát igényelhet. Elsődleges cél a bőr barrierfunkciójának javítása, továbbá a gyulladás megszüntetése, valamint a provokáló faktorok eliminálása. A megfelelően kiválasztott terápia végső célja a tünetmentesség elérése és az életminőség javítása.

2.4. Célkitűzések

Munkánk során az AD patogenezisében lejátszódó két fontos mechanizmus hátterének részletesebb megismerése volt a célunk.

2.4.1. Az nTreg sejtek szerepének vizsgálata AD-ben

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

1. milyen változást mutatnak az AD betegek perifériás vérében keringő CD4⁺CD25^{bright}FOXP3⁺CD127⁻ nTreg sejtek és azon belül a bőrbe visszatérő sejtek funkcionális és mennyiségi tulajdonságai az egészséges kontrollokhoz képest,

2. milyen funkcionális változásokat tapasztalhatunk az nTreg sejtek szuppresszor képességében in vitro funkcionális tesztel; a kapott eredmények összehasonlítása a betegek és az egészséges kontrollok között; milyen hatással van a sejtekre a SEB,

3. milyen összefüggés van az nTreg szám és a klinikai adatok közt.

2.4.2. Szöveti átépülés vizsgálata AD-ben

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

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

3. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Betegek

A nTreg sejtek vizsgálatához 27, magas IgE szinttel (>1000 U/ml) rendelkező, középsúlyos súlyos AD-ben szenvedő beteg és 11 egészséges, azonos korú és nemű önkéntes perifériás vérért használtuk. A szöveti átépülés vizsgálatában 6 milliméter átmérőjű bőrbiopsiákat nyertünk AD-s betegektől (29 tünetmentes területről nyert és 65 lézionális területről származó biopszia), psoriasisos betegektől (9 biopszia tünetmentes területről, 37 tünetes területről), és prurigo nodularisban szenvedőktől (46 beteg), továbbá 29 egészséges önkéntestől. Atópiás allergia tesztet (APT) végeztünk házipor atka keverékkel (Stallergen SA, Antony, Franciaország) 17, Prick tesztet bizonyítottan házipor atkákra érzékeny AD-s betegen. Az APT 7 betegnél volt pozitív, akiknél a tesztel fedett bőrterületből nyertünk biopsziát. Az atópiás betegek diagnózisának felállításában a Hanifin és Rajka által létrehozott kritériumrendszert követtük, míg a betegség súlyosságának meghatározásában a SCORing AD (SCORAD) indexet használtuk. A vizsgálatokba választott betegek nem részesültek szisztémás glükokortikoid vagy egyéb immunmoduláns kezelésben 4 héttel, míg TCS kezelésben 4 nappal a mintavételek előtt. A helyi etikai bizottság által engedélyezett vizsgálatokba bevont személyek részletes tájékoztatás után írásban egyeztek bele. A kísérletek a Helsinki Nyilatkozat előírásainak megfelelően történtek.

3.2. Sejtkultúrák

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

3.3. Szérum IgE szint mérése

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

3.4. Áramlási citometriás vizsgálatok

Az nTreg-ek tanulmányozása áramlási citométerrel

A perifériás vér mononukleáris sejteket (PBMC) Ficoll (Sigma-Aldrich, München, Németország) gradiens centrifugálással izoláltuk heparinizált vérből, majd a CD4⁺CD25⁺ T sejteket PBMC-ből különítettük el Miltenyi Regulatory T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Németország) felhasználásával, a gyártó által leírt protokollt követve. Áramlási citometriával határoztuk meg a CLA⁺CD4⁺CD25^{bright}FOXP3⁺ nTreg sejteket az AD betegek és az egészségesek vérében. Először a CD4⁺CD25^{bright} sejtek vizsgálata során bizonyítottuk, hogy csaknem kizárólagosan FOXP3 pozitívak és CD127 negatívak, majd a CD127 antitestet elhagyásával 4. jelölésként anti-CLA antitestet alkalmaztunk. A CLA pozitivitást a kapuzott CD4⁺CD25^{bright}FOXP3⁺ T sejteken vizsgáltuk. A sejtfelszíni és intracelluláris festések során a gyártók útmutatásait követtük. A PBMC előkészítése során nyert T sejteket foszfát puffer oldatban mostuk, majd sejtfelszíni festéseket végeztünk CD4-allophycocyanin, vagy CD4-fluoreszcein izotiocianát (FITC), CD127-allophycocyanin, CLA-FITC (mind BD Pharmingen, Heidelberg, Németország), és CD25-fikoeritrin (PE)-Cy5 (Immunotech, Marseille, Franciaország) antitestekkel (30 perc, 4°C). A sejteket hideg Flow Cytometry Staining Buffer oldatban mostuk és Fixation/Permeabilisation munkaadatban (eBioscience, San Diego, CA, USA) reszuszpendáltuk. Ezt követően anti-human FOXP3-PE (clone PCH101; eBioscience, San Diego, CA, USA) antitestet adtunk a szuszpenzióhoz. A mintákat BD FACSCalibur flow cytometerrel analizáltuk, és az adatokat CellsQuest software-rel (BD Pharmingen, Heidelberg, Németország) dolgoztuk fel.

Kemokin receptorok kimutatása fibroblasztokon áramlási citométerrel

Az NHDF felszínén expresszált kemokin receptorokat áramlási citometriával PE-konjugált antitestekkel mutattuk ki [CCR1-10, CXCR1-6 és izotípus kontroll (mind R&D Systems Inc.,

Minneapolis, MN, USA)]. A CCR3 kimutatásához patkány anti-humán anti-CCR3-PE (IgG2a) antitestet alkalmaztunk (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA). A sejtfelszíni festés után a mintákat Fixation/Permeabilisation munkaoldattal (eBioscience, San Diego, CA, USA) fixáltuk. A minták vizsgálata BD FACSCalibur áramlási citométerrel, kiértékelése CellsQuest software (BD Pharmingen, Heidelberg, Németország) segítségével történt.

3.5. Sejt szuppressziós teszt

A $CD4^+CD25^+$ T sejteket perifériás, heparinnal alvadásgátolt vérből Ficoll grádiens segítségével szeparált PBMC-ből izoláltuk Miltenyi Regulatory T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Németország) felhasználásával, a gyártó által leírt protokoll szerint. A szuppresszor aktivitás kimutatásának érdekében a $CD4^+CD25^+$ és $CD4^+CD25^-$ T sejteket 1:1 arányú kevert kultúrában tenyésztettük. A poliklonális stimuláció szimulálására anti-CD3/CD28 T sejt expander mikrogyöngyöket (Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norvégia) használtunk kizárólagosan, vagy az AD-es vizsgálatokban elfogadott SEB (Sigma-Aldrich, München, Németország) jelenlétében. A $CD4^+CD25^+$ populációt nemcsak kevert kultúrában, hanem önmagában is stimuláltuk, majd a kapott eredményre korrigáltuk a kevert lymphocytá reakció (MLR – mixed lymphocyte reaction) során kapott értékeket. Az alapkísérlet során 1 egység (gyöngy/sejt) anti-CD3/CD28 T sejt expandert és 1 pg/ml SEB-t alkalmaztunk. SEB által stimulált effektor T sejtek szuppresszióját okozó Treg sejtek szelektív defektusának bizonyítására dózis-függő kísérletsort is kialakítottunk. A sejtproliferációt EZ4U kolorimetriás kittel (BioMedica, Bécs, Ausztria) vizsgáltuk, és az aktivitást az optikai denzitás (OD) értékekből számítottuk, melyet 450 nm-es hullámhosszon Labsystems Multiscan MS készülékkel (MTX Lab Systems Inc, Vienna, VA, USA) detektáltunk. A kevert lymphocytá kultúrák OD értékeit korrigáltuk a tiszta $CD4^+CD25^+$ T sejt tenyészetek OD értékeivel. A szuppresszor aktivitást a $CD4^+CD25^-$ T sejt kultúrák és a kevert kultúrák korrigált OD értékei hányadosa alapján számoltuk.

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

A 6-lyukú tálcán tenyésztett humán primer keratinocytá és dermális fibroblaszt sejt kultúrákat kezeletlen állapotban, illetve kezelés után vizsgáltuk [TNF- α és IL-1 β , vagy IFN- γ , vagy IL-13, vagy IL-4 (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA), vagy h-granulocytá-makrofág-CSF (Schering-Plough Research Institute, Kenilworth, NJ, USA)]. A bőrbíopsziás minták vizsgálatához a szöveteket Mikro-DismembratorU készülék (Braun Biotech, San Diego, CA, USA) segítségével homogenizáltuk. Mind a sejt kultúrák, mind a bőrszövet esetében TRIzol

(Invitrogen, Karlsruhe, Németország) reagenst alkalmazva RNS izolálást hajtottunk végre. Ezután az RNS-t DNase I (Boehringer, Mannheim, Németország) enzimkezelésnek vetettük alá, majd a reverz transzkripció következett. A komplementer dezoxiribonukleinsav (cDNS) mintákban a kemokin ligandok (sejtkultúrában CCL11, CCL24, CCL26; bőrben CCL5, CCL8, CCL11, CCL24, CCL26) és receptor (bőrben CCR3) génexpressziós szintjét qRT-PCR méréssel mutattuk ki [ABI PRISM 7000 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems, Darmstadt, Németország) folyamatosan 40 ciklus]. A primer assay-t az Applied Biosystems (Darmstadt, Németország) cégtől rendeltük. A célgének expresszióját a 18S RNS normalizáló gén expressziójához viszonyítottuk.

3.7. Szövettani vizsgálatok

A szöveti átépülés és a dermális változások bemutatása érdekében rutin szövettani vizsgálatok mellett elastica van Giesson és Masson-féle trikróm festési módszereket alkalmaztunk egészségesek és AD-es betegek bőrből származó biopsziás mintákon.

3.8. Immunfluoreszcens vizsgálatok

Immunfluoreszcens vizsgálatok bőrben

A CCL26 fehérje expresszió bemutatásához immunfluoreszcens vizsgálatokat végeztünk egészségesek, és AD-s betegek bőrből származó acetonnal fixált fagyasztott metszeteken. A metszeteket kecske anti-humán CCL26 antitesttel inkubáltuk, izotípus kontroll mellett (kecske IgG; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Németország; izotípus Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA). Ezután a metszeteket AlexaFluor 555-jelzett számar anti-kecske antitesttel inkubáltuk (R&D Systems, Mineapolis, MN, USA) és sejtmagfestést (DAPI Invitrogen, Karlsruhe, Németország) alkalmaztunk. A metszetekről történt képek rögzítése Zeiss Cell Observer System (Zeiss, Oberkochen, Németország) által történt.

Immunfluoreszcens vizsgálatok NHDF-n

Az *in vitro* immunfluoreszcens vizsgálatok elvégzéséhez az NHDF sejteket tárgylemezen történő tenyésztés után fixáltuk, és előkészítés után a festéseket először primer antitestekkel, anti-humán CCR3 (kecske IgG; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Németország) és az izotípus kontrollhoz kecske IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA), majd a másodlagos kötődést nyúl anti-kecske fluoreszcens antitesttel (1:200; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) végeztük. A fibroblasztokat identifikáló fibroblaszt felszíni fehérje (fibroblast surface protein – FSP) és a vizsgált CCR3 lokalizációjának kimutatásához a kettős immunfluoreszcencia módszerét alkalmaztuk egészséges kontrollokból (n=10) és AD-s

betegekből (n=10) származó fagyasztott bőrmintákon. Az FSP jelzése anti-FSP-vel (egér IgG; Sigma, Taufkirchen, Németország) történt [másodlagos antitestként fluoreszcens egér elleni IgG antitestet (R&D Systems, Mineapolis, MN, USA) alkalmaztunk], míg a CCR3 kimutatása anti-CCR3 (kecske IgG; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Németország) segítségével készült, ahol másodlagos fluoreszcens antitestként kecske elleni IgG antitestet (R&D Systems, Mineapolis, MN, USA) használtunk. A sejtmagi festéshez DAPI-t (Invitrogen, Karlsruhe, Németország) alkalmaztunk. A metszeteket Zeiss Axiovert2 MOT mikroszkóppal vizsgáltuk (Zeiss, Oberkochen, Németország).

3.9. Funkcionális vizsgálatok NHDF sejteken

***In vitro* reparáció**

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

Fibroblaszt migráció 3D kollagén mátrixon

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

Kalcium-imaging konfokális mikroszkóppal

Az aktivációra kialakuló intracelluláris kalciumszint ($[Ca^{2+}]_i$) változásait fluorimetriás Ca^{2+} -imaging technikával detektáltuk. A méréseket megelőzően az NHDF sejteket tárgylemezre helyeztük a pre-konfluens állapot eléréséig, majd Hank oldatban (Sigma, Taufkirchen,

Németország), 37°C-on 40 percig inkubáltuk 1% szérum albumin, 2.5 mM Probenecid (mindkettő Sigma, Taufkirchen, Németország) és 2 μ M Fluo-4 AM (Invitrogen, Karlsruhe, Németország) indikátor jelenlétében. Mosás és inkubálás után a tárgylemezt lefedtük, majd a detektálásra LSM 510 laser scanning konfokális mikroszkópot (Zeiss, Oberkochen, Németország) alkalmaztunk. A vizsgálatban a sejteket 100 ng/ml CCL26 (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA) kemokinnel kezeltük, illetve a neutralizáció során egér anti-humán CCR3 előkezelést (2 μ g/ml) alkalmaztunk. Egy kezelés alkalmával 200 képet rögzítettünk (Zeiss LSM Image Browser 4.2.0.121, Zeiss, Oberkochen, Németország). A sejtek relatív fluoreszcens intenzitását ImageJ programmal határoztuk meg (NIH, Bethesda MD, USA).

BrdU sejtproliferációs assay

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

3.10. Statisztikai módszerek

Az adatok statisztikai feldolgozása során SPSS v.12.0 szoftvert (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) alkalmaztunk. A normál eloszlás vizsgálatát Kolgomorov-Smirnov teszttel végeztük el, majd meghatároztuk az átlag $\pm$ standard deviáció értékeket és a kiértékeléséhez kétmintás t-próbát végeztünk. Nem-normál eloszlás esetén medián, valamint minimum és maximum értékeket kalkuláltunk, és Mann-Whitney próbát vagy Kruskal-Wallis tesztet alkalmaztunk. A variancia-analízisben F tesztet végeztünk. A korrelációs számítások során ($CD4^+CD25^{bright}FOXP3^+$ és $CLA^+CD4^+CD25^{bright}FOXP3^+$ sejtek százalékos arányai, valamint az IgE szint és SCORAD között) normál eloszlás esetén a Pearson-féle korrelációs koefficiens határoztuk meg. A statisztikai próbák értékelésénél a $p < 0,05$ értéket tekintettük szignifikánsnak (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$).

4. EREDMÉNYEK

4.1. Az nTreg sejtek vizsgálata

Az nTreg populáció meghatározása AD betegek perifériás vérében $CD4^+CD25^{bright}CD127^{-/low}FOXP3^+$ jelöléssel (négyes kombináció)

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

Az nTreg sejtek számának meghatározása AD betegek perifériás vérében $CD4^+CD25^{bright}FOXP3^+$ jelöléssel (hármass kombináció)

Áramlási citométerrel határoztuk meg a $CD4^+CD25^{bright}FOXP3^+$ és a $CLA^+CD4^+CD25^{bright}FOXP3^+$ nTreg sejtek előfordulási frekvenciáját a $CD4^+$ T sejtek közt magas IgE szinttel rendelkező AD betegek (n=27) és életkorra illetve nemre illesztett egészségesek (n=11) perifériás vérében. A perifériás $CD4^+CD25^{bright}FOXP3^+$ nTreg sejtek arányát, az összes $CD4^+$ T sejt tükrében vizsgálva, szignifikánsan emelkedettnek mértük az AD betegekben az egészségesek adataihoz viszonyítva (AD: $3.62\% \pm 1.55$; kontroll: $2.19\% \pm 0.84$; $p=0.014$). Az nTreg sejtek fenotípusa meghatározza a sejtek bőrbe való migrációjának képességét, ezért kíváncsiak voltunk a bőrbe vándorló, CLA-t expresszáló $CD4^+CD25^{bright}FOXP3^+$ nTreg sejtek arányára a $CD4^+$ T sejtek között. Ezen sejtek százalékos arányát szignifikánsan magasabbnak mértük az AD betegek perifériás vérében az egészséges kontrollokhoz viszonyítva (AD: $0.78\% \pm 0.46$; kontroll: $0.43\% \pm 0.17$; $p=0.048$).

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

Az eredmények statisztikai feldolgozása során pozitív korrelációt találtunk a betegekben a $CD4^+CD25^{bright}FOXP3^+$ nTreg sejtek százalékos aránya, valamint a szérum IgE szint ($r=$

0.514, $p=0.041$) vagy a SCORAD index ($r=0.584$, $p=0.018$) között. Pozitív korrelációt találtunk a bőrbe vándorló $CLA^+CD4^+CD25^{bright}FOXP3^+$ nTreg sejtek, valamint az IgE szint ($r=0.561$, $p=0.024$) és a SCORAD ($r=0.789$, $p=0.0003$) között is.

4.3. Az nTreg sejtek *in vitro* funkcionális vizsgálata

Az nTreg-ek szuppresszor aktivitásának változása SEB hatására

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

Az nTreg szuppresszor aktivitás dózisfüggő változása SEB hatására

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

4.4. Szöveti átépülés vizsgálata atópiás bőrgyulladás során

A krónikus atópiás bőrgyulladások által okozott dermiszben végbemenő változások kimutatása érdekében szövettani vizsgálatokat végeztünk AD betegekből származó mintákon ($n=37$) és azokat egészséges önkéntesek bőrbioopsziáiból ($n=10$) származó mintákkal

hasonlítottuk össze. Az elasztik van Giesson festés az elasztikus rostok mennyiségének csökkenését, míg a Masson-féle trikróm festés a megnövekedett dermális kollagén mennyiségét mutatta AD betegekben az egészségesekhez viszonyítva.

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

A kemokinek kulcsszerepet játszanak az atópiás bőrgyulladások elindításában és fenntartásában, ezért arra voltunk kíváncsiak, vajon a kemokinek közvetlenül hatnak-e a NHDF sejtekre és részt vesznek-e a szöveti átépülésben. Ehhez a kemokin receptor repertoárt szisztematikusan vizsgáltuk tenyésztett NHDF sejteken. Vizsgálatainkban azt találtuk, hogy az NHDF sejtek nagymértékben expresszáltak CCR3-t a sejtfelszínen. A receptor jelenlétét fibroblasztokon immunfluoreszcens technikával is megerősítettük *in vitro* NHDF sejteken és *in vivo* FSP-pozitív dermális fibroblasztokon atópiás bőrbetegekben.

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

***In vitro* mRNS expressziók**

Csak limitált információ áll rendelkezésünkre a kemokinek expressziójáról AD bőrben, illetve egyéb szöveti átépüléssel járó krónikus gyulladásos kórképben, ezért célul tűztük ki, hogy krónikus gyulladásos bőrgyógyászati kórképekben is megvizsgáljuk a CCR3 és ligandjai (CCL5, CCL8, CCL11, CCL24 és CCL26) expresszióját. 65 lézionális és 29 nem-lézionális AD betegből származó, 37 lézionális és 9 nem-lézionális psoriasisos betegből származó, 46 prurigo nodularisban szenvedő betegből származó és 29 egészséges kontrollból nyert bőrmintát vizsgáltunk. A qPCR vizsgálatok megmutatták, hogy a CCL26 volt a leginkább AD-specifikus CCR3 ligand. A CCL26 mRNS expressziója átlagosan 150x volt magasabb lézionális AD bőrben, mint nem-lézionális AD, vagy egészséges bőrben, és 15x magasabb, mint lézionális psoriasisos bőrben (** $p < 0.01$). Érdekes módon az irodalomban leginkább tanulmányozott CCR3 ligand, a CCL11 nem mutatott domináns expressziós különbséget atópiás és psoriasisos minták összehasonlítása esetén, de lézionális AD bőrben 4x nagyobb expressziót mutatott, mint nem-lézionális AD, lézionális psoriasisos vagy egészséges bőrben, igaz az eredmény nem volt statisztikailag szignifikáns ($p > 0.05$). Emellett a CCL24 szintek, bár alacsonyak voltak, mégis szignifikánsan magasabb expressziót mutattak lézionális AD mintákban, mint nem-lézionális AD, vagy lézionális psoriasisos mintákban (** $p < 0.005$). Ezzel ellentétben a CCL5 és a CCL8 elsősorban psoriasisos mintákban mutatott magasabb expressziót, nem a lézionális AD mintákban, ahol alacsonyabb expressziót tudunk kimutatni a

kontrollhoz viszonyítva. A ligandok receptora, a CCR3 a legmagasabb expressziót leginkább lézionális AD, valamint emellett a prurigo nodularis bőrből származó mintákban mutatta, mely szignifikánsan magasabb volt, mint a nem-lézionális AD, lézionális psoriasisos, vagy egészséges bőrből származó mintákban. Összességében kimutattuk, hogy a CCR3 ligandjai közül a CCL26 mutatta a legerősebb asszociációt AD-szel.

***In vivo* szöveti expressziók**

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

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

CCR3 és CCL26 expressziós kinetikája atópiás bőrben

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

CCL26 expresszió regulációja primer keratinocytákban és NHDF sejtekben

A CCL26, és egyéb, az eotaxin családba tartozó kemokin (CCL11, CCL24), regulációjának pontosabb megértése érdekében humán primer epidermalis keratinocytákat és NHDF sejteket

kezeltünk proinflammatorikus (TNF- α /IL-1 β), és effektor Th sejt citokinekkal (IFN- γ , IL-4, IL-13), melyek fontos szerepet játszanak az atópiás gyulladás elindításában és fenntartásában. A qPCR vizsgálatok megmutatták, hogy alapállapotban a keratinocyták alacsony szinten expresszálják a CCL26-t, de IL-4 és IL-13 citokin stimulusok után 6, illetve 24 órával jelentősen megnő annak az expressziója. Az egyes kemokin ligandok mRNS expresszióját összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy a keratinocyták a CCL26-t 100x nagyobb szinten expresszálták, mint a CCL11-t, vagy a CCL24-t, mely a CCL26 domináns szerepét erősíti az epidermális sejtek által termelt CCR3 ligandok között. NHDF sejteket vizsgálva a CCL26 mRNS alapexpresszió igen alacsony volt, de 24 órás IL-4, vagy IL-13 stimulus hatására szignifikánsan nőtt a ligand expressziója. A CCL26 expresszióhoz hasonlóan a nyugvó NHDF sejtek alacsony CCL11 mRNS expressziót mutattak. Az NHDF által expresszált ligand profilt megvizsgálva látható, hogy a CCL11 homeosztatisz körülmények közt is erősen expresszált, és mind a CCL11, mind a CCL26 expresszió szignifikánsan emelkedik Th2 citokinek általi stimulusra. A CCL24 keratinocyták vagy fibroblasztok általi expressziója elhanyagolható, de IL-4 és IL-13 hatására NHDF sejtekben növekszik a CCL24 kifejeződése. A Th2 citokinek tehát fokozzák a CCL11 és CCL26 expresszióját a bőr strukturális rezidens sejtjeiben, és közülük a CCL26 bizonyult a fő CCR3 ligandnak az epidermális kompartmentben.

4.8. *In vitro* funkcionális vizsgálatok CCR3 tekintetében

CCL26 hatása az intracelluláris Ca²⁺ mobilizációra

A CCR3 receptor funkcionális aktivitását NHDF sejteken először Ca²⁺ mobilizációs tesztekkel vizsgáltuk. Ennek során a CCL26 (100 ng/ml) stimulus hatására állandó cytoszolikus Ca²⁺ emelkedést tapasztaltunk, mely a kalcium-flux primer rezidens sejtben kemokin stimulusra történő kialakulását bizonyította. A sejtek neutralizáló anti-CCR3 antitesttel történt előkezelése gátolta a CCL26 stimulatorikus hatását, mely a CCR3 funkcionális aktivitását bizonyította NHDF sejteken.

CCL26 biológiai hatása dermális fibroblaszt sejteken

Ezek után a CCR3 szignalizációs útvonal biológiai jelentőségét vizsgáltuk a fibroblaszt proliferáció és migráció tekintetében. Érdekes módon a növekvő dózisú CCL26 stimuláció nem okozott változást a fibroblasztok proliferációjában. Ugyanakkor az *in vitro* sebgyógyulási modellben a CCL26 hatására markánsan nőtt a fibroblasztok reparációs (kijavító) kapacitása a 15 órás megfigyelési periódus alatt (a stimulálatlan kontroll esetében 40.37 % $\pm$ 1.84 % volt a reparáció mértéke, míg a CCL26 esetében 70.06 % $\pm$ 12.86 %; *p<0.05) A sejtek neutralizáló anti-CCR3 antitesttel történő előkezelése teljesen blokkolta a CCL26 *in vitro* reparációt

serkentő hatását, mely bizonyította a CCR3 szignalizáció elengedhetetlen szerepét a folyamatban. További bizonyítékkal támasztotta ezt alá a CCL26 jelenlétében, vagy anélkül elvégzett NHDF-szferoid 3D migrációs tesztünk. Ennek során a 100 ng/ml koncentrációjú CCL26 a fibroblasztok szferoidból történő kivándorlása által a szferoid teljes méretét (36.5 % növekedés; $**p<0.01$), és a sejtek átlagos motilitását is (95.7 % növekedés; $***p<0.005$) szignifikánsan növelték a kezeletlen kontrollhoz képest. Eredményeink tehát bizonyították a CCL26 közvetlen hatását a fibroblaszt migrációra.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. Az nTreg sejtek vizsgálata AD betegek perifériás vérében

A regulatív T sejtek fontos kontroll funkciókat töltenek be az immunológiai folyamatokban, habár pontos feladatuk AD-ben még nem teljesen tisztázott. A regulatív sejtek heterogenitása és a specifikus sejtmakerek hiánya miatt a különböző vizsgálatok nTreg-ek karakterizálására vonatkozó eredményei nehezen összehasonlíthatók. Bár az irodalmi bizonyítékok azt mutatják, hogy AD betegek perifériás vérében az nTreg sejtek száma normális, vagy emelkedett lehet, csak néhány olyan tanulmány született, ahol egyszerre vizsgálták az nTreg-ek számbeli és funkcionális elváltozásait.

A jelen PhD munka egyik célja az volt, hogy karakterizálja az nTreg-ek, ezen belül a speciális, bőrbe vándorló nTreg sejtek komplex mennyiségi és funkcionális változásait középsúlyos-súlyos klinikai tüneteket, és magas IgE szintet mutató AD betegekben. További cél volt meghatározni a kapcsolatot a bőrbe vándorló nTreg sejtek és a betegség súlyossága között, mely rávilágíthat a nTreg-ek fontos patofiziológiai szerepére AD-ben.

Munkacsoportunk korábban már leírta a bőrben a $CD4^+CD25^{bright}FOXP3^+$ nTreg sejtek magas számát és kapcsolatát a dendritikus sejtekkel APT pozitív AD betegek biopsziáiban. Ezen sejtek magas száma AD-ben önmagában nem utal kizárólagosan regulatív funkciókra, hisz a FOXP3 pozitivitás a humán $CD4^+CD25^{bright}$ T sejtekben nem csak az nTreg sejtpopulációt jelölheti, egy részük Th2-szerű effektor funkciót is felvehet specifikus triggererek hatására.

Az nTreg-ek megfelelő karakterizálása érdekében jelen vizsgálatainkban először a regulatív funkcióval rendelkező $CD4^+CD25^{bright}CD127^{-/low}FOXP3^+$ T sejt populációt határoztuk meg, ahol a kapuzott $CD4^+CD25^{bright}$ sejtek csaknem teljessége FOXP3 pozitívnak és CD127 negatívnak bizonyult, ezek alapján az nTreg sejteket azonosítani tudtuk a $CD4^+CD25^{bright}FOXP3^+$ sejtekkel, melyek százalékos előfordulása szignifikánsan emelkedett volt AD betegek perifériás vérében az egészséges kontrollokhoz képest. Meghatároztuk a

specifikus, $CLA^+CD4^+CD25^{bright}FOXP3^+$, bőrbe vándorló nTreg alcsoportot, melyek százaléka szintén szignifikánsan magasabb volt AD betegekben egészségesekhez viszonyítva. Leírták már korábban a $CD4^+CD25^{bright}FOXP3^+$ nTreg sejtek és a SCORAD közti pozitív korrelációt, de a szérumban IgE szint és a CLA^+ nTreg-ek összefüggéseit a betegség súlyosságával korábban még nem jellemezték. Vizsgálataink során először mutattuk be, hogy AD betegekben szignifikáns korreláció van mind az nTreg sejtek, mind a CLA^+ nTreg-ek és a betegség SCORAD és IgE szint által jellemzett súlyossága és a szenzitizáció jelenléte között. Korábban kérdéses eredmények jelentek meg az irodalomban az nTreg sejtek antigén stimulusra adott válaszáról AD-ben. Nem megfelelő nTreg funkciót írtak le allergének és a bőrt kolonizáló mikroorganizmusok hatására. A betegek nagy százalékában írtak le *S. aureus* kolonizációt, és azt találták, hogy SEB jelenlétében az nTreg-ek elvesztették az effektor T sejteken való szuppresszív hatásukat. Vizsgálatainkban a SEB hatását tanulmányoztuk az nTreg funkcióra történő SEB-mediálta szuppresszió jelenlétének bemutatása által. A funkcionális tesztek bizonyították, hogy az anti-CD3/CD28 hatás mellett az AD betegek perifériás vérében lévő nTreg sejtek megtartották szuppresszor aktivitásukat. Amikor azonban további SEB stimulust is alkalmaztunk, a sejtek elvesztették szuppresszív képességüket mind az AD betegekben, mind az egészségesekben, mely azt mutatja, hogy AD-ben az nTreg sejtek primer funkciója megtartott és nem különbözik az egészségesekétől. Ugyanakkor AD esetén a beteget körülvevő mikrokörnyezet jelenti a legnagyobb különbséget az egészségesekhez viszonyítva. Mivel AD-ben a SEB szinte folyamatosan jelen van a betegek bőrén, ez okoz másodlagos úton funkciózavart az nTreg sejtekben. Ez alapján kijelenthető, hogy a $CD4^+CD25^{bright}FOXP3^+$ és a $CLA^+CD4^+CD25^{bright}FOXP3^+$ nTreg sejtek vizsgálata a betegség súlyosságának fontos markere AD betegekben.

5.2. Szöveti átépülés vizsgálata AD betegekben

A szöveti átépülés fontos patofiziológiai esemény krónikus atópiás bőrgyulladásban, mely a bőrben jól karakterizálható változásokat hoz létre, habár a folyamat pontos háttere nem ismert. Jelenleg úgy gondoljuk, hogy a gyulladásos sejtek (különösen az eosinophil granulocyták) részvétele, a mikrovaskulátúra megváltozása, valamint a rezidens mesenchymális sejtek (pl. fibroblasztok) összegyűlése és aktivációja mind szerepet játszhat az átalakulásokban. Ezt a fibroblaszt-eosinophil sejt-sejt interakciót pedig fontos kommunikációs útvonalak regulálhatják, melyek végezetül a dermális átépüléshez vezethetnek.

Vizsgálatainkban az volt a cél, hogy a szöveti rezidens sejtek (epitelialis sejtek, dermalis sejtek) közti kemokin vezérelte útvonalakat vizsgáljuk atópiás bőrben, hisz a kemokin

szignalizáció számos biológiai folyamatban (pl. migráció, invázió, proliferáció, gén expresszió) fontos szerepet játszik.

Először a NHDF sejtek kemokin receptor repertoárját analizáltuk. Vizsgálataink során a CCR3-t, mint legerősebben expresszált receptort identifikáltuk a dermális fibroblasztokon. A további kísérletekben bebizonyítottuk, hogy a fibroblasztok a CCR3 funkcionálisan aktív formáját *in vitro*, és *in vivo* AD bőrben is expresszálják. A tanulmányunk eredményei elsőként bizonyították, hogy a CCR3-mediálta útvonal fontos szerepet játszik a fibroblasztok aktiválásában és a bőrben történő szöveti átépülésben.

A CCR3 receptorhoz számos ligand kötődhet. Vizsgálatainkban krónikus gyulladásos és autoimmun kórképek esetén elemeztük ezen ligandok expressziós profilját, melyek között a keratinocytá eredetű CCL26 szignifikáns, erőteljes, és szelektív expressziót mutatott AD betegek lézionális bőrmintáiban a psoriasisos betegekhez, vagy az egészségesekhez viszonyítva. Mindezek alapján látható, hogy a CCL26, mint gyulladásos és atópiához szorosan kötött és AD során emelkedett expressziót mutató kemokin fontos szerepet játszik a betegség patogenezisében. Tanulmányunkban igazoltuk továbbá, hogy a CCL26 kemokin ligand általi direkt CCR3 stimuláció intracelluláris kalcium mobilizációt okoz NHDF sejtekben, mely erőteljes és szelektív migrációs, inváziós és reparációs aktivációt vált ki, de a sejt proliferációra való hatását nem tudtuk detektálni.

Eredményeink alapján látható, hogy a fehérvérsejtek gyulladásos területre történő összegyűjtésében és a szöveti átépülésben szerepet játszó regulátorok gyűjteményében fontos szerep jut a kemokinek által szabályozott kommunikációs útvonalaknak, amik egy speciális profibrogenikus mikrokörnyezetet („niche”) hoznak létre, melyben fontos szerepet játszanak a keratinocyták, fibroblasztok, eosinophilek, Th2 lymphocyták. Az atópiás állapothoz kötött, keratinocyták által termelt CCL26 gyulladásos sejteket (Th2 és eosinophil sejtek) vonz a bőrbe AD-ben. A megjelenő Th2 sejtek a gyulladásos területen termelt citokinjeik által a további CCL26 termelést segítik elő, mely ligandok felerősítik és állandósítják a gyulladásos folyamatot és ezáltal a szöveti átépülés elősegítéséhez vezetnek.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

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

Munkánk eredményei szerint a betegek szérumában az egészségesekhez képest szignifikánsan magasabb százalékban fordult elő a regulatív tulajdonsággal rendelkező

CD4⁺CD25^{bright}CD127^{-low}FOXP3⁺ és a bőrbe vándorló CLA⁺CD4⁺CD25^{bright}FOXP3⁺ T sejt populáció. Kimutattuk ezen sejtek számának a betegség súlyosságával való pozitív korrelációját, mely a FOXP3⁺ nTreg sejtek AD kialakulásában betöltött patogenetikai szerepére utal. Funkcionális tesztekkel bizonyítottuk, hogy az AD betegek perifériás vérében lévő nTreg sejtek primeren megtartották szuppresszor aktivitásukat, de SEB stimulus hatására az egészségesekhez hasonlóan elvesztették szuppresszív képességüket. Kísérleteink alapján látható, hogy az egészségesekkel ellentétben, AD esetén a regulatív sejtek funkciójára a legnagyobb mértékű befolyással a beteget körülvevő mikrokörnyezet van.

További kísérleteinkben az AD során kialakuló szöveti átépülést vizsgáltuk. Korábbi feltételezések szerint a gyulladásos és a rezidens sejtek aktivációja szerepet játszhat az átalakulásokban, de a fontos szabályozó útvonalak nem ismertek. Munkánk során meghatároztuk az NHDF sejteken a legerősebben expresszált kemokin receptort (CCR3), majd az ezen keresztül vezérelt útvonalat elemeztünk. A receptor ligandjai között a CCL26 szignifikáns és specifikus túlprodukciót mutatott egészségesekhez, vagy egyéb bőrgyulladásokhoz viszonyítva AD-ben. *In vivo* vizsgálataink szerint az epidermális keratinocyták mutatták a legerősebb CCL26 fehérje expressziót AD lézionális bőrben. Strukturális bőr rezidens sejtekben vizsgálva megállapítottuk, hogy a Th2 citokinek (IL-4 és IL-13) okozták a legerősebb CCL26 expressziót. Igazoltuk, hogy dermális fibroblaszokban a CCL26 által mediált CCR3 receptoron keresztüli szignál intracelluláris Ca²⁺ mobilizációt eredményezett, és a direkt stimuláció a fibroblasztokon migrációs, inváziós és reparációs aktivációt váltott ki, mint a szöveti remodelling fontos lépései AD bőrben.

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

A PhD munkához kapcsolódó válogatott előadások, illetve poszterek:

1. 2007. jún. Tag des wissenschaftlichen Nachwuchses, Heinrich Heine University, Düsseldorf: The chemokine receptor CCR3 participates in tissue remodeling during atopic skin inflammation [poszter-előadás]
2. 2007. szept. ESDR (European Society for Dermatological Research) 37. Kongresszusa, Zürich: The chemokine receptor CCR3 participates in tissue remodeling during atopic skin inflammation [előadás]
3. 2008. máj. MAKIT (Magyar Allergológiai és Klinikai Immunológiai Társaság) 36. Kongresszusa, Siófok: CCR3 kemokin receptor szerepe a szöveti remodeláció során atópiás bőrgyulladásokban [előadás]
4. 2008. máj. IID (International Investigative Dermatology) 5. Kongresszusa, Kyoto, Japan: The chemokine receptor CCR3 participates in tissue remodeling during atopic skin inflammation [poszter]
5. 2008. dec. MDT (Magyar Dermatológiai Társulat) 80. Kongresszusa, Budapest: CCR3 kemokin receptor szerepe a szöveti remodeláció során atópiás bőrgyulladásokban [előadás]
6. 2009. márc. AAD (American Academy of Dermatology) 67. Konferenciája, San Francisco, CA, USA: Identification of Chemokine-Mediated Communication Pathways Regulating Tissue Remodeling during Atopic Skin Inflammation [poszter] – a World Congress Fund Review Task Force for the AAD ösztöndíjasa
7. 2009. szept. ESDR 39. Kongresszusa, Budapest: Regulatory T cells in atopic dermatitis – epidermal dendritic cell clusters may contribute to their local expansion [poszter]
8. 2010. szept. ESDR 40. Kongresszusa, Helsinki: Frequency and function of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells in atopic dermatitis. [poszter]
9. 2010. nov. MIT (Magyar Immunológiai Társaság) 39. Vándorgyűlése, Szeged: CCR3 kemokin receptor szerepe a szöveti remodelációban atópiás bőrgyulladások során [előadás]
10. 2011. jan. KIADI (Klinikai Immunológiai és Allergológiai Doktori Iskola) PhD Konferencia, Debrecen: CCR3 kemokin receptor szerepe a szöveti remodeláció során atópiás bőrgyulladásokban [előadás]
11. 2011. okt. MIT 40. Vándorgyűlése, Kecskemét: Frequency, function, and correlation with disease severity of regulatory T cells in atopic dermatitis [előadás-megosztott szerző]
12. 2011. nov. KIADI PhD Konferencia, Debrecen: A CD4⁺CD25^{bright}FOXP3⁺ regulatórikus T sejtek számbeli és funkcionális eltérései atópiás dermatitisben [előadás]



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

Jelölt: Gáspár Krisztián

Neptun kód: Z23VEW

Doktori Iskola: Petrányi Gyula Klinikai Immunbiológiai és Allergológiai Doktori Iskola

MTMT azonosító: 10043775

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

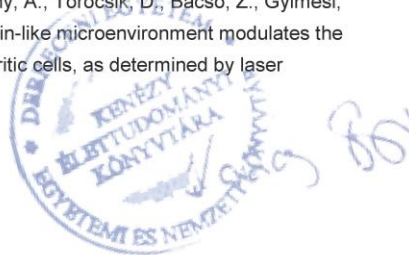
1. **Gáspár, K.**, Baráth, S., Nagy, G., Mócsai, G., Gyimesi, E., Szodoray, P., Irinyi, B., Zeher, M., Remenyik, É., Szegedi, A.: Regulatory T-cell Subsets in Atopic Dermatitis: Important Indicators of Disease Severity with Acquired Functional Impairment. *Acta Derm. Venereol.* 95 (2), 151-155, 2015.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





További Közlemények

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





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





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





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

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 29,294

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

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2015.02.20.

