

T helper és T citotoxikus limfociták szerepének vizsgálata allergológiai és autoimmun bőrgyógyászati kórképekben

A most befejezett OTKA pályázat célkitűzése volt immunmediált bőrgyógyászati ill. bőrgyógyászati vonatkozással is bíró kórképek patogenezisének jobb megismerése, elsősorban a perifériás vér T limfocita szubpopulációinak, az aktivált T sejtek, a Th1/Th2 és Tc1/Tc2 sejtek arányának, valamint a szérumban szolubilis citokin szintjeinek vizsgálata révén.

Vizsgálatok atopiás dermatitisben (AD)

Munkánk során 43 AD-ben szenvedő betegnél vizsgáltuk a perifériás vérben az eozinofil granulociták számát, az össz IgE és allergénspecifikus IgE szinteket, valamint a perifériás vér limfocita alosztályok megoszlását, a CD4+ és CD8+ sejtek citokin (IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-13) termelését és a szérumban szolubilis citokin szintjeit.

Betegeink 94%-ában emelkedett eozinofil sejt számot és 56%-ában magas össz IgE szintet találtunk, specifikus IgE 51%-ban volt detektálható. A perifériás vér limfocita alosztályok megoszlására jellemzőnek találtuk a szignifikánsan csökkent CD3+ és CD4+ T sejt arányt, valamint a szignifikánsan emelkedett CD19+ B limfocita arányt. Szintén szignifikáns emelkedést kaptunk az aktivált T limfociták számában. Az intracelluláris citokin vizsgálatok eredménye szerint mind a Th, mind a Tc limfociták csoportjában szignifikánsan csökkent az IFN- γ termelő sejtek száma és szignifikánsan emelkedett az IL-10 termelő sejtek száma. Szintén szignifikánsan magasabb volt a betegek csoportjában az IL-13 termelő CD4+ és CD8+ T limfociták száma. Az AD-ben szenvedő betegek perifériás limfocitáinak vizsgálata során az irodalomban közölt eredményekhez hasonlóan megállapítottuk, hogy a 2-es típusú citokint termelő Th és Tc limfociták aránya emelkedik meg. Ez az arányeltolódás azonban a mi vizsgálataink szerint elsősorban az IL-13 termelő sejtek számának fokozódásából adódik és nem az IL-4 termelő sejtek számának emelkedéséből. Az intracitoplazmatikus citokin vizsgálatok eredményét alátámasztották a szérumban szolubilis citokin szintjeinek mérése során nyert adatok. Mind az IL-10 mind az IL-13 szint szignifikánsan emelkedett volt, míg az IL-4 szint nem mutatott eltérést a kontrollokhoz viszonyítva. Fontos annak kiemelése, hogy az általunk észlelt fokozott IL-13 és IL-10 termelés, valamint csökkent IFN- γ szintézis nem csupán a Th, de a Tc sejtekben is detektálható volt. Beteganyagunkban nem találtunk lényeges eltérést az extrinzik és intrinzik AD-ben szenvedők adatainak összehasonlítása során.

A vizsgálatokat egy angol és egy magyar nyelvű közleményben ismertettük.

Vizsgálatok krónikus urticariában

Krónikus idiopátiás urticariában (CIU) szenvedő betegeken (n=22) az irodalomban először végeztünk citokin vizsgálatot perifériás vér limfocitákon. Eredményeink szerint a perifériás vér limfocita populációinak arányszáma nem mutatott eltérést a kontroll csoporthoz képest. Az egyetlen kivétel a szignifikánsan emelkedett aktivált T limfocita szám (CD3/HLA-DR kettős pozitív) volt. Az IL-4 és IL-13 termelő T limfocita populációk sem mutattak lényegi változást a kontroll csoporthoz képest, míg az IFN- γ termelő T limfociták száma szignifikánsan csökkent és az IL-10 termelő T limfociták száma szignifikánsan emelkedett volt a kontroll populációhoz viszonyítva. Ezek alapján egyértelmű Th1 vagy Th2 típusú dominanciát nem tudtunk kimutatni, bár bizonyos fokú károsodást észleltünk az 1-es típusú citokin termelésében. A CIU csoport autoimmun és nem autoimmun formája között sem találtunk eltérést a vizsgált paraméterekben.

Az autoimmun krónikus urticariában (ACU) szenvedő betegeket nehéz elkülöníteni a CIU csoporttól. Jelenleg az ACU klinikai diagnózisa az autológ szérumbőrteszt (ASST) elvégzésén alapszik, melyet hisztamin felszabadulás méréssel szükséges megerősíteni. Munkánk során vizsgáltuk egy új, módosított bazofil aktivációs teszt, a CD63 expresszió mérésen alapuló vizsgálati módszer alkalmazhatóságát az ACU diagnosztikájában, majd specificitását vizsgáltuk a hisztamin felszabadulás mérés párhuzamos elvégzésével. Kezdetben 30 CIU-ban és 26 szisztémás autoimmun betegségben szenvedő beteg szérumát valamint 10 kontroll szérumot használtunk. Az összes betegnél elvégeztük a bazofil aktivációs tesztet, az ASST-et, a szérumban IgE és eozinofil kationos protein (ECP) meghatározást, vizsgáltuk a pajzsmirigy ellenes autoantitestek jelenlétét. Az ASST és a CD63 expresszió erős korrelációt mutatott. Mérsékelt negatív korrelációt tapasztaltunk az atopiás szérumban IgE, ECP és a CD63 pozitívitás között, továbbá a CD63 pozitív és ASST pozitív csoportban női dominanciát és pajzsmirigy ellenes autoantitestek gyakoribb jelenlétét igazoltuk. Ezt követően 72 CIU-ban szenvedő betegnél vizsgáltuk a bazofil aktivációs teszt és a hisztamin felszabadulási teszt korrelációját. Atopiás donor sejteken a szérumban 51%-a, nem atopiás donor sejteken 32%-a mutatott jelentős hisztamin felszabadulási aktivitást. CD63 felszíni expressziót a szérumban 57%-ával ill. 28%-ával történő inkubáció eredményezett az atopiás, illetve nem atopiás donorokon. A hisztamin felszabadulás eredményei mindkét donor sejteken nagyon jó korrelációt mutattak a CD63 expresszió eredményeivel. Egészséges donorok vagy más autoimmun betegségben szenvedő betegek széruma emelkedett CD63 expressziót és fokozott hisztamin felszabadulást nem tudott előidézni. Eredményeink alapján az irodalomban először bizonyítottuk a CIU szérumban kiváltott bazofil CD63 expresszió

mérésen alapuló módszer alkalmasságát a CIU betegek autoimmun patomechanizmusú csoportjának elkülönítésére.

Az eredményekről három angol és két magyar nyelvű közleményben számoltunk be.

Vizsgálatok polymyositis/dermatomyositisben (PM/DM)

Munkánk során az irodalomban eddig nem olvasható megközelítéssel próbáltunk újabb adatokat szolgáltatni a betegségek patogeneziséhez. Sejtfelszíni CD markereik és eltérő citokin termelésük alapján differenciáltuk a perifériás vérben a különböző limfocita szubpopulációkat, meghatároztuk a keringő citokin szinteket PM-ben (n=50) és DM-ben (n=49) szenvedő betegeknél, a betegség aktív (aPM, aDM) illetve inaktív (iPM, iDM) szakaszában egyaránt. Szignifikánsan csökkent CD3+ és CD8+ sejtarány mellett emelkedett B sejtarányt mértünk aDM-ben, míg aPM-ben nem volt kimutatható eltérés. aDM-ben és aPM-ben egyaránt magasabb volt a CD3+/HLA-DR+ sejtek százalékos aránya, mint a kontrollokban. A CD3+, CD8+ és CD19+ sejtek vonatkozásában tapasztalt eltérések iDM-ben eltűntek, a fokozott T sejt aktiváció viszont mindkét kórképben kimutatható volt inaktív szakban is.

Az intracitoplazmatikus citokin meghatározások eredményeiben is jelentős különbséget tapasztaltunk a két betegség között. Az aDM-ben szenvedő betegek esetében szignifikánsan csökkent mind a CD4+, mind a CD8+ sejtek IFN- γ expressziója, mely változás eltűnt a betegség inaktív szakában, illetve nem volt kimutatható sem aPM-ben, sem iPM-ben. Emellett aDM-ben bár nem szignifikánsan, de a Th2 sejtek aránya is emelkedett, a változás iDM-ben eltűnt, illetve nem érintette a CD8+ sejteket. Ebből adódóan aDM-ben a Th1/Th2 arány jelentősen csökkent, iDM-ben emelkedett, ami PM-ben nem volt kimutatható. Az IL-10 termelés vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy mind DM-ben, mind PM-ben fokozódott az IL-10 expresszió. Az IL-4 és IL-10 expresszió egymással nem megegyező változásai is arra utalnak, hogy az IL-10 nem tisztán Th2 típusú citokin, hanem elsősorban az immunregulációs folyamatokban fontos szerepet betöltő molekula. Az IL-10 vizsgálata során végzett kísérleteinkben nem kaptunk olyan markáns különbségeket a két betegség között, mint az IL-4 vagy IFN- γ esetén. A szérumban citokin szintek nem mutattak szignifikáns eltérést DM-ben, illetve PM-ben, és nem korreláltak az intracitoplazmatikus citokinekkal.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy eredményeink alátámasztják azokat a megfigyeléseket, miszerint a DM és a PM két különböző patomechanizmusú betegség lehet. Irodalmi adatok elsősorban arra utalnak, hogy PM-ben inkább CD8+ T sejt mediálta folyamat vezet az izom károsodásához, ugyanakkor DM-ben a B sejteknek lehet patogenetikai szerepük, és az

általunk észlelt Th2 irányú polarizációnak esetlegesen szerepe lehet a kóros humorális immunológiai folyamatok elindításában/fenntartásában.

Egy angol és egy magyar nyelvű közleményben ismertettük az eredményeket.

Vizsgálatok kevert kötőszöveti betegségben (MCTD)

Kevert kötőszöveti betegségben (MCTD) szenvedő betegek esetében vizsgálatainkkal alapadatokat szeretnénk volna szolgáltatni a limfocita szubpopulációk eloszlása és az intracitoplazmatikus citokin szintek vonatkozásában.

Az intracitoplazmatikus citokinek meghatározása során az IL-10+/CD4+, IL-4+/CD8+ és az IL-10+/CD8+ sejtek százalékos arányának emelkedését tapasztaltuk. MCTD-ben döntően a CD8+ Tc2 sejtek tartalmaznak IL-4-t és IL-10-t. A CD4+ Th2 sejtek is fokozottan expresszálják az IL-10-t, ugyanakkor nem képesek IL-4-produkcióra. Nemrégiben írtak le az irodalomban egy CD4+ sejtpopulációt, melyet regulatórikus T sejteknek, Tr1 sejteknek tartanak. A Tr1 sejtek fokozottan expresszálják az IL-10-et, de nem képesek IL-4-termelésre. Eredményeink azt jelzik, hogy MCTD-ben ezek az IL-4-produkcióra képtelen, de IL-10-t termelő Th2 sejtek vannak jelen, és ezeknek a sejteknek szabályozó szerepe lehet a betegséget kísérő folyamatokban. Megfigyelésünk szerint az IL-4-t és az IL-10-et hordozó CD8+ sejteknek alapvető szerepük van MCTD-ben és ezeknek a sejteknek a működése a betegség aktív szakaszában fokozódik. A CD8+/IL-4+ (Tc2) sejtek *in vivo* szerepe még nem tisztázott. A szérumban IL-10, IL-4 és IFN- γ szintje egyaránt emelkedett volt, és nem mutatott korrelációt az intracitoplazmatikus citokin meghatározás eredményével, amit a citokinek pleiotróp tulajdonságával magyarázhatunk. Eredményeink azokat az irodalmi adatokat támasztották alá, ahol mind a Th1, mind a Th2 típusú citokinek emelkedését kimutatták a szérumban. Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy a szérumban mind a Th1, mind a Th2 típusú citokinek emelkedését kimutattuk. MCTD-ben a CD4+ sejtek IL-10, a CD8+ sejtek IL-4 és IL-10 expressziójának fokozódása, valamint az IFN- γ expresszió redukciója vezethet a citokin egyensúly felborulásához, az ellenanyagtermelés fokozódásához, különösen a betegség aktív szakaszában.

Egy angol nyelvű közlemény jelent meg a témában.

Vizsgálatok psoriasis vulgarisban

Psoriasis vulgarisban szenvedő betegek (n=18) perifériás vér T limfocitáinak intracitoplazmatikus INF- γ , IL-4 és IL-10 termelését vizsgáltuk. Eredményeink szerint szignifikánsan emelkedett az INF- γ termelő Th1 limfociták százaléka és abszolút sejtszáma, míg az IL-4 termelő Th2 sejtek száma szignifikánsan csökkent. A Tc limfociták nem mutatták az előbbi eltéréseket. Az IL-10 termelő sejtek esetében csupán az abszolút sejtszámot találtuk

emelkedettnek, a százalékos értékeket nem. Véleményünk szerint a proriasis olyan jellemzően krónikus inflammatorikus megbetegedés, ahol az emelkedett IL-10 szint egy fontos lépést jelenthet a betegség patomechanizmusában azáltal, hogy downregulálja a gyulladási folyamatokat, továbbá potenciálisan egy újabb terápiás lehetőséget adhat a klinikus kezébe. Vizsgálataink szintén rámutatnak az abszolút sejtszám meghatározásának fontosságára.

Egy angol nyelvű cikk közli az eredményeket.

Az UV-A1 fototerápia hatásainak vizsgálata szisztémás lupus erythematosusban szenvedő betegeken

A szisztémás lupus erythematosusban (SLE) szenvedő betegekre karakterisztikus a fényérzékenység, melyet főként UVB expozíció vált ki, de ritkábban UVA sugárzás is provokál. Az UVA-1 sugárzás azonban irodalmi adatok szerint nem vált ki fotoszenzitivitást ebben a betegcsoportban, sőt a beteg szubjektív tüneteinek (ízületi fájdalom, aktivitás csökkenés, fáradékonyság, rossz közérzet) javulását okozza.

Munkánk során azt vizsgáltuk, hogy az UVA-1 kezelés milyen hatást fejt ki SLE-s betegek klinikai tüneteire, valamint immunológiai laboratóriumi paramétereire. A kezelésben 9 beteg vett részt, 8 nő és 1 férfi. A páciensek 60 KJ/m²/nap dóziszú UVA-1 kezelésben részesültek. A betegek tüneteit a terápia megkezdése előtt, a kezelés harmadik hete után és a kilencedik hét után vizsgáltuk. A klinikai betegség aktivitási index kiindulási 13,44±6,19-os értékről 10,67±5,94-re változott, a SLEDAI súlyszám 7,2±5,6-ról 0,9±1,8-re csökkent, mely utóbbi szignifikánsnak bizonyult. A betegek MED teszttel történő vizsgálata során az UVB fényérzékenység kezdetben jelentős volt, mely a kezelés végére megszűnt. UVA fényérzékenység sem a kezelés előtt, sem utána nem jelentkezett. Az immunológiai laboratóriumi vizsgálatok közül kiemelhető, hogy az IFN- γ termelő Th1 és Tc1 sejtek aránya csökkent, melynek következtében mind a Th1/Th2 arány mind a Tc1/Tc2 arány a kezelés végére jelentősen csökkent. Az eredmények azt jelzik, hogy SLE-s betegek gondosan kiválasztott csoportjában az adjuváns UVA-1 terápia jó hatású lehet.

Az eredményeket egy angol nyelvű közleményben ismertetjük.

Vizsgálatok autoimmun hólyagos betegségekben

Immunhisztokémiai módszerrel tanulmányoztuk autoimmun hólyagos bőrgyógyászati kórképekben (36 beteg) egy adhézions molekula a P-cadherin expresszióját. Eredményeink szerint mind pemphigus vulgaris, pemphigus foliaceus, bullosus pemphigoid és dermatitis herpetiformis Duhring esetén kimutatható a P-cadherin expresszió megjelenése a magasabban elhelyezkedő epidermális keratinocita sejtsorokban is, nem csupán a bazális ill. szuprabazális

sejtsorokban. Véleményünk szerint ez az expresszió fokozódás kompenzatórikus jellegű, mely segítségével igyekszik a hám az elpusztult más típusú adhéziókat pótolni.

Ezen munka folytatásaként később azt vizsgáltuk, hogy a protein kináz C (PKC) izoformák fokozott kifejeződése milyen hatással van a P-cadherin és egyéb adhéziós molekulák, mint a desmoglein (Dsg) 1 és 3 szintézisére HaCaT sejtekben. Western blot eredményeink azt mutatják, hogy a PKC izoenzimek overexpressziója a dezmoszómális és klasszikus kadherineket kifejeződését megváltoztatja. A cPKC α és az nPKC δ overexpressziója csökkentette a Dsg3 és P-cadherin megjelenését, ugyanakkor fokozta a Dsg1 kifejeződését. A cPKC β és nPKC ϵ overexpressziója ezzel ellentétben fokozta a Dsg3 és P-cadherin termelődését és csökkentette a Dsg1 megjelenését. HaCaT sejtekben nPKC δ inhibitorával (rottlerin) történő inkubálás során a Dsg3 és P-cadherin szintézis fokozódott. Eredményeink összhangban vannak azon korábbi közléseinkkel, melyek szerint a PKC izoenzimek specifikus szerepet töltenek be a különböző keratinocita funkciók szabályozásában; a cPKC α és az nPKC δ a sejtek differenciálódását, míg a cPKC β és nPKC ϵ a sejtek proliferációját fokozzák.

Egy angol nyelvű közlemény megjelent, egy pedig jelenleg készül a témában.