

A szöveti átépülés valamint az autoimmunitás kapcsolata súlyos, terápia rezisztens atopiás dermatitisben

Az allergiás betegségek diagnosztikája és kezelése nagy társadalmi terhet jelent a fejlett országokban. Ezen kórképek közé tartozik az atopiás dermatitis (AD), melynek fontossága nem csupán gyakori előfordulásában és krónikus jellegében rejlik, hanem abban is, hogy megfelelő kezelése csökkentheti a későbbi életkorban a betegeknél gyakran jelentkező légúti allergiás szenzitizáció, rhinitis allergica illetve asthma bronchiale kialakulásának esélyét. Az AD prevalenciája a 2. világháború óta növekszik és néhány földrajzi területen 20-szoros növekedést mutat. Európában a betegség prevalenciája gyerekeknél 10-20%, hazánkban 17%, míg a prevalencia felnőttekben 0,5-1%. Munkánk során a súlyos, terápia-rezisztens AD hátterében álló immunológiai mechanizmusokat, a szöveti átépülést, a bőr barrier elváltozásokat és ezek kapcsolatát vizsgáltuk. Véleményünk szerint a betegség súlyos formájának hátterében álló eltérések pontosabb megítélése a sikerebb kezelések alapja lehet ennél a jelenleg igen nehezen kezelhető AD csoportnál.

Az iNKT sejtek tanulmányozása AD-s betegek perifériás vérében

Mivel csak kevés és egymásnak ellentmondó eredmény ismert az iNKT sejtek számáról és funkciójáról AD-ben, ezért a teljes iNKT számot, az alcsoportok gyakoriságát és a sejtek funkcióját vizsgáltuk a betegek perifériás vérében sejtfelszíni festéssel, intracelluláris citokin festéssel és áramlási citométerrel. A keringő iNKT sejtek számának átlaga szignifikánsan alacsonyabb volt a beteg populációban az egészségesekhez viszonyítva. Az iNKT sejt 4 alcsoportját vizsgálva [$CD4^+CD8^-$, $CD4^-CD8^+$, dupla negatív (DN), dupla pozitív (DP)] csökkenést találtunk mind az abszolút szám, mind a százalék tekintetében és a legkifejezettebb korreláció a teljes sejtszám és a DN alcsoport sejtszáma között volt. Nem találtunk összefüggést az iNKT sejtszám valamint az életkor, vagy a nem, vagy a betegség súlyossága illetve a szérum teljes IgE szintje, vagy a vér LDH szintje közt. Az iNKT sejtek funkciójának vizsgálatakor az intracelluláris $IFN\gamma$ expresszió csökkent, míg az IL-4 nőtt a teljes iNKT sejtcsoportban AD-s betegekben. A DN iNKT alcsoport AD betegekben szignifikánsan alacsonyabb $IFN\gamma$ és magasabb IL-4 szintet mutatott az egészségesekhez viszonyítva. A másik 3 iNKT alcsoport esetében nem volt különbség az intracelluláris $IFN\gamma$ és IL-4 szintekben a betegek és az egészségesek között. Összefoglalva, az iNKT sejtek feltehetően szerepet vállalnak az AD pathogenezisében amit számukban és funkciójukban talált szignifikáns eltérések valószínűsítenek.

Interleukin (IL)-16 szint és allergiás szenzitizáció vizsgálata AD-s betegekben

Az IL-16 citokinnek kemotaktikus hatása mellett gyulladást elősegítő és immunregulátoros szerepe is ismert. Célunk volt megvizsgálni a szérumban IL-16 szintet, és az allergiás szenzitizáció közötti összefüggést AD-s betegekben. A szérumban IL-16 szintet ELISA módszerrel határoztuk meg, továbbá az eosinophil sejtszámot, a szérumban teljes IgE és specifikus IgE szintjét mértük, és Prick tesztet végeztünk a betegekben. A specifikus IgE és a Prick teszt alapján a betegekben szenzitizált, és nem-szenzitizált csoportokra osztottuk, és úgy a teljes betegcsoportban, mint az alcsoportokban a szérumban IL-16 szint, teljes IgE szint és eosinophil sejtszám közötti korrelációt is vizsgáltuk. A teljes AD betegcsoportban szignifikánsan magasabb szérumban IL-16 szint volt az egészségesekhez és a psoriasisos betegekhez viszonyítva. Szignifikáns korrelációt mutatott az IL-16 és teljes IgE szint, a teljes IgE szint és az eosinophil sejtszám, de nem volt összefüggés az IL-16 és az eosinophil szám között. A szenzitizált, és nem-szenzitizált csoportokat összehasonlítva az IL-16 szint szignifikáns különbséget mutatott a specifikus IgE alapján létrehozott alcsoport felosztásokban, de nem a Prick teszt eredményei által felosztottban. Ugyanakkor a szérumban teljes IgE szint szignifikáns különbséget mutatott a szenzitizált, és nem-szenzitizált csoportokat összehasonlítva. Összefoglalva tehát az AD-s betegek IL-16 szintje korrelált bizonyos vizsgálatokban az allergiás szenzitizáció jelenlétével, de ez nem volt olyan erős összefüggés, mint a teljes IgE szint és az allergiás szenzitizáció közötti kapcsolat.

Szöveti átépülés atopiás bőrgyulladásban

Az AD súlyos, krónikus formájában szenvedő betegek bőre megvastagodott, száraz, hámló, lichenifikált, és a nem-gyulladásos időszakban is a normálistól eltérő szövettani szerkezetet mutat. A szerkezeti eltérés háttérében álló átalakulási folyamatot szöveti átépülésnek hívjuk, mely során mind a hámban, mind az irhában változások mennek végbe. Célul tűztük ki az átépülés regulációjának háttérében álló kemokin-mediálta kommunikációs útvonalak felderítését atopiás bőrgyulladásban. A normál humán dermális fibroblasztok (NHDF) kemokin receptorait áramlási citométerrel és immunhisztokémiai (IHC) módszerrel vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a CCR3-t nagymértékben expresszálják a sejtfelszínen és ugyanezt tapasztaltuk AD-s betegek bőréből származó biopsziás anyagban is. Megvizsgáltuk továbbá a CCR3 és ligandjainak (CCL5, CCL8, CCL11, CCL24, CCL26) expressziós profilját qPCR technikával és IHC-val AD-s betegekben, egészségesekben és egyéb gyulladásos kórképekben (psoriasis, prurigo) szenvedőkben, mely alapján a CCL26 bizonyult a leginkább AD-specifikus CCR3 kemokinnek. Majd a CCL26 regulációs útvonalait vizsgáltuk primer epidermális keratinocitákon (PEK) és NHDF-ken qPCR módszerrel, és azt tapasztaltuk, hogy a PEK-k alacsony CCL26 termelése szignifikánsan emelkedett gyulladásos Th2 citokinek (IL-4 and IL-13) hatására. Majd funkcionális vizsgálatokkal (fibroblaszt proliferáció, intracelluláris Ca^{2+} mobilizáció, sejt migráció, és repair-kapacitás mérése) a CCR3 aktivitását

mutattuk ki NHDF-n. Összességében eredményeink megmutatták, hogy a CCR3 megjelenik, és funkcionálisan aktív a NHDF-n, tehát a kemokinek által vezérelt epidermo-dermális kommunikációs útvonalak fontos szerepet játszanak az atopiás bőrgyulladásokban tapasztalt szöveti átépülés kialakulásában.

Lipoxygenáz és cyclooxygenáz mediált szignálok vizsgálata AD-s betegek perifériás vérében

A lipoxygenázok (LOX) és a cyclooxygenázok (COX) a PUFA bioaktív prosztaglandinokká, leukotriénekké, thromboxánokká való alakulásának fő enzimjei. A LOX és COX útvonalak igen fontosak számos gyulladásos betegségben (pl. AD) pro- és anti-inflammatórikus aktív metabolitjaik szintézise és lebontása révén. Vizsgálatainkban (qPCR) az 5-LOX, 12-LOX, 15-LOX és COX útvonalak, valamint egyéb enzimatikus útvonalak szignifikánsan alulműködőnek mutatkoztak AD-s betegek perifériás vérében (PBMC) egészségesekhez viszonyítva. Ezen túlmenően HPLC-vel eicosapentaensav (EPA), docosapentaensav (DHA) és arachidonsav (AA) 19 metabolitját határoztuk meg, valamint a LOX és COX metabolizmus további bioaktív derivátumait (thromboxánok, leukotriének, prosztaglandinok és protektinek). AD-s betegek perifériás vérében a LOX és COX útvonalak alul-reguláltak, így ez csökkenti az eicosanoid/docosanoid szintézist az allergiás gyulladás során az egészségesekhez viszonyítva.

Kapcsolat a súlyos bőrgyulladás és a barrier károsodások közt AD-s betegekben

A hám filaggrin (FLG) deficienciája jól ismert predisponáló faktor az AD kialakulására. Az alacsony FLG expresszió haploinsufficiencia, vagy szerzett módon, súlyos gyulladás következtében alakulhat ki. Célunk volt meghatározni azokat a klinikai és biokémiai paramétereket, amik FLG mutáció, illetve amik szerzett FLG károsodás mellett kialakuló AD-hez kötöttek. Az AD-s betegek új beosztását vezettük be az FLG mutáció jelenléte és a klinikai súlyosság alapján, és 3 csoportot alakítottunk ki: enyhe-középsúlyos vad-típus (A), súlyos vad-típus (B) és súlyos mutáns (C). Mindhárom csoportban klinikai és laboratóriumi vizsgálatokat végeztünk. A két súlyos klinikai csoport (B és C) betegek nem különböztek a szignifikánsan a barrier funkciót illetően, míg az A csoport betegek jobb eredményeket mutattak a másik 2 csoportnál. Ugyanakkor szignifikáns különbséget találtunk a B és C csoport betegek közt az allergiás szenzitizáció tekintetében. Ezek alapján látható, hogy a bőr barrier funkció korrelál a bőrgyulladás súlyosságával, és mind az FLG mutáns, mind a vad-típusban hasonló mértékben károsodott, míg a FLG mutáns betegek esetén az allergiás szenzitizáció kockázata nagyobb a vad-típushoz viszonyítva.

A myeloid dendritikus sejtek tanulmányozása AD-s betegek perifériás vérében

AD-ben nem pontosan ismert, hogy mikor és hol kerülnek a keringő myeloid dendritikus sejtek (mDC) olyan állapotba, hogy az atopiás karakterre jellemző T sejt polarizációt

elindítsák. A kísérleti modellrendszerünkben thymic stromal lymphopoietin (TSLP) és *Staphylococcus enterotoxin B* (SEB) által hoztunk létre AD-specifikus szöveti mikrokörnyezetet mDC sejtenyészetben. Vizsgáltuk, hogy az AD-s betegek és egészségesek perifériás véréből izolált mDC-k különböznek-e citokin expressziós profilukban (de novo) és vajon változik-e TSLP és SEB stimuláció hatására a sejtek T sejt-polarizáló citokin profilja. Multiparaméteres szkennelő lézer citometria (LSC) segítségével határoztuk meg a T sejt-polarizáló citokin profilt (IL-2, CCL17, IL-6, TNF- α , IL-12p40/p70, TGF- β , IL-10 and IL-23p19) és a minták egyéb sejtes tulajdonságait AD-s betegek és egészségesek vérében. Eredményink szerint az AD-s betegekből származó nem stimulált mDC-k előaktivált állapotban vannak és pluripotens T sejt-polarizáló kapacitással rendelkeznek, továbbá a bőr mikrokörnyezet jelenléte elengedhetetlen az mDC betegség-specifikus aktivitásának (Th2-Th22 polarizáló kapacitás) kialakulásában. Hangsúlyozzuk még, hogy az mDC-k közvetlen vizsgálatában az LSC megfelelő technika az új, célzott DC-terápiák hatásának tanulmányozására.

Regulatív T sejtek AD-ben

Célunk volt bemutatni, vajon az aktiv effektor T sejtek jelenléte AD-ben függ-e a regulatív T sejtek (Treg) számának, vagy funkciójának változásától. Egészségesekben és AD-s betegekben határoztuk meg (áramlási citometria) a CD4⁺CD25^{bright}CD127^{-/low}FOXP3⁺ és a bőrbe vándorló CLA⁺CD4⁺CD25^{bright}FOXP3⁺ Treg sejtek százalékos előfordulását és annak korrelációját a betegség súlyosságához képest. A Treg szuppresszor aktivitását és proliferációját T-sejt stimuláció után vizsgáltuk. AD-s betegekben szignifikánsan magasabb volt a Treg sejtek százalékos előfordulása az egészségesekhez viszonyítva és a sejtszám a betegség súlyosságával is szignifikánsan korrelált. A Treg-ek normális szuppresszor aktivitása csökkent SEB jelenlétében. A SEB folyamatos jelenléte az AD betegek bőrén a Treg-ek szerzett funkcionális károsodásának létrejöttét triggerelheti. A megnövekedett Treg szám és a betegség súlyossága közti korreláció a sejtek fontos szerepére utal AD-ben.

Az immun mediált gyulladás vizsgálata egyéb bőrbetegségben

Az AD kutatásokkal szoros összefüggésben munkacsoportunk folyamatosan végez vizsgálatokat psoriasisban és autoimmun krónikus urticariában (ACU) is, sokszor az AD gyulladásának egyféle kontrolljaként tekintve ezen kórképekre. Egy ilyen kutatásunkban a korai és a késői életkorban manifesztálódó psoriasis klinikai és epidemiológiai jellemzőit vizsgáltuk, különös figyelmet szentelve az egyes altípusokkal asszociált ko-morbiditások jelenlétére. Multicentrikus adatgyűjtésünk során összefüggéseket kerestünk a diagnózis felállításának időpontja, és a bináris ko-morbiditási kimenetek közt az életkorra és egyéb lényeges faktorokra illesztett többszörös logisztikus regressziós analízis alkalmazásával.

Pozitív családi anamnézis, psoriasisos arthritis, és depresszió előfordulásának prevalenciája emelkedett a korai életkorban kialakuló psoriasisos betegekben. Ugyanakkor a késői kialakulású forma esetén gyakrabban fordult elő obezitás és nagyobb haskörfogati értékek a korai formához viszonyítva. A psoriasis megnövekedett családi előfordulása korai életévben psoriasisossá vált betegeknél azt sugallja, hogy a psoriasis fiatalabb életkorban való kialakulásában erősek lehetnek a genetikai hatások. Ugyanakkor hasonlóan fontos összefüggés látható a centrális elhízás és a későn manifesztálódó psoriasis között, mely azt mutatja, hogy az elhízás az egyik olyan faktor lehet, mely prediszponálja az időseket a psoriasis kialakulására.

Vizsgálatot végeztünk arra nézve, hogyan növelhetnénk az autoimmun krónikus urticaria (ACU) diagnosztikai szűrővizsgálatoként ismert autológ szérumbőrteszt (ASST) szenzitivitását és specificitását, mivel a „gold standard” esszék (hisztamin felszabadulási teszt és CD63 teszt) kivitelezése nehézkes. Célunk volt meghatározni, hogy vajon az ASST specificitása növelhető-e a beteg szérumbőrtesztjével, valamint hogy az ASST, vagy a CD63 teszt alkalmasabb-e az ACU súlyosságának meghatározására. Vizsgálatunk bizonyította először az ASST és CD63 teszt összehasonlításakor azt, hogy a klinikai gyakorlatban nem ajánlott hígított beteg szérumbőrteszt alkalmazása az ASST kivitelezésére ACU diagnosztikájában. Ugyanakkor mind a hígított betegszérumbőrteszt pozitív ASST, mind a pozitív CD63 teszt megfelelő mutatója az ACU súlyosságának.