

**A D VITAMIN VIZSGÁLATA NEM DIFFERENCIÁLT
COLLAGENOSISBAN**

DR. ZÖLD ÉVA

Témavezető: Prof. Dr. Bodolay Edit



DEBRECENI EGYETEM

PETRÁNYI GYULA KLINIKAI IMMUNOLÓGIAI ÉS ALLERGOLÓGIAI DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2011

A D VITAMIN VIZSGÁLATA NEM DIFFERENCIÁLT COLLAGENOSISBAN

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

Írta: Dr. Zöld Éva

Készült a Debreceni Egyetem Petrányi Gyula Klinikai Immunológiai és Allergológiai doktori
iskolája (Autoimmun betegségek programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Bodolay Edit, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Maródi László, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Kovács Péter, Ph.D.
Dr. Horváth Csaba, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja: 2011. június. 23. 11 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Antal-Szalmás Péter, Ph.D.
Dr. Sütő Gábor, Ph.D.

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Maródi László, az MTA doktora
tagok: Dr. Antal-Szalmás Péter, Ph.D.
Dr. Sütő Gábor, Ph.D.
Prof. Dr. Kovács Péter, Ph.D.
Dr. Horváth Csaba, az MTA doktora

Az értekezés védésének időpontja: 2011. június. 23. 13 óra.

BEVEZETÉS

A szisztémás autoimmun kórképek (connective tissue disease- CTD), más néven kötőszöveti betegségek krónikus, több szerv és szervrendszer érintettségével járó gyulladásos megbetegedések. A kórlefolyás hullámzó, melynek során aktív és viszonylagos nyugalmi szakaszok követik egymást. A szisztémás autoimmun kórképek kifejlődése egy hosszabb folyamat eredménye, mivel a betegség szintjét elérő, vagyis a klinikai tüneteket és/vagy hisztológiai elváltozást (gyulladás, elhalás, funkciókárosodás) okozó patológiai állapot létrejöttéhez időre van szükség. A definitív szisztémás autoimmun kórképet megelőző állapotot, amikor a szisztémás autoimmun betegségnek a gyanúja már felmerül, de nincs meg az adott kórkép diagnosztizálásához szükséges tünetcsoport és autoantitest, illetve nincsenek meg a szisztémás autoimmun betegség diagnosztikai kritériumának követelményei *Nem Differenciált Collagenosishoz* (NDC)- vagy más terminológiával UCTD (undifferentiated connective tissue disease)-nek nevezzük.

Az NDC-ben észlelt leggyakoribb klinikai tünetek a polyarthrit/polyarthralgia, reggeli kéz kisízületi merevség, Raynaud jelenség a kéz és vagy a láb ujjain, myalgiform fájdalom, bőrtünetek, pleuritis/pericarditis, szem- és szájszáradás, központi idegrendszeri tünetek (convulsio, fejfájás, migrén, trigeminus neuralgia), funkcionális és morfológiai légzőszervi eltérések, perifériás neuropathia, visszatérő hőemelkedés vagy egyéb okkal nem magyarázható láz, máskor nyirokcsomó-, máj-, lépnagyobbodás.

A laboratóriumi és immunszerológiai eltérések közül a leggyakoribb a szérumfehérjék mennyiségi és minőségi változása, az akutfázis-fehérjék szintjének emelkedése (CRP), sejtmag- és citoplazmakomponensek ellen termelődött autoantitestek megjelenése (anti-natív DNS, anti-ENA, anti-Sm, anti-RNP, anti-SSA, anti-SSB, anti-Scl-70, anti-centromer, anti-Jo1, anti-PM1, foszfolipid struktúrák elleni antitestek), az immunkomplexek szintjének kóros növekedése, illetve a komplementrendszer klasszikus és alternatív aktivációját jelző eltérések

(a CH_{50} -, az AP_{50} -szint csökkenése). Mindemellett az alacsony fehérvérsejt szám, thrombocita szám csökkenés, anaemia, proteinuria, magas rheumatoid faktor (RF) titer is jelen lehet.

Az NDC-s betegek közel egyharmada valamely differenciált szisztémás autoimmun kórképbe progrediál, a betegek fele megmarad az NDC stádiumban, és 10-20 %-ban az is előfordulhat, hogy a meglevő tünetek visszafejlődhetnek, és nem is jelentkeznek újra.

A szisztémás autoimmun kórképek pathomechanizmusa változatos, és jelenleg is hiányosak az ismereteink arról, melyek azok a provokáló tényezők, amelyek elősegítik azt, hogy az NDC kórállapot definitív szisztémás autoimmun kórképbe differenciálódjon. A sejtmag és a citoplazma komponensek elleni antitestek jelenléte valamint a több szervi érintettség komplex immunregulációs zavart sejtet a progresszió hátterében.

Ismert, hogy adott genetikai háttér mellett a környezeti faktorok (vírus, baktérium, gyógyszerhatás, napfény) is fontos szereppel bírnak a szisztémás autoimmun betegségek kialakulásában. Epidemiológiai és kísérletes adatok alapján úgy tűnik, hogy a **D vitamin** hiányállapot egyike azoknak a tényezőknek, amely alapvető szerepet játszhat az autoimmun betegségek kifejlődésében vagy progressziójában.

A szervezet fő D vitamin forrását a bőrben zajló bioszintézis végső terméke, az aktív 1,25-dihidroxi-D-vitamin ($1,25(OH)_2D_3$) jelenti. A kialakulási folyamat első lépéseként, a bőrben UVB sugárzás (290-320 nm) hatására 7-dehidrocholesterolból izomerizáció révén cholecalciferol képződik. A cholecalciferol a májban történő hidroxilációval 25-hidroxi D vitaminná ($25(OH)D$) alakul, amely a vesében tovább hidroxilálódik a biológiailag aktív D vitaminná ($1,25(OH)_2D_3$).

Az aktív D vitamin a Ca anyagcsere szabályozásán túl kulcsfontosságú hormon a sejtek proliferációjának és differenciálódásának szabályozásában. Mint ligand, a D vitamin receptorhoz kötődve (VDR) jut a sejtmagba, és különböző génekhez kapcsolódva szabályozza a mRNS szintézist. Az aktív D vitamin gátolja a myeloid prekursorok dendritikus sejté (DC)

történő differenciálódását és érését, csökkenti a MHC-II és a kostimulátorok (CD80, CD86, CD40), valamint más, érést jelző és elősegítő proteinek (CD1a, CD83) sejtfelszíni megjelenését, a dendritikus sejtek antigén prezentáló képességét, és az IL-12 termelést. A D vitamin a T sejtek citokin szintézisének és differenciálódásának is fontos transzkripciósz regulátora. *In vitro*, a D vitamin gátolja a T helper 1 (Th1) sejtek differenciálódását elősegítő IL-12 termelődést, a Th1 sejtek citokin (IL-2, IFN- γ , és TNF- α) termelését, csökkenti a CD4⁺ T sejtek Th17 effektor sejté történő differenciálódást, ugyanakkor fokozza a regulatórikus T sejtek (Treg) számát és funkcióját, valamint elősegíti a Th2 sejtek működését. Az inflammatórikus Th1 és Th17 válasz gátlásával módosítja a Th egyensúlyt, amely által az immunrendszer működését a tolerogenitás irányába tereli.

Nincsenek előzetes ismereteink arról, hogy az NDC stádiumban milyen a betegek D vitamin szintje, gyakoribb-e, illetve milyen mértékű a D vitamin hiány a kontroll, egészséges populációhoz képest. Nem ismert az sem, a terápiásan alkalmazott D vitamin szupplementációval lehet-e kedvezően befolyásolni az NDC-ben meglévő diszregulatív immun-folyamatokat.

CÉLKITŰZÉSEK:

A definitív szisztémás autoimmun betegségek előfázisát jelentő Nem Differenciált Collagenosis stádiuma különös jelentőséggel bír az autoimmun betegségek pathomechanizmusának megismerésében, a szisztémás autoimmun kórkép irányába történő differenciálódás és a progressziót kiváltó faktorok tanulmányozása szempontjából.

1. Munkánkban vizsgáltuk az NDC stádiumban levő betegek D vitamin ellátottságát. Kíváncsiak voltunk, hogy az NDC-s betegekben észlelhető-e szezonális D vitamin szint változás?
2. Összefüggést kerestünk az alacsony D vitamin szint, valamint az NDC-s betegek tüneteinek alakulása és immun-szerológiai eltérései között.
3. Analizáltuk a mért D vitamin szintek lehetséges összefüggését a betegség kórlefolyásával.
4. Vizsgáltuk az NDC-s betegek perifériás vérében a Th17 és a CD4+CD25+Foxp3+ természetes regulatív (nTreg) sejtek arányát, az nTreg sejtek funkcionális aktivitását, valamint azt, hogy D vitamin kezelés befolyásolja-e a Th17 és az nTreg sejtek számát és százalékos megoszlását?
5. Kerestük a választ arra, hogy egy 5 héten át tartó 0,5 µg/nap dózisban alkalmazott D vitamin analóg, alfacalcidol kezelést követően észlelhető-e változás a D vitamin szintben, és a kezelés módosítja-e a természetes Treg sejtek számát és funkcióját, valamint az IL-17 termelést.
6. Elemeztük a Th1 differenciálódást elősegítő IL-12 citokin, és a Th1 sejtek proinflammatorikus, (IFN-γ) citokin termelését, a Th17 citokinek (IL-17, IL-23 és IL-

6) és a kulcs regulátor szereppel bíró IL-10 citokin plazma koncentrációja hogyan változik az előbbi alfacalcidol hatására.

BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

Betegek

Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum (DEOEC) III. sz. Belgyógyászati Klinika „Új betegeket fogadó” autoimmun szakrendelésén 2002 és 2006 között kezelt és gondozott, 161 randomszerűen kiválasztott NDC-s beteget vizsgáltunk tanulmányunk első részében. A betegcsoportból 25 D vitamin elégtelenségben (plazma D vitamin szint <30 ng/ml) szenvedő NDC-s nőbeteg részesült D vitamin analóg, alfacalcidol terápiában. A vizsgálatba bevont betegek egyike sem kapott immun-moduláló terápiát, kortikoszteroid kezelést a vizsgálati időszakban, nem szenvedtek osteoporosisban, vesebetegségben. Az NDC-t a következő, a korábban leírt kritériumtünetek alapján diagnosztizáltuk: (a) a betegeknek szisztémás autoimmun betegségre jellemző klinikai tünetei és autoantitestjei vannak, ugyanakkor a meglevő eltérések nem elegendőek ahhoz, hogy valamely definitív poliszisztémás autoimmun betegség diagnózisa felállítható legyen; (b) a betegség kezdete illetve időtartama legalább egy év; és (c) legalább egy nem szervspecifikus autoantitest kimutatása a betegek szérumában.

A vizsgálatunk első részében kontrollként, 58, korban és nemben illesztett, autoimmun vagy daganatos betegségben nem szenvedő beteg (átlag életkor $43,9 \pm 15,01$ év) mintáiból végeztünk meghatározást, a sejtes analízishez 21 egészséges nő (átlag életkor $55,3 \pm 7,9$ év) mintáit használtuk.

A 161 NDC-s betegben és a 58 egészséges kontrollban a plazma 25-hidroxi-D vitamin 25(OH)D szintet a nyári (júniustól októberig) és a téli (januártól májusig) időszakban mértük, míg az alfacalcidol kezelés során, a szérum illetve plazma mintákat az év azonos, júliustól szeptemberig tartó periódusában gyűjtöttünk a betegektől és a kontroll személyektől. A vizsgálatba bevont betegek és kontrollok mindegyikénél ellenőriztük a kalcium

homeosztázisában szerepet játszó faktorokat (parathormon, szérum kalcium), amelyek kóros eltérést nem mutattak.

D vitamin szint meghatározás

A plazma 25-hidroxi-D vitamin 25(OH)D vitamin meghatározások a DEOEC Klinikai Biokémiai és Molekuláris Pathológiai Intézetében történtek. A betegek és a kontroll csoport 25(OH)D vitamin szintjének meghatározását nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC) módszerrel végeztük. A méréshez Jasco műszereket és Bio-Rad reagens kitet használtunk. A mintát (500 μ L EDTA-val alvadásgátolt vérből nyert plazma) az előkészítés során megtisztítottuk a fehérjéktől, és a tisztított felülúszóból injektáltunk 50 μ L-t. Az elválasztást 90x3,2 mm-es C18-as töltetű reverz fázisú Bio-Rad oszlopon végeztük. A mobil fázis metanol-víz keverék (Bio-Rad), melyet 1,1 mL/perc sebességgel áramoltattunk. Az elválasztott 25(OH)D vitamin kvantitatív meghatározásához 265 nm-re beállított diódasoros detektort használtunk. A vizsgálati eredmények interpretálása ng/ml-ben történt. Az irodalmi adatok alapján D vitamin elégtelenségnek tekintettük a 30 ng/ml-nél kisebb plazma 25(OH)D vitamin koncentrációt, míg D vitamin hiányállapotnak az 10 ng/ml alatti plazma 25(OH)D szintet jelöltük

Immunszerológiai vizsgálatok

Az immunszerológiai meghatározások a DEOEC Regionális Immunológiai Laboratóriumában történtek.

Az *antinukleáris antitestek (ANA)* kimutatása HEp2 sejtvonalon indirekt immunfluoreszcenciával történt.

Az *autoantitesteket* (anti-ENA, anti-RNP, anti-Sm, anti-SSA, anti-SSB, anti-Jo1, anti-Scl70, anti-DNS, anti-centromer, anti-cardiolipin [anti-CL]) ELISA módszerrel határoztuk

meg (Pharmacia & Upjohn, Diagnostic GmbH, Freiburg, Germany és Cogent Diagnostics, Edinburgh, UK).

Az *IgM rheumatoid faktor (RF)* mérése nephelométerrel történt, pozitívnak az 50 U/l feletti értéket tekintettük.

A *ciklikus citrullinált peptid elleni antitest* (anti-CCP IgG) meghatározásához második generációs ELISA tesztet (Quanta Lite™, CCP IgG ELISA; Inova Diagnostics Inc., San Diego, CA, USA) használtunk, a gyári előírásoknak megfelelően.

Az NDC-s beteg első jelentkezésekor levett, majd centrifugálással nyert szérumokat felhasználásig -70 °C-on tároltuk.

A CD4+CD25+ T sejtek izolálása

A NDC-s betegek és a kontroll személyek perifériás mononukleáris sejtjeit heparinizált teljes vérből különítettük el Ficoll/Hystopaque sűrűség-gradiens centrifuga segítségével (Sigma Aldrich Corp, St. Louis, MO, USA). Az elkülönített polimorfonukleáris sejtekből a CD4+CD25+ T sejteket Miltenyi kittel izoláltuk (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany) a gyári leírás szerint. A nem-CD4+ T sejteket indirekt mágneses, biotin antitest koktélt és anti-biotin microbead-t tartalmazó jelöléssel távolítottuk el. A CD25+ sejteket pozitív szelekciós eljárással tisztítottuk meg az ún. „pre-enriched” CD4+ T sejt frakciótól. Ennek során a CD4+ T sejteket direkt jelöltük anti-CD25 microbead-ekkel, majd a CD4+CD25+ T sejteket leoldottuk az MS oszlopról.

Szuppressziós assay

A mágnesesen izolált 1×10^5 CD4+CD25+ és CD4+CD25- T sejteket önmagukban és együtt tenyésztettük 72 órán keresztül, 200 μ l cRPMI 1640 (bikarbonát alapú puffer oldat) és 96-os “U bottom” plate-ken. A kevert limfocita kultúrában a CD4+CD25+ és a CD4+CD25-

sejtek 1:1 arányát alkalmaztuk. A poliklonális stimuláció során a sejteket, anti-CD3/CD28 T sejt expandáló mikrobead-ekkel stimuláltuk (Dyna Bead, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) 1 bead/sejt koncentrációban. A proliferációhoz tetrazolium-alapú assay-t (EZ4U Proliferation Kit, Biomedica Inc) használtunk. A kultúrához a szubsztrátot 2,5 óra múlva adtuk hozzá, végül az OD értékek leolvasása 450 nm-n, ELISA olvasóval történt. A kevert limfocita reakció értékeit a CD4+CD25+ T sejt kultúrájának OD értékeivel korrigáltuk ($OD_{MLR_{corr}} = OD_{MLR} - OD_{CD25+}$). A szuppressziós aktivitást, a kevert limfocita reakció és CD4+CD25+ T sejt kultúrák OD értékeinek hányadosaként határoztuk meg (proliferatív index = $OD_{CD25+}/OD_{MLR_{corr}}$).

A CD4+CD25^{high}Foxp3+ T sejtek meghatározása Flow Citométerrel

A Foxp3 festést a gyári előírásnak megfelelően végeztük (eBioscience, San Diego, CA, USA). A polimorfonukleáris sejteket Ficoll/Hystopaque gradiens centrifugával szeparáltuk, majd 100 µl preparált sejtet adtunk minden csőbe (1×10^6 cell/ml). A sejtek CD4 és CD25 monoklonális antitesttel történő sejt felszíni festése, majd mosása után a mintákhoz fixációs/permeabilizációs munka oldatot adtuk. A sejteket 4°C-on 30-60 percig inkubáltuk sötétben, majd puffer oldat adása után 2%-os (2µl) normál patkány szérummal blokkoltuk a reakciót 1X permeabilizációs bufferben, 4°C-on 15 percig. A blokkolást követően 20 µl anti human Foxp3-PE antitestet adtunk a sejtekhez, majd 4°C-on legalább 30 percig inkubáltuk azokat, sötétben. Végül ismételt mosás és szuszpendálást követően a limfocitákat nagyságuk és granuláltságuk alapján különítettük el. 10000 kapuzott eseményt (limfociták) gyűjtöttünk össze minden minta esetén FACSCalibur eszközzel (Becton Dickinson, Germany, Heidelberg). Az adatok analízise során CellQuest szoftvert használtunk (Becton Dickinson). Foxp3 pozitivitást mutató CD4⁺CD25^{high} szuppresszor T sejtek meghatározása a Foxp3

festődés alapján történt. A következő reagenseket használtuk: Ficoll és CD4-FITC monoklonális antitest (Sigma Aldrich Corp, St. Louis, MO, USA), CD25-PC5 (Immunotech, Marseilles, France), Foxp3-PE és intracelluláris festő kit (eBioscience).

Az intracitoplazmatikus citokinek meghatározása Flow Citométerrel

1 ml heparinizált vért hígítottunk kétszeres RPMI 1640-ban (GIBRO-BRL, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA). A sejteket phorbol 12-myristate 13-acetate-tal (PMA) (Sigma) 1 ng/ml ionomycin (Sigma) stimuláltuk, majd 37°C-on 5%-os CO₂ közegben inkubáltuk. A stimulálatlan, BFA-t (Brefeldin A) tartalmazó sejteket használtuk kontrollként. A sejtek stimulációját követően a sejtfelszíni festéshez anti-human CD4-PC5-t vagy CD8-PC5 antitestet (Immunotech) használtunk, 30 percen át, szobahőmérsékleten. Mosás, fixálás, majd intracitoplazmatikus antitestre specifikus monoklonális antitesttel, anti-human IL-17-PE-vel (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA) vagy annak megfelelő izotípus kontrollokkal (anti-mouse IgG1-FITC vagy IgG1-PE izotípus antitestek) történő inkubálás után a sejteket 1 % paraformaldehiddel fixáltuk, majd 6 órán belül analizáltuk Coulter FC500 flow citométerrel (Beckmann Coulter, USA). Legalább tízezer CD4⁺ vagy CD8⁺ sejtet számoltunk (csak CD4⁺ sejteket az IL-17 esetén), és az eredményeket CXP Analysis Szoftverrel értékeltük (Beckmann Coulter, Fullerton, CA, USA).

A szérum IFN- γ , IL-12, IL-6, IL-17, IL-23 és IL-10 meghatározása ELISA módszerrel

A szérum citokin szinteket enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) módszerrel határoztuk meg a gyári előírásnak megfelelően (IL-23 ELISA kittek a Bender MedSystemstől, Burlingame, CA, USA; IL-10, IL-17, IL-6, IFN- γ és IL-12 (p40) ELISA kittek mindegyike a R&D systemtől, Minneapolis, MN, USA). A minimálisan detektálható koncentráció 0,7 pg/ml

volt az IL-6-, 78 pg/ml az IL-23-, 7,8 pg/ml az IL-10-, 15 pg/ml az IL-17- és 5,6 pg/ml volt az IFN- γ esetében. Az intra-assay és inter-assay coefficients $<5\%$ és $<10\%$ volt minden esetben. Minden minta esetén dupla mérés történt. Az NDC-s betegek jelentkezésekor levett, majd centrifugálással nyert szérumokat felhasználásig $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk

Statisztikai analízis

Az adatokat leíró analízissel jellemeztük (esetszám, átlagérték, standard deviáció). A csoportok összehasonlítása egy vagy kétmintás t-próbával, χ^2 próbával, illetve Fisher féle egzakt analízis segítségével történt. A normalitás tesztek után az adatokat Student féle t -teszttel vagy Mann–Whitney U teszttel hasonlítottuk össze, a korreláció vizsgálatokhoz a Spearman's rank korrelációt használtuk. Az eredmények kiértékelése GraphPad software (San Diego, USA) valamint az SPSS szoftver, 15.0 verziójának segítségével történt.

EREDMÉNYEK, ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK

Munkánkban elsőként vizsgáltuk a definitív poliszisztémás autoimmun kórképet megelőző NDC kórállapotban a plazma 25(OH)D vitamin szintjét, illetve a 25(OH)D vitamin szint szezonális változását nagy betegpopulációban.

A vizsgált 161 NDC-s betegből 35 beteg (21,7 %) differenciálódott definitív kötőszöveti betegségbe (CTD). A CTD-be történő differenciálódás ideje átlagosan $2,3 \pm 1,2$ év volt.

A 161 NDC-s beteg nyári és a téli periódusban mért 25(OH)D vitamin szintje szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a kontroll egészséges csoporté (NDC-nyár: $33,0 \pm 13,4$ ng/ml, kontroll nyár: $39,5 \pm 11,2$ ng/ml; $p < 0,01$; NDC-tél: $27,8 \pm 12,48$, kontroll tél: $38,2 \pm 12,1$ ng/ml; $p < 0,001$).

Az NDC-s betegekben a **plazma D vitamin szint** az évszakoknak megfelelően, **szezonális ingadozást mutatott**, a nyári hónapokban magasabb, a téli időszakban alacsonyabb értékeket mértünk. A nyári és a téli D vitamin szintek között szignifikáns különbség volt (NDC nyár: $33,0 \pm 13,4$ ng/ml, NDC tél: $27,8 \pm 12,48$ ng/ml, $p < 0,001$), míg a kontroll csoportban az ingadozás mértéke nem volt jelentős (kontroll nyár: $39,5 \pm 11,2$ ng/ml, kontroll tél: $38,2 \pm 12,1$; ns).

Az NDC-s betegek 41,6%-ában (67 beteg) találtunk alacsony (<30 ng/ml) D vitamin szintet a nyári időszakban, míg **télen az alacsony D vitamin szintű NDC-s betegek száma 54,3%-ra** (88 beteg) **nőtt**. A kontroll csoportban D vitamin elégtelenséget csak 18,4 %-ban (14 egyén) találtunk. Az alacsony D vitamin szintű (<30 ng/ml) betegekben a nyári hónapokhoz képest a téli időszakban tovább csökkent a mérhető D vitamin plazmakoncentrációja (nyár: $21,9$ ng/ml $\pm 4,7$ tél: $18,1$ ng/ml $\pm 5,9$; $p < 0,03$). **Kritikusan**

alacsony D vitamin (<10 ng/ml) szintet az NDC-s betegek 3,1%-ban (5 beteg) észleltünk, míg az egészséges kontroll csoportban egy esetben sem.

Vizsgálataink alapján új megállapításunk, hogy **az alacsony D vitamin szintű, D vitamin elégtelenségben szenvedő (<30 ng/ml) NDC-s betegekben gyakoribb a bőrtünetek** (fotoszenzitivitás, erythema, krónikus diszoidos bőrjelenség) ($p=0,0046$) és **a pleuritis előfordulása** ($p=0,0346$), mint az élettani D vitamin szinttel rendelkező betegekben.

Szignifikáns **összefüggést találunk** a betegek szérumában mérhető autoantitestek közül **az anti-U1RNP ($p=0,024$), anti-SSA ($p=0,029$), anti-CCP ($p=0,0001$) antitestek jelenléte és az alacsony D vitamin szint között.**

Figyelemre méltó megfigyelésünk, hogy **a 35 definitív kötőszöveti betegségbe differenciálódott beteg D vitamin szintje jelentősen alacsonyabb volt** (30 ng/ml alatti D vitamin szint), mint az NDC stádiumában maradt betegek D vitamin értéke (CTD-be differenciálódott betegek: $14,7 \pm 6,45$ ng/ml, NDC stádiumban maradt betegek: $33,0 \pm 13,4$ ng/ml; $p<0,0001$). **A kritikusan alacsony D vitamin szintű betegek mindegyike definitív szisztémás autoimmun kórképbe differenciálódott a követés során.** Az eredményeink alapján felvethető, hogy **a D vitamin hiányállapotnak szerepe lehet a definitív kötőszöveti betegségbe való progresszióban.**

Az általunk vizsgált NDC-s betegpopuláció megfelelő nagyságú volt ahhoz, hogy a kapott eredményeink alapján megállapítsuk, hogy az alacsony D vitamin szintű NDC betegeknél D vitamin pótlást szükséges alkalmazni. Elsőként vizsgáltuk a D vitamin analóg alfacalcidolnak a regulatórikus T sejtekre és az IL-17 expresszáló Th17 sejtekre kifejtett hatását NDC-s betegekben. A sejtfunkciók javulása mellett a rövid távú, 5 hetes kezelés során már D vitamin szint emelkedést is észleltünk. Az 5 hetes, napi 0,5 µg alfacalcidol kezelést követően a D vitamin elégtelenségben szenvedő NDC-s betegek D vitamin szintje emelkedett (Vitamin D szintek a kezelés előtt és után: $23,5 \pm 5,6$ ng/ml vs. $34,5 \pm 7,4$ ng/ml; $p=0,059$). A D vitamin

kezelés előtt a vizsgálatban részt vevő összes betegnek alacsony volt a D vitamin szintje, az alfacalcidol kezelést követően mindössze 28% (7 beteg) szenvedett D vitamin elégtelenségben.

Vizsgálatunkban elsőként igazoltuk, hogy az NDC-s betegekben a D vitamin analóg alfacalcidol hatására a T sejt immun-folyamatok kedvezően módosulnak.

Az alfacalcidollal kezelt 25 NDC-s beteg proinflammatorikus citokinjeinek (INF- γ , IL-12, IL-17, IL-23 és IL-6) szintje a kezelést követően szignifikánsan csökkent, míg az IL-10 citokin szint nőtt a D vitamin analóg terápia után. Az alfacalcidol terápia előtt mért alacsony 25(OH)D vitamin szint fordított korrelációt mutatott a szérum IL-23 és IL-6 citokin szintekkel (IL-23: -0.713, IL-6: -0.751).

A Th17 (CD4+IL-17+) sejtek százalékos és abszolút értéke jelentősen magasabb volt a vizsgált NDC-s csoportban a D vitamin analóggal való kezelést megelőzően, összehasonlítva a kezelés után mért értékekkel. A természetes regulatórikus T sejtek (CD4+CD25^{high}Foxp3+) százaléka és abszolút értéke szignifikánsan emelkedett a D vitamin kezelés után. A D vitamin terápiát követően az NDC-s betegek nTreg/Th17 sejtjeinek aránya nőtt (CD4+CD25^{high}Foxp3 és CD4+Th17+ abszolút értékeinek hányadosa a kezelés előtt: $0,00114 \pm 0,0061$, a kezelés után $0,00355 \pm 0,00223$, $p < 0,05$).

A CD4+CD25^{high} T sejtek autológ CD4+CD25⁻ T sejtek proliferációjára kifejtett gátló hatását anti-CD3 és anti-CD28-val történő stimuláció segítségével vizsgáltuk. A CD4+CD25^{high} T sejtek, autológ CD4+CD25⁻ T sejteken való szuppressziós képessége hasonló volt az egészséges kontrollok szuppressziós aktivitásához ($0,638 \pm 0,1$ vs. $0,64 \pm 0,1$ $p=ns$). Az **alfacalcidol terápiát követően az nTreg sejtek szuppresszív hatása fokozódott** (Proliferációs index: $0,638 \pm 0,1$ vs. $0,415 \pm 0,15$). A vizsgált 5 NDC-s betegből 4 esetében CD4+CD25^{high} T sejteknek az autológ CD4+CD25⁻ sejtek proliferációjára kifejtett gátló

hatása javult, míg egy beteg esetén a CD4+CD25^{high}T sejtek szuppressziós aktivitása nem változott az alfacalcidol terápiát követően.

Eredményeink alátámasztják, hogy az NDC-s betegekben az immunválasz regulációja károsodott, az autoimmun folyamatok kivédését célzó szuppresszor aktivitás csökkent.

Elsőként vizsgáltuk NDC-ben az IL-17 expresszáló CD4+T sejteket, és megállapítottuk, hogy az IL-17-t expresszáló CD4+T sejtek száma magas az NDC-s betegekben. A proinflammatorikus citokinek, az IL-12, IFN- γ , valamint a Th17 sejthez asszociálható citokinek, az IL-23, IL-17, továbbá az IL-6 szérum koncentrációja szignifikánsan magasabb volt NDC-ben, mint a kontrollban.

Az eredményeink azt mutatják, hogy az NDC-s betegekben Th17/nTreg sejt egyensúlyzavar van, amelynek szerepe lehet egy definitív kötőszöveti betegség irányába való progresszióban.

A D vitamin analóg, alfacalcidol terápia hatással van az NDC-s betegek CD4+CD25⁺ Treg sejtjeire, javítja a Treg sejtek szuppresszor kapacitását, ugyanakkor csökkenti a proinflammatorikus citokinek, az IL-6, IL-17 és IL-23 termelődését, valamint csökkenti a Th1 sejttel asszociálható citokinek, az IFN- γ és a IL-12 plazma koncentrációját, miközben növeli a regulációs IL-10 citokin termelést. Eredményeink arra utalnak, hogy az alfacalcidol a Th1 és Th17 sejtek differenciálódását, illetve azok citokin termelését egyaránt képes gátolni az NDC-s betegekben.

A D vitamin alkalmazása kedvezően befolyásolja a Th17/nTreg egyensúlyt, ennél fogva hatásos terápiának bizonyulhat az autoimmun betegségek terápiájában.

Eredményeink alapján *az NDC fázisában lévő betegeknél javasolt a plazma D vitamin szintjének meghatározása, illetve az egyéb rizikótényezőket is figyelembe véve a D vitamin pótlás megfontolása.*

Iktatószám: DEENKÉTK /27/2011.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Zöld Éva

Neptun kód: EX31BJ

Doktori Iskola: Petrányi Gyula Klinikai Immunbiológiai és Allergológiai Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Zöld, É.**, Szodoray, P., Nakken, B., Baráth, S., Kappelmayer, J., Csáthy, L., Hajas, Á., Sipka, S., Gyimesi, E., Gaál, J., Barta, Z., Hallay, J., Szegedi, G., Bodolay, E.:
Alfacalcidol treatment restores derailed immune-regulation in patients with undifferentiated connective tissue disease.
Autoimmun. Rev. 10 (3), 155-162, 2011.
IF:6.368 (2009)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2010.09.018>
2. **Zöld, É.**, Szodoray P., Gaál J., Kappelmayer J., Csáthy L., Baráth S., Gyimesi E., Hajas Á., Zeher M., Szegedi G., Bodolay E.: D-vitamin-analóg alfacalcidol hatása a regulatív T-sejt működésre.
Magyar Reum. 51 (1), 13-21, 2010.
3. **Zöld, É.**, Szodoray, P., Kappelmayer, J., Gaál, J., Csáthy, L., Baráth, S., Gyimesi, E., Hajas, Á., Zeher, M., Szegedi, G., Bodolay, E.: Impaired regulatory T-cell homeostasis due to vitamin D deficiency in undifferentiated connective tissue disease.
Scand. J. Rheumatol. 39 (6), 490-497, 2010.
IF:2.507 (2009)
DOI: <http://dx.doi.org/10.3109/03009741003781951>
4. **Zöld, É.**, Szodoray P., Gaál J., Szegedi A., Szegedi G., Bodolay E.: A D vitamin autoimmun kórképekben: a D-vitamin immunregulatórikus hatása és terápiás lehetőségek.
Ca csont. 12 (3), 85-93, 2009.
5. Gaál J., Szegedi A., Csáthy L., Szodoray P., Csípő I., **Zöld, É.**, Bodolay E.: A D-vitamin hatása autoimmun kórképekben.
Magyar Reum. 49 (1), 22-27, 2008.
6. Szodoray, P., Nakken, B., Baráth, S., Gaál, J., Aleksza, M., Zeher, M., Sipka, S., Szilágyi, A., **Zöld, É.**, Szegedi, G., Bodolay, E.: Progressive divergent shifts in natural and

induced T-regulatory cells signify the transition from undifferentiated to definitive connective tissue disease.

Int. Immunol. 20 (8), 971-979, 2008.

IF:3.181

DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/intimm/dxn056>

7. Szodoray, P., Nakken, B., Gaál, J., Jonsson, R., Szegedi, A., **Zöld, É.**, Szegedi, G., Brun, J.G., Gesztelyi, R., Zeher, M., Bodolay, E.: The Complex Role of Vitamin D in Autoimmune Diseases.

Scand. J. Immunol. 68 (3), 261-269, 2008.

IF:2.186

DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3083.2008.02127.x>

8. **Zöld É.**, Gaál J., Kappelmayer J., Csáthy L., Csípő I., Tumpek J., Zeher M., Szegedi G., Bodolay E.: D-vitamin-meghatározás nem-differenciált collagenosisban.

Allerg. Klin. Immun. 11 (2), 34-42, 2008.

9. **Zöld, É.**, Szodoray, P., Gaál, J., Kappelmayer, J., Csáthy, L., Gyimesi, E., Zeher, M., Szegedi, G., Bodolay, E.: Vitamin D deficiency in undifferentiated connective tissue disease.

Arthritis Res. Ther. 10 (5), R123, 2008.

IF:4.485

DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/ar2533>

További Közlemények

10. Bodolay E., **Zöld É.**, Gaál J.: A poliszisztémás autoimmun betegségek előfázisának jelentősége.

Focus Med. 12 (3), 3-6, 2010.

11. **Zöld, É.**, Nagy, Á., Dévényi, K., Zeher, M., Barta, Z.: Successful use of adalimumab for treating fistulizing Crohn's disease with pyoderma gangrenosum: Two birds with one stone.

World J. Gastroenterol. 15 (18), 2293-2295, 2009.

IF:2.092

DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.15.2293>



12. Barta, Z., **Zöld, É.**, Zeher, M.: Pulse cyclophosphamide in steroid-resistant inflammatory bowel disease.
Aliment. Pharmacol. Ther. 25 (11), 1363-1364, 2007.
IF:3.201
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2036.2007.03299.x>
13. **Zöld, É.**, Barta, Z., Zeher, M.: Spondylodiscitis representing as the very first sign of Crohn's disease.
Inflamm. Bowel Dis. 13 (8), 1058-1059, 2007.
IF:4.705
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/ibd.20132>
14. **Zöld, É.**, Barta, Z., Zeher, M.: Hydatid disease of the liver and associated hepatocellular carcinoma.
Clin Gastroenterol Hepatol. 3 (8), 35, 2005.

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2011.02.09



A PhD témában megjelent poszterek

1. **Eva Zold**, Gyula Szegedi, Edit Bodolay: Vitamin D in Undifferentiated Connective Tissue Disease, XXVII Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology (EAACI), Congress in Barcelona, Spain, 7-11 June 2008
2. E Bodolay, **E Zold**, P. Szodoray, E. Gyimesi, M Zeher, Gy Szegedi, J Gaál, J Kappelmayer, L Csathy: Vitamin D in Undifferentiated Connective Tissue Disease, 6 th International Congress on Autoimmunity, Porto, Portugal, 10-14 Sep 2008
3. **Eva Zold**, Gabor Papp, Peter Szodoray, Janos Kappelmayer, Janos Gaal, Laszlo Csathy, Sandor Barath, Edit Gyimesi, Agota Hajas Margit Zeher, Gyula Szegedi, Edit Bodolay: Impaired regulatory T-cell homeostasis due to Vitamin D deficiency in Undifferentiated Connective Tissue Disease, XXVIII Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology (EAACI), Congress in Warsaw, Poland 6-10 June 2009
4. **Zöld É**, Szodoray P, Gaál J, Kappelmayer J, Csáthy L, Barath S, Gyimesi E, Hajas Á, Zeher M, Szegedi Gy, Bodolay E: A D vitamin károsodott regulatív T sejt működésre kifejtett hatásának vizsgálata Nem Differenciált Collagenosisban; MRE, Kecskemét, 2008. szeptember.
5. **E Zold**, S Barath, J Kappelmayer, L Csathy, E Gyimesi, A Hajas, M Zeher, Gy Szegedi, E Bodolay: The effect of the different doses of alfacalcidol on regulatory T-cells in patients with undifferentiated connective tissue disease; 8th CERC, Sopron, 13-15 Sep 2010.

6. **E Zold**, M Zeher, E Bodolay: Alfacalcidol treatment restores derailed immune-regulation in patients with undifferentiated connective tissue disease; Annual Meeting of the Austrian Society for Allergology and Immunology, Bécs, 3-5 Dec 2010.

Egyéb poszterek jegyzéke

7. **Zöld Éva**, Barta Zsolt, Zeher Margit: Echinococcus granulosus okozta májbetegség és hepatocelluláris carcinoma együttes előfordulása, esetbemutató; Északkelet Magyarországi Belgyógyász Társaság 2005 évi Nagygyűlése, Debrecen, 2005
8. **Zöld Éva**, Kiss Emese, Barta Zsolt, Zeher Margit: Egy ritka társulás: Pyoderma gangrenosum, Crohn betegség és szisztémás lupus erythematosus sikeres kezelése TNF-alfa blokkolóval (infliximab), esetbemutató; Magyar Gastroenterológiai Társaság 47. Kongresszusa, Magyarország, Balatonaliga, 2005
9. **Zöld Éva**, Barta Zsolt, Csípő István, Zeher Margit: Anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies in celiac disease; Falk Symposium Turkey, Istanbul, May 2007.
10. Baráth Sándor, **Zöld Éva**, Sipka Sándor, Szegedi Gyula, Bodolay Edit: Regulatív CD4+CD25+ T sejtek funkcionális vizsgálata NDC-s betegeknél tetrazolium alapú proliferációs kit segítségével, Magyar Immunológiai Társaság (MIT), XXXVII. Vándorgyűlése, Budapest, 2008. október 29-31.
11. Szomják Edit, András Cs, Kerekes Gy., **Zöld É**, Dér H., Veres K., Soltész P.: Malignus betegségekhez társuló szerzett thrombophilia és akut artériás thrombosis megjelenése beteganyagunkban; A Magyar Belgyógyász Társaság Északkelet-

Magyarországi Szakcsoportjának 2008. évi Kongresszusa, Nyíregyháza-Sóstó, 2008

12. Nagy Árpád, **Zöld É**, Radványi M., Zeher M., Barta Zs.: Cyclophosphamid terápia gyulladásos bélbetegségekben; A Magyar Belgyógyász Társaság Északkelet-Magyarországi Szakcsoportjának 2008. évi Kongresszusa, Nyíregyháza-Sóstó, 2008
13. Hajas Á, Baráth S, Szodoray P, **Zöld É**, Bodolay E: Mixed Connective Tissue disease (MCTD): phenotypes and immunological characteristics. XXVIII Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology (EAACI), Congress in Warsaw, Poland 6-10 June 2009
14. A Hajas, P. Szodoray, **E Zold**, I Csipo, M Zeher, G Szegedi, E Bodolay: Distinct phenotypes in mixed connective tissue disease: subgroups and survival. 7th International Congress on Autoimmunity, Ljubljana, Slovenia, 5-6 May 2010.
15. Hajas Á, **Zöld É**, Végh J, Csípő I, Bodolay E: 25-hydroxyvitamin D és cardiovasculáris rizikófaktorok MCTD-s nőbetegekben, Magyar Allergológiai és Klinikai Immunológiai Társaság XXXVIII. Kongresszusa, Magyarország, Balatonalmádi, 2010.május 13-15
16. A Hajas, P Szodoray, **E Zold**, I Csipo, M Zeher, Gy Szegedi, E Bodolay: Distinct phenotypes in mixed connective tissue disease: Subgroups and survival; 8th CERC, Sopron, 13-15 Sep 2010.

Szcientometria

Értekezés alapjául szolgáló közlemények száma: 9

Egyéb közlemények száma: 5

Az értekezést megalapozó közlemények impakt faktora: 18,727

Az értekezésben fel nem használt közlemények impakt faktora: 9.998

Összesített impakt faktor: 28,725

Az értekezés témaköréhez kapcsolódó posztterek száma: 6

Az értekezéshez közvetlenül nem kapcsolódó posztterek száma: 10