

1. B-sejt alcsoportok definiálása sejtfelszíni markerek alapján szisztémás sclerosisos (SSc) betegek és egészséges egyének perifériás vérében

Egészséges egyének és SSc betegek perifériás véréből mononukleáris sejtek ficcolos szeparálását követően a beállított anti-CD19 mágnesgyöngy-alapú szeparálással B-sejteket tisztítottunk 90% feletti hatékonysággal, majd a sejteket áramlási citométerrel fenotípezáltuk. A vizsgálat során a betegség korai stádiumában lévő még kezeletlen SSc betegeket a diffúz (dcSSc) vagy limitált (lcSSc) formába tartozásuk, valamint betegségük aktivitása (aktív-nem aktív) alapján további csoportokba osztottuk. Az analízishez a jelenleg alkalmazott B-sejt alcsoport-meghatározási algoritmusokat kombináltuk az alábbiak szerint:

Másodlagos limfoid szövetekben (tonsilla) használt B-sejt alcsoport meghatározás IgD és CD38 expresszió alapján:

	IgD	CD38	B-sejt alcsoportok
Bm1	+	-	naiv sejtek+ <i>memória</i>
Bm2	+	+	follikuláris köpenysejtek
Bm3	-	+	csíráközpont sejtek
Bm4	-	+	csíráközpont sejtek
Bm5	-	-	<i>memória sejtek</i>
Bm2'	+	++	csíráközpont alapítósejtek

Bm1-Bm3 klasszifikáció kombinálása a CD23 és CD27 markerekkel:

	IgD	CD38	CD23	CD27	B-sejt alcsoportok
Bm1	+	-	+	-	naiv
Bm2	+	+/-	+	-	naiv
Bm2'	+	+/++	-	+	csíráközpontalapító
Bm3	-	+	+	+	centroblaszt
Bm4	-	+	-	+	centrocita
Bm5	+/-	+/-	-	+	memória

Mindezek alapján a perifériás vér B-sejt alcsoportjainak fenotípusos jellemzése a CD23-FITC/IgD-PE/CD27-PE-Cy5/CD38-APC monoklonális antitestek segítségével:

fenotípus	B-sejt alcsoportok
IgD-CD38+CD27+CD23+	centroblaszt
IgD-CD38+CD27+CD23-	centrocita
IgD-CD38-CD27-CD23+/-	feltételezetten éretlen
IgD-CD38+/-CD27+CD23-	switched memória
IgD+CD38+/-CD27-CD23+	naiv
IgD+CD38+/-CD27+CD23-	non-switched memória
IgD+CD38++CD27+CD23-	csíráközpontalapító

Eredményeink szerint az SSc betegek centrocita (IgD-/CD38+/CD27+/CD23-) valamint switched memória B-sejt (IgD-/CD38±/CD27+/CD23-) gyakorisága szignifikánsan alacsonyabb a kontrollokénál. Az SSc betegek csoportját betegség aktivitás szempontjából két további csoportra osztva az aktív betegek centrocita (IgD-/CD38+/CD27+/CD23-) valamint switched memória B-sejt gyakorisága (IgD-/CD38±/CD27+/CD23-) szignifikánsan alacsonyabb a nem aktívakénál. A dcSSc és lcSSc betegcsoportok esetében nem találtunk szignifikáns különbséget.

Következő lépésként az adott alcsoportokba tartozó sejtek aktivációs állapotát vizsgáltuk az FL1 – változó paraméter CD22/CD5/CD80/CD95 segítségével és az alábbi szignifikáns különbségeket kaptuk:

Az SSc betegekben a CD22- és CD95- feltételezetten éretlen B-sejt populációk (IgD-/CD38±/CD27-) gyakorisága emelkedett volt a kontrollokhöz képest, míg a CD80- és CD95-non-switched memória B-sejtek (IgD+/CD38±/CD27+) aránya az aktív betegcsoportban volt nagyobb, mint a nem-aktívban. A dcSSc betegekben a CD80+ switched memória B-sejtek (IgD-/CD38-/CD27+) és a CD95+ csíráközpont alapító sejtek (IgD-CD38++27+) gyakorisága magasabb volt, mint lcSSc-ben, ugyanakkor lcSSc betegekben a CD22-, CD80- és CD95-naiv B-sejtek (IgD+/CD27-/CD38+) gyakorisága volt emelkedett dcSSc-hez képest.

A meghatározott B-sejt alcsoportok klinikai relevanciájának kiterjedtebb meghatározását teheti majd lehetővé a jelenleg még véglegesítés alatt álló részletes klinikai adatbázis.

2. BCR-jelátvitelt moduláló molekulák foszforilációs állapotának vizsgálata

A humán primer B-sejtek stimulálásához a CD40L feeder sejteken történő stabil, jól definiált sejtfelszíni expressziója megfelelő kontextusban ko-kultúrában alkalmazva aktivációs jelet biztosíthat. Ennek megvalósításában a széles körben használt tranziens expressziót adó módszereknél többet nyújtanak a jól definiált és tartós expressziót biztosító vektorok. Esetünkben a CD40L gén került beillesztésre a GFP markergén elé IRES elválasztással. A sejtvonalak elkészítését követően a GFP markergén detektálását végeztük el. Sajnos a GFP markergén expressziójának megítélése nem sikerült kielégítő mértékben, mivel rendkívül alacsony szintű volt expressziója. Ennek oka pl. az lehet, hogy az IRES elválasztás előtti CD40L szekvencia jelentős hossza lecsökkenti (a vártnál nagyobb mértékben) a GFP expressziót. Megpróbáltuk a CD40L expressziós szint közvetlen meghatározását is. Sajnos ilyen irányú kísérleteink sem sikerültek, feltételezésünk miatt a CD40L mint fehérje sejtfelszíni jellege miatt. Ilyen esetben ugyanis előfordulhat az ún. pszeudo-transzfekeció jelensége, melynek során a vírus részecskék passzívan, kész sejtfelszíni fehérjéket (esetünkben CD40L fehérjét) vihetnek magukkal lefűződésük során. Ennek következtében nem ítéhető meg, hogy az alacsony szinten detektált CD40L fehérje expresszió valódi endogén konstrukcióból származik, vagy csupán pszeudo-transzfekeció eredménye.

A B sejtek stimulálása céljából következő lépésként az egészséges egyének és SSc betegek perifériás véréből mononukleáris sejtek ficollos elválasztását követő mágnesgyöngy-alapú szeparálással tisztított B-sejtekhez a TLR9 ligand CpG-t és anti-IgM/IgD-t adtunk. Az aktivációt áramlási citométerrel ellenőriztük az FSC-SSC paraméterek valamint CD25-PE, CD86-FITC, CD80-FITC monoklonális antitestekkel. Az előzőleg lefagyasztásra került B-sejtek stimulálása nem járt sikerrel.

3. Jelátviteli útvonalak jelentősebb molekuláinak génexpressziós vizsgálata B-sejtekben

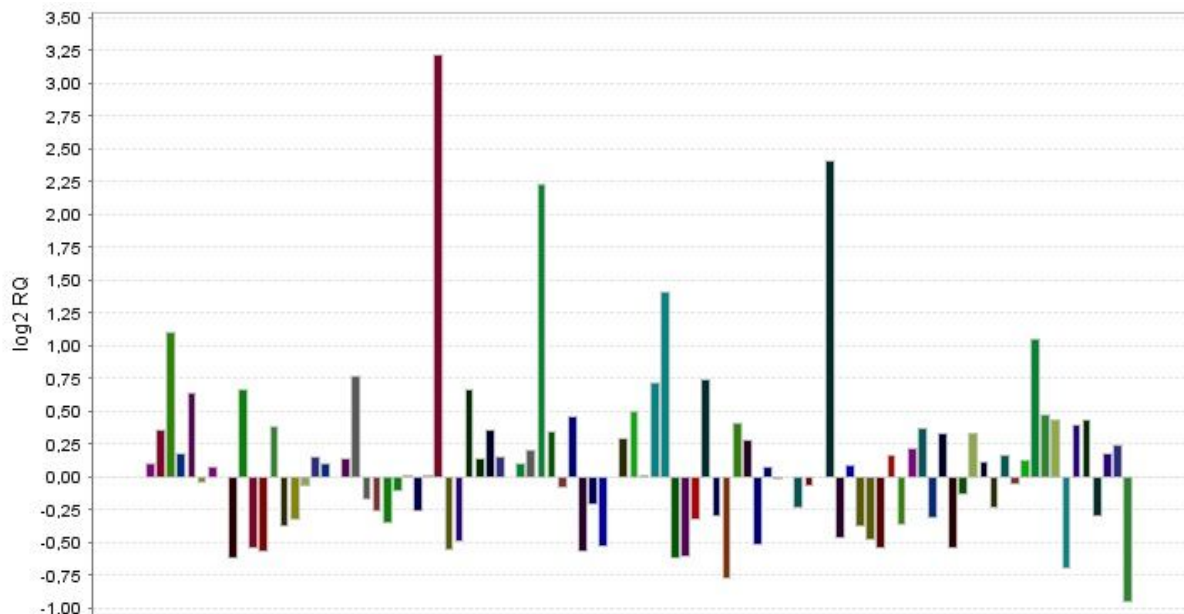
A B-sejtek sikertelen stimulálási kísérlete miatt a B-sejtekből RNS-t izoláltunk, az izolált RNS-ből cDNS-t készítettünk. A korai stádiumú kezelt beteget diffúz vagy limitált kután alcsoportokba tartozásuk és aktivitásuk alapján bontottuk csoportokra. A kontroll, korai

aktív dcSSc, korai nem aktív dcSSc, korai nem aktív lcSSc csoportoknak megfelelően a cDNS mintákat gyűjtöttünk. Első lépésként a kontroll és a korai aktív dcSSc összevont mintákból végeztük el 92 gén expressziójának vizsgálatát real-time PCR segítségével.

A vizsgált gének listája:

ABL1	BTK	CD19	FCGR2B	INPP5D	MAPK1	NFKBIA	PIK3R2	PTPRC	VAV1
AKT1	C3	CD40	FOS	IRS1	MAPK14	NFKBIB	PLCB1	RAC1	VAV3
AKT2	CALM1	CD79A	FOXO3	ITPR1	MAPK3	NFKBIE	PLCB2	RAF1	
AKT3	CALM2	CD79B	FYN	ITPR3	MAPK8	NRAS	PLCG1	REL	
ATF2	CALM3	CD81	HRAS	JUN	MAPK9	PDPK1	PLCG2	RELA	
ATF3	CAMK2A	CHUK	IKBKB	KRAS	NFAT5	PIK3AP1	PPP3CA	RELB	
BCL10	CAMK2B	CR2	IKBKE	LYN	NFATC1	PIK3C2A	PRKCB	SPP1	
BCR	CAMK2G	CREB1	IKBKG	MALT1	NFATC2	PIK3C2B	PRKCI	SYK	
BLK	CBL	DAPP1	IL4	MAP2K1	NFKB1	PIK3C3	PRKCZ	TEC	
BLNK	CD180	ELK1	IL4R	MAP2K2	NFKB2	PIK3R1	PTEN	TLR4	

Az alábbi ábra 92 gén expresszióját mutatja a korai aktív dcSSc betegek mintáiban a kontroll mintákhoz viszonyítva:



A legnagyobb mértékben emelkedett, illetve csökkent expressziót mutató 5 gén:

gén	RQ ↑	gén	RQ ↓
C3	9,33	CD180	0,51
SPP1	5,30	BCL10	0,58
PLCB1	4,69	NFATC2	0,61
TLR4	2,65	JUN	0,65
PLCG1	2,14	PDPK1	0,65

A meghatározott csoportok génexpressziós mintázatának analízise lehetővé teszi a dcSSc és lcSSc alcsoportok valamint az aktív és nem aktív stádiumú betegség közötti különbségek azonosítását, ami nem csak a különböző lefolyású kórképek pathomechanizmusának jobb megértéséhez járulhat hozzá, hanem a betegség aktivitására jellemző molekulák azonosításával terápiás célpontok kijelölésére is alkalmas lehet.

4. SSc betegek és egészséges egyének T-, NK-, NKT- sejtjeinek vizsgálata

CD4-FITC, CD3-PE, CD56-PE-Cy5, CD8-APC monoklonális antitestek kombinációjával jelölt perifériás vérminták áramlási citometriás analízisét végeztük el SSc betegekben és egészséges kontrollokban.

Eredményeink szerint az SSc betegekben az NK (CD56+) és NKT (CD56+/CD3+) sejtek aránya szignifikáns mértékben csökkent a kontrollokhoz képest. Az SSc betegeket a betegség aktivitás szempontjából két további csoportra osztva az aktív betegek citotoxikus T-sejt (CD3+/CD8+) aránya szignifikáns mértékben csökkent a nem-aktív betegekhez képest. A dcSSc és lcSSc betegcsoportok esetében nem találtunk szignifikáns különbséget. A meghatározott limfocita csoportok klinikai relevanciájának kiterjedtebb meghatározását teheti majd lehetővé a jelenleg még véglegesítés alatt álló részletes klinikai adatbázis.

5. SSc betegek és egészséges egyének invariáns T-sejtjeinek vizsgálata

iNKT-sejtek

Az NKT-sejtek egy jellegzetes alcsoportját alkotják a tímusz eredetű T-sejteknek. Ezek a sejtek mind T-sejt receptort, mind NK- sejt markereket (CD56, CD161) hordoznak. A heterogén NKT-sejtek közé tartoznak az iNKT-sejtek. Az iNKT-sejtek (CD4+, DN, CD8+ alpopulációk) invariáns T-sejt receptort hordoznak, melyet emberben a V α 24-J α Q α lánc és a V β 11 β lánc alkot. Az NKT-sejtek által termelt Th1 és Th2 citokin-profil döntően befolyásolhatja az immunválasz kimenetelét. Az irodalmi adatok nem egyértelműek az iNKT-sejtek sclerodermában betöltött szerepéről. Egyes adatok szerint az iNKT-sejtek száma SSc-s betegek perifériás vérében alacsonyabb, mint egészséges egyénekében. Ezen adatok tényleges

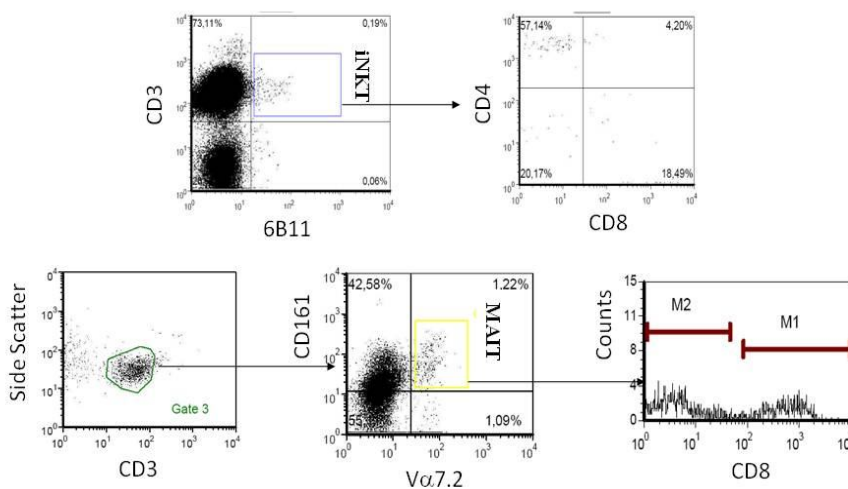
értékelését megnehezíti a kevés elérhető információ és a különbözően alkalmazott mérési protokollok. Ez alapján feltételezhető, hogy a közlésre került perifériás NKT-sejt szám nem reprezentatív. Alapvetően a vérben található össz NKT-sejtek meghatározásához a sejteket anti-CD3 és anti-CD56 antitestek segítségével határoztuk meg. Az iNKT- sejtek kimutatására sejtfelszíni anti-CD3 jelölést követően 6B11 ellenanyaggal (TcR α láncának V α 24 és J α 18-as kapcsolódó szakaszát ismeri fel) végeztünk festéseket. Az iNKT- sejtek alcsoportjainak meghatározására további sejtfelszíni anti-CD4 és anti-CD8 festéseket használtunk.

MAIT-sejtek

A MAIT-sejtek olyan tímusz eredetű T-sejtek melyek emberben kizárólagosan a V α 7.2- J α 33 T-sejt receptort hordozzák. Ez az invariáns α lánc limitált számú TcR β lánchoz, általában a V β 2 és V β 13 láncokhoz asszociál. A MAIT-sejtek között DN és CD8+ alcsoportok különböztethetők meg. A sejtek legnagyobb számban a gasztrointesztinális rendszerben és a tüdőben fordulnak elő. Bár már igazolták szerepüket szisztémás autoimmun megbetegedésekben (pl. sclerosis multiplex, rheumatoid arthritis) a MAIT-sejtek esetleges részvétele a szisztémás sclerosis pathogenezisében még egyáltalán nem ismert.

A MAIT-sejtek arányának meghatározásához sejtfelszíni anti-CD3, anti-CD161 és anti-V α 7.2 jelölést végeztünk. A MAIT-sejtek alcsoportjainak (CD8+, DN) vizsgálatához szintén anti-CD8 antitestet használtunk.

Invariáns T-sejtek festési mintázata humán perifériás vérben



6. SSc betegek és egészséges egyének folliculáris T-helper és regulátoros T-sejtjeinek vizsgálata

A folliculáris T-helper sejtek (Tfh) egy jellegzetes csoportját alkotják a perifériás T-helper sejteknek. Jellemző rájuk a Bcl6 transzkripciós faktor jelenléte illetve a CXCR5, PD-1 illetve ICOS molekulák sejtfelszíni expressziója. Újabb irodalmi adatok kiemelik a Tfh sejtek szerepét különböző immunológiai kórképekben. Az autoimmun betegségek közül vizsgálták már a Tfh sejtek előfordulását és funkcióját Sjögren-szindrómában, autoimmun thyreoiditisben, rheumatoid arthritisben és SLE-ben is, ugyanakkor nincsen adat a Tfh sejtek szerepéről sclerodermában. Az SSc-re jellemző autoantitest mintázat kialakítását azonban befolyásolhatják a folliculáris T-helper sejtek, így az ismert markerek felhasználásával elkezdtuk a beteg és kontroll Tfh-sejtek mérését SSc beteg és kontroll perifériás vérmintákból.

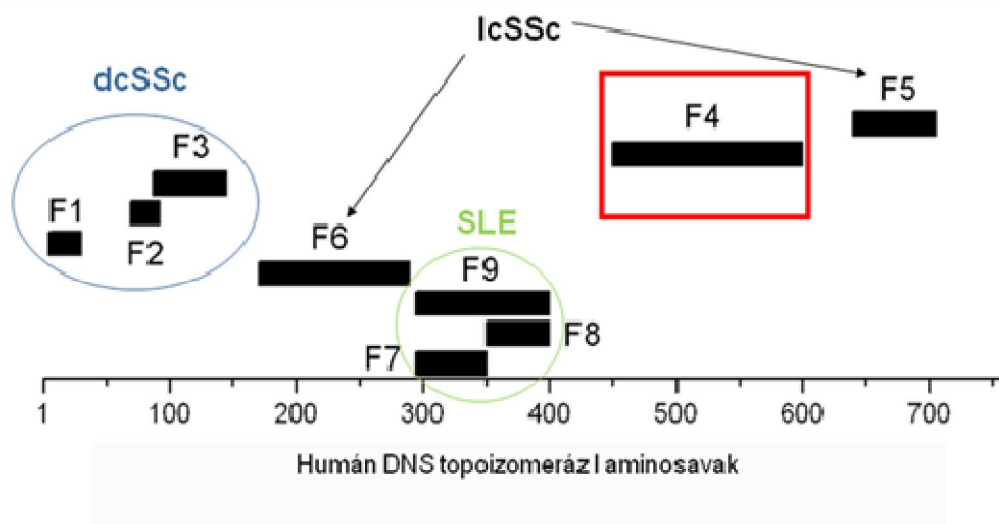
Az autoimmun válasz kialakulásában – a jelenlegi ismeretek alapján – az úgynevezett regulátoros T-sejtek defektusa is kitüntetett szerepet játszik. Igen nagyszámú publikáció foglalkozik a Treg sejtek szerepével sclerodermában, bár egyértelmű patogenitása nem igazolt. A regulátoros T-sejtek vizsgálatának legelfogadottabb markerei a CD4, a CD25^{hi}, illetve a Foxp3 transzkripciós faktor. E markerek felhasználásával jelenleg is vizsgáljuk a Treg sejtek számát a meghatározott SSc beteg alcsoportokban és a kontroll mintákban.

7. DNS topoizomeráz I (topo I) ellenes autoantitestek epitóp mintázatának vizsgálata

A SSc egyik fontos diagnosztikai paramétere a DNS topoizomeráz (topo I) elleni autoantitest kimutatása. A lambda-fág felszínen megjelenített topo I antigén fragmens könyvtár affinitás szelekciójával kapott eredmények alapján az anti-topo I autoantitestek által felismert epitóp mintázat különbözik dcSSc, lcSSc és SLE esetén. A dcSSc-s betegek szérumai elsősorban az N-terminális doménben, az SLE-s betegek szérumai a központi domén I-II területén, míg az lcSSc-s betegek szérummintái a topo I molekula teljes hosszában ismernek fel epitópokat.

A fág könyvtár affinitás szelekciójával kapott szekvenciáknak megfelelően előállítottunk kilenc MBP-topo I fragmens [AS 5-30 (F1), 69-92 (F2), 87-145 (F3), 450-600 (F4), 640-705 (F5), 170-290 (F6), 295-350 (F7), 350-400 (F8), 295-400 (F9)] fúziós fehérjét. A fúziós fehérjéket először egészséges egyének (magyar, finn, brit véradók) szérummintáival teszteltük

és azt találtuk, hogy az egészséges egyének jelentős része rendelkezik a topo I F4 fragmens elleni IgM és IgG izotípusú antitestekkel. Ez a topo I molekulán belül egy 150 aminosav hosszúságú, genetikailag konzervált szakasz. Nagyszámú szérummintát tesztelve kimutattuk, hogy mind az IgM mind az IgG izotípusú anti-F4 antitestek az életkortól és földrajzi elhelyezkedéstől függetlenül jelen vannak egészséges egyénekben. Továbbá F4 fragmens elleni antitestek voltak kimutathatóak SSc-től és SLE-től eltérő szisztémás autoimmun betegségekben szenvedő egyének szérummintáiban is. Az IgM izotípusú antitestek a legmagasabb titerben az anti-topo I pozitív SSc-s vagy SLE-s betegek szérumában voltak jelen. Ugyanakkor nem hagyhatjuk figyelmen kívül, hogy mindegyik anti-topo I pozitív SSc-s vagy SLE-s beteg szérumában kimutathatóak voltak IgG izotípusú anti-F4 antitestek és ezen antitestek titere ebben a csoportban volt a legmagasabb az összes vizsgált csoport közül. Az a tény, hogy ezen szérumminták a laboratóriumi diagnosztikában rutinszerűen alkalmazott, antigénként a teljes hosszú topo I molekulát használó ELISA teszttel negatívnak bizonyultak, arra utalhat, hogy az F4 fragmens által képviselt szekvencia a teljes hosszú molekula háromdimenziós szerkezetében rejtve lehet. Mindezek alapján felmerül annak lehetősége, hogy a kimutatott anti-F4 antitestek a természetes antitestek közé tartoznak. Ismereteink szerint ezek az első publikált eredmények a topo I ellenes természetes autoantitestek humán szérumából történt kimutatásáról.

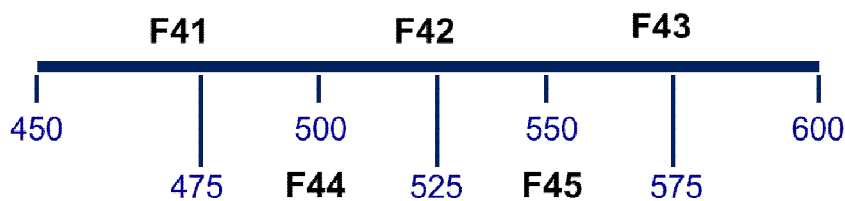


Az SSc-s és SLE-s betegek (Pécs, Debrecen) anti-topo I antitest pozitív szérummintáit megvizsgálva azt találtuk, hogy a rekombináns topo I fragmenseink többségét (F2, F3, F5-7, F9) felismerő antitestek nem a vizsgált betegcsoportokra specifikusak, hanem egyéni különbségekkel magyarázhatóak. Ugyanakkor minden, a rutin diagnosztikában használt ELISA teszttel anti-topo I pozitívnak bizonyult beteg széruma tartalmazott anti-F4 antitestet.

A topo I ezen korábban is leírt immundomináns régiója mellett két új szakaszt (F1 és F8) azonosítottunk, melyekről korábban még nem mutatták ki, hogy anti-topo I antitestek célpontjai lennének. Az F1 fragmenst felismerő antitestek a dcSSc-s betegek 26%-ában, F8 fragmens elleni antitestek SLE-s betegek 50%-ában voltak kimutathatóak, ezen fragmensek dcSSc-re illetve SLE-re jellemző epitópokat tartalmazhatnak. A longitudinális vizsgálat során az anti-topo I antitestek F4 fragmens elleni reaktivitása 94%-ban állandó volt, az F1 és F8 fragmens elleni reaktivitás mértéke idővel változott.

8. Az anti-F4 autoantitestek finom epitóp mintázatának vizsgálata

Mivel a topo I F4-es fragmense a molekula 150 aminosav hosszú szakasza, lehetséges, hogy a természetes és betegség asszociált anti-F4 antitestek által felismert finom epitóp mintázat különböző. Ennek vizsgálatára előállítottunk 5 egymást átfedő MBP-topo I fragmens [AS 450-500 (F41), 500-550 (F42), 550-600 (F43), 475-525 (F44), 525-575 (F45)] fúziós fehérjét.



Az anti-F4 pozitív szérummintákat tovább vizsgálva azt találtuk, hogy az egészséges egyének (magyar, finn, brit véradók) és a SSc-s, SLE-s és egyéb szisztémás autoimmun betegek (Pécs, Debrecen, Firenze) szérummintáinak autoantitest reaktivitása F41, F42, F43, F44 és F45 fragmensek esetében nem különbözik.

9. Anti-DNS topoizomeráz I autoantitestek epitóp mintázatának klinikai jelentősége

Az anti-topo I autoantitestek epitóp-specifitása és az SSc bőr és belső szervi manifesztációi közötti lehetséges összefüggéseket is elemeztük. A vizsgált klinikai adatok (bőrérintettség kiterjedése, kézkontrakturák, azotémia és/vagy malignus hipertónia, szívérintettség, artéria pulmonális hipertónia, nyelőcső szűkület/tágulat és diszmotilitás jelenléte, tüdőfibrózis kiterjedtsége, forszírozott vitál kapacitás és diffúziós kapacitás értéke) statisztikai analízise során nem találtunk összefüggést az anti-topo I antitest epitóp specifitása és az SSc klinikai

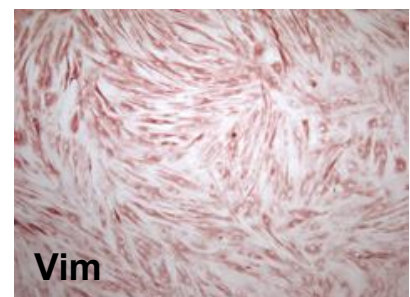
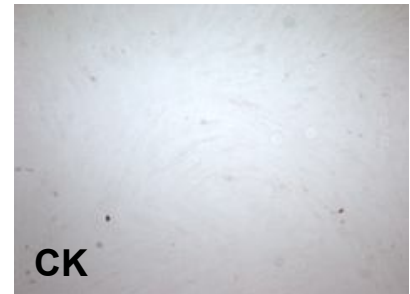
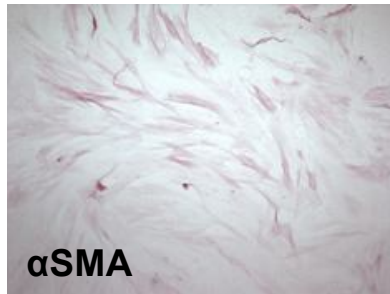
megjelenése között. Ugyanakkor a betegség fennállásának időtartamában kapott szignifikáns különbség az anti-F1 antitest pozitív és negatív dcSSc-s betegcsoportok között a longitudinális vizsgálatunk során kapott eredményeinkkel együtt arra utalhat, hogy a topo I ellenes immunválasz során a molekula immundomináns részének (F4-es fragmens) általános felismerése mellett a betegség későbbi fázisában jelenhetnek meg az N-terminális domén ellenes autoantitestek. Ezek szerint az F1 fragmens ellenes autoantitestek megjelenése a késői stádiumú dcSSc újonnan azonosított markere lehet. Az anti-F8 antitest pozitív és negatív SLE-s betegek klinikai adatainak összehasonlítása alapján úgy tűnik, hogy az anti-F8 antitest pozitív SLE-s betegeknek Raynaud jelensége van, betegségük pedig enyhébb lefolyású (arthritis, központi idegrendszeri és veseérintettség hiánya).

Az F1, F41, F42, F43, F44, F45 fragmensek elleni antitestek klinikai jelentőségét a betegség aktivitásának megítélésére használt EScSG aktivitási indexben szereplő adatok felhasználásával is megvizsgáltuk. Eredményeink szerint az anti-F1 pozitív SSc betegek EScSG aktivitási index értéke szignifikáns mértékben emelkedett. A betegeket a betegség alcsoportok szerint külön vizsgálva megállapíthatjuk, hogy az anti-F1 pozitív dcSSc betegek EScSG aktivitási index értéke is szignifikáns mértékben emelkedett.

10. SSc betegek és egészséges egyének fibroblasztjainak celluláris és molekuláris vizsgálata

Korai aktív dcSSc-s beteg és kontroll egyének alkarjának feszítő oldaláról bőrbopsziát vettünk, melyből kiindulva külföldi intézetek módszertani leírásainak alapján beállított protokoll szerint sikeresen hoztunk létre primer bőr fibroblaszt kultúrákat. A sejtenyészeteket organoid formában 1x1x1 mm-es szövet-darab fedőlemez alatt elhelyezésével, majd a kirajzó fibroblasztok felszaporításával alakítottuk ki. A bőrbopsziákból kiindulva 6 beteg és 2 kontroll bőr fibroblaszt sejtvonalat sikerült létrehozni. A megtapadt és növekedésnek indult sejteket felszaporítottuk és kisszámú ($n < 6$) passzázs mellett 10 (primer állapotúnak tekinthető) kapszulányi mennyiségben a további tanulmányokhoz lefagyasztottunk. Az SSc és kontroll fibroblaszt sejtekből kialakított tenyészeteken vizsgáltuk autoantitest-kötődésüket valamint antigén-fragmentum megkötési jellemzőiket, és kísérleteket végeztünk egy preparatív autoantitest-tisztításra alkalmas módszer kialakítására.

A tenyésztett fibroblaszt sejteket különböző mesenchymális markerekre vizsgáltuk, az immuncitokémiai tipizálást mindegyik létrehozott sejt-kultúrán elvégeztük. A citoplazmáris markerek mellett az extracelluláris matrix-termelés paramétereiként az in vitro fibronectin-képződést is vizsgáltuk. A sejt-kultúrákat 8-lyukú lemezekben paraformaldehid-fixálás és szaponinos permeabilizálás után indirekt immunperoxidáz eljárással vizsgáltuk, és szemikvantitatív skálán értékeltük. Eredményeink szerint a kialakított tenyészetek vimentin-pozitív mesenchymális sejtekből álltak, citokeratin-pozitív (epitheliális) sejtek elenyésző mennyiségben voltak kimutathatók. Kiszámított dezmin-pozitivitást mutató sejtek mellett (miofibroblasztokra jellemző) változó intenzitású és gyakoriságú α -simaizom-aktin jelölődést figyeltünk meg, mely mértékében a fibronectin-termeléshez hasonlóan nem volt értékelhető különbség a SSc és kontroll minták között.



A fibroblaszt-tenyészeteket jellemzésük után célsejtként alkalmaztuk SSc és kontroll szérumok vizsgálatára, lehetséges anti-fibroblaszt antitestek kimutatására áramlási citometriás eljárásban. Az adherens SSc és kontroll sejteket tripszin-mentes Ca^{2+} -keláló eljárással választottuk le, majd Protein G affinitás-kromatográfiás eljárással tisztított IgG-vel inkubáltuk 10, 1 és 0,1 μ g/ml koncentrációban. Ezt követően a sejteket PE-konjugált anti-humán κ/λ koktél antitesttel jelöltük, és FACS Calibur készüléken analizáltuk. Eredményeink szerint a vizsgált szérumokban csak igen nagy koncentrációban volt kimutatható alacsony mértékű kötődés, ugyanakkor nem volt különbség SSc és normál fibroblaszt célsejtek között.

Az SSc-re jellemző anti-topo autoantitest-termelés és fokozott fibrózis közötti kapcsolatban felvetődött a célantigénnek a fibroblasztok felületére történő passzív adszorpciója. Ennek vizsgálatára rekombináns F1 és F4 topo-fragmentumokat inkubáltunk SSc és kontroll fibroblasztokkal MBP fúziós fehérje formájában. Ezt követően a sejteket nyúl anti-MBP antitesttel majd PE-konjugált ösvér anti-nyúl IgG antitesttel inkubáltuk. Eredményeink

szerint 10 µg/ml koncentrációban nem jön létre detektálható mértékű fragmens-kötődés a SSc és normál fibroblasztokhoz.

A humán fibroblasztokkal szembeni autoantitestek izolálására a monolayer kultúra mellett affinitás-matrix kialakításához a fibroblaszt sejteket dextrán-gyöngyök (Cytodex) felszínére növesztettük, és teljes humán szérummal reagáltattuk. Ezt követően a sejteket tartalmazó gyöngyöket kromatográfiás oszlopba töltöttük, majd ismételt mosás után savas pH-jú pufferrel eluáltuk. Eredményeink szerint a sejtek tenyészetben stabilan kötődnek a Cytodex felszínre, ugyanakkor az eluálás során leválnak a gyöngyről. Jelenleg a fibroblaszt gyöngyökhöz való stabil kötődésének optimalizálását végezzük. Az anti-topo autoantitest-aktivitású szérum fibroblasztokra gyakorolt in vivo hatását egér-recipientek felhasználásával vizsgáljuk.

A tenyésztett fibroblaszt sejtek génexpressziós vizsgálatára a sejtvonalakból totál RNS-t izoláltunk, melyet a kvalitatív és kvantitatív ellenőrzés után transzkriptum analízisnek vetettünk alá új-generációs szekvenáló készülék (Bay-Gen, Szeged) alkalmazásával. Ezen adatok kiértékelése jelenleg folyik.

A sclerodermás beteg és egészséges fibroblasztok génexpressziós mintázatát valós-idejű PCR felhasználásával vizsgáljuk különös hangsúlyt fektetve a WNT jelátviteli útvonal tanulmányozására, ugyanis újabb irodalmi adatok alapján ezen jól ismert jelátviteli kaszkád a daganatos megbetegedések mellett autoimmun kórképek pathomechanizmusában is szerepet játszik.

A különböző beteg és kontroll fibroblaszt tenyészetek foszforilációs fehérjeprofiliójának analízise céljából a fibroblasztok fehérje lizátumát foszfo-RTK array felhasználásával vizsgáljuk.

Több irodalmi adat számolt be a sclerodermás fibroblasztok által termelt proteázok lehetséges szerepéről a betegség pathomechanizmusában. Ezt bizonyítandó, a beteg és kontroll fibroblaszt tenyészetek felülúszójában a mátrix metalloproteinázok jelenlétét szubsztrát (zselatin és kazein) zimográfia alkalmazásával vizsgáltuk. A zimográfias vizsgálattal sikerült különböző MMP-k (MMP-2, 9 és MMP-7) jelenlétét illetve eltérő aktivitási mintázatát igazolni a beteg és kontroll fibroblasztok között. További, kiterjedtebb vizsgálatainkban a fibroblasztok proteáz aktivitását vizsgáljuk egy komplex proteáz array felhasználásával, mely

az MMP-k mellett más proteázok (pl. cathepszinek, kallikreinek) expressziós mintázatának változásáról is információt nyújt.

11. Klinikai vizsgálatok a kórkép aktivitásának értékelésére. A szérum aktivitási markerek vizsgálata, valamint egy a bőrérzékenység felmérését szolgáló új eszköz kidolgozása SSc-ben

A követéses vizsgálatunk célja a betegség aktivitásával kapcsolatos európai index validálása illetve egy esetleges új index kidolgozása, valamint a betegségaktivitás szempontjából fontos biomarkerek identifikálása. Mind a klinikai és rutin laboratóriumi, mind számos endothel sejt aktivációt- és károsodást, fibrosist, valamint immunrendszer aktivációra jellemző biomarker alap- valamint egyéves vizsgálatát elvégeztük. Egyelőre a kiindulási és az egyéves adatok állnak rendelkezésre, a további vizsgálatok még nem zárultak le. Az eddigi eredmények alapján az alábbi következtetések vonhatók le:

- Az EScSG aktivitási index (európai aktivitási index) szerkezeti validitása („construct validity”) a nagyszámú beteganyagon végzett vizsgálataink alapján jónak bizonyult, egyaránt tükrözte a betegség perifériás vaszkuláris és fibrotikus jelenségeit.
- Az EScSG aktivitási index azonban nem tükrözi megfelelő mértékben a tüdőérzékenység interszticiális és vaszkuláris komponensét.
- A munkacsoportunk által képezett, új 12 pontos aktivitási index jobban tükrözi az interszticiális- és vaszkuláris tüdőérzékenységet.
- A vizsgált biomarkerek közül a kiindulási és 1 éves klinikai és laboratóriumi paraméterekkel futtatott kategorikus főkomponens elemzések során 5 biomarker mutatott konzekvens összefüggést az EScSG aktivitási index-szel: a CRP, albumin, VEGF, sPSGL-1 és vWF.
- Munkacsoportunk a CRP emelkedéssel kapcsolatban korábban már igazolta, hogy szisztémás sclerosiban befolyásolja a betegség prognózisát. A gastrointestinalis érintettség mérésére SSc-ben jelenleg még nem áll rendelkezésre egy egységes mutató, mert a tápcsatorna bármely része érintett lehet, emiatt ennek kivizsgálása és kvantifikálása meglehetősen bonyolult. Az albumin szint kapcsolata az aktivitási index-szel tükrözheti az aktívabb és előrehaladottabb betegséghez társuló malabszorptiót, de negatív akut fázis fehérjeként a gyulladáshoz kapcsolódó aktivitás jele is lehet. Az emelkedett endothel sejt aktivációs

markereket (vWF) és angiogenesis markereit (VEGF) korábban már összefüggésbe hozták az aktuálisan zajló kóros folyamatokkal SSc-ben. Az endothel sejtek aktivációja egyike a legkorábbi eseményeknek a betegség patogenezisében. Emellett a károsodott angiogenezis és szöveti hypoxia számos, a betegségre jellemző klinikai manifesztáció (ujjbegyfekélyek megjelenése, jellegzetes kapilláris mintázat, teleangiectaziák) megjelenéséért is felelős. Ezeknek a markereknek az emelkedése tehát szintén a zajló érkárosodás, vagyis az SSc vaszkuláris aktivitásának jele lehet. A solubilis P-selectin glycoprotein ligand 1-ről kevés adat áll rendelkezésre szisztémás sclerosisban. Egy vizsgálatban megtartott szintjét lehetséges protektív tényezőként azonosították a tüdőfibrozis kialakulásával szemben. A betegség aktivitásával kapcsolatos szerepe további vizsgálatokat igényel.

- Az előzőekben felsorolt 5 paraméter közül 4 marker (CRP, albumin, VEGF, sPSGL-1) a 12 pontos aktivitási index-szel is összefüggést mutatott a kategórikus főkomponens analízis során.

- Amennyiben beigazolódik a 12 pontos aktivitási index validitása a scleroderma aktivitás megítélésében, célszerűnek látjuk a vele korreláló további labormarkerek (anti-topoizomeráz I antitest titer, KL-6, SP-D, PINP és PIIINP) vizsgálatát is a betegségaktivitás megítélése és követése céljából. Az anti-topoizomeráz I antitest magasabb titerét korábban már összefüggésbe hozták a magasabb betegségaktivitással, illetve korrelált a forszírozott vitálkapacitással, a szénmonoxid diffúziós kapacitással, valamint a bőrfolyamat kiterjedésével (módosított Rodnan bőrpontszámmal). A KL-6 és SP-D a II. típusú alveolaris epithel sejtek által termelt markerek, amelyek munkacsoportunk és más kutatócsoportok vizsgálatai alapján is összefüggést mutattak a tüdőfibrosis aktivitásával és súlyosságával egyaránt. A kollagén anyagcsere termékei közül, melyek a fibrosis bizonyított markerei, a PINP és PIIINP vizsgálatunkban az általunk képezett 12-pontos aktivitási index-szel korrelált. A PINP és PIIINP-ről korábban már igazolták, hogy a bőrfolyamat kiterjedésével korrelálnak, munkacsoportunk emelkedett PIIINP esetén kedvezőtlen prognózist mutatott ki SSc-s betegekben.

- Két egyszerűen felmérhető fizikális vizsgálati paraméter, a fekélyek és kontraktúrák száma, konzekvensen összefüggést mutatott az EScSG aktivitási index-szel. Ezek további vizsgálatát javasoljuk és magunk is elvégezzük a betegségaktivitás megítélésében játszott szerepük megítélése céljából.

A kontraktúrák jelentőségének további vizsgálata során azt találtuk, hogy a kontraktúrák már a betegség korai fázisában kialakulnak. Továbbá a kiterjedtebb ízületi érintettség (nagyobb össz-kontraktúra szám) kedvezőtlen prognosztikus tényezőnek bizonyult a vizsgált betegcsoportban. A kontraktúra szám emelkedése az MRSS-el, emelkedett vvt süllyedés értékkel és az EScSG aktivitási index-szel mutatott összefüggést, ez a gyulladás és betegségaktivitás szerepét támogatja a kontraktúrák kialakulási mechanizmusában. Adataink alapján a korai gyulladáscsökkentő kezelés (kémiai bázisterápiás gyógyszerek vagy biológiai terápiák alkalmazása) hatékony lehet a kontraktúrák okozta jelentős ízületi érintettség és következményes mozgásbeszűkülés megelőzésében.

Követéses vizsgálatunkban tanulmányoztunk az RDW (red cell distribution width) klinikai jelentőségét is SSc-ben, melyre korábban ebben a betegcsoportban nem állt rendelkezésre adat. SSc-ben az RDW értéke számos pathologiai folyamat (kiterjedt vasculopathia, fibrózis, aktuális gyulladás) integratív mutatója lehet. Az RDW emelkedése a cardiorespiratorikus károsodás kialakulására utalhat.

Habár az MRSS egyszerű és reprodukálható módszer, az intra- és interobszerver variabilitása relatíve magas, és a módszer alkalmazása előtt a vizsgáló személy megfelelő oktatása szükséges. A bőrfolyamat megítélésére egy alternatív, egyszerű, független mérőeszköz bevezetésére is szükség lenne, mivel két független mérőeszköz együttes alkalmazása jelentősen megnövelné a bőrvastagodás értékelésének megbízhatóságát és pontosságát. Abból a feltételezésből kiindulva, hogy a betegek megbízható adatot tudnak szolgáltatni a bőrük érintettségére vonatkozóan, kidolgoztunk és részlegesen validáltunk egy beteg önkitöltős kérdőívet a bőrvastagság megítélésére.

A fentiek mellett egy retrospektív longitudinális vizsgálatban a KL-6 szérumbiomarker prognosztikai szerepét is vizsgáltuk 137 SSc-os beteg intersticiális tüdőbetegségére vonatkozóan. Eredményeink szerint a jelentősen emelkedett KL-6 szint növeli a halálozás bekövetkezésének esélyét. Ugyanakkor a KL-6 szérumbiomarker szintjének változása egy régi betegségfennállású betegcsoportban nem jelzi a tüdőfolyamat változását. Cyclophosphamid kezelt csoportban a KL-6 szintje szignifikánsan csökkent a kiindulási értékhez képest, míg az FVC értékben ezzel egyidejűleg nem következett be változás.