

## **Az antigénprezentáló sejtek, a regulatórikus T sejtek és az NKT sejtek fenotípusos és funkcionális vizsgálata atopiás dermatitisben**

### **Végző szakmai beszámoló**

Az atopiás betegségekben szenvedők számának robbanásszerű növekedését ma már a „járványok” kialakulásához hasonlítják. Ezen kórképek egyike az atopiás dermatitis (AD) egy krónikus, hullámzó lefolyású, gyulladásos bőrbetegség, melynek legfőbb klinikai jellemzői az erős viszketés és a száraz bőr. Előfordulási gyakorisága a II. világháború óta egyes földrajzi területeken akár húszszoros növekedést is mutatott, jelenleg Európában a gyermekek 10-20%-a, hazánkban végzett felmérés szerint 17%-a szenved a betegség eltérő súlyosságú formái miatt. Későbbi életkorban az esetek 30%-ában asthma bronchiale, 60%-ban rhinitis allergica társul hozzá, s a három betegség együtt alkotja az atopiás betegségek csoportját.

Az AD multifaktoriális betegség, kialakulásában öröklött tényezők és számos környezeti faktor játszik szerepet. A környezeti tényezők közül, melyek hatására a meglévő genetikai hajlam talaján a betegség manifesztálódik, ki kell emelni az allergének (élelmiszerek, növényi pollenek, porok, atkák, állati szőrök), az irritáló tényezők (éghajlat, gyapjú ruházat, izzadás) és a fertőző ágensek (baktériumok, gombák, vírusok) szerepét. A genetikailag meghatározott tényezők között ismertek a károsodott bőr barrier funkció, az immunrendszer működésében mutatkozó eltérések és a neurovegetatív idegrendszer zavara. Ezek közül munkacsoportunk már korábban is kiemelten foglalkozott az adaptív immunválasz AD-re jellemző eltéréseivel és a betegek vérében jelentős Th2 dominanciát tudtunk kimutatni. Az elmúlt négy évben kutatásaink során a fenti változások hátterében esetlegesen kimutatható regulatórikus T sejt, antigénprezentáló sejt, illetve NKT sejt számbeli és funkcionális eltéréseket vizsgáltuk. Ugyancsak tanulmányoztuk a veleszületett immunválasz további paramétereit, a Toll szerű receptorok (TLR) számának és funkciójának változásait, egyes leukotriének, és szignálútvonalaik aktivitását, valamint a szérum IL-16 szintet és ennek korrelációját a szenzibilizáltság fokával AD-es betegekben.

### **Regulatórikus T sejtek vizsgálata atopiás dermatitisben**

A regulatórikus T sejteknek ma már számos csoportját leírták. Részletesen 3 fő típusát tanulmányozta eddig az irodalom, a tímuszban keletkező és a periférián elsősorban sejt-sejt

kontaktus útján ható ún. „természetes” regulatórikus sejteket, a CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/Foxp3<sup>+</sup> nTreg sejteket, valamint a periférián képződő Th3 és Tr1 sejteket, melyek TGF- $\beta$  és IL-10 termelés révén fejtik ki hatásukat. AD-ben kevés irodalmi adat ismert a regulatórikus T sejtek számát, vagy funkcióját illetően. Saját vizsgálatainkban súlyos AD-ben szenvedő betegektől nyert vérből határoztuk meg áramlási citometriai módszerrel a Tr1 és nTreg sejtek százalékos arányát és abszolút sejt számát. Megállapítottuk, hogy míg a Tr1 sejtek száma szignifikánsan emelkedett AD-ben, a nTreg sejtek száma nem különbözött a kontrollok értékeitől. Az AD-ben végzett vizsgálataink előtt a módszer beállítása során kutatócsoportunk részt vállalt egyéb, autoimmun kórképekben végzett regulatórikus T sejt vizsgálatokban is. Ezt követően a nTreg sejtek funkciójának pontos értékelése céljából regulatív T sejteket és effektor T sejteket tartalmazó kevert limfocita kultúrákat állítottunk elő, amelyekhez a sejteket mágneses mikrogöngy technikával izoláltuk a betegek perifériás vérmintáiból. A CD3/CD28 T sejt expander hatására bekövetkező sejtproliferáció mértékének megállapításához egy tetrazólium formazán átalakuláson alapuló fotometriás módszert használtunk. A rendszerhez az esetek egy részében staphylococcal enterotoxin B-t (SEB) is adtunk, s a betegek regulatív T sejtjeinek szuppresszor aktivitását SEB-el stimulált és stimulálatlan rendszerben is vizsgáltuk. Az AD-ben szenvedő betegek regulatív T sejtjeinek funkcionális aktivitásában nem mutatkozott változás sem alap esetben, sem a SEB-el történő kezelés során.

A vérvizsgálatok mellett bőrből nyert szövettani anyagokon is elvégeztük a regulatórikus T sejtek kimutatását immunhisztokémiai módszerrel. Az irodalomban elsők között, akut AD-es bőrmintákban nagy számban, krónikus gyulladós bőrmintákban, kisebb mértékben ki tudtuk mutatni a nTreg sejtek jelenlétét. Irodalmi adatokból ismert, hogy nem csupán a nTreg sejtek hordoznak Foxp3 pozitivitást, hanem érésük során átmenetileg az effektor T sejtek is megjelenítik ezt a transzkripciós faktort, így az AD-ben nagy számban általunk detektált CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/Foxp3<sup>+</sup> T sejtek immunszuppresszív aktivitásának vizsgálata további célunk. Eredményeink alapján meg tudtuk állapítani, hogy AD-ben a perifériás vérben sem a nTreg sejtek száma, sem funkciója nem mutat károsodást, a Tr1 sejtek száma azonban szignifikánsan emelkedett, mely elsősorban kompenzatórikus változásnak és nem a patogenezisben szerepet játszó kiváltó tényezőnek tűnik. Az AD-es gyulladós bőrben nagy számban kimutatott CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/Foxp3<sup>+</sup> T sejtek regulatórikus funkciója további vizsgálatokat igényel.

(**Szegedi A**, Baráth S, Nagy G, Gál M, Sipka S, Bagdi E, Banham AH, Krenács L: Regulatory T cells in atopic dermatitis – epidermal dendritic cell clusters may contribute to their local expansion. *Br J Dermatol.* 2009; 160: 5: 984-993.; Baráth S, Gáspár K, Gyimesi E, Sipka S, Zeher M, Remenyik É, **Szegedi A**: nTreg cell function in

atopic dermatitis (közlemény, előkészületben); Baráth S, Sipka S, Szodoray P, **Szegedi A**, Aleksza M. Végh J, Szegedi Gy, Bodolay E.: Regulatory T cells in peripheral blood of patients with mixed connective tissue disease. *Scand J Reum.* 2006: 35: 4. 300-4.)

### **Antigénprezentáló sejtek vizsgálata atopiás dermatitisben**

Akut és krónikus AD-es bőrmintákat vizsgáltunk immunhisztokémiai módszerrel. Az akut gyulladásos anyagot pozitív atopy patch teszt területében végzett biopsziával nyertük. Az irodalomban először sikerült leírnunk, hogy akut AD-es epidermisben a dendritikus sejtek csoportokat alkotva helyezkednek el, mely csoportokban szoros kapcsolat mutatható ki a dendritikus sejtek és a CD4+/CD25+/Foxp3+ T sejtek között. Ezeket a dendritikus sejt csoportokat nem lehetett megfigyelni sem a krónikus AD-es léziókban, sem a psoriasisos kontrollokban. Fenotípusosan a sejtekre a CD1a+/CD11c+/CD40+/CD123-/CD207- felszíni molekula készlet volt jellemző, vagyis a sejtek nem Langerhans sejt típusú, hanem az AD-re korábban leírt és karakterisztikus, IDEC (Inflammatory Dendritic Epidermal Cell) típusú dendritikus sejtek voltak. Ezen IDEC típusú sejtek szoros kapcsolata a CD4+/CD25+/Foxp3+ T sejtekkel is utal arra, hogy a dendritikus sejtek kiemelt szerepet játszanak a T sejtek effektor vagy regulatórikus irányú érésében lokálisan az epidermisben.

Másik vizsgálatunkban AD-ben szenvedő betegek perifériás véréből származó monocitákból előállított éretlen és érett dendritikus sejtek felszíni kostimulációs molekula készletét hasonlítottuk össze nem atopiás kontrollok hasonló sejtjeivel. AD-es betegek és egészséges donorok perifériás véréből mágneses szeparálással nyertünk CD14+ monocitákat, melyeket 5 napon keresztül differenciáltattunk IL-4 és GM-CSF jelenlétében éretlen dendritikus sejtekké (DC-SIGN+CD1a+CD14-). Az éretlen dendritikus sejtek érését LPS-sel indukáltuk, és detektáltuk a felszíni CD83 expressziót. Ezt követően vizsgáltuk a B7-H2, CD274 és CD273 kostimuláló molekulák expresszióját, valamint az expresszió változását D-vitamin hatására mind az AD-s betegeken, mind a kontroll sejteken sejtfestési és PCR módszerekkel. A CD273 mRNS expressziója a kontrollokban emelkedett volt érett dendritikus sejteken az éretlen sejtekhez képest, míg ezt a változást nem tudtuk demonstrálni AD-es betegeken. A CD274 kostimuláló molekula esetén hasonló jelenséget tapasztaltunk a kontrollokban, ugyanakkor ez megfigyelhető volt az AD-es betegeken is. A molekulárbiológiai módszerek bevezetése igényelte, hogy részt vállaljunk egy olyan kísérletsorozatban is, melyben egyéb adhéziós molekulák vizsgálatát végeztük.

(**Szegedi A**, Baráth S, Nagy G, Gál M, Sipka S, Bagdi E, Banham AH, Krenács L: Regulatory T cells in atopic dermatitis – epidermal dendritic cell clusters may contribute to their local expansion. *Br J Dermatol.* 2009: 160:

5: 984-993.; Nagy G, Dobrosi N, Páyer E, Rajnavölgyi É, Bíró T, **Szegedi A**: The Effect of 1 $\alpha$ ,25 Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and Dexamethasone on Dendritic Cells *J Invest Dermatol*. 2007;127:S1-96.; Nagy G, Dobrosi N, Páyer E, Rajnavölgyi É, Bíró T, **Szegedi A**: Different costimulatory molecules on dendritic cells of atopic dermatitis patients *Exp. Dermatology* (előkészületben); **Szegedi A**, Páyer E, Czifra G, Tóth BI, Schmidt E, Kovács L, Blumberg PM, Bíró T: Protein kinase C isoenzymes differentially regulate the differentiation-dependent expression of adhesion molecules in human epidermal HaCaT keratinocytes. *Exp Dermatol*, 2009: 18: 2. 122-9; Szodoray P, Nakken B, Gaál J, Jonsson R, **Szegedi A**, Zöld É, Szegedi Gy, Brun JG, Zeher M, Bodolay E: The complex role of vitamin D in autoimmune diseases. *Scand J Immunol* 2008: 68: 3. 261-9.)

## **NKT sejtek vizsgálata atopiás dermatitisben**

A perifériás T sejtek 5-15%-át kitevő NKT sejtek a limfociták olyan alosztályát képezik, melyek az NK sejtekre jellemző NKRP1A (CD161) molekulát és T sejt receptort (TCR) egyaránt kifejeznek a felszínükön. Az általuk hordozott TCR-ok nagyon csekély változatosságot mutatnak, csaknem kivétel nélkül  $\alpha$ 24 láncból és legtöbbször V $\beta$ 11 láncból épülnek fel. Az NKT sejtek a nem polimorf, MHC szerű CD1d antigén prezentáló molekula által bemutatott glycolipid antigéneket ismernek fel. Aktiválódást követően nagy mennyiségű IL-4 és/vagy IFN- $\gamma$  termelésre képesek, így szerepük lehet az allergiás betegségekre jellemző Th2 dominancia kialakításában. Saját vizsgálatainkban áramlási citometriás módszerrel tanulmányoztuk AD-ben szenvedő betegek vérében az NKT sejtek százalékos arányát valamint abszolút sejtszámát és mindkét paraméter szignifikáns csökkenését tudtuk kimutatni. Nem találtunk összefüggést a sejtszám és a betegek klinikai paramétereit között. Ugyancsak megállapítottuk, hogy az NKT sejtek négy alpopulációja közül (CD4+, CD8+, dupla pozitív, dupla negatív) legnagyobb mértékben a dupla negatív (CD4-/CD8-) alcsoport száma csökkent. Az NKT sejtek és alcsoportok funkciójának vizsgálata során intracitoplazmatikus citokin mérési módszerrel mértük a sejtek IFN- $\gamma$  és IL-4 termelését. Eredményeink szerint az irodalomban először sikerült kimutatnunk, hogy a CD4-/CD8- NKT alcsoport szignifikánsan kevesebb IFN- $\gamma$ -t és szignifikánsan több IL-4-et termel az egészséges kontrollokhöz képest AD-ben. Véleményünk szerint az NKT sejtek számában és funkciójában észlelt jelentős és szignifikáns eltérés patogenetikai szereppel bírhat az AD-re jellemző Th2 dominancia és krónikus gyulladás kialakulásában.

(Gyimesi E, Sipka S, Szarazne Sz M, Zeher M, Gaspar K, Remenyik E, **Szegedi A**: Flow cytometric analysis of peripheral invariant NKT cells in patients with atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 129: S7. 2009.; Gyimesi E, Sipka S, Szarazné MS, **Szegedi A**: Analysis of invariant NKT cells of patients with atopic dermatitis by flow cytometry *Eur J Immunol* 2009: 39: S55-279.; Gyimesi E, Gáspár K, Zeher M, Bíró T, **Szegedi A**: Altered peripheral iNKT cells in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* – közlés alatt)

## **Toll szerű receptorok (TLR) vizsgálata atopiás dermatitisben**

AD-ben a gyakori bőrfertőzések nemcsak jellegzetes klinikai tünetként jelentkeznek, de fontos patogenetikai szerephez is jutnak a betegségre jellemző gyulladás kiváltásában és fenntartásában. Nincs adat az irodalomban arra vonatkozóan, hogy a TLR-ok számbeli, vagy funkcionális eltérései kimutathatók-e a fertőzések gyakori kialakulásának hátterében AD-ben. A TLR-ok számbeli vizsgálatánál monoklonális antitesteket és áramlási citometria technikát alkalmaztunk, a funkcionális vizsgálatokban a CD14 mediálta LPS kötést és E. coli fagocitózist mértük. Eredményeink szerint AD-ben a perifériás vér monocitákon szignifikánsan emelkedett TLR2, granulocitákon CD14, limfocitákon CD180 expressziót találtunk. Véleményünk szerint a fokozott TLR sejtfelszíni jelenlét AD-ben a folyamatos mikrobiális stimulus következménye. Az általunk AD-ben kimutatott TLR szám növekedés még kifejezettebb volt az AD intrinzik csoportjában (IAD). Itt szignifikánsan emelkedettnek találtuk a monociták felszínén a TLR2 és TLR4 szintet, a granulocitákon a TLR2 és CD14 szintet és a limfocitákon a CD180 expressziót. Véleményünk szerint az IAD-ben, ahol hiányzik a külső allergén mint provokáló ágens, a sejtek felszínén megjelenő fokozott TLR expresszió egy bakteriális komponensekre mutatott esetleges hiperreaktivitás jelzője lehet. A bakteriális komponensek így erős trigger faktorként szerepelhetnek a gyulladás elindításában és fenntartásában. Vizsgálataink során a TLR-okon keresztüli LPS kötés és E. coli fagocitózis nem mutatott károsodást sem AD-ben sem az IAD, sem az EAD (extrinsic AD) csoportokban. Az AD-re jellemző gyakori bőrfertőzések hátterében tehát a perifériás vér fehérvérsejteken nem tudtuk a TLR-ok csökkent számát, vagy kóros funkcióját kimutatni. Ezzel ellentétben szignifikánsan emelkedett számot találtunk, melyet következményes jellegűnek tartunk. IAD csoportban ez a jelenség még kifejezettebben volt megfigyelhető, ami tovább erősíti az irodalomban korábban felvetődött hipotézist, miszerint a mikrobiális ágensek patogenetikai szerepet játszhatnak az IAD kialakulásában.

(Sümegei A, Szegedi A, Irinyi B, Gaál M, Hunyadi J, Antal-Szalmás P.: Altered serum concentration and altered expression of the components of the CD14/TLR complex on the peripheral leukocytes of patients with atopic dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol.* 2007; 143: 3. 177-84.)

## **Leukotriének jelenléte atopiás dermatitisben**

A leukotriének a potens eicosanoidok családjába tartozó lipid mediátorok, melyek fontos hatással bírnak az atopiás gyulladásokban (például AD-ben). A kifejezetten potens leukotrién B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) arachidonsavból (AA) keletkezik az 5-lipoxygenáz (5-LOX) útvonalon keresztül az 5-hydroxyeicosatetraenoicsav (5-HETE) közti termékéből egy hydroxilációs lépést követően. A keletkezett LTB<sub>4</sub> a BLT1 és BLT2 leukotrién B<sub>4</sub> receptorokat aktiválja. A receptorok által mediált szignál útvonalak számos pro-inflammatorikus sejt kemotaktikus aktivitását és gyulladással területhez történő toborzását serkentik. Az LTB<sub>5</sub> eicosatetraenoicsavból (EPA) keletkezik, és sokkal kevésbé potens, mint az LTB<sub>4</sub>. Vizsgálatainkban atopiás betegek és egészséges önkéntesek szérumban, valamint egerek vérében allergiás szenzitizáció után tömegspektrométer (LC-MS-MS) segítségével határoztuk meg az 5-HETE, 5-hydroxypentadecanoicsav, LTB<sub>4</sub>, LTB<sub>5</sub> koncentrációkat. QRT-PCR segítségével meghatároztuk humán perifériás vér mononukleáris sejtekben (PBMC) és egér lépsejtekben az LTB<sub>4</sub> szignalizációs enzimek, kötő fehérjék és receptorok koncentrációját. Vizsgálataink során kifejezett 5-LOX expressziót találtunk AD betegeknél (PBMC-ben) az egészségesekhez viszonyítva, melyet az ovalbuminnal érzékenyített atopiás egerekben is igazolni tudtunk. Összefoglalva kimutattuk, hogy AD-es betegekben a LTB<sub>4</sub> szignál útvonal kifejezetten felerősödött egészségesekhez viszonyítva.

(Ruhl R, Mihaly J, **Szegedi A**: Leukotriens and leukotriene-signaling in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 129: S53. 2009., és azonos című közlemény közlés alatt)

### **Szérumban IL-16 szint és a szenzitizáció mértéke atopiás dermatitisben**

Az IL-16 egy immunmodulátor citokin, mely kemotaktikus hatása mellett a T sejt aktivált gyulladásokat is felerősíti az IL-2 receptor  $\alpha$  lánc expresszió fokozása, valamint egyéb citokinek termelésének stimulálása által, illetve immunoregulatórikus jellemzőkkel is bír. Kísérleteinkben a szérumban IL-16 és az allergiás szenzitizáció mértéke közti összefüggéseket vizsgáltuk AD-ben. ELISA technikával mértük a betegek és egészségesek szérumban IL-16 szintjét. A betegek allergénekkal szembeni szenzitizáltsági állapotát a totál és specifikus szérumban IgE szintek mérésével, valamint *in vivo* Prick tesztek végzésével határoztuk meg. Az előbbi eredmények alapján 3, az utóbbi eredmények alapján 2 nagy csoportra oszthattuk a betegeket (>5, 1-5 specifikus antigénre pozitív, illetve negatív betegek, valamint Prick teszt negatív és pozitív betegek), és korrelációt kerestünk az IL-16 és IgE szintek, valamint a szenzitizáció mértéke között. Eredményeinkben szignifikánsan magasabb szérumban IL-16 szintet találtunk az AD betegeknél, mint a kontrollokban, és az IL-16 szint pozitív korrelációt

mutatott a betegek totál IgE szintjével és eozinofil sejt számával. A magasabb IL-16 szérumszinteket a specifikus IgE antitesttel rendelkező betegekben találtuk az antitesttel nem rendelkező betegekkel összehasonlítva. Bár nem szignifikáns mértékben, de a Prick pozitív betegekben is magasabb szérum IL-16 szintet találtunk a Prick negatív betegekhez viszonyítva. Megállapítottuk, hogy a szérum IL-16 szintje bár korrelál a specifikus IgE által mért atopiás szenzitizáció mértékével, de nem korrelál a Prick teszttel mért szenzitizációval, így kevésbé jelzi a szenzitizáció mértékét, mint a totál IgE szint, hiszen ez utóbbi erősen korrelál mind specifikus IgE, mind Prick teszt által mért szenzitizáció mértékével. Az IL-16 szerepe tehát komplex az AD patogenezisében. A gyulladás kialakulásában feltehetően, mint kemoattraktáns, gyulladás fokozó fehérje vesz részt, míg annak későbbi fázisában immunregulátor szerephez is juthat.

(Gaspar K, Nagy G, Irinyi B, Tumpek J, Sipka S, Remenyik E, Szodoray P, **Szegedi A**: Association between serum IL-16 level and the degree of sensitization in patients with atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 2009; 129: S19.; Nagy G, Gárpár K, Irinyi B, Gál M, Tumpek J, Gyimesi E, Sipka S, Remenyik É, Szodoray P, **Szegedi A**: Association between serum IL-16 level and the degree of sensitization in patients with atopic dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol.* 2009: bírálat alatt)