

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**FOLLIKULÁRIS T HELPER SEJTEK
PATHOLÓGIÁS SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA
AUTOIMMUN KÓRKÉPEKBEN**

Szabó Krisztina

Témavezető: Prof. Dr. Zeher Margit



DEBRECENI EGYETEM

Petrányi Gyula Klinikai Immunológiai és Allergológiai Doktori Iskola

Debrecen, 2016

FOLLIKULÁRIS T HELPER SEJTEK PATHOLÓGIÁS SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA AUTOIMMUN KÓRKÉPEKBEN

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzésének érdekében
a klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: **Szabó Krisztina** okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Petrányi Gyula Klinikai Immunológiai és Allergológiai
Doktori Iskolája keretében

Témavezető: Prof. Dr. Zeher Margit, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Fésüs László, akadémikus
tagok: Prof. Dr. Bata Zsuzsanna, az MTA doktora
Dr. Antal-Szalmás Péter, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK,
Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, ÉTK 3.506
2016. március 22. 11 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Prohászka Zoltán, az MTA doktora
Dr. Szántó Sándor, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Fésüs László, akadémikus
tagok: Prof. Dr. Bata Zsuzsanna, az MTA doktora
Prof. Dr. Prohászka Zoltán, az MTA doktora
Dr. Antal-Szalmás Péter, PhD
Dr. Szántó Sándor, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK,
Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme
2016. március 22. 13 óra

I. BEVEZETÉS

Az immunrendszer mindkét ágának, a veleszületett és adaptív immunitásnak kiemelt figyelemmel történő vizsgálata számos új eredményt szolgáltatott a szakirodalom számára. Napjainkra az alapvető immunfolyamatok szabályozásáért felelős sejtek a kutatások célpontjaivá váltak, és különösen az immunológiai háttérrel rendelkező betegségek pathomechanizmusának megértésével a jövőben kiváló terápiás célpontként szolgálhatnak. A Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Klinikai Immunológiai Tanszékén több évtizede foglalkoznak szisztémás autoimmun betegségek magas szintű kezelésével és széleskörű kutatásával, különös figyelmet fordítva a primer Sjögren-szindróma (pSS) és a szisztémás lupus erythematosus (SLE) tanulmányozására. Munkánk során átfogóan vizsgáltuk az adaptív immunrendszer elemeinek megváltozott működését, mind a perifériás, mind pedig a gyulladásos környezetben. Kollektív irodalmi adatok és rendszerszintű összefoglaló, amely a follikuláris T helper (T_{FH}) sejtek és B sejt alcsoportok kapcsolatát érinti, még nem áll rendelkezésre egyik kórképben sem. Ez ösztönzött minket arra, hogy e sejtek szisztémás autoimmun kórképekben betöltött szerepét vizsgáljuk.

II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

II.1. Az autoimmun kórképek általános jellemzői

Az elmúlt évek immunpatológiai kutatásai alapján ma már kétségtelen, hogy számos krónikus gyulladásos és szöveti károsodással járó megbetegedés alapja a kóros autoimmunitás. Autoimmun folyamatok fiziológiás körülmények között is végbemennek, azonban a jól szabályozott immunválaszoknak köszönhetően nem veszélyeztetik a szervezet épségét. Az autoimmun kórképek olyan multifaktoriális betegségek, melyek kialakulásának hátterében genetikai „hajlamosító” tényezők, epigenetikai módosulások, továbbá környezeti és hormonális faktorok állnak. A genetikailag fogékony egyéneknél a saját struktúrákkal szemben kifejlődött tolerancia, illetve az immuntoleranciát kiváltó és szabályozó mechanizmusok károsodnak és a betegség kialakulásához vezetnek.

II.1.1. Sjögren-szindróma

A pSS egy krónikus gyulladásos megbetegedés, melynek előfordulási gyakorisága elérheti a 0,6 %-ot, így az egyik leggyakoribb szisztémás autoimmun kórképnek tekinthető. Bármely életkorban kialakulhat, de elsősorban a menopauza körüli időszakban, a 40-60 év közötti nőket betegítheti meg. A legmagasabb női dominanciával jellemezhető betegség, melyben az

érintett nők és férfiak aránya 9:1. A kórfolyamat legfőképp a külső elválasztású mirigyek károsodásával és következményes funkcióvesztésével definiálható, amely a betegség jellegzetes tüneteinek kifejlődéséhez vezet. A pSS-ban elsősorban úgynevezett glanduláris tünetek jelentkeznek; a könnymirigyek érintettsége szemszárazságot, míg a nyálmirigyek diszfunkciója szájszárazságot okoz. Kórlefolyása során mirigyműködéshez köthető tünetek mellett idővel extraglanduláris manifesztációk (EGM) is kifejlődhetnek. Pathogenezeise még máig sem teljesen tisztázott, de biztos, hogy kialakulása többlépcsős folyamat eredménye. A kezdeti belső szervezeti és külső környezeti tényezők által előidézett változások az autoimmun folyamatok felerősödéséhez és az exokrin mirigyek károsodásához vezetnek, amelynek szövettani elváltozásai túlnyomóan a kisnyálmirigy biopsziás mintákon vizsgálhatók. A mirigyszövet epitheliának károsodása és diszfunkciója következtében a kemokinek (CXCL9, CXCL10), adhéziós molekulák (ICAM-1) és aktivációs markerek (MHC-I, CD40) expressziója, illetve citokinek (IL-6, TNF- α) termelődése elősegíti a mononukleáris sejtek infiltrációját. A gyulladásos mikrokörnyezetbe beáramló dendritikus sejtek (pDC, mDC) az NK sejtek és T sejtek aktivációját okozzák, majd tovább erősítik az abnormális immunfolyamatokat. A BAFF szekréciójával az adaptív immunrendszer is aktiválódik és kialakul a kórképre jellemző károsodott humorális immunválasz. A kisnyálmirigy biopsziás mintákban megfigyelhető ektópiás germinális centrum (GC) képződés a fokozott lokális B sejt aktivitás jele, amely kiváló lehetőséget biztosít a betegségre jellemző autoreaktív folyamatok tanulmányozására, továbbá prediktív értékkel bír a későbbi malignus limfómák előrejelzésében.

II.1.2. Szisztémás lupus erythematosus

A SLE heterogén tüneteket mutató, krónikus szisztémás autoimmun betegség. A gyulladásos folyamatok számos szervet érinthetnek, de többnyire a bőr, ízületek, vesék és a központi idegrendszer panaszai jellemzőek. Elsősorban fogamzóképes nőket betegít meg, de a gyermekkortól egészen az időskorig bármely korosztályban előfordulhat. A pSS-hoz hasonlóan szintén erős női dominancia jellemzi. A betegség kórlefolyása hullámzó, az aktív stádiumot nyugalmi szakasz követheti. Az utóbbi évek intenzív kutatásainak köszönhetően számos ismeret gyűlt össze a kórkép pathogenezisét illetően, de minden részlete még ma sem teljesen tisztázott. A betegség kezdeti lépésének a külső környezeti tényezők által elindított nekrotikus és apoptotikus folyamatokat tekintik, utóbbi esetében, ha a programozott sejthalál zavart szenved, akkor a blebeket alkotó membrán integritása megszűnik, így tartalmuk az extracelluláris térbe kerül. Ennek hatására az SLE-re jellemző duplaszálú (ds) DNS, RNS és

kromatin partikulumok az immunrendszer sejtjei által felismerődnek és autoimmun folyamatot indítanak el. Az autoantigének további forrása lehet a neutrofil granulociták által alkalmazott „NETózis”, amely során DNS-t és ribonukleoproteineket tartalmazó struktúrákat bocsátanak ki a sejtközi térbe. Amennyiben a fent említett folyamatok lejátsszódását követő eltakarító procedúra zavart szenved, a kiszabadult autoantigének tartós triggerévé válnak az immunsejteknek. A sejtörmelékek aktiválják a mDC-eket, míg a pDC-ek az immunkomplexek (IK) és neutrofilek által kibocsátott struktúrák felismerésére képesek. Az adaptív immunrendszer a $CD4^+$ T sejtek mDC általi aktivációjával, illetve a pDC és mDC révén szekretált BAFF útján kapcsolódik be a SLE pathogenezisébe. Az autoreaktív B sejtek túlélésének és differenciálódásának támogatásával autoantitest termelő plazmasejtek keletkeznek. A SLE legfontosabb manifesztációja az IK-ek lerakódása kiváltképpen a vese glomerulusokban. Az abnormális B sejt válaszok meglétét támogatják azok a vizsgálatok, amelyekben lupus nephritisben szenvedő betegek vese biopsziáiban a B sejt aktiváló BAFF molekulát és ektópiás GC-okat sikerült kimutatni.

II.1.3. A konvencionális és cirkuláló folliculáris T helper sejtek eredete és funkciója

Az utóbbi évek legintenzívebben kutatott sejt típusa a T_{FH} sejt, melyet a GC reakciók központi szereplőjeként tartanak számon. Az elmúlt években publikált adatok alapján bizonyossá vált, hogy a T_{FH} sejtek mind génexpresszió és transzkripció program szintjén, mind funkcióban különböznek a T helper (Th)1/Th2/Th17 sejt vonalak differenciálódási útjaitól és számos olyan faktor kifejezésére képesek, melyek a hatékony B sejt immunválaszokat segítik. A T_{FH} sejtek differenciálódása többlépcsős folyamat, melynek első fázisa a DC-ek és naív $CD4^+$ T sejtek közötti interakciókor, a másodlagos nyirokszövetek T sejt zónájában történik. A T_{FH} sejt vonal irányú fejlődés alapvető feltétele, hogy a sejtekre jellemző Bcl-6 transzkripció faktor expressziója emelkedjen, és ezzel szemben a Blimp-1 szintje csökkenjen. A DC-ek által bemutatott antigének kostimulációs szignálok (B7-CD28, CD40-CD40L) és citokinek (IL-6, IL-12, IL-27) által a $CD4^+$ T sejtekben először fokozzák a BATF kifejeződését, amely ezt követően aktiválja a Bcl-6 és c-maf transzkripció faktorokat. A $CD4^+$ T sejtek felszínén megnő a CXCR5 (B sejt zóna kemokinje) és erősödik a CD40L, indukálható kostimulatórikus (ICOS) receptor, programozott sejthalál 1 (PD-1), szignált adó limfocita aktivátor molekula [SLAM]-asszociált protein (SAP) expresszió, illetve a CXCL13 és IL-21 szekréciója miközben a szövet T-B sejt határterületére vándorolnak. A fejlődés következő állomása a pre- T_{FH} sejtek kölcsönhatása az aktivált B sejtekkel. A határterületen a kétféle sejt találkozik, szoros kontaktusba kerül egymással és a kapcsolat hatására további aktivációs jeleket

közvetítenek egymás felé, amelynek eredményeként extrafollikuláris, rövid-életű plazmasejtek közvetítette antitest válaszok fejlődnek ki vagy a másodlagos follikulusokban képződő csíráközpontok részeként támogatják a B sejtek túlélését és differenciálódását. A GC sötét zónájában osztódó centroblasztok B-sejt receptorának (BCR) szomatikus hipermutációja (SHM) megy végbe, majd centrocitává fejlődve a világos zónába vándorolnak, ahol a már terminálisan differenciált T_{FH} sejtek és FDC-ek közreműködésével érési, illetve szelekciós folyamaton mennek keresztül. A folyamat eredményeként magas affinitású antitesteket termelő, izotípus váltáson átesett, hosszú-életű plazmasejtek és memória B sejtek keletkeznek. A vérben keringő, úgynevezett T_{FH} -szerű sejtek az utóbbi években kerültek a figyelem középpontjába és eredetüket tekintve azt feltételezik, hogy olyan memória sejtek, amelyek differenciációja a T_{FH} sejtvonalon indul el, de valószínűleg még azelőtt elhagyják a GC-ot, mielőtt elérnék a teljesen érett állapotot. A keringő $CD4^+CXCR5^+$ memória T_{FH} sejtek szintén expresszálják az ICOS és PD-1 molekulákat, azonban jóval alacsonyabb szinten. Továbbra is képesek a B sejt válaszok elősegítésére, de közel sem olyan arányban, mint a GC T_{FH} sejtek. A periférián megtalálható sejtek heterogén csoportot alkotnak, amelyek tovább osztályozhatók a memória T limfociták típusa alapján, illetve kostimulációs és kemokin receptorok expressziója szerint is. Irodalmi adatok szerint, a vérben keringő T_{FH} -szerű sejtek közül, funkciójukat és genetikai profiljukat tekintve, az $ICOS^+PD-1^+CCR7^{int}$ T_{FH2} és T_{FH17} fenotípus áll legközelebb a GC T_{FH} sejtekhez.

II.2. Célkitűzések

A pSS és SLE laboratóriumi paramétereiben tapasztalt elváltozások, továbbá az a tény, hogy mindkét kórkép célszervének immunhisztológiai vizsgálatával ektópiás GC-ok mutathatók ki, az adaptív immunitás abnormális működését támasztják alá. A humorális immunválasz szabályozó elemeként ismert T_{FH} sejt szerepét, illetve e sejt kapcsolatát más immunsejtekkel, a diagnosztikai vizsgálat során nyert laboratóriumi eredményekkel, illetve a klinikai tünetekkel még nem vizsgálták. A kutatás fontosságát kiemeli, hogy a pSS glanduláris, illetve szisztémás formáinak, valamint ezzel párhuzamosan SLE aktív és inaktív formáinak a vizsgálatára is lehetőségünk volt. Munkánk során az alábbi célokat fogalmaztuk meg:

- pSS-ás betegek glanduláris (GI) és szisztémás tüneteket mutató csoportjaiban, valamint SLE inaktív és aktív stádiumában lévő betegek perifériás vérében lévő T_{FH} -szerű sejtek százalékos arányának meghatározása és összevetése az egészséges egyének paramétereivel
- pSS-ban a perifériás vérben megtalálható immunsejtek diagnosztikai profilozása és az eltérések összevetése a T_{FH} -szerű sejt eredményekkel

- a betegek laboratóriumi paramétereinek, nevezetesen a szérumban mérhető Ig alcsoportok, jellemző autoantitestek, RF, IK és komplement komponensek vizsgálata majd a kapott eredmények, illetve sejtes vizsgálataink adatai közötti összefüggések keresése
- mindkét betegcsoportban a B sejt alpopulációk vizsgálata a klinikai tünetek alapján történő csoportosítást követően és az eredmények összehasonlítása a kontroll értékekkel
- pSS-ban szenvedő betegek korábban részletezett csoportjában kisnyálmirigy biopsziás mintát nyerünk és azokat hagyományos, illetve immunhisztokémiai módszerrel feldolgozva választ keresünk arra, hogy a T_{FH} sejtek részt vesznek-e a terciér limfoid neogenezisben, továbbá, hogy van-e összefüggés a szövettani eredmények, laboratóriumi paraméterek és a klinikum között.

III. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

III.1. Betegek

III.1.1. Etikai nyilatkozat

Szerológiai és sejtes vizsgálatainkhoz a Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Klinikai Immunológiai Tanszéke által gondozott pSS-ban és SLE-ben szenvedő betegek vérmintáit használtuk fel. Szövettani vizsgálatainkat a Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Patológiai Intézetének archívumában tárolt kisnyálmirigy biopsziás minták szövettani blokkjaiból készített metszeteken végeztük. A kísérleteket a Debreceni Egyetem, Klinikai Központ, Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottsága engedélyezte (Referencia szám: IX-R-052/00016-22/2012.). Minden vérvétel a betegek előzetes, írásos beleegyezésével történt és a kísérletek a Helsinki Nyilatkozat etikai irányelveit követve valósultak meg.

III.1.2. Primer Sjögren-szindróma perifériás paramétereinek vizsgálatába bevont betegek

Vizsgálatainkba összesen 75 pSS-ás beteget vontunk be (72 nő, 3 férfi; átlag életkor $\pm$ SD: 60,20 $\pm$ 9,58 év). A diagnózis megállapítása az Amerikai-Európai Konszenzus Kritériumrendszer alapján történt. A betegek közül 35 személynél csak glanduláris tünetek jelentkeztek, míg 40 személy egy, vagy több EGM-t mutatott a kórlefolyás során. Az extraglanduláris tünetek megoszlása a következőképpen alakult: polyarthrititis n=25, Raynaud-szindróma n=18, lymphadenopathia n=3, vasculitis n=5, polyneuropathia n=2, myositis n=1, polyarthralgia n=11. A vizsgálat idejét megelőzően a betegek csak szubsztitúciós kezelést

(könny- és nyálpótlás) kaptak. A laboratóriumi mérésekhez kontroll csoportként összesen 37 egészséges személy szolgált (35 nő, 2 férfi; átlag életkor $\pm$ SD: 45,58 $\pm$ 12,99év).

III.1.3. Primer Sjögren-szindróma szövettani vizsgálatába bevont betegek

Vizsgálatunkba olyan 10 pSS-ás beteget vontunk be (10 nő; átlag életkor $\pm$ SD: 57,20 $\pm$ 11,40 év), akiknél a pSS diagnózisának felállításakor végeztek kisnyálmirigy biopsziát és szerepeltek a perifériás vizsgálatainkban is. Az adatgyűjtés alapjául a rendelkezésre álló ambuláns gondozási lapok szolgáltak, amelyek részletes információt nyújtottak a betegek klinikai tüneteiről, fizikai állapotáról és laboratóriumi paramétereiről.

III.1.4. Szisztémás lupus erythematosus vizsgálatába bevont betegek

A vizsgálatba 25 SLE-ben szenvedő beteget vontunk be (24 nő, 1 férfi; átlag életkor $\pm$ SD: 41,17 $\pm$ 13,20 év), a diagnózis megállapítása az Amerikai Reumatológiai Kollégium kritérium rendszere alapján történt. Azokat a betegeket tekintettük klinikailag aktívnak, akiknél az SLE betegség aktivitási index (SLE Disease Activity Index; SLEDAI) érték nagyobb, vagy egyenlő volt, mint 6. A pontrendszer alapján két csoportot alakítottunk ki: SLEDAI<6 (n=17) és SLEDAI $\geq$ 6 csoport (n=8). A betegek átlagosan napi 4 mg metilprednizolon kezelésben részesültek, a terápiás dózis egyik betegnél sem haladta meg a 8 mg napi adagot. A kontroll csoport 21 egészséges személyből állt (20 nő, 1 férfi; átlag életkor $\pm$ SD: 39,10 $\pm$ 12,43 év).

III.2. Laboratóriumi vizsgálati módszerek

III.2.1. Limfocita alcsoportok meghatározása teljes vérből áramlási citométerrel

A limfocita alcsoportok rutinszerű elkülönítésére a következőkben felsorolt sejtfelszíni markerek elleni monoklonális antitesteket használtuk: CD3, CD4, CD8, CD19, CD16, CD56. A T sejtek aktivációs markereinek vizsgálatát anti-CD69 és anti-HLA-DR monoklonális ellenanyagok segítségével a CD3⁺ limfocita populáción belül végeztük (BD Biosciences). A naiv és memória B sejtek meghatározása anti-IgD/anti-CD27/anti-CD19 (Beckman Coulter) monoklonális antitestekkel történt. A minták feldolgozását a Coulter Q-PREP protokoll (Beckman Coulter) alapján és a Regionális Immunológiai Laboratórium korábban kidolgozott rutin diagnosztika irányelvei szerint végeztük. A CD4⁺ Th sejt altípusok meghatározását intracelluláris citokin festéssel végeztük. A heparinnal alvadásgátolt teljes vért 1:1 arányban 100 U/ml penicilinnel, 100 ng/ml streptomycinnel és 10% végkoncentrációjú hőinaktivált FCS-el (Life Technologies) RPMI 1640 GLUTAMAXTM-I médiummal (Life Technologies) hígítottuk. A limfocitákat forbol 12-mirisztoil 13-acetáttal (PMA) (25 ng/ml), ionomycinnel

(1 µg/ml) és Brefeldin A-val (10 µg/ml) (Sigma-Aldrich) 37°C-on, 5%-os CO₂ tartalom mellett 4 órán keresztül inkubáltuk. Az sejtek jelölését a megfelelő antigének elleni (CD4, CD8, IFN-γ, IL-4, IL-17 és IL-10) monoklonális antitestekkel, az IntraPrep permeabilizációs kitben (Beckman Coulter Inc.) szereplő protokoll szerint végeztük. Az adatok gyűjtése és kiértékelése Cytomics FC500 típusú áramlási citométer, illetve CXP szoftver segítségével történt (Beckman Coulter).

III.2.2. B limfocita alcsoportok meghatározása áramlási citométerrel

A B-sejt alcsoportok fenotípusos vizsgálatához perifériás vér mononukleáris sejteket (PBMC) izoláltunk, majd anti-IgD/anti-CD27/anti-CD19 és anti-CD38/anti-CD27/anti-CD19/anti-CD24 monoklonális antitest kombinációkkal azonosítottuk a sejteket (Beckman Coulter, Immunotech, BD Biosciences). A minták mérését FACS Calibur áramlási citométeren (BD Biosciences), CellQuest program segítségével végeztük, a detektált adatok kiértékelése FlowJo szoftverrel (TreeStar) történt.

III.2.3. Keringő T_{FH}-szerű sejtek meghatározása áramlási citométerrel

A keringő T_{FH}-szerű sejtek vizsgálatát 50 pSS-ás beteg esetében teljes vérmintából, míg 25 pSS-ban és 25 SLE-ben szenvedő beteg esetében PBMC-ből végeztük. A sejtek azonosítására a következő markerek elleni monoklonális antitestek szolgáltak: CD4, CXCR5, ICOS, PD-1 (BD Biosciences). A naiv és memória CD4⁺ T sejtek elkülönítésére anti-CD45RA reagenst használtunk (BioLegend). A FACS Calibur áramlási citométerrel detektált adatok elemzése FlowJo szoftverrel történt.

III.2.4. IL-21R expressziójának vizsgálata primer Sjögren-szindrómás betegek B sejtein

A CD19⁺IL-21R⁺ sejtek vizsgálatát PBMC-ből, 6,5 µg/ml anti-humánBCR-ral (Jackson ImmunoResearch), illetve 50 ng/ml rekombináns humán IL-21 fehérjével (R&D Systems) 18 órás, 37°C-on, 5%-os CO₂ tartalom melletti aktiválás után végeztük. A sejtfelszíni festéshez CD19 és IL-21R elleni monoklonális antitesteket használtunk (Beckman Coulter és BioLegend). A mérést FACS Calibur áramlási citométer, a kiértékelést FlowJo szoftver segítségével végeztük.

III.2.5. Intracelluláris citokin meghatározás áramlási citométerrel

A citoplazmatikus IL-21 citokin jelöléshez PBMC-et használtunk. A szeparált sejteket 2x10⁶ sejt/ml koncentrációban poliklonális aktivátorok (25 ng/ml PMA; 1 µg/ml ionomycin [Sigma-

Aldrich]) jelenlétében 37°C-on, 5%-os CO₂ tartalom mellett 5 órán keresztül aktiváltuk. A *de novo* szintetizálódott citokinek felszabadulását a Golgi-készülékből Brefeldin A (10 µg/ml) (Sigma-Aldrich) hozzáadásával gátoltuk meg. A sejtfelszíni jelöléshez anti-CD4, anti-CXCR5 és anti-PD-1, az intracelluláris citokin meghatározáshoz anti-IL-21 monoklonális ellenanyagot használtuk (BD Biosciences). A B sejtek intracelluláris IL-10 szekréciójának stimulálásához a PBMC-ket 2x10⁶ sejt/ml koncentrációban 0,5 µM/ml CpG-ODN jelenlétében (TLR9 agonista, ODN 2006 B típus, Hycult Biotech) 48 órán keresztül tenyésztettük. A tenyésztés utolsó 5 órájában 25 ng/ml PMA, 1 µg/ml ionomycin és 10 µg/ml Brefeldin A (Sigma-Aldrich) segítségével újraaktiváltuk a sejteket. A sejtfelszíni festéshez anti-CD19/anti-CD38/anti-CD24 (BD Biosciences és BioLegend), a citoplazmatikus jelöléshez anti-IL-10 (BD Biosciences) monoklonális antitestet használtuk. Mindkét vizsgálat esetében a sejtek fixálását és permeabilizációját az IntraPrep permeabilizációs kit (Beckman Coulter) alapján a gyártó utasításainak megfelelően végeztük. Az adatok gyűjtését FACS Calibur áramlási citométerrel, a kiértékelést FlowJo szoftverrel végeztük.

III.2.6. Szolubilis citokinek meghatározása ELISA módszerrel

A szérumban keringő IL-12, IL-21 és IL-27 citokinek mennyiségét Platinum ELISA kit (eBioscience) felhasználásával, a gyártó által leírt protokoll szerint végeztük. Az abszorbanciát LabSystems Multiskan MS multiplate olvasó (Labsystems) segítségével 450 nm hullámhosszon detektáltuk. Az eredmények kiértékelése Genesis v2.0 szoftveren (Labsystems) történt.

III.2.7. Szerológiai paraméterek meghatározása

A szérum immunglobulinok (IgG, IgA és IgM), C3, C4 szérum komplement mennyiségét kalibrátor reagensek (DIALAB) segítségével, BN II Nefelométeren (Siemens AG) mértük. A keringő IK-ek meghatározása polietilén glikollal történő precipitációs teszttel történt. Az anti-Ro/SSA, anti-La/SSB és anti-dsDNS autoantitestek meghatározását AUTOSTAT II kit (Hycor Biomedical) alkalmazásával, a gyártó utasításainak megfelelően végeztük. A mérések és az adatok kiértékelése ETI-MAX 300 készüléken (Diasorin) zajlott.

III.2.8. Kisnyálmirigy biopsza és hagyományos szövettani vizsgálat

Formalinban fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) szövettani blokkokból 4 µm vastag metszeteket készítettünk. Az általános hisztológiai áttekintést és a „focus score” (FS) értékeket hematoxilin-eozin festéssel határoztuk meg. Egy focusnak számított a legalább 50

mononukleáris sejtből álló aggregátum 4 mm² kisnyálmirigy szövetre vonatkoztatva, amely alapján négy fokozatot különítettünk el: FS=0 (nincs limfocitás infiltrátum), FS=1 (<1 focus/4 mm²), FS=2 (<2 focus/4 mm²), FS=3 (>2 focus/4 mm²).

III.2.9. Immunhisztokémiai vizsgálatok

Immunhisztokémiai (IHK) módszerrel, FFPE blokkokból készített szövettani metszeteken meghatároztuk a CD4, CD5, CD20, CD138, PD-1, CD84 sejtfelszíni molekulák és Bcl-6 transzkripciós faktor megoszlását. A primer monoklonális antitestekkel 1 órán át, a szekunder antitestként funkcionáló biotin-mentes EnVision™ FLEX/HRP polimer-enzim konjugátummal (Dako) 30 percig nedves kamrában, szobahőmérsékleten inkubáltuk a metszeteket. A detektálás VIP peroxidáz (Vector Laboratories) szubsztrát alkalmazásával, a sejtmagok festése metil-zölddel (Vector Laboratories) történt. A digitalizált tárgylemezeket Panoramic Viewer 1.15.2. (3D Histech) szoftver segítségével értékeltük ki.

III.2.10. A periduktális sejtes infiltrátum osztályozása immunhisztokémiai módszerrel

A limfocitás infiltrátum szerveződési szintjének meghatározása IHK festéssel, CD4 és CD20 markerekkel történt. A grádusok megítélése során négy fokozatot különítettünk el: (1) elszórtan, kevés számban perivaszkulárisan elhelyezkedő limfociták; (2) közepes mértékben szerveződött limfocitás beszűrődés; (3) szervezettebb, szeparált T- és B sejt zónákból álló periduktális limfocita aggregátum; (4) elkülönült T- és B sejtes területekből álló, jól organizált periduktálisan lokalizált gyulladásos infiltrátum.

III.2.11. Kettős immunfluoreszcens festés

A kettős immunfluoreszcens (IF) festést FFPE blokkokból készített szövettani metszeteken végeztük. Az első primer monoklonális antitesttel (anti-Bcl-6) történő jelölést (1 óra, szobahőmérséklet, nedves kamra) követően a metszeteket biotin-mentes EnVision™ FLEX/HRP polimer-enzim konjugátummal 30 percen át inkubáltuk és tyramide-kapcsolt vörös fluoreszcens amplifikációs kittel (Perkin Elmer Life Sciences) vizualizáltuk. Ezt követően a metszeteket a második primer monoklonális ellenanyagokkal (anti-CD20 és anti-CD3) 1 órán keresztül inkubáltuk, majd a detektálást Ab-biotinilált-(Fab')₂ komplexszel (30 perc) és streptavidin-FITC zöld színű fluorokrómmal végeztük (30 perc). A sejtmagok festésére kék fluoreszcens DAPI (Vector Laboratories) nukleáris festést használtunk. A képeket Zeiss AXIO Imager Z2 fluoreszcens mikroszkóppal (NA 10x/0.3 és 20x/0.5; Zeiss), Isis szoftver (Metasystems) segítségével készítettük.

III.3. Statisztikai módszerek

Az adatok elemzéséhez és az ábrák elkészítéséhez a GraphPad Prism 5 statisztikai szoftvert (Graphpad Software) használtuk. Az adataink normál eloszlásának tesztelését Kolmogorov-Smirnov és Shapiro-Wilk próbával végeztük. Normál eloszlás esetén kétmintás T-próbát, ha a szórásnégyzeteket nem tekintettük azonosnak, akkor Welch-próbát használtunk. A normál eloszlástól eltérő esetekben Mann-Whitney próbát alkalmaztunk. Két változó közötti kapcsolat vizsgálata során normál eloszlás esetén Pearson-féle, míg nem-normál eloszlás esetén Spearman-féle korrelációs koefficiens határoztunk meg, illetve lineáris regressziós egyenest állítottunk fel. Az eredményekben mutatkozó különbségeket $p < 0,05$ értéke esetén tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

IV. EREDMÉNYEK

IV.1. Perifériás vizsgálatok eredményei

IV.1.1. Keringő T_{FH} -szerű sejtek vizsgálata primer Sjögren-szindrómában teljes vérből származó mintákon

Tanulmányunk első részében 50 pSS-ban szenvedő beteg perifériás vérében meghatároztuk a cirkuláló $CD4^+CXCR5^+ICOS^+PD-1^+$ T_{FH} -szerű sejtek százalékos arányát. A teljes betegpopuláció adatainak kiértékelése során csak az EGM-et mutató betegcsoport esetében tapasztaltunk szignifikánsan magasabb sejtarányt a kontroll értékekhez képest ($0,79\% \pm 0,39$ vs. $0,29\% \pm 0,19$; $p < 0,0001$), míg a glanduláris tünetekkel rendelkező betegcsoport adatai nem mutattak eltérést a kontrollal szemben. Továbbá, a szisztémás tünetekben szenvedő betegekénél mért értékek szignifikánsan magasabbak voltak a csak glanduláris panaszokat mutató betegnél ($0,79\% \pm 0,39$ vs. $0,26\% \pm 0,13$; $p < 0,0001$) is. Vizsgálatunkban 19 személy mutatott anti-Ro/SSA pozitivitást és 11 egyénél igazoltunk az SSA mellett anti-La/SSB autoantitestet is. A T_{FH} -szerű sejtek százalékos aránya az anti-Ro/SSA pozitív betegcsoportban szignifikánsan emelkedett az autoantitest-negatív csoporttal szemben ($0,510$ ($0,070-1,560$)% vs. $0,350$ ($0,030-1,690$)%; $p = 0,0341$). Szignifikáns különbséget találtunk az anti-La/SSB pozitív csoportban mért sejtarányok esetében is a negatív csoportban kapott adatokhoz képest ($0,870$ ($0,070-1,560$)% vs. $0,350$ ($0,030-1,690$)%; $p = 0,0452$).

IV.1.2. Szolubilis citokinek vizsgálata primer Sjögren-szindrómás betegek szérumban

A szérumban mért citokinek közül csak az IL-12 és IL-21 esetében tapasztaltunk szignifikáns eltéréseket. A T_{FH} -szerű sejtek százalékos aránya szignifikánsan magasabb volt az IL-12 pozitív csoportban a kontroll (0,69 (0,24-1,56)% vs. 0,24 (0,06-0,75)%; $p=0,0011$) és az IL-12 negatív csoporthoz képest (0,69 (0,24-1,56)% vs. 0,35 (0,03-1,69)%; $p=0,0249$). Az emelkedett IL-21 szinttel rendelkező betegek esetében szoros összefüggést találtunk a T_{FH} -szerű sejtek százalékos aránya és az EGM megjelenése között. A sejtek arányát szignifikánsan magasabbnak találtuk az EGM-mel rendelkező IL-21 pozitív csoportban összehasonlítva a negatív csoport ugyanezen alcsoportjával (0,56 (0,13-1,69)% vs. 0,91 (0,51-1,56)%; $p=0,0414$). Ugyanakkor mindkét esetben az EGM alcsoportba sorolt T_{FH} -szerű sejtarányok szignifikáns mértékű emelkedést mutattak mind a kontroll (negatív EGM vs. kontroll: 0,56 (0,13-1,69)% vs. 0,24 (0,06-0,75)%; $p=0,0003$ és pozitív EGM vs. kontroll: 0,91 (0,51-1,56)% vs. 0,24 (0,06-0,75)%; $p=0,0002$), mind a glanduláris (negatív EGM vs. negatív Gl: 0,56 (0,13-1,69)% vs. 0,24 (0,03-0,60)%; $p<0,0001$ és pozitív EGM vs. pozitív Gl: 0,91 (0,51-1,56)% vs. 0,31 (0,07-0,39)%; $p=0,0121$) csoportokkal szemben.

IV.1.3. Perifériás T_{FH} -szerű sejtek vizsgálata PBMC-ből származó mintákon primer Sjögren-szindrómában és szisztémás lupus erythematosusban

További kísérleteink során a pSS-ás betegcsoport kibővítésével, illetve SLE-ban szenvedő egyének perifériás véréből szeparált PBMC-ből származó mintákban vizsgáltuk a T_{FH} -szerű sejtek százalékos arányát. A tanulmány második felébe újonnan bevont pSS-ás betegcsoportot külön kezeltük az előző populációtól. Eredményeink összhangban álltak a teljes vérből mért adatainkkal, nevezetesen a $CD4^+CXCR5^+ICOS^+PD-1^+$ T_{FH} -szerű sejtarány szignifikánsan magasabb volt az extraglanduláris tüneteket is mutató csoportban, szemben a csak glanduláris panaszokkal rendelkező (0,4121% $\pm$ 0,2753 vs. 0,2253% $\pm$ 0,1238; $p=0,0322$), illetve a kontroll csoporttal (0,4121% $\pm$ 0,2753 vs. 0,2235% $\pm$ 0,0979; $p=0,0218$). A keringő T_{FH} -szerű sejtek aránya szintén szignifikáns mértékű emelkedést mutatott SLE-s betegek esetében is a kontroll értékekhez viszonyítva (0,3369% $\pm$ 0,2029 vs. 0,2235% $\pm$ 0,0979; $p=0,0184$). Ha a betegpopuláció felosztását az autotantitest pozitivitás alapján osztályoztuk, akkor a sejtek százalékos aránya szignifikánsan magasabb volt az anti-dsDNS-pozitív csoportban a kontroll értékekhez képest (0,3717% $\pm$ 0,2153 vs. 0,2235% $\pm$ 0,0979; $p=0,0192$).

IV.1.4. Keringő T_{FH}-szerű sejtek citokin termelésének vizsgálata PBMC-ből származó mintákon primer Sjögren-szindrómában és szisztémás lupus erythematosusban

A perifériás T_{FH}-szerű sejtek IL-21 termelését intracelluláris citokin jelöléssel vizsgáltuk. A CD4⁺CXCR5⁺PD-1⁺IL-21⁺ T_{FH}-szerű sejtek arányát pSS-ban csak a szisztémás panaszokban is szenvedő betegcsoportban találtuk szignifikánsan magasabbnak a kontroll értékekhez viszonyítva ($0,2449\% \pm 0,1657$ vs. $0,1469\% \pm 0,0649$; $p=0,0442$), míg a glanduláris csoport adatai a kontrollokénak feleltek meg. Autoantitest pozitivitás alapján, az anti-Ro/SSA-pozitív csoport adatai szignifikáns mértékű emelkedést mutattak a kontroll csoporttal szemben ($0,2742\% \pm 0,1418$ vs. $0,1469\% \pm 0,0649$; $p=0,0297$). Az IL-21 termelő CD4⁺CXCR5⁺PD-1⁺ T_{FH}-szerű sejtek százalékos aránya szignifikánsan emelkedett a teljes SLE betegpopulációban ($0,3125\% \pm 0,1886$ vs. $0,1469\% \pm 0,0649$; $p=0,0003$), továbbá az inaktív ($0,2786\% \pm 0,1805$ vs. $0,1469\% \pm 0,0649$; $p=0,0100$) és aktív ($0,3846\% \pm 0,1968$ vs. $0,1469\% \pm 0,0649$; $p=0,0123$) alcsoportokban is az egészséges egyének értékeihez viszonyítva. A két alcsoport között azonban nem találtunk szignifikáns eltérést. Ha az IL-21⁺ T_{FH}-szerű sejtek arányát az autoantitest jelenléte szerint rendszereztük, akkor a sejtarány szignifikánsan magasabbnak bizonyult az anti-dsDNA-pozitív SLE-s csoportnál összevetve a kontroll adatokkal ($0,3638\% \pm 0,1982$ vs. $0,1469\% \pm 0,0649$; $p=0,0009$), és különbséget találtunk az inaktív és aktív stádiumban lévő betegek között ($0,3638\% \pm 0,1982$ vs. $0,2356\% \pm 0,1509$; $p=0,0489$) is.

IV.1.5. Perifériás T_{FH}-szerű sejtek fenotípusos vizsgálata

Egy kisebb számú betegcsoport bevonásával, megvizsgáltuk a T_{FH}-markerek expressziójának megoszlását a CD45RA⁺ naiv és a CD45RA⁻ memória T sejtpopulációkban. A naiv CD4⁺CD45RA⁺ T limfociták között mind az ICOS, mind a PD-1 markerek aránya minimálisnak bizonyult szemben a memória CD4⁺CD45RA⁻ T sejteknél tapasztalt értékekkel.

IV.1.6. Perifériás B sejt alcsoportok megoszlásának vizsgálata PBMC-ből származó mintákon primer Sjögren-szindrómában és szisztémás lupus erythematosusban

További kísérleteinkben mindkét betegségben tanulmányoztuk a perifériás B sejt alcsoportok megoszlását. A következő alcsoportokat különítettük el: CD19⁺IgD⁺CD27⁻ naiv B sejtek, CD19⁺IgD⁺CD27⁺ “un-switched” memória B sejtek, CD19⁺IgD⁻CD27⁺ “switched” memória B sejtek, CD19⁺IgD⁻CD27⁻ kettős negatív B sejtek, CD19⁺CD38⁻CD24^{hi}CD27⁺ elsődleges memória B sejtek, CD19⁺CD38^{hi}CD24^{hi}CD27⁻ tranzicionális B sejtek, CD19⁺CD38⁺CD24⁺ érett-naiv B sejtek és CD19⁺CD38^{hi}CD27^{hi} plazmablasztok. Eredményeink szerint, a CD19⁺IgD⁻CD27⁺ “switched” memória B sejtek százalékos aránya szignifikánsan csökkent

pSS-ás betegek körében a kontroll értékekhez viszonyítva ($15,07\% \pm 7,65$ vs. $23,23\% \pm 6,78$; $p=0,0005$). Az SLE-s betegeknek csak a SLEDAI ≤ 6 alcsoportban tapasztaltunk szignifikánsan alacsonyabb sejtarányokat az egészséges egyénekben mért értékekhez képest ($17,53\% \pm 13,89$ vs. $23,23\% \pm 6,78$; $p=0,0321$). A $CD19^+IgD^+CD27^+$ “un-switched” memória B sejtek megoszlásakor csak az SLE-ben szenvedő betegeknek találtunk szignifikáns különbséget a kontroll csoporthoz viszonyítva ($10,98\% \pm 10,06$ vs. $21,67\% \pm 11,52$; $p=0,0019$), míg a pSS-ás betegek és az egészséges személyek adatai hasonlóan adódtak. A $CD19^+IgD^-CD27^-$ kettős negatív B sejtek megoszlása fordított arányban változott a két betegségben. A sejtek értékei szignifikáns csökkenést mutattak a teljes pSS-ás betegcsoportban ($3,214\% \pm 2,463$ vs. $3,796\% \pm 1,681$; $p=0,0290$), míg a SLE-ben szenvedő betegeknek szignifikánsan emelkedtek ($6,906\% \pm 4,525$ vs. $3,796\% \pm 1,681$; $p=0,0119$) a kontroll adatokhoz képest. A $CD19^+IgD^+CD27^-$ naiv B sejtek aránya a teljes betegpopulációt tekintve szignifikánsan emelkedett pSS-ban ($63,87\% \pm 20,76$ vs. $51,32\% \pm 15,14$; $p=0,0261$) és SLE-ben ($62,88\% \pm 21,87$ vs. $51,32\% \pm 15,14$; $p=0,0471$) is összevetve az egészséges egyénekben mért értékekkel.

A $CD19^+CD38^-CD24^{hi}CD27^+$ elsődleges memória B sejtek megoszlása alacsonyabbnak bizonyult a kontrollhoz viszonyítva, azonban szignifikáns eltérést pSS esetében csak a glanduláris alcsoportban ($23,29\% \pm 9,827$ vs. $34,58\% \pm 13,91$; $p=0,0289$), míg SLE vonatkozásában a teljes ($22,77\% \pm 14,45$ vs. $34,58\% \pm 13,91$; $p=0,0074$) és a SLEDAI ≥ 6 ($17,10\% \pm 12,11$ vs. $34,58\% \pm 13,91$; $p=0,0042$) alosztályokban figyeltünk meg. A $CD19^+CD38^{hi}CD24^{hi}CD27^-$ tranzicionális B sejtek arányát tekintve pSS-ban nem találtunk szignifikáns eltérést sem a teljes populációt, sem az alcsoportokat illetően a kontroll adatokhoz képest. Azonban, ha a pSS-ás betegek felosztását az anti-Ro/SSA autoantitest jelenléte alapján végeztük, akkor a $CD19^+CD38^{hi}CD24^{hi}CD27^-$ tranzicionális B sejtek százalékos aránya szignifikánsan emelkedett a pozitív csoportban összehasonlítva a negatív csoporttal ($9,842\% \pm 7,766$ vs. $3,722\% \pm 2,320$; $p=0,0499$). Ellenben SLE esetében a $CD19^+CD38^{hi}CD24^{hi}CD27^-$ tranzicionális B sejtek megoszlása szignifikánsan magasabb volt a teljes populációban ($10,35\% \pm 7,78$ vs. $5,30\% \pm 2,42$; $p=0,0045$) és az SLEDAI ≥ 6 alcsoportban ($12,71\% \pm 7,73$ vs. $5,30\% \pm 2,42$; $p=0,0323$) a kontroll értékekkel szemben. A $CD19^+CD38^+CD24^+$ érett-naiv B sejtek aránya SLE-ben a teljes betegcsoportban ($35,86\% \pm 14,86$ vs. $27,74\% \pm 9,33$; $p=0,0297$) és az aktív stádiumban lévő betegek ($39,32\% \pm 11,61$ vs. $27,74\% \pm 9,33$; $p=0,0094$) vonatkozásában mutatott szignifikáns mértékű emelkedést az egészséges személyek adataihoz viszonyítva. A $CD19^+CD38^{hi}CD27^{hi}$ plazmablasztok megoszlásában eltérést tapasztaltunk a két kórképben. A sejtek százalékos aránya szignifikánsan alacsonyabb volt a pSS teljes betegpopulációjában ($0,134\% \pm 0,154$ vs.

0,267% $\pm$ 0,293; $p=0,0050$) és az extraglanduláris tünetekben is szenvedő alcsoportban (0,127% $\pm$ 0,183 vs. 0,267% $\pm$ 0,293; $p=0,0014$) a kontroll értékekkel összevetve. Ellenben, SLE-s betegeknél a plazmablasztok aránya magasabbnak adódott a kontroll csoporttal szemben, de szignifikáns különbséget csak az aktív stádiumban lévő betegcsoportban találtunk (1,150% $\pm$ 1,181 vs. 0,267% $\pm$ 0,293; $p=0,0403$).

IV.1.7. B sejtek IL-21R expressziójának vizsgálata primer Sjögren-szindrómában

Egy független betegpopulációban (30 nő, 2 férfi; átlag életkor $\pm$ SD: 58,98 $\pm$ 7,67 év) vizsgáltuk a CD19⁺ B sejtek IL-21R expresszióját, amelyet átlagos fluoreszcencia intenzitás (MFI) értéként adtunk meg. A teljes betegpopuláció kiértékelése során emelkedett IL-21R expressziót figyeltünk meg a kontroll értékekhez képest (3,434 $\pm$ 0,929 MFI vs. 2,961 $\pm$ 0,585 MFI; $p=0,0288$) és ezt a változás tapasztaltuk szisztémás tünetekkel rendelkező pSS-ás betegeknél is (3,578 $\pm$ 0,901 MFI vs. 2,961 $\pm$ 0,585 MFI; $p=0,0195$).

IV.1.8. IL-10 termelő B sejtek vizsgálata primer Sjögren-szindrómában és szisztémás lupus erythematosusban

Ezt követően egy kisebb donor populáción vizsgáltuk a B sejtek IL-10 termelését CpG-ODN-dal indukált aktivációt követően. Eredményeink szerint, az IL-10 termelő B sejtek (B10 és B10_{PRO} sejtek) aránya szignifikáns emelkedést mutatott a csak PIB koktéllal stimulált csoporttal szemben (kontroll: 7,335% $\pm$ 0,9034 vs. 3,675% $\pm$ 1,050; $p=0,0384$; pSS: 5,838% $\pm$ 0,6618 vs. 2,748% $\pm$ 1,032; $p=0,0357$; SLE: 5,477% $\pm$ 0,6775 vs. 1,907% $\pm$ 0,4094; $p=0,0007$). A kezelést követően nem találtunk szignifikáns különbséget a csoportokon belül az egészséges személyek adatai és a beteg alpopulációk között, azonban azt megfigyeltük, hogy mindkét kórkép esetében az értékek lényeges csökkenést mutattak a kontrollhoz képest.

IV.1.9. A cirkuláló T_{FH}-szerű sejtek és T limfocita alcsoportok megoszlása közötti összefüggések vizsgálata primer Sjögren-szindrómában

Az eredményeink statisztikai feldolgozása során szignifikáns pozitív korrelációt találtunk a perifériás T_{FH}-szerű sejtek százalékos aránya és a korai-aktivált T sejtek aránya között ($R=0,4147$; $p=0,0028$). Ezt az összefüggést figyeltük meg a késői-aktivált T sejtek esetében is ($R=0,3148$; $p=0,0276$). Továbbá, a Tr1 sejtekkel kapcsolatos eredmények feldolgozását követően szintén szignifikáns pozitív korrelációt tapasztaltunk a T_{FH}-szerű sejtek és a Tr1 sejtek megoszlása között ($R=0,4140$; $p=0,0034$). Nem találtunk összefüggést más immunparaméterek és T_{FH}-szerű sejtek között.

IV.1.10. A keringő T_{FH} -szerű sejtek és B limfocita alcsoportok aránya közötti kapcsolatok vizsgálata EGM-et mutató primer Sjögren-szindrómás betegekben

A T_{FH} -szerű sejtek és B sejtek megoszlásával kapcsolatos eredményeink áttekintése során döntően a szisztémás tünetekben szenvedő pSS-ás betegek esetében tapasztaltunk jelentősebb eltéréseket, ezért az adatok további statisztikai kiértékelését már ezzel a populációval végeztük. Szignifikáns pozitív korrelációt figyeltünk meg az IL-21 termelő T_{FH} -szerű sejtek és a $CD19^+CD38^{hi}CD24^{hi}CD27^-$ tranzicionális B sejtek ($R=0,5857$; $p=0,0218$), illetve a $CD19^+CD38^+CD24^+$ érett-naiv B sejtek aránya között ($R=0,5536$; $p=0,0323$). Szintén szignifikáns pozitív korrelációt találtunk a T_{FH} -szerű sejtek és a tranzicionális B sejtek megoszlása között ($R=0,5964$; $p=0,0189$). Ezzel szemben, szignifikáns negatív korrelációt igazoltunk mind a $CD19^+IgD^+CD27^+$ "un-switched" memória B sejtek és T_{FH} -szerű sejtek ($R=-0,6553$; $p<0,0001$), mind a $CD19^+IgD^-CD27^+$ "switched" memória B sejtek és T_{FH} -szerű sejtek aránya között ($R=-0,5876$; $p<0,0001$). További immunparaméterek és a T_{FH} -szerű sejtek megoszlása között nem találtunk összefüggést.

IV.1.11. Korrelációs számítások a perifériás T_{FH} -szerű sejtek aránya és a vizsgált szerológiai paraméterek között primer Sjögren-szindrómában

Az elvégzett korrelációs analízis azt mutatta, hogy a T_{FH} -szerű sejtek arányának emelkedése szignifikáns mértékű pozitív kapcsolatot mutatott az anti-Ro/SSA ($R=0,5143$; $p=0,0243$) és anti-La/SSB ($R=0,6545$; $p=0,0336$) autoantitest szintek növekedésével. A kísérleteinkben részt vett teljes betegpopuláció adatainak kiértékelése során szignifikáns pozitív korrelációt tapasztaltunk a T_{FH} -szerű sejtek százalékos aránya és a szérumban mért IgG ($R=0,3674$; $p=0,0016$), illetve IK ($R=0,3830$; $p=0,0036$) szintek között. Egyaránt szoros összefüggést találtunk az IL-21 termelő T_{FH} -szerű sejtek magasabb aránya és a szérumban detektált IK szintek emelkedett értéke között ($R=0,5734$; $p=0,0128$). Továbbá pozitív korrelációt figyeltünk meg az IL-21⁺ T_{FH} -szerű sejtek megoszlása és a szérum RF titer értékek között is ($R=0,6219$; $p=0,0101$).

IV.2. Szövettani vizsgálatok eredményei primer Sjögren-szindrómában

IV.2.1. A tanulmányba bevont betegpopuláció szisztémás manifesztációinak kifejlődése a betegség kórlefolyása során

Retrospektív adatelemzésünk során összevetettük a pSS diagnózisának felállításakor és a vizsgálat időpontjában rögzített klinikai és laboratóriumi paramétereket. Megfigyeléseink szerint, a vizsgálat időpontjában mért T_{FH} -szerű sejtek százalékos aránya célzatosan

emelkedett a magasabb FS értékeket mutató betegek esetében. A klinikai adatok feldolgozása során azt tapasztaltuk, hogy a betegség kezdetén nem diagnosztizáltak extraglanduláris tüneteket egyik betegnél sem, ellenben a kórlefolyás idején kifejezetten a FS=3 csoportban szisztémás pSS kórforma fejlődött ki.

IV.2.2. A kisnyálmirigy biopsziás minták szövettani osztályozása a „focus score” és periduktális sejtes infiltrátum grádus alapján

A kisnyálmirigy biopsziás minták morfológiáját tanulmányozva a metszet teljes felületén meghatároztuk a FS értékeket, majd minden egyes gyulladásos limfocitás infiltrátum felépítésének osztályozásakor négy fokozatot különítettünk el. Eredményeink alapján, a FS=2 csoportba tartozó biopsziás mintákon csak az 1-, és 2-es grádusoknak megfelelő sejtes beszűrődéseket figyeltünk meg. A szervezettebb felépítésű limfocita aggregátumok, amelyek a 3-, és 4-es grádus elrendezéseket mutatták, csak a FS=3 csoportban tapasztaltunk. A 4-es grádusú gyulladásos infiltrátum morfológiája ektópiás GC-nak felelt meg.

IV.2.3. A gyulladásos infiltráció immunhisztokémiai jellemzése kisnyálmirigy biopsziás mintákon

A beszűrődött sejtek specifikus markereinek előfordulását és denzitását az aggregátumokban sorozatmetszetek IHK festésével vizsgáltuk. A FS=2 csoportba sorolt metszetek aggregátumaiban többnyire CD4, CD5 és CD20 markereket detektáltunk, míg a T_{FH}-sejtekre jellemző markerek, mint a CD84 és PD-1 expressziója alacsonyabbnak bizonyult. Az felsorolt markerek alapján azonosított sejtek az infiltrátumon belül elszórt elrendeződést mutattak. Ezzel szemben, a FS=3 csoportban a markerek eloszlása eltérő mintázatot ábrázolt, amely összefüggésben állt az aggregátumok szervezettebb morfológiájával. A CD4⁺ T sejtek meghatározóan a sejtes beszűrődések perifériáján lokalizálódtak, míg a CD20⁺ B sejteket dominánsan a gyulladásos fókusz centrális régiójában figyeltük meg. A CD138⁺ plazmasejtek esetében az infiltrátumon kívül, a FS=2 csoporthoz hasonlóan, elszórt mintázatot tapasztaltunk, de ebben a csoportban e sejteket a B sejtes régió határán is kimutattuk. A CD84 marker kifejeződését diffúznan találtuk, ugyanakkor denzitása az aggregátum központi területén akkumulálódott. A PD-1⁺ sejteket, kiváltképp a fejlettebb szerveződésű infiltrátumokban, a B sejtek szomszédságában sikerült azonosítanunk. A leglényegesebb eltérés a két csoport között a Bcl-6 expresszióban mutatkozott; a markert kizárólag a FS=3 csoportban tudtuk kimutatni, és nagyrészt a 4-es grádusú gyulladásos fókuszokban sikerült erőteljesen expresszáló és centrálisan csoportosuló Bcl-6⁺ sejteket detektálnunk.

IV.2.4. Kettős immunfluoreszcens vizsgálat a Bcl-6 marker és a T-, vagy B-sejt marker ko-expressziójának megerősítésére kisnyálmirigy biopsziás mintákon

Annak igazolására, hogy a $CD3^+Bcl-6^+$ T sejtek megtalálhatók a kisnyálmirigy biopsziás mintákban kialakuló ektópiás GC-ban, kettős IF jelölést kivitelezünk Bcl-6 és CD3 vagy CD20 markerekkel. Vizsgálatunkkal bebizonyítottuk, hogy az infiltrátumot alkotó T sejtek egy része pozitív Bcl-6 transzkripciós faktorra és a két marker ko-expressziójával T_{FH} sejtek jelenlétét mutattuk ki az aggregátumban. A Bcl-6 és CD20 markerek együttes kifejeződésével az infiltrátum centrális régiójában jellegzetes GC morfológiát igazoltunk.

V. MEGBESZÉLÉS

A pSS és SLE pathogenezeise az immunrendszer mindkét ágát érintő, komplex immunológiai folyamat. A jellegzetes laboratóriumi paraméterek diagnózisa mellett szisztémás autoimmun kórképekben a különböző érési fázisban lévő B sejt alpopulációk aránya is eltérést mutathat mind a perifériás vérben, mind a gyulladás helyszínén az egészséges személyekben tapasztalt megoszláshoz képest. Fiziológias körülmények között, az autoreaktivitás elkerülése végett, a B sejt fejlődés során a saját struktúrák túlnyomó többségével szemben tolerancia alakul ki, ezáltal az autoreaktív B sejtek jelentős része az ellenőrzési pontok egyikén eliminálódik. Az immunrendszer érése során a saját struktúrák túlnyomó többségével szemben tolerancia alakul ki, csak hogy az „ellenőrzési pontokon” fellépő regulációs zavarok – akár a T_{FH} sejtek túlzott aktivációja miatt, ezen állapot megszűnését és genetikailag fogékony egyéneknél autoimmun betegségek kialakulását eredményezhetik. A B sejt alcsoportok megoszlása lényeges különbségeket mutat pSS-ás és SLE-s betegek perifériás vérében a kontroll adatokhoz viszonyítva. Eredményeink azt mutatták, hogy a $CD19^+IgD^+CD27^-$ naiv B sejtek aránya mindkét betegségben emelkedett az egészséges személyekben mért értékekhez képest. Következtetéseink szerint, a centrális és korai perifériás tolerancia károsodása során az autoreaktív/polireaktív B sejtek eliminálása csökken, ezáltal több sejt vándorol ki a csontvelőből és akkumulálódik a periférián. Perifériás vérben a B sejt fejlődés korai stádiumának résztvevői a tranzicionális B sejtek is, melyeknek általában csak kis hányada található a vérben miközben a másodlagos nyirokszövetek irányába migrálnak. Korábban tapasztaltakhoz hasonlóan, munkacsoportunk is emelkedett $CD19^+CD38^{hi}CD24^{hi}CD27^-$ tranzicionális B sejtarányt igazolt SLE-ben, amely szoros összefüggést mutatott a betegség aktivitásával. Ellentétben a lupuszos betegnél megfigyelt eredményekkel, pSS-ban a tranzicionális sejtek megoszlása nem mutatott eltérést a kontroll donorok adataihoz képest

abban az esetben, ha a betegpopuláció felosztását a klinikai tünetek alapján végeztük. Azonban, ha a csoportosítást az anti-SSA/Ro autoantitest jelenléte alapján hajtottuk végre, akkor magasabb sejtarányt figyeltünk meg az autoantitest pozitív alpopulációban. Továbbá, a sejtek megoszlása és a szérumban mért IgG szintje közötti pozitív korreláció pSS-ban felveti a sejtpopuláció kórosan megemelkedett arányának jelentőségét a B sejt fejlődés következő szakaszaira nézve. A nemzetközi tapasztalatok arra utalnak, hogy az éretlen B sejtek patológiás felhalmozódása a periférián a csontvelői szelekció károsodását vagy a másodlagos nyirokszövetekbe történő gátolt belépést jelezheti. A korai perifériás tolerancia defektusa szintén a fiziológiás állapottól eltérő, magasabb autoreaktív érett-naiv sejtarányt eredményezhet. Munkánk során, SLE-ben emelkedett $CD19^+CD38^+CD24^+$ érett-naiv B sejt megoszlást észleltünk, amely markánsabb különbséget mutatott az aktív stádiumban lévő betegeknél az egészséges donorokkal szemben. Ezt követően a poszt-GC reakciót követő eseményeket vizsgáltuk és azt tapasztaltuk, hogy mind a $CD19^+IgD^+CD27^+$ „un-switched”, mind a $CD19^+IgD^-CD27^+$ „switched” memória B sejtek százalékos aránya mindkét betegségben jelentősen csökkent a kontroll értékekhez képest. Emellett, a két memória B sejttípus megoszlása között is eltérést fedeztünk fel a vizsgált kórképekben; pSS-ban a „switched” memória B sejtek, míg SLE-ben az „un-switched” memória B sejtek arányában találtunk szignifikáns különbséget. Érdekes módon a szisztémás tünetektől szenvedő pSS-ás betegek, illetve a magasabb SLEDAI értékkel rendelkező SLE-s betegek adatai esetében határozottabb csökkenést figyeltünk meg. A keringő memória B sejt alcsoportok redukált aránya a CD95, CD80, CD86, CXCR3 és CXCR4 molekulák túlzott expressziójával magyarázható. Kemotaxis vizsgálatok derítették fényt arra, hogy a CXCR3 és CXCR4 kemokin receptorok kifejeződése növeli a memória B sejtek migrációs képességét megfelelő ligandumaik felé, amelyek a limfoid szövetek mellett a gyulladás területén is expresszálódnak. Továbbá, az aktivációs markerként szolgáló CD95 és kostimulatórikus molekulák (CD80, CD86) emelkedett expressziója a memória B sejtek aktivált állapotára és a következetes hatékony T sejt interakcióra, illetve nagymértékű plazmasejt irányú differenciációra utalhat. A $CD19^+IgD^-CD27^-$ kettős-negatív B sejtek arányát is tanulmányoztuk a betegek perifériás vérében. A sejtek megoszlása ellentétes képet mutatott a két betegségben, míg SLE-ben a kettős-negatív B sejtek expanszióját, addig pSS-ban a sejtek százalékos arányának visszaesését észleltük. Az egészséges donorok értékéhez viszonyítva a sejtarány változás csak pSS-ban mutatott összefüggést a szisztémás manifesztációk jelenlétével, az SLE-s betegeknél nem találtunk kapcsolatot a betegség aktivitásával. A sejtek aktivált állapotban vannak, azonban a CXCR3 receptor kizárólagos expressziója és a többi

kemokin hiánya végett feltételezik, hogy jelenlétük abnormalis extrafollikuláris differenciáció eredménye és további fejlődésük T sejtektől függetlenül megy végbe. Végül, de nem utolsó sorban elemeztük a $CD19^+CD38^{hi}CD27^{hi}$ plazmablasztok megoszlását. Eredményeink szerint a plazmablasztok százalékos aránya határozott csökkenést mutatott pSS-ban, különösen a szisztémás tünetekben szenvedő betegekben, és emelkedett az aktív szakaszban lévő SLE-s betegekben. Az ellentétes sejtarány háttérét indokolhatja az, hogy pSS-ban a plazmablasztok a memória B sejtekhez hasonlóan magas szinten fejezik ki felszínükön a CXCR3 és CXCR4 kemokineket, amelyek hozzájárulnak a sejtek fokozott migrációjához nemcsak a csontvelőbe, hanem a gyulladásos szövetekbe is. Ezzel szemben SLE-ben a plazmasejtekkel kapcsolatban károsodott „homing” folyamatot írtak le, amely indokolja a magasabb sejtarányok kialakulását. A plazmasejtté érés folyamatának jelentőségét emeli ki az a megfigyelésünk is, miszerint a plazmablasztok megoszlása pozitívan korrelált pSS-ban a szérumban mért IK titerrel, SLE-ben pedig az anti-dsDNS autoantitest szintekkel. B sejtes vizsgálataink utolsó lépéseként analizáltuk az IL-10 termelő B sejtek (B10 és B10_{PRO}) arányát CpG-ODN aktiváció hatására. Eredendően, a Breg sejtek fontos szerepet játszanak az immunrendszer homeosztázisának fenntartásában. Heterogén sejtpopulációt alkotnak, de rendszerint IL-10 termelő képességük alapján azonosíthatók. Tanulmányunkban, hasonlóan a nemzetközi munkacsoportokhoz, CpG-ODN kezelés hatására az IL-10⁺ B sejtek expanszióját észleltük, de a betegek értékei alacsonyabbak maradtak az egészséges személyek adatainál és esetünkben a sejtek legfőképp a $CD19^+CD38^+CD24^+$ B sejtpopulációban halmozódtak fel. A beteg és kontroll eredmények közötti különbségeket csak a $CD19^+CD38^{hi}CD24^{hi}$ és $CD19^+CD24^{hi}CD27^+$ B sejteknél fedeztünk fel, az előbbi csoportban emelkedett, míg az utóbbiban csökkent az IL-10 termelő B sejtek aránya a betegekben. A nyirokszövetek másodlagos follikulusaiban tartózkodó T_{FH} sejteknek kiemelt szerepe van a T sejtektől függő B sejt válaszok kialakulásában és irányításában. Mivel a GC T_{FH} sejtek vizsgálata a nyiroktüszőkben humán mintákon nehezen kivitelezhető, ezért e sejtekkel folytatott kísérletek javarészt a perifériás vérben keringő T_{FH}-szerű sejtekre korlátozódnak. Tanulmányunk során, a $CD4^+CXCR5^+ICOS^+PD-1^+$ T_{FH}-szerű sejtek emelkedett százalékos arányát figyeltük meg pSS-ban. Érdekes módon, csak az extraglanduláris manifesztációkban szenvedő betegek értékei mutattak szignifikáns eltérést, míg a glanduláris formákban megfigyelt adatok az egészséges személyekéhez hasonlítottak. Ha a betegeket az autotantitest jelenléte alapján osztályoztuk, akkor az anti-SSA/Ro és anti-SSB/La pozitív csoportban magasabb sejtarányt tapasztaltunk. Hasonló eredményeket kaptunk SLE-ben is, miszerint az anti-dsDNS jelenlétével szoros összefüggésben emelkedett T_{FH}-szerű sejtarányokat vizsgáltuk, azonban

nem találtunk szignifikáns eltérést a betegség inaktív és aktív stádiumai között. A T_{FH} differenciáció egyik kardinális citokinje az IL-21, amely autokrin módon fokozza a T_{FH} sejtek osztódását és túlélését. A citokin legfontosabb szerepe viszont az, hogy szolubilis kostimulátorként segíti a GC B sejtek proliferációját és plazmasejt irányba történő differenciációját. A szolubilis IL-21 szintje és a magasabb T_{FH} -szerű sejtarány között pozitív összefüggést találtunk pSS-ban, valamint eredményünk korrelált az extraglanduláris panaszok jelenlétével. Egy független pSS-ás betegcsoportban elemeztük az IL-21R kifejeződését a $CD19^+$ B sejteken és igazoltuk, hogy a B sejteken fokozódik az IL-21 expresszió mértéke, amely ráadásul korrelál az EGM-k jelenlétével is. Továbbá azt tapasztaltuk, hogy mind pSS-ban, mind SLE-ben megnövekedett az IL-21 termelő T_{FH} -szerű sejtek aránya. Az emelkedés pSS-ban kizárólag a szisztémás tüneteket és autoantitest pozitivitást mutató betegpopulációkban tapasztaltuk, míg SLE-ben a teljes betegcsoportban magasabb volt az IL-21⁺ T_{FH} -szerű sejtek megoszlása, amellett, hogy ez a tendencia markánsabbnak bizonyult az aktív stádiumú és anti-dsDNS pozitív betegeknél. Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a T_{FH} sejtek differenciálódása egy integrált modellel írható le, amely a sejtek aktivációjából, az aktivált állapot fenntartásából és egy teljesen polarizált stádiumból áll. Feltételezzük, hogy a T_{FH} sejtek kezdeti differenciációjához szükséges IL-12 citokin forrásaként a másodlagos nyirokszövetekbe vándorló aktivált DC-k szolgálnak. Ennek ismeretében megvizsgáltuk a pSS-ás betegek szérumának IL-12 citokin szintjét és azt tapasztaltuk, hogy azoknál a betegeknél, akiknél az IL-12 szintje detektálható mennyiségben volt jelen, a T_{FH} -szerű sejtek aránya is magasabbnak bizonyult. Munkánk során a T_{FH} -szerű sejtek mellett széleskörűen vizsgáltuk az immunkompetens sejtek és laboratóriumi paraméterek változását is, ezáltal a nemzetközi irodalomban elsőként komplex képet kialakítva e sejtek szerepéről pSS-ban. A pSS-ás betegek T_{FH} -szerű sejtek és a korai-, illetve késői-aktivált T sejtek aránya között pozitív összefüggést találtunk, mely rámutat az immunrendszer krónikusan aktív állapotára. A T_{FH} -szerű sejtek és Tr1 sejtek megoszlása között szintén pozitív korrelációt figyeltünk meg. Utóbbi sejttípus arányának növekedése egy fokozott ellenregulációs reakció részét képezheti, mely által a szervezet a betegségre jellemző abnormális immunreaktivitás visszaszorítására törekszik. B sejtes megfigyeléseinket párhuzamba állítva a T_{FH} -szerű sejtes eredményeinkkel, elmondhatjuk, hogy a tranzicionális B sejtekkel és érett-naiv B sejtekkel mutatott pozitív korrelációból a korai és késői perifériás tolerancia defektusára következtethetünk. A T_{FH} -szerű sejtek és az „un-switched”, illetve „switched” memória B sejtek közötti negatív korreláció is alátámasztja hipotézisünket, miszerint a periférián található memória B sejtek csökkenése a fokozott plazmasejt irányú differenciációval vagy a sejtek gyulladásos

szövetekbe történő nagymértékű migrációs készségével értelmezhető. Azért, hogy tisztább képet kaphassunk a T_{FH} -szerű sejtek pSS pathogenezisében betöltött szerepéről, vizsgáltuk a sejtek és szerológiai paraméterek közötti lehetséges kapcsolatot is. Pozitív korrelációt találtunk a T_{FH} -szerű sejtek aránya és a szérumban mért anti-SSA/Ro, illetve anti-SSB/La szintek között, továbbá a sejtarány emelkedése korrelált az IgG és IK megnövekedett titerével is. Kutatásunk végső szakaszában arra kerestük a választ, hogy pSS-ban a perifériás vérben megfigyelt elváltozások vajon összefüggésben állhatnak-e a gyulladás területén észlelt patológiás folyamatokkal. Tudjuk, hogy a betegség diagnosztikájában rutinszerűen használt kisnyálmirigy biopsziás minták szöveti feldolgozása ideális lehetőséget jelent az ektópiás GC-ok analizálására, ezért a szövetet infiltráló sejtek összetételének vizsgálatakor különös figyelmet fordítottunk a T_{FH} sejtek jelenlétére. A szakirodalomban elsőként, vizsgáltuk a kisnyálmirigy szövetben észlelhető limfocita infiltrátum különböző morfológiai szakaszait és ezek kapcsolatát a betegség kórlefolyása során megjelenő lehetséges szisztémás tünetekkel. Eredményeink szerint, a kisnyálmirigy biopsziás minták rendszerint több különböző grádusú limfocita aggregátumot tartalmaztak és a legfejlettebb morfológiájú periduktális sejtes beszűrődést jellemzően a magasabb FS értékű, nevezetesen a FS=3 csoportban figyeltük meg. A perifériás területen ektópiás GC struktúrákat kizárólag a FS=3 csoportban, 4-es grádusú infiltrátumok esetében találtunk. A T_{FH} markerek, mint a CD84, PD-1 és Bcl-6 expressziója markánsabbnak bizonyult a FS=3 csoportban, de a legszembetűnőbb eltérést a Bcl-6 esetében tapasztaltuk, melynek expressziója csak a 4-es grádusú limfoid aggregátumokra korlátozódott és ko-lokalizációt mutatott a B sejt zónával. Köztudott, hogy a Bcl-6 molekula különösen a GC B sejtek gyors osztódásakor, a sötét zónát alkotó centroblasztokban expresszálódik, de részben a világos zónában található centrociták is kifejezik. Irodalmi adatok alapján, a *BCL6* gén defektusa SHM és izotípusváltás hiányával járó, károsodott GC folyamatokhoz vezet, így kiemelve a Bcl-6 jelentőségét a csíráközpontozáshoz kötött immunválaszokban. Továbbá, kettős immunfluoreszcens festéssel sikerült kimutatnunk, hogy a $CD20^+Bcl-6^+$ B sejtes régió perifériáján található $CD3^+$ T limfocita közül néhány expresszálja a Bcl-6 molekulát is, ezzel alátámasztva azon elképzelésünket, hogy a T_{FH} sejtek megtalálhatók az ektópiás GC B sejtes zónájának közelében. Fontos megjegyezni, hogy vizsgálatainkat olyan kisnyálmirigy biopsziás mintákon végeztük, amelyeket még a diagnózis felállításakor, csak kezdeti glanduláris tüneteket mutató betegektől vettünk. A klinikai és laboratóriumi paraméterek retrospektív áttekintését követően pozitív összefüggést találtunk a diagnózis idejében gyűjtött mintákban megjelenő ektópiás GC-ok, a T_{FH} sejtek jelenléte és a kórlefolyás alatt jelentkező extraglanduláris manifesztációk kifejlődése között. Összefoglalásként elmondható, hogy

kísérleteink során sikerült rávilágítanunk a T_{FH} sejtek autoimmun folyamatokban betöltött patológiás szerepére, amely hozzájárul mind a pSS, mind az SLE pathomechanizmusára jellemző abnormális B sejt válaszok és a jellegzetes diagnosztikai paraméterek kialakulásához. A T_{FH} sejtek immunbiológiájának megértése napjaink kutatásának fókuszában áll, de reményeink szerint a fejlődésükkel és funkciójukkal kapcsolatos további vizsgálatok értékes információkat nyújthatnak, hogy a jövőben potenciális terápiás célpontként szolgáljanak az autoimmun kórképek gyógyításában.

VI. ÖSSZEFOGLALÁS

A pSS és SLE pathogenezeise komplex, az immunrendszer mindkét ágát, a veleszületett és adaptív immunitást érintő folyamat. Az autoimmun betegségek kulcsfontosságú jellegzetessége a B sejtek hiperaktivitása. A másodlagos limfoid follikulusokban található T_{FH} sejtek kritikus szerepet töltenek be az immunfolyamatok szabályozásában azáltal, hogy koordinálják a B sejtek memória és plazmasejt irányú differenciálódását. Mivel az abnormális humorális immunválasz mindkét betegség kulcskérdése, így munkánk célja a perifériás T_{FH} sejtek és B sejtek közötti patológiás kapcsolat feltérképezése volt. Mindkét betegségben magas naiv B sejtarányt, míg alacsony „un-switched” és „switched” memória B sejtarányt figyeltünk meg. A kettős-negatív B sejtek, illetve a plazmablasztok aránya SLE-ben emelkedett és pSS-ban csökkent. A tranzicionális B sejtek és érett-naiv B sejtek aránya magasabb volt SLE-ben. A súlyosabb tüneteket mutató betegeknél magasabb volt a T_{FH} -szerű sejtek és az IL-21 termelés aránya. Továbbá, a T_{FH} -szerű sejtek arányának növekedése pozitívan korrelált az antitesttermeléshez kapcsolódó paraméterekkel, úgymint szérum IgG, IK-ek és autoantitestek. Megfigyeléseink szerint az intenzív keringő T_{FH} -szerű sejtarány emelkedés és emelkedett IL-21 szekréció, továbbá ezzel kapcsolatos abnormális perifériás B sejt megoszlás, mind pSS-ban és SLE-ben a T_{FH} sejtek kulcsfontosságú szerepét emeli ki a B sejt szelekció szabályozásában. A továbbiakban vizsgáltuk a limfocitás infiltrátum összetételét pSS-ás betegek kisnyálmirigy biopsziáiban, különös figyelmet fordítva a B és T_{FH} sejtekre. A T_{FH} markerek túlnyomóan a magasabb FS értékkel rendelkező, szervezettebb morfológiájú infiltrátumokban voltak detektálhatók. Érdekességgépp, a betegek klinikai adatainak retrospektív értékelésekor összefüggést találtunk a T_{FH} sejtek jelenléte és a betegség súlyossága között. Eredményeink szerint a T_{FH} sejtek fontos szerepet játszanak az autoreaktív B-sejt képződésben az infiltrátumokban és hozzájárulhatnak a későbbi szisztémás tünetek kialakulásában.

VII. KAPCSOLÓDÓ ELŐADÁSOK, ILLETVE POSZTEREK

- **Szabó Krisztina**

DE OEC, ÁOK, Belgyógyászati Intézet, Klinikai Immunológiai Tanszék

A follikuláris T helper sejtek pathológiás szerepe az immun-diszregulációban a Sjögren-szindróma különböző fenotípusai esetén. (KIADI III. PhD Konferencia, 2011. 11. 25.)

- **Szabó Krisztina, Papp Gábor, Baráth Sándor, Szántó Antónia, Zeher Margit**

DE OEC, ÁOK, Belgyógyászati Intézet, Klinikai Immunológiai Tanszék

A follikuláris T helper sejtek pathológiás szerepe az immun-diszregulációban a Sjögren-szindróma különböző fenotípusai esetén. (MAKIT 40., 2012. május 17-19. Balatonalmádi, Immunológia-Allergológia Szekció) – *Legjobb előadás díja*

- **Szabó Krisztina**

DE OEC, ÁOK, Belgyógyászati Intézet, Klinikai Immunológiai Tanszék

A periférián található follikuláris T helper sejtek patológiás szerepe primer Sjögren-szindrómában. (KIADI IV. PhD Konferencia, 2012. 09. 28.)

- **Szabó Krisztina, Papp Gábor, Baráth Sándor, Gyimesi Edit, Szántó Antónia, Zeher Margit**

DE OEC, ÁOK, Belgyógyászati Intézet, Klinikai Immunológiai Tanszék

A periférián található follikuláris T helper sejtek patológiás szerepe primer Sjögren-szindróma különböző fenotípusai esetén. (MIT 41., 2012. október 17-19. Debrecen, Kölcsey Központ, IV. szekció)

- **Krisztina Szabó, Gábor Papp, Margit Zeher**

Division of Clinical Immunology, Institute of Medicine, University of Debrecen

Increased proportions of peripheral follicular helper T cells in patients with primary Sjögren's syndrome. (EMESCO 2012. Oral Session V - Immunology, Microbiology)

- **Krisztina Szabo, Gabor Papp, Sandor Barath, Edit Gyimesi, Antonia Szanto, Margit Zeher**

Division of Clinical Immunology, Institute of Medicine, University of Debrecen

Investigation of peripheral follicular helper T cells in primary Sjögren's syndrome. (WISC 2012. Hyderabad, India, 6-9 December, Poster Session 3-3: Basic and Clinical Immunology 2, 3036)

- **Krisztina Szabo, Gabor Papp, Sandor Barath, Edit Gyimesi, Antonia Szanto, Margit Zeher**

Division of Clinical Immunology, Institute of Medicine, University of Debrecen

Peripheral follicular helper T cells correlate with B cell activation and autoantibody production in primary Sjögren's syndrome. (CORA 2013, Budapest, Hungary, 4-6 April, Poster Session/Walk 1: Tissue issues, P91, Thursday, April 4, 2013)

- **Szabó Krisztina, Papp Gábor, Szegedi Andrea, Zeher Margit**

DE OEC, ÁOK, Belgyógyászati Intézet, Klinikai Immunológiai Tanszék

A follikuláris helper T sejtek kiemelt szerepet játszhatnak bizonyos autoimmun és allergiás betegségek pathogenezisében. (MAKIT 41., 2013. május 9-11. Balatonalmádi, Immunológia Szekció)

- **Krisztina Szabo, Gabor Papp, Sandor Barath, Margit Zeher**
Division of Clinical Immunology, Institute of Medicine, MHSC, University of Debrecen
Follicular helper T cells may play an essential role in the severity of certain autoimmune disorders. (8th ENII, Porto Conte, Sardinia, Italy, 27 May-3 June, 2013, Poster Session D: P7, Friday, May 31, 2013)
- **Szabó Krisztina**
DE OEC, ÁOK, Belgyógyászati Intézet, Klinikai Immunológiai Tanszék
A follikuláris T helper sejtek pathológiás szerepe az immun-diszregulációban a Sjögren-szindróma különböző fenotípusai esetén. (TAIM Nemzetközi Alapítvány XI. Szakmai Továbbképzése, 2013. augusztus. 23-24. Debrecen) - *Pályadíjasok előadása, I. helyezés.*
- **Szabó Krisztina**
DE OEC, ÁOK, Belgyógyászati Intézet, Klinikai Immunológiai Tanszék
A follikuláris T helper sejtek pathológiás szerepének immunhisztokémiai vizsgálata primer Sjögren-szindrómás betegek kisnyálmirigy biopsziás mintáiban. (KIADI V. PhD Konferencia, 2013. október 4. Debrecen)
- **Szabó Krisztina, Papp Gábor, Szántó Antónia, Tarr Tünde, Zeher Margit**
DE ÁOK, Klinikai Immunológiai Tanszék
Follikuláris T helper sejtek és IL-10 termelő regulatív B sejtek vizsgálata primer Sjögren-szindrómában és szisztémás lupus erythematosusban. (MAKIT 43., 2015. május 7-9. Kecskemét, Poszter szekció II.)
- **K. Szabó¹, G. Papp¹, S. Baráth¹, E. Gyimesi¹, B. Dezső², A. Szántó¹, M. Zeher¹**
¹Division of Clinical Immunology, Faculty of Medicine, University of Debrecen
²Department of Pathology, Faculty of Medicine, University of Debrecen
The role of follicular T helper cells in altered B cell functions in primary Sjögren's syndrome. (ISSS 2015, Norway, Bergen, 19-22 May, 2015, Poster Session S7:12)
- **Szabó Krisztina, Papp Gábor, Tarr Tünde, Szántó Antónia, Zeher Margit**
DE ÁOK, Klinikai Immunológiai Tanszék
Cirkuláló follikuláris T helper sejtek és B sejt alcsoportok vizsgálata autoimmun kórképekben. (TAIM Nemzetközi Alapítvány XII. Szakmai Továbbképzése, 2015. augusztus 27-28. Debrecen)
- **Szabó Krisztina, Papp Gábor, Szántó Antónia, Tarr Tünde, Zeher Margit**
DE ÁOK, Klinikai Immunológiai Tanszék
A follikuláris T helper sejtek és B sejt alcsoportok megoszlásának átfogó vizsgálata primer Sjögren-szindrómában és szisztémás lupus erythematosusban. (MRE 2015, 2015. szeptember 24-27. Szeged, „legjobb előadások díja” jelöltjeinek előadásai)

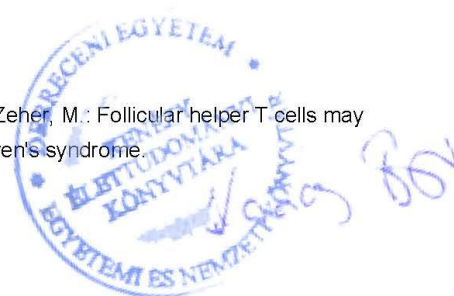


Nyilvántartási szám: DEENK/15/2016.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Szabó Krisztina
Neptun kód: GJX1AG
Doktori Iskola: Petrányi Gyula Klinikai Immunbiológiai és Allergológiai Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10043545

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Papp, G., Gyimesi, E., **Szabó, K.**, Zöld, É., Zeher, M.: Increased IL-21 Expression Induces Granzyme B in Peripheral CD5+ B Cells as a Potential Counter-Regulatory Effect in Primary Sjögren's Syndrome.
Mediat. Inflamm. 2016, 1-8, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/4328372>
IF:3.236 (2014)
2. **Szabó, K.**, Papp, G., Szántó, A., Tarr, T., Zeher, M.: A comprehensive investigation on the distribution of circulating follicular T helper cells and B cell subsets in primary Sjögren's syndrome and systemic lupus erythematosus.
Clin. Exp. Immunol. Epub, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/cei.12703>
IF:3.037 (2014)
3. **Szabó, K.**, Papp, G., Dezső, B., Zeher, M.: The histopathology of labial salivary glands in primary Sjögren's syndrome: Focusing on follicular helper T cells in the inflammatory infiltrates.
Mediat. Inflamm. 2014, 11 p., 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/631787>
IF:3.236
4. **Szabó, K.**, Papp, G., Baráth, S., Gyimesi, E., Szántó, A., Zeher, M.: Follicular helper T cells may play an important role in the severity of primary Sjögren's syndrome.
Clin. Immunol. 147 (2), 95-104, 2013.
IF:3.992



További közlemények

Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. □ Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 39. □ Tel.: (52) 410-443
E-mail: publikaciok@lib.unideb.hu □ Honlap: www.lib.unideb.hu



5. Csillag, A., Kumar, B.V., **Szabó, K.**, Szilasi, M., Papp, Z., Szilasi, M.E., Pázmándi, K., Boldogh, I., Rajnavölgyi, É., Bácsi, A., László, F.J.: Exposure to inhomogeneous static magnetic field beneficially affects allergic inflammation in a murine model.
J. R. Soc. Interface. 11 (95), 20140097-20140097, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1098/rsif.2014.0097>
IF:3.917
6. **Szabó K.**, Zeher M.: A follicularis T-helper-sejtek jellegzetességei és lehetséges szerepük az autoimmun és immunhiányos kórképekben.
Immunol. Szle. 5 (3), 48-55, 2013.
7. Pázmándi, K., Kumar, B.V., **Szabó, K.**, Boldogh, I., Szöör, Á., Vereb, G., Veres, Á., Lányi, Á., Rajnavölgyi, É., Bácsi, A.: Ragweed subpollen particles of respirable size activate human dendritic cells.
PLoS One. 7 (12), e52085, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0052085>
IF:3.73

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 21,148

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
13,501**

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, 2016.01.21.



VIII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném hálás köszönetemet kifejezni témavezetőmnek, Dr. Zeher Margit professzornőnek, aki kiemelkedő szakmai tudásával az elmúlt évek során segítette munkámat, akihez bármikor fordulhattam segítségért és nélkülözhetetlen támogatást nyújtott eredményeim eléréséhez. Köszönöm folyamatos figyelmét, türelmét és útmutatását, amely biztosította szakmai fejlődésem előremozdítását.

Köszönöm Dr. Sipka Sándor professzor úrnak a szakmai tanácsait, biztatását és a szellemi „útravalókat”, melyekkel laboratóriumi munkámat támogatta. Szeretném köszönetemet kifejezni közeli munkatársamnak, Dr. Papp Gábornak, aki pályám kezdetén szárnyai alá vett és mindig feltétel nélkül segítette munkámat. Külön köszönöm Gábor humorát és optimizmusát, amely nagymértékben hozzájárult kutatómunkám sikerességéhez. Köszönöm cikkeim társszerzőinek, hogy támogatásukkal hozzájárultak értekezésem elkészüléséhez.

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Dr. Dezső Balázsnak, aki lehetővé tette számomra, hogy az értekezéshez tartozó kísérleteim egy részét a Pathológiai Intézetben végezhessem, és aki szakmai tanácsaival segítette munkámat. Köszönöm Besenyei Mária asszisztensnőnek a szövettani vizsgálatokban nyújtott lelkes segítségét.

Köszönettel tartozom a volt Regionális Immunológiai Laboratórium dolgozóinak, különösen Dr. Baráth Sándornak, aki időt és fáradságot nem kímélve egyengette laboratóriumi tevékenységemet, akihez bármikor fordulhattam kérdéseimmal és hasznos tanácsaival segítette kísérleteim megtervezését. Külön köszönöm Dr. Gyimesi Editnek, hogy önzetlenül támogatta szakmai fejlődésemet. Hálával tartozom az immunlabor további dolgozóinak, hogy barátságos légkört teremtettek és köszönöm segítségüket, melyet a laboratóriumban töltött évek során nyújtottak.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni családomnak és páromnak, illetve barátaimnak, akik szeretete, türelme és biztatása erőt adott és hozzájárult céljaim megvalósításához.