

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**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.

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
I. BEVEZETÉS	6
II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	7
II.1. Az autoimmun kórképek általános jellemzői	7
II.1.1. Sjögren-szindróma epidemiológiája és klinikai tünetei	8
II.1.2. Sjögren-szindróma etiológiája és pathomechanizmusa	10
II.1.2.1. Etiológia – genetikai, epigenetikai, környezeti és hormonális tényezők	10
II.1.2.2. Pathomechanizmus - veleszületett és adaptív immunitás	13
II.1.3. Szisztémás lupus erythematosus epidemiológiája és klinikuma	17
II.1.4. Szisztémás lupus erythematosus etiológiája és pathomechanizmusa	17
II.2. A follikuláris T helper sejtek eredete és szerepe az adaptív immunválaszban	19
II.3. A vérben keringő follikuláris T helper sejtek	24
II.4. A B sejtek fejlődése és funkciói	26
II.5. Célkitűzések	29
III. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK	30
III.1. Betegek és egészséges kontroll személyek	30
III.1.1. Etikai nyilatkozat	30
III.1.2. Primer Sjögren-szindróma perifériás paramétereinek vizsgálatába bevont betegek	30
III.1.3. Primer Sjögren-szindróma szövettani vizsgálatába bevont betegek	32
III.1.4. Szisztémás lupus erythematosus vizsgálatába bevont betegek	32
III.2. Laboratóriumi vizsgálati módszerek	34
III.2.1. Limfocita alcsoportok meghatározása teljes vérből áramlási citométerrel	34
III.2.2. B limfocita alcsoportok meghatározása áramlási citométerrel	37
III.2.3. Keringő T_{FH}-szerű sejtek meghatározása áramlási citométerrel	38
III.2.4. IL-21R expressziójának vizsgálata primer Sjögren-szindrómás betegek B sejtein	39
III.2.5. Intracelluláris citokin meghatározás áramlási citométerrel	40
III.2.6. Szolúbilis citokinek meghatározása ELISA módszerrel	41
III.2.7. Szerológiai paraméterek meghatározása	41
III.2.8. Kisnyálmirigy biopsza és hagyományos szövettani vizsgálat	42
III.2.9. Immunhisztokémiai vizsgálatok	42
III.2.10. A periduktális sejtes infiltrátum osztályozása immunhisztokémiai módszerrel	44
III.2.11. Kettős immunfluoreszcens festés	45
III.3. Statisztikai módszerek	45

IV. EREDMÉNYEK	47
III.1. Perifériás vizsgálatok eredményei	47
III.1.1. Keringő T _{FH} -szerű sejtek vizsgálata primer Sjögren-szindrómában teljes vérből származó mintákon	47
III.1.2. Szolúbilis citokinek vizsgálata primer Sjögren-szindrómás betegek szérum mintáiban	48
III.1.3. Perifériás T _{FH} -szerű sejtek vizsgálata PBMC-ből származó mintákon primer Sjögren-szindrómában és szisztémás lupus erythematosusban	51
III.1.4. Keringő T _{FH} -szerű sejtek citokin termelésének vizsgálata PBMC-ből származó mintákon primer Sjögren-szindrómában és szisztémás lupus erythematosusban	52
III.1.5. Perifériás T _{FH} -szerű sejtek fenotípusos vizsgálata	54
III.1.6. Perifériás B sejt alcsoportok megoszlásának vizsgálata PBMC-ből származó mintákon primer Sjögren-szindrómában és szisztémás lupus erythematosusban	54
III.1.7. A B sejtek IL-21R expressziójának vizsgálata primer Sjögren-szindrómában	60
III.1.8. IL-10 termelő B sejtek vizsgálata primer Sjögren-szindrómában és szisztémás lupus erythematosusban	60
III.1.9. A keringő T _{FH} -szerű sejtek és T limfocita alcsoportok megoszlása közötti összefüggések vizsgálata primer Sjögren-szindrómában	62
III.1.10. A keringő T _{FH} -szerű sejtek és B limfocita alcsoportok aránya közötti kapcsolatok vizsgálata extraglanduláris tüneteket mutató primer Sjögren-szindrómás betegekben	63
III.1.11. Korrelációs számítások a perifériás T _{FH} -szerű sejtek aránya és a vizsgált szerológiai paraméterek között primer Sjögren-szindrómában	65
III.1.12. Korrelációs számítások a perifériás B sejt alcsoportok aránya és a vizsgált szerológiai paraméterek között	66
III.2. Szövettani vizsgálatok eredményei primer Sjögren-szindrómában	66
III.2.1. A tanulmányba bevont betegpopuláció szisztémás manifesztációinak kifejlődése a betegség kórlefolyása során	66
III.2.2. A kisnyálmirigy biopsziás minták szövettani osztályozása a „focus score” és periduktális sejtes infiltrátum grádus alapján	67
III.2.3. A gyulladásos infiltráció immunhisztokémiai jellemzése kisnyálmirigy biopsziás mintákon	68
III.2.4. Kettős immunfluoreszcens vizsgálat a Bcl-6 marker és a T-, vagy B-sejt marker ko-expressziójának megerősítésére kisnyálmirigy biopsziás mintákon	71
V. MEGBESZÉLÉS	73
VI. ÖSSZEFOGLALÁS / SUMMARY	86
VII. IRODALOMJEGYZÉK	88
III.1. Hivatkozott közlemények jegyzéke	88
III.2. A Kenézy Élettudományi Könyvtár által ellenőrzött közlemények jegyzéke	104
VIII. TÁRGYSZAVAK	106
IX. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	107
X. FÜGGELÉK	108

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

Rövidítés	Angol	Magyar
ACR	American College of Rheumatology	Amerikai Reumatológiai Kollégium
AECC	American-European Consensus Criteria	Amerikai-Európai Konszenzus Kritériumrendszer
AID	activation induced cytidine deaminase	aktiváció indukált-citidin deamináz
APC	antigen presenting cell	antigén prezentáló sejt
APC	allophycocyanin	
BAFF	B cell activating factor	B-sejt aktiváló faktor
BATF	basic leucine zipper ATF-like	alapvető leucin-cipzár transzkripció faktor
Bcl	B-cell lymphoma	B-sejt limfóma
BCR	B cell receptor	B-sejt receptor
Blimp-1	B lymphocyte-induced maturation protein-1	B-limfocita indukált érési fehérje 1
BLK	B lymphoid tyrosine kinase	B-limfoid tirozin kináz
Breg	regulatory B	regulatórikus B
CXCR	C-X-C chemokine receptor	C-X-C kemokin receptor
DAMP	Danger Associated Molecular Pattern	veszély asszociált molekuláris mintázat
DC	dendritic cell	dendritikus sejt
ds	double strand	duplaszálú
EBF	early B cell factor	korai B-sejt faktor
EBV	Epstein-Barr virus	Epstein-Barr vírus
EGM	extraglandular manifestation	extraglanduláris manifesztáció
FcR	Fc receptor	Fc receptor
FDC	follicular dendritic cell	follikuláris dendritikus sejt
FFPE	formalin-fixed, paraffin-embedded	formalinban fixált, paraffinba ágyazott
FITC	fluorescein isothiocyanate	
FMO	fluorescence minus one	fluoreszcencia mínusz egy
FO	follicular B	follikuláris B
FoxP3	forkhead box P3	
FS	focus score	
FSC	forward scatter	előre irányuló fényszórás
GC	germinal center	germinális centrum
Gl	glandular	glanduláris
GWAS	genome-wide association study	teljes genom asszociációs vizsgálat
HE	hematoxylin–eosin	hematoxilin-eozin
HLA	human leukocyte antigen	humán leukocita antigén
ICOS	Inducible T-cell COStimulator	indukálható kostimulatórikus receptor
IF	immunofluorescence	immunfluoreszcens
IFN	interferon	interferon
Ig	immunoglobulin	immunglobulin
IHK	immunohistochemistry	immunhisztokémia
IK	immune complex	immunkomplex
IL	interleukin	interleukin
IRF	interferon regulatory factor	interferon regulatórikus faktor
mDC	myeloid dendritic cell	mieloid dendritikus sejt
MEF2B	Myocyte Enhancer Factor 2B	myocita-specifikus erősítő faktor 2B

MFI	mean fluorescence intensity	átlagos fluoreszcencia intenzitás
MHC	major histocompatibility complex	fő hisztokompatibilitási génkomplex
MZB	marginal zone B	marginális zóna B
NF- κ B	nuclear factor kappa-B	nukleáris faktor kappa B
NHL	non-Hodgkin lymphoma	non-Hodgkin limfóma
NK	natural killer cell	természetes ölősejt
ODN	oligodeoxynucleotide	oligonukleotid
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern	patogénekre jellemző molekuláris mintázatok
PBMC	peripheral blood mononuclear cell	perifériás vér mononukleáris sejt
PD-1	programmed cell death 1	programozott sejthalál-1
pDC	plasmacytoid dendritic cell	plazmacitoid dendritikus sejt
PE	phycoerythrin	
PE-Cy5	phycoerythrin-Cyanine dye 5	
PMA	phorbol-12-myristate 13-acetate	forbol 12-mirisztoil 13-acetát
pSS	primary Sjögren's syndrome	primer Sjögren-szindróma
RA	rheumatoid arthritis	rheumatoid arthritis
RbAp	retinoblasztóma associated protein	retinoblasztóma-asszociált protein
RF	rheumatoid factor	rheumatoid faktor
SHM	somatic hypermutation	szomatikus hipermutáció
SLAM	signaling lymphocytic activation molecule	szignált adó limfocita aktivátor molekula
SLE	systemic lupus erythematosus	szisztémás lupus erythematosus
SLEDAI	SLE Disease Activity Index	SLE betegség aktivitási index
SS	Sjögren's syndrome	Sjögren-szindróma
SSC	side scatter	oldalirányú fényszórás
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription	szignál transzducer és transzkripció aktivátor
Tc	cytotoxic T	citotoxikus T
T _{FH}	follicular T helper	follikuláris T helper
T _{FR}	follicular regulatory T	follikuláris T regulatórikus
Th	T helper	T helper
TLR	toll-like receptor	toll-szerű receptor
TMR	tetrametil-rhodamine	
TNF	tumor necrosis factor	tumor nekrosis faktor
TNFAIP3	Tumor Necrosis Factor-Alpha-Induced Protein	tumor nekrosis faktor-alfa indukált protein
TNFRSF	TNF-Receptor superfamily	TNF-Receptor szupercsalád
TNIP1	TNFAIP interaction protein	TNFAIP interakciós protein
Treg	regulatory T	regulatórikus T

I. BEVEZETÉS

Az elmúlt évtizedek egyik legdinamikusabban kutatott tudományterülete az immunológia volt, melynek tanulmányozásával eddigi ismereteinket sikerült tovább bővíteni. Az immunrendszer mindkét ágának, a veleszületett és adaptív immunitásnak kiemelt figyelemmel történő vizsgálata számos új eredményt szolgáltatott a szakirodalom számára. Az utóbbi évek intenzív kutatásainak köszönhetően eddig ismeretlen, vagy kevésbé azonosított sejttípusok jelentek meg, nevezetesen a follikuláris T helper és regulatórikus B sejtek, melyek jelenleg még újdonságnak számítanak. Napjainkra az alapvető immunfolyamatok szabályozásáért felelős sejtek a kutatások célpontjaivá váltak, mivel 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 és a szisztémás lupus erythematosus tanulmányozására. A klinikum és a laboratóriumi munka szoros kapcsolata egyedülálló lehetőséget biztosít az immunfolyamatok vizsgálatára közvetlenül az érdeklődés középpontjában álló kórképben, így 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 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 fiziológias körülmények között is végbemennek, azonban a jól szabályozott immunválasznak 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.

A genetikai faktorok jelentőségét ikervizsgálatok igazolták, miszerint a konkordancia egypetéjű ikrek esetében sokkal magasabb, mint kétpetéjű ikrekben vagy nem ikertestvérekben [1, 2]. Azonban a populációgenetikai és migrációs vizsgálatokkal foglalkozó tanulmányok az örökletes tényezők mellett a környezeti faktorok – különböző patogének, stresszhatások, gyógyszerek - szerepére hívták fel a figyelmet [3, 4]. Az utóbbi évek kutatásai az epigenetikai hatások - mint a DNS metiláció, hiszton acetiláció és metiláció, telomeráz aktivitás, mikroRNS kifejeződés - szerepét is igazolták az autoimmun folyamatok pathogenezisében, azt feltételezve, hogy a környezeti tényezők közreműködésével előidézett epigenetikai változások együttesen vezetnek bizonyos gének expressziójának befolyásolásához és az autotolerancia elvesztéséhez [5, 2]. Az autoimmun betegségekkel szembeni érzékenység függ a hormonális egyensúlytól is, funkcionális vizsgálatok bizonyították, hogy a női nemi hormonok közül az ösztrogén fokozza a T-, és B sejtek aktivitását, illetve a T sejtek „homing” mechanizmusát, hozzájárulva az immunhomeosztázis megbomlásához [6, 7]. Attól függően,

hogy a kóros folyamatokat elindító autoantigének megoszlása egy szervre korlátozódik vagy az egész szervezetre kiterjed, megkülönböztethetünk szervspecifikus, illetve szisztémás autoimmun kórképeket, habár a két csoport között gyakori az átfedés. Az autoimmun rendellenességekre általánosan jellemző továbbá, hogy krónikus lefolyású, progresszív betegségek és az immunreguláció zavara komplex effektor mechanizmusokon keresztül vezethet a szövetek károsodásához [8].

II.1.1. Sjögren-szindróma epidemiológiája és klinikai tünetei

A Sjögren-szindróma (SS) egy krónikus gyulladásos megbetegedés, melynek előfordulási gyakorisága elérheti a 0,6 %-ot, így a rheumatoid arthritishez (RA) hasonlóan az egyik leggyakoribb szisztémás autoimmun kórképnek tekinthető. A SS 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 [9]. A kórfolyamat legfőképp a külső elválasztású mirigyek károsodásával és következményes funkcióvesztésével definiálható, amely a betegség jellegzetes tüneteinek kifejlődéséhez vezet. A SS primer formájában (pSS) elsősorban úgynevezett glanduláris tünetek jelentkeznek; a könnymirigyek érintettsége szemszárazságot (xerophthalmia), míg a nyálmirigyek diszfunkciója szájszárazságot (xerostomia) okoz. A csökkent könny-, és nyáltermelés eredményeként fellépő kellemetlen panaszok mellett szövődmények kifejlődése sem kizárt, melyek közül szemtüneteknél kiemelendő a bakteriális keratitis, a szaruhártya kifeléyesedése vagy perforációja, illetve orális manifestációk esetében a fogszuvasodás, fogágybetegségek és gombás fertőzések által szájszaggyulladás (cheilitis angularis) is észlelhető. Ezenfelül a nyálkahártya szárazság érintheti a légzőrendszert is, melynek következtében garatszárazság (pharyngitis sicca), bronchitis/tracheitis sicca miatt köhögés és felsőlégúti gyulladás, majd a későbbiekben pneumonia alakulhat ki. A

gastrointestinalis traktussal kapcsolatos panaszok az oesophagus-motilitási zavarok mellett a pancreas mirigyfunkcióinak redukálódásában nyilvánulhatnak meg. További kísérő panaszként a bőr exokrin mirigyek csökkent működése bőrszárazsághoz (xeroderma) vezethet, illetve nők esetében főleg a menopauza utáni időszakban vaginitis sicca jelentkezhethet. Esetenként a betegeknél kétoldali, aszimmetrikus parotis vagy submandibularis nyálmirigy duzzanat is megfigyelhető [10].

A pSS kórlefolyása során mirigyműködéshez köthető tünetek mellett idővel extraglanduláris manifesztációk (EGM) is kifejlődhetnek, amelyek az olyan általános panaszokból, mint a fáradtságérzet, myalgia, arthralgia és egyes szervek érintettségéből tevődnek össze. Az utóbbi két csoportra, nevezetesen periepithelialis és extraepithelialis szisztémás tünetekre osztható. A periepithelialis panaszok esetében a szervek károsodása az epithelsejtek limfociták beszűrődésével magyarázható, ebbe a csoportba sorolható például az interstitialis pneumonia, hepatitis és az interstitialis nephritis. Az extraepithelialis szervi érintettség elsősorban a B sejtek fokozott aktivitásával összefüggő immunkomplex (IK) keletkezés következménye, ide tartozik a tapintható purpura, glomerulonephritis, polyarthrit, illetve a vasculitis [11]. Az utóbbi csoportban felsorolt tünetekben szenvedő betegeknél magasabb morbiditást és nagyfokú rizikót tapasztaltak a malignus limfómák, túlnyomórészt non-Hodgkin limfóma (NHL) kialakulására nézve [12, 13]. A kórképben a fent említetteken kívül izom-, és idegrendszeri manifesztációkkal is találkozhatunk, leggyakoribb tünetként a myositis és a perifériás szenzomotoros neuropathia említhető meg [10]. A SS azonban nemcsak elsődleges formában, hanem egyéb poliszisztémás (RA, szisztémás lupus erythematosus [SLE], szisztémás sclerosis) és szervspecifikus (Hashimoto-thyreoidis) autoimmun betegségekkel társulva is kifejlődhet, ekkor már szekunder típusról beszélünk.

II.1.2. Sjögren-szindróma etiológiája és pathomechanizmusa

A pSS egy összetett, multifaktoriális eredetű betegség, melynek pathogenezise még máig sem teljesen tisztázott. A kórkép kialakulása többlépcsős folyamat eredménye, melyben a kezdeti belső szervezeti és külső környezeti tényezők által előidézett változások az autoimmun folyamatok felerősödéséhez és az exokrin mirigyek károsodásához vezetnek.

II.1.2.1. Etiológia – genetikai, epigenetikai, környezeti és hormonális tényezők

A pSS iránti genetikai hajlam kiemelt szerepét a betegség kialakulásában számos esettanulmány és teljes genom asszociációs vizsgálat (GWAS) bizonyította. A betegség és a fő hisztokompatibilitási génkomplex (major histocompatibility complex; MHC) közötti összefüggést tekintve a legfontosabb gének az MHC II régióban elhelyezkedő humán leukocita antigének (HLA) HLA-DR és HLA-DQ alléljai. Az MHC génkomplex régióiban a lókuszok között rendkívül szoros kapcsoltság áll fenn, így a betegséggel összefüggésbe hozható gének kiválasztása nehéz feladat, de sikerült igazolni, hogy a HLA-B8, HLA-DRw52 és HLA-DR3 allélek erős asszociációt mutatnak pSS-val [14]. Valamint igazolódott, hogy a HLA-DQ1/DQ2 alléleket hordozó egyének esetében a betegség súlyosabb formában manifesztálódik, továbbá a HLA-DQA1*0501, HLA-DQB1*0201 és HLA-DRB1*0301 allélek szoros kapcsolatot mutattak az anti-Ro/SSA és anti-La/SSB autoantitestek jelenlétével [15-17]. A legfrissebb GWAS tanulmányok olyan újabb hajlamosító gének jelentőségére hívták fel a figyelmet, amelyek a betegség kialakulásában kardinális szerepet betöltő immunfolyamatokban vesznek részt. Az I-es és II-es típusú interferon (IFN) és nukleáris faktor kappa B (NF- κ B) útvonallal összefüggésbe hozható gének közül az interferon regulatórikus faktor 5 (*IRF5*)-TNPO3, szignál transzducer és transzkripció aktivátor 4 (*STAT4*), interleukin (*IL*)-12A és tumor nekrozis faktor (TNF)-alfa indukált protein 3 (*TNFAIP3*) és TNFAIP3 interakciós protein 1 (*TNIP1*) lókuszok polimorfizmusát igazolták

[18]. Mindemellett, számos olyan gént is sikerült azonosítani, amelyek kapcsolatban állnak az adaptív immunrendszerrel, mint például a korai B-sejt faktor 1 (early B cell factor 1; *EBF1*), B-limfoid tirozin kináz (*FAM167A-BLK*), TNF-Receptor szupercsalád 4 (TNF-R superfamily 4; *TNFRSF4*) és C-X-C kemokin receptor 5 (*CXCR5*)-*DDX6* lókuszok [18, 19].

A genetikai predispozícióon kívül újabban az epigenetikai módosulások, úgymint DNS metiláció és mikroRNS expresszió szerepére is rávilágítottak a pSS patomechanizmusában, habár az ezzel kapcsolatos eredmények még korlátozott számban állnak rendelkezésünkre. Yin és munkatársai alátámasztották, hogy a T-B sejtek közötti kostimulációért felelős *TNFSF7* DNS promóter régiójának hipometilációja a molekula overexpresszióját idézi elő [20]. Egy másik kutatócsoport által publikált tanulmányban a regulatórikus T (Treg) sejtekre jellemző transzkripciós faktor (forkhead box P3; FoxP3) promóter régiójának hipermetilációja a FoxP3 kifejeződésének csökkenését igazolták perifériás CD4⁺ T sejtekben [21]. A mikroRNS-ek kicsi, fehérjét nem kódoló, egyszálú RNS molekulák, amelyek a velük részlegesen komplementer nukleotid szekvenciájú mRNS-ekhez kapcsolódva a génexpresszió poszttranszkripciós szintű szabályozásáért felelősek. A miR-146 fiziológiás körülmények között a Toll-szerű receptor (toll-like receptor; TLR) és TNFR jelközvetítő faktorainak szabályozását végzi. Pauley és munkatársai pSS-ás betegekben a miR-146 emelkedett kifejeződését figyelték meg és feltételezésük szerint a molekula fokozott expressziója ellenére sem képes szuppresszálni a gyulladásos citokinek termelődését, továbbá fokozza a fagocitózist is [22]. Egyéb mikroRNS-ek jelentőségét is leírták, mégpedig a miR-181a, miR-16, melyek overexpressziója pSS-ás betegek nyálmirigy szövetében összefüggést mutatott a csökkent nyálmirigy funkcióval és a miR-200b, illetve miR223, melyek fokozott kifejeződése negatív visszacsatolás útján szabályozza az autoantigének jelenlétét [23, 24].

A genetikailag hajlamos személyekben az autoimmun folyamatok kiváltását valószínűleg környezeti faktorok, például vírusfertőzés indukálhatja, amely az utóbbi néhány évben ismét

az érdeklődés középpontjába került. Irodalmi adatok szerint legismertebbek az Epstein-Barr vírus (EBV), humán T-sejtes leukéma-limfóma vírus 1-es típusa, cytomegalovírus, hepatitis C vírus és Coxsackie A vírus [25, 26]. Az elmúlt évek során a legtöbb eredmény EBV fertőzéssel kapcsolatban született, mely szerint a vírus az epithel sejtek apoptózisának előidézésével támogatja a Ro/SSA, illetve La/SSB ribonukleoprotein felszabadulását és a vírus RNS-ével komplexet képezve a TLR3-on keresztül triggereli az I-es típusú IFN útvonal aktivációját [27]. A nyálmirigyek epithel sejtjei a konzervált, patogénekre jellemző molekuláris mintázatokat (Pathogen Associated Molecular Pattern; PAMP) felismerő TLR1-4, -7 és -9 konstitutív expressziójával a veleszületett immunrendszert aktiválva veszik fel a fertőző ágensekkel szembeni harcot, ezzel rámutatva a kórokozók szerepére pSS-ban [28, 29]. A pSS-ra jellemző erős női dominancia a hormonális tényezők szerepére hívta fel a figyelmet, amelyet számos állatkísérletes modellben végzett vizsgálattal sikerült alátámasztani. Az ösztrogén szerepét aromatáz-knock out egerekben vizsgálták és azt tapasztalták, hogy az ösztrogén deficiencia pSS-szerű limfoproliferatív kórkép kifejlődését idézte elő, amely fitoösztrogén adásával megelőzhető volt [30]. Továbbá, transzgenikus egerekkel folytatott kísérletben igazolódott, hogy a retinoblasztóma-asszociált protein 48 (RbAp48) kifejeződésének emelkedése ösztrogén hiányában az exokrin mirigyek apoptózist válthat ki és pSS-hoz hasonló autoimmun exokrinopathia-t eredményez. A szerzők arra a következtetésre jutottak, hogy az ösztrogén deficiencia stimulálja a nyálmirigy epithel sejtjeit és kostimulatórikus molekulák expresszáldásával antigénprezentáló sejtként (APC) viselkedhetnek, ezáltal aktív szerepet játszva az autoimmun folyamatokban [31].

II.1.2.2. Pathomechanizmus - veleszületett és adaptív immunitás

A pSS-ra jellemző gyulladásos folyamat kifejezetten az exokrin mirigyeket érinti, amelynek szövettani elváltozásai túlnyomóan a kisnyálmirigy biopsziás mintákon vizsgálhatók. Az

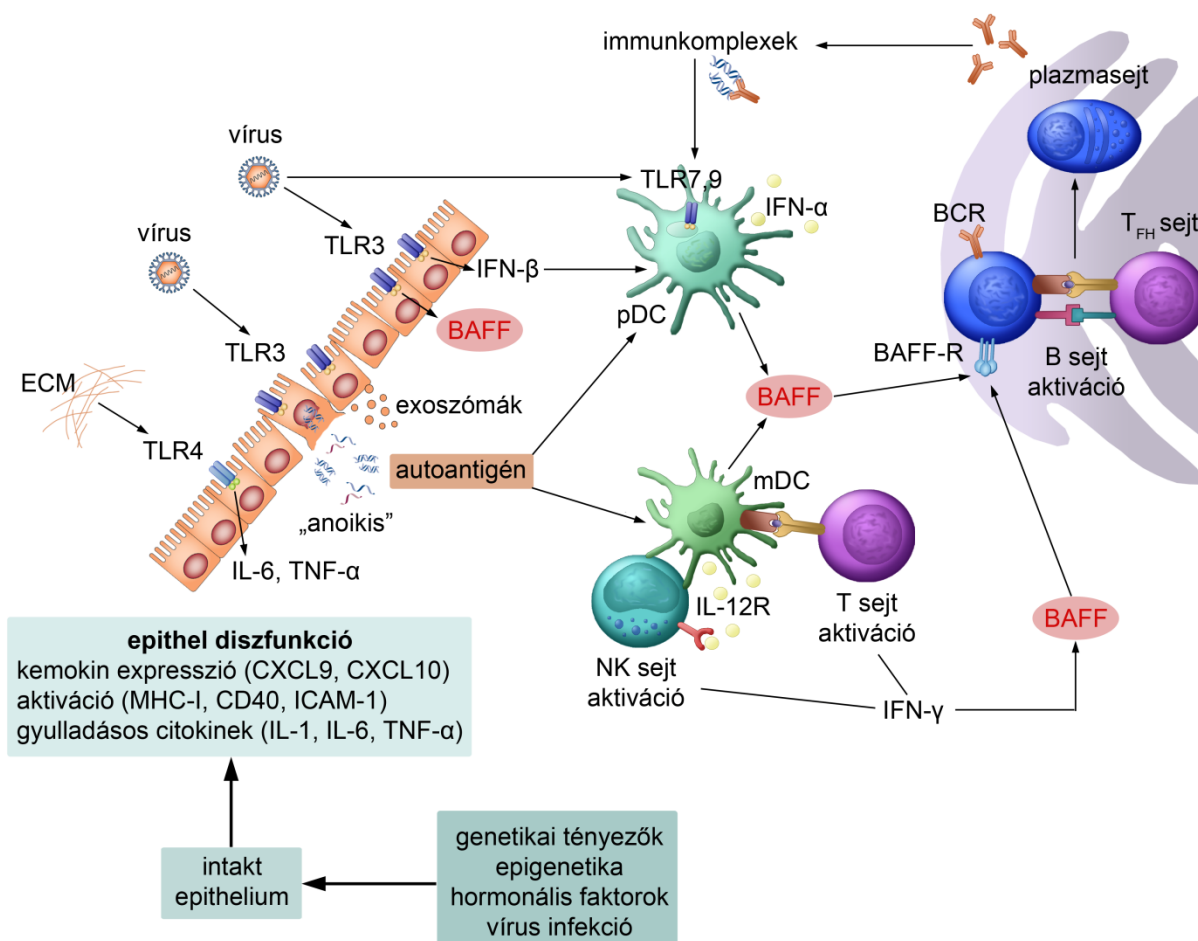
autoreaktív immunválasz eredményeként a ductusok kitágulása, az acinusok atrophíája alakul ki, melyek mellett a betegség jellegzetes tünete az elpusztult acinusok helyén visszamaradt, mononukleáris sejtekkel infiltrált nyálmirigyszövet. Egér és humán tanulmányok szerint, a gyulladásos infiltrátum sejtes összetétele a betegség kórlefolyása során változik; a kezdetben nagyobb arányban beszűrődött $CD4^+$ T sejtek helyén később többségében B sejtek és makrofágok, illetve dendritikus sejtek (DC) dominálnak [32]. A 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, nevezetesen a NHL előrejelzésében [33].

Az utóbbi évtizedek adatai alapján ismertté vált, hogy az exokrin mirigyek epithel sejtei nemcsak szenvedő alanyai az autoreaktív immunfolyamatoknak, hanem adhéziós-, kostimulatórikus molekulák, citokinek és kemokinek kifejezésével elősegítik a mononukleáris sejtek infiltrációját, illetve differenciálódását, hozzájárulva az autoimmun epithelitis kialakulásához. Arról még nincsenek pontos adatok, hogy a mirigyszövet epitheliumának destrukciója extrinsic vagy intrinsic tényezők által megy végbe, de valószínűleg mindkét útvonal előidézheti a sejtek apoptózist. A külső ágensek részvételével indukált folyamat a TLR3 útvonalon keresztül egyrészt kemokin ligandok (CXCL9, CXCL10) expresszióját előidézve kezdeményezi a $CXCR3^+$ T és B sejtek, plazmasejtek beszűrődését, másrészt növeli az MHC-I, CD40, CD54 és CD95 markerek kifejeződését, továbbá a TRAF6-IRF3 jelközvetítő molekulákon keresztül serkenti az IFN- β szekrécióját [29, 34]. Ezenfelül, a TLR3 aktiváció a pro-apoptotikus Bim és Bmf molekulák termelődésének fokozásával, illetve a B-sejt limfóma 2 (B-cell lymphoma 2; Bcl-2) anti-apoptotikus molekula kifejeződésének csökkentésével támogatja az „anoikis” típusú programozott sejthalál végbemenetelét [35]. Apoptózis hatására az intracelluláris elhelyezkedésű Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 és

La/SSB autoantigének exoszómákban, illetve apoptotikus blebekben kiszabadulnak az epithel sejtekből és stimulálják a szövetben akkumulálódott sejtek immunválaszát [36]. A gyulladásos mikrokörnyezet kialakításában a TLR4 útvonal szerepét is igazolták, ugyanis a bakteriális lipopoliszacharid mellett a szöveti integritás fenntartásáért felelős extracelluláris mátrix proteinek, mint például a heparán-szulfát, fibronectin és laminin, veszély asszociált molekuláris mintázatként (Danger Associated Molecular Pattern; DAMP) a receptorhoz kötődve aktiválják a jelátviteli pályát, kiváltva a proinflammatorikus mediátorok, illetve kemoattraktánsok (IL-1, IL-6, TNF- α , CCL6) szekrécióját [37, 38]. A makrofágok, mieloid DC-ek (mDC), plazmacitoid DC-ek (pDC) és CD4⁺ T sejtek „homing” folyamatát a mirigyszövet epitheliumának adhéziós molekulái (E-kadherin) és kemokin ligandjai (CXCL9, CXCL10, CXCL12, CCL6) irányítják, majd az akkumulálódott sejtek a jelenlévő autoantigének, illetve citokinek és kostimulátorikus molekulák által aktiválódnak. A CXCL12 erős kemoattraktánsként szolgál a pDC-ek számára, melyek a nagy mennyiségű I-es típusú IFN (IFN- α és IFN- β) gyors termelése révén a vírusellenes immunválasz legfőbb képviselői. A szövet destrukciója következtében az endoszomálisan elhelyezkedő TLR-7 és -9 virális egyszálú RNS-eket, illetve metilátlan CpG-motívumot tartalmazó oligonukleotidot (ODN) ismernek fel és a konvencionális DC-ek és makrofágok aktivációját, továbbá a B-sejt aktiváló faktor (BAFF) stimuláción keresztül a további B és T sejt akkumulációt és aktivációt idéznek elő. A proapoptotikus Fas/FasL expressziójának növelésével szintén autoantigén felszabadulást eredményeznek, így pozitív visszacsatolással az epithel sejtek további apoptózist támogatják [39]. A pSS pathogenezisében betöltött szerepüket emeli ki az a tény, hogy Bave és munkatársai kisnyálmirigy biopsziás mintákban igazolták a pDC-ek jelenlétét és kiemelt fontosságát az I-es típusú IFN válaszban [40]. Az epithelsejtekből felszabadult autoantigének és a pDC-ek által termelt I-es típusú IFN-ok a konvencionális DC-ek aktivációját segítik elő, amelyek IL-6 és IL-12 proinflammatorikus citokinek révén a CD4⁺ T

sejtek és természetes ölósejtek (natural killer cell; NK) általi válaszok serkentéséhez, IFN- γ szekrécióhoz és következményes BAFF expresszió emelkedéshez vezetnek [41]. A fent említett sejtek mellett igazolták, hogy a nyálmirigy epithel sejtei TLR3 agonista poli (I:C) stimuláció hatására képesek BAFF termelésre [42], továbbá számos munkacsoport demonstrálta a molekula jelenlétét kisnyálmirigy biopsziás mintákban is [43, 44]. Az irodalmi adatok alapján elfogadott modell szerint a BAFF a veleszületett és adaptív immunválasz közötti kapcsolatot teremti meg a pSS pathomechanizmusában azáltal, hogy pozitívan szabályozza a B sejt homeosztázist; a Bcl-2 és Bcl-xL anti-apoptotikus molekula kifejeződésének fokozásával, illetve a CD40 molekulával kooperálva gondoskodik a sejtek túléléséről [45]. Az emelkedett szérum BAFF szint és ezzel párhuzamosan szintén magas immunglobulin (Ig) és autoantitest titerek a pSS-ban tapasztalt B sejt hiperaktivitást támasztják alá [46]. A betegség későbbi szakaszában a mirigyszövet gyulladásos infiltrátumában a CXCL12 és CXCL13 kemokin ligandok hatására fokozódik a CXCR4 és CXCR5 receptorokat kifejező B sejtek beáramlása, melyek esszenciális szerepet játszanak az ektópiás GC-ok kifejlődésében és fenntartásában [47]. A CXCL13 fontosságát aláhúzza az a tény, hogy pSS-ás betegek szérumában és nyálában emelkedik a szintje és az infiltrátumon belüli expressziója szoros összefüggést mutat az aggregátum szervezettebb felépítésével [48]. Általánosan ismert adat, hogy a GC-ban lezajló szomatikus hipermutáció (SHM) és izotípus váltás folyamata nagymértékben függ a GC B sejtekben kifejeződő aktiváció indukált-citidin deamináz (AID) aktivitásától, amely a B sejtek későbbi szelekciója és differenciálódása szempontjából elengedhetetlen [49]. Az AID pSS-ban kiemelt szerepére hívja fel a figyelmet az, hogy a betegek kisnyálmirigy szövetében, follikuláris dendritikus sejtes (FDC) hálózatot és jól szegregált T, illetve B sejtes régiókat tartalmazó infiltrátumokban magas AID expresszió mutatható ki [50]. Salomonsson és munkatársainak munkája nyomán bizonyítást nyert a kisnyálmirigy szövetekben lejátszódó limfoid neogenezis, amelyek a jellemző

sejttípusok mellett az autoimmun folyamat végtermékeként szolgáló anti-Ro/SSA és anti-La/SSB autoantitesteket is tartalmazták [51]. A ribonukleoprotein-RNS intracelluláris antigén komplexek (Ro/SSA: Ro52/TRIM21, Ro60/TROVE2 és La/SSB) mellett még megemlítendő a reumatoid faktor (RF), krioglobulinok, anti-mitokondriális és muszkarin-receptor 3 elleni antitestek gyakorisága pSS-ban [52] (1. Ábra).



1. Ábra A Sjögren-szindróma pathomechanizmusának összefoglaló ábrája. A genetikailag hajlamos egyéneknél környezeti és hormonális faktorok a mirigyszövet epitheliumának diszfunkciójához vezetnek. A gyulladt környezetbe beáramló DC-ek (pDC, mDC) 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.

II.1.3. Szisztémás lupus erythematosus epidemiológiája és klinikuma

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, az első panaszok körülbelül a 20-30-as évek között jelentkezhetnek, de a gyermekkortól egészen az időskorig bármely korosztályban előfordulhat. A női és férfi arány 8-10:1, tehát a pSS-hoz hasonlóan szintén erős női dominancia jellemzi. Előfordulási gyakorisága évente 1-10/100000 eset. A betegség kórlefolyása hullámzó, az aktív stádiumot nyugalmi szakasz követheti. A kórkép kezdetén általános tünetek, mint fáradékonyság, láz és fogyás tapasztalható. Bőrtünetek közül jellegzetesek a pillangó erythema a szubakut cutan és krónikus cutan discois lupus. Mozgásszervet érintő panaszok között a kéz és láb kisizületeinek, illetve a csukló és térd arthritise figyelhető meg [11]. A betegség kardinális tünete a lupus nephritis, amely a betegek közel felénél, viszonylag fiatalabb korban alakul ki. Aktív gyulladásra utal a vese glomerulusok nekrozisa és a mononukleáris sejtek beszűrődése, amely a jellegzetes szövettani kép kialakítása mellett a betegségre jellemző autoimmun folyamatok exacerbációját igazolja [53].

II.1.4. Szisztémás lupus erythematosus etiológiája és pathomechanizmusa

A SLE komplex, az immunrendszer veleszületett és adaptív ágának diszregulációjával járó, multifaktoriális gyulladásos betegség. Az utóbbi évek intenzív kutatásainak köszönhetően számos ismeret gyűlt össze a kórkép pathogenezisét illetően, de minden részlete még ma sem teljesen tisztázott. A genetikai tényezők közreműködését GWAS tanulmányok tárták fel és az MHC II osztályba tartozó fehérjéket kódoló HLA gének mellett (HLA-DRB1*1501, HLA-DRB1*0301) számos olyan gén jelentőségét bizonyították, melyek részt vesznek a veleszületett és adaptív immunitás, a vesét érintő folyamatok szabályozásában, sőt az IK-ek

eltávolításában is [54]. A veleszületett immunitás TLR 7-9 keresztüli útvonal fontosságára hívja fel a figyelmet az *IRF5* és *IRF7* haplotípusok asszociációja SLE-ben tapasztalt emelkedett IFN- α aktivitással [55, 56], továbbá a jelátviteli pálya részeként szolgáló NF- κ B közvetítő molekulát szabályozó *TNFAIP3*, illetve *TNIP3* gének is összekapcsolhatók a betegséggel [57, 58]. Említést érdemel még az IgG-t kötő Fc receptorokat (FcR) érintő polimorfizmusok (FcgammaRIIIA-V/F158, FcgammaRIIBT[232]) kapcsolata a kórképpel, ezenkívül lupus nephritis kifejlődésével is [59, 60]. Az adaptív immunválasszal összefüggésbe hozható gének közül a *FAM167A-BLK*, *PRDM1* és *PTPN22* polimorfizmusa emelhető ki, amelyek a T-B interakcióban, B sejteket és plazmasejteket érintő szignál folyamatokban vesznek részt [61]. A laboratóriumi vizsgálatok során tapasztalt magas IK szint és a komplementrendszer egyes faktorainak (C3 és C4) alacsony szintje a „clearance” mechanizmusok károsodására hívja fel a figyelmet SLE-ben. A komplementhiányos állapot az esetek egy részében genetikai defektusra vezethető vissza, de ki lehet mutatni a szerzett defektusokat is. A klasszikus út korai komponenseinek (C1q, C1r, C1s és C2, illetve C4) örökletes homozigóta és heterozigóta hiánya, illetve mutációk a komplementrendszer aktiválódását szabályozó molekulák közül a H-faktor és MCP fehérjét kódoló génekben szoros asszociációt mutatnak SLE kialakulásával [62]. Szerzett tényezőnek tekinthetők a komplementrendszer faktoraival szemben termelődő autoantitestek, melyek közül az anti-C1q autoantitest emelkedett mennyisége és a veseérintettség kimutathatósága között összefüggést figyeltek meg [63]. Az elmúlt években a figyelem középpontjába kerültek az epigenetikai módosulásokkal foglalkozó vizsgálatok, melyek SLE-ben számtalan eredményt produkáltak. A teljesség igénye nélkül említhető például a DNS hipometilációja (CD40L, CD70), hiszton acetilációja (H3 és H4), illetve a mikroRNS-ek (miR146a redukció) szerepe a betegség kórfolyamatának irányításában [5]. A genetikailag hajlamosított személyekben a betegség manifestálódásához további tényezők szükségesek, ilyen környezeti faktorok például a

napfény, UV sugárzás, gyógyszeres kezelés és infekciók. A női dominancia meglétéből a hormonháztartás és a női nemi hormonok provokáló szerepére is következtethetünk. 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 [64, 65]. Az autoantigének további forrása lehet a neutrofil granulociták által alkalmazott újonnan felfedezett ölő mechanizmus, amely során DNS-t és ribonukleoproteineket tartalmazó struktúrákat bocsátanak ki a sejtközötti térbe, ezáltal biztosítva a kórokozók eliminálását. Amennyiben a fent említett folyamatok lejátszódását követő eltakarító procedura zavart szenved, a kiszabadult autoantigének tartós triggerévé válnak az immunsejteknek [66-68]. A sejtörmelékek, például a HMGB-kromatin komplexek a TLR2-n keresztül aktiválják a mDC-eket, melyek felszínén fokozódik a CD40, CD80 expresszió, illetve a proinflammatorikus citokinek (IL-1 β , IL-6, TNF- α) termelődése és APC-ként a T sejteknek mutatják be az autoantigént [69, 70]. A pDC-ek a TLR7 és TLR9 közreműködésével az IK-ek és neutrofilek által kibocsátott struktúrák felismerésére képesek, mely az I-es típusú IFN-ok termelődését eredményezi, ezzel fokozva az autoreaktív immunválaszt [67]. 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 [71, 72]. Ismeretes, hogy 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, ektópiás GC-okat

sikerült kimutatni és az IK lerakódás asszociációt mutatott a limfoid neogenezissel [73, 74]. A felhalmozódott IK-ek eltakarítása a komplementrendszer közreműködésével történik, azonban SLE-ben a komplement komponensek csökkent szintje (C1q, C3, C4) miatt az opsonizáció és fagocitózis zavart szenved, amely a tolerancia elvesztéséhez vezet tovább gerjesztve az autoreaktív folyamatokat [75, 76].

II.2. A follikuláris T helper sejtek eredete és szerepe az adaptív immunválaszban

Az utóbbi évek legintenzívebben kutatott sejt típusa a follikuláris T helper (T_{FH}) sejt, melyet manapság már a GC reakciók központi szereplőjeként tartanak számon. A szakirodalomban először a 90-es évek végén, a humán mandulában megtalálható, CXCR5 kemokin receptort magas szinten expresszáló és B sejtek funkcióit támogató $CD4^+$ T sejtnek említették [77]. 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/ Th 2/ Th 17 sejt vonalak differenciálódási útvonalaitól és számos olyan faktor kifejezésére képesek, melyek a hatékony B sejt immunválaszt segítik [78, 79]. Azonban annak ellenére, hogy különálló sejt típusnak tekinthetők, a legfrissebb eredmények a T_{FH} sejtek sejt vonalbeli plasztikusságára utalnak, nehéz eldönteni, hogy valóban terminálisan differenciálódott sejtekről van-e szó. Lu és munkatársai *in vitro* generált és *ex vivo* izolált T_{FH} -szerű sejteken kimutatták, hogy polarizáló citokin környezetben tenyésztve Th 1 (IFN- γ)/ Th 2 (IL-4)/ Th 17 (IL-17) effektor citokinek produkciójára képesek, miközben megőrzik IL-21 termelő képességüket is. Megfigyeléseiket a kromatin állomány feltérképezésével is megerősítették és igazolódott, hogy ezen T_{FH} -szerű sejtek *TBX21* (Th 1), *GATA3* (Th 2) és *RORC* (Th 17) génjein, hozzáférhető aktív hiszton modifikációs jelek (H3K4me3) találhatók [80]. Egy másik tanulmányban Luthje és munkatársai IL-21-GFP riportert egérben demonstráltak, hogy a T_{FH} sejtek memória sejtekké alakulhatnak, melyek másodlagos antigén ingertől függően képesek

újra T_{FH} sejtekké vagy hagyományos Th sejtekké is differenciálódni [81]. Egy másik kutatás szerint egér Th2 sejtek is képesek lehetnek bizonyos körülmények között, például *Schistosoma mansoni* fertőzés hatására T_{FH} irányba transzformálódni miközben expresszálják a GATA3, IL-4, IL-5 és IL-13 Th2 sejtvonal markereket [82]. Újabban CXCR5 kemokin receptort és Bcl-6 transzkripció faktort expresszáló Foxp3⁺ Treg sejteket, úgynevezett follikuláris regulatórikus T (T_{FR}) sejteket is azonosítottak egér, illetve humán GC-ban, melyek a periférián CXCR5⁺ természetes Treg sejtekből alakulhatnak ki és hiányuk erőteljesebb GC reakciókhoz vezethet [83].

A szakirodalom eddigi következtetései alapján a T_{FH} sejtek differenciálódása egy többlépcsős, multifaktoriális folyamat, melynek első fázisa a DC-ek és naív CD4⁺ T sejtek közötti interakciókor, a másodlagos nyirokszövetek T sejt zónájában történik. A T_{FH} sejtvonal irányú fejlődés alapvető feltétele, hogy a sejtekre jellemző Bcl-6 transzkripció faktor expressziója emelkedjen, és ezzel szemben a B-limfocita indukált érési fehérje 1 (B lymphocyte-induced maturation protein-1; Blimp-1) szintje csökkenjen. Utóbbi marker a Th1/Th2/Th17 sejtvonalakban tapasztalt magas kifejeződésével a T_{FH} sejtek differenciációjának, illetve funkcióinak gátlása miatt a Bcl-6 ellenpólusaként szolgál [84]. A Bcl-6 olyan nukleáris foszfoprotein, amely N-terminálisan POZ/BTB domént hordozó cink-ujj motívumot tartalmaz és transzkripció represszorként funkcionál [85]. Eredetileg B sejt limfómák kapcsán került a figyelem középpontjába, majd fény derült arra, hogy szerepet játszik a GC-hoz kötött T sejt-függő B sejt válaszok kialakulásában is [86, 87]. Funkciójából eredően a *TBX21* és a *RORC* gének promóter régiójához kötődve gátolja az IFN- γ és IL-17 citokinek termelődését, illetve a miR-17-92 mikroRNS klaszter kifejeződését is szuppresszálja, így megelőzve a CXCR5 kemokin expressziójának csökkenését és támogatva a T_{FH} differenciációt [85, 88]. A DC-ek által bemutatott antigének (MHCII-TCR), kostimulációs szignálok (B7-CD28, CD40-CD40L) és citokinek (IL-6, IL-12, IL-27) hatására

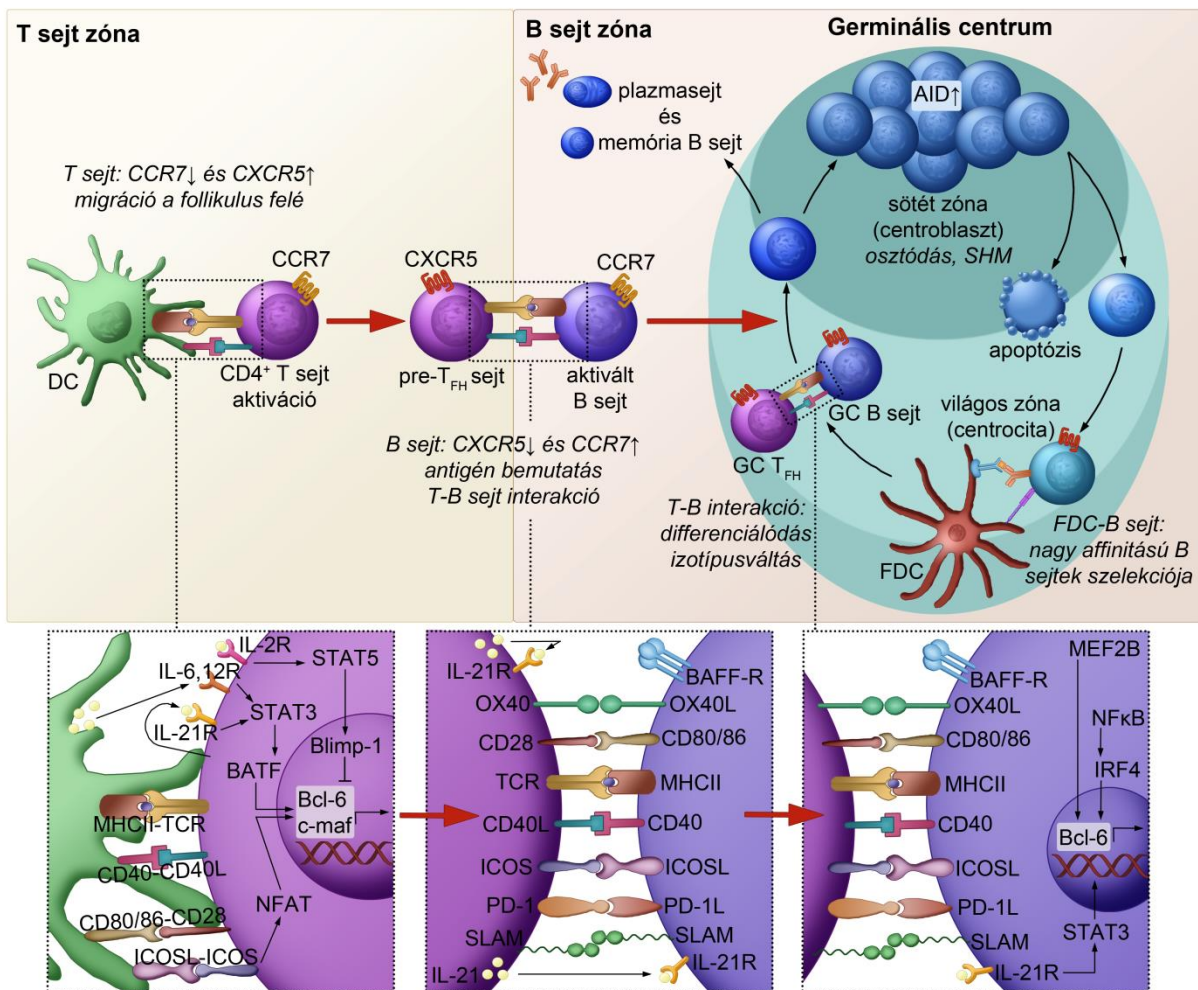
a STAT3/STAT4 jelkövetítőn keresztül a CD4⁺ T sejtekben először emelkedik az alapvető leucin-cipzár transzkripciós faktor (basic leucine zipper ATF-like; BATF) kifejeződése, amely ezt követően a Bcl-6 és c-maf promóter régióhoz kötődve fokozza azok expresszáldását [89-96]. Ezen transzkripciós faktorok hatására a CD4⁺ T sejtek felszínén megnő a CXCR5 (B sejt zóna kemokinje) és ezzel párhuzamosan csökken a CCR7 (T sejt zóna kemokinje) expresszió, továbbá erősödik az indukálható kostimulatórikus (ICOS) receptor, programozott sejthalál 1 (PD-1), CD40L, szignált adó limfocita aktivátor molekula [SLAM]-asszociált protein (SAP) megjelenése, illetve a CXCL13 és IL-21 szekréciója miközben a már pre-T_{FH} állapotban lévő sejtek a szövet T-B sejt határterületére vándorolnak [94]. A fenti folyamat negatív szabályozását az elmúlt évben két független munkacsoport is demonstrálta, azaz az IL-2R-on keresztüli aktivációval a STAT5 gátolja a T_{FH} differenciációt úgy, hogy szuppresszálja a CXCR5, Bcl-6, BATF, c-maf és IL-21 gének expresszióját, valamint pozitív hatással van a Blimp-1-re is [97, 98]. Az IL-21 a T_{FH} sejtek karakterisztikus citokinje, amely autokrin módon biztosítja a sejtek további aktiválódását és túlélését [78, 99]. A fejlődés következő állomása a pre-T_{FH} sejtek kölcsönhatása az aktivált B sejtekkel, melynek előzménye, hogy a kemokinek (CXCR5, CCR7) megváltozott kifejeződése következtében egymás felé vándorolnak és a másodlagos limfoid szövetek interfollikuláris régiójában találkoznak. Ebben az állapotban már rendelkeznek azokkal a markerekkel, melyekkel a szakirodalomban elfogadott T_{FH} fenotípus jellemezhető. Az elsődleges sajátosság az emelkedett CXCR5 kemokin receptor szintje, amely biztosítja a CXCL13 kemokin ligand irányába, így a B sejt follikulusba történő vándorlásukat [100, 101]. A marker fontosságát egérvizsgálatban bizonyították, mely szerint CXCR5 hiányában károsodik a T sejtek migrációja a primer follikulusba, és a T-B sejt interakció elmaradásával kevesebb számú, illetve kisebb méretű GC alakul ki, továbbá az izotípus váltáson átesett antitest-termelő sejtek száma is redukálódik [102]. A kemokin receptorok vonatkozásában

fontos megemlíteni, hogy szemben az egér T_{FH} sejtekkel, a humán T_{FH} sejtek CXCL13 kemokin ligand expresszáására is képesek [103]. Ezenkívül még számos olyan kemokin, aktivációs és kostimulációs molekulát fejeznek ki felszínükön, amelyek a GC B sejt folyamatok elindításához és fenntartásához szükségesek, nevezetesen az ICOS, PD-1, CD40L, OX40, CXCR4, BTLA, IL-21, CD84 és a SAP [103, 104]. 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-ba történő belépés előtt a pre- T_{FH} sejtek és a B sejtek között a SLAM receptor család (CD84 és Ly108), illetve a SAP közvetítésével szoros kapcsolat alakul ki [105], mely hozzájárul a CD28-CD80, CD40L-CD40, OX40-OX40L, ICOS-ICOSL, PD-1-PD-L1, a szekretált IL-21-IL-21R kölcsönhatásának meghosszabbításához és következményes Bcl-6 expressziót eredményez [103]. A GC folyamatok kezdetén számos transzkripciós faktor aktiválódása szükséges a program legfontosabb elemének, a Bcl-6-nak a kifejeződéséhez, amely az NF- κ B közvetítésével az IRF4, illetve a myocita-specifikus erősítő faktor 2B (MEF2B) által megy végbe. A magas Bcl-6 szint szükséges a GC sötét zónájában lezajló génexpressziós programok végbemeneteléhez, amelyek az itt lévő CXCR4⁺ B sejtek szaporodásához és az osztódó centroblasztokban az Ig-molekulák V-génjeinek SHM-hoz szükségesek. Ebben a stádiumban a kezdetben magas NF- κ B és IRF4 szintje lecsökken, csak a Bcl-6, PAX5 és a MEF2B marad aktív [106]. Ezt követően a centroblasztok a világos zónába vándorolnak, ahol a módosult B-sejt recepttorral (BCR) rendelkező CXCR5⁺ centrociták a már terminálisan differenciált T_{FH} sejtek és FDC-ek közreműködésével érési, illetve szelekciós folyamaton mennek keresztül. Itt a CD40-CD40L stimuláció hatására újra emelkedik az IRF4 szintje, azonban ez csak közepes szintű expressziót mutat, így nem

szuppresszálja az AID kifejeződését és lejátszódhat az izotípus váltás programja is. A pozitív szelekción átesett, magas affinitású BCR-t hordozó B sejtek a c-myc expresszió növelésével képesek újra a sötét zónába migrálni és akár újabb osztódási folyamaton végigmenni [107]. Az antigén-szelekción átesett centrociták memória B sejtekké vagy hosszú-életű plazmasejtekké alakulnak, majd kilépnek a GC-ból. Ehhez az IRF4 expresszió további fokozódása szükséges, amely a Blimp-1 aktiválódásával gátolja a Bcl-6 kifejeződést, illetve a BCR-MAPK szignál hatására pedig a Bcl-6 foszforilációja és degradálódása következik be. A plazmasejt irányú differenciálódáshoz elengedhetetlen a PAX5 csökkenése, ezzel párhuzamosan pedig az XBP1 és Blimp-1 transzkripciós faktorok kifejeződésének emelkedése [106, 108], míg a memória B sejtek megőrzik PAX5 expressziójukat, ugyanakkor a differenciációjukban résztvevő faktorok megértése még tisztázásra vár [103] (2. Ábra).

II.3. A vérben keringő follikuláris T helper sejtek

Az elmúlt évtizedekben a T_{FH} sejtek biológiájával kapcsolatos ismereteink nagymértékben bővültek, azonban tudásunk javarészt az egérkísérletekből nyert eredményeken alapszik. Humán vonatkozásban a T_{FH} sejtek eredete és funkciói még máig sem teljesen tisztázottak, különösen igaz ez a kijelentés a vérben keringő, úgynevezett T_{FH} -szerű sejtekre. Ezen 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. Ezt a hipotézist támasztja alá az a megfigyelés, miszerint SAP-deficiens és vad-típusú egerekből származó $CD4^+T$ sejtek hasonló arányban alakultak vérben keringő memória T_{FH} sejtekké [109]. Mivel a SAP a T_{FH} érési programjának későbbi fázisában, a B sejtekkel történő kölcsönhatás kialakításakor kulcsfontosságú, ezért feltételezhető, hogy még az interakció kialakítása előtt kilépnek a sejtek a follikulusból. A cirkuláló $CD4^+CXCR5^+$ memória T_{FH}



2. Ábra A T_{FH} sejtek funkciójának és a csíráközpont eseményeinek sematikus ábrázolása. A naív CD4⁺ T sejtek a T sejt zónában DC-ek közreműködésével aktiválódnak, majd a folliculus felé vándorolnak, ahol találkoznak a már aktiválódott B sejtekkel. A T-B sejt határterületen a pre-T_{FH} sejtek és B sejtek kölcsönösen segítik egymás differenciálódását, majd a pre-T_{FH} sejtek által szolgáltatott szignálok hatására elindul a GC ciklus. A csíráközpontban a B sejtek túlélését, szelekcióját és differenciálódásának lejátékozását a T_{FH} sejtek és FDC-ek által biztosított szignálok támogatják.

sejtek szintén hordozzák a T_{FH} jellegzetes markereit, magyarul expresszálják az ICOS és PD-1 molekulákat, azonban jóval alacsonyabb szinten, sőt továbbra is képesek a B sejt válaszok elősegítésére, de közel sem olyan arányban, mint a GC T_{FH} sejtek, így konzekvensen T_{FH}-szerű sejteknek nevezik [77, 100, 110]. A periférián megtalálható sejtek heterogén csoportot alkotnak, amelyek tovább osztályozhatók a memóriaT limfociták típusa alapján, illetve

kostimulációs és kemokin receptorok expressziója szerint is. A memória típusa szerint megkülönböztetünk CXCR5⁺CCR7⁻CD62L⁻ effektor memória és CXCR5⁺CCR7⁺CD62L⁺ centrális memória T_{FH}-szerű sejteket. A két molekula expressziója valószínűleg a sejtek másodlagos limfoid szövetekbe történő migrációját segíti elő [111]. A CCR7 kemokin mellett az ICOS és PD-1 molekulák expressziójának vizsgálatával újabb alcsoportok különíthetők el: ICOS⁺PD-1⁺⁺CCR7^{lo} aktivált, ICOS⁻PD-1⁺CCR7^{int} és ICOS⁻PD-1⁻CCR7^{hi} nyugalmi állapotban lévő sejtek [112]. A CXCR3 és CCR6 kemokin receptorok alapján kategorizált csoportok a következők: CXCR3⁺CCR6⁻ T_{FH}1, CXCR3⁻CCR6⁻ T_{FH}2 és CXCR3⁻CCR6⁺ T_{FH}17-szerű sejtek. Az említett csoportok a T_{FH} markereken kívül az adott sejtvonal specifikus transzkripciós faktorok és citokinek expressziójára is képesek, de igazolták, hogy effektív IL-21 szekréción keresztül B sejt támogatásra a T_{FH}2 és T_{FH}17 alcsoportok alkalmasabbak voltak a T_{FH}1 alosztálynál [113]. További vizsgálatok arra is rámutattak, hogy a vérben keringő T_{FH}-szerű sejtek közül, funkciójukat és genetikai profiljukat tekintve, az ICOS⁻PD-1⁺CCR7^{int} T_{FH}2 és T_{FH}17 fenotípus áll legközelebb a másodlagos nyirokszövetekben tartózkodó T_{FH} sejtekhez [111]. Irodalmi adatok demonstrálták azt is, hogy a memória T_{FH}-szerű sejtek hosszú életűek, akár több mint egy hónapig is túlélnek és ismételt antigén inger hatására gyorsan effektor T_{FH} vagy más sejtvonalba tartozó Th sejtekké differenciálódnak [109, 114].

II.4. A B sejtek fejlődése és funkciói

A B sejtek központi szerepet töltenek be a humorális immunválaszban, fiziológiás körülmények között legfőbb feladatuk az ellenanyagtermelés és antigén prezentáció a T sejtek számára, továbbá citokinek termelésével az immunfolyamatok szabályozása. A B sejt fejlődés két szakaszra különíthető el: első fázisa antigén inger hiányában a csontvelőben zajlik, míg az érés későbbi része a periférián történik. A fejlődés a csontvelőben hemopoetikus őssejtből

indul ki és a B-sejt érés különböző fázisai (pro-B és pre-B sejt) alatt az Ig gének rekombinációja megy végbe. Az Ig génrégiókban variábilis (Variable; V), konstans (Constant; C) és ezeket összekötő (Joining; J), illetve nehézlánc esetében diverzitás (Diversity; D) gének találhatók. A variábilis régió az Ig- μ -nehézlánc, a V_H - D_H - J_H génszakaszok, míg az Ig- κ -könnyűlánc a V_L - J_L szegmensek kombinációjából véletlenszerűen rendeződik össze [115]. A folyamat eredményeként afunkcióképes könnyűlánc összekapcsolódik a korábban termelődött nehézlánccal és kialakul az IgM molekula, amely a sejtmembránban Ig α - és Ig β -segédláncokkal asszociáltan helyezkedik el, megalkotva a BCR-komplexet [116, 117]. Ebben a stádiumban az éretlen B sejt már funkcióképes BCR-rel rendelkezik, azonban ha antigént ismer fel, akkor a sejt elpusztul vagy funkcionális válaszképtelenség alakul ki és kiszелеktálódik. Azonban előfordul, hogy a központi tolerancia során nem eliminálódik minden autoreaktív B sejt, így az éretlen vagy tranzicionális sejtek a csontvelőből a perifériára vándorolnak [118]. A tranzicionális B sejtek számos érési folyamaton mennek keresztül, majd a másodlagos nyirokszervekbe vándorolnak, ahol aktiválódnak és a T_{FH} sejtek, illetve FDC-ek segítségével SHM, izotípusváltás és a receptor-újraszerkesztés mechanizmusán mennek keresztül. Az itt lezajló perifériás tolerancia során a sajátot felismerő és az idegennel szembeni gyenge reakció válthat ki apoptózist, anergiát vagy ignoranciát [119]. A B sejteket alapvetően két sejtvonalra oszthatjuk: a magzati májból származó őssejtből B-1 típusú, a csontvelői őssejtből pedig B-2 típusú B sejtek fejlődnek ki. A B-1 B sejtek hosszú életű, önmegújító sejtek, melyek polireaktív, úgynevezett természetes IgM antitesteket termelnek, ideális és gyors védelmet biztosítva a kórokozókkal szemben. Utóbbi évek kutatásai különös figyelmet fordítottak az IL-10 termelő regulatórikus B (Breg) sejtek immunfolyamatokat szabályozó szerepére és egyes szerzők egér modellekben azt tapasztalták, hogy az IL-10 termelő sejtek fenotípus szerint a CD5⁺CD1d^{hi} B-1 B sejt csoportba sorolhatók [120]. A B limfociták többsége viszont leginkább a B-2 típusba tartozik, melyeket tovább

csoportosíthatunk marginális zóna B sejtekké (MZB) és follikuláris B sejtekké (FO). A MZB sejtek elsősorban a lép marginális szinuszaiban helyezkednek el és a B-1 B sejtekhez hasonlóan javarészt a T-sejt független válaszokban vesznek részt és természetes ellenanyagokat termelnek. Ezzel szemben a FO B sejtek a másodlagos nyirokszövetekbe vándorolnak és alapvető elemét képezik a humorális immunválasznak. Az előző két csoporttal ellentétben legfőképp T-sejt függő B sejt válaszokban vesznek részt és a csíráközpontban lejátszódó folyamatok következtében memória B sejtekké és plazmasejtekké differenciálódnak [121]. A B sejt fejlődés során az adott érési stádiumban lévő sejtek különböző markereket expresszálnak, melyek alapján B sejt alpopulációkat különíthetünk el [122]. Ha a sejtek fenotípusának változatosságát nézzük, akkor ez kimondottan igaz az IL-10 termelő Breg sejtekre, ugyanis a B-2 B sejtcsoportban is kimutatták jelenlétüket, melyből következtethetünk, hogy egy heterogén sejtpopulációról van szó. Egérkísérletekben $CD1d^{hi}CD23^{-}IgM^{hi}$ MZB sejteknél, míg humán vonatkozásban $CD38^{hi}CD24^{hi}CD27^{-}$ tranzicionális B sejtek esetében mutattak ki IL-10 termelést [120, 123, 124].

A B sejtek számtalan feladatot látnak el az immunreakciók során, melyek közül a legfontosabb az antitestek termelése, melyek az antigénhez kötődve különféle effektor funkciókat indítanak be, és a patogén elpusztításához, majd a szervezetből való eltávolításához vezetnek. Azonban a „saját” anyaggal való reakció és hasonló effektor funkció a szervezet szöveteinek károsodását eredményezi. Hasonló folyamat tapasztalható kóros IK képződés esetén is, ha a képletek eltakarítása nem megfelelő, akkor az IK-ek a szövetekben lerakódva azok gyulladását idézi elő. Abnormális B sejt válasz az autoantigének felismerése és bemutatása a T sejtek felé, amellyel autoreaktív T sejt aktivációt váltanak ki, és az autoimmun folyamatok felerősödését okozzák. Ezenkívül, a túlzott citokin termeléssel gyulladásos mikrokörnyezetet hozhatnak létre és a limfotoxin expresszióval előidézhetik az ektópiás limfoid struktúrák kialakulását is [121].

II.5. Célkitűzések

A pSS és a 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 egyik szabályozó elemeként ismert T_{FH} sejtek szerepét, illetve e sejtek 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-nak a vizsgálatára is lehetőségünk volt. Munkánk során az alábbi célokat fogalmaztuk meg:

- pSS-ás betegek glanduláris 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 sejtekkel kapcsolatos 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 és egészséges kontroll személyek

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, Pathológiai Intézetének archívumában tárolt kisnyálmirigy biopsziás minták szövettani blokkjaiból készített metszeteken végeztük. A vérmintákkal és szövettani blokkokkal történő munkát 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 Helsinkai Nyilatkozat etikai irányelveit követve valósultak meg.

III.1.2. Primer Sjögren-szindrómaperifériás paramétereinek vizsgálatába bevont betegek

Vizsgálatainkba összesen 75 pSS-ásbeteget vontunk be (72 nő, 3 férfi; átlag életkor $\pm$ SD: $60,20 \pm 9,58$ év). A diagnózis megállapítása az Amerikai-Európai Konszenzus Kritériumrendszer (American-European Consensus Criteria; AECC) alapján történt [125]. A betegeket konszekutív módon választottuk ki a Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Klinikai Immunológiai Tanszékének járóbeteg szakrendelés névsorából. Kizáró tényezőnek tekintettük az immunszuppresszív, vagy immunmoduláns készítményekkel történő kezelést és a vizsgálat időtartama alatt, illetve az azt megelőző 6 hónapban fennálló fertőzést. A betegek közül 35 személynél csak glanduláris (Gl) tünetek jelentkeztek, míg 40 személy egy, vagy több EGM mutatott a kórlefolyás során. Az

extraglanduláris tünetek megoszlása a következőképpen alakult: polyarthritis n=25 (szimmetrikus, nem erozív, a metacarpo-phalangealis és/vagy proximalis interpharangealis sort érintő ízületi gyulladás), Raynaud-szindróma n=18 (epizodikus, digitalis vasospasmussal járó szekunder forma), lymphadenopathia n=3, vasculitis n=5 (bőr érintettség), polyneuropathia n=2 (perifériás, szenzomotoros kevert forma), myositis n=1 (a proximalis végtag izmok érintettségével járó betegség), polyarthralgia n=11 (enyhébb klinikai tünetekkel, illetve akut gyulladásos eltérésekkel nem járó ízületi érintettség). A vizsgálat idejét megelőzően a betegek csak szubsztitúciós kezelést (könny- és nyálpótlás) kaptak. A vasculitist és további társuló extraglanduláris tüneteket, amelyek kezelése immunszuppresszív szerek alkalmazását igényli, a kísérlet kezdetén rögzítették a klinika orvosai és a terápia megkezdése a vérvételt követően történt. A laboratóriumi mérésekhez kontroll csoportként összesen 37 egészséges, korban és nemből a vizsgált betegpopuláció jellemzőihez illeszkedő személy szolgált (35 nő, 2 férfi; átlag életkor $\pm$ SD: $45,58 \pm 12,99$ év). A vizsgálatba bevont személyek demográfiai adatait az 1. Táblázat összegzi.

		Egészséges kontrollok	pSS betegek	pSS csak GI tünetekkel	pSS EGM-mel
Szám	^a	16	50	25	25
	^b	21	25	10	15
	^c	37	75	35	40
Életkor (átlag $\pm$ SD, év)	^a	51,81 $\pm$ 6,22	61,36 $\pm$ 9,65	64,64 $\pm$ 8,03	58,08 $\pm$ 10,17
	^b	39,10 $\pm$ 12,43	57,88 $\pm$ 9,19	51,80 $\pm$ 10,02	63,00 $\pm$ 5,65
	^c	45,58 $\pm$ 12,99	60,20 $\pm$ 9,58	60,94 $\pm$ 10,41	59,55 $\pm$ 8,88
Nem (ffi/nő)	^a	1/15	2/48	1/24	1/24
	^b	1/20	1/24	1/9	0/15
	^c	2/35	3/72	2/33	1/39

1. Táblázat A tanulmányunk során vizsgált egyének demográfiai adatai

^a1. tanulmány

^b2. tanulmány

^cösszes

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

Vizsgálatunkba olyan 10pSS-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. A betegek kiválasztása során kizáró tényezőnek számított a diagnózis megállapításakor és a szövettani mintavétel idején malignus lymphoma, illetve extraglanduláris tünetek jelenléte. A betegek széleskörű klinikai és szerológiai vizsgálaton estek át, az adatgyűjtés alapjául a rendelkezésre álló ambuláns gondozási lapok szolgáltak, amelyek részletes információt szolgáltattak a betegek klinikai tüneteiről, fizikai állapotáról és laboratóriumi paramétereiről. A szövettani vizsgálatainkban kontrollként 3 olyan személy szerepelt, akiknél enyhe siccás panaszokat dokumentáltak, de tüneteik nem elégtették ki a Sjögren-szindróma nemzetközileg felállított kritériumrendszerének diagnózis felállításához szükséges pontjait. A vizsgálatba bevont pSS-ás betegek demográfiai és laboratóriumi adatait a 2. Táblázat foglalja össze.

III.1.4. Szisztémás lupus erythematosus vizsgálatába bevont betegek

A vizsgálatba 25 szisztémás lupus erythematosusban szenvedő beteget vontunk be (24 nő, 1 férfi; átlag életkor $\pm$ SD: 41,17 $\pm$ 13,20 év), a betegség diagnózisának megállapítása az Amerikai Reumatológiai Kollégium (American College of Rheumatology; ACR) 1997-es, illetve a 2012-ben revideált ajánlása, illetve kritériumrendszere alapján történt [126, 127]. A betegeket a Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Klinikai Immunológiai Tanszékének járóbeteg szakrendeléséről, konszekutív módon választottuk be a vizsgálatba. Kizáró tényező volt a magas dózisú immunszuppresszív, vagy immunmoduláns gyógyszerekkel történő kezelés, báziterápia, illetve biológiai készítmények alkalmazása és a vizsgálat időtartama alatt, valamint az azt megelőző 6 hónapban fennálló fertőzés. A betegség aktivitásának jellemzése az SLE betegség aktivitási index (SLE Disease Activity Index; SLEDAI) alapján történt; azokat a betegeket tekintettük klinikailag aktívnak, akiknél a

Betegek			Laboratóriumi paraméterek											
Szám	Életkor	Életkor (biopszia)	pSS diagnózis felállításakor						Perifériás T _{FH} vizsgálataink idejében					
			SSA/Ro (0,00-10,00 U/ml)	SSB/La (0,00-10,00 U/ml)	IgG (7,00- 16,00 g/L)	IgA (0,70- 4,00 g/L)	IgM (0,40- 2,30 g/L)	Focus score (FS)	SSA/Ro (0,00-10,00 U/ml)	SSB/La (0,00-10,00 U/ml)	IgG (7,00- 16,00 g/L)	IgA (0,70- 4,00 g/L)	IgM (0,40- 2,30 g/L)	KeringőT _{FH} - szerű sejtek (%)
1	66	58	176,5	117,5	40,86*	6,34*	2,31*	2	120,8	51,9	6,04	2,68	0,72	0,28
2	74	66	< 10	< 10	9,12	1,75	1,24	2	10,4	< 10	8,10	1,75	1,19	0,42
3	48	46	76,3	< 10	18,09*	1,42	2,15	2	86,6	< 10	13,49	1,19	1,70	0,30
4	46	38	< 10	< 10	14,57	2,90	8,23*	3	< 10	< 10	13,26	2,54	5,84*	0,92
5	62	53	< 10	< 10	14,41	1,47	0,74	3	< 10	< 10	9,10	1,30	0,64	0,77
6	64	61	< 10	< 10	10,18	1,89	1,58	3	< 10	< 10	9,64	2,18	1,65	1,11
7	64	57	130,0	41,0	19,74*	3,20	3,98*	3	123,2	39,5	14,34	3,15	2,14	0,44
8	40	34	126,6	76,1	31,97*	5,07*	1,01	3	146,5	68,6	22,79*	2,95	0,75	1,56
9	63	52	< 10	< 10	27,24*	6,31*	2,38*	3	< 10	< 10	19,97*	5,23*	3,43*	0,57
10	45	45	157,4	< 10	26,92*	6,34*	2,97*	3	157,4	< 10	26,92*	6,34*	2,97*	0,68

2. Táblázat A szövettani vizsgálatba bevont pSS-ás betegek demográfiai és laboratóriumi adatai

SLEDAI érték nagyobb, vagy egyenlő volt, mint 6. A pontrendszer alapján két csoportot alakítottunk ki: SLEDAI<6 csoport, amelybe az inaktív stádiumban lévő betegek tartoztak (n=17) és SLEDAI≥6 csoport, amelybe a betegség aktív stádiumában lévő betegeket soroltuk (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 vérminták gyűjtése minden beteg esetén legalább 24 órával az utolsó metilprednizolon kezelés követően történt. Az aktív stádiumban lévő betegek újonnan felismert lupusos esetek voltak, akiknél a vérmintát még az SLE kezelésében alkalmazott immunszuppresszív terápia megváltoztatása előtt gyűjtöttük. A kontroll csoport 21 egészséges, korban és nemből a betegség csoportjához illeszkedő személyből állt (20 nő, 1 férfi; átlag életkor ± SD: 39,10 ± 12,43 év). A tanulmányba bevont egyének demográfiai adatait a 3. Táblázat összegzi.

	Egészséges kontrollok	SLE betegek	SLEDAI<6	SLEDAI≥6
Szám	21	25	17	8
Életkor (átlag ± SD, év)	39,10 ± 12,43	41,17 ± 13,20	41,70 ± 13,86	40,62 ± 9,79
Nem (ffi/nő)	1/20	1/24	0/17	1/7

3. Táblázat A tanulmányba bevont személyek demográfiai adatai

III.2. Laboratóriumi vizsgálati módszerek

A perifériás vérrel végzett vizsgálatainkat a Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Klinikai Immunológiai Tanszékének Kutató Laboratóriumában, míg a szövettani vizsgálatainkat a Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Patológiai Intézet, Endes Pongrác Laboratóriumában végeztük el.

III.2.1. Limfocita alcsoportok meghatározása teljes vérből áramlási citométerrel

A perifériás vérben található limfocita alpopulációk fenotípusos vizsgálatához frissen vett (< 3 óra) nátrium-heparinnal alvadásgátolt teljes vért használtunk. A sejtcsoportok azonosítását

az adott sejtfelszíni antigén ellen termeltetett, fluoreszcens festékekkel konjugált monoklonális antitestek és a megfelelő izotípusú antitest kontrollok felhasználásával végeztük. A limfocita alcsoportok rutinszerű elkülönítésére használt monoklonális ellenanyagok a következők voltak: anti-CD3-fluorescein isothiocyanate (FITC), anti-CD4-FITC, anti-CD8-R-phycoerythrin (PE), anti-CD19-R-phycoerythrin-Cyanine dye 5 (PE-Cy5), és anti-CD16+anti-CD56-PE (BD Biosciences, San Diego, CA, USA és Immunotech, Beckmann Coulter Company, Marseille, Franciaország). A T sejtek aktivációs markereinek vizsgálatát anti-CD69-PE-Cy5 és anti-HLA-DR-PE monoklonális antitestek segítségével a CD3⁺ limfocita populáción belül végeztük. A következő monoklonális ellenanyag kombinációk segítségével a naiv és memória T sejtek azonosítását végeztük el: anti-CD45RA-FITC/anti-CD4-PE/anti-CD62L-PE-Cy5 (Immunotech) és anti-CD45RA-FITC/anti-CD8-PE/anti-CD62L-PE-Cy5 (Serotec, Oxford, UK és Immunotech). A naiv és memória B sejtek meghatározása anti-IgD-FITC/anti-CD27-PE/anti-CD19-PE-Cy5 (Beckman Coulter Inc, Fullerton, CA, USA and Immunotech) monoklonális antitestekkel történt. A CD4⁺CD25^{bright} Treg sejtek vizsgálatát anti-CD4-FITC (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) és anti-CD25-PE-Cy5 (Immunotech) monoklonális antitestek felhasználásával végeztük. A minták feldolgozása a Coulter Q-PREP protokoll (Beckman Coulter Inc., Miami, FL, USA) alapján, a korábbi munkánkban leírtaknak megfelelően a Regionális Immunológiai Laboratórium korábban kidolgozott rutin diagnosztikai irányelvei szerint történt. A sejtfelszíni antigének jelölésére szolgáló ellenanyagokból előre meghatározott térfogatot mértünk ki Falcon csövekbe, majd 100 µl heparinnal alvadásgátolt teljes vér hozzáadását követően a mintákat 30 percig, sötétben, szobahőmérsékleten inkubáltuk. Az inkubálás után a vörösvértestek hemolízisét a következőképpen végeztük: a mintákhoz 400 µl A oldatot (100 ml desztillált víz, 180 µl hangyasav) adtunk, majd 10 másodperc vortexelést követően B oldatot (1,5g Na₂CO₃; 3,62g NaCl; 7,78g Na₂SO₄; 250 ml desztillált víz) és 2%-os paraformaldehidet mértünk a

csövekbe. A sejteket 2x2 ml Na-azid (2 mg/L) és BSA (10 mg/L) tartalmú PBS-ben mostuk (1800 rpm, 3 perc), majd 1%-os paraformaldehiddel fixáltuk és a mérésig 4°C-on tároltuk. Az adatok gyűjtését és kiértékelését Cytomics FC500 típusú áramlási citométeren, CXP szoftver segítségével végeztük (Beckman Coulter Inc.). $CD3^+T$ sejtek, $CD3^+CD4^+$ Th sejtek, $CD3^+CD8^+$ citotoxikus T (Tc) sejtek, $CD19^+$ B sejtek, $CD3^+CD69^+$ korai aktivált T sejtek, $CD3^+HLA-DR^+$ késői aktivált T sejtek, $CD3^+CD56^+CD16^+$ NK sejtek, $CD3^+CD56^+CD16^+$ NKT sejtek és $CD4^+CD25^{bright}$ Treg sejtkszázalékos arányának meghatározása a teljes limfocita populáción belül történt. A naiv és memória T sejt altípusok százalékos értékeinek megállapítása a $CD4^+$ és $CD8^+$ sejteken belül a következők szerint történt: $CD4^+CD45RA^+CD62L^+$ naiv Th, $CD4^+CD45RA^-CD62L^+$ centrális memória Th, $CD4^+CD45RA^-CD62L^-$ effektor memória Th, $CD8^+CD45RA^+CD62L^+$ naiv Tc, $CD8^+CD45RA^-CD62L^+$ centrális memória Tc, $CD8^+CD45RA^-CD62L^-$ effektor memória Tc és $CD8^+CD45RA^+CD62L^-$ terminálisan differenciálódott effektor memória Tc sejt. A naiv és memória B sejtek százalékos arányának meghatározása a $CD19^+$ B sejteken belül a következők alapján történt: $CD19^+IgD^+CD27^-$ naiv B, $CD19^+IgD^+CD27^+$ memória B, $CD19^+IgD^-CD27^+$ memória B sejtek.

A $CD4^+$ Th sejt altípusok meghatározását intracelluláris citokinfestéssel végeztük. A heparinnal alvadásgátolt teljes vért 1:1 arányban 100 U/ml penicillin, 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 (phorbol-12-myristate 13-acetate; PMA) (25 ng/ml) és ionomycinnel (1 µg/ml) (Sigma-Aldrich) 37°C-on, 5%-os CO₂ tartalom mellett 4 órán keresztül aktiváltuk. A *de novo* termelődött citokinek extracelluláris térbe történő szekrécióját Brefeldin A (10 µg/ml) (Sigma-Aldrich) hozzáadásával akadályoztuk meg. Kontrollként nem stimulált sejteket használtunk. Az inkubáció után a sejtfelszíni CD4 és CD8 molekulákat a megfelelő

monoklonális antitestekkel jelöltük az IntraPrep permeabilizációs kitben (Beckman Coulter Inc., Miami, FL, USA) szereplő protokoll szerint. Fixálást és permeabilizálást követően a Golgi-készülékben lévő citokineket IFN- γ -ra, IL-4-re, IL-17-re és IL-10-re specifikus fluorokrómmal konjugáltatott monoklonális ellenanyag koktéllal és megfelelő izotípus kontrollal jelöltük, majd a sejteket 1%-os paraformaldehidben fixáltuk és a mérés idejéig 4°C-on tároltuk. A procedúra során a következő monoklonális antitest kombinációkat használtuk: anti-IFN- γ -FITC/anti-IL-4-PE/anti-CD4-PE-Cy5 vagy anti-CD8-PE-Cy5, anti-IL-10-PE/anti-CD4-PE-Cy5 vagy anti-CD8-PE-Cy5 (BD Biosciences), anti-IL-17-PE/anti-IFN- γ -FITC/anti-CD4-PE-Cy5 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA és BD Biosciences). A méréseket és az adatok kiértékelését Cytomics FC500 típusú áramlási citométeren, CXP szoftver segítségével végeztük (Beckman Coulter Inc.). A CD4⁺ limfocitákon belül a következő Th fenotípusokat különítettük el: CD4⁺ IFN- γ ⁺IL-4⁻Th1 sejtek; CD4⁺ IFN- γ ⁻IL-4⁺Th2 sejtek; CD4⁺IFN- γ ⁻IL17⁺Th17 sejtek és CD4⁺IL-10⁺Tr1. A sejtek százalékos arányának meghatározása a CD4⁺ limfocita populáción belül történt.

III.2.2. B limfocita alcsoportok meghatározása áramlási citométerrel

A B-sejt alcsoportok fenotípusos vizsgálatához 15-18 ml frissen vett (< 3 óra) nátrium-heparinnal alvadásgátolt teljes vért használtunk. A vérmintákat 1:1 arányban fiziológias sóoldattal hígítottuk, majd Ficoll-Histopaque (Sigma-Aldrich) poliszacharid oldatra történő rétegzést követően, sűrűség alapú gradiens centrifugálással elválasztottuk a perifériás vér mononukleáris sejteket (PBMC) a vér további sejtalkotóitól. A sejteket 2x2 ml Na-azid-BSA-PBS pufferral történő mosást követően, 0,75x10⁶ sejt/ml koncentrációban PBS oldatban 20 percig, sötétben, 4°C-on jelöltük a megfelelő monoklonális antitest koktéllal. A naiv, memória és kettős-negatív B sejt alcsoportok elkülönítésére az előző fejezetben részletezett monoklonális antitesteket használtuk: anti-IgD-FITC/anti-CD27-PE/anti-CD19-PE-Cy5. Az

érett-naív, elsődleges memória, tranzicionális B sejtek és plazmablasztok azonosítását a következő monoklonális ellenanyagok segítségével végeztük: anti-CD38-FITC/anti-CD27-PE/anti-CD19-PE-Cy5/anti-CD24-allophycocyanin (APC). A minták mérését FACS Calibur áramlási citométeren (BD Biosciences, Immunocytometry Systems, Franklin Lakes, NJ, USA), CellQuest program segítségével végeztük, a detektált adatok kiértékelését FlowJo szoftverrel (TreeStar, Ashland, OR, USA) történt. Az adatok kiértékelésekor a pozitív és negatív populációk elkülönítésére fluoreszcencia mínusz egy (fluorescence minus one; FMO) kontrollt használtunk. Az FMO kontroll minta a vizsgálni kívánt fluoreszcencia-csatornában detektált fluorokróm kivételével az adott protokollhoz tartozó mindegyik jelölést tartalmazta. Méréseink során mintánként legalább 20 000 CD19⁺ sejtet mértünk le a limfocita populáción belül. A B sejt alcsoportok százalékos arányának meghatározása a CD19⁺ limfocitákon belül történt.

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

A perifériás vérben keringő T_{FH}-szerű sejtek vizsgálatát 50 pSS-ás beteg esetében teljes vérmintából, míg 25 pSS-ban és 25 SLE-ben szenvedő beteg esetében pedig PBMC-ből végeztük. A sejtfelszíni jelölésnél az előző fejezetekben részletezett módszereket alkalmaztuk. A sejtek azonosítására a következő monoklonális antitestek szolgáltak: anti-CD4-APC, anti-CXCR5-Alexa Fluor 488, anti-ICOS-PE és anti-PD-1-Peridinin-chlorophyll protein-Cyanine dye 5.5 (PerCP-Cy5.5) (BD Biosciences). A naív és memória CD4⁺ T sejtek elkülönítésére anti-CD45RA-PE és anti-CD45RA-PerCP-Cy5.5 reagenseket használtuk. A FACS Calibur áramlási citométerrel (BD Biosciences) detektált adatok elemzése FlowJo szoftverrel (TreeStar) történt. A kapuzási stratégia ellenőrzéséhez FMO kontrollt használtunk. Teljes vérből készült minták esetén a limfocitákat, monocitákat és granulocitákat, míg PBMC-ből végzett méréseinknél a monocitákat és limfocitákat méretük és granuláltságuk alapján

különítettük el. Az oldalirányú (side scatter; SSC) és előre irányuló fényszórás (forward scatter; FSC) alapján kiválasztott limfocitákat vizsgáltuk tovább. A limfocitákon belül az FSC és CD4-APC (FL4) alapján a CD4⁺sejteket kapuztuk ki, majd a kijelölt csoporton belül vizsgáltuk a CXCR5-Alexa Fluor 488⁺ (FL1) sejteket. Ezt követően a CD4⁺CXCR5⁺ limfocitákon egyszerre néztük az ICOS-PE (FL2) és PD-1-PerCP-Cy5.5 (FL3) paramétereit. Teljes vérből végzett vizsgálataink esetében legalább 35000 eseményt mértünk le a CD4⁺ limfocita populáción belül, a PBMC-ből származó minták vonatkozásában legalább 75 000 CD4⁺ sejtet számoltunka limfocita kapuban. A T_{FH}-szerű sejtek százalékos arányát mindkét esetben a CD4⁺ limfocita alcsoportban határoztuk meg.

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

A CD19⁺IL-21R⁺ sejtek vizsgálatát Na-heparinnal alvadásgátolt vérből, Ficoll gradiens módszerrel szeparált PBMC-ből végeztük. A sejteket 1x10⁶ sejt/ml koncentrációban 100 U/ml penicilinnel, 100 ng/ml streptomycinnel és 10% végkoncentrációjú hőinaktivált FCS-el (Life Technologies) RPMI 1640 GLUTAMAX™-I tápfolyadékban (Life Technologies) tenyésztettük és Hahn és munkatársai alapján alkalmazott protokoll szerint 6,5 µg/ml anti-humán BCR-ral (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA), illetve 50 ng/ml rekombináns humán IL-21 fehérjével (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) 18 órán 37°C-on, 5%-os CO₂ tartalom mellett végeztük az aktiválást. Az inkubációt követően a sejteket összegyűjtöttük, jelölő pufferben mostuk. A sejtfelszíni festéshez anti-CD19-PECy5 és anti-IL-21R (CD360)-PE monoklonális antitesteket használtunk (Beckman Coulter Inc. és BioLegend). Az mérést FACS Calibur áramlási citométer (BD Biosciences), a kiértékelést FlowJo szoftver (TreeStar) segítségével végeztük.

III.2.5. Intracelluláris citokin meghatározás áramlási citométerrel

A citoplazmatikus IL-21 citokin jelöléshez Na-heparinnal alvadásgátolt vérből, Ficoll grádiens módszerrel izolált PBMC-ket használtunk. A szeparált sejteket 2×10^6 sejt/ml koncentrációban 100 U/ml penicilinnel, 100 ng/ml streptomycinnel és 10% végkoncentrációjú hőinaktivált FCS-el (Life Technologies) RPMI 1640 GLUTAMAXTM-I tápfolyadékban (Life Technologies) tenyésztettük és poliklonális aktivátorok (25 ng/ml PMA; 1 μ g/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 μ g/ml) (Sigma-Aldrich) hozzáadásával gátoltuk meg. Az inkubációt követően a sejteket összegyűjtöttük, jelölő pufferben mostuk és 1×10^6 sejt/ml koncentrációban Falcon csövekbe szétosztottuk. A sejtfelszíni jelöléshez anti-CD4-APC, anti-CXCR5-Alexa Fluor 488, és anti-PD-1-PerCP-Cy5.5 (BD Biosciences) monoklonális antitesteket, az intracelluláris citokin meghatározáshoz anti-IL-21-PE monoklonális ellenanyagot használtuk.

A B sejtek intracelluláris IL-10 szekréciójának stimulálásához Ficoll grádiens centrifugálással szeparált PBMC-ket alkalmaztunk. Az izolált sejteket 2×10^6 sejt/ml koncentrációban 100 U/ml penicilinnel, 100 ng/ml streptomycinnel és 10% végkoncentrációjú hőinaktivált FCS-el (Life Technologies) RPMI 1640 GLUTAMAXTM-I tápfolyadékban (Life Technologies), 0,5 μ M/ml CpG-ODN jelenlétében (TLR9 agonista, ODN 2006 B típus, Hycult Biotech Inc., Uden, Hollandia) 48 órán keresztül tenyésztettük. A tenyésztés utolsó 5 órájában 25 ng/ml PMA, 1 μ g/ml ionomycin és 10 μ g/ml Brefeldin A (Sigma-Aldrich) segítségével a megfelelően detektálható intracelluláris citokin szint elérése érdekében újra aktiváltuk a sejteket, majd mostuk és 1×10^6 sejt/ml koncentrációban Falcon csövekbe osztottuk szét. A sejtfelszíni festéshez anti-CD19-PECy5, anti-CD38-FITC, és anti-CD24-APC (BD Biosciences és BioLegend) monoklonális ellenanyagokat, a citoplazmatikus jelöléshez anti-IL-10-PE (BD Biosciences) monoklonális antitestet használtuk. Mindkét vizsgálat esetében a

sejtek fixálását és permeabilizációját az IntraPrep permeabilizációs kit (Beckman Coulter Inc.) alapján a gyártó utasításainak megfelelően végeztük. A CpG-ODN kezelt sejtek életképességét 7-aminoactinomycin D (BioLegend) festék segítségével vizsgáltuk. Az adatok gyűjtését FACS Calibur áramlási citométer (BD Biosciences), a kiértékelést FlowJo szoftver (TreeStar) segítségével végeztük. Minden mérés során legalább 75 000 CD4⁺, illetve 15 000 CD19⁺ eseményt számoltunk a limfocita kapuban. Az IL-21 termelő T_{FH}-szerű sejtek százalékos arányát a CD4⁺ limfocita alcsoportban, az IL-10 termelő B sejtek arányát a CD19⁺ limfocitákon belül határoztuk meg.

III.2.6. Szolúbilis citokinek meghatározása ELISA módszerrel

A szérumban keringő IL-12, IL-21 és IL-27 citokin mennyiségeket szendvics technikán alapuló, enzim-kötött immunszorbens (ELISA) módszerrel határoztuk meg. A vizsgálatot Platinum ELISA kit (eBioscience, San diego, CA, USA) felhasználásával, a gyártó által leírt protokoll szerint végeztük. Az abszorbanciát LabSystems Multiskan MS multiplate olvasó (Labsystems, Helsinki, Finnország) segítségével 450 nm hullámhosszon detektáltuk. Az eredmények kiértékelése Genesis v2.0 szoftveren (Labsystems) történt.

III.2.7. Szerológiai paraméterek meghatározása

A szerológiai paraméterek meghatározásához nem-alvadésgátolt teljes vért használtunk. A szérum immunglobulinok (IgG, IgA és IgM), C3, C4 szérum komplement faktorok mennyiségét turbidimetrián alapuló immunprecipitációs módszerrel, BN II Nefelométeren (Siemens AG, München, Németország) végeztük. Az immun-turbidimetriás mérésekhez a gyártó által szolgáltatott megfelelő antitesteket, kontroll és kalibrátor reagenseket (DIALAB GmbH, Neudorf, Ausztria) használtuk. A keringő immunkomplexek meghatározására polietilén-glikol precipitációs módszert alkalmaztunk. Az Anti-Ro/SSA, anti-La/SSB és anti-

dsDNS autoantitestek meghatározása ELISA módszeren alapuló AUTOSTAT II kit (Hycor Biomedical, Indianapolis, IN, USA) alkalmazásával, a gyártó utasításainak megfelelően történt. A méréseket és az adatok kiértékelését ETI-MAX 300 készüléken (Diasorin, Saluggia, Olaszország) végeztük. A referencia tartomány Anti-Ro/SSA, anti-La/SSB esetében 0,00-10,00 U/ml, anti-dsDNS esetében pedig 0,00-20,00 IU/ml volt.

III.2.8. Kisnyálmirigy biopsza és hagyományos szövettani vizsgálat

A Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Patológiai Intézetének archívumában tárolt, 2001-2010 között rutin diagnosztikai vizsgálati célra gyűjtött kisnyálmirigy biopsziaközül 10 szövettanilag alkalmasnak ítélt minta került elemzésre. Minden mintából formalinban fixált, paraffinba ágyazott (formalin-fixed, paraffin-embedded; FFPE) szövettani blokk készült, amelyekből 4 μm vastag, adhézios tárgylemezre (SuperFrost Ultra Plus®, Menzel-Gläser, Németország) fixált metszeteket készítettünk. Az általános hisztológiai áttekintést és a „focus score” (FS) értékeket hagyományos szövettani festéssel (hematoxin-eozin; HE) határoztuk meg, az értékek meghatározásához az AECC irányelvei szolgáltak alapul. Egy focusnak számított a legalább 50 mononukleáris sejtből álló aggregátum 4 mm^2 kisnyálmirigy szövetre vonatkoztatva. A nemzetközileg is elfogadott szemi-kvantitatív rendszer alapján négy fokozatot különítettünk el: FS=0 (nincs limfocitás infiltrátum), FS=1 (<1 focus/4 mm^2), FS=2 (<2 focus/4 mm^2), FS=3 (>2 focus/4 mm^2) [128].

III.2.9. Immunhisztokémiai vizsgálatok

Immunhisztokémiai (IHK) módszerrel a FFPE blokkokból készített szövettani metszeteken meghatároztuk a CD4, CD5, CD20, CD138, PD-1, CD84 sejtfelszíni molekulák és Bcl-6 transzkripciós faktor megoszlását, továbbá a CD4, illetve CD20 markerek alapján osztályoztuk a limfocita beszűrődés szervezetségi szintjét. Az IHC jelöléseket 4 μm vastag,

adhéziós tárgylemezre (SuperFrost Ultra Plus®) fixált sorozatmetszeteken végeztük. A jelöléseket a gyártók által javasolt protokoll, illetve a laboratóriumban alkalmazott módszerek irányelvei alapján végeztük. Röviden; a metszeteket deparaffináltuk (xilol, 2x3 perc), majd leszálló alkoholsorban rehidráltuk (3-3 perc) és 3%-os hidrogén-peroxid oldatban gátoltuk az endogén peroxidáz aktivitást (12 perc). Ezt követően magas nyomáson (maximális nyomáson 3 perc) citrát-puffer (pH 6.0) vagy Tris/EDTA puffer (pH 9.0) segítségével feltártuk a szöveti antigéneket. A hűtési (desztillált víz) és mosási (1xTBS, pH 7,4-7,5; 2x5 perc) lépések után a metszeteket primer monoklonális antitestekkel inkubáltuk 1 órán át, nedves kamrában, szobahőmérsékleten. Az alkalmazott antitesteket és hígításokat a 4. Táblázat foglalja össze. Az inkubációt követően a nem kötődött antitesteket lemostuk (1xTBS, 2x5 perc), majd a metszeteket a szekunder antitestként funkcionáló biotin-mentes EnVision™ FLEX/HRP polimer-enzim konjugátummal (Dako, Glostrup, Dánia) 30 percig inkubáltuk nedves kamrában, szobahőmérsékleten. Az inkubációt 1xTBS puffer oldatos mosási lépés (2x5 perc) követte. Az antigén-antitest kötődés detektálása VIP peroxidáz (Vector Laboratories, Peterborough, UK) szubsztrát alkalmazásával, a sejtmagok festése metil-zölddel (Vector Laboratories) történt. Utolsó lépésként a metszeteket dehidráltuk (acetonos, majd xilolos öblítés kétszer) és xilolbázisú fedőanyaggal (Surgipath Micromount, Leica Microsystems, Németország) fedtük le. A festett szövettani metszeteket egy Zeiss Plan-Apokromát objektívvel felszerelt (nagyítás: 20x/NA 0,8), Panoramic MIDI tárgylemez szkennel (3D Histech, Budapest, Magyarország) használatával digitalizáltuk, amelyhez magas felbontású, nagysebességű digitális kamera tartozik (Hitachi HV-F22CL). A digitalizált tárgylemezek megtekintése és kiértékelése Panoramic Viewer 1.15.2. (3D Histech) szoftver segítségével történt. Minden metszeten, ha lehetséges volt, akkor átlagosan 4 db (2-6 db) limfocitás aggregátumot választottunk ki véletlenszerűen, melyeken kvantitatív méréseket végeztük a HistoQuant nevű szoftvermodul (3DHistech) alkalmazásával. A program kiszámolta a kijelölt

terület (FA, mm²) és a fedett terület (MA, mm²) értékét; az előbbi a kiválasztott sejtes infiltrátum teljes területét, míg az utóbbi az adott markerre pozitív területet jelölte. A relatív fedett terület (rMA %) értékét a MA/FAx100 képlet alapján határoztuk meg.

Módszer	Primer antitest	Hígítás	Antigén feltárás	Szekunder antitest	Kromogén/ Fluorokróm
IHC	egér anti-CD20 mAb (L26 klón) ²	1:300	citrát-puffer (pH 6.0)	biotin-mentes EnVision™ FLEX /HRP	VIP
	egér anti-CD4 mAb (1F6 klón) ¹	1:20	Tris/EDTA puffer (pH 9.0)		
	egér anti-CD5 mAb (4C7 klón) ¹	1:50			
	nyúl anti-CD84 mAb (EPR8325 klón) ³	1:25			
	egér anti-CD138 mAb (MI15 klón) ²	1:50			
	egér anti-PD-1 mAb (NAT klón) ³	1:50			
	egér anti-Bcl-6 mAb (PG-B6P klón) ²	1:10			
kettős IF	egér anti-Bcl-6 mAb (LN22 klón) ¹	1:100	Tris/EDTA puffer (pH 9.0)	biotin-mentes EnVision™ FLEX /HRP	TSA-TMR
	egér anti-CD3 mAb (LN10 klón) ¹	1:250		Ab-biotinilált-(Fab') ₂ komplex	streptavidin-FITC
	egér anti-CD20 mAb (L26 klón) ²	1:300			

4. Táblázat A szövettani vizsgálatokhoz használt antitestek és hígításaik

¹ Novocastra, Leica Biosystems, Nussloch, Németország

² Dako, Glostrup, Dánia

³ Abcam, Cambridge, UK

III.2.10. A periduktális sejtes infiltrátum osztályozása immunhisztokémiai módszerrel

A limfocitás infiltrátum szerveződési szintjének meghatározása IHK festéssel, Th sejtekre jellemző CD4- és B sejt specifikus CD20 markerek használatával történt. A grádusok megítélése során négy fokozatot különítettünk el: (1) elszórtan, kevés számban perivaszkulárisan elhelyezkedő limfociták; (2) közepes mértékben szerveződöttlimfocitás beszűrődés; (3) szervezettebb, szeparált T- és B sejt zónákból álló periduktális limfocita

aggregátum; (4) elkülönült T- és B sejt területéből álló, jól organizált periduktálisan lokalizált gyulladásos infiltrátum.

III.2.11. Kettős immunfluoreszcens festés

A kettős immunfluoreszcens (IF) festést a FFPE blokkokból készített 4 µm vastag, adhézios tárgylemezre (SuperFrost Ultra Plus®) rögzített szövettani metszeteken végeztük. Deparaffinálás, rehidratálás és peroxidáz gátlást követően az antigén feltárás Tris/EDTA puffer (pH 9.0) oldatban történt. 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 tyramidekapcsolt vörös fluoreszcens amplifikációs kittel (tetrametil-rhodamine; TMR, TSA-Fluorescent System, PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA, USA) vizualizáltuk. Ezt követően a metszeteket a második primer monoklonális ellenanyagokkal (anti-CD20 és anti-CD3, az utóbbi Novocastra) 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. Az alkalmazott antitesteket és hígításokat a 4. Táblázat részletezi. A lépések között a tárgylemezeket 1xTBS (pH 7,4-7,5; 2x5 perc) pufferrel mostuk. A képeket Zeiss AXIO Imager Z2 fluoreszcens mikroszkóppal (NA 10x/0.3 és 20x/0.5; Zeiss, Németország), Isis szoftver (Metasystems, Németország) segítségével készítettük. A felvételek szerkesztése Adobe Photoshop CS5 v12.0 programmal történt.

III.3. Statisztikai módszerek

Az adatok elemzéséhez és az ábrák elkészítéséhez a GraphPad Prism 5 statisztikai szoftvert (Graphpad Software, San Diego, USA) használtuk. Az eredmények értékelése során pSS

esetében az első adatsor feldolgozásakor SPSS v16.0 (SPSS, Inc., IL, USA) program segítségével, „boxplot” panel alkalmazásával kiszűrtük az extrém kiugró értékeket. Az adataink normál eloszlásának tesztelését Kolmogorov-Smirnov és Shapiro-Wilk próbával végeztük. Normál eloszlás esetén, ha az F-próbaszerint a szórásnégyzetek megegyeztek, akkor kétmintás T-próbát, ha a szórásnégyzeteket nem tekintettük azonosnak, akkor Welch-próbát használtunk. A fent említett esetekben a diagramokon az adatokat átlag $\pm$ szórással (SD) formában ábrázoltuk. A normál eloszlástól eltérő esetekben Mann-Whitney próbát alkalmaztunk és az adatsort medián, illetve interkvartilis terjedelemmel prezentáltuk. Két változó közötti kapcsolat vizsgálata során normál eloszlás esetén Pearson-féle, míg nem-normál eloszlás esetén Spearman-féle korrelációs koefficiens meghatároztunk 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

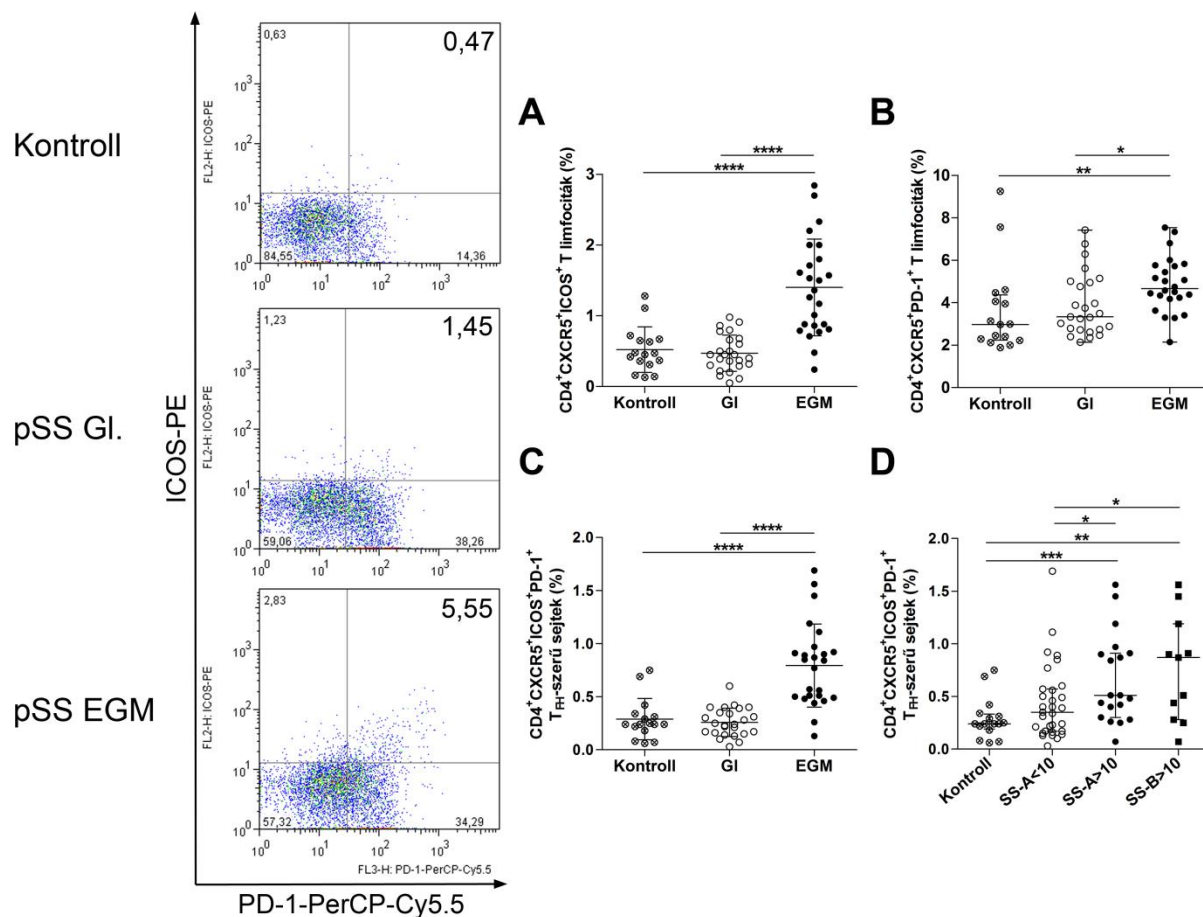
Tanulmányunk első részében 50 pSS-ban szenvedő beteg perifériás vérében meghatároztuk a keringő T_{FH}-szerű sejtek százalékos arányát. Eredményeink kiértékelése során figyelembe vettük a betegek klinikai állapotát, így az EGM-k hiánya, illetve megléte alapján elkülönített két betegcsoport adatait is összevetettük a kontroll értékekkel. Munkánk során a T_{FH}-szerű sejtek azonosítása a CD4⁺CXCR5⁺ T limfocita populáción belül az ICOS és PD-1 sejtfelszíni markerek szimultán expressziója alapján történt. A CD4⁺CXCR5⁺ICOS⁺PD-1⁺ T_{FH}-szerű sejtek, továbbá a CD4⁺CXCR5⁺ICOS⁺ és CD4⁺CXCR5⁺PD-1⁺ T sejtek százalékos arányát a CD4⁺ limfocita populáción belül határoztuk meg. A teljes betegpopuláció adatainak kiértékelése során csak az extraglanduláris tüneteket mutató betegcsoport esetében tapasztaltunk szignifikánsan magasabb CD4⁺CXCR5⁺ICOS⁺ (1,40% ± 0,68 vs. 0,52% ± 0,32; p<0,0001) (3A. Ábra) és CD4⁺CXCR5⁺PD-1⁺ (4,67 (2,15-7,54)% vs. 2,98 (1,88-9,25)%; p=0,0039) (3B. Ábra) T sejtarányt a kontroll értékekhez képest. A szisztémás tünetek jelenléte, illetve hiánya alapján elkülönített két betegcsoport között mind a CD4⁺CXCR5⁺ICOS⁺ (1,40% ± 0,68 vs. 0,47% ± 0,26; p<0,0001) (3A. Ábra) és a CD4⁺CXCR5⁺PD-1⁺ (4,67 (2,15-7,54)% vs. 3,33 (2,14-7,42)%; p=0,0102) (3B. Ábra) T sejtek értékek esetében szignifikáns eltérést találtunk. Ezzel szemben a glanduláris tüneteket mutató betegeknél mért értékek a kontroll csoport adatainak feleltek meg. A perifériás T_{FH}-szerű sejtek százalékos arányát a fent említett két sejtpopulációhoz hasonlóan szignifikánsan emelkedettnek találtuk az EGM-t mutató betegek vérében a kontroll értékekhez viszonyítva (0,79% ± 0,39 vs. 0,29% ± 0,19; p<0,0001) (3C. Ábra), míg a glanduláris tünetekkel

rendelkező betegcsoport adatai nem mutattak eltérést a kontroll csoporttal szemben. A T_{FH} -szerű sejtek arányában különbséget találtunk a két betegcsoport között, a szisztémás tünetekben szenvedő betegeknél mért értékek szignifikánsan magasabbak voltak a csak glanduláris panaszokat mutató betegnél ($0,79\% \pm 0,39$ vs. $0,26\% \pm 0,13$; $p < 0,0001$) (3C. Ábra). Kíváncsiak voltunk a T_{FH} -szerű sejtarányok megoszlására abban az esetben is, ha a betegeket az autoantitest megléte, illetve hiánya alapján különítettük el. Vizsgálatunkban a betegek között 19 személy mutatott anti-Ro/SSA pozitivitást és 11 személynél igazoltunk az SSA mellett anti-La/SSB autoantitestet is. A cirkuláló T_{FH} -szerű sejtek százalékos aránya az anti-Ro/SSA pozitív betegcsoportban szignifikáns mértékű emelkedést mutatott mind a kontroll ($0,510$ ($0,070$ - $1,560$)% vs. $0,240$ ($0,060$ - $0,750$)%; $p = 0,0009$), mind pedig az autoantitest-negatív csoporttal szemben ($0,510$ ($0,070$ - $1,560$)% vs. $0,350$ ($0,030$ - $1,690$)%; $p = 0,0341$) (3D. Ábra). Szignifikáns különbséget találtunk az anti-La/SSB pozitív csoportban mért sejtarányok esetében is, mind a kontroll ($0,870$ ($0,070$ - $1,560$)% vs. $0,240$ ($0,060$ - $0,750$)%; $p = 0,0052$), mind a negatív csoportban kapott adatokhoz képest ($0,870$ ($0,070$ - $1,560$)% vs. $0,350$ ($0,030$ - $1,690$)%; $p = 0,0452$) (3D. Ábra).

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

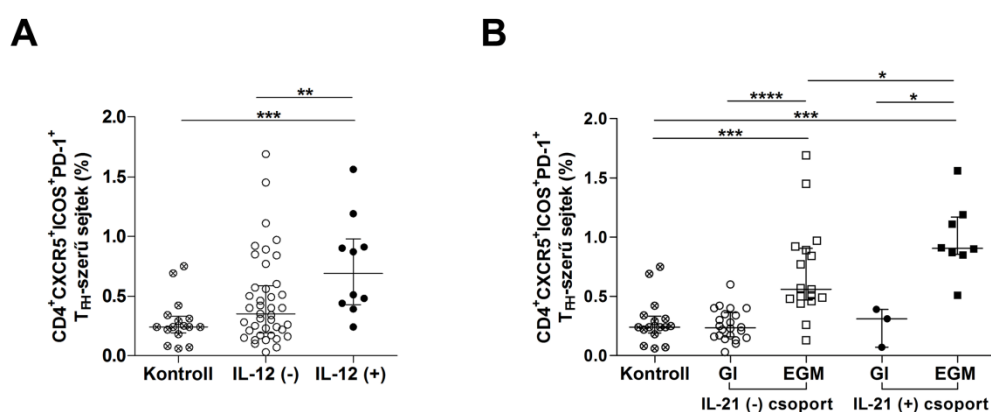
A szérumban mért citokinek közül csak az IL-12 és IL-21 esetében tapasztaltunk szignifikáns eltéréseket. Nyugalmi állapotban alacsony mennyiségű citokin található a szérumban, azaz jelentős hányaduk nem is detektálható. Mivel nem minden betegnél volt kimutatható nagyságrendű IL-12 és IL-21, ezért az említett citokinek titere alapján a betegeket két csoportra különítettük el. A detektálási határt a hígító médium abszorbancia értékére optimalizáltuk, azaz negatívnak tekintettük a detektálási határ alatt mért adatokat. Ezek alapján azt tapasztaltuk, hogy 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)%; $p=0,0249$) (4A. Ábra).



3. Ábra A keringő T_H1-szerű sejtek százalékos megoszlása pSS-ás betegek és egészséges személyek perifériás vérében. Vizsgálatunkban glanduláris tüneteket mutató (n=25), EGM-kal rendelkező betegek (n=25), illetve kontrollként szolgáló egyének (n=16) teljes vérmintáiban vizsgáltuk a sejtek arányát. A reprezentatív dot plot ábrák a CD4⁺CXCR5⁺ kapuzott sejtek ICOS és PD-1 szimultán expresszióját ábrázolják. (A) CD4⁺CXCR5⁺ICOS⁺ T sejtek százalékos aránya. (B) CD4⁺CXCR5⁺PD-1⁺ T sejtek százalékos aránya. (C) CD4⁺CXCR5⁺ICOS⁺PD-1⁺ T sejtek százalékos aránya. (D) CD4⁺CXCR5⁺ICOS⁺PD-1⁺ T sejtek százalékos aránya autoantitest pozitivitás alapján csoportosítva. A T_H1-szerű sejtek százalékos arányát a CD4⁺ limfocita alcsoportban határoztuk meg. Minden egyes pont egy egyént ábrázol. A vízszintes vonalak az A és C ábrák esetében az átlag ± SD-t, a B és D ábrákon a mediánt ± interkvartilis tartományt jelölik. Szignifikáns különbségek jelölése: $p<0,05$ (*); $p<0,01$ (**); $p<0,001$ (***); $p<0,0001$ (****).

Az IL-21 citokin szérumban mérhető mennyisége alapján ugyancsak két csoportra osztottuk a beteget, emellett a szisztémás manifesztációk jelenléte szerint is rendszereztük a populációt. 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)%; $p=0,0414$) (4B. Ábra). 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 GI: 0,56 (0,13-1,69)% vs. 0,24 (0,03-0,60)%; $p<0,0001$ és pozitív EGM vs. pozitív GI: 0,91 (0,51-1,56)% vs. 0,31 (0,07-0,39)%; $p=0,0121$) (4B. Ábra) csoportokkal szemben.



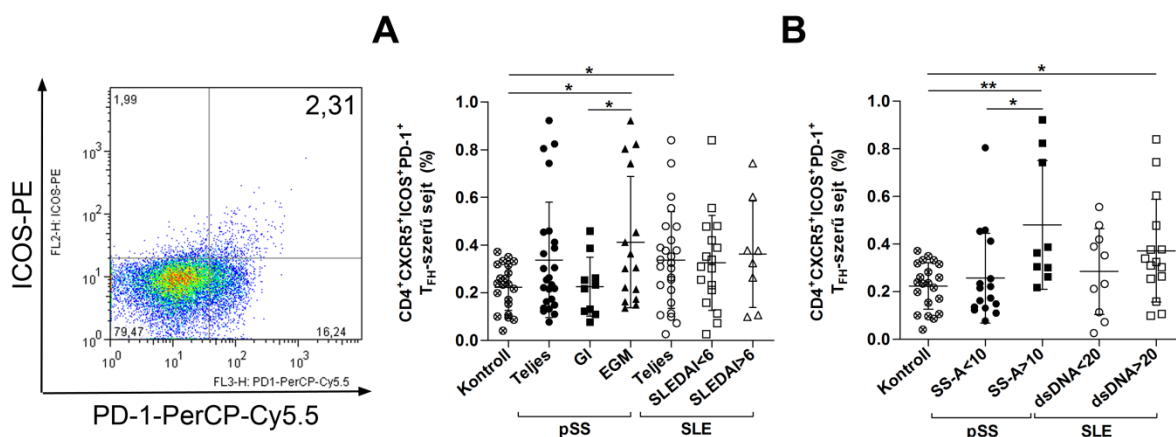
4. Ábra A T_{FH} -szerű sejtek arányának vizsgálata a szérumban mért szolúbilis citokinek szintje alapján.

(A) T_{FH} -szerű sejtek megoszlása az IL-12 titer szerint. (B) T_{FH} -szerű sejtek megoszlása az IL-21 titer szerint pSS-ban a betegségre jellemző klinikai tünetek alapján felosztott csoportokban. A T_{FH} -szerű sejtek százalékos arányát a $CD4^{+}$ limfocita alcsoportban határoztuk meg. A pontok egy egyént ábrázolnak. A vízszintes vonalak a medián értéket $\pm$ interkvartilis tartományt jelölik. Szignifikáns különbségek jelölése: $p<0,05$ (*); $p<0,01$ (**); $p<0,001$ (***); $p<0,0001$ (****).

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. A sejtek azonosítása az előzőeknek megfelelően történt. 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% ± 0,2753 vs. 0,2253% ± 0,1238; p=0,0322), illetve a kontroll csoporttal (0,4121% ± 0,2753 vs. 0,2235% ± 0,0979; p=0,0218) (5A. Ábra). Ugyancsak kíváncsiak voltunk a sejtarány változására akkor is, ha a betegek elkülönítését autoantitest pozitivitás alapján végezzük. Ebben a vizsgálatban 9 személynél igazoltunk anti-Ro/SSA pozitivitást és 4 személynél mutattuk ki az SSA mellett anti-La/SSB jelenlétét is. A sejtarány változása szintén a klinikai tüneteknél tapasztalt tendenciát követte, a betegek csoportosítása után (pozitív vs. negatív: 0,4806% ± 0,2699 vs. 0,2568% ± 0,1893; p=0,0138 és pozitív vs. kontroll: 0,4806% ± 0,2699 vs. 0,2235% ± 0,0979; p=0,0050) (5B. Ábra). A keringő T_{FH}-szerű sejtek aránya szintén szignifikáns mértékű emelkedést mutatott SLE-s betegek esetében is a kontroll értékekhez viszonyítva (0,3369% ± 0,2029 vs. 0,2235% ± 0,0979; p=0,0184), azonban nem találtunk különbséget az inaktív (SLEDAI<6) és aktív (SLEDAI≥6) stádiumban lévő betegcsoportok, illetve az egészségesek adatai között (5A. Ábra). Azonban ha a betegpopuláció felosztását az autotantitest pozitivitás alapján osztályoztuk, akkor azt tapasztaltuk, hogy a sejtek százalékos aránya szignifikánsan magasabb volt az anti-dsDNA-pozitív csoportban a kontroll értékekhez képest (0,3717% ± 0,2153 vs. 0,2235% ± 0,0979; p=0,0192) (5B. Ábra).

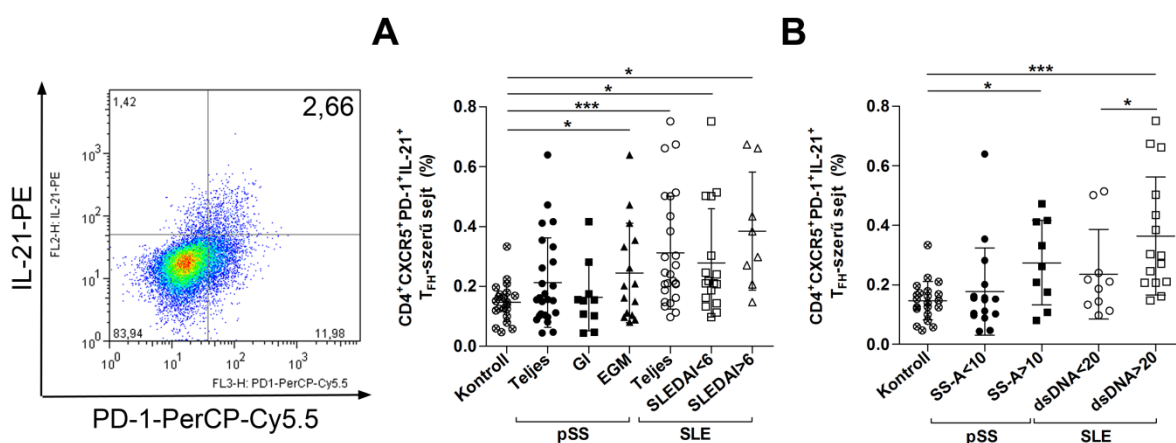


5. Ábra A cirkuláló T_{FH}-szerű sejtek százalékos megoszlása pSS-ás, SLE-s betegek és egészséges egyének perifériás vérében. Vizsgálatunkban PBMC-t szeparáltunk, majd pSS-ás (n=25), SLE-s betegek (n=25), illetve kontroll személyek (n=21) esetében, fluoreszcens festékekkel konjugált monoklonális antitestek segítségével vizsgáltuk a sejtek arányát. A reprezentatív dot plot ábra a CD4⁺CXCR5⁺ kapuzott sejtek ICOS és PD-1 szimultán expresszióját ábrázolja. (A) CD4⁺CXCR5⁺ICOS⁺PD-1⁺ T sejtek százalékos aránya a betegek klinikai tünetei alapján végzett felosztás szerint csoportosítva. (B) CD4⁺CXCR5⁺ICOS⁺PD-1⁺ T sejtek százalékos aránya az autoantitestek jelenléte alapján csoportosított beteg populációkban. A T_{FH}-szerű sejtek százalékos arányát a CD4⁺ limfocita alcsoportban határoztuk meg. Minden pont egy egyént ábrázol. A vízszintes vonalak az átlagot ± SD-t jelölik. Szignifikáns különbségek jelölése: p<0,05 (*); p<0,01 (**).

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 tünetekkel bíró csoport adatai a kontrollokénak feleltek meg (6A. Ábra). Ha autoantitest pozitivitás alapján kategorizáltuk a pSS betegpopulációt, akkor az anti-Ro/SSA-pozitív csoport adatai szignifikáns mértékű emelkedést mutattak a kontroll csoporttalszemben ($0,2742\% \pm 0,1418$ vs. $0,1469\% \pm 0,0649$; p=0,0297) (6B. Ábra). Az IL-21 termelő

CD4⁺CXCR5⁺PD-1⁺ T_{FH}-szerű sejtek százalékos aránya szignifikánsan emelkedett a teljes SLE betegpopulációban (0,3125% ± 0,1886 vs. 0,1469% ± 0,0649; p=0,0003), továbbá az inaktív (0,2786% ± 0,1805 vs. 0,1469% ± 0,0649; p=0,0100) és aktív (0,3846% ± 0,1968 vs. 0,1469% ± 0,0649; p=0,0123) alcsoportokban is az egészséges egyének értékeihez viszonyítva (6A. Ábra). 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-dsDNS-pozitív SLE-s csoportnál összevetve a kontroll adatokkal (0,3638% ± 0,1982 vs. 0,1469% ± 0,0649; p=0,0009) (6B. Ábra). Továbbá, az IL-21citokint termelő T_{FH}-szerű sejtek arányában szignifikáns különbséget találtunk az inaktív és aktív stádiumban lévő betegek között (0,3638% ± 0,1982 vs. 0,2356% ± 0,1509; p=0,0489) (6B. Ábra).



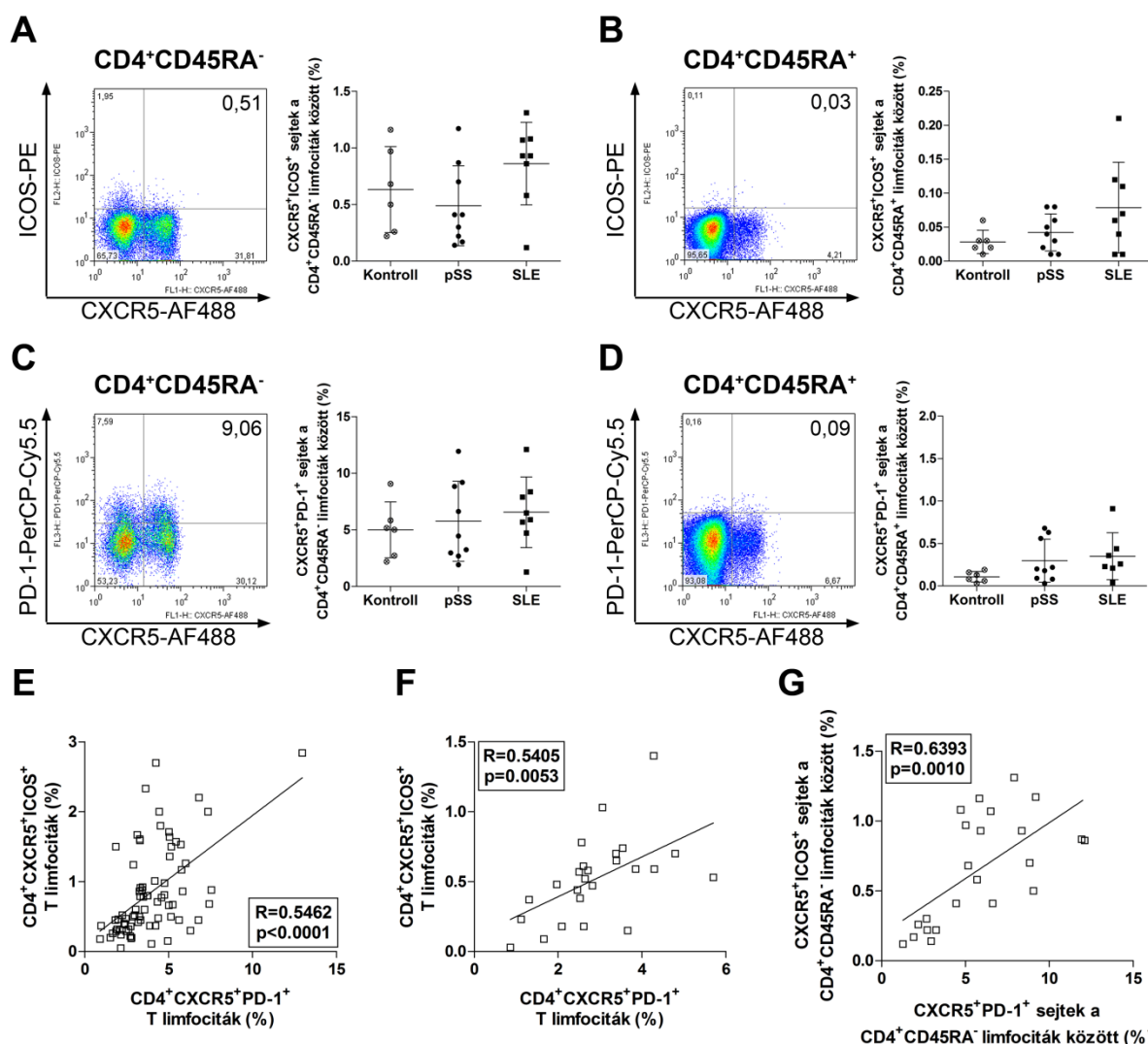
6. Ábra A keringő IL-21 termelő T_{FH}-szerű sejtek százalékos megoszlása pSS-ás, SLE-s betegek és egészséges egyének perifériás vérében. Vizsgálatunkban PBMC-t szeparáltunk, majd pSS-ás (n=25), SLE-s betegek (n=25), illetve kontroll személyekben (n=21), intracelluláris citokin jelölést követően tanulmányoztuk a sejtek arányát. A reprezentatív dot plot ábra a CD4⁺CXCR5⁺ kapuzott sejtek PD-1 és IL-21 kettős expresszióját ábrázolja. (A) CD4⁺CXCR5⁺PD-1⁺IL-21⁺ T sejtek százalékos aránya a betegek klinikai tünetei alapján végzett felosztás szerint csoportosítva. (B) CD4⁺CXCR5⁺PD-1⁺IL-21⁺ T sejtek százalékos aránya az autoantitestek jelenléte alapján csoportosított beteg populációkban. Az IL-21⁺ T_{FH}-szerű sejtek százalékos arányát a CD4⁺ limfocita alcsoportban határoztuk meg. Minden pont egy egyént ábrázol. A vízszintes vonalak az átlagot ± SD-t jelölik. Szignifikáns különbségek jelölése: p<0,05 (*); p<0,001 (***).

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

A továbbiakban, 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. Megfigyeltük azt is, hogy a sejtek és százalékos arányuk emelkedett a betegek esetében a kontroll adatokhoz viszonyítva (7A-D. Ábra). Ezenfelül, vizsgáltuk az ICOS és a PD-1 markerek expressziója közötti összefüggést, amely során a CXCR5⁺ICOS⁺ sejtek szignifikáns pozitív korrelációt mutattak a CXCR5⁺PD-1⁺ sejtek arányával a CD4⁺CD45RA⁻ T sejtcsoporthoz viszonyítva (R=0,6393; p=0,0010) (7G. Ábra). Ha a két marker megoszlását a CD4⁺CXCR5⁺ T sejteken a teljes betegpopulációban vizsgáltuk, akkor a CD4⁺CXCR5⁺ICOS⁺ és a CD4⁺CXCR5⁺PD-1⁺ sejtek aránya között szintén szignifikáns pozitív korrelációt találtunk a pSS-ás (R=0,5462; p<0,0001) és az SLE-s betegcsoportban (R=0,5405; p=0,0053) egyaránt (7E. és 7F. Ábra).

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. Vizsgáltuk, hogy a betegek klinikai állapota és az adott autoimmun kórképre jellemző autoantitestek jelenléte alapján milyen eltérések figyelhetők meg a B sejtek eloszlását tekintve. A B sejt alpopulációk meghatározását a CD19, IgD, CD27, CD38 és CD24 sejtfelszíni molekulák segítségével végeztük. A fenti markerek alapján 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,

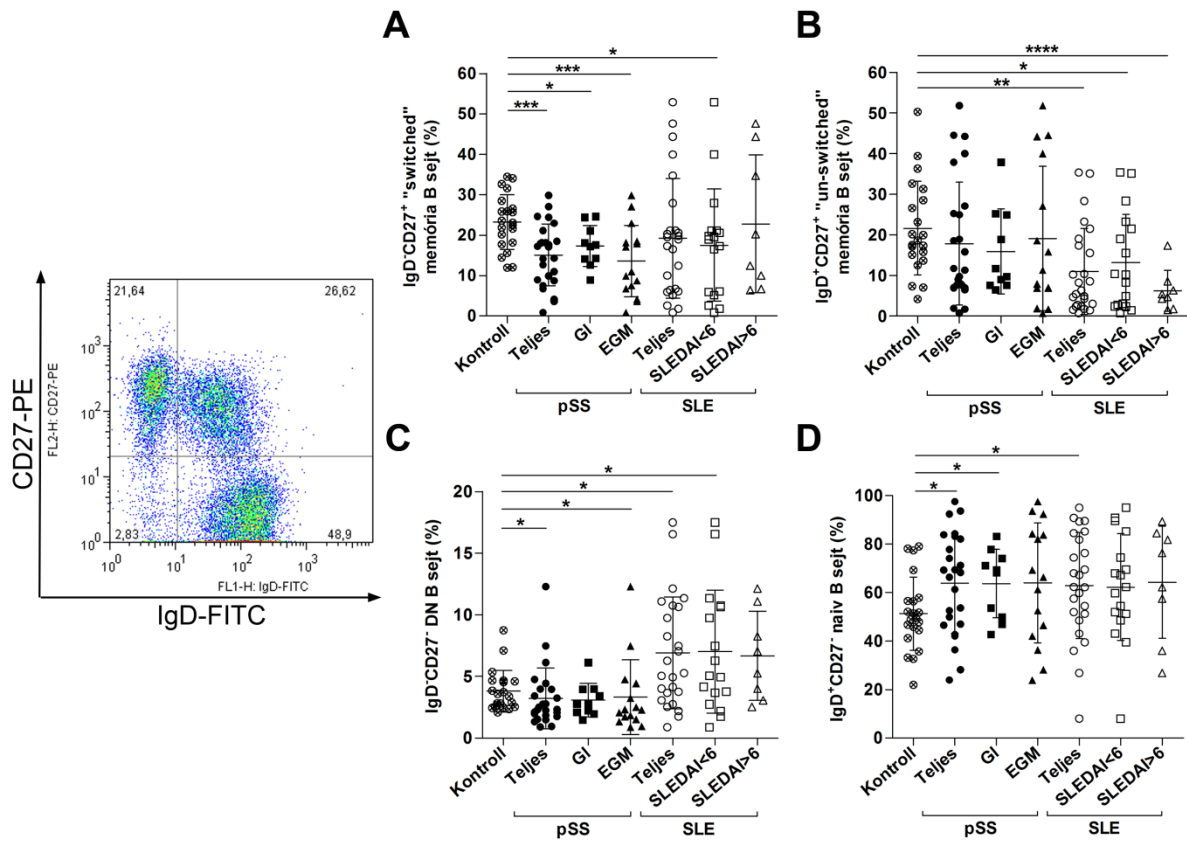


7. Ábra Perifériás T_H1-szerű sejtek fenotípusos vizsgálata pSS-ás, SLE-s betegek és egészséges személyek perifériás vérében. PBMC-t szeparáltunk, majd tanulmányoztuk a T_H1-markerek expressziójának megoszlását a CD45RA⁺ naiv és a CD45RA⁻ memória T sejtpopulációkban. Vizsgálatunkat kisebb betegpopulációval; 9 pSS-ás, 8 SLE-s beteg, illetve 6 kontroll bevonásával végeztük. Reprezentatív dot plot a CXCR5 és ICOS kettős expresszióját ábrázolja, mellette a CXCR5⁺ICOS⁺ sejtek aránya figyelhető meg a kontroll és beteg csoportokban a CD4⁺CD45RA⁻ memória (A) és CD4⁺CD45RA⁺ naiv (B) T sejt populációban. Reprezentatív dot plot a CXCR5 és PD-1 kettős expresszióját jelöli, jobbra a CXCR5⁺PD-1⁺ sejtek aránya látható a kontroll és beteg csoportokban a CD4⁺CD45RA⁻ memória (C) és CD4⁺CD45RA⁺ naiv (D) T sejt populációban. A vízszintes vonalak az átlagot jelölik. (E és F) Korreláció a CD4⁺CXCR5⁺ICOS⁺ és a CD4⁺CXCR5⁺PD-1⁺ sejtek aránya között pSS-ban (n=75) és SLE-ben (n=25). (G) Korreláció a CXCR5⁺ICOS⁺ és CXCR5⁺PD-1⁺ sejtek aránya között a CD4⁺CD45RA⁻ memória T sejtcsoporthoz (n=23). A változók közötti korrelációkat a Spearman-féle (E), illetve Pearson-féle (F és G) korrelációs együtthatóval határoztuk meg.

CD19⁺CD38^{hi}CD24^{hi}CD27⁻ tranzicionális B sejtek, CD19⁺CD38⁺CD24⁺ érett-naiv B sejtek és CD19⁺CD38^{hi}CD27^{hi} plazmablasztok. Az alpopulációk százalékos arányát a CD19⁺ limfocita populáción belül határoztuk meg. 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. $23,23\% \pm 6,78$; $p=0,0005$) (8A. Ábra). A szisztémás manifesztációk jelenléte alapján kettéosztott csoportok esetében mind a glanduláris ($17,30\% \pm 5,06$ vs. $23,23\% \pm 6,78$; $p=0,0207$), mind az EGM-kal rendelkező ($13,58\% \pm 8,83$ vs. $23,23\% \pm 6,78$; $p=0,0007$) alosztályok értékei szignifikáns mértékű csökkenést mutattak a kontroll adatokkal szemben (8A. Ábra). Az SLE-s betegeknél csak a SLEDAI<6 alcsoportban tapasztaltunk szignifikánsan alacsonyabb sejtarányokat az egészséges egyénekben mért értékekhez képest ($17,53\% \pm 13,89$ vs. $23,23\% \pm 6,78$; $p=0,0321$) (8A. Ábra). A CD19⁺IgD⁺CD27⁺ “un-switched” memória B sejtek megoszlásakor csak az SLE-ben szenvedő betegeknél 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 (8B. Ábra). Ez a megfigyelés SLE-ben a betegség aktivitási indexe szerinti felosztás után fennmaradt, azaz mind az inaktív ($13,21\% \pm 11,88$ vs. $21,67\% \pm 11,52$; $p=0,0333$), mind az aktív stádiumban ($6,25\% \pm 5,03$ vs. $21,67\% \pm 11,52$; $p<0,0001$) lévő betegekben mért sejtarányok szignifikánsan alacsonyabbak voltak a kontrollhoz képest (8B. Ábra). A CD19⁺IgD⁻CD27⁻ kettős negatív B sejtek megoszlása fordított arányban változott a két betegségben a kontroll értékekkel szemben. A sejtek értékei szignifikáns csökkenést mutattak a teljes pSS-ás betegcsoportban ($3,214\% \pm 2,463$ vs. $3,796\% \pm 1,681$; $p=0,0290$), továbbá a szisztémás tünetekkel rendelkező alosztályban is szemben az egészséges kontroll csoporttal ($3,306\% \pm 3,030$ vs. $3,796\% \pm 1,681$; $p=0,0291$) (8C. Ábra). Ezzel szemben, SLE-ben szenvedő betegeknél szignifikáns emelkedést figyeltünk meg a teljes populáció ($6,906\% \pm 4,525$ vs. $3,796\% \pm 1,681$; $p=0,0119$)

és az inaktív stádiumú betegek esetében ($7,017\% \pm 4,998$ vs. $3,796\% \pm 1,681$; $p=0,0204$) a kontroll adatokhoz képest (8C. Ábra). A $CD19^+IgD^+CD27^-$ naív 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, viszont az alcsoportok esetében csak a glanduláris tünetekben szenvedő pSS-ás betegeknél tapasztaltunk szignifikáns eltérést ($63,70\% \pm 14,14$ vs. $51,32\% \pm 15,14$; $p=0,0382$) (8D. Ábra).

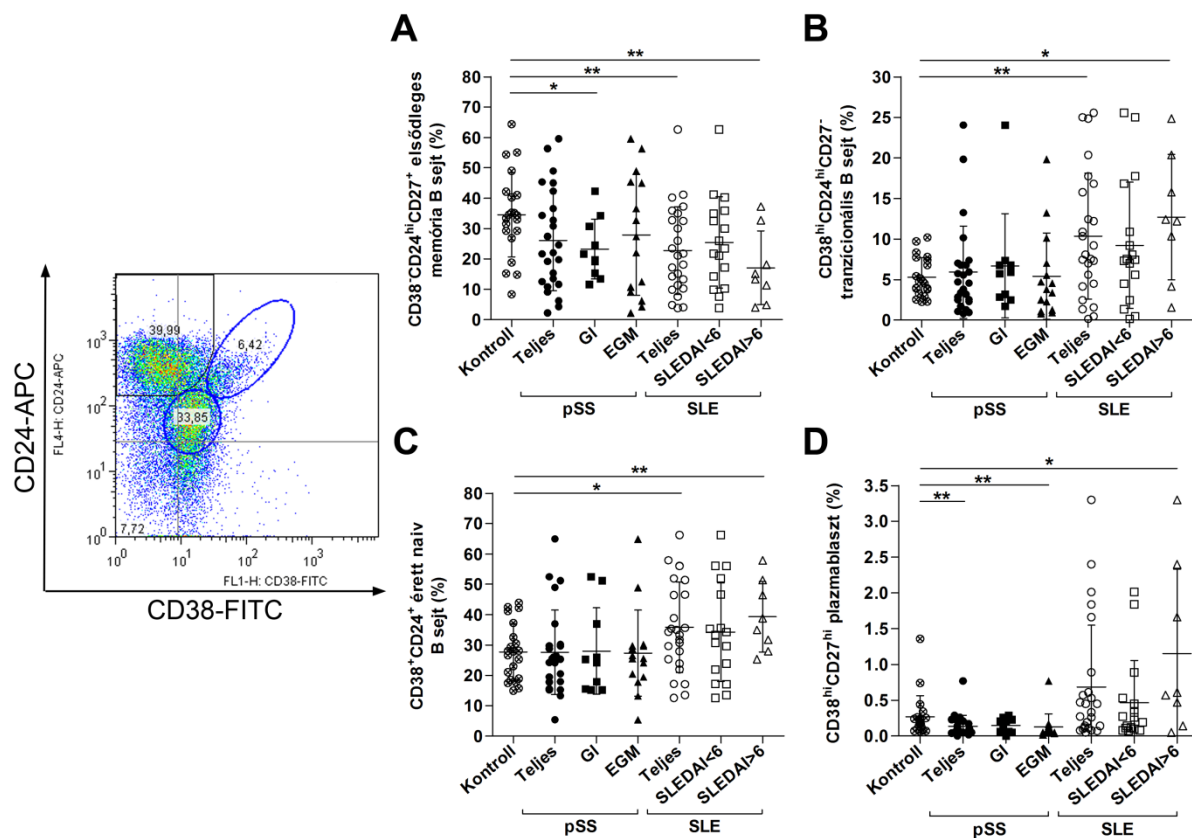
A $CD19^+CD38^-CD24^{hi}CD27^+$ elsődleges memória B sejtek megoszlása az IgD-CD27 markerek alapján azonosított sejtcsoporthoz hasonlóan alacsonyabbnak bizonyult a kontrollhoz viszonyítva, azonban szignifikáns eltérést pSS esetében csak a glanduláris alcsoportban ($23,29\% \pm 9,827$ vs. $34,58\% \pm 13,91$; $p=0,0289$), míg SLE vonatkozásában a teljes ($22,77\% \pm 14,45$ vs. $34,58\% \pm 13,91$; $p=0,0074$) és a $SLEDAI \geq 6$ ($17,10\% \pm 12,11$ vs. $34,58\% \pm 13,91$; $p=0,0042$) alosztályokban figyeltünk meg (9A. Ábra). A $CD19^+CD38^{hi}CD24^{hi}CD27^-$ tranzicionális B sejtek és $CD19^+CD38^+CD24^+$ érett-naív 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 $SLEDAI \geq 6$ alcsoportban ($12,71\% \pm 7,73$ vs. $5,30\% \pm 2,42$; $p=0,0323$) a kontroll értékekkel szemben (9B. Ábra). A $CD19^+CD38^+CD24^+$ érett-naív B sejtek aránya szintén 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



8. Ábra Perifériás B sejt alcsoportok vizsgálata pSS-ban, SLE-ben és egészséges egyéneknél. PBMC-t izoláltunk pSS-ás (n=25), SLE-s betegek (n=25) és kontroll egyének (n=21) perifériás véréből, ezt követően fluorokrómmal konjugált monoklonális antitestekkel különböző B sejt alcsoportokat azonosítottunk. A reprezentatív dot plot az IgD és CD27 expresszióját ábrázolja a CD19⁺ B sejteken. B sejt alcsoportok megoszlását a betegek klinikai állapota szerint is vizsgáltuk. (A) A „switched” memória B sejtek százalékos aránya. (B) Az „un-switched” memória B sejtek százalékos aránya. (C) Kettős-negatív B sejtek százalékos aránya. (D) Naív B sejtek százalékos megoszlása. A sejtek százalékos arányát a CD19⁺ limfocita alcsoportban határoztuk meg. Minden pont egy egyént ábrázol. A vízszintes vonalak az átlag $\pm$ SD-t jelölik. Szignifikáns különbségek jelölése: p<0,05 (*); p<0,01 (**); p<0,001 (***); p<0,0001 (****).

mutatott szignifikáns mértékű emelkedést az egészséges személyek adataihoz viszonyítva (9C. Ábra). A CD19⁺CD38^{hi}CD27^{hi} plazmablasztok megoszlásában eltérést tapasztaltunk a két kórképesetében. A sejtek százalékos aránya szignifikánsan alacsonyabbnak igazolódott 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;

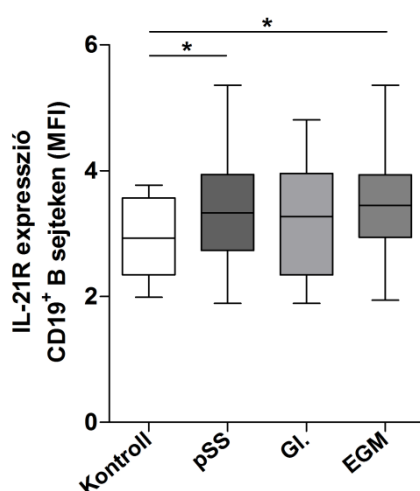
p=0,0014) a kontroll értékekkel összevetve. Ellenben, SLE-s betegeknek a plazmablasztok aránya magasabbnak adódott a kontroll csoporttal szemben, de szignifikáns különbséget csak az aktív stádiumban lévő betegcsoportban találtunk ($1,150\% \pm 1,181$ vs. $0,267\% \pm 0,293$; p=0,0403) (9D. Ábra).



9. Ábra Perifériás B sejt alcsoportok vizsgálata pSS-ban, SLE-ben és egészséges egyéneknél. PBMC-t izoláltunk pSS-ás (n=25), SLE-s betegek (n=25) és kontroll egyének (n=21) perifériás véréből, ezt követően fluorokrómmal konjugált monoklonális antitestekkel számos B sejt alcsoportot azonosítottunk. A reprezentatív dot plot a CD38 és CD24 expresszióját ábrázolja a CD19⁺ B sejteken. B sejt alcsoportok megoszlását a betegek klinikai állapota szerint is vizsgáltuk. (A) Elsődleges memória B sejtek százalékos aránya. (B) Tranzicionális B sejtek százalékos aránya. (C) Érett naív B sejtek százalékos aránya. (D) Plazmablasztok százalékos megoszlása. A sejtek százalékos arányát a CD19⁺ limfocita alcsoportban határoztuk meg. Minden pont egy egyént ábrázol. A vízszintes vonalak az átlag $\pm$ SD-t jelölik. Szignifikáns különbségek jelölése: p<0,05 (*); p<0,01 (**).

IV.1.7. A 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 változást tapasztaltuk szisztémás tünetekkel rendelkező pSS-ás betegeknél is ($3,578 \pm 0,901$ MFI vs. $2,961 \pm 0,585$ MFI; $p=0.0195$) (10. Ábra).



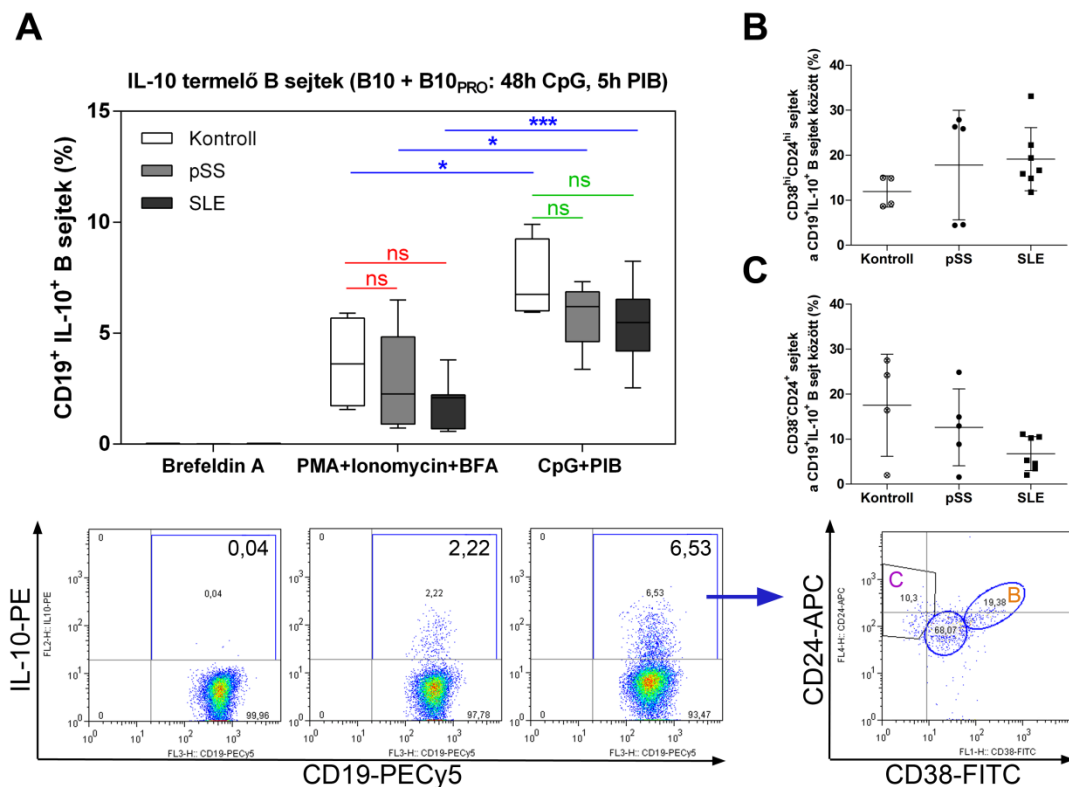
10. ábra IL-21 receptor expresszió $CD19^+$ B sejteken primer Sjögren-szindrómában

Vizsgálatunkban glanduláris tüneteket mutató ($n=14$), EGM-kal rendelkező betegek ($n=18$), illetve kontrollként szolgáló egyének ($n=24$) PBMC mintáiban, fluoreszcens festékkel konjugáltatott monoklonális antitestek segítségével vizsgáltuk a sejtek IL-21R expresszióját. Az értékek az átlagos fluoreszcencia intenzitást (mean fluorescence intensity; MFI) mutatják. A box plot-on látható vízszintes vonalak az átlag értéket, az antennák a minimum-maximum intervallumot jelölik. Szignifikáns különbségek jelölése: $p<0,05$ (*).

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. A 48 órán keresztül történő inkubáció utolsó 5 órájában az intracelluláris citokin detektálás hatékonyságának elősegítése céljából PIB koktéllal kezeltük

a sejteket. Első megállapításunk, hogy az IL-10 termelő B sejtek aránya a CpG-ODN+PIB reagensekkel aktivált csoportban, melyek a kezelés határása magukba foglalják a B10 és B10_{PRO} sejteket is, szignifikáns emelkedést mutatott a csak PIB koktéllal stimulált csoporttal

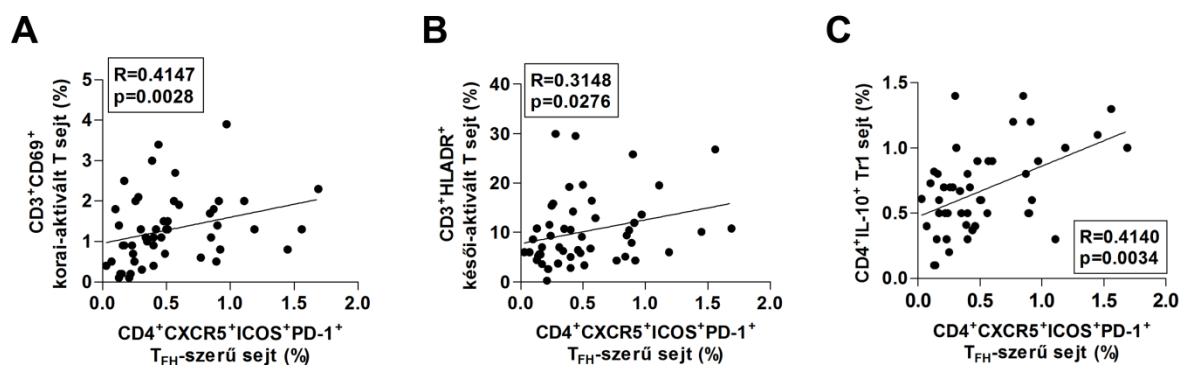


11. Ábra IL-10 termelő B sejtek vizsgálata pSS-ás, SLE-s betegek és egészséges kontroll személyek perifériás vérében. PBMC-t szeparáltunk, majd egy kisebb donor populáción [pSS (n=5), SLE (n=7) és kontroll (n=4)] vizsgáltuk az CD19⁺IL-10⁺B sejtek megoszlását CpG-ODN-dal indukált 48 órás aktivációt követően. Az inkubáció utolsó 5 órájában PMA + Ionomycin + brefeldin A (PIB) reagensekkel kezeltük a sejteket. A reprezentatív dot plot ábrák az IL-10⁺ sejteket jelölik a CD19⁺ limfocita populációban. (A) CD19⁺IL-10⁺ B sejtek aránya a kezelést követően a betegek és kontroll csoportok esetében. A sejtek százalékos arányát a CD19⁺ limfocita alcsoportban határoztuk meg. (B) CD38^{hi}CD24^{hi} fenotípusú sejtek aránya az IL-10 termelő B sejtek között. (C) CD38⁻CD24⁺ fenotípusú sejtek megoszlása az IL-10 termelő B sejtek között. A sejtek százalékos arányát a CD19⁺IL-10⁺ limfocita alcsoportban határoztuk meg. A box plot-on látható vízszintes vonalak átlag értéket, az antennák a minimum-maximum intervallumot jelölik (A). A dot plot-on látható vízszintes vonalak az átlag ± SD-t jelölik (B és C). Szignifikáns különbségek jelölése: p<0,05 (*); p<0,001 (***); ns: nem szignifikáns.

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. $1,907\% \pm 0,4094$; $p=0,0007$) (11A. Ábra, kék szín). Azonban a kezelést követően nem találtunk szignifikáns különbséget a csoportokon belül az egészséges személyek adatai és a beteg alpopulációk között, de azt megfigyeltük, hogy mindkét kórkép esetében az értékek lényeges csökkenést mutattak a kontrollhoz képest (11A. Ábra, piros és zöld szín). A továbbiakban vizsgáltuk az IL-10 termelő B sejtek fenotípusát, amely során azt tapasztaltuk, hogy pSS-ás és SLE-s betegek körében emelkedett a tranzicionális B sejt fenotípus (11B. Ábra), míg az elsődleges memória B sejtekre jellemző markerek expressziója csökkent az egészséges egyének értékeihez viszonyítva (11C. Ábra).

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

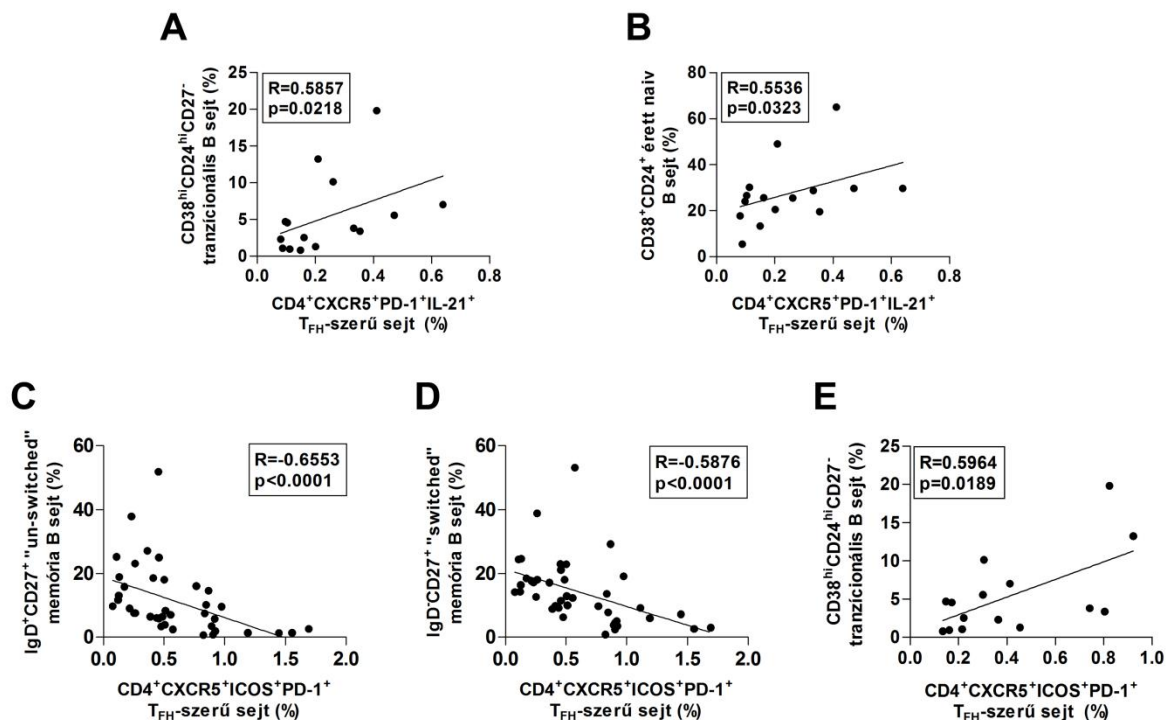
Az eredményeink statisztikai feldolgozása során szignifikáns pozitív korrelációt találtunk a perifériás T_{FH} -szerű sejtek százalékos aránya és a korai-aktivált T sejtek aránya között ($R=0,4147$; $p=0,0028$) (12A. Ábra). Ezt az összefüggést figyeltük meg a késői-aktivált T sejtek esetében is ($R=0,3148$; $p=0,0276$) (12B. Ábra). Továbbá, a Tr1 sejtekkel kapcsolatos eredmények feldolgozását követően szintén szignifikáns pozitív korrelációt tapasztaltunk a T_{FH} -szerű sejtek és a Tr1 sejtek megoszlása között ($R=0,4140$; $p=0,0034$) (12C. Ábra). Nem találtunk összefüggést más immunparaméterek és T_{FH} -szerű sejtek között.



12. Ábra Korrelációs számítások T_{FH} -szerű sejtek és T limfocita alcsoportok aránya között pSS-ban. Pozitív korreláció a T_{FH} -szerű sejtek és korai-aktivált T sejtek (A), késői-aktivált T sejtek (B), illetve a Tr1 sejtek (C) aránya között pSS-ás betegek (n=50) perifériás vérében. A változók közötti korrelációkat a Spearman-féle korrelációs koefficienssel határoztuk meg. Minden egyes pont egy egyént ábrázol.

IV.1.10. A keringő T_{FH} -szerű sejtek és B limfocita alcsoportok aránya közötti kapcsolatok vizsgálata extraglanduláris tüneteket 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 ($R=0,5857$; $p=0,0218$) (13A. Ábra), illetve a $CD19^+CD38^+CD24^+$ érett-naiv B sejtek aránya között ($R=0,5536$; $p=0,0323$) (13B. Ábra).

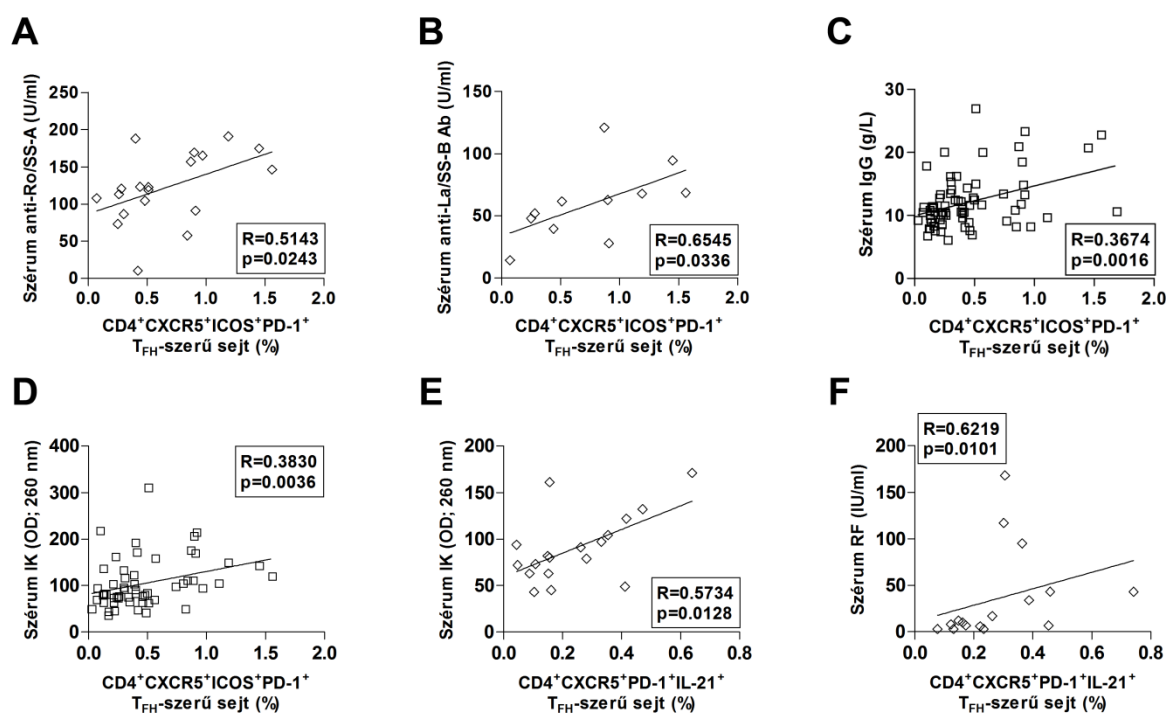


13. Ábra Korrelációs számítások T_{FH} -szerű sejtek és B limfocita alcsoportok aránya között szisztémás tüneteket mutató pSS-ás betegekben. Pozitív korreláció az IL-21 termelő T_{FH} -szerű sejtek és a tranzicionális B sejtek (A, n=15), illetve érett-naiv B sejtek (B, n=15) aránya között. Negatív korreláció a T_{FH} -szerű sejtek és az „un-switched” (C, n=40), illetve „switched” (D, n=40) memória B sejtek megoszlása között. Pozitív korreláció a T_{FH} -szerű sejtek és tranzicionális B sejtek (E, n=15) aránya között. A változók közötti korrelációkat a Spearman-féle (A-D), illetve a Pearson-féle (E) korrelációs együtthatóval határoztuk meg. Minden egyes pont egy egyént ábrázol.

Szintén szignifikáns pozitív korrelációt találtunk a T_{FH} -szerű sejtek és a tranzicionális B sejtek megoszlása között ($R=0.5964$; $p=0.0189$) (13E. Ábra). Ezzel szemben, szignifikáns negatív korrelációt igazoltunk mind a $CD19^+IgD^+CD27^+$ „un-switched” memória B sejtek és T_{FH} -szerű sejtek ($R=-0.6553$; $p<0.0001$) (13C. Ábra), mind a $CD19^+IgD^-CD27^+$ „switched” memória B sejtek és T_{FH} -szerű sejtek aránya között ($R=-0.5876$; $p<0.0001$) (13D. Ábra). 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

Ezután megvizsgáltuk a T_{FH}-szerű sejtek megoszlásának változását az autoantitest szintek függvényében. 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 (14A és 14B. Ábra). 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 (14C és 14D. Ábra).



14. Ábra Korrelációs számítások T_{FH}-szerű sejtek aránya és a vizsgált szerológiai paraméterek között pSS-ban. Pozitív korreláció a T_{FH}-szerű sejtek megoszlása és anti-SSA (A, n=19), illetve anti-SSB (B, n=11) autoantitestek szintje között. Pozitív korreláció a T_{FH}-szerű sejtek és szérumban mért IgG (C, n=71) és IK (D, n=56) titere között. Pozitív korreláció az IL-21⁺ T_{FH}-szerű sejtek és a szérumban mért IK (E, n=18) és RF (F, n=16) szintje között. A változók közötti korrelációkat a Spearman-féle (A-D és F), illetve a Pearson-féle (E) korrelációs koefficienssel határoztuk meg. Minden egyes pont egy egyént ábrázol.

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) (14E. Ábra). 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) (14F. Ábra).

IV.1.12. Korrelációs számítások a perifériás B sejt alcsoportok aránya és a vizsgált szerológiai paraméterek között

Eredményeink további statisztikai kiértékelése során mindkét betegségben tanulmányoztuk a B sejt alpopulációk megoszlása és a rutin diagnosztikai vizsgálat során mért szerológiai paraméterek között fennálló lehetséges összefüggéseket. A korrelációs analízis elvégzését követően kapott eredményeket az 5. Táblázat szemlélteti.

Asszociáció	Betegség	Változó	Korrelációs koefficiens	p-érték
Pozitív	pSS	CD19 ⁺ CD38 ^{hi} CD24 ^{hi} CD27 ⁻ tranzicionális B sejt vs. szérum IgG szint	Spearman R=0,4884	0,0181
		CD19 ⁺ CD38 ^{hi} CD27 ^{hi} plazmablaszt vs. szérum IK szint	Spearman R=0,4907	0,0387
	SLE	CD19 ⁺ CD38 ^{hi} CD27 ^{hi} plazmablaszt vs. szérum anti-dsDNA szint	Spearman R=0,5320	0,0090
Negatív	SLE	CD19 ⁺ CD38 ^{hi} CD24 ^{hi} CD27 ⁻ tranzicionális B sejt vs. szérum C3 szint	Pearson R=-0,4914	0,0172

5. Táblázat Perifériás B sejt alcsoportok megoszlása és a szerológiai paraméterek közötti asszociáció vizsgálata

IV.2. Szövettani vizsgálatok eredményei primer Sjögren-szindrómában

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

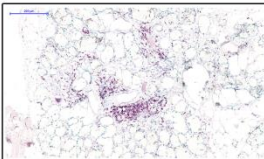
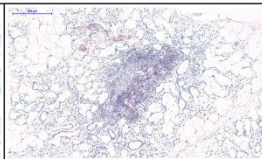
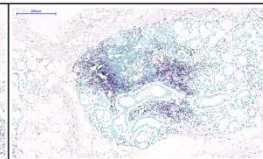
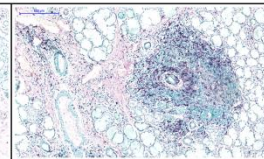
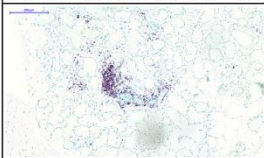
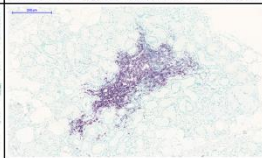
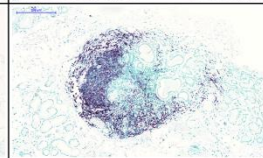
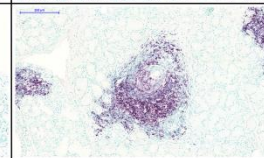
A vizsgálatunkban részt vett 10 pSS-ás beteg átlagos életkora a diagnózis felállításakor 50,80 ± 10,34 év, a betegség fennállásának időtartama pedig átlagosan 7,40 ± 3,10 év volt. Retrospektív adatelemzésünk során összevetettük a pSS diagnózisának felállításakor és a

vizsgálat időpontjában rögzített klinikai és laboratóriumi paramétereket. Tanulmányoztuk a követési periódus alatt jelentkező szisztémás tünetek és laboratóriumi eltérések, illetve a diagnózis időpontjában tapasztalt korai klinikopatológiai eredmények közötti kapcsolatot. A FS értékek alapján a betegeket két csoportra osztottuk: a FS=2 csoportot 3 személy, míg a FS=3 csoportot 7 egyén alkotta. A populációba nem tartozott olyan beteg, akinek a szövettani eredményei alacsonyabbnak bizonyultak a 2-es FS értéknél. Megfigyeléseink szerint, a vizsgálat időpontjában mért T_{FH}-szerű sejtek százalékos aránya célzatosan emelkedett a magasabb FS értékeket mutató betegek esetében (pSS FS=3 vs. kontroll: 0,86% ± 0,38 vs. 0,32% ± 0,12 és pSS FS=3 vs. pSS FS=2: 0,86% ± 0,38 vs. 0,33% ± 0,08). 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. Az EGM-k a következők voltak: polyarthrit (n=3), Raynaud-jelenség (n=2), lymphadenopathia (n=1), pulmonalis fibrosis (n=1) és asszociált kórképként primer biliaris cirrhosis (n=1), illetve primer szklerotizáló cholangitis (n=1).

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 kiterjedtségének és strukturális felépítésének osztályozásakor négy fokozatot különítettünk el. A szervezetségi szintek elkülönítésének kritériumai a 15. Ábrán olvashatók. 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 elrendeződéseket mutatták, kifejezetten csak a

FS=3 csoportban tapasztaltunk. A 4-es grádusú gyulladásos infiltrátum morfológiája a másodlagos nyirokszövetekben megtalálható GC-okhoz hasonló jellemvonásokat mutatta, a centrális régióban kiterjedt CD21 expresszióval, amely a FDC hálózat azonosító markere. Azonban az utóbbi elrendeződéssel rendelkező aggregátumokat csak 3 biopszia esetében sikerült diagnosztizálnunk. Jellemzően a kisnyálmirigy biopsziás minták egy metszeten különböző grádusú infiltrátumokat tartalmaztak, különösképpen igaz volt ez a megfigyelés a magasabb FS értékekkel rendelkező mintákra.

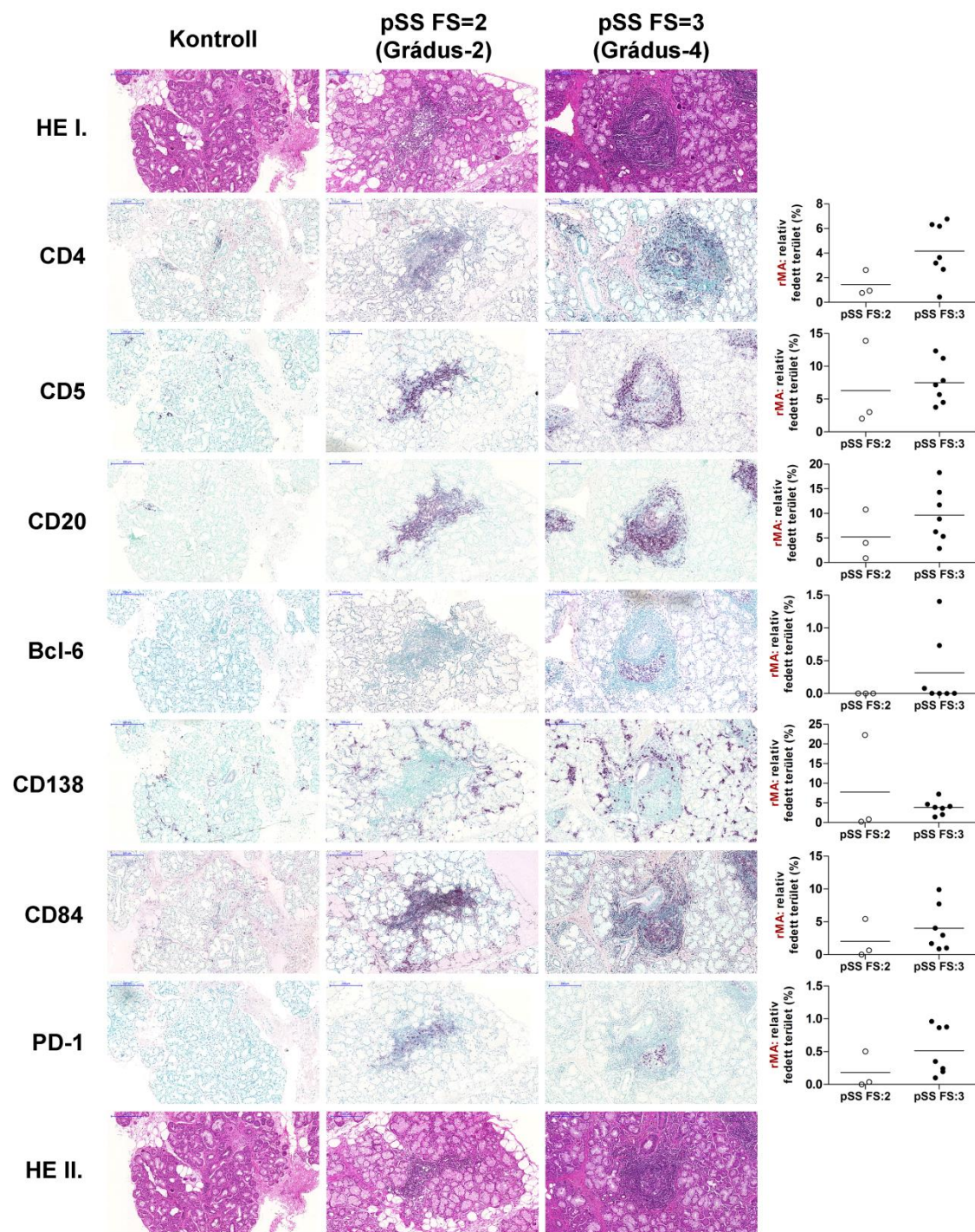
CD4				
CD20				
	Grádus-1: elszórtnan, kevés számban perivaszkulárisan elhelyezkedő limfociták <i>pSS FS:2 (n=1)</i> <i>pSS FS:3 (n=3)</i>	Grádus-2: kiterjedt területű, közepes mértékben szerveződött limfocitás beszűrődés <i>pSS FS:2 (n=2)</i> <i>pSS FS:3 (n=7)</i>	Grádus-3: szervezettebb, szeparált T- és B sejt zónákból álló periduktális limfocita aggregátum <i>pSS FS:2 (n=0)</i> <i>pSS FS:3 (n=6)</i>	Grádus-4: elkülönült T- és B sejt területéből álló, jól organizált periduktális lokalizált gyulladásos infiltrátum <i>pSS FS:2 (n=0)</i> <i>pSS FS:3 (n=3)</i>

15. Ábra A kisnyálmirigy biopsziás minták szövettani osztályozása a „focus score” és periduktális sejtes infiltrátum grádus alapján pSS-ban. IHK módszerrel CD4 és CD20 markerek segítségével vizsgáltuk a limfocitás beszűrődés mértékét és szervezettségét. Eredményeink alapján 4 különböző grádust állapítottunk meg. A digitalizált tárgylemezek nagyítása 10x, a méretarány vonal 200µm. FS: „focus score” érték, n: olyan biopsziás minták száma, amely az adott grádusú elrendeződést mutatta.

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

A beszűrődött sejtek specifikus markereinek előfordulását és denzitását az aggregátumokban sorozatmetszetek immunhisztokémiai festésével vizsgáltuk. A CD4, CD5, CD20, CD138, PD-1, CD84 sejtfelszíni molekulákat és Bcl-6 transzkripciós faktort expresszáló sejteket mind a

FS=2, mind a FS=3 betegcsoportban detektáltunk, de a markerek kifejeződésének sűrűsége és a sejtek elhelyezkedése alapján különbségeket fedeztünk fel a két csoport között (16. Ábra). 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. A CD138 marker alapján azonosított plazmasejtek kimondottan az infiltrátumokon kívül, szórványosan helyezkedtek el a biopsziás minta teljes felületén. Ezzel szemben, a FS=3 csoportban a sejt-specifikus markerek eloszlása eltérő mintázatot ábrázolt, amely összefüggésben állt az aggregátumok szervezettebb morfológiájával. A CD4⁺ T sejtek meghatározóan a sejtbeszűrődések periferiáján lokalizálódtak és esetenként a sejtek, amelyek penetrálták a ductusok epitéliumát, szintén CD4 expressziót mutattak. A CD5 markert elsősorban a T sejt régióban az infiltrátum külső területén detektáltuk és a B sejt zónában csak kevés sejt bizonyult pozitívnak. A CD20⁺ B sejteket dominánsan a gyulladásos fókusz centrális régiójában figyeltük meg. Hasonlóan a FS=2 csoportban észleltékhez, a CD138⁺ plazmasejtek esetében az infiltrátumon kívül szintén elszórt mintázatot tapasztaltunk, de ebben a csoportban e sejteket különös módon a fókuszon belül a B sejt 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, nagyjából a B sejtek szomszédságában sikerült azonosítanunk. A leglényegesebb eltérés a két csoport között a Bcl-6 expresszióban mutatkozott; ugyanis a markert kizárólag a FS=3 csoportban tudtuk kimutatni. A csoporton belül is különbséget fedeztünk fel a különböző grádusba sorolható aggregátumok között; míg a 3-as grádusú szerveződésben a Bcl-6⁺ sejtek alacsonyabb intenzitású kifejeződést és elszórt elrendeződést mutattak, addig a 4-es grádusú gyulladásos

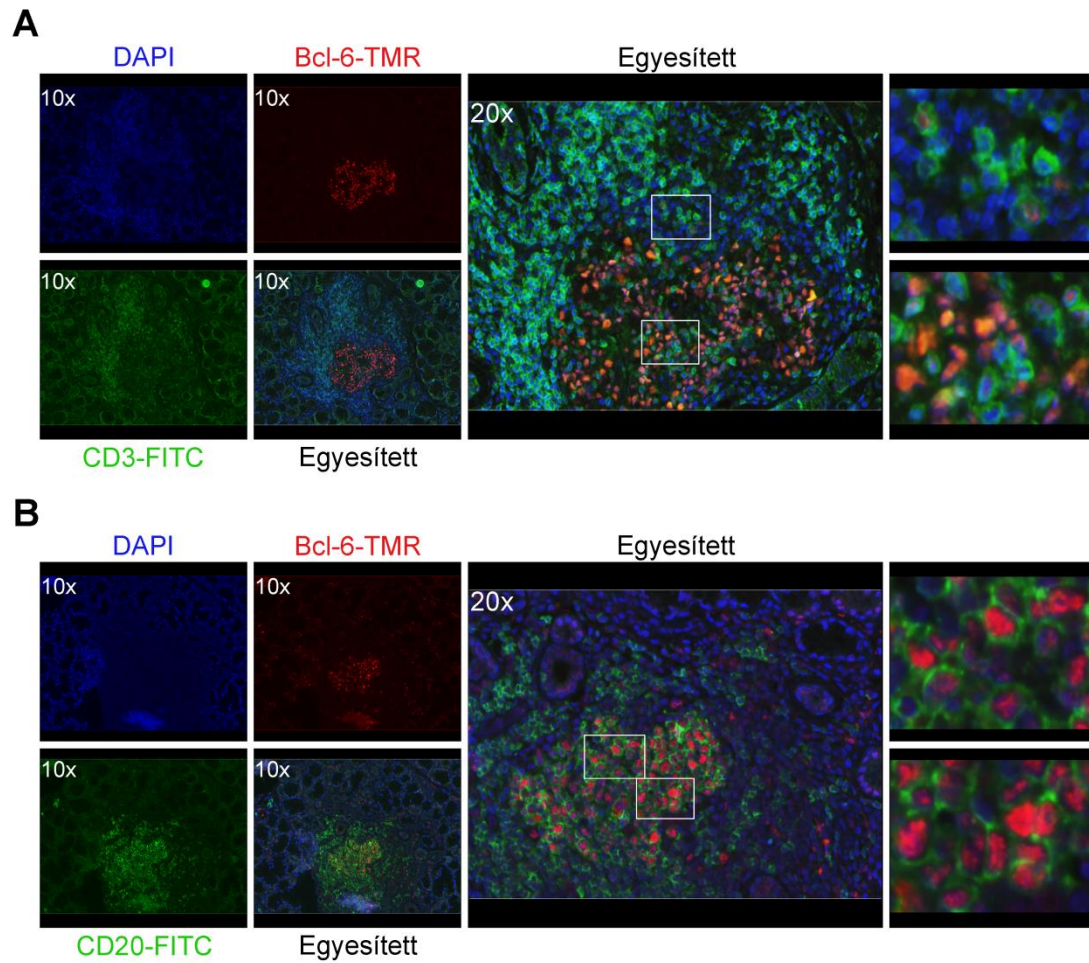


16. Ábra A gyulladásos infiltráció immunhisztokémiai jellemzése kisnyálmirigy biopsziás mintákon pSS-ban. A reprezentatív képek kontroll, 2-es grádusú és 4-es grádusú aggregátumokat ábrázolnak. Sorozatmetszeteket hematoxilin-eozin (HE) festés mellett IHK módszerrel vizsgáltuk, különös tekintettel a T_{FH}-markerek expressziójára. A digitalizált metszetek kvantitatív kiértékelése a relatív fedett terület (rMA %) meghatározásával történt. Nagyítás mértéke 10x, a méretarány vonal 200µm.

fókuszokban erőteljesen expresszáldó és centrálisan csoportosuló Bcl-6⁺ sejteket detektáltunk. Következő lépésben a sejt-specifikus markerek denzitásának pontosabb megítélése céljából digitalizált tárgylemezeken kvantitatív méréseket végeztük. A limfocitás aggregátumok átlagos mérete nagyobb volt a FS=3 csoportban a FS=2 csoporthoz képest [medián (minimum-maximum): 0,3114 mm² (0,095-0,642) vs. 0,1927 mm² (0,058-0,566)] és a T_{FH}-B sejt interakcióban résztvevő markerek expressziója magasabbnak igazolódott a nagyobb FS értékkel rendelkező biopsziás mintákban (16. Ábra).

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

Tanulmányunk utolsó részében arra kerestük a választ, hogy a Bcl-6 expresszió csak a beszűrődött CD20⁺ B sejtekre jellemző vagy kimutatható a CD3⁺ T sejtekben is. Annak igazolására, hogy a CD3⁺Bcl-6⁺ T sejtek megtalálhatók a kisnyálmirigy biopsziás mintákban kialakuló ektópiás GC-ban, kettős immunfluoreszcens jelölést kivitelezünk Bcl-6 és CD3 vagy CD20 markerekkel. Vizsgálatunkkal bebizonyítottuk, hogy az infiltrátumot alkotó T sejtek egy része pozitív Bcl-6 transzkripció faktorra és a két marker ko-expressziójával T_{FH} sejtek jelenlétét mutattuk ki az aggregátumban (17A. Ábra). A Bcl-6 és CD20 markerek együttes kifejeződésével az infiltrátum centrális régiójában jellegzetes GC morfológiát igazoltunk (17B. Ábra).



17. Ábra Kettős immunfluoreszcens vizsgálat a Bcl-6-CD3 és Bcl-6-CD20 ko-expressziójának megerősítésére pSS-ás betegek kisnyálmirigy biopsziás mintáin. A reprezentatív minta egy FS=3 csoportba tartozó 4-es grádusú szervezetséget mutató gyulladásos infiltrátumot ábrázol. (A) Bcl-6 T_{FH}-marker és CD3 T sejt marker kettős IF jelölése. (B) Bcl-6 T_{FH}-marker és CD20 B sejt marker kettős IF jelölése. A bekeretezett területek a jobb oldalon látható kinagyított képeket jelzik, abban a sorrendben, ahogy az egyesített képen is szerepelnek.

V. MEGBESZÉLÉS

A pSS és SLE pathogenezise az immunrendszer mindkét ágát – a veleszületett és adaptív immunitást - érintő, komplex immunológiai folyamat. Az autoimmun betegségek egyik jellemző immunszabályozási zavara az autoreaktív B sejtklónok felszaporodása, amelynek szerológiai megnyilvánulása az emelkedett immunglobulin szint és fokozott autoantitest termelődés, illetve patológiás mértékű immunkomplex képződés. Azonban 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. Fiziológiai 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 [129]. Az immunrendszer érése során a csontvelőben zajló centrális tolerancia következtében funkcionális BCR-al rendelkező, éretlen vagy tranzicionális B sejtek keletkeznek, amelyek a lépbe, illetve a perifériás nyirokszövetekbe vándorolnak. Korai ún. „ellenőrzési pont” található a tranzicionális és érett-naív B sejt fejlődési szakaszban is, amely elősegíti az autoreaktív/polireaktív B sejtek redukálását a periférián [130]. Ebben a stádiumban keringő sejtek fejlődési programja ezt követően elágazik és MZB vagy FO alakulnak [121]. Utóbbiak a másodlagos nyirokszövetekbe vándorolnak és az adaptív immunválasz központi szereplőjeként újabb szelekciós folyamaton mennek keresztül. Ez a késői perifériás tolerancia a másodlagos follikulusok GC-ában T_{FH} sejtek és FDC-ek közreműködésével zajlik, amelyek szelekciós és túlélő szignálokat biztosítanak a már aktivált B sejtek számára, biztosítva a csíráközpontban végbemenő folyamatok lebonyolítását [121, 131, 132]. 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, mely megfigyelés összhangba hozható számos korábbi vizsgálattal [129, 133, 134]. 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 [130, 135-137]. 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 [138]. Korábban tapasztaltakhoz hasonlóan [123, 138, 139], 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 e 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 belépését jelezheti [138]. A B limfocita érés következő fejlődési állomása a felszínükön

funkcionális immunglobulin molekulákat kifejező érett-naiv B sejtek kialakulása, amelyek a másodlagos nyirokszövetek follikulusai felé vándorolnak és megfelelő antigén hatására aktiválódva extrafollikuláris vagy GC válaszokat indítanak el [121, 140, 141]. Természetesen, a korai perifériás tolerancia defektusa szintén a fiziológiás állapottól eltérő, magasabb autoreaktív érett-naiv sejtarányt eredményezhet [136]. 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 a szakirodalomban leírtaknak megfelelően [138, 142-146] 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 [129, 130, 133, 147]. 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 utalhat. Legújabb irodalmi adatok szerint, az SLE-s betegek „un-switched” memória B sejtjei magas szinten expresszálják az AID enzimet, melynek aktivitása elengedhetetlen mind a SHM-k, mind az

izotípusváltás létrejöttéhez [129]. A fentiekén kívül a jelenség a „switched” memória B sejtek alacsony aránya a nagymértékű plazmasejt irányú differenciációval vagy pSS-ban a CD27 molekula sejtfelszínről történő leválással is magyarázható [146]. Kísérleteink során $CD19^+CD38^-CD24^{hi}CD27^+$ elsődleges memória B sejteket is azonosítottunk, melyek eloszlása SLE-ben hasonló tendenciát követett az „un-switched” memória B sejtekkel és mérsékeltebb arányuk korrelált a betegség aktivitásával. A memória B sejtek egy újabb csoportját, az ún. $CD19^+IgD^-CD27^-$ 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 expanzióját, 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 betegekénél nem találtunk kapcsolatot a betegség aktivitásával. A közelmúltban publikált adatok alapján, ezek a sejtek különböző sejtfelszíni markerek kifejeződése által heterogén csoportot alkotnak, de többnyire a CD95 molekulát expresszáló csoport a legelterjedtebb. A sejtek aktivált állapotban vannak, azonban a CXCR3 receptor kizárólagos expressziója és a többi kemokin hiánya végett feltételezik, hogy jelenlétük abnormális extrafollikuláris differenciáció eredménye és további fejlődésük T sejtektől függetlenül megy végbe. Továbbá, a CXCR3 receptor kifejeződése végett a gyulladás területére is vándorolhatnak [129, 148, 149]. 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 hátterét 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 [150]. Ezzel szemben SLE-ben a plazmasejtekkel kapcsolatban károsodott „homing” folyamatot írtak le, továbbá a plazmasejt irányú differenciáció is jóval kifejezettebb, mint pSS-ban, amely indokolja a magasabb sejtarányok kialakulását [151]. A plazmasejttéérés 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 és fenotípusát hipometilált CpG motívumot tartalmazó bakteriális DNS-t mimikáló 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 [152]. A csoporton belül, konkrét fenotípus hiányában, számos sejtfelszíni marker alapján azonosíthatók. A humán Breg sejteket többségében CD19⁺CD38^{hi}CD24^{hi} és CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ B sejtként definiálják [123, 153], amelyek kostimulációt követően IL-10 szekréció útján szuppresszálják a target sejtet [124]. Irodalmi adatok szerint, olyan szisztémás autoimmun kórképekben, mint SLE és RA, a sejtek számbeli és funkcionális defektusát írták le [123, 152, 154, 155]. 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. Viszont egyes közlemények szerint, a B10 sejtek aránya növekedik autoimmun betegségekben, sőt, MRL/lpr egerekkel végzett kísérletek szerint az IL-21 citokin elősegíti a Breg sejtek IL-10 termelését [156]. Fontos megjegyezni, hogy e sejtek tanulmányozása

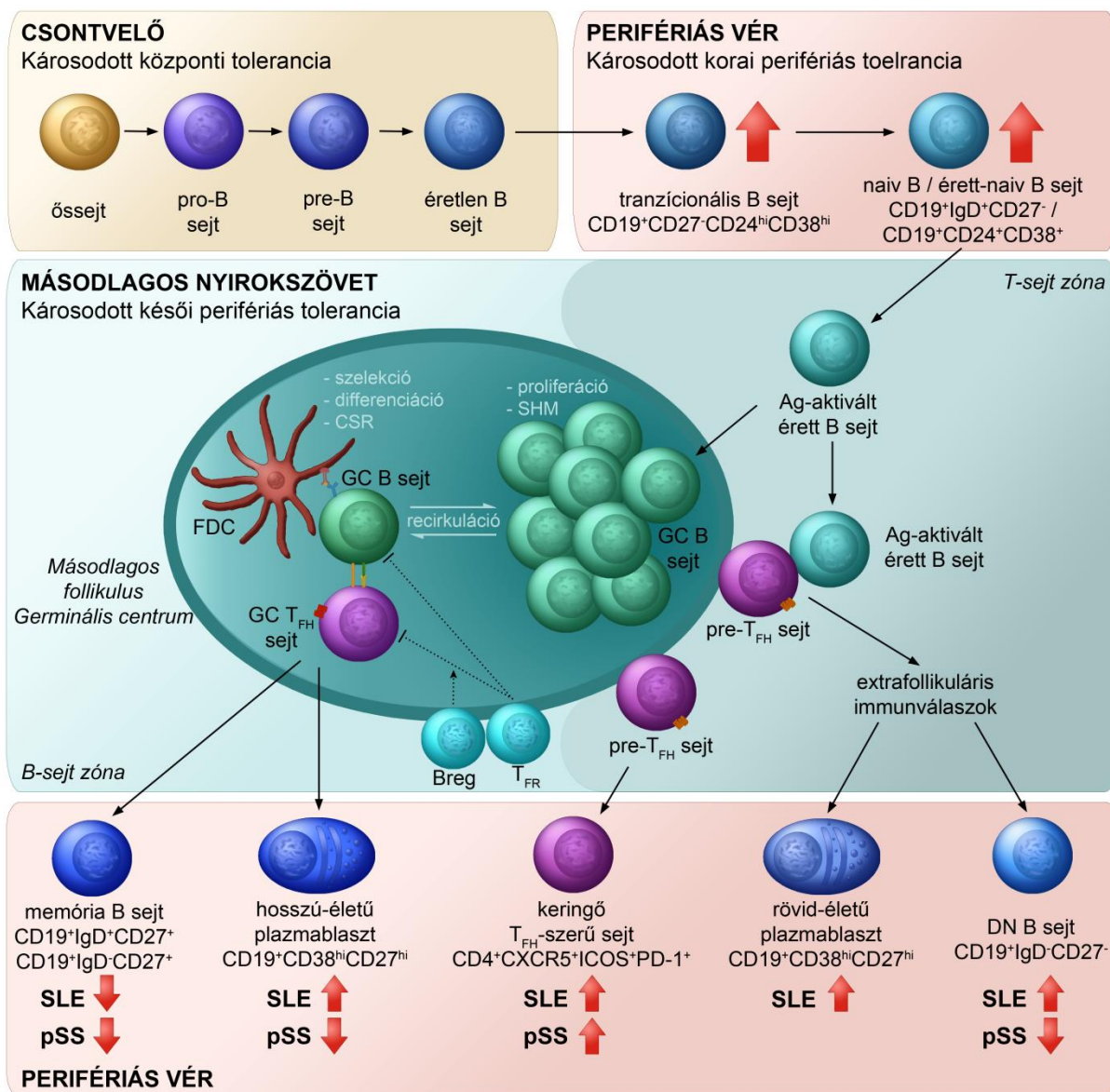
napjaink kutatásának fókuszában áll és további vizsgálatok szükségesek az ellentmondásos eredmények tisztázására.

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. Eredetüket tekintve bizonyított, hogy az effektor T_{FH} sejtvonalból származnak, azonban még a teljesen differenciált, érett T_{FH} állapot elérése előtt elhagyják a GC-ot [109, 113, 157]. Legfrissebb tanulmányok szerint, a cirkuláló T_{FH} -szerű sejtek memória $CD4^+$ T sejteknek tekinthetők, amelyek különböző fenotípusú sejtekből álló, heterogén csoportot alkotnak [111]. A periférián az ICOS/PD-1/CCR7 sejtfelszíni markerek alapján centrális vagy effektor memória sejt alosztályokba, a CXCR3/CCR6 kemokin receptorok expressziójával pedig T_{FH1} , T_{FH2} , illetve T_{FH17} sejt irányba polarizálódó alcsoportokba sorolhatjuk a T_{FH} -szerű sejteket. Funkciójukat a csíráközponton kívül is megőrzik, továbbá igazolták, hogy a T_{FH2} és T_{FH17} alcsoport $ICOS^+PD-1^{++}CCR7^{lo}$ fenotípust mutató sejtjei képesek leghatékonyabban támogatni a B sejt válaszokat [112, 113]. Az elmúlt évek intenzív kutatásainak köszönhetően már humán vonatkozásban is emelkedett perifériás T_{FH} -szerű sejtarányt mutattak ki autoimmun betegségben; nevezetesen SLE-ben, RA-ban, juvenilis dermatomyositisben, autoimmun thyreoiditisben és myastenia gravisban [113, 158-161], azonban e sejtek más immunsejtekhez fűződő kapcsolatát és asszociációját a laboratóriumi paraméterekkel, illetve klinikai tünetekkel még nem vizsgálták. 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 autoantitest 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 a Vav1 fehérjén és PI3K szignál útvonalon keresztül aktiválja a sejtet [99]. A citokin termelése az ICOS által indukált c-Maf útvonalon keresztül zajlik, amely további T_{FH} markerek expresszióját segíti elő, továbbá a szekretált IL-21 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 [94, 162]. Ezen tények tudatában vizsgáltuk a szolubilis IL-21 szintjét pSS-ban szenvedő betegekben és magasabb T_{FH}-szerű sejtarányt találtunk abban a betegpopulációban, amelyben detektálható mennyiségű IL-21 citokint mértünk a szérumban, valamint eredményünk korrelált az extraglanduláris panaszok jelenlétével. Egy független pSS-ás betegcsoportban elemeztük az IL-21R kifejeződését a CD19⁺ B sejteken. Ismert tény, hogy a GC B sejtek maximális Bcl-6 expressziójához IL-21R szignál útvonalon keresztüli aktiváció szükséges [163]. Munkánk során igazoltuk, hogy a B sejteken fokozódik az IL-21 expresszió mértéke, amely ráadásul korrelál az EGM-k jelenlétével is. További kísérleteink során, mind pSS-ban, mind SLE-ben megnövekedett az IL-21 termelő T_{FH}-szerű sejtek aránya, mely megfigyelésünk összhangban van az irodalmi adatokkal [155, 164-169]. Megjegyzendő, hogy szignifikáns emelkedést pSS-ban kizárólag a szisztémás tüneteket és autoantitest pozitivitást mutató betegpopulációkban tapasztaltunk, míg SLE-ben a teljes betegcsoportban magasabb volt az IL-21⁺ T_{FH}-szerű sejtek megoszlása, amellet, hogy ez a tendencia markánsabbnak bizonyult az aktív stádiumú és anti-dsDNS pozitív betegnél. Eddigi eredményeink és az elmúlt években más kutatócsoportok által publikált adatokban eltérések lehetnek a T_{FH}-szerű sejtek fenotípusát

illetően, de egyetértés van abban, hogy a perifériás vérben keringő T_{FH} -szerű sejtek esszenciális szerepet töltenek be az autoimmun folyamatokban, továbbá emelkedett arányuk a betegség súlyosságát is tükrözi. A B-, és T_{FH} sejt kísérleteinkből származó eredmények grafikus összefoglalása a 18. Ábrán látható.



18. Ábra Összefoglalás a perifériás vérben végzett kísérleteink eredményeiről primer Sjögren-szindrómában és szisztémás lupusz erythematosusban. Fiziológias körülmények között a B sejt fejlődés folyamatában számos „ellenőrzési pont” biztosítja az autoreaktív B sejtek eliminációját. A tolerancia károsodása és a T_{FH} sejtek fokozott aktivációja kóros B sejt válaszok kialakulásához, majd autoimmun kórkép kifejlődéséhez vezet. Ezek a folyamatok abnormális B sejt megoszláshoz és emelkedett T_{FH} -szerű sejtarányhoz vezetnek a perifériás vérben.

Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a T_{FH} sejtek differenciálódása egy integráltmodellelírható le, amely a sejtek aktivációjából, az aktivált állapot fenntartásából és egy teljesen polarizált stádiumból áll [103]. A naiv Th sejtek stimulációjához a hivatásos APC-k és a Th sejtek kölcsönhatása kell, ezért feltételezhetjük, hogy a T_{FH} sejtek kezdeti differenciációjához szükséges IL-12 citokin forrásaként a másodlagos nyirokszövetekben vándorló aktivált DC-k szolgálnak. Habár az IL-12 általi aktiváció a STAT4 jelátviteli pályán keresztül fejt ki hatását, számos munkacsoport demonstrálta, hogy humán T_{FH} sejtek esetében ez a folyamat hatékonyabban valósul meg STAT3-függő módon. Továbbá azt is sikerült kimutatniuk, hogy az IL-12 képes fokozni nemcsak a CD40L és ICOS, hanem a CXCR5, Bcl-6 és IL-21 expressziót is, előzmódítva a T_{FH} fenotípus kialakulását [91, 90, 170]. 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.

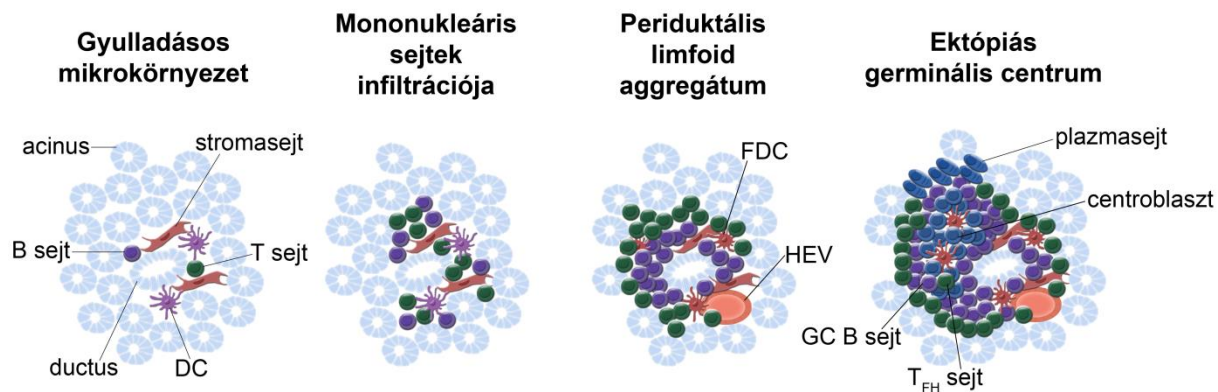
Munkánk során a T_{FH} -szerű sejtek mellett széleskörűen vizsgáltuk az immunkompetens sejtek és laboratóriumi paraméterek változását is, ezáltal a nemzetközi irodalomban elsőként komplex képet kialakítva a sejtek szerepéről pSS-ban. Munkacsoportunk korábban demonstrálta, hogy a korai-aktivált T és T_{H1} sejtek aránya emelkedik pSS-ás betegek perifériás vérében, sőt a szisztémás tüneteket mutatóknál ez a változás kifejezettebb [171, 172]. 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 T_{H1} 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. Tanulmányunk további célja volt a T_{FH} -szerű sejtek, különböző B sejt alcsoportokkal fennálló kapcsolatának feltérképezése pSS-ás betegek perifériás vérében.

Az eltérő fejlődési szakaszban lévő B sejtek rendellenes megoszlásáról és lehetséges magyarázatáról már korábban írtam. Megfigyeléseinket párhuzamba állítva a T_{FH}-szerű sejtes eredményeinkkel, elmondhatjuk, hogy a tranzicionális B sejtekkel és érett-naív 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. Az IL-21 termelő T_{FH}-szerű sejtek aránya és a szérum IK, illetve RF szintje között is pozitív összefüggést tapasztaltunk. Megfigyelésünk alapján elmondható, hogy a T_{FH}-szerű sejtarány növekedésével párhuzamosan felerősödnek a GC-ban zajló folyamatok, amelyek közvetetten a klinikai kép súlyosbodásához vezethetnek.

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 [173, 174]. Korábbi közleményekben már foglalkoztak a kisnyálmirigyekben észlelhető gyulladásos környezet sejtjeivel és igazolták a T és B sejtek, illetve kisebb arányban makrofágok és DC-ek jelenlétét pSS-ás betegek mintáiban [51, 175-177], melyek eloszlása pozitívan korrelált a gyulladás súlyosságával. Később, a

további sejttípusokat, mint például Foxp3⁺ és IL-17 termelő sejteket is sikerült detektálni [178, 179]. Egy közelmúltban publikált tanulmányban, Kang és munkatársai kisnyálmirigy mintákban az IL-21 és CXCR5 ko-expresszióját figyelték meg, amely felvetette a T_{FH} sejtek jelenlétének további kutatását [180]. Ezt követően, Maehara és munkatársai vizsgálták a beszűrődött T limfocita alcsoportok fenotípusát és leírták, hogy Th2 és bizonyos T_{FH}-specifikus markerek expressziója összefüggést mutat az infiltráció mértékével, illetve az ektópiás GC-ok kialakulásával [181]. Fontos megemlíteni még Gong és munkatársainak munkáját is, amely *in vitro* körülmények között bemutatta, hogy az epithelsejtek képesek a T_{FH} sejtek differenciációjának és IL-21 termelésének elősegítésére, ezáltal rávilágítva a kisnyálmirigy epithelsejteinek lehetséges patológiás szerepére [182]. Munkacsoportunk is a T_{FH} fenotípusra jellemző markerek eloszlását elemezte, de 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 T sejtekből, centrális zónában B sejtekből és FDC-ekből álló ektópiás GC struktúrákat kizárólag a FS=3 csoportban, 4-es grádusú infiltrátumok esetében találtunk. A T_{FH} markerek, nevezetesen a CD84, PD-1 és Bcl-6 expressziója markánsabbnak bizonyult a FS=3 csoportban. Irodalmi adatokból ismert, hogy a SLAM receptor családba tartozó CD84 felelős a T_{FH}-B sejtek közötti szoros kontaktus kialakításáért, amely kapcsolat két sejt közötti interakció felerősítését eredményezi [183]. A T_{FH} sejtek funkciójának kiteljesedésében hasonlóan fontos szerepe van a PD-1 receptornak is, úgy, hogy szabályozza a B sejtek szelekcióját és túlélését a GC-ban [184]. A markerek vizsgálata során azonban a legszembetűnőbb eltérést a Bcl-6 esetében tapasztaltuk, melynek

expressziója csak a 4-es grádusú limfoid aggregátumokra korlátozódott és kolokalizációt mutatott a B sejt zónával. A 3-as grádusú infiltrátumokban ugyan detektáltunk alacsony szintű Bcl-6 expressziót, de elhelyezkedésük már nem ábrázolt jellegzetes képet. 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 [185]. Irodalmi adatok alapján, a BCL6 gén defektusa SHM és izotípusváltás hiányával járó, károsodott GC folyamatokhoz vezet, így kiemelve a Bcl-6 jelentőségét a csíráközpontozóhoz kötött immunválaszban [86]. Humán eredetű mintákkal folytatott kísérletekben is sikerült igazolni a GC reakció fenntartásában betöltött szerepét, továbbá kimutatták, hogy a fejletlenebb aggregátumokkal ellentétben csak a tényleges ektópiás GC-okban detektálható a Bcl-6 [186, 187]. Éppen ezért, munkacsoportunk is különös figyelmet fordított a Bcl-6 molekula kifejeződésére kisnyálmirigy biopsziás mintákban. Kettős immunfluoreszcens festéssel sikerült kimutatnunk, hogy a CD20⁺Bcl-6⁺ B sejtés 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 sejtés zónájának közelében (19. Ábra). Azonban, valódi GC-szerű struktúrákat csak a súlyos szövetdestrukcióval és kiterjedt gyulladásos infiltrátummal rendelkező, FS=3 csoportba sorolt mintákban tudtunk azonosítani. Eredményeink összhangban vannak azzal a megfigyeléssel is, miszerint pSS-ás betegekből származó kisnyálmirigy mintákban, a szervezettebb struktúrájú limfocita aggregátumok expresszálták az AID enzimet, amelynek aktivitása a Bcl-6 által szabályozódik és szükséges a SHM-k és izotípusváltás megvalósulásához [50]. 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



19. Ábra Primer Sjögren-szindrómás betegek kisnyálmirigyében megfigyelhető ektópiás germinális centrum képződés folyamatának grafikus ábrázolása. A gyulladás kezdeti stádiumában aktivált T sejtek, B sejtek és DC-ek infiltrálódnak a ductus körül. A strómasejtek és az epithelsejtek által szolgáltatott kemokin-, illetve aktivációs szignálok egy szervezettebb morfológiájú limfoid aggregátum kifejlődését idézik elő. Az egyértelműen elkülöníthető T- és B sejt régiókból álló, jól organizált periduktális gyulladásos infiltrátum, amely centrálisan Bcl-6⁺ B sejtekből, T_{FH} sejtekből és FDC hálózattól áll, ektópiás GC-nak tekintjük.

T_{FH} sejtek jelenléte és a kórlefolyás alatt jelentkező extraglanduláris manifesztációk kifejlődése között. Továbbá, azoknál a pSS-ás betegeknél, akiknél a T_{FH} markerek emelkedett expresszióját detektáltunk az infiltrátumban, az ezt követő perifériás vizsgálatunkban is magasabb T_{FH}-szerű sejtarány tapasztaltunk. Természetesen figyelembe kell venni, hogy a szövettani vizsgálatba bevonható alacsony betegszám miatt nem végezhattünk statisztikai számításokat. Összefoglalásként elmondható, hogy kísérleteink során sikerült rávilágítanunk a T_{FH} sejtek autoimmun folyamatokban betöltött pathológiás 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 patológias kapcsolat feltérképezése volt. Mindkét betegségben magas naív 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-naív 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 szérumszintű 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. Érdekességgé, 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.

SUMMARY

The immunopathogenesis of pSS and SLE are highly complex and are associated with both the adaptive and innate branches of the immune system. Pronounced B-cell hyperactivity appears to be the hallmark of diseases. T_{FH} cells have a crucial role in regulating immune responses within secondary lymphoid follicles by directing B cell differentiation toward memory B cells and plasma cells. Since abnormal humoral responses are key features in both diseases, the aim of this study was to profile the pathological connection between peripheral T_{FH} cells and B cells. We observed higher percentages of naive B cells in both diseases, while non-switched and switched memory B cells showed decreased frequencies. The proportions of DN B cells and plasmablasts were elevated in SLE and decreased in pSS. The percentages of transitional B cells and mature-naive B cells were higher in SLE. Patients with more severe disease course had elevated ratio of T_{FH}-like cells and increased IL-21 production. Moreover, expansion of T_{FH}-like cells correlated positively with parameters related to antibody secretion, including serum IgG, ICs and autoantibodies. Our observations on the profound expansion of circulating T_{FH}-like cells and their IL-21 production along with the characteristic aberrant peripheral B cell distribution in both pSS and SLE indicate the prominent role of T_{FH} cell in the regulation of B cell selection. Furthermore, we examined the composition of lymphocyte infiltration in labial salivary gland (LSG) biopsies from patients with pSS, focusing on the presence of B and T_{FH} cells. T_{FH} cell markers are predominantly occurred in more organized lymphocyte infiltrates with higher focus scores. Interestingly, upon assessing the clinical data of patients retrospectively, we found association between the presence of T_{FH} cells in LSGs at onset and the severity of clinical course. Our results suggest that T_{FH} cells play important role in the generation of autoreactive B cells in glandular infiltrations and may contribute to the subsequent systemic manifestations as well.

VII. IRODALOMJEGYZÉK

VII.1. Hivatkozott közlemények jegyzéke

1. Wandstrat A, Wakeland E. The genetics of complex autoimmune diseases: non-MHC susceptibility genes. *Nat Immunol* 2001;2(9):802-9.
2. Hewagama A, Richardson B. The genetics and epigenetics of autoimmune diseases. *J Autoimmun.* 2009;33(1):3-11.
3. Alarcón-Riquelme ME. Recent advances in the genetics of autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1110:1-9.
4. Temajo NO, Howard N. The mosaic of environment involvement in autoimmunity: the abrogation of viral latency by stress, a non-infectious environmental agent, is an intrinsic prerequisite prelude before viruses can rank as infectious environmental agents that trigger autoimmune diseases. *Autoimmun Rev.* 2014;13(6):635-40.
5. Picascia A, Grimaldi V, Pignalosa O, De Pascale MR, Schiano C, Napoli C. Epigenetic control of autoimmune diseases: from bench to bedside. *Clin Immunol* 2015;157(1):1-15. .
6. Ahmed SA, Hissong BD, Verthelyi D, Donner K, Becker K, Karpuzoglu-Sahin E. Gender and risk of autoimmune diseases: possible role of estrogenic compounds. *Environ Health Perspect* 1999;107 (Suppl 5):681-6.
7. Hughes GC, Choubey D. Modulation of autoimmune rheumatic diseases by oestrogen and progesterone. *Nat Rev Rheumatol.* 2014;10(12):740-51.
8. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*, 8th Edition. Elsevier; 2014.
9. Jonsson R, Moen K, Vestrheim D, Szodoray P. Current issues in Sjögren's syndrome. *Oral Dis.* 2002;8(3):130-40.
10. Zeher M. Sjögren's syndrome. In: Zeher M, Szodoray P, editors. *Sjögren's syndrome and associated disorders*. Kerala, India: Transworld Research Network; 2009. p. 1-25.
11. Tulassay Z. *A belgyógyászat alapjai* 2. Medicina Könyvkiadó Zrt.; 2011.
12. Voulgarelis M, Tzioufas AG. Current Aspects of Pathogenesis in Sjögren's Syndrome. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 2010;2(6):325-34.

13. Theander E, Henriksson G, Ljungberg O, Mandl T, Manthorpe R, Jacobsson LT. Lymphoma and other malignancies in primary Sjögren's syndrome: a cohort study on cancer incidence and lymphoma predictors. *Ann Rheum Dis* 2006;65(6):796-803.
14. Bolstad AI, Roland Jonsson R. Genetic aspects of Sjögren's syndrome. *Arthritis Res.* 2002;4(6):353-9.
15. Kerttula TO, Collin P, Polvi A, Korpela M, Partanen J, Mäki M. Distinct immunologic features of Finnish Sjögren's syndrome patients with HLA alleles DRB1*0301, DQA1*0501, and DQB1*0201. Alterations in circulating T cell receptor gamma/delta subsets. *Arthritis Rheum.* 1996;39(10):1733-9.
16. Bolstad AI, Wassmuth R, Haga HJ, Jonsson R. HLA markers and clinical characteristics in Caucasians with primary Sjögren's syndrome. *J Rheumatol* 2001;28(7):1554-62.
17. Cruz-Tapias P, Rojas-Villarraga A, Maier-Moore S, Anaya JM. HLA and Sjögren's syndrome susceptibility. A meta-analysis of worldwide studies. *Autoimmun Rev* 2012;11(4):281-7.
18. Lessard CJ, Li H, Adrianto I, Ice JA, Rasmussen A, Grundahl KM et al. Variants at multiple loci implicated in both innate and adaptive immune responses are associated with Sjögren's syndrome. *Nat Genet.* 2013;45(11):1284-92.
19. Nordmark G, Kristjansdottir G, Theander E, Appel S, Eriksson P, Vasaitis L et al. Association of EBF1, FAM167A(C8orf13)-BLK and TNFSF4 gene variants with primary Sjögren's syndrome. *Genes Immun* 2011;12(2):100-9.
20. Yin H, Zhao M, Wu X, Gao F, Luo Y, Ma L et al. Hypomethylation and overexpression of CD70 (TNFSF7) in CD4+ T cells of patients with primary Sjögren's syndrome. *J Dermatol Sci* 2010;59(3):198-203.
21. Sharma R, Deshmukh US, Zheng L, Fu SM, Ju ST. X-linked Foxp3 (Scurfy) mutation dominantly inhibits submandibular gland development and inflammation respectively through adaptive and innate immune mechanisms. *J Immunol* 2009;183(5):3212-8.
22. Pauley KM, Stewart CM, Gauna AE, Dupre LC, Kuklani R, Chan AL et al. Altered miR-146a expression in Sjögren's syndrome and its functional role in innate immunity. *Eur J Immunol* 2011;41(7):2029-39.
23. Alevizos I, Alexander S, Turner RJ, Illei GG. MicroRNA expression profiles as biomarkers of minor salivary gland inflammation and dysfunction in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2011;63(2):535-44.

24. Kapsogeorgou EK, Gourzi VC, Manoussakis MN, Moutsopoulos HM, Tzioufas AG. Cellular microRNAs (miRNAs) and Sjögren's syndrome: candidate regulators of autoimmune response and autoantigen expression. *J Autoimmun* 2011;37(2):129-35.
25. Pflugfelder SC, Crouse CA, Monroy D, Yen M, Rowe M, Atherton SS. Epstein-Barr virus and the lacrimal gland pathology of Sjögren's syndrome. *Am J Pathol* 1993;143(1):49-64.
26. Green JE, Hinrichs SH, Vogel J, Jay G. Exocrinopathy resembling Sjögren's syndrome in HTLV-1 tax transgenic mice. *Nature*. 1989;341(6237):72-4.
27. Iwakiri D, Zhou L, Samanta M, Matsumoto M, Ebihara T, Seya T et al. Epstein-Barr virus (EBV)-encoded small RNA is released from EBV-infected cells and activates signaling from Toll-like receptor 3. *J Exp Med* 2009;206(10):2091-9.
28. Zheng L, Zhang Z, Yu C, Yang C. Expression of Toll-like receptors 7, 8, and 9 in primary Sjögren's syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;109(6):844-50.
29. Spachidou MP, Bourazopoulou E, Maratheftis CI, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM, Tzioufas AG et al. Expression of functional Toll-like receptors by salivary gland epithelial cells: increased mRNA expression in cells derived from patients with primary Sjögren's syndrome. *Clin Exp Immunol* 2007;147(3):497-503.
30. Shim GJ, Warner M, Kim HJ, Andersson S, Liu L, Ekman J et al. Aromatase-deficient mice spontaneously develop a lymphoproliferative autoimmune disease resembling Sjogren's syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(34):12628-33.
31. Ishimaru N, Arakaki R, Yoshida S, Yamada A, Noji S, Hayashi Y. Expression of the retinoblastoma protein RbAp48 in exocrine glands leads to Sjögren's syndrome-like autoimmune exocrinopathy. *J Exp Med* 2008;205(12):2915-27.
32. Christodoulou MI, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM. Characteristics of the minor salivary gland infiltrates in Sjögren's syndrome. *J Autoimmun* 2010;34(4):400-7.
33. Theander E, Vasaitis L, Baecklund E, Nordmark G, Warfvinge G, Liedholm R et al. Lymphoid organisation in labial salivary gland biopsies is a possible predictor for the development of malignant lymphoma in primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2011;70:1363-8.
34. Manoussakis MN, Kapsogeorgou EK. The role of intrinsic epithelial activation in the pathogenesis of Sjögren's syndrome. *J Autoimmun*. 2010;35(3):219-24.
35. Manoussakis MN, Spachidou MP, Maratheftis CI. Salivary epithelial cells from Sjogren's syndrome patients are highly sensitive to anoikis induced by TLR-3 ligation. *J Autoimmun*. 2010;35(3):212-8

36. Ohlsson M, Jonsson R, Brokstad KA. Subcellular redistribution and surface exposure of the Ro52, Ro60 and La48 autoantigens during apoptosis in human ductal epithelial cells: a possible mechanism in the pathogenesis of Sjögren's syndrome. *Scand J Immunol.* 2002;56(5):456-69.
37. Piccinini AM, Midwood KS. DAMPening Inflammation by Modulating TLR Signalling. *Mediators of Inflammation.* 2010;Article ID 672395,.
38. Kramer JM. Early events in Sjogren's Syndrome pathogenesis: The importance of innate immunity in disease initiation. *Cytokine.* 2014;67(2).
39. Brkica Z, Versnel MA. Type I IFN signature in primary Sjögren's syndrome patients. *Expert Review of Clinical Immunology.* 2014;10(4). doi:10.1586/1744666X.2014.876364.
40. Båve U, Nordmark G, Lövgren T, Rönnelid J, Cajander S, Eloranta ML et al. Activation of the type I interferon system in primary Sjögren's syndrome: a possible etiopathogenic mechanism. *Arthritis Rheum* 2005;52(4):1185-95.
41. Nocturne G, Mariette X. Advances in understanding the pathogenesis of primary Sjögren's syndrome. *Nat Rev Rheumatol.* 2013;9:544-56.
42. Ittah M, Miceli-Richard C, Gottenberg JE, Sellam J, Eid P, Lebon P et al. Viruses induce high expression of BAFF by salivary gland epithelial cells through TLR- and type-I IFN-dependent and -independent pathways. *Eur J Immunol* 2008;38(4):1058-64.
43. Daridon C, Devauchelle V, Hutin P, Le Berre R, Martins-Carvalho C, Bendaoud B et al. Aberrant expression of BAFF by B lymphocytes infiltrating the salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 2007;56(4):1134-44.
44. Lavie F, Miceli-Richard C, Ittah M, Sellam J, Gottenberg JE, Mariette X. B-cell activating factor of the tumour necrosis factor family expression in blood monocytes and T cells from patients with primary Sjögren's syndrome. *Scand J Immunol.* 2008;67(2):185-92.
45. Do RK, Hatada E, Lee H, Tourigny MR, Hilbert D, Chen-Kiang S. Attenuation of apoptosis underlies B lymphocyte stimulator enhancement of humoral immune response. *J Exp Med.* 2000;197(7):953-64.
46. Groom J, Kalled SL, Cutler AH, Olson C, Woodcock SA, Schneider P et al. Association of BAFF/BLyS overexpression and altered B cell differentiation with Sjögren's syndrome. *J Clin Invest* 2002;109(1):59-68.
47. Allen CD, Ansel KM, Low C, Lesley R, Tamamura H, Fujii N et al. Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nat Immunol.* 2004;5(9):943-52.

48. Kramer JM, Klimatcheva E, Rothstein TL. CXCL13 is elevated in Sjögren's syndrome in mice and humans and is implicated in disease pathogenesis. *J Leukoc Biol.* 2013;94(5):1079-89.
49. Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S, Yamada S, Shinkai Y, Honjo T. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 2000;102(5):553-63.
50. Bombardieri M, Barone F, Humby F, Kelly S, McGurk M, Morgan P et al. Activation-induced cytidine deaminase expression in follicular dendritic cell networks and interfollicular large B cells supports functionality of ectopic lymphoid neogenesis in autoimmune sialoadenitis and MALT lymphoma in Sjögren's syndrome. *J Immunol.* 2007;179(7):4929-38.
51. Salomonsson S, Jonsson M, Skarstein K, Brokstad K, Hjelmström P, Wahren-Herlenius M et al. Cellular basis of ectopic germinal center formation and autoantibody production in the target organ of patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 2003;48:3187-201.
52. Kyriakidis NC, Kapsogeorgou EK, Tzioufas AG. A comprehensive review of autoantibodies in primary Sjögren's syndrome: clinical phenotypes and regulatory mechanisms. *J Autoimmun* 2014;51:67-74.
53. Saxena R, Mahajan T, Mohan C. Lupus nephritis: current update. *Arthritis Res Ther.* 2011;13(5):240
54. Mohan C, Putterman C. Genetics and pathogenesis of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *Nat Rev Nephrol.* 2015;11(6):329-41.
55. Niewold TB, Kelly JA, Flesch MH, Espinoza LR, Harley JB, Crow MK. Association of the IRF5 risk haplotype with high serum interferon-alpha activity in systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Rheum* 2008;58(8):2481-7.
56. Fu Q, Zhao J, Qian X, Wong JL, Kaufman KM, Yu CY et al. Association of a functional IRF7 variant with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2011;63(3):749-54.
57. Caster DJ, Korte EA, Nanda SK, McLeish KR, Oliver RK, G'sell RT et al. ABIN1 dysfunction as a genetic basis for lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol.* 2013;24(11):1743-54
58. Bates JS, Lessard CJ, Leon JM, Nguyen T, Battiest LJ, Rodgers J et al. Meta-analysis and imputation identifies a 109 kb risk haplotype spanning TNFAIP3 associated with lupus nephritis and hematologic manifestations. *Genes Immun.* 2009;10(5):470-7.
59. Karassa FB, Trikalinos TA, Ioannidis JP, investigators. FcγR-Sm-a. The Fc gamma RIIIA-F158 allele is a risk factor for the development of lupus nephritis: a meta-analysis. *Kidney Int.* 2003;63(4):1475-82.

60. Floto RA, Clatworthy MR, Heilbronn KR, Rosner DR, MacAry PA, Rankin A et al. Loss of function of a lupus-associated FcγRIIb polymorphism through exclusion from lipid rafts. *Nat Med* 2005;11(10):1056-8.
61. Ghodke-Puranik Y, Niewold TB. Immunogenetics of systemic lupus erythematosus: A comprehensive review. *J Autoimmun* 2015;64:125-36.
62. Leffler J, Bengtsson AA, Blom AM. The complement system in systemic lupus erythematosus: an update. *Ann Rheum Dis*. 2014;73(9):1601-6.
63. Marto N, Bertolaccini ML, Calabuig E, Hughes GR, Khamashta MA. Anti-C1q antibodies in nephritis: correlation between titres and renal disease activity and positive predictive value in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2005;64(3):444-8.
64. Casciola-Rosen LA, Anhalt G, Rosen A. Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J Exp Med*. 1994;179(4):1317-30.
65. Rekvig OP, Van der Vlag J. The pathogenesis and diagnosis of systemic lupus erythematosus: still not resolved. *Semin Immunopathol* 2014;36(3):301-11.
66. Hedberg A, Mortensen ES, Rekvig OP. Chromatin as a target antigen in human and murine lupus nephritis. *Arthritis Res Ther*. 2011;13(2):214.
67. Garcia-Romo GS, Caielli S, Vega B, Connolly J, Allantaz F, Xu Z et al. Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med* 2011;3(73):73ra20.
68. Hakkim A, Fürnrohr BG, Amann K, Laube B, Abed UA, Brinkmann V et al. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(21):9813-8.
69. Urbonaviciute V, Fürnrohr BG, Meister S, Munoz L, Heyder P, De Marchis F et al. Induction of inflammatory and immune responses by HMGB1-nucleosome complexes: implications for the pathogenesis of SLE. *J Exp Med*. 2008;205(13):3007-18.
70. Fransen JH, Hilbrands LB, Jacobs CW, Adema GJ, Berden JH, Van der Vlag J. Both early and late apoptotic blebs are taken up by DC and induce IL-6 production. *Autoimmunity* 2009;42(4):325-7.
71. Ding H, Wang L, Wu X, Yan J, He Y, Ni B et al. Blockade of B-cell-activating factor suppresses lupus-like syndrome in autoimmune BXSB mice. *J Cell Mol Med* 2010;14(6B):1717-25.

72. Chu VT, Enghard P, Schürer S, Steinhauser G, Rudolph B, Riemekasten G et al. Systemic activation of the immune system induces aberrant BAFF and APRIL expression in B cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2009;60(7):2083-93.
73. Chang A, Henderson SG, Brandt D, Liu N, Guttikonda R, Hsieh C et al. In situ B cell-mediated immune responses and tubulointerstitial inflammation in human lupus nephritis. *J Immunol.* 2011;186(3):1849-60.
74. Neusser MA, Lindenmeyer MT, Edenhofer I, Gaiser S, Kretzler M, Regele H et al. Intrarenal production of B-cell survival factors in human lupus nephritis. *Mod Pathol* 2011;24(1):98-107.
75. Bijl M, Reefman E, Horst G, Limburg PC, Kallenberg CG. Reduced uptake of apoptotic cells by macrophages in systemic lupus erythematosus: correlates with decreased serum levels of complement. *Ann Rheum Dis* 2006;65(1):57-63.
76. Navratil JS, Korb LC, Ahearn JM. Systemic lupus erythematosus and complement deficiency: clues to a novel role for the classical complement pathway in the maintenance of immune tolerance. *Immunopharmacology* 1999;42(1-3):47-52.
77. Schaerli P, Willimann K, Lang AB, Lipp M, Loetscher P, Moser B. CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *J Exp Med.* 2000;192:1553-62.
78. Nurieva R, Chung Y, Hwang D, Yang X, Kang H, Ma L et al. Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. *Immunity.* 2008;29:138–49.
79. Chtanova T, Tangye SG, Newton R, Frank N, Hodge MR, Rolph MS et al. T follicular helper cells express a distinctive transcriptional profile, reflecting their role as non-Th1/Th2 effector cells that provide help for B cells. *J Immunol.* 2004;173(1):68-78.
80. Lu KT, Kanno Y, Cannons JL, Handon R, Bible P, Elkahoul AG et al. Functional and Epigenetic Analyses of In Vitro-generated and In Vivo-derived Interleukin-21-Producing Follicular T helper-like cells. *Immunity* 2011;35 (4):622–32.
81. Lüthje K, Kallies A, Shimohakamada Y, Belz G, Light A, Tarlinton D et al. The development and fate of follicular helper T cells defined by an IL-21 reporter mouse. *Nat Immunol.* 2012;13:491-8.
82. Zaretsky A, Taylor J, King I, Marshall F, Mohrs M, Pearce E. T follicular helper cells differentiate from Th2 cells in response to helminth antigens. *J Exp Med.* 2009;206:991–9.

83. Chung Y, Tanaka S, Chu F, Nurieva R, Martinez G, Rawal S et al. Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions. *Nat Med*. 2011;17:983-8.
84. Johnston R, Poholek A, DiToro D, Yusuf I, Eto D, Barnett B et al. Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. *Science*. 2009;325:1006-10.
85. Yu D, Rao S, Tsai L, Lee S, He Y, Sutcliffe E et al. The transcriptional repressor Bcl-6 directs T follicular helper cell lineage commitment. *Immunity*. 2009;31:457–68.
86. Ye BH, Lista F, Lo Coco F, Knowles DM, Offit K, Chaganti RS et al. Alterations of a zinc finger-encoding gene, BCL-6, in diffuse large-cell lymphoma. *Science*. 1993;262:747-50.
87. Ye B, Cattoretti G, Shen Q, Zhang J, Hawe N, de Waard R et al. The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2-type inflammation. *Nat Genet*. 1997;16:161-70.
88. Nurieva R, Chung Y, Martinez G, Yang X, Tanaka S, Matskevitch T et al. Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science*. 2009;325:1001-5.
89. Hiramatsu Y, Suto A, Kashiwakuma D, Kanari H, Kagami S, Ikeda K et al. c-Maf activates the promoter and enhancer of the IL-21 gene, and TGF-beta inhibits c-Maf-induced IL-21 production in CD4+ T cells. *J Leukoc Biol*. 2010;87:703-12.
90. Ma C, Avery D, Chan A, Batten M, Bustamante J, Boisson-Dupuis S et al. Functional STAT3 deficiency compromises the generation of human T follicular helper cells. *Blood*. 2012;119(17):3997-4008.
91. Schmitt N, Morita R, Bourdery L, Bentebibel S, Zurawski S, Banchereau J et al. Human dendritic cells induce the differentiation of interleukin-21-producing T follicular helper-like cells through interleukin-12. *Immunity*. 2009;31:158-69.
92. Diehl S, Schmidlin H, Nagasawa M, Blom B, Spits H. IL-6 Triggers IL-21 production by human CD4(+) T cells to drive STAT3-dependent plasma cell differentiation in B cells. *Immunol Cell Biol*. 2012;90(8):802-11.
93. Batten M, Ramamoorthi N, Kljavin N, Ma C, Cox J, Dengler H et al. IL-27 supports germinal center function by enhancing IL-21 production and the function of T follicular helper cells. *J Exp Med*. 2010;207:2895-906.
94. Kroenke M, Eto D, Locci M, Cho M, Davidson T, Haddad E et al. Bcl6 and Maf cooperate to instruct human follicular helper CD4 T cell differentiation. *J Immunol* 2012;188(8):3734-44.

95. Eto D, Lao C, DiToro D, Barnett B, Escobar T, Kageyama R et al. IL-21 and IL-6 are critical for different aspects of B cell immunity and redundantly induce optimal follicular helper CD4 T cell (Tfh) differentiation. *PLoS One*. 2011;6:e17739.
96. Ise W, Kohyama M, Schraml BU, Zhang T, Schwer B, Basu U et al. The transcription factor BATF controls the global regulators of class-switch recombination in both B cells and T cells. *Nat Immunol*. 2011;6:536-43.
97. Johnston R, Choi Y, Diamond J, Yang J, Crotty S. STAT5 is a potent negative regulator of TFH cell differentiation. *J Exp Med*. 2012;209:243-50.
98. Nurieva RI, Podd A, Chen Y, Alekseev AM, Yu M, Qi X et al. STAT5 protein negatively regulates T follicular helper (Tfh) cell generation and function. *J Biol Chem*. 2012;287:11234-9.
99. Vogelzang A, McGuire H, Yu D, Sprent J, Mackay C, King C. A fundamental role for interleukin-21 in the generation of T follicular helper cells. *Immunity*. 2008;29:127-37.
100. Kim CH, Rott LS, Clark-Lewis I, Campbell DJ, Wu LC, Butcher E. Subspecialization of CXCR5⁺ T cells: B helper activity is focused in a germinal center-localized subset of CXCR5⁺ T cells. *J Exp Med*. 2001;193:1373-81.
101. Hardtke S, Ohl L, Förster R. Balanced expression of CXCR5 and CCR7 on follicular T helper cells determines their transient positioning to lymph node follicles and is essential for efficient B-cell help. *Blood*. 2005;106:1924-31.
102. Arnold CN, Campbell DJ, Lipp M, Butcher EC. The germinal center response is impaired in the absence of T cell-expressed CXCR5. *Eur J Immunol* 2007;37:100-9.
103. Crotty S. Follicular Helper CD4 T Cells (TFH). *Annu Rev Immunol*. 2011;29:621-63.
104. Chen M, Guo Z, Ju W, Ryffel B, He X, Zheng SG. The development and function of follicular helper T cells in immune responses. *Cell Mol Immunol*. 2012;9(5):375-9.
105. Cannons JL, Qi H, Lu KT, Dutta M, Gomez-Rodriguez J, Cheng J et al. Optimal germinal center responses require a multistage T cell:B cell adhesion process involving integrins, SLAM-associated protein, and CD84. *Immunity*. 2010;32:253-65.
106. Basso K, Dalla-Favera R. Germinal centres and B cell lymphomagenesis. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(3):172-84.
107. Dominguez-Sola D, Vitorica GD, Ying CY, Phan RT, Saito M, Nussenzweig MC et al. The proto-oncogene MYC is required for selection in the germinal center and cyclic reentry. *Nat Immunol* 2012;13(11):1083-91.
108. De Silva NS, Simonetti G, Heise N, Klein U. The diverse roles of IRF4 in late germinal center B-cell differentiation. *Immunol Rev*. 2012;247:73-92.

109. Tsai LM, Yu D. Follicular helper T-cell memory: establishing new frontiers during antibody response. *Immunol Cell Biol.* 2014;92(1):57-63.
110. Breitfeld D, Ohl L, Kremmer E, Ellwart J, Sallusto F, Lipp M et al. Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J Exp Med.* 2000;192:1545-52.
111. Schmitt N, Bentebibel SE, Ueno H. Phenotype and functions of memory Tfh cells in human blood. *Trends Immunol.* 2014;35(9):436-42.
112. He J, Tsai LM, Leong YA, Hu X, Ma CS, Chevalier N et al. Circulating precursor CCR7(lo)PD-1(hi) CXCR5⁺ CD4⁺ T cells indicate Tfh cell activity and promote antibody responses upon antigen reexposure. *Immunity.* 2013;39(4):770-81.
113. Morita R, Schmitt N, Bentebibel S, Ranganathan R, Bourdery L, Zurawski G et al. Human blood CXCR5(+)CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity.* 2011;34:108-21.
114. Hale JS, Youngblood B, Latner DR, Mohammed AU, Ye L, Akondy RS et al. Distinct memory CD4⁺ T cells with commitment to T follicular helper- and T helper 1-cell lineages are generated after acute viral infection. *Immunity* 2013;38(4):805-17.
115. Jung D, Giallourakis C, Mostoslavsky R, Alt FW. Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:541-70.
116. Erdei A, Sarmai G, Prechl J. *Immunológia.* Budapest: Medicina Könyvkiadó Zrt.; 2012.
117. Melchers F. Checkpoints that control B cell development. *J Clin Invest* 2015;125(6):2203-10.
118. von Boehmer H, Melchers F. Checkpoints in lymphocyte development and autoimmune disease. *Nat Immunol.* 2010;11(1):14-20.
119. LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood.* 2008;112(5):1570–80.
120. Kalampokis I, Yoshizaki A, Tedder TF. IL-10-producing regulatory B cells (B10 cells) in autoimmune disease. *Arthritis Res Ther.* 2013;15(Suppl 1):S1.
121. Browning JL. B cells move to centre stage: novel opportunities for autoimmune disease treatment. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5(7):564-76.
122. Kaminski DA, Wei C, Qian Y, Rosenberg AF, Sanz I. Advances in human B cell phenotypic profiling. *Front Immunol* 2012;3:302.
123. Blair PA, Noreña LY, Flores-Borja F, Rawlings DJ, Isenberg DA, Ehrenstein MR et al. CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are

functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity*. 2010;32(1):129-40.

124. Miyagaki T, Fujimoto M, Sato S. Regulatory B cells in human inflammatory and autoimmune diseases: from mouse models to clinical research. *Int Immunol*. 2015;27(10):495-504.

125. Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos H, Alexander E, Carsons S et al. Classification criteria for Sjögren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis*. 2002;61:554-8.

126. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997;40(9):1725.

127. Petri M, Orbai AM, Alarcón GS, Gordon C, Merrill JT, Fortin PR et al. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2012;64(8):2677-86.

128. Scardina G, Spanó G, Carini F, Spicola M, Valenza V, Messina P et al. Diagnostic evaluation of serial sections of labial salivary gland biopsies in Sjögren's syndrome. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2007;12:E565-8.

129. Rodríguez-Bayona B, Ramos-Amaya A, Pérez-Venegas JJ, Rodríguez C, Brieva JA. Decreased frequency and activated phenotype of blood CD27 IgD IgM B lymphocytes is a permanent abnormality in systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Res Ther* 2010;12(3):R108.

130. Corsiero E, Sutcliffe N, Pitzalis C, M. B. Accumulation of Self-Reactive Naïve and Memory B Cell Reveals Sequential Defects in B Cell Tolerance Checkpoints in Sjögren's Syndrome. *PLoS One*. 2014;9(12).

131. Guerrier T, Youinou P, Pers JO, Jamin C. TLR9 drives the development of transitional B cells towards the marginal zone pathway and promotes autoimmunity. *J Autoimmun*. 2012;39(3):173-9.

132. Tiller T, Tsuiji M, Yurasov S, Velinzon K, Nussenzweig MC, Wardemann H. Autoreactivity in human IgG+ memory B cells. *Immunity*. 2007;26(2):205–13.

133. Hansen A, Odendahl M, Reiter K, Jacobi A, Feist E, Scholze J et al. Diminished peripheral blood memory B cells and accumulation of memory B cells in the salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum*. 2002;46:2160-71.

134. Bohnhorst J, Bjørgan MB, Thoen JE, Natvig JB, Thompson KM. Bm1-Bm5 classification of peripheral blood B cells reveals circulating germinal center founder cells in

healthy individuals and disturbance in the B cell subpopulations in patients with primary Sjögren's syndrome. *J Immunol.* 2001;167(7):3610-8.

135. Mietzner B, Tsuiji M, Scheid J, Velinzon K, Tiller T, Abraham K et al. Autoreactive IgG memory antibodies in patients with systemic lupus erythematosus arise from nonreactive and polyreactive precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(28):9727-32.

136. Yurasov S, Wardemann H, Hammersen J, Tsuiji M, Meffre E, Pascual V et al. Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 2005;201(5):703-11.

137. Yurasov S, Tiller T, Tsuiji M, Velinzon K, Pascual V, Wardemann H et al. Persistent expression of autoantibodies in SLE patients in remission. *J Exp Med.* 2006;203(10):2255-61.

138. Wehr C, Eibel H, Masilamani M, Illges H, Schlesier M, Peter HH et al. A new CD21low B cell population in the peripheral blood of patients with SLE. *Clin Immunol* 2004;113(2):161-71.

139. Sims GP, Ettinger R, Shirota Y, Yarboro CH, Illei GG, Lipsky PE. Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood.* 2005;105(11):4390-8.

140. Dörner T, Jacobi AM, Lee J, Lipsky PE. Abnormalities of B cell subsets in patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol Methods* 2011;363(2):187-97.

141. Luu VP, Vazquez MI, Zlotnik A. B cells participate in tolerance and autoimmunity through cytokine production. *Autoimmunity.* 2014;47(1):1-12.

142. Odendahl M, Jacobi AM, Hansen A, Feist E, Hiepe F, Burmester GR et al. Disturbed peripheral B lymphocyte homeostasis in systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 2000;165(10):5970-9.

143. Bohnhorst J, Thoen J, Natvig J, Thompson K. Significantly depressed percentage of CD27+ (memory) B cells among peripheral blood B cells in patients with primary Sjögren's syndrome. *Scand J Immunol.* 2001;54:421-7.

144. Korganow AS, Knapp AM, Nehme-Schuster H, Soulas-Sprauel P, Poindron V, Pasquali JL et al. Peripheral B cell abnormalities in patients with systemic lupus erythematosus in quiescent phase: decreased memory B cells and membrane CD19 expression. *J Autoimmun.* 2010;34(4):426-34.

145. Hansen A, Jacobi A, Pruss A, Kaufmann O, Scholze J, Lipsky P et al. Comparison of immunoglobulin heavy chain rearrangements between peripheral and glandular B cells in a patient with primary Sjögren's syndrome. *Scand J Immunol.* 2003;57:470-9.

146. Bohnhorst J, Bjørgan M, Thoen J, Jonsson R, Natvig J, Thompson K. Abnormal B cell differentiation in primary Sjögren's syndrome results in a depressed percentage of circulating

memory B cells and elevated levels of soluble CD27 that correlate with Serum IgG concentration. *Clin Immunol.* 2002;103:79-88.

147. Hansen A, Reiter K, Ziprian T, Jacobi A, Hoffmann A, Gosemann M et al. Dysregulation of chemokine receptor expression and function by B cells of patients with primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 2005;52(7):2109-19.

148. Jacobi AM, Reiter K, Mackay M, Aranow C, Hiepe F, Radbruch A et al. Activated memory B cell subsets correlate with disease activity in systemic lupus erythematosus: delineation by expression of CD27, IgD, and CD95. *Arthritis Rheum* 2008;58(6):1762-73.

149. Wei C, Anolik J, Cappione A, Zheng B, Pugh-Bernard A, Brooks J et al. A new population of cells lacking expression of CD27 represents a notable component of the B cell memory compartment in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2007;178(10):6624-33.

150. Szyszkowski EA, Brun JG, Skarstein K, Peck AB, Jonsson R, Brokstad KA. Phenotypic diversity of peripheral blood plasma cells in primary Sjögren's syndrome. *Scand J Immunol.* 2011;73(1):18-28.

151. Jacobi AM, Odendahl M, Reiter K, Bruns A, Burmester GR, Radbruch A et al. Correlation between circulating CD27^{high} plasma cells and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2003;48(5):1332-42.

152. Mauri C, Menon M. The expanding family of regulatory B cells. *Int Immunol.* 2015;27(10):479-86.

153. Iwata Y, Matsushita T, Horikawa M, Dilillo DJ, Yanaba K, Venturi GM et al. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood.* 2011;117(2):530-41.

154. Flores-Borja F, Bosma A, Ng D, Reddy V, Ehrenstein MR, Isenberg DA et al. CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation. *Sci Transl Med* 2013;5(173):173ra23.

155. Wang L, Zhao P, Ma L, Shan Y, Jiang Z, Wang J et al. Increased interleukin 21 and follicular helper T-like cells and reduced interleukin 10⁺ B cells in patients with new-onset systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2014;41(9):1781-92.

156. Yang X, Yang J, Chu Y, Wang J, Guan M, Zhu X et al. T follicular helper cells mediate expansion of regulatory B cells via IL-21 in Lupus-prone MRL/lpr mice. *PLoS One.* 2013;8(4):e62855.

157. Deenick EK, Chan A, Ma CS, Gatto D, Schwartzberg PL, Brink R et al. Follicular helper T cell differentiation requires continuous antigen presentation that is independent of unique B cell signaling. *Immunity.* 2010;33(2):241-53.

158. Simpson N, Gatenby P, Wilson A, Malik S, Fulcher D, Tangye S et al. Expansion of circulating T cells resembling follicular helper T cells is a fixed phenotype that identifies a subset of severe systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2010;62:234-44.
159. Ma J, Zhu C, Ma B, Tian J, Baidoo S, Mao C et al. Increased frequency of circulating follicular helper T cells in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Dev Immunol* 2012.
160. Zhu C, Ma J, Liu Y, Tong J, Tian J, Chen J et al. Increased frequency of follicular helper T cells in patients with autoimmune thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97:943-50.
161. Luo C, Li Y, Liu W, Feng H, Wang H, Huang X et al. Expansion of circulating counterparts of follicular helper T cells in patients with myasthenia gravis. *J Neuroimmunol.* 2012;256:55-61.
162. Bauquet A, Jin H, Paterson A, Mitsdoerffer M, Ho I, Sharpe A et al. The costimulatory molecule ICOS regulates the expression of c-Maf and IL-21 in the development of follicular T helper cells and TH-17 cells. *Nat Immunol.* 2009;10:167-75.
163. Linterman MA, Beaton L, Yu D, Ramiscal RR, Srivastava M, Hogan JJ et al. IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses. *J Exp Med* 2010;207(2):353-63.
164. Terrier B, Costedoat-Chalumeau N, Garrido M, Geri G, Rosenzweig M, Musset L et al. Interleukin 21 correlates with T cell and B cell subset alterations in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2012;39(9):1819-28.
165. Xu H, Liu J, Cui X, Zuo Y, Zhang Z, Li Y et al. Increased frequency of circulating follicular helper T cells in lupus patients is associated with autoantibody production in a CD40L-dependent manner. *Cell Immunol.* 2015;295(1):46-51.
166. Zhang X, Lindwall E, Gauthier C, Lyman J, Spencer N, Alarakhia A et al. Circulating CXCR5+CD4+helper T cells in systemic lupus erythematosus patients share phenotypic properties with germinal center follicular helper T cells and promote antibody production. *Lupus* 2015;pii: 0961203314567750.
167. Li X, Wu Z, Ding J, Zheng Z, Li X, Chen L et al. Role of the frequency of blood CD4(+) CXCR5(+) CCR6(+) T cells in autoimmunity in patients with Sjögren's syndrome. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;422(2):238-44.
168. Choi JY, Ho JH, Pasoto SG, Bunin V, Kim ST, Carrasco S et al. Circulating follicular helper-like T cells in systemic lupus erythematosus: association with disease activity. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67(4):988-99.

169. Le Coz C, Joublin A, Pasquali JL, Korganow AS, Dumortier H, Monneaux F. Circulating TFH subset distribution is strongly affected in lupus patients with an active disease. *PLoS One*. 2013;8(9):e75319.
170. Ma C, Suryani S, Avery D, Chan A, Nanan R, Santner-Nanan B et al. Early commitment of naïve human CD4(+) T cells to the T follicular helper (T(FH)) cell lineage is induced by IL-12. *Immunol Cell Biol*. 2009;87:590-600.
171. Szodoray P, Papp G, Horvath I, Barath S, Sipka S, Nakken B et al. Cells with regulatory function of the innate and adaptive immune system in primary Sjögren's syndrome. *Clin Exp Immunol*. 2009;157:343-9.
172. Szodoray P, Gal I, Barath S, Aleksza M, Horvath I, Gergely P et al. Immunological alterations in newly diagnosed primary Sjögren's syndrome characterized by skewed peripheral T-cell subsets and inflammatory cytokines. *Scand J Rheumatol*. 2008;37:205-12.
173. Rasmussen A, Ice J, Li H, Grundahl K, Kelly J, Radfar L et al. Comparison of the American-European Consensus Group Sjogren's syndrome classification criteria to newly proposed American College of Rheumatology criteria in a large, carefully characterised sicca cohort. *Ann Rheum Dis* 2013. doi: doi: 10.1136/annrheumdis-2013-203845.
174. Tavoni A, Baldini C, Bencivelli W, Cavazzini L, Covelli M, De Vita S et al. Minor salivary gland biopsy and Sjögren's syndrome: comparative analysis of biopsies among different Italian rheumatologic centers. *Clin Exp Rheumatol*. 2012;30(6):929-33.
175. Larsson A, Bredberg A, Henriksson G, Manthorpe R, Sallmyr A. Immunohistochemistry of the B-cell component in lower lip salivary glands of Sjögren's syndrome and healthy subjects. *Scand J Immunol* 2004;61:98-107.
176. Prochorec-Sobieszek M, Wagner T, Loukas M, Chwalińska-Sadowska H, Olesińska M. Histopathological and immunohistochemical analysis of lymphoid follicles in labial salivary glands in primary and secondary Sjögren's syndrome. *Med Sci Monit*. 2004;10:BR115-21.
177. Christodoulou M, Kapsogeorgou E, Moutsopoulos H. Characteristics of the minor salivary gland infiltrates in Sjögren's syndrome. *J Autoimmun*. 2010;34:400-7.
178. Christodoulou M, Kapsogeorgou E, Moutsopoulos N, Moutsopoulos H. Foxp3+ T-regulatory cells in Sjogren's syndrome: correlation with the grade of the autoimmune lesion and certain adverse prognostic factors. *Am J Pathol* 2008;173:1389-96.
179. Katsifis G, Rekka S, Moutsopoulos N, Pillemer S, Wahl S. Systemic and local interleukin-17 and linked cytokines associated with Sjögren's syndrome immunopathogenesis. *Am J Pathol*. 2009;175:1167-77.

180. Kang K, Kim H, Kwok S, Ju J, Park K, Sun D et al. Impact of interleukin-21 in the pathogenesis of primary Sjögren's syndrome: increased serum levels of interleukin-21 and its expression in the labial salivary glands. *Arthritis Res Ther*. 2011;13:R179.
181. Maehara T, Moriyama M, Hayashida J, Tanaka A, Shinozaki S, Kubo Y et al. Selective localization of T helper subsets in labial salivary glands from primary Sjögren's syndrome patients. *Clin Exp Immunol*. 2012;169:89-99.
182. Gong Y, Nititham J, Taylor K, Miceli-Richard C, Sordet C, Wachsmann D et al. Differentiation of follicular helper T cells by salivary gland epithelial cells in primary Sjögren's syndrome. *J Autoimmun*. 2014. doi:10.1016/j.jaut.2013.11.003.
183. Qi H, Cannons J, Klauschen F, Schwartzberg P, Germain R. SAP-controlled T-B cell interactions underlie germinal centre formation. *Nature*. 2008;455:764-9.
184. Good-Jacobson K, Szumilas C, Chen L, Sharpe A, Tomayko M, Shlomchik M. PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells. *Nat Immunol*. 2010;11:535-42.
185. Klein U, Dalla-Favera R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol*. 2008;8:22-33.
186. Guerrier T, Le Pottier L, Devauchelle V, Pers J, Jamin C, Youinou P. Role of Toll-like receptors in primary Sjögren's syndrome with a special emphasis on B-cell maturation within exocrine tissues. *J Autoimmun*. 2012;39:69-76.
187. Le Pottier L, Devauchelle V, Fautrel A, Daridon C, Saraux A, Youinou P et al. Ectopic germinal centers are rare in Sjogren's syndrome salivary glands and do not exclude autoreactive B cells. *J Immunol*. 2009;182:3540-7.

VII.2. A Kenézy Élettudományi Könyvtár által ellenőrzött közlemények jegyzéke



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



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

Jelölt: Szabó Krisztina

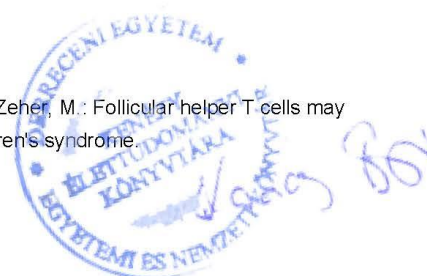
Neptun kód: GJX1AG

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.**, Zehner 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., Szóór, 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. TÁRGYSZAVAK

Autoimmun betegségek, follikuláris T helper sejt, B sejt alcsoportok, primer Sjögren-szindróma, szisztémás lupus erythematosus, autoantitestek, immunkomplexek

KEYWORDS

Autoimmune diseases, follicular T helper cell, B cell subsets, primary Sjögren's syndrome, systemic lupus erythematosus, autoantibodies, immune complexes

IX. 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.

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Dr. Dezső Balázsnak, aki lehetővé tette számomra, hogy az értekezéshez tartozó kísérleteim egy részét a Patológiai 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.

X. FÜGGELÉK

Az értekezés alapjául szolgáló, impakt faktoral rendelkező saját publikációk gyűjteménye