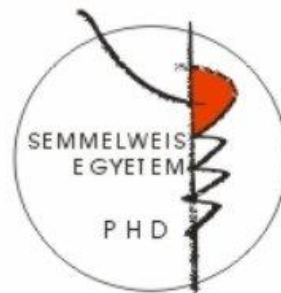


Patogenetikai tényezők (dohányzás, citrullináció és mikrovezikulák) vizsgálata autoimmun reumatológiai kórképekben

Doktori értekezés

Dr. Baka Zsuzsanna

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



- Témavezető: Dr. Nagy György egyetemi adjunktus, Ph.D.
- Hivatalos bírálók: Prof. Dr. Szekanecz Zoltán egyetemi tanár, az MTA doktora
Dérfalvi Beáta egyetemi docens, Ph.D.
- Szigorlati bizottság elnöke: Prof. Dr. Fekete Béla egyetemi tanár, az MTA doktora
- Szigorlati bizottság tagjai: Bajtay Zsuzsa, egyetemi docens, Ph.D.
Dr. Prohászka Zoltán, tudományos főmunkatárs, az MTA doktora

Budapest
2012

1. TARTALOMJEGYZÉK

1.	TARTALOMJEGYZÉK	2
2.	RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
3.	BEVEZETÉS	9
3.1.	Autoimmunitás.....	9
3.1.1.	Az immunrendszer funkciója.....	9
3.1.2.	Autoimmun folyamat kialakulásához vezető zavarok az immunrendszer működésében	10
3.1.3.	Genetikai tényezők szerepe az autoimmun reumatológiai betegségek kialakulásában	11
3.1.4.	Környezeti tényezők szerepe az autoimmun kórképek kialakulásában....	13
3.1.5.	A tüneteket megelőző immunregulációs zavar –preklinikai stádium.....	14
3.1.6.	A betegség kezdete – a tünetek megjelenése.....	15
3.1.7.	Effektorok a kialakult autoimmun betegségben	16
3.1.8.	Az autoimmun betegségek patomechanizmusának összefoglalása	20
3.2.	Rheumatoid arthritis	21
3.2.1.	Általános jellemzők	21
3.2.2.	Autoantitestek RA-ban	23
3.2.3.	Kockázati tényezők.....	27
3.2.4.	Patomechanizmus	32
3.2.5.	Biológiai terápia és citokingátlás RA-ban.....	36
3.3.	Polymyositis/dermatomyositis.....	38
3.3.1.	Általános jellemzők	38
3.3.2.	Autoantitestek.....	39
3.3.3.	Kockázati tényezők.....	41
3.3.4.	Patomechanizmus	42
4.	CÉLKITŰZÉS	45
5.	MÓDSZEREK	47
5.1.	Vizsgálati alanyok.....	47
5.1.1.	Pulmonológiai betegek a dohányzás–citrullináció–ACPA kapcsolat vizsgálatához	47

5.1.2.	Betegek a mikrovezikula-vizsgálatokhoz.....	49
5.2.	<i>In vitro</i> sejtes vizsgálatok	50
5.2.1.	Dohányfüst elnyelése.....	50
5.2.2.	Sejtek és kezelési séma.....	51
5.2.3.	PBMC izolálás.....	52
5.3.	ELISA vizsgálatok (szérum PAD4, ACPA és IgA RF).....	52
5.4.	CK enzimaktivitás mérése	54
5.5.	Áramlási citometria.....	55
5.5.1.	Dohányfüsttel kezelt sejtek.....	55
5.5.2.	Mikrovezikulák.....	55
5.6.	Immunhisztokémia.....	56
5.7.	Elektronmikroszkópia	57
5.8.	Statisztika.....	57
6.	EREDMÉNYEK	58
6.1.	A dohányzás–citrullináció–ACPA kapcsolat vizsgálata.....	58
6.1.1.	A citrullinált fehérjék, a CK7 és a PAD4 szöveti festődése.....	58
6.1.2.	Szérum PAD4, ACPA és IgA RF	63
6.1.3.	Betegkérdőív, a klinikai és laboratóriumi paraméterek és az immunhisztokémiai pontszám összefüggése a tüdődaganatos betegekben.....	65
6.2.	Dohányfüst hatása a TNFR expresszióra.....	66
6.3.	Mikrovezikulák.....	67
6.3.1.	Lymphocyta és monocyta eredetű MV-k	67
6.3.2.	CK enzimaktivitást mutató MV-k	68
6.3.3.	A klinikai és laboratóriumi paraméterek korrelációja az MV-k számával PM/DM-ben.....	69
6.3.4.	Az MV-k morfológiája PM/DM-ben.....	71
7.	MEGBESZÉLÉS	73
7.1.	A dohányzás és citrullináció szerepe az ACPA-képzésben.....	73
7.1.1.	A fokozott citrullináció nem elégséges ACPA-képzéshez.....	74
7.1.2.	A dohányzás és a jelentős citrullináció nem indukál ACPA-választ.....	76
7.1.3.	A dohányzás befolyásolja az RF-termelést	76
7.2.	A dohányzás-citrullináció lehetséges szerepe a daganatképződésben.....	77

7.3.	A dohányfüst hatása a TNFR-kifejeződésre	78
7.4.	A mikrovezikulák szerepe.....	79
8.	KÖVETKEZTETÉSEK	82
9.	ÖSSZEFOGLALÁS	83
10.	SUMMARY	84
11.	IRODALOMJEGYZÉK	85
12.	SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	104
12.1.	A disszertációhoz kapcsolódó közlemények.....	104
12.2.	A disszertációhoz nem kapcsolódó közlemények.....	104
13.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	106

2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

A disszertáció helyesírásánál A magyar helyesírás szabályai (1), az Orvosi helyesírási szótár (2), a Brenesán Orvosi szótár (3) és A magyar orvosi nyelv tankönyve (4) című szakkönyvek irányelveit és szabályzatát követtem.

ACPA	citrullinált protein ellenes antitest
AH	ancestral haplotype (ősi haplotípus)
AFA	filaggrin ellenes antitest (anti-filaggrin antibody)
AKA	keratin ellenes antitest (anti-keratine antibody)
ANA	antinukleáris antitest
anti-CCP	ciklikus citrullinált peptid ellenes antitest
anti-MCV	módosított citrullinált vimentin ellenes antitest
AP-1	aktivátor protein-1
APF	antiperinukleáris faktor
Arg	arginin
BAFF	B cell-activating factor/B-sejtet aktiváló faktor
Blys	B lymphocyte stimulator/B-lymphocytát stimuláló
Breg	szabályozó/regulátoros B-sejt
CD40L	CD40 ligand
CEP-1	citrullinált enoláz peptid-1
COX	ciklooxigenáz
cFb	citrullinált fibrinogén
CIA	kollagénindukált arthritis
Cit	citrullin
CK	kreatin-kináz
CK7	citokeratin-7
CRP	C-reaktív protein
CTLA-4	citotoxikus T-lymphocytá antigén 4
D	dohányos
DA	dohányos asthmás beteg
diab.mell.	diabetes mellitus
diff.adeno:	differenciált adenocarcinoma

DK	dohányos kontroll
DM	dermatomyositis
DMARD	betegségmódosító gyógyszer (disease modifying anti-rheumatic drug)
DNS	deoxiribonukleinsav
DS	dohányos sarcoidosisos beteg
dsDNS	dupla szálú DNS
DT	dohányos tumoros beteg
EBNA	Epstein-Barr vírus nukleáris antigénje
EBV	Epstein-Barr vírus
EIRA	Epidemiological Investigation of Rheumatoid Arthritis
ELTE	Eötvös Loránd Tudományegyetem
EMG	electromyogram
eMV	endothel eredetű MV
EV	extracelluláris vezikula
FACS	Fluorescence-activated cell sorting, áramlási citometria
Fb	fibrinogén
Fc	antitest konstans régiója
Fc γ R	IgG konstansrégiót kötő receptor
FCS	fetal calf serum, borjúsérum
FSC	forward scatter
Fv	antitest variábilis régiója
FLICE	FADD-szerű IL-1 β -konvertáló enzim
GOT	glutamát-oxálacetát-transzamináz
GPT	glutamát-piroszőlősav-transzamináz
HLA	humán leukocytaantigén
HPT	hypertonia
ic.	intracellularis
ICOS	Inducible T-cell COStimulator/Indukálható T-sejtet kostimuláló
ICOSL	ICOS ligand
IFCC	International Federation of Clinical Chemistry
IFN	interferon
IL	interleukin

IMACS	International Myositis Assessment and Clinical Studies
IRF-5	interferonregulátor-faktor 5
IVIG	intravénás immunglobulin
LDH	laktát-dehidrogenáz
MCP-1	monocytakemotaktikus protein 1
MDA5	melanoma differentiation-associated gene 5
MHC	major histocompatibility complex
miRNS	micro RNS
mRNS	messenger RNS
MTA	Magyar Tudományos Akadémia
mucin	mucintermelő daganat
MV	mikrovezikula
MVB	multivezikuláris test
MSA	myositisspecifikus autoantitest
MYOACT VAS	Myositis disease activity assessment visual analogue scale
N	nem dohányos
NA	nem dohányos asthmás beteg
NARAC	North American RA Consortium
nem diff.adeno:	differenciálatlan adenocarcinoma
nem szekr:	nem szekretáló tumor
NF- κ B	nukleáris faktor- κ B
NK	nem dohányos kontroll
NS	nem dohányos sarcoidosis beteg
NSCLC:	nem kissejtes tüdőrák
NT	nem dohányos daganatos beteg
PAD	peptidil-arginin-deimináz
PADI	peptidil-arginin-deimináz génje
PBS	phosphate buffer saline/foszfátpuffersó
PBMC	perifériás vérből származó mononukleáris sejt
PEG	poli-etilénlikol
PM	polymyositis
pMV	thrombocyta eredetű MV

PTPN22	proteintirozinfoszfátáz, nem receptor fajta 22
RA	rheumatoid arthritis
RF	rheumatoid faktor
RNS	ribonukleinsav
RUNX1	runt related transcription factor 1
SCLC	kissejtes tüdőrák
SE	shared (közös) epitóp
SEM	standard error of the mean
SLC22A4	solute carrier family 22 member 4
SLE	szisztémás lupus erythematosus
SONORA	Study of New Onset Rheumatoid Arthritis
SPA	spondylarthritis
SRP	signal recognition particle/szignálfelismerő részecske
SSc	szisztémás sclerosis
SSC	laphámrák, illetve side scatter
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
sTNF	szolubilis tumornekrózis-faktor
sTNFR	szolubilis tumornekrózisfaktor-receptor
SUMO-1	small ubiquitin-like modifier 1
T	timin
TACE	TNF- α -konvertáló enzim
TGF	transforming growth factor
Th	helper T-sejt
TMA	tissue microarray
tmTNF	transzmembrán TNF
TNFRSR11A	NF- κ B receptor aktivátor génje
TNF	tumornekrózis-faktor
TNFR	tumornekrózisfaktor-receptor
Treg	szabályozó/regulátoros T-sejt
UV	ultraibolya
VAS	visual analogue scale/vizuális analógskála
ZAP-70	zétalánc-asszociált proteinkináz 70

3. BEVEZETÉS

A szisztémás autoimmun reumatológiai kórképek igen heterogén tünetekkel járó betegcsoportot képviselnek. Gyakran kíséri őket ízületi, vese- és tüdőérintettség, és általában jellemző a szteroidok terápiás hatékonysága (kivételt képez ez alól többek között a szisztémás sclerosis [SSc], hiszen ebben a betegségben a szteroid ronthat a beteg állapotán). Overlapszindrómaként is jelentkezhetnek, azaz két vagy több kötőszöveti betegség klinikailag és szerológiailag átfedhet: például polymyositisben (PM) rheumatoid arthritisre (RA-ra) jellemző, erozív polyarthritis jelentkezhet, vagy a magas ciklikus citrullinált peptid ellenes antitest (anti-CCP) szint szisztémás lupus erythematosusban (SLE-ben) SLE-RA overlapszindrómára utalhat. Az autoimmun reumatológiai kórképek kialakulásában a környezeti (fertőzés, dohányzás stb.) és genetikai (humán leukocytaallélek [HLA-allélek]) tényezőknek nagy szerepe lehet. Főként a 30-50. éveiben járó nőket érintik. A betegek számára jelentős betegségterhet, valamint súlyos életminőség- és funkciómérést okoznak, és a szervi károsodás megelőzése, valamint a gyulladás kezelése kihívást jelent a gyakorló orvos számára. Bizonyos területeken (elsősorban RA-ban) a biológikumok megjelenésével egyre kiválóbb gyógyszerek állnak rendelkezésünkre, ennek ellenére vannak terápiarezisztens betegcsoportok. A tartós remisszió aránya szintén alacsony (RA-ban 20-40%, míg a többi szisztémás autoimmun kórképben ennél is alacsonyabb), és általában nem érhető el végleges gyógy mód, bár korai RA-ban beszámoltak gyógyszermentes remisszióról is a BeST-vizsgálatban (5). Mindezen megfontolások alapján érthető, hogy a patogenezis jobb megismerése, a kiváltó okok és hajlamosító tényezők, valamint a patomechanizmus szerint elkülönített alcsoportok feltérképezése kulcsfontosságú. A korai diagnózisnak és a korai (agresszív), célirányos kezelésnek kiemelt jelentősége van.

3.1. Autoimmunitás

3.1.1. Az immunrendszer funkciója

Az immunrendszer fiziológiásan véd az idegen behatásoktól (baktériumok, vírusok, egyéb kórokozók, toxinok), immunválaszt produkál ellenük (sejtes és humorális formában), és ezt a választ hosszú időre megjegyzi (immunológiai memória). A válasz

alapja a saját struktúrák és a kórokozók különbözősége (elsősorban fehérje-, valamint nukleinsav-, lipid- és szénhidrátszinten). Az immunrendszer nem csak az idegen támadásokat érzékeli, hanem aktívan felismerve elfogadja/tolerálja (centrális és perifériás) saját struktúráit (negatív szelekció, anergia, Treg-Breg működés stb.). Tehát lényegében az idegen miliót aktívan elkülöníti a sajáttól, a saját állandóságát aktívan fenntartva. Fontos hangsúlyozni, hogy aktív, energiaigényes folyamatról van szó. Az immunrendszer működésében szabályozási zavarok alakulhatnak ki: i) az autonóm működésűvé váló, megváltozott saját struktúrát továbbra is tolerálja, ami daganatképződést idézhet elő; ii) az idegent és a sajátot nem képes hatékonyan elkülöníteni (keresztreaktivitás, molekuláris mimikri, poszttranszlációs módosítás miatt megváltozott szerkezet, a toleranciáért felelős faktorok eltolódása), ami autoimmunitáshoz vezethet; iii) a fertőzésekkel szemben nem nyújt megfelelően hatékony védelmet.

3.1.2. Autoimmun folyamat kialakulásához vezető zavarok az immunrendszer működésében

Az immunrendszer alapját/hardverjét az egyén génállománya (DNS) adja. Hogy ezen a hardveren az immunológiai szoftverek (idegen diszkriminációja, saját aktív toleranciája) hogyan, milyen hatékonysággal, egyáltalán futnak-e, az a környezeti tényezőktől is függ (epigenetikus hatás). Autoimmunitás esetén a „hajlamosító” hardveren/génállományon (pl. HLA-allélek) futó immunológiai szoftvert (saját és nem saját elkülönítése) megzavarják a környezeti tényezők (dohányzás, fertőzések), ami immunregulációs zavarhoz (autoantitestek és autoreaktív T-sejtek megjelenése) vezethet. Ez az állapot tekinthető az autoimmun betegségek preklinikai stádiumának, ahol kizárólag laboreltérések tapasztalhatók klinikum nélkül. Az immunregulációs zavar mértéke, illetve további genetikai/környezeti tényezők indukáló hatása szabja meg, hogy a folyamat autoimmun kórképben manifesztálódik-e. Korai fázisában a betegség részben reverzibilis klinikai tünetekkel és jelekkel jár, és általában ebben a stádiumban érhető el jó eredmény gyógyszerrel. Majd hosszú távon a kórosan működő immunrendszer effektorai (sejtek, illetve az általuk termelt citokinek, extracelluláris vezikulák stb.) gyakran súlyos szervkárosodással járó, irreverzibilis elváltozásokat idézhetnek elő. A következő alfejezetekben ezen vezérfonal mentén tekintjük át az autoimmun reumatológiai kórképek patomechanizmusát (1. táblázat) (6).

1. táblázat Autoimmun betegségek patomechanizmusa (Nagy Gy. könyvfejezete alapján, In: Szekanecz Z., Reumatológia: egyetemi jegyzet) (6)

Genetikailag fogékony egyéneknél a környezeti tényezők immunregulációs zavart idézhetnek elő (genetikai és környezeti tényezők kölcsönhatása). A zavar további triggererek (vírusfertőzés, stressz stb.) hatására betegségben manifesztálódhat. A tünetekkel kísért kórképre számos effektor-tényező közös működése jellemző. A gyulladás hosszú távon szervkárosodással járó, irreverzibilis elváltozásokat idézhet elő a szervezetben.

Rövidítések: PTPN22 proteintirozin-foszfátáz nem receptor típus 22, TNF tumornekrozis-faktor, UV ultraibolya, ACPA citrullinált protein ellenes antitest, RF rheumatoid faktor, ANA antinukleáris faktor, anti-DNS dezoxiribonukleinsav ellenes antitest, IL interleukin, IFN interferon, MV mikrovezikula, SPA spondylarthritis

Genetikai és környezeti tényezők	Immunregulációs zavar (betegségmegelőző állapot)	Betegség korai stádiuma (klinikai tünetek megjelenése)	A krónikus gyulladás következményei	
Genetika HLA-DRB1 HLA-B27 PTPN22 TNF-promoter	Autoantitestek ACPA RF antiszintetáz antitest ANA, anti-DNS	Effektorsejtek T- és B-lymphocyták monocyták, makrofágok fibroblastok	RA: csont- és porcdestrukció SSc: tüdőfibrosis	
		Citokinek TNF- α , IL-1, IL-6, IL-17, IFN- α , IFN- γ	SPA: ankylosis SLE: veseelégtelenség	
	Környezet dohányzás vírusok baktériumok UV-sugárzás	Autoreaktív T-sejtek 2-es típusú kollagént, citrullinált proteinek reaktív sejtek	Extracelluláris vezikulák exosoma MV apoptotikus test	PM: izomatropia, tüdőfibrosis

3.1.3. Genetikai tényezők szerepe az autoimmun reumatológiai betegségek kialakulásában

Általánosan elfogadottnak tekinthető, hogy a genetikai fogékonyság szükséges (de önmagában nem elégséges) az autoimmun betegségek kialakulásához. Bár számos esetben nem, vagy csak részben ismerjük az egyes kórképekre hajlamosító genetikai tényezőket. A jelen fejezetben áttekintünk néhány, klinikai relevanciával bíró genetikai tényezőt.

Az MHC-géneknek (major histocompatibility complex) – elsősorban az MHC II-es osztály – kitüntetett kockázati szerepe van a szisztémás autoimmun reumatológiai kórképekben (2. táblázat) (7). Ezek a gének kódolják többek között a HLA-alléleket (MHC I-es osztály: HLA-A, B, C; MHC II-es osztály: HLA-DP, DQ, DR), melyek alapvető szerepet töltenek be a saját és idegen fehérjék bemutatásában. Az RA genetikai hátteréért jelentős részben a HLA-DRB1 allélek hordozása felel (8, 9), míg a DR2 (HLA-DRB1*1501) és DR3 (DRB1*0301) allélek polimorfizmusai pl. SLE-re

hajlamosítanak - bár jelentőségük nem olyan kifejezett, mint RA-ban (10). SSc-ben a HLA-A1, HLA-B8 és HLA-DR3 asszociációját igazolták (11), míg Sjögren-szindrómában többek között a HLA-A24 gyakoribb (12). SPA-ban ezzel szemben az MHC I régió érintett, a betegség HLA-B27-tel való szoros összefüggése régóta ismert (13). Érdekes módon a HLA-DR3 asszociáció több autoimmun betegségben (pl. ACPA-negatív RA és PM/DM) kimutatható (2. táblázat) (14, 15). A DR3 locus egy ősi haplotípus része (*ancestral haplotype* [AH] 8.1), amely magába foglalja az MHC III régiót is. Az MHC III locus kódolja pl. a TNF- α -t, tehát a DR3-asszociáció feltételezhetően a gyulladás mértékét befolyásolhatja (16).

Genetikai tényező és következményes immunregulációs zavar kapcsolatára példa RA-ban a HLA-DRB1 allélek hordozása és az ACPA-pozitivitás közötti összefüggés, míg PM/DM-ben bizonyos HLA-allélek myositisspecifikus autoantitestekkel (MSA-val) való társulása (17).

Az MHC-n kívül a proteintirozin-foszfátáz (PTNP22) polimorfizmusai is számos autoimmun betegségben (RA, SLE, SSc, arthritis psoriatica, Wegener-granulomatosis, 1-es típusú diabetes mellitus, Addison-kór és Graves–Basedow-kór) megfigyelhetők (18). A PTPN22 befolyásolja a T-sejtek aktivációs küszöbét, ezáltal általánosságban autoimmunitásra hajlamosít, és a fennálló más genetikai és környezeti tényezőktől függ, hogy jelenlétében mely kórkép alakul ki. RA-ban például a HLA-DRB1 allélek hordozása esetén (gén-gén kölcsönhatás) számít kockázati tényezőnek (19).

A TNF alapvető szerepet játszik a szisztémás autoimmun kórképek patomechanizmusában: TNF-promoter-polimorfizmust leírtak RA-ban, SPA-ban, SLE-ben, SSc-ben és PM/DM-ben (2. táblázat) (6).

A T-sejtek aktiválódásához elengedhetetlen a kostimuláció. Ezzel szemben a CTLA-4 molekula gátló szignált közvetít a T-sejt számára, és megakadályozza annak effektorsejtté differenciálódását. A CTLA-4 polimorfizmusait számos autoimmun betegséggel összefüggésbe hozták, többek között autoimmun thyreoditissel, SLE-vel és RA-val (2. táblázat) (7, 20).

Az immunkomplex mediálta autoimmun betegségekben (SLE és RA) számos Fc γ R-polimorfizmust (IgG konstansrégiót kötő receptor) leírtak (6, 7). A szervezet ezen receptorok segítségével eliminálja a különböző szervekben (pl. vese, ízület) lerakódott immunkomplexeket. Az Fc γ R-ok eltérései a gyengébb kötődés miatt az

immunkomplexek felszaporodásához vezethetnek, és ezáltal pl. lupus nephritisre hajlamosíthatnak (2. táblázat) (6).

A komplementrendszer szintén fontos szerepet tölt be az immunkomplexek eliminálásában, eltéréseit számos autoimmun kórképben (RA, SLE) igazolták (7). A komplementrendszer aktivációjának különösen SLE-ben van jelentősége az autoimmun kórképek közül, a ritkán előforduló teljes C1q-hiány például 90%-os valószínűséggel vezet a betegség megjelenéséhez, de a gyakoribb komplementhiányok (C2 és C4) szintén fokozzák az SLE kialakulásának kockázatát (2. táblázat) (6).

2. táblázat Genetikai tényezők autoimmun reumatológiai betegségekben

Genetikai eltérések	Autoimmun betegség
(Auto)antigén prezentálása (MHC)	
HLA-DRB1	ACPA-pozitív RA
HLA-DR2, HLA-DR3	SLE
HLA-A1, HLA-B8 és HLA-DR3	SSc
HLA-A24	Sjögren-szindróma
HLA-B27	SPA
Autoreaktív sejtek kialakulása	
PTPN22	RA, SSc, arthritis psoriatica
CTLA-4	RA, SLE
Gyulladás mértéke	
TNF-promoter	RA, SPA, SLE, SSc és PM/DM
HLA-DR3 ősi haplotípus asszociáció	ACPA-negatív RA, PM/DM
Immunkomplexek eliminálása	
Fc γ R	RA, lupus nephritis
komplementrendszer	SLE, RA

3.1.4. Környezeti tényezők szerepe az autoimmun kórképek kialakulásában

A környezeti tényezők közül a fertőzések emelendők ki. RA-ban a parvo vírus B19, a rubeola és a Porphyromonas gingivalis szerepét feltételezik, míg az Epstein-Barr vírus (EBV) mind RA-ban, mind SLE-ben kockázati tényező. PM/DM-ben többek között a Coxsackie, echo és influenza vírus szerepe merült fel (17). Fertőzéseken kívül az UV-sugárzás is betegséget indukálhat SLE-ben és PM/DM-ben. Az RA és a dohányzás

összefüggését régóta ismerjük. Számos tanulmány igazolta, hogy a dohányzás a shared epitópot (SE) kódoló HLA-DRB1 allélek hordozása esetén fokozza az ACPA-positív RA kialakulásának kockázatát, tehát egy genetikai és egy környezeti tényező kölcsönhatása immunregulációs zavarhoz, illetve betegséghez vezethet. SLE-ben szintén igazolták a dohányzás triggerelő hatását, valamint összefüggését a betegség súlyosságával és a dupla szálú DNS (dsDNS) titerrel (21).

Meg kell említenünk a környezeti tényezőkről, hogy a civilizált 21. századunkban az ipari fejlődés következtében immunrendszerünk mind több és több, az emberi faj számára évezredekig ismeretlen, mesterségesen előállított/módosított anyaggal (élelmiszeripar, vegyipar, építőipar, gyógyszeripar stb.) találkozik nap mint nap. Ráadásul a „civilizációs tisztaság”, az étrend megváltozása, a védőoltások, a széles körű antibiotikumhasználat, a globalizáció következtében a vírusok/baktériumok intenzív transzferje és nagyfokú genetikai variabilitása újfajta módon szabályozhatja az immunrendszert. Valamint a korábbi évszázadokhoz képest felgyorsult, stresszes életmód a neuroendokrin rendszer modulációján keresztül szintén befolyásolja az immunrendszer működését. Mindezek után nem meglepő, hogy a komplex hálózatnak tekinthető immunrendszer nincs felkészülve ezekre az evolúciós szempontból új hatásokra, ami többek között allergiás betegségekben és autoimmunitásban manifesztálódhat.

3.1.5. A tüneteket megelőző immunregulációs zavar –preklinikai stádium

A genetikai és környezeti tényezők kölcsönhatásaként létrejövő immunregulációs zavar autoantitestek és autoreaktív T-sejtek megjelenése, illetve megváltozott citokin/immunsejtegyensúly (Th1/Th2/Th17/Treg) formájában valósulhat meg. Ez az állapot tünetmentes, preklinikai szakasznak tekinthető, és nem feltétlenül vezet manifeszt betegséghez. Az immunregulációs zavarra jellemző laboratóriumi eltérések (biomarkerek) diagnosztikus és prognosztikus jelentőségűek lehetnek. SLE-ben például a diagnózis felállítása előtt is jelen lehetnek az anti-DNS antitestek. RA-ban az immunglobulinok Fc része ellen képződő RF és a citrullinált fehérjék ellen képződő autoantitestek, az ACPA-k évekkal megelőzhetik a betegség kialakulását, és rossz prognosztikai jelnek tekintendők (22). Autoreaktív T-sejtek (II-es típusú kollagénre vagy citrullinált proteinekre specifikus T-sejt klónok) szintén kimutathatók az RA

kialakulása előtt (23). Hasonló módon PM-ben az anti-Jo-1 autoantitestek általában már a myositis diagnózisakor jelen vannak (24).

Immunregulációs zavar esetén - ahogy említettük - hiba csúszik a „saját” és az „idegen” elkülönítésébe és az immunválasz szabályozásába (ugyanakkor a kórokozók elleni védekezés rendben működhet). A hiba egyik oka lehet a saját struktúra megváltozása egyes fehérjék poszttranszlációs módosítása miatt. Ennek példája RA-ban az immunológiai tolerancia elvesztése bizonyos citrullinált fehérjékkel szemben (citrullinált alfa-enoláz, vimentin, fibrin). Feltételezik, hogy a dohányzás fokozza a citrullinációt a peptidil-arginin-deimináz (PAD) enzim expressziójának befolyásolásán keresztül (25), valamint modulálja az immunrendszert (26), ami együttesen hozzájárulhat az ACPA-képzéshez.

A nem saját-saját diszkriminációját a keresztreaktivitás is megzavarhatja: RA-ban a humán alfa-enoláz immundomináns része (citrullinált enoláz peptid-1 [CEP-1]) 82%-ban azonos a szájnyálkahártya-patogén *Porphyromonas* baktérium α -enolázának megfelelő szakaszával, és a CEP-1 ellenes antitestek RA-ban mind a humán, mind a bakteriális enolázzal reagálnak (27). A citrullinált humán α -enoláz kimutatható az RA-s synoviumban is (28). A virális keresztreaktivásra példa az EBV RA-ban (29): a vírusantigének hasonlóságot mutatnak a synovialis fehérjékkel (az EBNA-1 glicin/alanin ismétlődései) és az EBV gp110 glükoprotein SE szekvenciát (a SE jelentőségét lásd később) tartalmaz. Az EBNA-1-ről kimutatták, hogy citrullinálódhat, és a vírus antitesttermelést indukálhat a citrullinált fehérjék ellen. Az anti-EBV titer magasabb az RA-s betegekben (29).

3.1.6. A betegség kezdete – a tünetek megjelenése

Kevésbé tisztázott, hogy az autoimmun betegségeket pontosan milyen tényezők indítják be. Ahogy említettük, a hajlamosító tényezők (dohányzás, vírusfertőzés) immunregulációs zavart okozhatnak, de sok esetben elő is hívhatják a klinikai tünetekkel kísért kórképet. Ugyanakkor egy nagyobb pszichés megterhelés, illetve hormonális változások (terhesség, postpartum időszak) szintén betegséget indukálhatnak a hajlamosító faktorok jelenlétében.

3.1.7. Effektorok a kialakult autoimmun betegségben

Az autoimmun kórképet akkor diagnosztizáljuk, ha az immunregulációs zavarhoz klinikum is társul. Fontos hangsúlyozni, hogy az anti-DNS, ACPA vagy RF pozitív egyének egy részénél nem alakul ki betegség. Gyakran vírus- vagy bakteriális fertőzés indítja be a tünetekkel és laboreltérésekkel kísért betegséget. Az autoimmun gyulladást az effektormechanizmusok (sejtek és az általuk termelt mediátorok) szabályozzák, és az adott kórképre jellemző klinikumot is meghatározzák. Ebben a fejezetben röviden összefoglaljuk az effektortényezőket kitérve főbb funkcióikra is.

Sejtek

Az autoimmun betegségekben az autoreaktív T- és B-sejteknek kitüntetett szerepe van. A kórosan aktiválódott T-sejtek proinflammatorikus mediátoraikkal (citokinek, extracelluláris vezikulák [EV-k] stb.) makrofágokat vonzanak a gyulladás helyére. Fokozódik az angiogenesis és a sejtadhéziós molekulák expressziója, aminek hatására még több leukocytá juthat a célszervbe (30). Számos sejttípus aktiválódik (fibroblastok, osteoclastok, endothelsejtek, hízósejtek), amelyek összességében szervkárosodást (pl. porc- és csontmátrix bontása, fibrosis) idézhetnek elő a kibocsátott enzimek (mátrixmetalloproteáz, kollagenáz), citokinek (TNF- α , IL-1), prosztaglandinok, reaktívoxigén-gyökök révén (30). A T-sejtek közül kiemelendők a Th1- és Th17-sejtek, melyek a TNF- α és az IL-17 szekretálásával karmesterként hangolják össze az autoimmun gyulladással folyamatot. A T-sejt-aktiváció számos részfolyamatának zavarát leírták szisztémás autoimmun kórképekben: pl. a T-sejt jelátvitelben szerepet játszó zétalánc-asszociált-proteinkináz 70 (ZAP-70) spontán pontmutációja egerekben RA-hoz hasonló arthritishez vezet. Ennek feltételezett mechanizmusa az egyébként negatív szelekcióval elpusztuló autoreaktív T-sejtek fennmaradása (31).

Az autoreaktív B-sejtek szintén hozzájárulnak a gyulladáshoz, melyet kibocsátott mediátoraik (citokinek és EV-k) mellett autoantitesttermelésük révén is szabályoznak. A képződő és lerakódó immunkomplexek aktiválják a komplementrendszer, illetve az Fc-receptorokon keresztül a gyulladással sejteket (pl. frusztrált fagocytosis), ami szövetkárosodást okozhat. SLE-ben a veseglomerulusokban lerakódott immunkomplexek interstitialis nephritist okozhatnak. RA-ban a citrullinált fehérjék ellen képződő autoantitestek, az ACPA-k szintén nagy mennyiségben kimutathatók a gyulladt, megvastagodott synoviumban. A legújabb irodalmi adatok alapján az ACPA-k

az osteoclastok felszínéhez kötődve fokozzák az osteoclastogenezist, és ezáltal közvetlenül elősegítik a csonterosiók kialakulását (32). A B-sejtek patogenetikai szerepét igazolják a következő megfigyelések is: A B-sejt túlélésben szerepet játszó Blys/BAFF (B-sejtet aktiváló faktor/B-sejtet stimuláló) transzgenikus állatokban lupus-szerű betegség alakul ki (33). SLE-s és RA-s betegek szérumában az egészséges kontrollokénál magasabb BLys-szint mérhető (34, 35). A Blys-gátló belimumab ma már törzskönyvezett gyógyszer SLE-ben. A B-sejteken (kivéve plazmasejteken) található CD20 molekula blokkolása (anti-CD20 monoklonális antitest, rituximab) szintén hatékony terápiás lehetőség RA-ban.

A T- és B-sejtek mellett számos egyéb sejt (dendritikus sejtek, makrofágok, fibroblastok stb.) is részt vesz az autoimmun gyulladásos folyamatok fenntartásában. Továbbá a gátló mechanizmusok zavara is létrejöhet: fiziológiásan a szabályozó T- és B-sejtek (Treg és Breg) antiinflammatorikus citokinjeikkel (IL-10, IL-35, TGF- β) és egyéb mediátoraikkal számos ponton a gyulladás ellen hatnak, míg RA-ban, SLE-ben és SSc-ben egyaránt leírták a Treg-ek funkciózavarát (6, 36).

3.1.7.1. Citokinek

A citokinek autokrin, parakrin és endokrin módon szabályozzák a gyulladást, és hangolják össze egyszerre sok sejt működését. Ismert, hogy autoimmun betegségekben a citokinegyensúly a proinflammatorikus (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-17, IL-18, IL-22, IL-33) irányba tolódik el. A citokinek termelésében a T- (Th1- és Th17-sejtek) és B-sejteknek, makrofágoknak és dendritikus sejteknek van kitüntetett szerepe. SLE-ben az IFN- α központi szerepe jól ismert, míg RA-ban a TNF, az IL-1, IL-6 és IL-17 jelentősége emelendő ki (37). A proinflammatorikus citokinek a synovitis legtöbb alapfolyamatát (sejtdhézió, kemokintermelés, angiogenesis, mátrixmetalloproteáz-termelés) elősegítik. Például az RA-t kísérő általános tünetekért (láz, fogyás, anaemia, depresszió) főként a TNF- α felelős, míg a lokális (ízületi) gyulladást (synovialis hyperplasia, osteoclastogenezis, csont- és porcdestrukció) a TNF- α , IL-1, IL-6 és IL-17 együttesen szabályozza. Nem meglepő, hogy ezek a citokinek egyben terápiás célpontok is. A TNF-blokkolók hatékonyak RA-ban, a gyulladás csökkentése mellett a porc- és csontkárosodást is lassítják. Az IL-1 terápiás gátlása nem váltotta be a hozzáfűzött

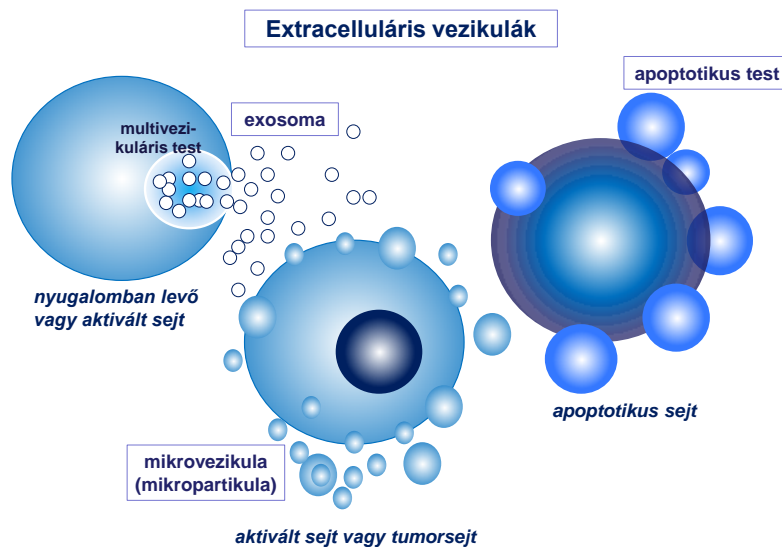
reményeket, viszont az IL-6 antagonista tocilizumab jól használható biológikum RA-ban.

PM/DM-ben például fokozott IL-1, TNF- α és IFN- γ mérhető szöveti szinten (38, 39). A proinflammatorikus citokinek fokozzák a kostimulációs molekulák expresszióját a myositises izomrostokon, ami elősegítheti az izomeredetű fehérjék elleni autoreaktív T-sejtek aktiválódását.

A szervezet homeosztázisában a proinflammatorikus citokinek mellett alapvetően fontosak az antiinflammatorikus citokinek (IL-4, IL-10, IL-13, IL-35, TGF- β) is, melyek aránya felborul az autoimmun betegségekből, bár az arány eltolódása kórképenként eltérő. RA-ban például az IL-1 és IL-6 szintje fokozott, míg az IL-10 és IL-35 csökkent a szérumban (6).

3.1.7.2. Extracelluláris vezikulák

Az effektorfunkciókkal bíró EV-k (exosomák, MV-k, apoptotikus testek) patogenetikai szerepére az utóbbi években derült fény. Először Wolf és mtsai. írták le őket 1967-ben, de nem tulajdonítottak nekik nagy jelentőséget (40). Az EV-k közös jellemzőkkel bíró, membránnal határolt struktúrák, melyek a sejtek közötti kommunikációban és adaptációban vesznek részt (1. ábra).



1. ábra EV-k képződése (György és mtsai. alapján módosítva) (41) Az *exosomák* (50-100nm) preformált vezikulák, melyek multivezikuláris testek excitózisa során szabadulnak ki a sejtől. Az *MV-k* (100-1000 nm) bimbózással fűződnek le a sejtekről aktiváció vagy korai apoptózis során, míg az *apoptotikus testek* (1-5 μ m) apoptózis során képződnek.

Három fő csoportjuk ismert: Az exosomák (50-100nm) preformált vezikulák, melyek multivezikuláris testek exocitózisa során szabadulnak ki a sejtéből (41). Az MV-k (100-1000 nm) (korábbi nomenklatúra szerint mikropartikulák) bimbózással fűződnek le a sejtekről aktiváció vagy korai apoptózis során, míg az apoptotikus testek (1-5 μm) apoptózis során képződnek (1. ábra) (41). Jelen tudásunk szerint bármely sejtfeleség képes az EV-k kibocsátására: lymphocyták, monocyták, endothelsejtek, thrombocyták, fibroblastok, tumorsejtek, trophoblastok, őssejtek stb. (42). A membránfelszínen, illetve a citoplazmában az anyasejtre jellemző molekuláris mintázatot mutatnak (sejt-receptorok, citoplazmaproteinek, nukleinsavak [mRNS, miRNS és DNS] és citokinek) (42). Igen hatékony modulátorok a következő tulajdonságaiknak köszönhetően: i) nagy koncentrációban szabadulnak fel az anyasejtéből (pl. TNF- α , IL-1, C5a hatására); ii) kompakt felületet biztosítanak az effektormolekulák számára (Fas ligand, alvadási faktorok); iii) számos anyag transzportmédiumaként szolgálnak (arachidonsav); és iv) komplex molekuláris mintázatok révén fejtik ki hatásukat (43).

Az EV-k az immunrendszer működésében szerteágazó funkciót (serkentő és gátló egyaránt) látnak el: a dendritikus sejtekről és B-sejtekről lefűződve részt vesznek az antigénprezentálásban (MHC II-antigén komplex prezentálása a CD4⁺ T-sejteknek), a citotoxikus CD8⁺ T-sejteknek MHC I-antigén komplexet mutatnak be, aktiválják a természetes ölü sejteket, makrofágokat és B-sejteket, elősegítik az antitesttermelést, részt vesznek az antigéntranszferben (sejtantigéneket magukkal szállítva a dendritikus sejtekhez), de gátló funkciókat is ellátnak ugyanezen sejt típusokon, illetve serkentik a szabályozó T-sejtek működését (44).

Fokozzák a leukocyták adhézióját, gördülését és citokintermelését (IL-6 és MCP-1) (45). Számos mediátor fő forrásai (pl. IL-1 β) (46). Aktiválják a komplementrendszert (47), és az arachidonsavon keresztül serkentik a COX-2-t (48). Emellett fokozzák az antiinflammatorikus hatású TGF- β 1 expresszióját is (49). A sejtaktiváció mellett a Fas ligandon keresztül szerepet játszanak a T- és B-sejtek apoptózisában (50). Tehát számos folyamatban részt vesznek, és a lokális miliótól és az anyasejt típusától függően különböző, gyakran antagonisztikus hatást fejtenek ki a szervezetben.

Szerepük a szív-ér rendszeri, hematológiai, daganatos, cerebrovascularis és autoimmun betegségekben egyaránt igazolódott (42). Számos kórképpel összefüggésben felmerült biomarkerként (diagnosztikus és prognosztikus tényező) való bevezetésük (51). Több

vizsgálat kóros szérumban MV szintekről számolt be az autoimmun reumatológiai betegségekben (SLE, RA és SSc) (3. táblázat) (41, 52).

3. táblázat MV-k szerepe autoimmun reumatológiai betegségekben

Számos autoimmun reumatológiai betegségben (SLE, RA és SSc) kóros szérumban MV szinteket találtak.

Rövidítések: eMV endothel eredetű MV, pMV vérlemezke eredetű MV, ↑ emelkedett, ↓ csökkent

Betegség	Jellemző MV eltérések
SLE	Plazma totál MV, pMV és eMV ↑, de a betegségaktivitással nincs összefüggés (53). pMV korrelációja a thrombinképződéssel (54).
RA	Plazma totál MV, pMV ↑, de nem korrelálnak a betegségaktivitással (53). AnnexinV pozitív MV és pMV ↑ az RA-s synovialis folyadékban (55, 56). Citruillinált fehérjék a synovialis eredetű exosomákban (57). pMV összefüggése a betegségaktivitással (55). pMV az IL-1 révén fokozza a synovialis fibroblastok citokintermelését (58). Az RA-s synovialis folyadékból izolált MV-k fokozzák a fibroblastszerű synoviocyták BAFF kibocsátását (59).
SSc	Plazma totál MV, pMV, eMV, T-sejt és monocyta eredetű MV ↑, de nem korrelálnak a betegségaktivitással (53, 60). A módosított Rodnan-féle bőrvastagsági pontszám negatívan korrelál a totál MV számmal (61). A bőrfekélyes betegekben szignifikánsan ↓ a totál MV szám (61).

3.1.7.3. Krónikus elváltozások

Az effektormechanizmusok (sejtek és az általuk termelt mediátorok) hosszú távon a szervek irreverzibilis károsodásához vezethetnek, így például RA-ban csont- és porcdestrukcióhoz, PM/DM-ben és SSc-ben tüdőfibrosishoz, míg SLE-ben veseelégtelenséghez. Az immunregulációs zavar jellege (pl. egy adott autoantitest jelenléte) befolyásolhatja az effektorok által okozott károsodás mértékét. Így például az ACPA-pozitív RA lefolyása várhatóan súlyosabb az ACPA-negatív RA-val összehasonlítva (62). PM/DM-ben az anti-SRP (anti-signal recognition particle) autoantitestek rapidan progrediáló izomelhalással társulhatnak (63).

3.1.8. Az autoimmun betegségek patomechanizmusának összefoglalása

Összefoglalva tehát a környezeti tényezők genetikai hajlam esetén immunregulációs zavart idézhetnek elő. Ez az állapot laboreltérésekkel (pl. autoantitestek megjelenése a

vérben) jellemezhető, és az autoimmun betegségek preklinikai stádiumának tekinthető. Az immunregulációs zavar további faktorok (vírusfertőzés pl.), illetve a fennálló kockázati tényezők hatására specifikus tünetekkel kísért betegségben is megnyilvánulhat. Az autoimmun gyulladást számos effektortényező (gyulladásos sejtek és az általuk termelt mediátorok) tartja fenn, és azok mintázata felel a karakterisztikus klinikai képért. Az effektormechanizmusok hosszú távon akár irreverzibilis szervi elváltozásokat is előidézhetnek. Sajnos jelenleg terápiásan nem tudunk beleszólni a kezdeti, preklinikai stádiumba, a legtöbb gyógyszer az effektorokat célozza (T- és B-sejtek, valamint citokinek gátlása), és így próbálja lassítani, kivédeni a krónikus szervi károsodást.

3.2. Rheumatoid arthritis

3.2.1. Általános jellemzők

Az RA főként a kéz és láb kisízületeit érintő, általában szimmetrikus polyarthritissel járó betegség (2. ábra), melyhez extraartikuláris tünetek társulhatnak (veseérintettség, amyloidosis, episcleritis, reumathoid csomó, tüdőfibrosis stb.).



2. ábra RA ízületi manifesztációja
(forrás: cedars-sinai.edu)

Az ízületi gyulladás erozív jellegű, ami hosszú távon az ízületek deformitásához, funkcióvesztéséhez vezet, és jelentősen rontja az életminőséget, illetve a munkaképességet.

Ez a leggyakoribb autoimmun reumatológiai kórkép, a felnőtt lakosság 0,5-0,8%-át érinti. Jellemző rá a női túlsúly (férfi:nő=1:2-3). Ikervizsgálatok alapján a betegség konkordanciája 15-50%, tehát kialakulásában mind a genetikai (HLA-allélek), mind a környezeti tényezők (dohányzás, fertőzés) szerepet játszanak. Patogenezisét tekintve a Th1-, valamint a Th17-sejtek szerepét feltételezik, illetve a proinflammatorikus citokinek közül a TNF- α , IL-1, IL-6, IL-17 emelendő ki, melyek elősegítik a leukocyták

synoviumba vándorlását, a synovium megvastagodását (pannus), és a csont és porc lebontását.

RA-ban fontos diagnosztikus (4. táblázat) és prognosztikus tényezők a citrullinált fehérjék ellen képződő autoantitestek, az ACPA-k (22). A betegség diagnózisát a szerológiai eltérések, az ízületi érintettség és a gyulladáshoz kapcsolódó paraméterek alapján állítjuk fel (4. táblázat).

4. táblázat RA klasszifikációs kritériumai az ACR és az EULAR 2010-es ajánlása alapján (64)

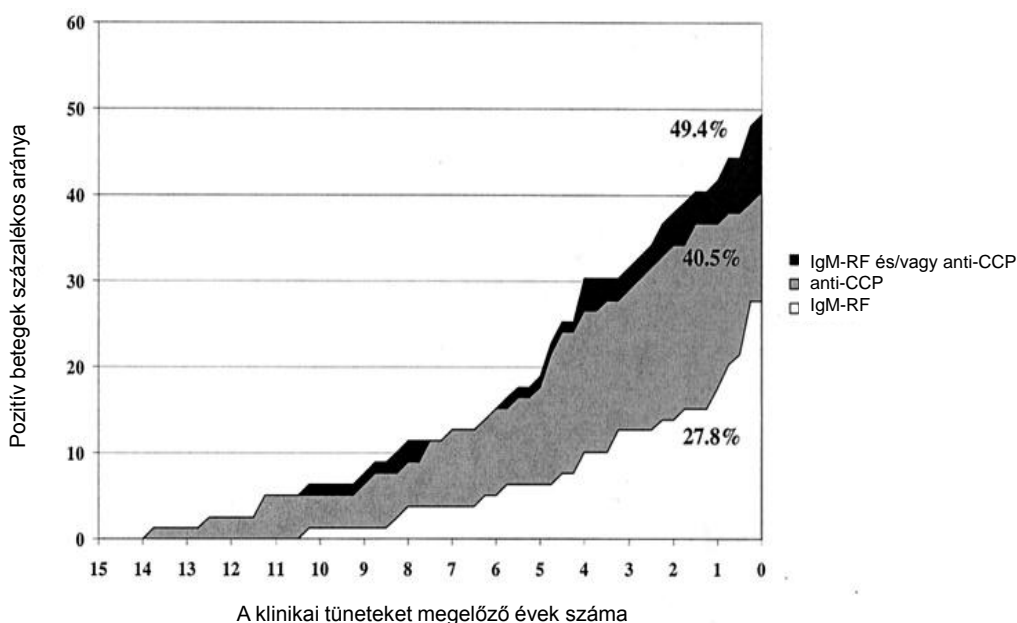
Célcsoportok:	
1. akinek legalább 1 ízületben klinikailag definitív synovitis van (duzzanat)	
2. a synovitis nem magyarázható jobban semmilyen más kórállappal	
A) Ízületi érintettség	pont
1 nagyízület	0
2-10 nagyízület	1
1-3 kisízület (nagyízületi érintettséggel vagy anélkül)	2
4-10 kisízület (nagyízületi érintettséggel vagy anélkül)	3
>10 ízület (legalább 1 kisízület)	5
B) Szerológia (legalább 1 teszt kivitelezése szükséges)	
Negatív RF és negatív ACPA	0
Alacsony pozitív RF vagy ACPA	2
Magas pozitív ACPA	3
C) Akutfázis-reakció	
Normális CRP és süllyedés	0
Kóros CRP vagy süllyedés	1
D) A tünetek fennállásának tartama	
<6 hét	0
≥6 hét	1
Ha a pontszám összesen ≥6/10 A-D részben, RA klasszifikálható	

Terápiájában a betegségmódosító gyógyszerek (DMARD, disease modifying anti-rheumatic drugs) az első választás, a proinflammatorikus citokineket célzó biológikumok a súlyosabb esetekben alkalmazandók - alapvetően pénzügyi okokból.

3.2.2. Autoantitestek RA-ban

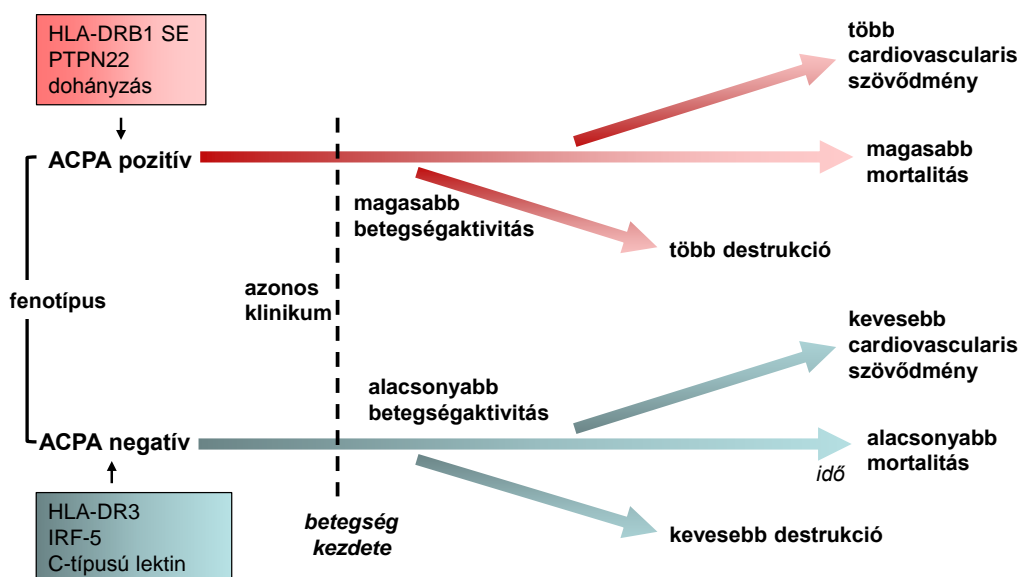
3.2.2.1. ACPA-k

Először 1964-ben figyelték meg, hogy az RA-s betegek széruma a differenciálódó szájnyálkahártyasejtek keratohyalingranulumaival reagál, és ezeket az antitesteket antiperinukleáris faktornak nevezték el (APF) (65). Az APF a szájnyálkahártyasejtek nehéz elérhetősége miatt nem terjedt el a napi gyakorlatban. Young és mtsai. megfigyelték, hogy az RA-s szérumok a patkánynyelöcsőhámmal is reagálnak, és a feltételezett antigén alapján keratin ellenes antitestekként (AKA) hivatkoztak rájuk (66). Később igazolódott, hogy ezen ellenanyagok célpontja valójában a keratinnal asszociált filaggrin (67), és az AKA-k megegyeznek az APF-fel, ezért az új nevezéktanuk filaggrin ellenes antitest (AFA) lett. A synoviumban azonban nem található filaggrin, ami alapján úgy tűnt, nem ez a valódi antigén RA-ban. Masson-Bessiere és mtsai. igazolták, hogy az AFA antitestek igazi célpontja a citrullinált fibrin(ogén) (68, 69). Az AKA/AFA/APF antitestek a citrullinált vimentin ellenes antitestekhez hasonlóan az ACPA-k családjába tartoznak (70). Ezek az autoantitestek a fiziológiásan is jelenlevő, posztranszlációsán módosult, azaz citrullinálódott/deiminálódott fehérjékre (pl. fibrinogén, vimentin, alfa-enoláz, II-es típusú kollagén) reaktívak (26). Kimutatásuk ciklikus citrullinált peptid ellenes antitestekkel (anti-CCP) és módosított citrullinált vimentinnel (anti-MCV) történik a mindennapi klinikai gyakorlatban (71).



3. ábra Az anti-CCP antitestek évekkal megelőzhetik a betegséget (Nielen és mtsai. alapján módosítva) (22)

Az ACPA-k magas szenzitivitásuk (60-80%) és specificitásuk (>90%) miatt fontosak az RA diagnosztikájában. Gyakran évekkal megelőzik a betegséget (3. ábra), és rossz prognosztikai jelnek tekintendők. Úgy tűnik, hogy az ACPA-pozitív RA klinikumát tekintve súlyosabb lefolyású (4. ábra). Magasabb betegségaktivitás, több ízületi destrukció, rosszabb ösztimortalitás és több cardiovascularis szövődmény jellemző rá az ACPA-negatív RA-val összehasonlítva (4. ábra) (62).



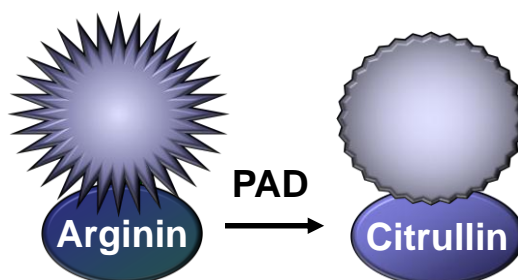
4. ábra ACPA-pozitív és negatív RA lefolyásának összehasonlítása (Klareskog és mtsai. alapján módosítva) (62)

3.2.2.2. Az ACPA-k célpontjai: citrullinált fehérjék

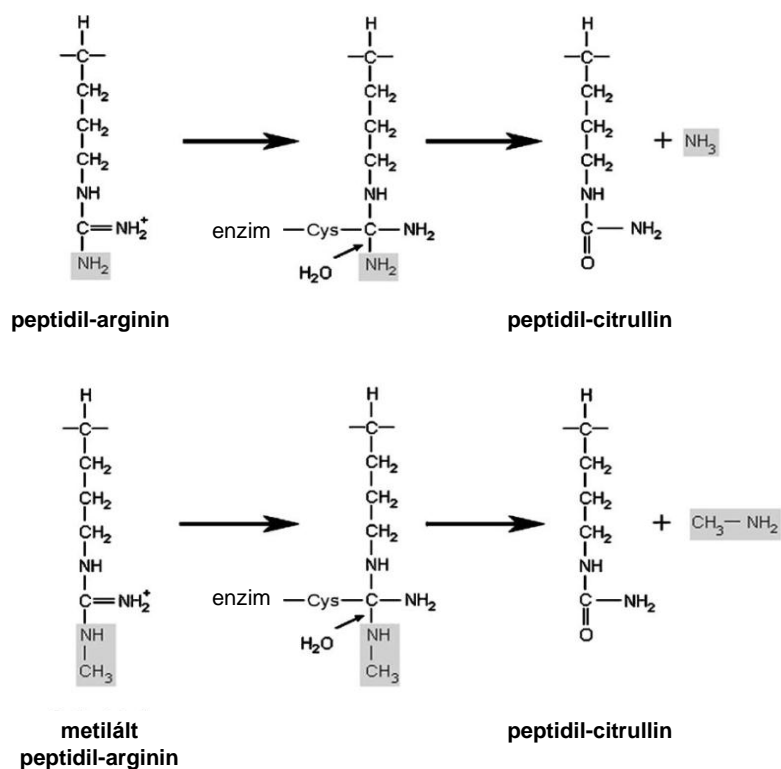
Ahogy említettük, az ACPA-k a citrullinált fehérjék ellen képződő autoantitestek. A citrullináció a poszttranszlációs módosítások egyike. Az átalakításért felelős enzim a PAD, mely genetikailag konzervált, kalciumfüggő enzim. A fehérjék argininjét citrullinná alakítva (deiminálva) számos konformációs változást (csökken a nettó pozitív töltés) idéz elő a protein harmadlagos-negyedleges szerkezetében (5. ábra, 6. ábra), ami megváltoztathatja a fehérje funkcióját és antigenitását.

Az enzimnek öt izoformája ismert eltérő szöveti kifejeződéssel. A PAD1 az epidermisben expresszálódik, míg a PAD2 mind az izomszövetben, mind a központi idegrendszerben (72). A PAD3 a hajhagymában jelenik meg, míg a PAD4 főként a hemopoetikus sejtvonalakban (72). A PAD4 a sejtmagba kerülhet, és szerepet játszhat a génszabályozásban (72). Az RA-s synoviumban fokozott PAD2 és PAD4 expressziót

mutattak ki (73). A PAD6 korai embriókban és az ovariumban fejeződik ki, és kevésbé ismert funkciója (72).



5. ábra Citrullináció hatása a fehérje szerkezetére



6. ábra PAD enzim által katalizált citrullináció/deimináció (György B. és mtsai. alapján módosítva) (74)

Számos fiziológias folyamatban megfigyelhető a citrullináció: a bőr elszarusodási folyamataiban (filaggrin, cytokeratin, trichohyalin), a génszabályozásban (a p53 és az ösztrogén által szabályozott gének), az immunrendszer működésében (neutrophilek, makrofágok baktériumölő funkciói, citokinek működésének módosítása) és az idegrendszer plaszticitásában (myelinhüvely) (75). Patológias szerepére elsőként az RA kapcsán derült fény, majd igazolták jelentőségét a tumorképződésben, sclerosis multiplexben és Alzheimer-kórban egyaránt (75).

RA-ban az ACPA-képzés mechanizmusa nem teljesen ismert, de az SE-allélekkel való asszociációja alapján feltételezik, hogy a citrullináció módosult saját epitópokat generálhat, melyeket az antigénprezentáló sejtek idegenként ismernek fel megfelelő genetikai hajlam esetén (MHCII HLA-DRB1 hajlamosító allélek hordozása esetén), és felkínálnak az autoreaktív T-sejteknek (76). Bár a citrullináció nem specifikus RA-ra, egyéb gyulladásozó folyamatban (osteoarthritis) is megfigyelhető.

Számos irodalmi adat felveti a citrullinált fibrinogén (cFb) arthritist indukáló szerepét: az RA-s betegek kétharmadában ellenanyagok képződnek ellene (77), és a betegek felében citrullinált fibrinogén tartalmú immunkomplexek találhatóak a szérumban és a synoviumban (78). Foulquier és mtsai. kimutatták a citrullinációért felelős PAD2 és PAD4 enzimet is a citrullinált fibrin törmelékben, illetve annak szomszédságában (73). Hill és mtsai. humán HLA-DRB1*0401-re transzgenikus egereket immunizált cFb-vel, ill. nem módosított Fb-vel (79). Kizárólag azokban a transzgenikus egerekben alakult ki arthritis, amelyeket cFb-vel immunizáltak, de a vad típusúak egyikében sem, az immunizáló fibrinogén citrullináltságától függetlenül. Ha az immunizálást egér cFb-vel végezték, nem alakult ki arthritis. Érdekes módon vad típusú egerek cFb-vel immunizálása adjuváns jelenlétében antitestválaszt indukált, de arthritist nem (80). Ehhez hasonlóan a citrullinált patkány-szérumalbumin injektálása toleranciavesztést idéz elő, de arthritist nem képes okozni, bár a II-es típusú kollagén artritogén hatását fokozza (80).

Ezek az eredmények azt sugallják, hogy mind a humán MHC II genotípusnak (SE allél), mind a humán antigén (pl. fibrinogén) citrullinációjának kulcsfontosságú szerepe lehet az autoimmun arthritis előidőzésében.

3.2.2.3. RF

Az RF az RA klasszifikációs kritériumainak része, szenzitivitása (60-70%) és specificitása (50-90%) elmarad az ACPA-kétől. Az IgG típusú immunglobulinok Fc része ellen képződő autoantitest, amely általában IgM típusú, de IgG, IgE és IgA típus is jelen lehet a betegek szérumában. Fontos prognosztikai tényező – a magas titerhez súlyosabb csont- és porcdestrukció társulhat. RF pozitivitás megfigyelhető más autoimmun kórképekben is (Sjögren-szindróma, SLE stb.), illetve az időskor, különböző fertőzések (EBV) és a dohányzás is összefüggésbe hozható az RF-termeléssel.

3.2.3. Kockázati tényezők

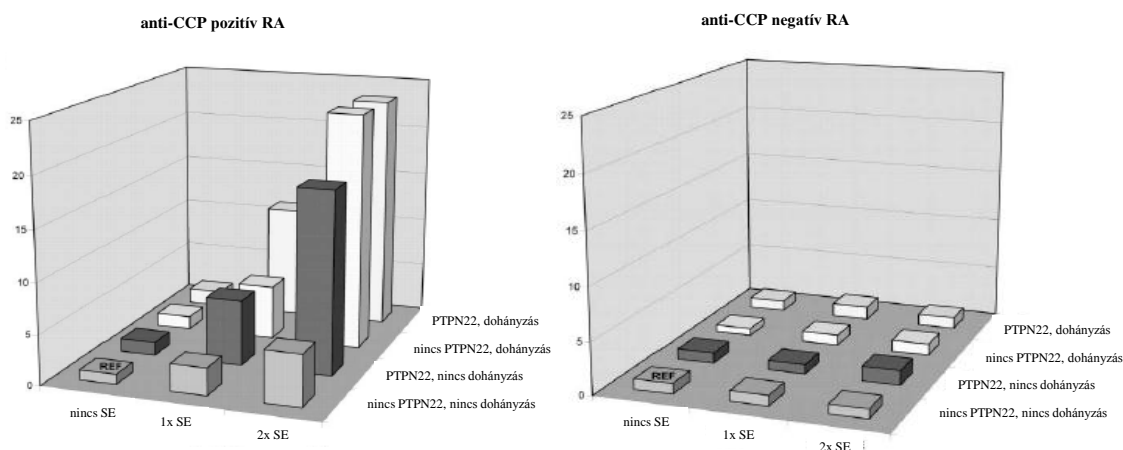
3.2.3.1. Genetika

Az RA konkordanciája 30-50%, illetve 15% monozigóta és dizigóta ikrekben, ami azt mutatja, hogy a betegség patogenezisében a genetikai és a környezeti faktorok egyaránt szerepet játszanak (8). Az ACPA-k jelenléte alapján az RA felosztható két alcsoportra (ACPA-pozitív és a-negatív), melyek genetikailag is különböznek.

Az RA genetikai hátterének két harmad részéért az MHC II locusban található HLA-DRB1 allélok (*0101, *0102, *0401, *0404, *0405, *0408, *1001 és *1402) felelnek (81). Számos HLA-DRB1 molekula egy közös, RA-ra hajlamosító szekvenciát, az úgynevezett shared epitópot (SE) (glutamin-leucin-arginin-alanin-alanin [QKRAA, QRRAA és RRRAA]) kódolja a DR β 1-lánc harmadik hipervariábilis régiójában a 70-74. aminosavszakaszon (81). Az SE a HLA-molekula antigénkötő régiójában helyezkedik el, emiatt korábban az a nézet uralkodott, hogy egy feltételezett artritogén peptid megkötésében játszhat szerepet (SE-hipotézis) (82). Bár a DR-molekula kristályszerkezetének tanulmányozásával igazolódott, hogy az SE valójában nem az antigénkötő zseb része, hanem a T-sejt-válasz modulálásában, illetve az autoreaktív T-sejt-repertoár formálásában játszhat szerepet. Ezt alátámasztani látszik az is, hogy a hajlamosító epitóphoz hasonlóan ugyanezen a helyen (70-74. aminosav) létezik egy védő hatású aminosavszekvencia is (DERAA, HLA-DRB1*0103, *0402, *1102, *1103, *1301, *1302, *1304) (83). Úgy tűnik továbbá, hogy az SE nem közvetlenül RA-ra, hanem az ACPA-pozitivitásra hajlamosít (84), és befolyásolja az ACPA válasz nagyságát (magasabb anti-CCP titer 1 vagy 2 SE allél esetén a nem SE hordozókkal összehasonlítva) és fajlagosságát (pl. citrullinált vimentin vagy fibrinogén ellenes ACPA-képzés) (16).

A másik legjelentősebb genetikai meghatározottságot a PTPN22 egy pontos nukleotidpolimorfizmusa (1858T: 1858 citozin -> timin, azaz R620W: arginin 620-> triptofán cseréje) jelenti RA-ban (85). A módosult fehérje általános autoimmunitási tényezőnek tekinthető: fiziológiásan a T-sejt-receptor jelátviteli folyamataiban játszik szerepet - a C-src-tirozin-kinázzal képez komplexet -, míg az RA-ra hajlamosító mutációja csökkenti a T-sejt aktivációs küszöböt, ami elősegítheti az autoreaktív T-lymphocyták fennmaradását (16).

Populációgenetikai vizsgálatok jelentős gén-gén kölcsönhatást ismertek fel a PTPN22 és a HLA-DRB1 között (7. ábra) (19): A PTPN22 az SE jelenlétében fokozza az ACPA-pozitív RA kialakulásának kockázatát, ami a dohányzástól függetlenül valósul meg.



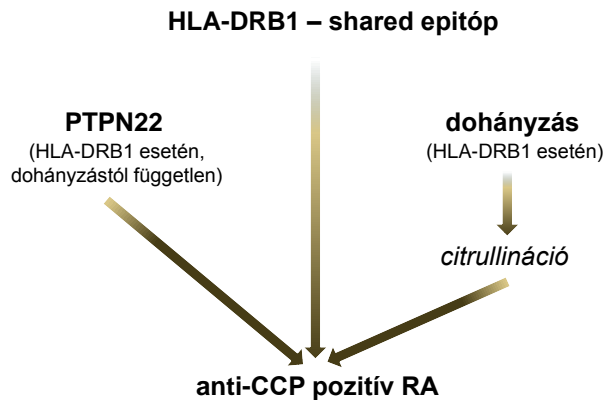
7. ábra SE allélek, a dohányzás és a PTPN22 hajlamosító polimorfizmusának összefüggése anti-CCP pozitív és negatív RA-ban (Kallberg és mtsai. alapján módosítva) (19)

A technikai fejlődésnek (pl. teljes genom asszociációs vizsgálatok (8)) köszönhetően újabb és újabb RA-ra hajlamosító genetikai eltéréseket azonosítottak, melyekből csak néhányat sorolunk fel a teljesség igénye nélkül: *PADI4* (ázsiai populációkban), *CTLA-4*, *CD40*, *STAT4* (14), *TNFR2*, *SLC22A4*, *RUNX1* és az NF- κ B receptor aktivátor génje (*TNFRSF11A*) (26).

Az ACPA-negatív RA genetikája kevésbé feltérképezett, de összefüggésbe hozták a HLA-DR3 locussal (14). Ahogy a korábbi fejezetben említettük, a DR3-asszociáció a gyulladás mértékét befolyásolhatja. További feltételezett kockázati tényező ACPA-negatív RA-ban az interferon regulátor faktor 5 (IRF-5), a C-típusú lektin és a neuropeptid S receptor polimorfizmusa (8, 14).

3.2.3.2. Dohányzás

A dohányzás és a HLA-DRB1 SE-allél hordozás között számos epidemiológiai tanulmány jelentős gén-környezeti tényező kölcsönhatást igazolt az ACPA-pozitív RA esetében (5. táblázat, 7. ábra, 8. ábra) (19), bár ugyanilyen összefüggés nem jelentkezett a PTPN22 esetén.



8. ábra Gén-gén, ill. gén-környezeti tényező kölcsönhatás RA-ban
A PTPN22 hajlamosító polimorfizmusa a HLA-DRB1 allél hordozása mellett, de a dohányzástól függetlenül fokozza az anti-CCP pozitív RA kialakulásának kockázatát. A dohányzás szintén a HLA-DRB1-allélek jelenléte esetén jelent kockázatot ACPA-pozitív RA-ban.

5. táblázat A HLA-DRB1 és a dohányzás összefüggése anti-CCP pozitív RA-ban populációgenetikai vizsgálatok alapján

Forrás: Baka Zs. és mtsai. (26)

Tanulmány	Eredmények
Svéd eset-kontroll tanulmány (858 eset és 1048 kontroll)	Az RF-szeropozitív RA relatív kockázata igen magas az SE allélt hordozó dohányosokban (7,5 egy SE és 15,7 két SE esetén) (86).
Arthritises korai esetek (nem differenciált arthritis n=486 és RA n=407)	A dohányzás csak az SE pozitív betegekben fokozza az anti-CCP pozitivitást (87).
Eset-kontroll tanulmány (515 RA-s beteg és 769 kontroll)	A dohányzás fokozza az anti-CCP pozitív RA kialakulásának kockázatát (88).
RA-s betegek sorozatszérumai (n=241)	Magasabb anti-CCP titer dohányosokban. Az anti-CCP pozitivitas több erózióval jár. Közepes összefüggés az anti-CCP és az RF-titer között (89).
Eset-kontroll tanulmány (korai RA)	A korábbi dohányzás és az anti-CCP szint között dózisfüggő összefüggés van. Dupla SE allél 20-szoros kockázatot jelent az anti-CCP pozitív RA-ra dohányosokban (90).
Eset-kontroll vizsgálat (309 szeropozitív és 136 szeronegatív RA-s beteg, ill. 533 kontroll)	Homozigóta SE-allél hordozó, erős dohányosokban fokozott az anti-CCP pozitív RA kialakulásának kockázata (91).

Study of Leiden Early Arthritis Clinic (977 korai arthritises beteg)	A HLA-DRB1*0401, *0404, *0405 és *0408 SE allélek jelentik a legnagyobb kockázatot az anti-CCP pozitivitásra. A dohányzás-SE kölcsönhatás a HLA-DRB1*0101, *0102 és *1001 SE allélek esetén a legkifejezettebb (92).
Study of Leiden Early Arthritis Clinic (n=216)	A dohányos anti-CCP pozitív RA-s betegek több anti-CCP izotípussal rendelkeznek függetlenül az SE-státusztól (93).
francia RA-s betegpopuláció (n=274, fele halmozott előfordulású család)	Legalább egy SE-allél (főként a DRB1*0401) jelenléte anti-CCP pozitivitásra hajlamosít (94).
3 észak-amerikai kohorsz esettanulmánya (n=2476) (NARAC: n=1105, SONORA: n=618, Inception Cohort: n=753)	A NARAC és Inception Cohortban összefüggés a dohányzás és az anti-CCP pozitivitas között. Csak a NARAC kohorsz erősíti meg a dohányzás és az SE-allélek kölcsönhatását anti-CCP pozitív RA-ban (95).
Korai RA-s afroamerikai populáció (n=300)	Nem találtak összefüggést a dohányzás és az anti-CCP pozitivitas között (96).
3 eset-kontroll vizsgálat (1977 eset és 2405 kontroll) (EIRA, NARAC, Dutch Leiden Early Arthritis Clinic)	Összefüggés a dohányzás, HLA-DRB1 SE-allélek és az anti-CCP pozitív RA között, de nincs kapcsolat a dohányzás és a PTPN22 esetében, valamint a PTNP22 kizárólag HLA-DRB1 jelenlétében fokozza az anti-CCP pozitív RA kockázatát (19).

A dohányzás negatívan befolyásolja a betegség klinikai jellemzőit (6. táblázat), kérdés azonban, hogyan járul hozzá az RA patogeneziséhez.

6. táblázat A dohányzás hatása az RA klinikai jellemzőire

anti-CCP és RF szint (főként IgA RF) ↑ (88, 97)
betegségaktivitás és HAQ-érték ↑ (97)
radiológiai elváltozások ↑ (98)
több extraartikuláris manifesztáció (rheumatoid csomó, tüdő érintettség, vasculitis) (99, 100).
rosszabb terápiás válasz TNF-gátlóra és metotrexátra (21)

I. Egy részről több ponton modulálja az immunrendszer működését (7. táblázat): gátolja a makrofágok és neutrophilek baktériumölő funkcióit és számos proinflammatorikus

citokin termelését, szupprimálja a primer immunválaszt, és T-sejt anergiát okoz. Mindezen hatások kedvezhetnek az RA kockázati tényezőnek számító infekciók (EBV, parvo vírus B19 stb.) előfordulásának.

7. táblázat A dohányzás szerteágazó hatásai

Rövidítések: ↓ csökkent, ↑ fokozott, ic. intracellularis

Forrás: Baka Zs. és mtsai. (26)

Dohányzás hatása	Eredmények
Immensejtek	Neutrophilműködés (pl. szuperoxid-termelés) ↓ (101) Alveoláris makrofágok fagocita és ic. baktériumölő funkciói ↓ (102, 103) Elsődleges immunválasz ↓ (104) T-sejt-anergia és T-sejt-aktiváció ↓ (101) Nikotin/nikotinos acetyl-kolin-receptor szerepe (101)
Citokinek	alveoláris makrofágok TNF- α , IL-1, IL-6 és IFN- γ szekréciója ↓ (105). dendritikus sejtek IL-12 termelése ↓ (101) IFN- γ szekréció gátlása lymphocytákban (106) nikotinos acetyl-kolin-receptor és hidrokinon szerepe (101, 106) Dohányos RA-s betegekben TNF- α /sTNFR arány ↑ (107) Egészséges dohányosokban TNF-szint ↑ (108)
Oxidatív stressz	sok szabadgyök cigarettafüstben ic. glutationdeplécio → sejtkárosodás (109) redoxszenzitív NF- κ B és aktivátor protein-1 (AP-1) aktivációja (109)
Antiösztrogénhatás	inaktív ösztrogének képződése (110)
Fibrinogén	A dohányosokban szérumbfibrinogén ↑ (111)
Citrullináció	PAD2 expresszió és citrullináció ↑ egészséges dohányosok bronchoalveoláris mosófolyadékában (25)

II. A dohányfüst káros anyagai a sejtek elhalását idézhetik elő, ami genetikailag fogékony egyéneknél autoantigének prezentálásához vezethet. **III.** A dohányzás fokozott oxidatív stresszt jelenthet a szervezet számára: a dohányfüst sok szabad gyököt tartalmaz, és elősegíti a szervezetben az endogén szabad gyökök képződését is, amelyek együttesen károsíthatják a DNS-t (112). A DNS-károsodás azután elősegítheti az autoimmunitásért felelős gének aktivációját, illetve a toleranciában szerepet játszó gének inaktivációját. **IV.** Ráadásul a dohányzás antiösztrogén hatású (26), ezáltal az endokrin rendszert befolyásolva indirekt módon hathat az immunrendszerre, és a

gyulladásos folyamatok irányába tolhatja el az egyensúlyt (21). **V.** Ismert, hogy a dohányzás emeli a szérumban a fibrinogén szintet (Framingham tanulmány) (113). Ahogy az előző fejezetben említettük, a citrullinált fibrinogénnek feltételezett artritogén szerepe lehet az ACPA pozitív RA-ban. Arról viszont nincs közvetlen adat, hogy a dohányzás a citrullinált fibrinogén szintjét befolyásolja-e. **VI.** A dohányzás elősegítheti a citrullinációt a PAD enzimre hatva (26), ami autoantigének képződéséhez vezethet a poszttranszlációs módosulás következtében.

A dohányzás TNF jelátviteli rendszerre kifejtett hatásáról csak közvetett adatok állnak rendelkezésre: A TNF-gátlók kevésbé hatékonyak dohányos RA-s betegekben (21). Bennük magasabb a TNF- α /sTNFR aránya, és korrelál a dohányzással (107). Egészséges dohányosokban magasabb a szérumban a TNF szint, amely összefüggést mutat az elszívott cigarettamennyiséggel (108).

3.2.3.3. Egyéb kockázati tényezők

A dohányzáson kívül további kockázati tényezők a következők: fertőzések (rubeola, parvo vírus B19, EBV, Porphyromonas gingivalis és Proteus mirabilis), koffein, ásványi olajok, szilikátpor és stressz; ugyanakkor az alkohol védő hatásának bizonyult (114, 115).

3.2.4. Patomechanizmus

3.2.4.1. Synovialis gyulladás

Az RA-s synovitis során az ízületi belhártya megvastagszik, és tumorszerű sejtburjánzás, pannusképződés jellemző rá. A gyulladt synovium fő sejt alkotói a makrofágok, lymphocyták, endothelsejtek és fibroblastok. Aktiválódva gyulladást mediátorokat (citokinek, kemokinek, prosztaglandinok, reaktívoxigén-gyökök, mátrixmetalloproteáz enzimek stb.) termelnek, sejtmembránjukon megnö a sejt felszíni adhéziós molekulák expressziója, így könnyedén a gyulladást helyére vándorolhatnak (30). Fokozódik az érújdonképződés, ami szintén elősegíti a leukocytatoborzást. A fibroblastaktiváció végső soron synovialis fibrosishoz vezet. Ha a gyulladást sejt által termelt enzimek elemésztik a porcot, a subchondralis csont is károsodik, ami széli eróziók képében látható a röntgenfelvételen. Az ACPA-k az osteoclastok felszínéhez kötődve fokozzák azok képződését (osteoclastogenesis) (32). Ez a hatás az aktiválódott

osteoclastprekursorok TNF-termelésével magyarázható. Az ACPA-knak ezáltal közvetlen patogenetikai szerepük lehet a betegségben.

A synovialis gyulladást számos proinflammatorikus citokin szabályozza, melyek a leukocyták ízületbe való kitapadásában (adhézió), az új erek képzésében (angiogenesis), valamint a porc- és csontbontásban (resorptio) egyaránt szerepet játszanak (8. táblázat) (116-120). Az antiinflammatorikus citokinek relatív hiánya szintén kedvez a gyulladós folyamatoknak az RA-s synoviumban (8. táblázat).

8. táblázat Pro- és antiinflammatorikus citokinek és lehetséges szerepük a synovialis gyulladásban (Szekanecz Z. könyvfejezete alapján módosítva) (30, 116-120)

Proinflammatorikus citokinek	Sejtadhézió	Angiogenesis	Csontresorptio
TNF-α	+	+	+
IL-1	+	+/-	+
IL-6	+/-	+/-	+
IL-8	+	+	?
IL-17	+	+	+
IL-18	+	+	-
IL-22	?	?	+
IL-23	?	?	+
IL-33	?	+	-
Antiinflammatorikus citokinek	Sejtadhézió	Angiogenesis	Csontresorptio
IL-4	+	-	-
IL-10	+/-	?	-
IL-12	+	--	?
IL-13	-	+/-	+
IL-35	?	?	?
TGF-β	+/-	+/-	+/-

3.2.4.2. $CD4^+$ T-sejt-alcsoportok kóros szabályozottsága RA-ban

Sok évig az a nézet uralkodott, hogy az RA a Th1-sejtek által mediált autoimmun betegség. Ezt alátámasztotta a Th1-citokinek túlsúlya és a Th1-sejtek ellen ható Th2-citokinek relatív hiánya (IL-4, IL-5, IL-10) az RA-s betegekben, valamint az, hogy a Th1-sejtek hatékonyan aktiválják a TNF- α fő forrásának számító makrofágokat (121).

Azonban az utóbbi időben a Th1-dominanciát tükröző alapfeltételezés kissé árnyaltabbá vált. Jelenleg a CD4⁺ T-sejt alcsoportok (Th1/Th2/Th17/Treg) egyensúlyának kóros szabályozottságával magyarázzák az autoimmun folyamatot (121). Úgy tűnik, hogy inkább a Th17-sejtek, mint a Th1-sejtek a gyulladásos válasz fő mediátorai (37, 122). A Th17-sejtek jellemző citokinje a TNF- α -val szinergizáló IL-17. Az RA-s betegekben mind az IL-17, mind az IL23 (a Th17-sejtek IL-17 termelésében van fontos szerepe) megtalálható a szérumban, synovialis folyadékban és biopsziás mintában (123). Az IL-17 erős stimulust jelent a makrofágok TNF és IL-1 termelésére, és az osteoclastogenesisben is bizonyított szerepe (122).

A Treg-ek funkciója feltételezhetően szintén károsodott RA-ban. Ehrenstein és mtsai. kimutatták, hogy a TNF gátolja a Treg működést, míg az RA-s betegek TNF-antagonistával történő kezelése visszaállítja azt (36). A Treg-ek szerepét bizonyítja az egér RA-s modelljén (kollagénindukált arthritis, CIA) végzett kísérletek eredménye is: a Treg depletált egerekben súlyosabb betegség alakul ki, és a már kialakult betegséget a Treg adása enyhíti (124).

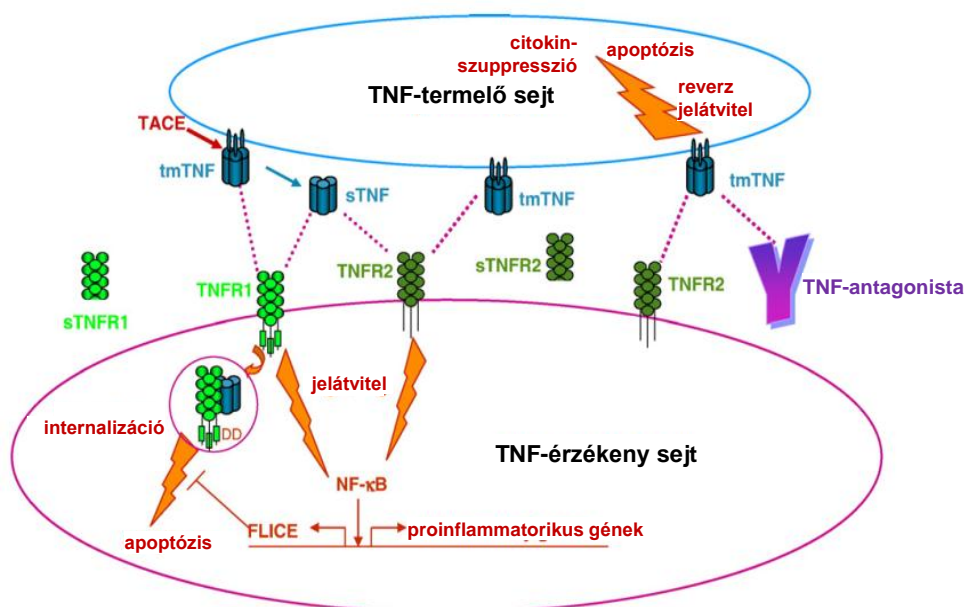
Jelen ismereteink szerint az RA-s gyulladás és porckárosodás fő mediátorai a TNF- α és IL-17, és az autoimmun folyamat hátterében a Th17/Th1/Th2/Treg homeostasis felborulása állhat.

3.2.4.3. TNF

A krónikus synovialis gyulladást, valamint a porc- és csontdestrukciót többek között a TNF- α szabályozza, amit sok év kutatási eredményei igazolnak: A synovialis gyulladás területén a TNF koncentrációja magas (125), főként a porc-pannus határon halmozódik fel (126), és elsődleges forrásai az aktivált makrofágok (127). A TNF-et nagy koncentrációban expresszáló transzgén állatokban súlyos destruktív arthritis alakul ki, amely hisztopatológiailag hasonló az RA-hoz (128). A kollagénindukált arthritisben (CIA) a TNF blokkolása enyhíti a betegséget (129, 130), míg a TNF neutralizálása gátolja az IL-1 és más proinflammatorikus citokinek termelését az RA-s synovialis szövettenyészetben (125, 131).

A TNF a proinflammatorikus citokinek közé tartozik, és sok más citokin (IL-1, IL-2, IL-17 és IFN- γ) termelését is elősegíti, amelyek szintén hozzájárulnak a gyulladásához és a szövetkárosodáshoz, valamint circulus viciosusként a TNF-termeléshez.

Számos sejtfeleség (immun- és nem immunsejtek egyaránt) termel TNF-et: makrofágok, T-sejtek, hízósejtek, granulocyták, természetes ölü sejtek, fibroblastok, neuronok, keratinocyták és simaizomsejtek (132). A TNF két formában található meg a szervezetben: a szolubilis és transzmembránválozat (sTNF és tmTNF) (9. ábra) (132). A tmTNF-et a TACE (TNA- α konvertáló enzim) enzim hasítja, és így alakul ki a szolubilis forma. A TNF kétféle receptorhoz kötődhet: a TNFR1 szinte minden sejtípuson konstitutívan kifejeződik, míg a TNFR2 indukálható, és főként az endothel- és hemopoetikus sejteken jelenik meg (132). Az sTNF inkább a TNFR1-hez, míg a tmTNF a TNFR2-höz kötődik nagyobb affinitással (9. ábra) (132). A TNFR1 sejtaktivációt (NF- κ B) vagy apoptózist idéz elő a sejt metabolikus állapotától függően. A TNFR2 a sejtaktiváló útvonalaknak kedvez, és fokozza a proinflammatorikus gének expresszióját.



9. ábra TNF jelátvitel (Tracey és mtsai. alapján módosítva) (132)

A TNF-et termelő sejt felszínén a tmTNF a TACE hatására sTNF-é alakul. A tmTNF inkább a TNFR2-höz, míg az sTNF inkább a TNFR1-hez kötődik. A TNFR1 sejtaktivációt (NF- κ B) vagy apoptózist idéz elő a sejt metabolikus állapotától függően. A TNFR2 a sejtaktiváló útvonalaknak kedvez, és a proinflammatorikus gének expresszióját fokozza. A TNF-antagonisták többek között a tmTNF-hez kötődve reverz szignalizáció révén a TNF-termelő sejt apoptózisát, ill. a TNF-termelés gátlását idézik elő.

Rövidítések: TACE TNF- α -konvertáló enzim, FLICE FADD-szerű IL-1 β -konvertáló enzim, tmTNF transzmembrán TNF, sTNF szolubilis TNF, TNFR TNF receptor

Érdekes módon a dohányos RA-s betegekben a TNF- α /sTNFR aránya magasabb, és a hányados összefüggést mutat a dohányzás mértékével, a dohányzásról való leszokás után is (107). Továbbá egészséges dohányosokban szignifikánsan magasabb a szérum-

TNF-szint a nem dohányosokhoz képest, és az elszívott cigarettamennyiség pozitívan korrelál vele (108).

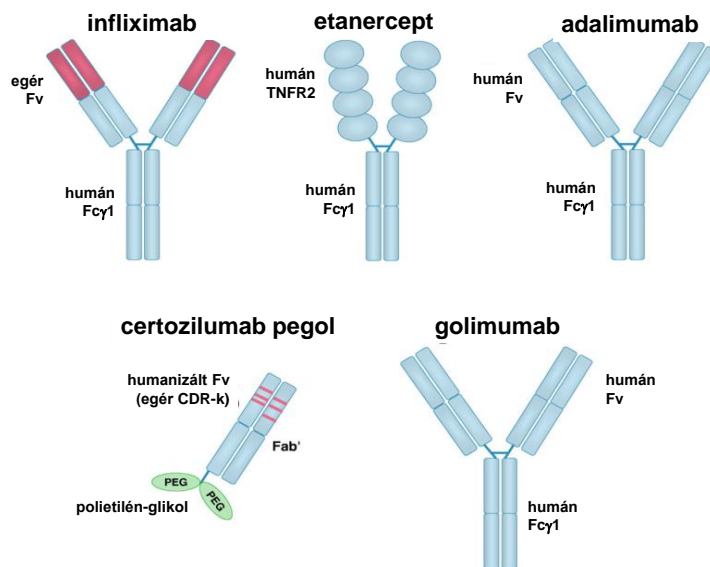
3.2.5. Biológiai terápia és citokingátlás RA-ban

A synovialis gyulladást számos proinflammatorikus citokin szabályozza, melyek hatása bár nem teljesen azonos, de összességében fokozzák a leukocyták ízületbe vándorlását, az angiogenesisist, a porc- és csontbontást. Legtöbbjük ma már terápiás célpont RA-ban (9. táblázat). Mivel a TNF- α -nak igen szerteágazó hatásai vannak a gyulladás számos folyamatára, ezért a legtöbb, jelenleg alkalmazott biológikumnak ez a citokin a támadáspontja (9. táblázat).

9. táblázat Citokingátlás RA-ban (30, 116-120, 133)

Citokin	Terápiás vonatkozás
TNF-α	A TNF-gátlókat széles körben használják RA-ban. <i>etanercept</i> : humán TNFR2-t és humán konstans régiót tartalmazó fúziós protein <i>infliximab</i> : egér variábilis régiót és emberi konstans régiót tartalmazó TNF-antagonista <i>adalimumab</i> : teljesen humán antitest <i>golimumab</i> : teljesen humán antitest <i>certolizumab pegol</i> : felszívódást lassító polietilén-glikol (PEG) oldalláncot tartalmazó humanizált (a hipervariábilis régiók egér eredetűek) Fab antitest
IL-1	<i>anakinra</i> : rekombináns humán IL-1 receptorantagonista, RA-ban törzskönyvezett <i>canakinumab</i> : IL-1 β ellenes humán monoklonális antitest, a gyógyszervizsgálatot lezárták hatástalanság miatt, RA-ban nem törzskönyvezett
IL-6	<i>tocilizumab</i> : IL-6 receptor ellenes humanizált monoklonális antitest, RA-ban törzskönyvezett
IL-17	<i>vidofludimus</i> : kis molekulásúlyú vegyület, mely az IL-17 szintézist gátolja. II.b fázisú COMPONENT vizsgálat szerint hatékony lehet RA-ban.
IL-18	<i>in vitro</i> adatok alapján gátlása hatékony lehet RA-ban.
IL-22	<i>in vitro</i> adatok alapján gátlása hatékony lehet RA-ban.
IL-23	<i>in vitro</i> adatok alapján gátlása hatékony lehet RA-ban.
IL-33	<i>in vitro</i> adatok alapján gátlása hatékony lehet RA-ban.

Számos többközpontú (multicentrikus) vizsgálat igazolta a TNF-gátlók hatékonyságát, és ma már igen széles körben alkalmazzák őket RA-ban. Öt, különböző szerkezetű TNF-blokkolót törzskönyveztek: az infliximab egér variábilis régiót és emberi konstans régiót tartalmazó TNF-antagonista ellenanyag, az adalimumab és a golimumab teljesen humán antitest, míg a certolizumab pegol a felszívódást lassító polietilén-glikol (PEG) oldalláncot tartalmazó humanizált (a hipervariábilis régiók egér eredetűek) Fab antitest; továbbá az etanercept humán TNF receptor 2-t (TNFR2-t) és humán konstans régiót tartalmazó fúziós protein (10. ábra) (132).



10. ábra TNF-antagonisták (Tracey és mtsai. alapján módosítva) (132)
 Az infliximab egér variábilis régiót és emberi konstans régiót tartalmazó TNF-antagonista, az adalimumab és a golimumab teljesen humán antitest, míg a certolizumab pegol a felszívódást lassító polietilén-glikol (PEG) oldalláncot tartalmazó humanizált (a hipervariábilis régiók egér eredetűek) antitest; továbbá az etanercept humán TNF receptor 2-t (TNFR2-t) és humán konstans régiót tartalmazó fúziós protein.
 Rövidítések: Fv variábilis régió, Fc γ 1 IgG1 konstans régió, CDR hipervariábilis régió

A legtöbb TNF-blokkoló úgy fejt ki hatását, hogy a szolubilis és transzmembrán TNF- α -hoz kapcsolódva meggátolja a TNFR-hoz való kötődést. Továbbá reverz szignalizáció révén a TNF-termelő sejt apoptózist, ill. TNF-termelésének gátlását idézi elő (9. ábra) (133).

Az ízületbe vándorló, és a gyulladási folyamatokat szabályozó autoreaktív T- és B-sejtek működése szintén több ponton befolyásolható terápiásan. A T-sejtek

effektorsejttéérésében elengedhetetlen a T-sejt-receptoron érkező aktivációs jeleken kívül a kostimuláció. A túlzott aktivációt a CTLA-4 receptoron érkező negatív szignál fékezi, ami terápiásan kihasználható (CTLA-4 fúziós protein, abatacept). A B-sejtek differenciálódásához elengedhetetlen a CD20 molekula, amely egyre növekvő koncentrációban expresszálódik a B-sejtek fejlődése során, bár a plazmasejteken már nem található. A CD20 ellen képzett ellenanyag, a rituximab TNF-gátlók sikertelensége esetén jól használható RA-ban.

Jelenleg is folynak a gyulladás egyéb folyamatait célzó gyógyszerkutatások az adhéziógátlástól a kis molekulású tirozinkináz-gátlókig (JAK kinázok).

3.3. Polymyositis/dermatomyositis

3.3.1. Általános jellemzők

A PM/DM főként a proximális végtagizmok gyengeségével járó autoimmun betegség, melyet szisztémás tünetek (bőrelváltozások, belszervi eltérések) kísérhetnek. Jellemző rá a női túlsúly (férfi:nő=1:3), és kialakulása főként a 40-50. életévre tehető. Más szisztémás autoimmun kórképekhez hasonlóan patogenezisében mind a genetikai, mind a környezeti tényezők szerepet játszanak.

Tünetei közül kiemelendő az izomgyulladás okozta progresszív izomgyengeség, mely megnehezíti a mindennapi tevékenységeket (öltözködés, lépcsőn járás). A jellemző, patognomikus bőrelváltozásokat (Gottron-papula, Gottron-jel stb.) a kiserek gyulladása okozza (11. ábra). Gastrointestinalis (dysphagia, reflux etc.) és cardialis tünetek (ingerületvezetési zavarok, szívelégtelenség) egyaránt kísérhetik a betegséget, és gyakran alakul ki tüdőfibrosissal járó intersticiális tüdőbetegség.



11. ábra Jellemző bőrelváltozások PM/DM-ben (az EULAR online kurzusának anyagából, <http://www.eular-onlinecourse.org/index.html>)

A PM/DM paraneopláziás szindrómaként másodlagosan is előfordulhat daganatokban (ovarium, tüdő stb.) (134), illetve autoimmun reumatológiai betegségekkel átfedve (Sjögren-szindróma, SSc, kevert kötőszöveti betegség, SLE és RA) is megjelenhet. Ismert juvenilis formája is (135).

A PM/DM diagnózisát máig a Bohan és Peter által kidolgozott kritériumrendszer alapján állítjuk fel (10. táblázat) (136, 137). Terápiájában a szteroidok az első vonalbeli szerek, emellett a betegség kezelésében az immunszuppresszív készítmények (azatioprin, metotrexát, ciklofoszamid, IVIG) is használatosak.

10. táblázat PM/DM diagnosztikus kritériumrendszere (136-138)

Definitív PM: 4 kritérium teljesülése bőrkiütés nélkül; definitív DM: 4 kritérium teljesülése bőrkiütést is beleértve

1. proximális végtagizmok szimmetrikus gyengesége
2. pozitív izombiopszia: mononukleáris sejtes infiltráció, nekrozis, izomrost-degeneráció és -regeneráció, kapilláriselzáródás, kötőszövet-szaporulat
3. szérum izoenzimok emelkedése: CK, aldoláz, GOT, GPT, LDH
4. EMG-n myopathiára jellegzetes triász: kis amplitúdójú, polifázisos hullámok, magas frekvenciájú tüskék, spontán fibrilláció és pozitív, meredek hullámok
5. DM esetén karakterisztikus bőrtünetek: heliotrop rash (halványlila elszíneződés a felső szemhéjon), Gottron-papula és -tünet, V-jel (erythemás bőrelváltozás a dekoltázs területén)

3.3.2. Autoantitestek

PM/DM-ben gyakran fordulnak elő autoantitestek, melyeken belül két csoportot különböztethetünk meg: a myositisasszociált autoantitestek más autoimmun betegségben is előfordulnak, és jelenlétük felhívhatja a figyelmet overlapszindrómára vagy gyulladásos kötőszöveti betegségre (11. táblázat), míg a myositisspecifikus autoantitestek (MSA-k) főként PM/DM-re jellemzőek (12. táblázat). A betegek 60-80%-a pozitív rájuk, és magas specifitásukkal segíthetik a diagnózis felállítását (139). Jellemzően minden betegnek egyfajta MSA-ja van, és az autoantitest szérumszintje a betegségaktivitással korrelál.

A leggyakoribb MSA az antiszintetáz autoantitest, amely a PM/DM-es betegek 25-30%-ában fordul elő, és az aminosav-tRNS-szintetázok ellen irányul (140). A fehérjeszintézis során az aminosavakat tRNS-szintetázok kapcsolják a tRNS-hez. Az adott aminosav

csak így képes beépülni a képződő fehérjelánc végére. Az antiszintetáz autoantitestek klinikailag jól körülírt szindrómát jelölnek, melyre myositis, szimmetrikus, nem erozív arthritis, Raynaud-jelenség, mechanikus kéz, láz és interstitialis tüdőbetegség jellemző.

11. táblázat Myositisasszociált autoantitestek PM/DM és egyéb kötőszöveti rendszerbetegség társulása esetén

Myositisasszociált autoantitestek
overlapszindróma társulása anti-PM-Scl anti-snRNP anti-SSA (anti-Ro52/anti-Ro60) anti-SSB (anti-La) anti-Ku
SSc társulása anti-PM-Scl anti-Ku
kevert kötőszöveti betegség társulása anti-snRNP
SLE társulása anti-Ku

12. táblázat Myositisspecifikus autoantitestek PM/DM-ben, illetve antigénjük funkciójával együtt

Myositisspecifikus autoantitestek	Antigén és funkciója
antiszintetázok	
anti-Jo1	hisztidin-tRNS-szintetáz (fehérjeszintézis)
anti-PL7	treonin-tRNS-szintetáz (fehérjeszintézis)
anti-PL12	alanin-tRNS-szintetáz (fehérjeszintézis)
anti-EJ	glicin-tRNS-szintetáz (fehérjeszintézis)
anti-OJ	izoleucin-tRNS-szintetáz (fehérjeszintézis)
anti-KS	aszparagin-tRNS-szintetáz (fehérjeszintézis)
anti-Zo	tirozin- és fenil-alanin-tRNS-szintetáz (fehérjeszintézis)
anti-Mi2	Mi2 (transzkripciószabályozás)
anti-SUMO-1	SUMO-1 (fehérjék posztranszlációs módosítása)
anti-SRP	SRP (újjonnan képződött fehérje transzportja)
anti-p140/155	p140/155 (transzkripciószabályozás)
anti-MDA5	MDA5 (vírus ellenes veleszületett immunválasz)

A leggyakoribb antiszintetáz autoantitest az anti-Jo-1, amely általában már a myositis diagnózisakor jelen van, a betegségaktivitással korrelál, és szerepet játszhat a a PM/DM patogenezisében (24).

Jóval ritkábban fordul elő az anti-Mi-2 autoantitest. Antigénje a nukleoszómaátrendezésben és a transzkripciógátlásban játszik szerepet (141). Működése a T- és B-sejt-differenciálódásban (142, 143), illetve az izomregenerációban egyaránt ismert (63). Az anti-Mi-2 antitestek kizárólag DM-ben fordulnak elő, és súlyosabb bőrelváltozásokkal társulnak, viszont a szteroidválasz jobb ebben az alcsoportban, és a malignitás kockázata is kisebb (63).

Szintén ritkán előforduló antitest az anti-SRP. A szignálfelismerő részecske (SRP) az újonnan képződő fehérjék szignálszekvenciájához kötődik, és elősegíti a fehérje citoplazmából az endoplazmás retikulumba való transzportját (63). Az anti-SRP PM-hez társul, és klinikumát tekintve jellemző rá az immunmediált nekrotizáló myopathia, amely rapidan progrediáló izomgyengességgel és izomelhalással járó betegség (63).

Az utóbbi években számos új autoantitestet mutattak ki: az anti-p155/140 ellenanyag gyakran fordul elő a daganattal társuló szekunder DM-ben, míg az anti-SUMO-1 a súlyos bőrtünetekkel kísért DM-re jellemző (63).

3.3.3. Kockázati tényezők

3.3.3.1. Genetika

A legszorosabb genetikai összefüggést az MHC II-es allélek (főként a 8.1-es ősi haplotípus bizonyos alléljai, a HLA-DR3-allélek) jelentik, ami azt sugallja, hogy a betegség kialakulásában a T-sejt mediálta immunválasz zavarának lehet szerepe (15). Az anti-Jo-1 antitestek összefüggést mutatnak HLA DRB1*0301 és DQA1*0501 allélekkel (144), míg az anti-Mi-2 a DRB1*0701 és DQA1*0201 allélekkel (17).

Egyéb genetikai meghatározottságot a proinflammatorikus TNF gén promotor –308A polimorfizmusa jelenti, amely az autoimmun gyulladásra hajlamosíthat (17).

3.3.3.2. Környezeti tényezők

A környezeti tényezők közül a vírusok (Coxsackie, echo, influenza) említhetők, bár vírusantigént nem sikerült kimutatni a betegségben, illetve vírus ellenes antitestképzésre sem áll rendelkezésre irodalmi adat. Ezen kívül az UV-sugárzás kockázati szerepe

emelhető ki (17). A betegség gyakran társul malignitáshoz, tehát kialakulásában a daganat rejtett epítőjainak is szerepe lehet (17).

3.3.4. Patomechanizmus

A PM/DM az autoimmun betegségek közé tartozik az izomban található T-sejtek, a HLA-DR asszociáció és az autoantitestek alapján. A tünetek három mechanizmussal magyarázhatók: a) az infiltráló T-sejtek és makrofágok citotoxikus hatást fejtenek ki az izmokon; b) a citokinek és MHC-fehérjék megzavarják az izometabolizmust és működést; és c) a mikroerek érintettsége és a mikrocirkuláció zavara, melyek hipoxiás károsodást idéznek elő az izmokban (15).

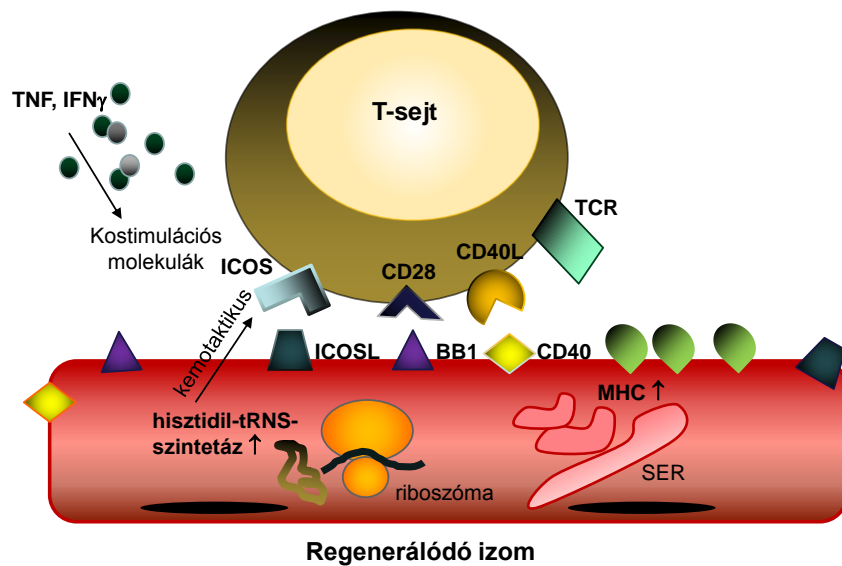
DM-ben a gyulladásos infiltrátum főként perivascularisan és perimysialisán helyezkedik el, és főként CD4⁺ T-sejtek és makrofágok, alkalmanként B-sejtek uralják a képet (15). PM-ben a gyulladás inkább endomysialis, és CD8⁺ T-sejtek dominálják, illetve esetleg CD4⁺ T-sejtek és makrofágok (15). Az infiltráció elhelyezkedése és a domináló T-sejt típus alapján feltételezhető, hogy a myositist más mechanizmusok idézik elő DM-ben és PM-ben.

Fiziológiásan a differenciált izomrostok nem fejeznek ki MHC I-es molekulákat, kizárólag a regenerálódó és fejlődő izomrostokban található meg. Ezzel ellentétben myositisben megjelennek az MHC I és II molekulák az izomrostokon (normálnak tűnő izmokon, re- és degenerálódó rostokon egyaránt) (145). Ennek hátterében *in vitro* eredmények szerint a proinflammatorikus citokinek és kemokinek MHC I és II expressziót indukáló hatása állhat, amit izomsejtkultúrán igazoltak. PM/DM-ben nagy mennyiségű citokint (IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IFN- γ) (38, 39) bocsátanak ki a gyulladásos és endothelsejtek az infiltrált izomszövetben, ami összességében hozzájárulhat az MHC feldúsulásához a betegségben. Érdekes módon az MHC I fehérjék izomspecifikus, fokozott expressziója myositishez és anti-Jo-1 antitestképzéshez vezet transzgén állatokban (146). Ennek hátterében az úgynevezett endoplazmásretikulum-stressz állhat, azaz a túlzott mennyiségű, fel nem tekeredett MHC I fehérje károsítja az endoplazmás retikulumot, ezáltal számos jelátviteli útvonalat (NF-kB) aktiválhat, ami végső soron izomdiszfunkcióhoz és -károsodáshoz vezethet (147).

Az izomban így megjelenő MHC I molekulák endogén és vírus antigéneket prezentálhatnak a CD8⁺ T-sejteknek, amelyek citotoxikus hatásuknak köszönhetően

izomkárosodást idézhetnek elő. Ennek megfelelően nagyszámú CD8⁺ T-sejt található a myositises mintákban (15).

Bizonyos irodalmi adatok alátámasztják a kostimulációs molekulák jelenlétét is myositisben, ami azt sugallja, hogy az izomrostok PM/DM-ben professzionális antigénprezentáló sejtekként működhetnek. Az izomrostok normál esetben nem expresszálnak B7-1-et (CD80) és B7-2-t (CD86), de ezek módosult változatát, a BB-1 fehérjét igen (12. ábra) (148). A proinflammatorikus citokinek (IFN- γ , TNF- α) BB-1-expressziót indukálnak myoblastokban (12. ábra) (148). Az ICOSL expresszió szintén kifejezett a myositises izomrostokon, és a T-sejteket az ICOS proteinen keresztül kostimulálhatja (12. ábra) (149). A CD40 is megjelenhet a PM/DM-es izomrostokon (az IFN- γ CD40 expressziót indukál myoblasttenyészetben), és az infiltráló mononukleáris sejtek (CD4⁺ T-sejtek főként) CD40L-ját aktiválhatja (12. ábra) (150).



12. ábra PM/DM-es izomrostokon kifejeződő molekulák

A gyulladós citokinek hatására a myositises izomrostokon megjelennek a kostimulációs molekulák, illetve az MHC I és II. Az MHC I endoplazmásretikulum-stresszt idéz elő, ami izomkárosodáshoz vezet. A kostimulációs molekulák és az MHC-expresszió alapján az izmok részt vehetnek az antigénprezentálásban, és endogén, ill. vírus eredetű antigéneket mutathatnak be a T-sejteknek. Az anti-Jo-1 antitest célpontja, a hisztidin-tRNS-szintetáz kifejeződik a regenerálódó izomsejtekben, ráadásul kemotaktikus hatású az immunsejtek számára, ezáltal az immunrendszer célpontjává válhat genetikai hajlam esetén. Ha egy környezeti tényező (vírus stb.) izomrost-károsodást és -regenerációt idéz elő, akkor megfelelő genetikai hajlam esetén elindíthatja az izomgyulladást.

Az anti-Jo-1 antitestek célpontja, a hisztidin-tRNS-szintetáz jelentős mértékben kifejeződik a myositises regenerálódó izomsejtekben (151), és kemotaktikus hatású – *in*

vitro legalábbis – a dendritikus sejtekre és T-sejtekre (152), ezáltal az enzim az immunrendszer célpontjává válhat genetikai hajlam esetén.

Ha valamilyen környezeti tényező (trauma, vírus stb.) izomrost-károsodást és regenerációt idéz elő, az izomrostok az immunrendszer célpontjaivá (tRNS-szintetáz pl.) válhatnak genetikailag fogékony egyéneknél (HLA-allélek), ami azután circulus viciosus tarthat fenn a gyulladós környezetben (T-sejtek, citokinek, MHC-upreguláció, izomrostok antigénprezentálása).

4. CÉLKITŰZÉS

Munkánk során az autoimmun betegségek patogeneziséből emeltünk ki egy-egy tényezőt. Egyrészt vizsgáltuk a dohányzás szerepét az RA patomechanizmusában: *in vivo* rendszerben a fehérjék citrullinációjára, illetve az autoantitestképzésre kifejtett hatásait, míg *in vitro* rendszerben a TNF-jelátvitelre gyakorolt hatásait vizsgáltuk. Továbbá a PM/DM kórképben szenvedő betegek keringő MV-mintázatának elemzésével biomarkert kerestünk.

1. Számos epidemiológiai tanulmány igazolja a dohányzás kockázati szerepét az ACPA pozitív RA kialakulásában. Az ACPA-termelés pontos mechanizmusa azonban nem ismert. Ennek tisztázására egy nem arthritises betegcsoportban (tüdődaganatos betegekben) vizsgáltuk, hogy a dohányzás hatására fokozódik-e a citrullináció, illetve a fokozott citrullináció indukál-e autoantitesttermelést (ACPA). Meghatároztuk a daganatszövetben a citrullinált fehérjék, a citokeratin 7 (CK7, ismert szöveti tumormarker tüdőrákban) és a citrullinációért felelős PAD4 enzim kifejeződését, valamint a tüdődaganatos betegek szérumában a PAD4, ACPA (anti-CCP és filaggrin ellenes antitestek) és IgA RF szintet. A kapott eredményeket azután a dohányzási anamnézis szerint elemeztük.

2. *In vitro* kísérleti rendszerben (sejtenyészetben) is megvizsgáltuk a dohányzás hatásait. Az RA-s autoimmun gyulladás szabályozásában a TNF-nek fontos szerepe van, ezért a dohányfüst és a TNF-jelátvitel kapcsolatának elemzése magyarázatot adhat a betegség és a környezeti tényező összefüggésére. Egyik célunk volt, hogy standardizált módszert dolgozzunk ki a dohányfüst elnyeletésére. Majd arra kerestük a választ, hogy a dohányfüst hogyan befolyásolja a TNFR1-2 kifejeződést, valamint apoptózist indukál-e humán T-lymphocytákon.

3. Az autoimmun betegségekben nagy szükség van a mindennapi klinikai gyakorlatban használható, diagnosztikai és prognosztikai értékű biomarkert találni. Számos kórképben felmerült az EV-k lehetséges patogenetikai szerepe, és biomarkerként való alkalmazása. Ezért PM/DM-ben a keringő MV-mintázat (lymphocytá és monocytá

eredetű MV-k, illetve kreatin-kináz (CK) enzimet tartalmazó, izom eredetű MV-k) feltérképezése révén összefüggést kerestünk a betegség patogenezisével, terápiájával, klinikumával és diagnosztikus laboratóriumi eltéréseivel, azaz potenciális biomarkert kerestünk. Továbbá vizsgáltuk az MV-k morfológiáját.

5. MÓDSZEREK

5.1. Vizsgálati alanyok

5.1.1. Pulmonológiai betegek a dohányzás–citrullináció–ACPA kapcsolat vizsgálatához

A Semmelweis Egyetem Pulmonológiai Klinikájának ambuláns szakrendeléséről és fekvőbetegosztályáról kaptuk a betegek és egészséges kontrollok mintáit (n=109). Az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága és az intézeti kutatásetikai bizottság jóváhagyta a vizsgálatot. Minden beteg elolvasta a betegtájékoztatót, és aláírásával elfogadta a vizsgálatban való részvételt. A betegek klinikai adatait a MedSol rendszerből vettük át, a beteg és a kezelőorvos beleegyezésével.

13. táblázat Betegadatok.

* DT csoport szignifikánsan többet dohányzott a DK-hoz képest. Az értékek átlag±SEM vannak feltüntetve. A dohányzás intenzitása csomagévben van megadva (ennek számítását lásd később).

Rövidítések: HPT hypertonia, diab.mell. diabetes mellitus, SEM standard error of the mean

beteg-csoport	betegszám	férfi:nő arány	életkor	dohányzás intenzitása	kísérő betegség	szerves vegyület expozíció	tumoros családi anamnézis
NK	11	4:7	46±5	NA	2 HPT	0	5
DK	10	3:2	53±5	21±9	4 HPT, 1 diab.mell.	2	2
NS	8	3:5	51±5	NA	4 HPT, 1 diab.mell.	1	2
DS	8	3:1	46±5	15±6	1 HPT	0	5
NA	10	3:7	44±6	NA	2 HPT	0	5
DA	6	1:5	45±5	13±5	2 HPT, 1 diab.mell.	1	2
NB	3	1:2	42±9	NA	2 HPT, 1 diab.mell.	0	2
NB	11	5:6	60±5	28±6	5 HPT, 1 diab.mell.	0	5
NT	5	1:4	61±5	NA	1 HPT, 2 diab.mell.	1	1
DT	37	18:19	61±1	36±3 *	14 HPT, 7 diab.mell., 10 COPD	7	20

Munkánk elsősorban tüdőrákos betegekre irányult, de kontrollként az egészséges egyének mellett egyéb pulmonológiai kórképben szenvedő betegeket is bevontunk a vizsgálatba, hogy szélesebb rálátásunk legyen az ACPA-képzés mechanizmusára.

A dohányzási szokás és a tüdőgyógyászati diagnózis szerint 10 betegcsoportot különböztettünk meg (13. táblázat): nem dohányos (soha nem dohányzott) és dohányos (jelenleg vagy korábban dohányzott) egészséges kontrollok (NK és DK), asthma bronchialében (NA és DA), sarcoidosisban (NS és DS), krónikus obstruktív tüdőbetegségben (COPD) (NB és DB) és tüdőrákban (NT és DT) szenvedő betegek. A betegek adatait a 13. táblázat mutatja.

A tüdőrákos betegek közül 30 fő részesült kemoterápiás kezelésben, 14 kapott sugárkezelést, 3 fő pedig kombinált kezelésben részesült. 17 betegnél adenocarcinómát, 11-nél kissejtes tüdőrákot, 10-nél laphámrákot diagnosztizáltak, míg 4 főnek nem ismert a daganatos szövettani eredménye a MedSol rendszerből. Egyik beteg sem szenvedett RA-ban vagy más autoimmun betegségben.

A vért natív vérvételi csövekbe vettük le (n=109), és a szérumokat -20°C -on tartottuk a feldolgozásig (RF, PAD4 és ACPA szint meghatározáshoz). 18 betegről formaldehiddel fixált és paraffinba ágyazott bronchoszkópos szövettani mintát is gyűjtöttünk szöveti microarray-hez (TMA-hoz), amelyet azután immunhisztokémiai módszerrel (CK7, PAD4 és citrullinált fehérje) festettünk. A Semmelweis Egyetem I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézete tüdőrákos betegektől származó, további 100 TMA-át (vérminta nélkül; a dohányzási anamnéziséből annyi ismert, hogy dohányzott-e valaha) bocsátott a rendelkezésünkre a Pulmonológiai Klinikával egyeztetve. A TMA-kat az előbb említett három szöveti antigénre szintén megfestettük (14. táblázatban tüntettük fel a TMA alcsoportokat).

14. táblázat TMA-k megoszlása tumortípus szerint a dohányzás függvényében

Tumortípus	Dohányos	Nem dohányos	Ismeretlen
differentiált adenocarcinoma	12	6	5
nem differentiált adenocarcinoma	9	2	3
laphámrák	4	0	1
kissejtes tüdőrák	5	0	0
mucinszekretáló daganat	10	8	7
nem szekretáló daganat	9	9	9

Minden beteg kérdőívet töltött ki dohányzási szokásairól (megtől meddig, naponta mennyit dohányzott), az alkoholfogyasztásról, a kémiai expozícióról, korábbi betegségeiről (cukorbetegség, magasvérnyomás-betegség, COPD, asthma, sarcoidosis, RA) és tumoros anamnéziséről (a diagnosztizált tumor típusa, kapott-e kemoterápiát és sugárkezelést a beteg, és daganatok családi előfordulása) (13. táblázat). A dohányzás intenzitását a csomagévvvel számszerűsítettük: csomagév = napi cigarettaszám x dohányos évek száma / 20 (1 doboz 20 cigarettát tartalmaz). Az alkoholfogyasztást az egységevekkel számszerűsítettük: egység év = naponta elfogyasztott alkoholos egység száma (egység = alkoholos ital térfogata ml-ben x alkoholos ital térfogatszázaléka / 1000) x az alkoholfogyasztás hossza években megadva.

5.1.2. Betegek a mikrovezikula-vizsgálatokhoz

Húsz PM/DM-es beteget (kezelt, nem aktív betegek) és húsz kor és nem szerint illesztett egészséges kontrollt választottunk be a vizsgálatba a prágai Károly Egyetem Reumatológiai Tanszékéről. Minden beteg elolvasta a betegtájékoztatót, és aláírta a beleegyező nyilatkozatot. A résztvevők jellemzőit (klinikai és laboratóriumi paraméterek) a 15. táblázat mutatja.

15. táblázat Betegek adatai és vizsgálati eredményei.
Az értékek átlag±SEM vannak feltüntetve.

Klinikai jellemzők		Laboratóriumi paraméterek	
<i>átlag életkor</i>	51±3 év	<i>CRP</i>	9,00±2,05
<i>férfi:nő arány</i>	1:3	<i>CK</i>	315±76 U/ml
<i>tünetek fennállása</i>	42±12 hónap	<i>LDH</i>	500±108 U/ml
<i>PM-DM-es betegek aránya</i>	12:8	<i>myoglobin</i>	174±46 ng/ml
<i>izomerő (MMT)</i>	84±2	<i>kreatinin</i>	75±5 µmol/l
<i>izom MYOACT VAS</i>	15±3	<i>lymphocyta</i>	1850±180 sejt/µl
<i>tüdő MYOACT VAS</i>	14±3	<i>thrombocyta</i>	242±14 sejt/µl
<i>ízületi MYOACT VAS</i>	11±4	<i>anti-Jo-1</i>	9/20 fő pozitív
<i>globális aktivitás VAS</i>	19±2		
<i>tüdőérintettség</i>	11/20 fő		
<i>kezelés</i>	18/20 fő szteroid (31±5 mg prednizon) 5 fő azatioprin 6 fő metotrexát 1 fő mikofenolát		

Az izomerőt manuális izomteszttel (manual muscle test, MMT) becsültük meg (International Myositis Assessment and Clinical Studies [IMACS] alapján (153)). A domináns oldalon a deltoideus, biceps és triceps brachii, csukló extensorok, quadriceps femoris, boka dorsiflexorok, nyaki flexorok, gluteus medius és maximus, iliopsoas izmokat 10 pontos skálán értékeltük (maximum $10 \times 10 = 100$ pont adható normál izomműködésnél). Vizuális analóg skálán (Myositis disease activity assessment visual analogue scales, MYOACT VAS) határoztuk meg a szervspecifikus (izom, tüdő és ízület) és a globális betegségaktivitást (153). A szteroidkezelés esetében a prednizolonra átszámított dózist adtuk meg. A laboratóriumi paraméterek közül rögzítettük a gyulladás mértékét jelző C-reaktív proteint (CRP-t), ill. az izomeredetű faktorok - kreatin-kináz (CK), laktát-dehidrogenáz (LDH), myoglobin – szintjét, továbbá dokumentáltuk a kreatininszintet, a lymphocyta- és thrombocytaszámot, az anti-Jo-1 pozitivitást és a tüdőérintettséget.

A betegek és egészséges kontrollok anamnézisében nem szerepelt olyan egyéb, jelentős megbetegedés (trombotikus szövődmény, stroke, akut koronáriszindróma és szisztémás fertőzés), amely jelen ismereteink szerint befolyásolhatta az MV számot (egy beteg 2-es típusú diabetesben szenvedett).

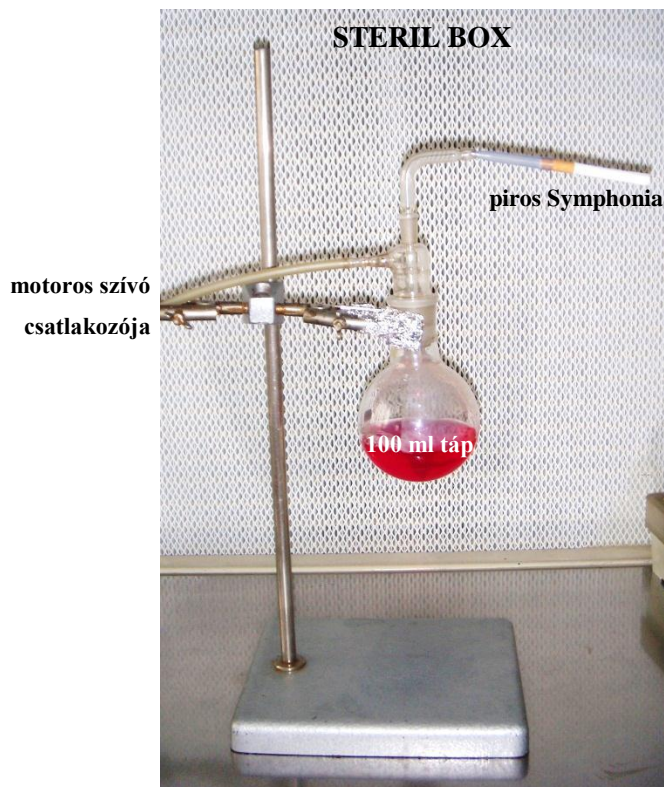
A vér citrátot tartalmazó vérvételi csőbe került levételre. A frissen centrifugált vérplazmákat -20 fokon tárolták a Prágai Egyetemen, majd -20 fokon szállították Intézetünkbe (Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet), ahol egyszeri felolvasztást követően egyszerre, egy műszerbeállítással történt a minták áramlási citometriás mérése. A CK enzim meghatározást a Jávorszky Ödön Kórház Központi Laboratóriumában (Vác), míg az elektronmikroszkópos feldolgozást a Magyar Tudományos Akadémia Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézetében végeztük.

5.2. *In vitro* sejtes vizsgálatok

5.2.1. Dohányfüst elnyeletése

A dohányfüst elnyeletésére *in vitro* rendszert dolgoztunk ki az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport közreműködésével (13. ábra). A kialakítás nehézségét jelzi, hogy a kezelendő sejtek miatt sterilen kellett megoldani az elnyeletést, ezért minden lépést steril fülke alatt végeztünk. A munkához piros Symphonia cigarettát használtunk.

A lombikba előzetesen 100 ml steril 10%-os szérumot (FCS) tartalmazó tápoldatot (lásd az összetétel a sejtek kezelése fejezetben) pipettáztunk. A cigaretta végét lecsípett végű, sterilizált pipettahegybe dugtuk, majd a pipettahegy másik végét sterilen a lombikkivezetés végéhez csatlakoztattuk. A másik lombikkivezetés biztosította a levegő szívását a cigaretta megfelelő égéséhez, ezért steril csatlakozón keresztül motoros szívót csatlakoztattunk a rendszerhez. Majd meggyújtottuk a cigarettavéget, és időnként a motoros szívóval szippantottunk a megfelelő égéshez. A lombikba csak a magas hőmérsékleten izzó cigaretta füstje került. A cigaretta teljes elégeése után a lombikot steril kupakkal gyorsan zártuk, és a benne levő gázelegyet összeráztuk a 100 ml tápoldattal. Ezután a tápoldatot 4°C-on tartottuk, valamint az oldat csíramentességének igazolására kis mennyiséget szobahőmérsékleten tároltunk 5 napig zárt, sterilizált üvegben, de a megfigyelési időszak alatt nem nőtt ki baktérium, gomba.



13. ábra Dohányfüst elnyelése

5.2.2. Sejtek és kezelési séma

Jurkat-sejteket és egészséges egyén perifériás vér mononukleáris sejtjeit (PBMC) kezeltük a dohányfüstös médium különböző koncentrációival. A következő csoportokat különítettük el:

1. kontroll: hagyományos tápoldatban tartott sejtek
2. tömény füst: a dohányfüsttel telített tápoldat eredeti koncentrációjában inkubált sejtek
3. 5x: 5-szörös hígítású dohányfüsttel telített tápoldatban inkubált sejtek
4. 10x: 10-szeres hígítású dohányfüsttel telített tápoldatban inkubált sejtek
5. 20x: 20-szoros hígítású dohányfüsttel telített tápoldatban inkubált sejtek
6. 30x: 30-szoros hígítású dohányfüsttel telített tápoldatban inkubált sejtek
7. 50x: 50-szeres hígítású dohányfüsttel telített tápoldatban inkubált sejtek

A 24 lyukú tenyésztő lemezre lyukanként 10^6 sejtet vittünk fel, majd a megfelelő médiumban tartottuk 48 órán keresztül. Ezután elvégeztük az áramlási citometriás mérést. A kísérleteket 3 alkalommal ismételtük, minden esetben 3 párhuzamos mintán (összesen 9 minta minden egyes dohányfüsthígításhoz).

A kísérletekhez RPMI 1600 tápoldatot használtunk, amely 10%-os borjúsérumot (FCS), 2 mM L-glutamint, 100 IU/ml penicillint, 100 µg/ml gentamicint is tartalmazott. A sejteket 37°C-os 5% CO₂-t tartalmazó termosztátban tartottuk.

5.2.3. PBMC izolálás

A perifériás vért heparinos vérvételi csőbe vettük le, majd 2:1 arányban hígítottuk fel RPMI-vel. Grádienst készítettünk ¼ rész Histopaque 1083 (Sigma Aldrich St. Louis, Egyesült Államok) és ¾ rész hígított vérből. Centrifugálás után leszívtuk a lymphocytagyűrűt. RPMI-ben való kétszeri mosás után a sejtüledéket RPMI-ben reszuszpendáltuk.

5.3. ELISA vizsgálatok (szérum PAD4, ACPA és IgA RF)

A Pulmonológia Klinikáról származó betegsérumok PAD4 szintjét Chang és mtsai. munkája alapján ELISA módszerrel határoztuk meg (154). A szérumminták (1:10-es hígítás 0,05 M-os karbonát-bikarbonát pufferben, pH 9,6) fehérje tartalmát erősen kötő microplate-re (Greiner-Bio-One GmbH, Frickenhausen, Németország) kötöttük ki egy éjszakás inkubálással 4°C-on. 5%-os zsírszegény tejjel való blokkolás után (1 óra, 37°C) a lemezt poliklonális egér anti-PAD4 ellenanyaggal (1:500-as hígítás PBS-0,1% Tween oldatban) (Abnova Corporation, Taipei, Tajvan) inkubáltuk egy éjszakán át 4°C-on. Mosás után tormaperoxidázzal konjugált poliklonális anti-egér IgG ellenanyaggal (1:500-as hígítás PBS-0,1% Tween oldatban; Dako, Glostrup, Dánia) inkubáltuk 1 órán

át 37°C-on. Az ellenanyag-kötődést tetrametil-benzidinnel (10mg/l koncentráció; 0,1M-os pH 5,5 acetát pufferben hígítva, 30%-os H₂O₂ hozzáadásával; Sigma Aldrich, St. Louis, Egyesült Államok) jelenítettük meg (1 óra, szobahőmérséklet). A reakciót 4N-os kénsavval állítottuk le. Az abszorbanciát 450 nm-es és 620 nm-es hullámhosszon mértük (Labsystems Multiskan MS spektrofotométer, Vantaa, Finnország). Mivel a PAD4 normál szintje nem ismert, ezért a betegek PAD4 értékeit az egészséges kontrollcsoporthoz hasonlítottuk, azaz az egészséges nem dohányos kontrollokban mért átlag + 2-szeres szórás feletti értékeket tekintettük emelkedettnek.

A szérum ACPA szintet kétféle módszerrel határoztuk meg: CCP kittel (anti-CCP titer) és filaggrin peptidekkel (filaggrin ellenes antitest). Az anti-CCP pozitivitást Immunoscan CCPlus® kittel (Euro-diagnostica, Nijmegen, Hollandia) határoztuk meg a gyártó utasításai szerint (155). A gyártó által megadott határérték 25 U/ml volt.

Vizsgáltuk a szérumok reaktivitását citrullint és azonos aminosavnál arginint tartalmazó filaggrinpeptidekkel is (Ac-TXGRSK(biotin-6-amino-hexanoil)-NH₂ és Ac-TRGRSK(biotin-6-amino-hexanoil)-NH₂, X=citrullin, R=arginin), melyeket az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport szintetizált (156). Az ELISA módszert az ELTE Immunológiai Tanszéke dolgozta ki. A citrullin vagy arginin tartalmú filaggrinpeptidet (1 µg/ml PBS-ben oldva) erősen kötő microplate-re (Greiner-Bio-One GmbH, Frickenhausen, Németország) kötöttük NeutrAvidinnel (5 µg/ml PBS-ben oldva; Thermo Scientific, Waltham, Egyesült Államok) (156). Marha-szérumalbuminnal (Sigma Aldrich, St. Louis, Egyesült Államok) blokkoltuk a lemezeket, majd a vizsgálati alanyok szérumaival (1:400-as hígítás PBS–0,05% Tween oldatban) inkubáltuk egy éjszakán át 4°C-on. Ezután tormaperoxidázzal konjugált nyúl antihumán poliklonális IgG antitesttel (1:2000-es hígítás; Dako, Glostrup, Dánia) inkubáltuk a lemezeket 1 órán át 37°C-on, és az ellenanyag-kötődést tetrametil-benzidinnel (10 mg/ml-es 0,1 M pH5,5 acetát pufferben oldva 30%-os H₂O₂ hozzáadásával; Sigma Aldrich, St. Louis, Egyesült Államok) jelenítettük meg 5 perc alatt szobahőmérsékleten. A reakciót 4N-os kénsavval állítottuk le. Az abszorbanciát 450 nm-es és 620 nm-es hullámhosszon mértük (Labsystems Multiskan MS spektrofotométer, Vantaa, Finnország).

A betegszérumok RF-pozitivitását is vizsgáltuk. Amiatt választottuk az IgA típusú RF-et, mert az IgA antitestek elsősorban a mucosa/bronchus asszociált szövetekben termelődnek, és a pulmonológiai betegek vizsgálata kapcsán kézenfekvőnek tűnt az IgA

típus meghatározása. Ráadásul leginkább az IgA RF mutat összefüggést a dohányzással RA-ban (26). A mérést AutostatTM II RF IgA kittel (Hycor Biomedical Ltd., Edinburgh, Egyesült Királyság) végeztük a gyártó utasításai szerint. A gyártó által megadott határérték 30 U/ml volt.

5.4. CK enzimaktivitás mérése

Hat PM/DM-es beteg és hat egészséges kontroll vérplazmáján vizsgáltuk a CK enzimaktivitást differenciálcentrifugálást követően. Feltételeztük, hogy a PM/DM-es betegek vérplazmájában izom eredetű, CK enzimet tartalmazó MV-k lehetnek jelen. Az izomgyulladás miatt a károsodott izmokból nagy mennyiségű CK enzim szabadul fel, esetleg MV-k formájában is. A vérminták 5ml-es térfogatát 300 g-n 10 percig centrifugáltuk a sejtek ülepítése céljából. Majd a felülúszót 16500g-n 20 percig centrifugáltuk, így a nagyobb EV-eket kicsaptuk. Ezt követően 2,5 ml felülúszót 9 ml-re hígítottunk, és 800 nm-es szűrőn átszűrtük, ezáltal MV-ben gazdag szuszpenzióhoz jutottunk. A 8,5 ml szuszpenziót 100 000g-n 60 percig ultracentrifugáltuk, és a képződő csapadékot 200 µl 1%-os, pH7,4-es PBS-ben reszuszpendáltuk. A CK-aktivitás meghatározásához az enzimet ki kellett nyerni az MV-kből. Erre kétféle módszer állt rendelkezésünkre: detergensekkel a membrán feloldása, ill. ismételt fagyasztás-felolvasztás módszerével a membrán feldarabolása. Előzetes kísérleteink során a normál és magas CK tartalmú próbaszérumok (egyéb betegségben szenvedő betegek szérummintái) különböző detergensekkel (Triton-X 100 és Tween 20) történő kezelése kis mértékben csökkentette a mért enzimaktivitást, a fagyasztás-felolvasztás azonban nem befolyásolta azt, tehát ez alapján feltételezhetően az MV-gazdag szuszpenzióban sem. Ez alapján választottuk az utóbbi módszert az MV-k fragmentálásához. Öt perc fagyasztás -70°C-on és 5 perc inkubálás 36,5°C-on háromszor ismételve. A CK enzimaktivitást kinetikus fotometriai módszerrel határoztuk meg Advia 1650 kémiai automatával IFCC (International Federation of Clinical Chemistry) ajánlás szerint gyártott reagenssel a PM/DM-es betegek és egészséges kontrollok minden centrifugafrakciójában (eredeti minta, 300g és 16500g centrifugálás után képződött felülúszó, szűrés utáni szuszpenzió, 100 000g ultracentrifugálás után képződött felülúszó és a reszuszpendált csapadék). A méréseket a váci Jávorszky Ödön Kórház Központi Laboratóriumában végeztük. A kalibrált mérési minimum 5 U/l.

5.5. Áramlási citometria

5.5.1. Dohányfüsttel kezelt sejtek

A dohányfüsttel kezelt sejteken TNFR1 és 2, valamint annexin V festést végeztünk. A sejteket lecentrifugáltuk, majd mosás után 10^6 sejtet PBS-ben (TNFR1 és 2 jelölés), illetve 10x annexinbufferben (annexinjelölés) hígított festékekkel (TNFR1-FITC, TNFR2-R-PE, Annexin V-FITC, Invitrogen, Egyesült Államok) jelöltünk 20 percig szobahőmérsékleten sötétben. Mosás után 2%-os paraformaldehid oldatban fixáltuk a sejteket, és ezt követően két órán belül elvégeztük az áramlási citometriás mérést. Festetlen és festett kezeletlen sejteket használtunk kontrollként. A mintákat 20 mW-os argon (emisszió 488 nm-en) és 16 mW-os hélium-neon (emisszió 634 nm-en) lézerrel felszerelt FACSCALibur áramlási citométeren (BD Biosciences, New Jersey, Amerikai Egyesült Államok) mértük le. Az értékeléshez CellQuestPro szoftvert (BD Pharmingen, New Jersey, Amerikai Egyesült Államok) használtunk. Mivel a sejtkeléseket 3 különböző alkalommal végeztük (minden alkalommal 3 párhuzamos sejt mintán), ezért a FACS-mérésből (Fluorescence-activated cell sorting, áramlási citometria) nyert adatok összehasonlíthatósága érdekében minden esetben a változás mértékével számoltunk.

5.5.2. Mikrovezikulák

Hús PM/DM-es és hús egészséges kontroll plazmamintáját használtuk fel az áramlási citometriához egyszeri felolvasztás után. 300 μ l plazmamintához 100-100 μ l fluorokróm festéket (FITC, PE, PerCP) adtunk, és sötétben szobahőmérsékleten 20 percig inkubáltuk. A T- és B-sejt, illetve monocyta eredetű MV-eket FITC-, PE- és PerCP-konjugált CD3, CD19 és CD14 ellenes egér antihumán monoklonális antitesttel (BD Pharmingen, New Jersey, Amerikai Egyesült Államok) jelöltük. Ezt követően az összes mintát egyszerre, egy készülékbeállítással mértük le FACSCALibur áramlási citométeren. A mérésstartomány beállításához (200-1000 nm) 1 μ m-es mikrogyöngyöket (Sigma-Aldrich, St. Louis, Amerikai Egyesült Államok) használtunk (157): ezen események képezték az MV kapu felső részét. Az áramlási citométer 200 nm-es filtert tartalmaz, ezért ez az érték számított a mérési minimumnak. Minden minta esetében az eseményszámot 30 másodpercig számoltuk. A háttérzaj csökkentésére a festetlen minta eseményeit nátrium-klorid oldathoz hasonlítottuk az FSC (forward scatter) - SSC (side scatter) diagrammon, és a festetlen minta pozitív eseményeire kapuztunk. A festett

minták mérése ezen kapun belül történt. Rögzítettük a CD3, CD14 és CD19 pozitív eseményeket. Az FL1-FL2, FL2-FL3, FL1-FL3 diagrammokon a betegekben mért, kapuzott események számát az egészséges kontrollok eseményeihez hasonlítottuk. Az értékelést CellQuestPro szoftverrel (BD Pharmingen, New Jersey, Amerikai Egyesült Államok) végeztük.

5.6. Immunhisztokémia

A tüdődaganatban szenvedő betegek vizsgálata során 4 µm vastag TMA sorozatmetszeteket használtunk fel az immunhisztokémiához (CK7, PAD4 és citrullinált proteinek). A TMA metszeteken az adott beteg mintái kétszeresen-háromszorosan voltak jelen. Az expressziót NovoLink Polymer kittel (Novocastra/LEICA, Newcastle Upon-Tyne, Egyesült Királyság) jelenítettük meg. Az antigénfeltárás céljából a deparaffinezett TMA metszeteket ~100°C-on forraltuk melegítettük Tris-EDTA pufferben (pH 9) 40 percig kuktában. Az endogén peroxidázokat 0,5%-os H₂O₂-metanol oldattal blokkoltuk 15 percig. Majd a metszeteket Protein Block reagenssel inkubáltuk 10 percig, és azután monoklonális egér antihumán CK7 (1:500-as hígítás; Novocastra/LEICA, Newcastle Upon-Tyne, Egyesült Királyság), antihumán PAD4 (1:400-as hígítás; Sigma Aldrich, St. Louis, Egyesült Államok) vagy anticitrullin (1:4000-es hígítás; Abnova Corporation, Taipei, Tajvan) antitesttel jelöltük. Ezt követően a metszeteket Post Primary Block reagenssel inkubáltuk 30 percig, majd NovoLinkTM Polymerrel szintén 30 percig. Az inkubációk között a metszeteket TBS-ben mostuk 2x5 percig. A peroxidázaktivitást DAB-H₂O₂ oldattal jelenítettük meg, majd hematoxilinnel felülfestettük a metszeteket, és Faramounttal rögzítettük a tárgylemezen (Dako, Glostrup, Dánia).

Az immunfestett TMA-kat azután Pannoramic Scan szoftverrel (3DHISTECH, Budapest, Magyarország) digitalizáltuk 20x objektívvel (NA=0,83). A CK7, PAD4 és citrullinált fehérje expresszió mértékét szemikvantitatív pontrendszerrel értékeltük (158, 159). Az immunhisztokémiai pontszám két komponens szorzatából tevődött össze: festődési intenzitás (0: negatív festődés, 1: enyhe festődés, 2: közepes festődés, 3: erős festődés) és a pozitív sejtek százalékos aránya (0: 0%, 1: <10%, 2: 10-50%, 3: 50-80%, 4: >80%). A festődés mértéke alapján 4 alcsoportot különítettünk el: 0 pont: nincs expresszió, 0,5-4,4 pont: gyenge kifejeződés, 4,5-8,4 pont: közepes kifejeződés, 8,5-12

pont: erős kifejeződés (20). Minden betegről 2-3 mintát pontoztunk, és az átlagolt értékeket használtuk fel statisztikai elemzéshez. A kiértékelés során felnőtt tonsilla szolgált kontrollként, illetve egy adenocarcinomás beteg nyirokcsomója belső kontrollként.

5.7. Elektronmikroszkópia

A PM/DM-es betegekből származó MV-eket elektronmikroszkópiával is megvizsgáltuk. A 100 000g-s ultracentrifugálással nyert csapadék elektronmikroszkópos feldolgozása után nem sikerült megfelelő minőségben megjeleníteni az MV-eket, ezért a 16500 g-s centrifugálással nyert csapadékot is vizsgáltuk, és ily módon jobb képminőséghez jutottunk. A csapadékot szobahőmérsékleten 60 percig fixáltuk 4%-os paraformaldehiddel (0,01M-os foszfát pufferben [PB], pH7,4). Majd kimostuk a fixálót foszfátpufferrel, és 1%-es OsO₄-dal (Taab; Aldermaston, Berks, Egyesült Királyság) fixáltuk 30 percig. Desztillált vízzel öblítettük, és felszálló alkoholsorban dehidráltuk, majd 2%-os urán-acetáttal (70%-os etanolban) fixáltuk 30 percig. Taab 812-be (Taab; Aldermaston, Berks, Egyesült Királyság) ágyasztuk, és egy éjszakán át 60°C-on polimerizáltuk. Ultravékony szeleteket (60 nm) vágunk, és Hitachi 7100 transzmissziós elektronmikroszkóppal (Hitachi Corporation, Japán) vizsgáltuk.

5.8. Statisztika

A különböző csoportok közötti különbségeket Mann–Whitney-teszttel, Kruskal–Wallis egymintás varianciaanalízissel (majd Dunn-féle posthoc teszttel) és Fischer-teszttel elemeztük. Mivel a PAD4 normál szintje nem ismert, ezért a pulmonológiai betegek értékeit a nem dohányos kontrollokéihoz hasonlítottuk, azaz az egészséges nem dohányos csoportban mért átlag+2-szeres szórás feletti PAD4 értékeket tekintettük emelkedettnek. A klinikai és laboratóriumi paraméterek, valamint a szövettani pontszám összefüggéseit Spearman-féle rangkorrelációs teszttel vizsgáltuk. Továbbá lineáris regressziószámítást végeztünk a korreláló MV paraméterek között. A 0,05 alatti p értéket tekintettük szignifikánsnak. Az adatokat átlag±SEM tüntettük fel.

6. EREDMÉNYEK

6.1. A dohányzás–citrullináció–ACPA kapcsolat vizsgálata

6.1.1. A citrullinált fehérjék, a CK7 és a PAD4 szöveti festődése

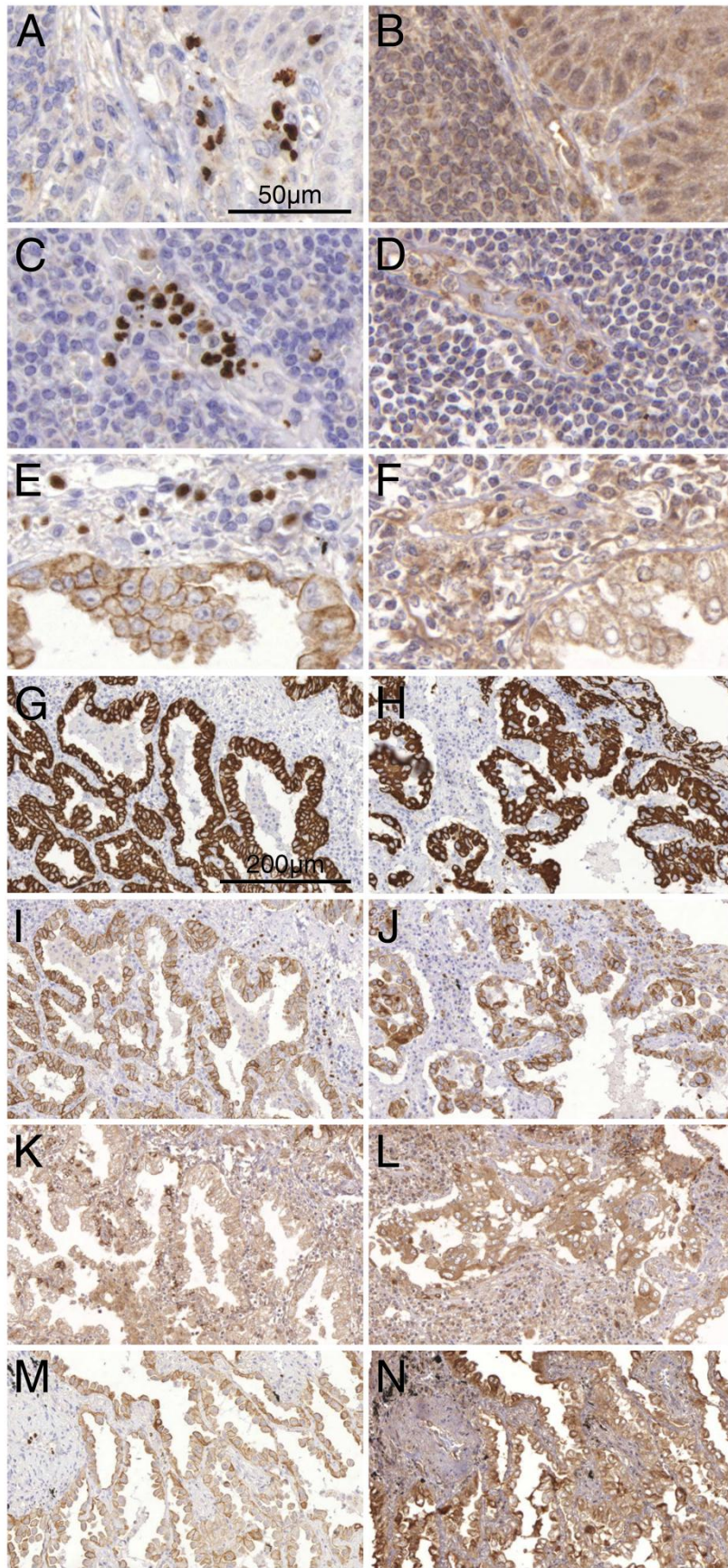
A tüdőbetegek mintáin végzett kísérleteink első részében szöveti szinten vizsgáltuk a citrullinált fehérjék és a citrullinációért felelős enzim jelenlétét. Az expressziós mintázatot a dohányzás szerint értékeltük, hogy megtudjuk, a dohányzás valóban befolyásolja-e a tüdőszövet citrullinációját.

6.1.1.1. PAD4 és a citrullinált fehérjék lokalizációja

A kontrolltonsillában a kapillárisokban látható granulocyták festődtek PAD4-re (nukleáris festődési mintázat) (14. ábra A). A daganatos beteg nyirokcsomójában szintén nukleárisan festődő, PAD4 pozitív granulocytákat láttunk az erekben (14. ábra C). A daganatos sejtekre erőteljes PAD4 kifejeződés volt jellemző, bár inkább citoplazmatikus lokalizációt találtunk, illetve a daganatot infiltráló monocytákban/makrofágokban nukleáris PAD4 festődést láttunk (14. ábra E).

A teljes kontrolltonsilla citrullinált proteineket tartalmazott: az immunsejtek és a hámréteg egyaránt festődött (citoplazmatikus és nukleáris) (14. ábra B). Az adenocarcinomás betegből származó nyirokcsomó kevésbé mutatta a citrullináció jeleit, és inkább nukleáris festődés mutatkozott (14. ábra D). A daganatos sejtek intenzív citoplazmatikus festődést mutattak a citrullinált fehérjékre, de egy enyhe alapfestődés a környező, nem daganatos szövetekben is látszódott (14. ábra F).

A CK7 a tüdődaganat ismert markere. Egy kivételével minden daganatminta kifejezte a CK7-et. Meglepő módon a citrullinált fehérjék festődési mintázata megegyezett a CK7-tel (14. ábra G és I, H és J), és a citrullináció alapján minden esetben elkülönült a daganatos szövet a környező, egészséges részeketől - itt minimális citrullinációt tapasztaltunk (14. ábra I, J). A citrullináló enzim, azaz a PAD4 expressziója szintén megegyezett a CK7-ével (14. ábra G és K, H és L), és minden esetben megfestette a daganatos sejteket, a környező szövetek viszont nem fejezték ki a PAD4-et (14. ábra K, L) – szemben a citrullinált fehérjék minimális alapfestődésével.



14. ábra A CK7, PAD4 és a citrullinált fehérjék immunhisztokémiai vizsgálata. A-F: 400x nagyítás, melynél jól látható a PAD4 (A, C, E) és a citrullinált fehérjék (B, D, F) pontos lokalizációja a kontroll tonsilla (A, B) és a nyirokcsomó (C, D), valamint a tüdődaganat (E, F) konszekutív metszeteiben. G-N: 100x nagyítás, mely alkalmas a nem dohányos (G, I, K) és dohányos (H, J, L) adenocarcinomás, illetve laphámrákos (M, N) beteg CK7 (G, H), PAD4 (I, J, M) és citrullinált fehérje (K, L, N) mintázatának összehasonlítására.

A: tonsilla granulocytáinak nukleáris PAD4 festődése; **B:** citrullinált fehérjék a tonsillában; **C:** nyirokcsomó granulocytáinak PAD4 festődése; **D:** citrullinált fehérjék a nyirokcsomóban; **E:** PAD4 citoplazmatikus festődése a tüdődagاناتos sejtekben; **F:** citrullinált fehérjék a dagاناتos sejtekben; **G:** CK7 festődés nem dohányos tüdőrákos beteg mintáján; **H:** CK7 festődés dohányos tüdődagاناتos beteg mintáján; **I:** PAD4 festődés nem dohányos tüdőrákos beteg mintáján; **J:** PAD4 festődés dohányos tüdődagاناتos beteg mintáján; **K:** citrullináció nem dohányos tüdőrákos beteg mintáján; **L:** citrullináció dohányos tüdődagاناتos beteg mintáján; **M:** laphámrák PAD4 festődése; **N:** citrullináció laphámrákban.
Forrás: Baka Zs. és mtsai. (160)

6.1.1.2. Kifejeződés mértéke

A kifejeződés mértékét az immunhisztokémiai pontszám alapján 4 csoportba osztottuk: nincs expresszió (0), gyenge (0,5-4,4), közepes (4,5-8,4) és erős (8,5-12) kifejeződés (16. táblázat). A citrullinált fehérjék és a PAD4 enzim minden dagاناتmintában (a CK7 negatívban is) megjelent (16. táblázat). A citrullinált fehérjék esetében ritkán találoztunk gyenge expresszióval: az adenocarcinomás csoportban és nem kissejtes tüdőrákban 12,9%-ban és 11,9%-ban, laphámrákban és kissejtes tüdőrákban egyáltalán nem (16. táblázat). A PAD4 enzimmél gyakrabban figyeltünk meg gyenge kifejeződést: a laphámrákos minták 60%-ában (szemben a citrullinációval), adenocarcinómában 37,1%-ban. A minták nagy része közepes és erős expressziót mutatott a citrullinált fehérjék esetében (adenocarcinómánál: 41,9-45,2% arányban), és meglepő módon kissejtes tüdőrákban és laphámrákban minden TMA erősen festődött (16. táblázat). Hasonlóan a PAD4 kifejeződése is nagyobb részt közepes és erős volt, bár gyakrabban találoztunk közepes festődést a citrullinációval összehasonlítva (16. táblázat). A dohányosok és nem dohányosok PAD4 és citrullin mintázata azonos volt (16. táblázat). A CK7 expressziója egyaránt követte a citrullinált fehérjék és a PAD4 festődési eloszlását.

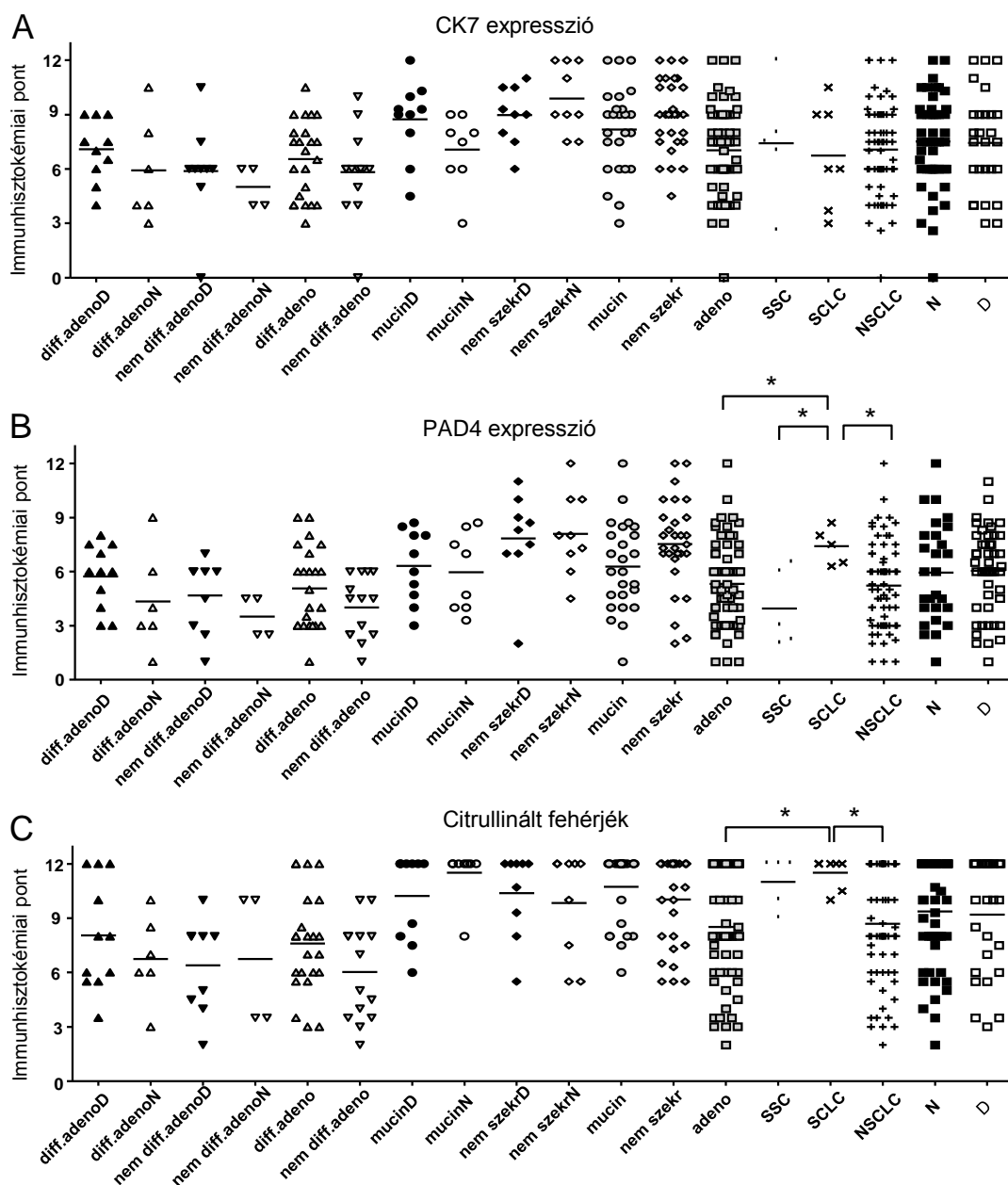
16. táblázat A daganatalcsoportok expressziós mintázata

Daganatesoport és festődés		Nincs expresszió (0)	Gyenge expresszió (0,5-4,4)	Közepes expresszió (4,5-8,4)	Erős expresszió (8,5-12)
adeno-carcinoma	CK7	1,6%	16,1%	50,0%	32,3%
	PAD4	0%	37,1%	50%	12,9%
	CIT	0%	12,9%	41,9%	45,2%
laphámrák	CK7	0%	20,0%	60,0%	20,0%
	PAD4	0%	60,0%	40,0%	0%
	CIT	0%	0%	0%	100%
kissejtes tüdőrák	CK7	0%	28,6%	28,6%	42,8%
	PAD4*	0%	0%	80,0%	20,0%
	CIT	0%	0%	0%	100%
nem kissejtes t.	CK7	1,5%	16,4%	50,7%	31,4%
	PAD4	0%	38,8%	49,3%	11,9%
	CIT	0%	11,9%	38,8%	49,3%
Dohányos	CK7	2,0%	7,8%	49,0%	41,2%
	PAD4	0%	24,5%	61,2%	14,3%
	CIT	0%	5,9%	33,3%	60,8%
Nem dohányos	CK7	0%	22,2%	40,7%	37,1%
	PAD4	0%	33,3%	44,5%	22,2%
	CIT	0%	11,1%	25,9%	63,0%

6.1.1.3. A citrullinált fehérjék, a PAD4 és a CK7 immunhisztokémiai pontszámainak statisztikai elemzése és összehasonlítása

A citrullinált fehérjék festődése és a CK7 kifejeződés - ahogy láttuk a fénymikroszkópos felvételeken - egybeesett a daganatos mintákban (14. ábra G és K, H és L), továbbá immunhisztokémiai pontszámuk is korrelált egymással (15. ábra A és C) ($p < 0,0021$, $r = 0,2978$).

A PAD4 enzim expressziója szintén egybeesett a CK7 festődéssel (14. ábra G és I, H és J), és immunhisztokémiai pontszámuk korrelált egymással ($p < 0,0001$, $r = 0,5397$) (15. ábra A és B). Bár a PAD4-é és a citrullinált fehérjéké nem korrelált.



15. ábra A daganatos alcsoportok immunhisztokémiai pontszáma a CK7, PAD4 és citrullinált fehérjék szerint. A PAD4 immunhisztokémiai pontszáma szignifikánsan magasabb volt a kissejtes tüdőrákban a nem kissejtes tüdőrákhoz ($p=0,0232$), az adenocarcinomához ($p=0,0291$) és a laphámrákhoz ($p=0,0159$) képest. A citrullinált fehérjék immunhisztokémiai pontszáma szignifikánsan magasabb volt a kissejtes tüdőrákban az adenocarcinomához ($p=0,0175$) és a nem kissejtes tüdőrákhoz képest ($p=0,0230$).

Rövidítések: D dohányos, N nem dohányos, diff.adeno differenciált adenocarcinoma, nem diff.adeno differenciálatlan adenocarcinoma, mucin mucintermelő daganat, nem szekr nem szekretáló tumor, SSC laphámrák, SCLC kissejtes tüdőrák, NSCLC nem kissejtes tüdőrák.

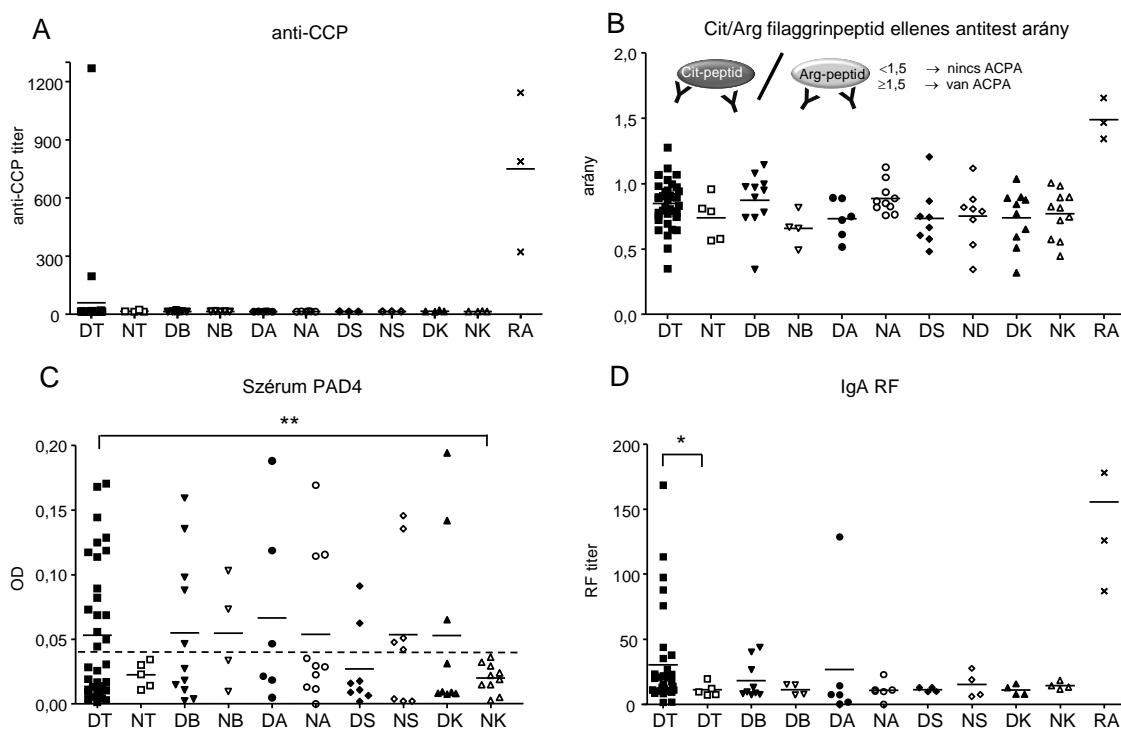
Forrás: Baka Zs. és mtsai. (160)

A citrullinált fehérjék, a CK7 és a PAD4 expresszióját tükröző immunhisztokémiai pontszám alapján nem találtunk szignifikáns különbséget a dohányos és nem dohányos tüdődaganatos betegek között (14. ábra G és H, I és J, K és L; 15. ábra).

A PAD4 immunhisztokémiai pontszáma szignifikánsan magasabb volt a kissejtes tüdőrákban a nem kissejtes tüdőrákhoz ($p=0,0232$), az adenocarcinomához ($p=0,0291$) és a laphámrákhoz ($p=0,0159$) képest (15. ábra B). Hasonló módon a citrullinált fehérjék immunhisztokémiai pontszáma szignifikánsan magasabb volt kissejtes tüdőrákban a nem kissejtes tüdőrákhoz ($p=0,0230$) és az adenocarcinomához ($p=0,0175$) képest (15. ábra C). Ismert a PAD4 expresszió ösztrogénfüggése (161), ezért a PAD4 és a citrullinált fehérjék immunhisztokémiai pontszámát a két nem között is összehasonlítottuk, de nem találtunk szignifikáns különbséget.

6.1.2. Szérum PAD4, ACPA és IgA RF

Miután megvizsgáltuk szöveti szinten a citrullinációt és a citrullináló enzim kifejeződését, a betegek és egészséges kontrollok szérummintáiban is megmértük a PAD4- és ACPA-szintet. A kapott eredményeket a dohányzási szokás szerint értékeltük, hogy választ kaphassunk, hogyan befolyásolja a dohányzás a citrullinációt és az ACPA-termelést.



16. ábra anti-CCP, filaggrinpeptid ellenes antitest arány, PAD4 és IgA RF ELISA. A. Két dohányos tüdődagados betegnél találtunk emelkedett anti-CCP szintet. B. A citrullin és arginin tartalmú filaggrinpeptid ellenes antitestek aránya minden csoportban 1,5 alatt volt, a két anti-CCP pozitív dohányos tüdőrákos betegen is, ami az ACPA válasz hiányát jelzi. Az RA-s betegek pozitív kontrollként szolgáltak. C. A dohányos tüdőrákos betegek PAD4 szintje szignifikánsan magasabb volt a nem dohányos egészséges kontrollokkal összehasonlítva ($p=0,007$). D. A dohányos tüdődagados betegeknél szignifikánsan magasabb volt az IgA RF-szint a nem dohányos betegeknél összehasonlítva. Forrás: Baka Zs. és mtsai. (160)

A nem dohányos egészséges kontrollokban mért PAD4 átlag+2-szeres szórás feletti értékeket ($OD > 0,042$) tekintettük emelkedettnek (lsd. szaggatott vonal 16. ábra C része). A dohányos tüdődaganatos betegek jelentős hányadában (a 35-ből 16 betegnél, azaz 46%-ban) tapasztaltunk emelkedett PAD4 szintet ($OD > 0,042$), viszont a nem dohányos tüdődaganatos betegekben a PAD4 a nem dohányzó egészséges kontrollokhoz hasonlóan a normál tartományban ingadozott (16. ábra C), bár szignifikánsan nem tért el a dohányos daganatos betegektől. A dohányos tüdőrákos betegek PAD4 szintje szignifikánsan magasabb volt a nem dohányos egészséges kontrollokkal összehasonlítva ($p=0,007$) (16. ábra C). Hasonló különbségeket nem tapasztaltunk a nem dohányosok és dohányosok között az asthmás, COPD-s és sarcoidosisos betegek esetében (16. ábra C). Vizsgáltuk a PAD4 szintjét a két nem között is, de nem detektáltunk szignifikáns eltérést.

Az ACPA-kat először az anti-CCP titerrel határoztuk meg. A legtöbb beteg és egészséges kontroll anti-CCP negatív volt, kivéve két dohányos tüdődaganatos beteget (5,9%) (16. ábra A). Mindkét betegnél magas volt az anti-CCP titer (196 és 1270 U/ml). Kórtörténetükben RA vagy más autoimmun betegség nem szerepelt.

Az ACPA-kat filaggrin ellenes antitestekkel is meghatároztuk. Lemértük a citrullin tartalmú és a nem módosított, arginin tartalmú filaggrinpeptid ellen képződött antitestek szintjét, majd a két érték hányadosát képeztük (16. ábra B). A 1,5 alatti hányados azt jelzi, hogy nincs citrullinált fehérje (filaggrin) ellenes immunválasz, míg az RA-ban megfigyelhető 1,5-2 körüli érték az ACPA-képzést mutatja (16. ábra B). Az antitesthányados a különböző csoportokban 1 körül volt, és megjegyzendő, hogy a két anti-CCP pozitív tüdődaganatos betegben is. Egyedül a pozitív kontrollként szolgáló 3 RA-s betegben láttuk a várt, 1,5 körüli hányadosot (16. ábra C).

A legtöbb nem daganatos beteg IgA RF negatív volt, azonban néhány dohányos COPD-s beteg mintájában (kilencből két beteg) enyhén emelkedett értéket mértünk (16. ábra D). A dohányos tüdődaganatos betegekben jelentős arányban (34-ből 8-ban, azaz 23,5%-ban) tapasztaltunk magas IgA RF-titert (35-168 U/ml), amely szignifikánsan különbözött ($p=0,049$) a nem dohányos tüdődaganatos betegektől, ahol minden minta IgA RF negatív volt (16. ábra D).

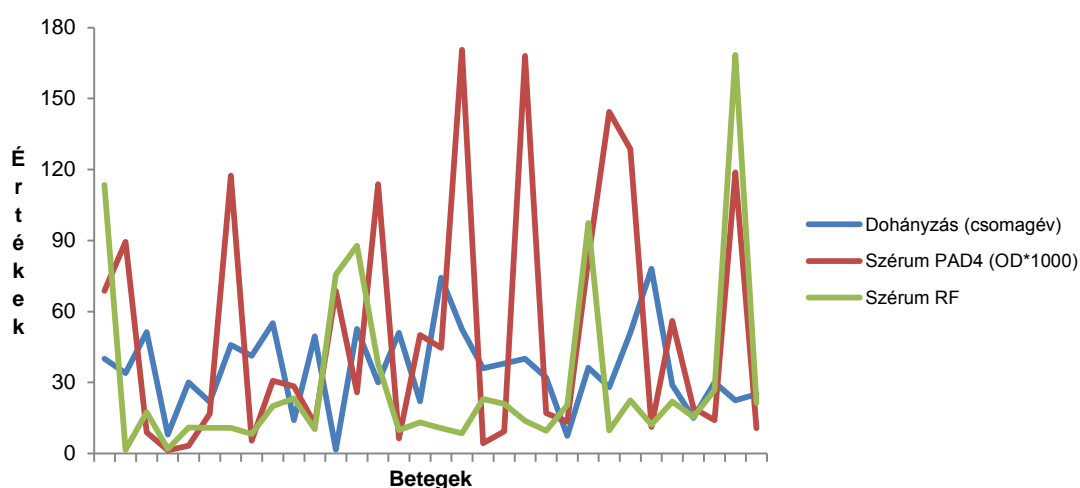
6.1.3. Betegkérdőív, a klinikai és laboratóriumi paraméterek és az immunhisztokémiai pontszám összefüggése a tüdődaganatos betegekben

A dohányos tüdődaganatos betegek szignifikánsan többet dohányoztak ($p=0,006$; DK: 21 ± 9 csomagév, DT: 36 ± 3 csomagév) az egészséges dohányosokkal összehasonlítva (13. táblázat), és a tüdőrákos betegek nagy része dohányos volt (88%). A többi dohányos csoport dohányzási intenzitásában nem láttunk szignifikáns eltérést (DS: 15 ± 6 csomagév, DA: 13 ± 5 csomagév, DB: 28 ± 6 csomagév) (13. táblázat).

A kérdőívek áttekintése alapján a megkérdezettek nagy része vagy nem írta be az alkoholfogyasztási szokásait, vagy igen minimális mennyiségről számolt be, ami nem tűnt reálisnak, ezért az alkoholfogyasztást nem vettük bele a statisztikai számításokba. Ennek háttérében feltételezésünk szerint az alkoholfogyasztás negatív megőrző hatása állhatott.

A 42 tüdődaganatos beteg közül 8 (19%) számolt be szervesvegyület- vagy azbesztexpozícióról, és 21 (50%) betegnél szerepelt a családi anamnézisben bármilyen daganat (tüdő, gyomor-bél rendszeri, agyi, urogenitalis), ezzel szemben az egészséges 21 kontrollból 2 (10%) jelentett expozíciót és 7-nél (33%) szerepelt daganat a családban (13. táblázat).

A szérums PAD4, IgA RF szint és a dohányos csomagév nem korrelált egymással a különböző betegcsoportokban. A magas anti-CCP, a magas PAD4 és a magas RF szint, valamint a kifejezett dohányzás nem társult egymáshoz a betegekben (17. ábra).



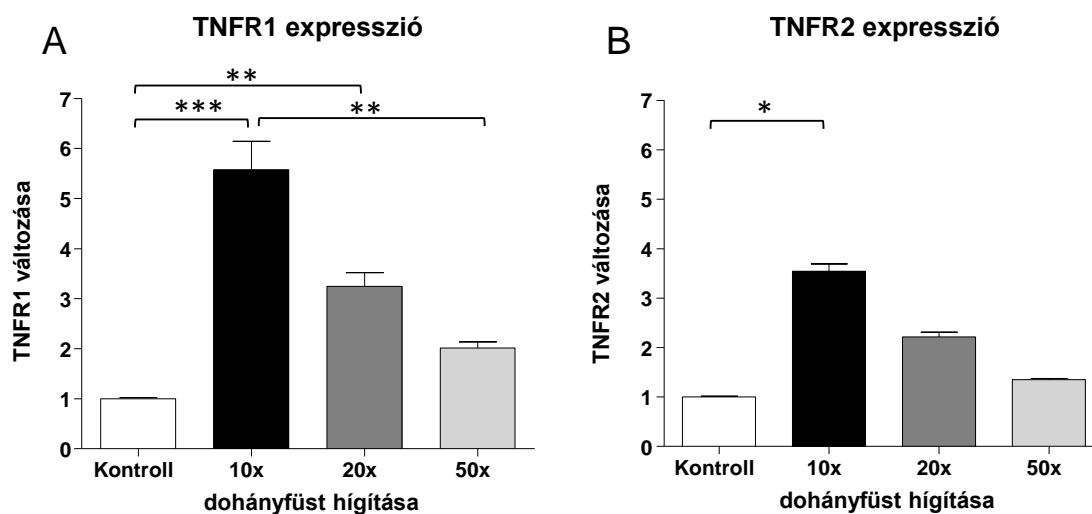
17. ábra A dohányzás intenzitása (csomagévben megadva), a szérums PAD4 (1000x érték ábrázolva) és a szérums IgA RF ábrázolása betegenként.

A szérumban mért értékek (RF és PAD4), a dohányzás intenzitása (csomagév) és az immunhisztokémiai pontszám (PAD4, CK7 és citrullinált fehérjék) nem korreláltak egymással a 13 tüdődagánatos betegben sem, akiknél a szérumban mért értékek mellett bronchoszkópos szövetblokkok is rendelkezésünkre álltak.

6.2. Dohányfüst hatása a TNFR expresszióra

Az elnyeletett dohányfüst eredeti, tömény koncentrációjában a sejtek jelentős apoptózisához vezetett, amelyet az annexinestéssel igazoltunk. A füstös médium koncentrációfüggően indukált apoptózist, 5-10x hígítás mellett 5% alatt volt.

A TNFR1-expresszió a dohányfüsttel kezelt sejtekben koncentrációfüggően megemelkedett, és a hígítás függvényében lecsökkent a kontrollt megközelítő értékre. A 18. ábrán a kontrollhoz viszonyított változás mértékét (azaz hányszor nagyobb az expresszió a dohányfüsttel kezelt sejtekben, ha a nem kezelt kontrollé egy egység) tüntettük fel.



18. ábra A TNFR1 (A) és TNFR2 (B) expresszió változása Jurkat-sejteken a dohányfüst koncentrációjának függvényében.

A TNFR1 és 2 expressziója a dohányfüsttel kezelt sejtekben koncentrációfüggően megemelkedett, és a hígítás függvényében lecsökkent a kontrollt megközelítő értékre.

n=9. x tengely: kezeletlen kontroll, 10-szeres, 20-szoros és 50-szeres hígítású dohányfüstös médiummal kezelt sejtek. y tengely: az expresszió növekedésének mértéke az egységnyi kontrollhoz képest. Nem közölt eredmények.

A 10-szeres hígítású dohányfüstös médiumban a TNFR1-expresszió mintegy 5,5-szörösére emelkedett, 20-szoros hígításnál 3-szoros emelkedést tapasztaltunk, míg az 50-szeres hígítás kb. 2-szeres emelkedést okozott (18. ábra A). Szignifikáns eltérést a kezeletlen kontroll és a 10x, 20x hígítású dohányfüsttel kezelt sejtek között találtunk, valamint a 10x és 50x hígítású dohányfüsttel kezelt sejtek között (18. ábra A). Ezzel

szemben a TNFR2-expresszió nem ilyen jelentős mértékben nőtt: a 10x dohányfüsthígításnál átlagosan 3,5x növekedést tapasztaltunk, a 20x hígításnál 2x emelkedést, és az 50x hígításnál a TNFR2 kifejeződése megfelelt a kontrollénak (18. ábra B). Szignifikáns különbséget a kezeletlen kontroll és a 10x hígítású füstös tápoldattal kezelt sejtek között találtunk (18. ábra B).

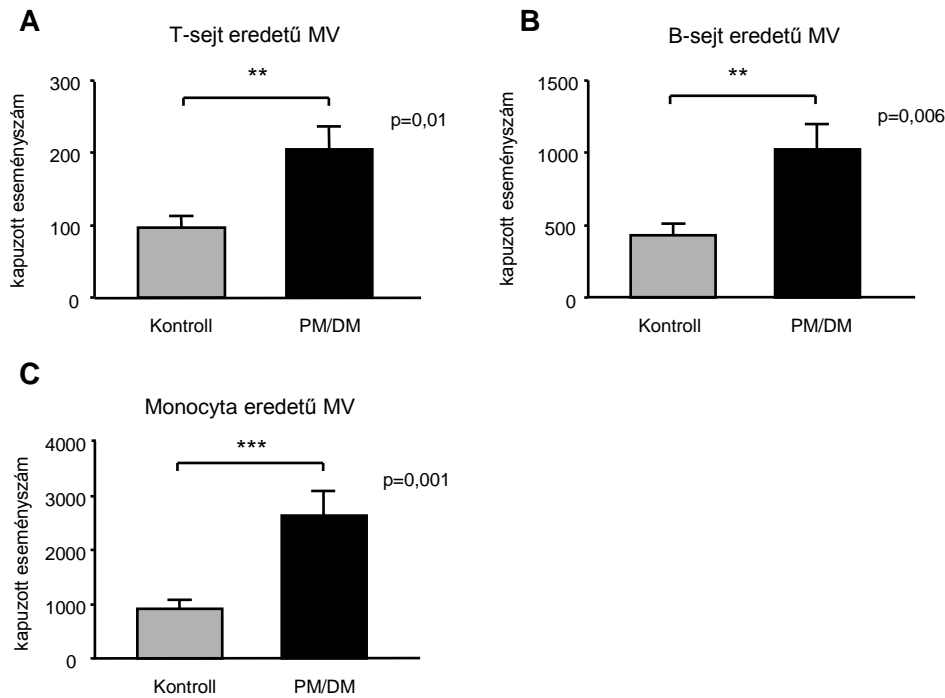
A vizsgálatokat egészséges egyénből származó perifériás vér mononukleáris sejtjein is elvégeztük, és hasonló eredményeket kaptunk.

6.3. Mikrovezikulák

6.3.1. Lymphocyta és monocyta eredetű MV-k

Az általunk használt módszer bár nem teszi lehetővé az abszolút MV-szám meghatározását, reprezentatív képet ad a beteg és egészséges plazmamintákról, hiszen minden mintát egyszerre, egy készülékbeállítással azonos ideig mértünk. Mivel minden minta azonos térfogatát azonos módon festettük a fluorokróm festékkel, és azonos módon mértünk, ezáltal a kapott mérési eredmények alkalmasak arra, hogy a vizsgálati alanyok klinikai és laboratóriumi paramétereivel korreláltassuk azokat.

Az azonos ideig mért CD3 (96 ± 16 vs. 205 ± 29 eseményszám; $p=0,01$), CD14 (910 ± 149 vs. 2639 ± 427 eseményszám; $p=0,001$) és CD19 (428 ± 73 vs. 1025 ± 166 eseményszám; $p=0,006$) pozitív MV-k száma szignifikánsan magasabb volt a PM/DM-es betegekben a kontrollokhöz képest (19. ábra A-C). Tehát eredményeink szerint szignifikánsan több T-sejt, B-sejt és monocyta eredetű MV van jelen a PM/DM-es plazmákban.



19. ábra MV-k megoszlása az egészséges kontrollok és PM/DM-es betegek között. Az azonos ideig mért CD3 (T-sejt eredetű), CD14 (monocyta eredetű) és CD19 (B-sejt eredetű) pozitív MV-k száma szignifikánsan magasabb volt a PM/DM-es betegekben a kontrollokhoz képest.

Forrás: Baka Zs. és mtsai. (43)

6.3.2. CK enzimaktivitást mutató MV-k

Mivel a vérplazmák kezelt betegektől származtak, ezért egy PM/DM-es egyén kivételével a CK enzimaktivitás a normál tartományban mozgott. A 300 és 16500 g-s centrifugálás érdekében nem változtatta az enzimaktivitást, a 800 nm-es szűrés után 3-189 U/l tartományba csökkent le.

Az MV-gazdag, ultracentrifugált csapadékban csak nyomokban tudtuk kimutatni a CK enzimaktivitást mind az egészséges, mind a beteg mintákban (17. táblázat és 21. ábra A). Bár a csapadékról leöntött felülúszóban 2-51 U/L tartományban mértünk enzimaktivitást (17. táblázat), ami azt feltételezi, hogy a csapadékban is kellett volna mérnünk, ha az enzim jelen van az MV-kben.

17. táblázat CK értékek a centrifugálással elválasztott frakciókban

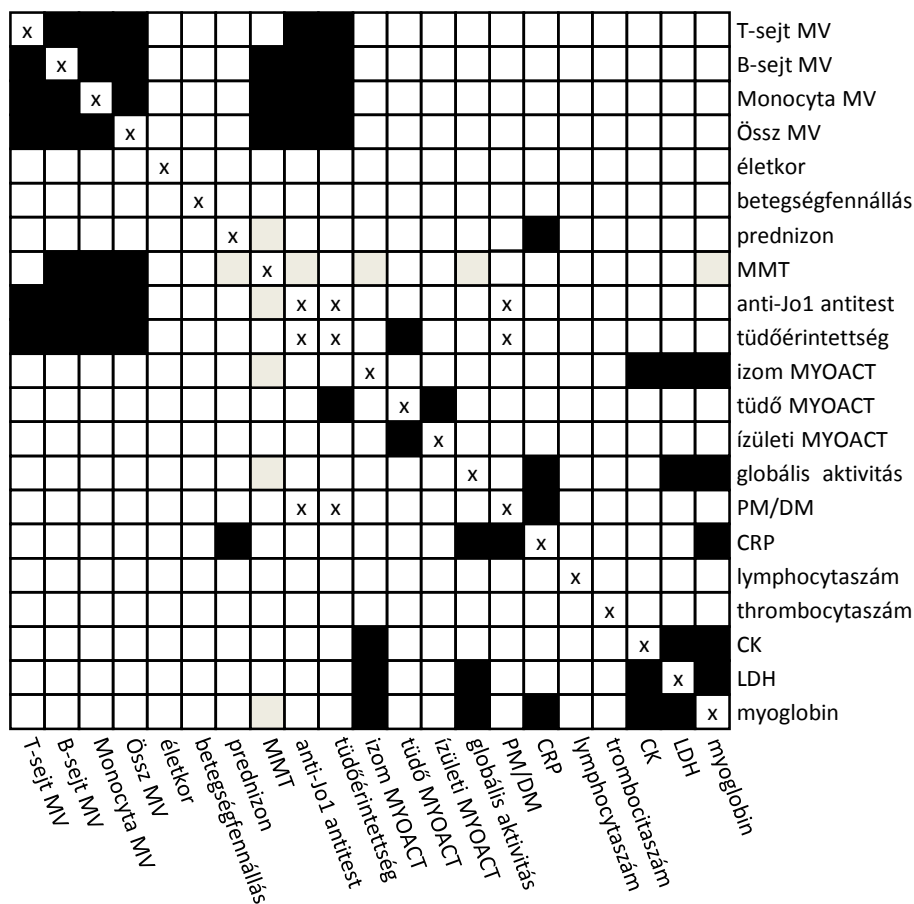
	Eredeti plazma	300g után	16500g után	szűrés után	100 000g felülúszó	100000g reszuszpendált csapadék
Egészséges kontroll	52	53	51	3	3	0
	90	91	90	6	5	0
	68	67	67	13	6	1
	69	66	65	12	7	0
	31	33	32	9	4	1
	105	104	104	15	7	0
PM/DM	53	42	41	9	5	0
	23	20	26	2	2	0
	142	151	147	16	7	0
	89	88	87	16	9	0
	27	27	27	5	3	0
	1114	1066	1085	289	51	2

6.3.3. A klinikai és laboratóriumi paraméterek korrelációja az MV-k számával PM/DM-ben

Az azonos módon és ideig mért MV-szám klinikai (életkor, betegség fennállása, szteroid- és immunszuppresszív kezelés, anti-Jo-1 antitest pozitívitas, tüdőérintettség, globális, izom, tüdő és ízületi MYOACT VAS-sal értékelt betegségaktivitás, MMT-vel meghatározott izomerő, PM vagy DM diagnózisa) és laboratóriumi (CRP, lymphocyták és vérlemezkeszám, CK és LDH aktivitás, myoglobinszint) paraméterekkel való összefüggését korrelációs mátrixon tüntettük fel (20. ábra). A monocyták és B-lymphocyták eredetű MV-k száma pozitívan korrelált az MMT-vel ($r=0,497$, $p=0,027$; $r=0,508$, $p=0,023$) (20. ábra), de az izom MYOACT VAS-sal nem. Az MV-k nem mutattak összefüggést a betegségaktivitással, a gyulladás mértékét jelző CRP-vel, a CK és LDH aktivitással, sem a myoglobinszinttel (20. ábra). Nem volt különbség az MV-k számában a férfiak és nők között, illetve a PM és DM betegek között. A szteroidkezelés adagja, illetve az immunszuppresszív kezelés sem befolyásolta az MV-számot. Azonban az anti-Jo1 antitest pozitív betegekben szignifikánsan több T- és B-sejt, illetve monocyták eredetű MV-t találtunk ($p=0,006$, $p=0,012$ és $p=0,007$). Továbbá

tüdőérintettség esetén szignifikánsan magasabb volt a T- és B-sejt, ill. monocyta eredetű MV-k száma ($p=0,013$, $p=0,016$ és $p=0,025$).

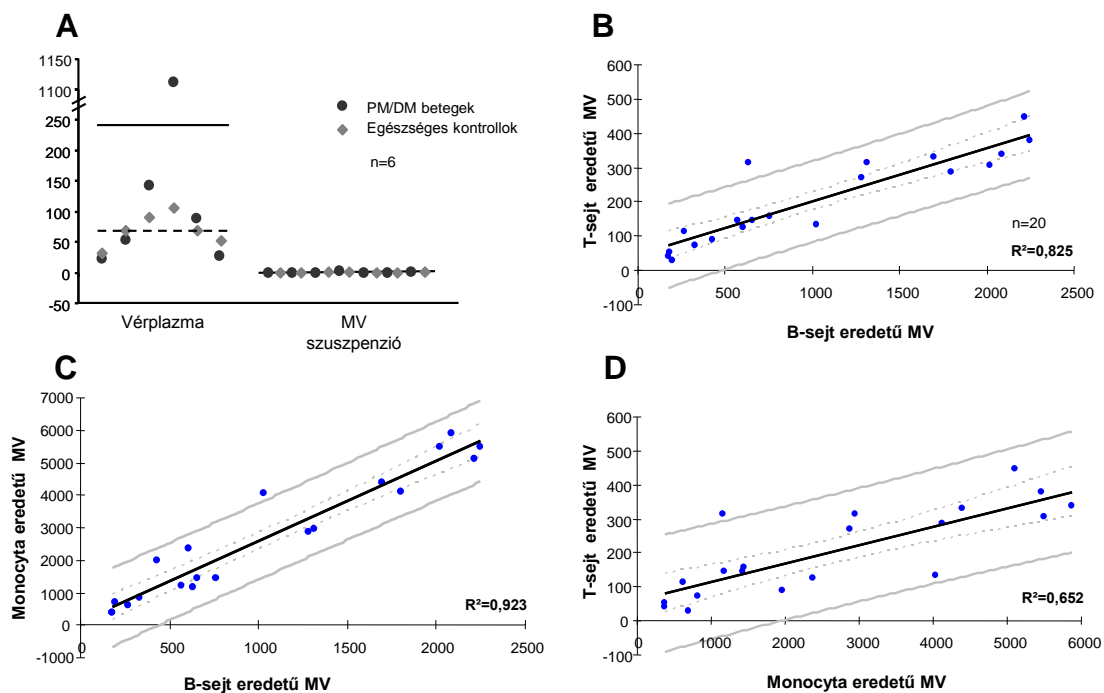
Érdekes módon az MV alcsoportok erősen korreláltak egymással (T-lymphocyta és monocyta eredetű MV-k: $r=0,815$, $p<0,0001$; T- és B-sejt eredetű MV-k: $r=0,927$, $p<0,0001$; monocyta és B-lymphocyta eredetű MV-k: $r=0,947$, $p<0,0001$) (20. ábra).



20. ábra A klinikai és laboratóriumi paraméterek összefüggése. Az MV alcsoportok korreláltak egymással. Az izomerő szintén korrelált az MV-számmal, de az izom MYOACT VAS nem. Anti-Jo-1 pozitívítás és tüdőérintettség esetén több MV-t találtunk. Fekete négyzet: erős összefüggés, szürke négyzet: közepes összefüggés, fehér négyzet: nincs összefüggés.

Forrás: Baka Zs. és mtsai. (43)

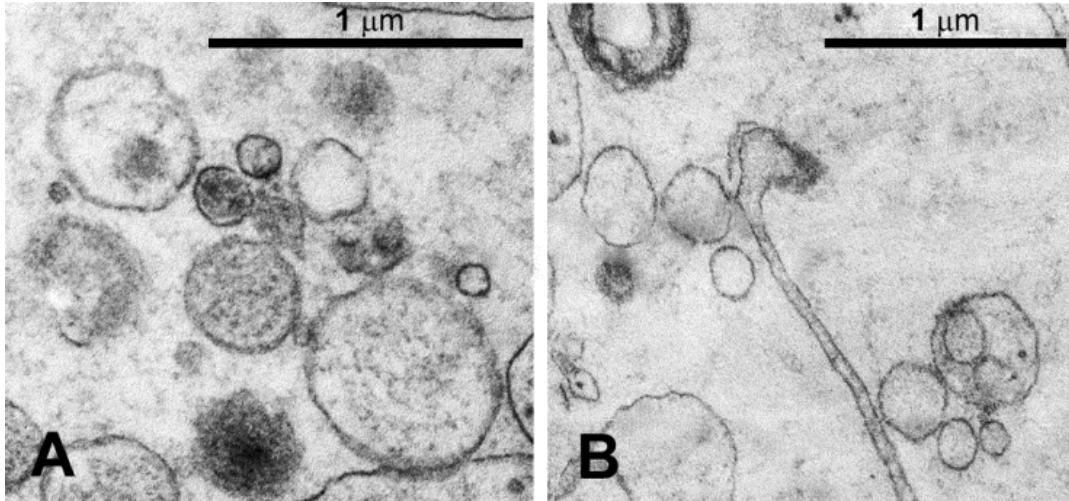
Lineáris regressziószámítással a következő egyenlettel lehet leírni összefüggésüket: T-sejt eredetű MV= $61,9+5,4E-02$ *monocyta eredetű MV, $R^2=65\%$; monocyta eredetű MV= $110,9+2,5$ *B-sejt eredetű MV, $R^2=92\%$; T-sejt eredetű MV= $44,7+0,16$ *B-sejt eredetű MV, $R^2=83\%$) (21. ábra B-D).



21. ábra A. CK szint a vérplazmában és az MV szuszpenzióban. **B-D.** MV-k lineáris korrelációja. *Forrás: Baka Zs. és mtsai. (43)*

6.3.4. Az MV-k morfológiája PM/DM-ben

Az ultracentrifugálással nyert MV-frakció sok törmelékot tartalmazott az elektronmikroszkópos felvételen, ezért a 16500 g-s centrifugálással nyert frakciót vizsgáltuk. Az egészséges kontrollokban különböző méretű és denzitású MV-eket láttunk (22. ábra A). A PM/DM-es betegekben elvéte jelent meg ez az MV-mintázat, inkább nanocsöveknek tűnő struktúrák látszódtak. (22. ábra B).



22. ábra Egészséges kontroll (A) és PM/DM-es beteg (B) 16500g-s centrifugafrakciójából készült elektronmikroszkópos felvétel. Különböző méretű és denzitású MV-k láthatók az egészséges kontrollban. A PM/DM-es betegben inkább nanocsöveknek tűnő struktúrák látszódnak.
Forrás: Baka Zs. és mtsai. (43)

7. MEGBESZÉLÉS

7.1. A dohányzás és citrullináció szerepe az ACPA-képzésben

Munkánk során vizsgáltuk, hogy a dohányzás hogyan járulhat hozzá a citrullináció feltételezett befolyásolásán keresztül az immunregulációs zavarhoz, azaz az ACPA-képzéshez.

Igazoltuk egy nem arthritises betegcsoportban (tüdőrákos betegekben), hogy a dohányzás és a citrullinált fehérjék fokozott jelenléte nem vezet feltétlenül ACPA-termeléshez. Kimutattuk, hogy dohányos tüdődaganatos betegekben gyakran emelkedett PAD4 és szignifikánsan magasabb IgA RF szérumszint mérhető a nem dohányos daganatos betegekkel összehasonlítva, de a szöveti citrullináció és PAD4 expresszió hasonlóan alakul dohányosokban és nem dohányosokban.

A nem arthritises csoport választásának alapját a következő irodalmi adatok és megfigyelések szolgáltatták: Az RA-hoz hasonlóan a dohányzásnak kiemelt szerepe van a tüdőrák patogenezisében (az esetek 90%-a dohányosokban fordul elő), tehát a választott betegcsoportban a dohányos háttér adott. Bár a tüdőrák genetikája jelen tudásunk szerint nem hozható összefüggésbe a HLA-allélekkel. Az RA-s synovium sok tekintetben hasonlít a tumoros szövetekre (18. táblázat) (160, 162).

18. táblázat RA és a (tüdő)daganat hasonlósága és összefüggése (160)

RA-ban fokozott a tüdőrák kialakulásának kockázata (162) vs. a tüdőrákot gyakran kíséri polyarthritissel járó paraneopláziás szindróma (162)
hasonló kockázati tényezők – EBV, dohányzás
fokozott sejtburjánzás (pannus - tumoros sejt)
onkogének fokozott kifejeződése (c-myc)
szolubilis tumorantigének kifejeződése (163)
fokozott angiogenesis
metastasishajlam (164)
terápia: metotrexát, azatioprin, rituximab

Ismert, hogy számos malignus daganatban fokozott a szöveti citrullináció (158). Mivel az előrehaladott tüdőrák jelentős sejtszéteséssel társul, ezért az immunrendszer sejtjei felismerhetik a daganat (citrullinált) antigénjeit.

Az RA patogenezisében Klareskog hipotézise szerint a tüdőnek kiemelt szerepe lehet: a dohányzás és egyéb környezeti tényezők a tüdőben indíthatják el a citrullinált fehérjék ellen irányuló antitestképzést (90). Az ACPA-k azután az ízületben nem specifikus módon képződő citrullinált fehérjékkel (fibrin, vimentin, alfa-enoláz) immunkomplexet képezve segíthetik elő az autoimmun synovialis gyulladást.

Tehát az irodalmi adatok arra utalnak, hogy a tüdőben zajló citrullináció kiinduló pontja lehet az RA-nak. Az általunk alkalmazott betegmintákban jelen volt a szöveti citrullináció a tüdőben, és a betegek nagy része dohányzott. Ezek után arra kerestük a választ, hogy immunválasz, azaz autoantitesttermelés létrejön-e a citrullinált antigének ellen, és ezt a dohányzás befolyásolja-e.

7.1.1. A fokozott citrullináció nem elégséges ACPA-képzéshez

Egyrészt megvizsgáltuk, hogy a fokozott citrullináció immunregulációs zavarhoz, azaz ACPA-képzéshez vezet-e.

Eredményeink szerint a tüdőrákos szövetben a citrullinált proteinek jelentős mértékben kifejeződtek, és jól elkülönítették a daganatot minden esetben - a környező szövetekben csak alacsony festődést találtunk. A citrullinált fehérjék az ismert tumormarkerek számító CK7 immunfestéssel átfedtek, és szoros korrelációt mutattak az immunhisztokémiai pontszám szerint is. A CK7 negatív, hematoxin-eozinnal daganatnak azonosított mintában is pozitív volt a citrullinált fehérjék kifejeződése. Feltételezésünk szerint a CK7 citrullinált formában lehetett jelen a daganatban, és a citrullinált fehérje pool jelentős hányadát képezhette. Ezt alátámasztja Chang és Han munkája, akik kimutatták, hogy a CK citrullinált az általuk vizsgált malignus daganatokban (158).

Mintáinkban a citrullinált fehérjékhez hasonlóan a katalizáló PAD4 enzim is specifikusan (a környező területek nem festődtek) és általában intenzíven kifejeződött a daganatos sejtekben, és minden daganatos TMA pozitív volt.

A vérszérumokban is gyakran magas PAD4 szintet mértünk a dohányos tüdőrákos betegekben, és az értékek szignifikánsan eltértek az egészséges kontrollokétól, ahol emelkedett szintet nem mértünk.

Szöveti szinten tehát jelentős a citrullinált fehérjék és a katalizáló PAD4 enzim kifejeződése, ezek alapján úgy tűnik (ahogy az irodalmi adatok alapján vártuk), hogy a választott betegcsoportban fokozottan jelen vannak a citrullinált fehérje antigének, és a

hozzátartozó enzim mind szöveti mind szérum szinten (legalábbis a dohányos tüdőrákos betegekben). Kérdés, hogy mindez elégséges-e citrullinált fehérjék elleni antitestképződéshez. Az ACPA-pozitivitást kétféle módon vizsgáltuk: a minden napi klinikai gyakorlatban alkalmazott, anti-CCP-szint mérésére használható kittel és az ELTE Peptid Kémián szintetizált citrullinált filaggrin peptidekkel. A betegek nagy része anti-CCP negatívnak bizonyult, kivéve két dohányos tüdődaganatos beteget, akikben meglepő módon magas értékeket kaptunk. A filaggrin peptidekkel sem mértünk ACPA-választ a tüdőrákos betegekben, beleértve a két anti-CCP pozitív beteget is.

Ezek alapján úgy tűnik, hogy a fokozott szöveti citrullináció és a jelentős mennyiségű PAD4 (mind szöveti mind szérum szinten) nem vezet feltétlenül ACPA-válaszhoz annak ellenére, hogy a tüdőrák gyakran paraneopláziás szindrómával és autoantitesttermeléssel társul (bár a betegpopulációt úgy választottuk, hogy paraneopláziás vagy polyarthritises beteget ne tartalmazzon). Feltételezésünk szerint az ACPA-képzés hiányának hátterében több tényező állhat:

I) A citrullinált antigének csak a tüdőrák egyes stádiumaiban fejeződnek ki, így nincs elegendő idő az autoimmunitás kialakulásához. Továbbá a daganatos betegek nagy része kemoterápiát és/vagy sugárkezelést kapott, ami jelentősen gátolja az immunválaszt. Az autoantitestképződésre a széteső, előrehaladott tüdőrákban van nagyobb esély, ahol a tumor (citrullinált) neoantigének a rossz vérellátású, nekrotizáló, centrális tumorban nagyobb eséllyel kerülhetnek bemutatásra az immunsejtek számára. Azonban az előrehaladott tüdőrák túlélési esélye igen alacsony.

II) Hozzájárulhat az ACPA-képzés elmaradásához a genetikai hajlam hiánya is. A tüdőrákról ismert, hogy a HLA-antigének nem kockázati tényezői. Ugyanakkor az ACPA-képzés és az ACPA-pozitív RA HLA-DRB1-allélekkel való asszociációja jól ismert (19). A HLA-kapcsolatot kimutató genetikai vizsgálat az általunk vizsgálnál jóval nagyobb létszámú betegpopuláción lenne informatív, ezt a jelen vizsgálati rendszerben nem tudtuk megvalósítani, ezért a genetikai hajlamra vonatkozó magyarázatunk feltételezés. Ezt megerősíti azonban az a megfigyelés, mely szerint nincs ACPA-válasz sclerosis multiplexben sem annak ellenére, hogy fokozott az agyi citrullináció, valamint a PAD2 és PAD4 expresszió is kifejezett (165, 166). Továbbá jelen van az autoimmun háttér, de az RA-ra jellemző genetikai hajlam hiányzik. (Bár a vér-agy gát is szerepet játszhat abban, hogy nincs ACPA-válasz.)

7.1.2. A dohányzás és a jelentős citrullináció nem indukál ACPA-választ

Elemeztük a dohányzás-citrullináció-ACPA patogenetikai lánc összefüggését. A tüdőrákos betegeink nagy része dohányzott, és szignifikánsan többet az egészséges dohányosokhoz viszonyítva, tehát a választott betegcsoportban a dohányzás kifejezetten jelen volt. Szérum szinten a dohányos tüdődaganatos betegekben gyakran találtunk emelkedett PAD4 szintet, a nem dohányosokban viszont egyáltalán nem (az egészséges kontrollokhoz hasonlóan), bár szöveti szinten hasonló eltérést nem tudtunk kimutatni a dohányosok/nem dohányosok között. Ennek háttérében feltételezésünk szerint a tumorsejtek autonómmá váló PAD4 szabályozása (mutált p53 miatt?) állhat, amelyet már a dohányzás sem tud tovább módosítani. Érdekes módon az ACPA-pozitív, két tüdődaganatos beteg dohányos volt. Makrygiannakis például kimutatta, hogy egészséges dohányosok bronchoalveolaris mosófolyadékában a citrullináció és a PAD2 kifejeződés fokozott a nem dohányosokkal összehasonlítva (25). Tehát a dohányzás befolyásolhatja a PAD4 enzim expresszióját a szérumban legalábbis. Ennek magyarázatára jelenleg kevés irodalmi adat áll rendelkezésre. Egyrészt a dohányzás fokozott oxidatív stresszel járhat, ami aktiválhatja a redoxszenzitív transzkripciós faktorokat (pl. AP-1) (26). Ezek a fehérjék azután elősegíthetik a PAD-expressziót és következményes citrullinációt (a PAD4 promotor AP-1 kötő régiót tartalmaz) (161). Másrészt a dohányfüst számos káros anyagot tartalmaz, melyek sejtkárosodást idézhetnek elő a tüdőben, és azután aktiválhatják a p53-expressziót (a p53-nak szintén van kötő régiója a PAD4 génben), és elősegítik számos fehérje citrullinációját (167).

7.1.3. A dohányzás befolyásolja az RF-termelést

Megvizsgáltuk a dohányzás-RF kapcsolatát is. A dohányos tüdőrákos betegekben jelentős arányban kórosan magas értékeket találtunk (ill. néhány dohányos COPD-s betegben is), a nem dohányos daganatos betegekben viszont nem. Tuomi korábban igazolta, hogy az RF reakció kétszer gyakoribb az egészséges dohányosokban a nem dohányosokhoz viszonyítva, és a magas titer az aktív dohányzással hozható összefüggésbe (168). Az RF jelenléte betegeinkben azt sugallja, hogy a dohányzás hozzájárulhat az immunregulációs zavarhoz, ami az IgA típus alapján a mucosa/bronchusasszociált nyirokszövetben jöhet létre.

7.2. A dohányzás-citrullináció lehetséges szerepe a daganatképződésben

Elemeztük, hogy a citrullináció és PAD4 expresszió kapcsolatba hozható-e a daganatképződéssel, bár ez nem képezte szerves részét az autoimmun vizsgálatainknak. A PAD4 és a citrullinált fehérjék specifikusak voltak a daganatra. Ezek alapján úgy tűnik, hogy a PAD4 és a citrullinált fehérjék alkalmasak lehetnek a jövőben tüdődaganatos markernek. Kérdés, hogy következményes kísérői a kórfolyamatnak, vagy esetleg szerepük lehet a daganatképződésben.

Számos irodalmi adat alátámasztja a PAD4 daganatképződésben felmerülő szerepét és epigenetikus hatását a génszabályozásban. Chang és Han sokféle malignus daganatban (főként adenocarcinomákban) kimutatta a PAD4 fokozott szöveti expresszióját és a jelentős citrullinációt (158). Szérum szinten szintén emelkedett PAD4 szintet mértek ezekben a daganatokban (154). A szérum értékek a tumormarkerekkel szoros összefüggést mutattak, és a daganat kimetszése után csökkentek. A PAD4 és a p53 reciprok módon kölcsönhatásban áll egymással: a PAD4 a p53 által szabályozott gének promóteréhez kötődhet, míg a p53 transzaktiválja a PAD4-et p53-kötő intronon keresztül (167) - habár a pontos szabályozás nem teljesen ismert, és ellentmondónak tűnő eredmények szerepelnek az irodalomban. A p53 mutációja a tüdőrákos esetek 60-75%-ában megfigyelhető, tehát a tüdődaganatos szövettani mintáinkban talált fokozott PAD4 kifejeződés megzavarhatja a p53 szabályozott géneken keresztül az apoptózist. Bár előfordulhat az is, hogy a mutált p53 kórosan szabályozza a PAD4-expressziót (a p53-kötő intronon keresztül), és a daganatban megfigyelt jelentős PAD4 kifejeződés és citrullináció ennek következménye, és nem oki tényezője.

Elképzelhető az is, hogy a fokozottan expresszálódó – feltételezésünk szerint citrullinált formában jelen levő – CK7 szintén megzavarja a sejtek homeosztázisát. Omary és mtsai. kimutatták, hogy a CK poszttranszlációs módosításai jelentős mértékben befolyásolják a fehérje fizikai és kémiai tulajdonságait és fiziológias működését (169).

A dohányzás epigenetikus hatása feltételezett a tüdőrák patogenezisében (170): bizonyos génpromóterek hipermetilációja/hipometilációja összefüggésbe hozható a dohányzással (171). Feltételeztük, hogy ennek háttérében a hisztonmetilációt befolyásoló PAD4 dohányzás függése is állhat, de az enzim és a citrullinált fehérjék

szöveti festődési mintázata nem ezt igazolta, hiszen a dohányosok és nem dohányosok között nem találtunk különbséget.

Munkánk során azt is igazoltuk, hogy a kissejtes és a nem kissejtes tüdőrák PAD4- és citrullináltfehérje-kifejeződése szignifikánsan eltér, ami azt sugallja, hogy patogenezisükben eltérő mechanizmusok játszhatnak szerepet.

7.3. A dohányfüst hatása a TNFR-kifejeződésre

Munkánk során arra is kíváncsiak voltunk, hogy a dohányzás hogyan hathat az autoimmunitásban szerepet játszó effektortényezőkre. Az RA-s gyulladás szabályozásában a TNF- α központi szerepet játszik, ezért vizsgáltuk a dohányfüst hatását a TNF-jelátvitelre. Kidolgoztunk egy olyan módszert, amellyel a dohányzás sejtműködésre gyakorolt hatásait *in vitro* rendszerben, standardizált módon lehet vizsgálni. Kimutattuk humán T-lymphocytákon, hogy a dohányfüst apoptózist indukál, és a TNFR-expresszió a dohányfüst koncentrációjának függvényében fokozódik.

Jurkat-sejteken a dohányfüst koncentrációfüggően a sejtek apoptózist okozta, a sejtelhalás mértéke 10-szeres füstígításnál 5% alá csökkent. A TNFR1-expresszió jelentősen megemelkedett (3-5,5-szörös növekedés) a dohányfüst koncentrációjának függvényében, és még az 50-szeres ígításnál is emelkedést láttunk. A dohányfüst kifejezett hatása magyarázhatja, miért káros a passzív dohányzás is, ahol kis dohányfüst-koncentrációk kerülhetnek a passzív dohányos tüdejébe.

Ezzel szemben a TNFR2-expressziófokozódása a dohányfüst koncentrációjának függvényében nem volt ennyire kifejezett (2-3,5-szörös növekedés) Jurkat-sejteken, és 50-szeres dohányfüsthígításnál megfelelt a kezeletlen sejtekének. Feltételezzük, hogy a kifejezett TNFR1-növekedés a dohányfüst apoptózist indukáló hatásával állhat összefüggésben, hiszen a TNFR1-szignál elsősorban az apoptotikus útvonalaknak kedvez, és a kisebb mértékű TNFR2-expressziófokozódás sejtaktivációt kiváltó (NF κ B-útvonal) hatását ellensúlyozhatja. Ezzel összhangban számos sejttypusban és sejtvonalon igazolták, hogy a cigarettafüst/kondenzátum apoptózist idézhet elő, valószínűleg a kaspázok (kaspáz-8 és 3) aktiválásán keresztül (172, 173). Morissette és mtsai. igazolták, hogy a dohányfüst érzékenyíti a sejteket (tüdőadenocarcinomából származó sejtvonalon) a TNF-szupercsalád TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) tagja

által mediált apoptózis iránt (174). Eredményeink szerint az apoptózisindukcióban a TNFR1-nek is szerepe lehet. Irodalmi adatok alapján a sejtelhalást a redukált glutation, illetve a sejtek glutation-S-transzferázzal való transzfektálása csökkenti, ezért feltételezhetően az apoptózist a cigarettafüstben jelen lévő szabadgyökök idézhetik elő (173).

Dohányfüstös eredményeink jelen pillanatban tájékozódó jellegűek, és munkacsoportunk további kísérletekkel szeretné tisztázni a cigaretta összetevőinek pontos hatását a TNF-szignálrendszerre.

7.4. A mikrovezikulák szerepe

Munkánk során az egyik széles körben kutatott effektortényező, a mikrovezikulák szerepét is vizsgáltuk. A keringő MV-mintázat elemzésével potenciális biomarkert kerestünk PM/DM-ben. Igazoltuk, hogy a lymphocytá és monocytá eredetű MV-k mennyisége szignifikánsan nagyobb a PM/DM-es betegek vérében az egészségesekkel összehasonlítva. Kimutattuk továbbá, hogy az MV-k a klinikai paraméterek közül az izomerővel, az anti-Jo-1 pozitivitással és a tüdőérintettséggel függnek össze, de nem mutatnak kapcsolatot a betegségaktivitással, a gyulladás mértékével és a terápiával. Ez alapján az MV-k hasznosak lehetnek a tüdőérintettség megállapításában, esetleg az izomkárosodás fokát is jelezhetik. CK enzimaktivitást (mely az izomeredetre utalhat) nem detektáltunk a betegek keringő MV-iben.

PM/DM-ben a T- és B-sejtek, illetve monocyták szerepe igazolt: az endomysialis sejtinfiltrátum főként CD8⁺ T-lymphocytákat és makrofágokat tartalmaz, míg a perivascularis/perimysialis beszűrődésben főként CD4⁺ T-lymphocyták, B-sejtek és makrofágok találhatóak. A betegségben kimutathatók aktiválható memória T-sejtek (175) és az affinitás érés jelei (szomatikus mutáció, izotípusváltás és receptorrevízió) (176). A B-sejtek további szerepét igazolja az MSA-k jelenléte (anti-Jo-1, anti-Mi-2) a betegek 60-70%-ában (177). Az izomrostok feltételezhetően antigénprezentáló sejtekként működhetnek, és kostimulációs jelek expressziójával autoreaktív T-sejteket aktiválhatnak myositisben. Mindezen irodalmi adatok alapján a T- és B-sejtek hozzájárulhatnak a PM/DM patogeneziséhez. Ezzel összhangban fokozott mennyiségű T- és B-sejt, valamint monocytá eredetű MV-t találtunk a PM/DM-es betegek vérplazmájában. Eredményeinkhez hasonlóan SSc-ben szintén magasabb a

monocytaból és T-sejtekből származó MV-k száma (61). Az MV-k az immunrendszer számos funkciójában részt vesznek, az antigénprezentálástól a T- és B-sejtek, dendritikus sejtek, szabályozó T-sejtek működésének befolyásolásáig. Ez alapján feltételezzük, hogy az MV-k szerepet játszhatnak a lokális gyulladásos folyamatok felerősítésében/szabályozásában az érintett PM/DM-es izmokban.

A plazmában mért MV-k eredete nem egyértelmű: recirkuláló immunsejtekből, a nyirokcsomókból vagy akár az izomszövetből is származhatnak. Greenberg feltételezése szerint az antigénprezentáció és a B-sejt-érés inkább az izomban, mint a nyirokcsomókban történik (178), ami azt sugallja, hogy az MV-k is lokálisan keletkezhetnek, és a gyulladás helyén, a károsodott ereken keresztül a keringésbe kerülhetnek. A plazmamintáinkban CK enzimaktivitást mutató MV-t nem tudtunk igazolni, tehát elképzelhető, hogy az izomeredetű MV-k nem jutnak a keringésbe, vagy nem tudjuk detektálni őket a gyors elimináció vagy a mérésünk pontatlansága miatt, esetleg nem tartalmazznak CK-t.

Azt is vizsgáltuk, hogy az MV-k összefüggést mutatnak-e a betegségaktivitással, a gyulladás mértékével, hiszen irodalmi adatok alapján erre találtunk példát (pl. RA). Knijff-Dutmer és mtsai. az RA-s betegek vérében szignifikánsan magasabb pMV számot talált, és az MV-k korreláltak a betegségaktivitással, de a CRP-vel és a süllyedéssel nem (55). Vasculitisben a pMV szintén szignifikánsan magasabb volt, és a vasculitis aktivitási pontszámmal, a CRP-vel és a süllyedéssel korrelált (179). Shirafuji és mtsai szignifikánsan magasabb pMV-t mutattak ki PM/DM-ben, és összefüggést találtak a CRP-vel (180). Sellam és mtsai. SLE-s, RA-s és SSc-s beteganyagában a pMV szám azonban nem korrelált a betegségaktivitással (53). Mi is hasonló eredményre jutottunk: a PM/DM patogenezisében szerepet játszó lymphocita és monocyta eredetű MV-k nem függték össze a betegségaktivitással és a CRP-vel. Ennek egyik oka az lehetett, hogy kezelt betegeken végeztük az MV-mérést, illetve PM/DM-ben a CRP gyakran a normál tartományban van.

Eredményeink alapján egyedül az izomerő (de az izomban zajló gyulladást jelző CK, LDH és myoglobinszint, valamint az izom MYOACT VAS nem) korrelált az MV-k számával. Meglepő módon pozitív korrelációt találtunk, azaz jobb izomerőnél magasabb MV-számot mértünk PM/DM-ben. Ennek lehetséges mechanizmusa:

1) Hozzánk hasonlóan SSc-ben Guiducci és mtsai. leírták, hogy a totál MV-szám és pMV-szám negatívan korrelál a módosított Rodnan-féle bőrvastagsági pontszámmal és a bőrfekélyek jelenlétével: azaz magas MV szám enyhébb bőrfibrosissal és kevesebb fekélyel társul (61). Guiducci és mtsai. feltételezése szerint az MV-k mátrixmetalloproteáz-indukáló hatása ellensúlyozhatja a fibrosist a mátrix lebontásán keresztül (181). Ez alapján a magasabb MV-szám (nagyobb proteázaktivitással) az izomfibrosis gátlása révén jobb izomerővel társulhat.

2) Vizsgálatainkat kezelt betegeken végeztük, ahol a rosszabb izomerő oka nem feltétlenül az aktív gyulladás, hanem az izomfibrosis is lehet. A fibrotikus izmokban azonban a gyulladás már nagyobb részt lecsengett, tehát belőlük feltételezhetően kevesebb lymphocyta eredetű MV származik, ezért rosszabb izomerő kevesebb (de az egészségesekhez képest még mindig több) MV-vel társul.

Tüdőérintettség esetén szignifikánsan magasabb lymphocyta és monocyta eredetű MV-t mértünk PM/DM-ben. A keringő MV-mintázat mérése alkalmas lehet a tüdőérintettség laboratóriumi módszerekkel történő megállapítására és szűrésére (egyéb laboratóriumi módszerekkel, képalkotó vizsgálatokkal és funkcionális tesztekkel kiegészítve) a PM/DM-es betegeknél a pulmonológussal történő konzultáció előtt.

Az anti-Jo-1 antitest pozitív betegeknél szintén magasabb volt a keringő MV-k száma. Az antiszintetáz antitestek és a vele gyakran társuló tüdőérintettség általában súlyosabb betegséggel és rosszabb prognózissal jár (182), ami felvetheti az MV-k prognosztikai szerepét is a betegségben.

A lymphocyta és monocyta eredetű MV-k terápiával való összefüggését is vizsgáltuk. Shirafuji és mtsai. leírták, hogy a glükokortikoidkezelés után a pMV-szám csökken PM/DM-ben (180), viszont munkacsoportunk nem talált összefüggést a szteroid adagja és az MV-szám között. Az sem befolyásolta az MV-k számát, hogy a beteg kapott-e immunszuppresszív kezelést.

A PM/DM-es betegekből származó MV-eket megjelenítettük elektronmikroszkóppal. Az egészséges kontrollokkal összehasonlítva nem láttuk a tipikus MV-mintázatot, inkább nanocsöveknek tűnő struktúrákat találtunk.

8. KÖVETKEZTETÉSEK

1. Igazoltuk egy nem arthritises betegcsoportban (tüdőrákos betegekben), hogy a dohányzás és a fokozott citrullináció a tüdőben nem vezet feltétlenül autoantitesttermeléshez, azaz ACPA-k megjelenéséhez. Kimutattuk, hogy dohányos tüdőrákos betegekben magasabb szérum PAD4 és IgA RF szint mérhető, de a szöveti citrullináció és PAD4 expresszió hasonló dohányosokban/nem dohányosokban.
2. Leírtuk továbbá, hogy fokozott PAD4 expresszió és citrullináció jellemző a tüdődagánatra, ami alapján felmerülhet tumormarkerként történő alkalmazásuk.
3. Kidolgoztunk egy olyan módszert, amellyel a dohányzás sejtműködésre gyakorolt hatásait *in vitro* rendszerben, standardizált módon lehet vizsgálni. Kimutattuk, hogy a dohányfüst apoptózist indukál, és koncentrációfüggően fokozhatja a TNFR1 és 2 szintet humán T-lymphocytákon.
4. Eredményeink szerint a T-sejtekből, B-sejtekből és monocytákból származó MV-k mennyisége szignifikánsabb magasabb a PM/DM-es betegek plazmájában az egészségesekkel összehasonlítva. Az immunsejt eredetű MV-k száma összefüggést mutatott az izomerővel, az anti-Jo-1 pozitivitással és a tüdőérintettségel, ami felveti biomarkerként történő bevezetésük lehetőségét. CK enzimaktivitást (amely az izomeredetre utal) nem detektáltunk a PM/DM-es betegek keringő MV-iben.

9. ÖSSZEFOGLALÁS

Számos epidemiológiai tanulmány igazolja, hogy a dohányzás fontos kockázati tényező rheumatoid arthritisben (RA-ban). Munkánk során egyrészt vizsgáltuk a dohányzás szerepét az RA patomechanizmusában: *in vivo* rendszerben a fehérjecitrullinációra, illetve autoantitestképzésre kifejtett hatásait, míg *in vitro* rendszerben a tumornekrózis-faktor (TNF) jelátvitelre gyakorolt hatásait elemeztük.

Egy nem arthritises betegcsoportban (tüdőrákos betegekben) igazoltuk, hogy a dohányzás és a fokozott citrullináció a tüdőben nem vezet feltétlenül autoantitesttermeléshez, azaz citrullinált fehérje ellenes autoantitestek (ACPA-k) megjelenéséhez. Kimutattuk, hogy dohányos tüdőrákos betegekben magasabb szérumban peptidil-arginin-deimináz (PAD) 4 és IgA rheumatoid faktor szint mérhető, de a szöveti citrullináció és PAD4 expresszió hasonló dohányosokban/nem dohányosokban. Továbbá leírtuk, hogy a fokozott PAD4 expresszió és citrullináció specifikus a daganatos szövetre, ami felveti tumormarkerként történő alkalmazásuk lehetőségét.

Kidolgoztunk egy olyan módszert, amellyel a dohányzás sejtműködésre gyakorolt hatásait *in vitro* rendszerben, standardizált módon lehet vizsgálni. Kimutattuk, hogy a dohányfüst apoptózist indukál, és koncentrációfüggően fokozhatja a TNF-receptor 1 és 2 szintet humán T-lymphocytákon.

Az autoimmun betegségekben nagy szükség van a mindennapi klinikai gyakorlatban használható biomarkerekre. Polymyositis/dermatomyositis (PM/DM-es) betegekben vizsgáltuk a keringő mikrovezikula-mintázatot (MV), és összefüggést kerestünk a betegség klinikai és laboratóriumi paramétereivel.

Kimutattuk, hogy a T-sejtekből, B-sejtekből és monocytákból származó MV-k száma szignifikánsabb magasabb a PM/DM-es betegek plazmájában az egészségesekkel összehasonlítva. Az immunsejt eredetű MV-k száma összefüggést mutatott az izomerővel, az anti-Jo-1 pozitivitással és a tüdőérintettséggel.

A dohányzás vizsgálata kiemelt területe az autoimmun reumatológiai kórképeknek, kapott eredményeink hozzásegíthetnek az ACPA-termelés mechanizmusának tisztázásához, valamint a TNF-jelátvitel jobb megértéséhez. Az MV-kkel kapcsolatos eredményeink új biomarkerek bevezetését vetik fel PM/DM-ben.

10. SUMMARY

Several epidemiological studies have confirmed that smoking is an important risk factor in rheumatoid arthritis (RA). The role of smoking in the pathomechanism of RA has been investigated: the impacts of smoking on protein citrullination and autoantibody production, and tumor necrosis factor (TNF) signaling were studied in an *in vivo* and *in vitro* system, respectively.

It was confirmed in a non-arthritic patient group (lung cancer patients) that smoking and increased citrullination in the lung might not lead to autoantibody (anti-citrullinated protein antibody, ACPA) production. Increased serum peptidyl arginine deiminase (PAD) 4 and IgA rheumatoid factor levels were seen in smoker lung cancer patients but tissue citrullination and PAD4 expression were similar in smokers and non-smokers. It was also found that increased PAD4 expression and citrullination were characteristic of lung cancer, thus, they may serve as tumor markers.

An *in vitro* system was developed to investigate the effects of smoking on cell function in a standardized way. It was shown that smoke induced apoptosis, and might increase TNFR1 and 2 levels in human T-lymphocytes as a function of smoke concentration.

There is a need for diagnostic and prognostic biomarkers in the daily practice of autoimmune diseases. Plasma microvesicles (MVs) were measured in polymyositis/dermatomyositis (PM/DM) patients, and were correlated to the clinical and laboratory parameters of the disease.

Significantly elevated levels of T and B cell, and monocyte derived MVs were found in the blood plasma of PM/DM patients compared to healthy controls. Immune cell derived MVs correlated to muscle strength, anti-Jo-1 positivity and lung involvement.

This work may contribute to the better understanding of smoke effects on ACPA production and TNF signaling, while the results on MVs may reveal novel biomarkers in PM/DM.

11. IRODALOMJEGYZÉK

1. A magyar helyesírás szabályai. Magyar Tudományos Akadémia, Akadémiai Kiadó, Budapest, 1985
2. Orvosi helyesírási szótár. Fábián Pál, Magasi Péter (szerk.), Akadémiai Kiadó, Budapest, 1992
3. Brencsán Orvosi szótár. Krúdy Erzsébet (szerk.), Medicina Könyvkiadó Rt., Budapest, 2001
4. A magyar orvosi nyelv tankönyve. Bösze Péter (szerk.), Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 2009
5. van den Broek M, Klarenbeek NB, Dirven L, van Schaardenburg D, Hulsmans HM, Kerstens PJ, Huizinga TW, Dijkmans BA, Allaart CF. (2011) Discontinuation of infliximab and potential predictors of persistent low disease activity in patients with early rheumatoid arthritis and disease activity score-steered therapy: subanalysis of the BeSt study. *Ann Rheum Dis*, 70: 1389-1394.
6. Nagy G. A reumatológiai betegségek patogenezise. In: Szekanecz Z (szerk.), *Reumatológia: egyetemi jegyzet*. SpringMed, Budapest, 2011: 33-54.
7. Perricone C, Ceccarelli F, Valesini G. (2011) An overview on the genetic of rheumatoid arthritis: a never-ending story. *Autoimmun Rev*, 10: 599-608.
8. (2007) Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*, 447: 661-678.
9. Raychaudhuri S, Sandor C, Stahl EA, Freudenberg J, Lee HS, Jia X, Alfredsson L, Padyukov L, Klareskog L, Worthington J, Siminovitch KA, Bae SC, Plenge RM, Gregersen PK, de Bakker PI. (2012) Five amino acids in three HLA proteins explain most of the association between MHC and seropositive rheumatoid arthritis. *Nat Genet*, 44: 291-296.
10. Deng Y, Tsao BP. (2010) Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus in the genomic era. *Nat Rev Rheumatol*, 6: 683-692.
11. Romano E, Manetti M, Guiducci S, Ceccarelli C, Allanore Y, Matucci-Cerinic M. (2011) The genetics of systemic sclerosis: an update. *Clin Exp Rheumatol*, 29: S75-86.

12. Loiseau P, Lepage V, Djelal F, Busson M, Tamouza R, Raffoux C, Menkes CJ, Meyer O, Charron D, Goldberg D. (2001) HLA class I and class II are both associated with the genetic predisposition to primary Sjogren syndrome. *Hum Immunol*, 62: 725-731.
13. Dougados M, Baeten D. (2011) Spondyloarthritis. *Lancet*, 377: 2127-2137.
14. Bax M, van Heemst J, Huizinga TW, Toes RE. (2011) Genetics of rheumatoid arthritis: what have we learned? *Immunogenetics*, 63: 459-466.
15. Grundtman C, Malmstrom V, Lundberg IE. (2007) Immune mechanisms in the pathogenesis of idiopathic inflammatory myopathies. *Arthritis Res Ther*, 9: 208.
16. van der Helm-van Mil AH, Huizinga TW, de Vries RR, Toes RE. (2007) Emerging patterns of risk factor make-up enable subclassification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 56: 1728-1735.
17. Mammen AL. (2010) Dermatomyositis and polymyositis: Clinical presentation, autoantibodies, and pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci*, 1184: 134-153.
18. Gregersen PK, Batliwalla F. (2005) PTPN22 and rheumatoid arthritis: gratifying replication. *Arthritis Rheum*, 52: 1952-1955.
19. Kallberg H, Padyukov L, Plenge RM, Ronnelid J, Gregersen PK, van der Helm-van Mil AH, Toes RE, Huizinga TW, Klareskog L, Alfredsson L. (2007) Gene-gene and gene-environment interactions involving HLA-DRB1, PTPN22, and smoking in two subsets of rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet*, 80: 867-875.
20. Budarf ML, Goyette P, Boucher G, Lian J, Graham RR, Claudio JO, Hudson T, Gladman D, Clarke AE, Pope JE, Peschken C, Smith CD, Hanly J, Rich E, Boire G, Barr SG, Zummer M, Fortin PR, Wither J, Rioux JD. (2011) A targeted association study in systemic lupus erythematosus identifies multiple susceptibility alleles. *Genes Immun*, 12: 51-58.
21. Arnson Y, Shoenfeld Y, Amital H. (2010) Effects of tobacco smoke on immunity, inflammation and autoimmunity. *J Autoimmun*, 34: J258-265.
22. Nielen MM, van Schaardenburg D, Reesink HW, van de Stadt RJ, van der Horst-Bruinsma IE, de Koning MH, Habibuw MR, Vandenbroucke JP, Dijkmans BA. (2004) Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum*, 50: 380-386.

23. Thomas R, Turner M, Cope AP. (2008) High avidity autoreactive T cells with a low signalling capacity through the T-cell receptor: central to rheumatoid arthritis pathogenesis? *Arthritis Res Ther*, 10: 210.
24. Yoshida S, Akizuki M, Mimori T, Yamagata H, Inada S, Homma M. (1983) The precipitating antibody to an acidic nuclear protein antigen, the Jo-1, in connective tissue diseases. A marker for a subset of polymyositis with interstitial pulmonary fibrosis. *Arthritis Rheum*, 26: 604-611.
25. Makrygiannakis D, Hermansson M, Ulfgren AK, Nicholas AP, Zendman AJ, Eklund A, Grunewald J, Skold CM, Klareskog L, Catrina AI. (2008) Smoking increases peptidylarginine deiminase 2 enzyme expression in human lungs and increases citrullination in BAL cells. *Ann Rheum Dis*, 67: 1488-1492.
26. Baka Z, Buzas E, Nagy G. (2009) Rheumatoid arthritis and smoking: putting the pieces together. *Arthritis Res Ther*, 11: 238.
27. Lundberg K, Kinloch A, Fisher BA, Wegner N, Wait R, Charles P, Mikuls TR, Venables PJ. (2008) Antibodies to citrullinated alpha-enolase peptide 1 are specific for rheumatoid arthritis and cross-react with bacterial enolase. *Arthritis Rheum*, 58: 3009-3019.
28. Kinloch A, Lundberg K, Wait R, Wegner N, Lim NH, Zendman AJ, Saxne T, Malmstrom V, Venables PJ. (2008) Synovial fluid is a site of citrullination of autoantigens in inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum*, 58: 2287-2295.
29. Toussirot E, Roudier J. (2007) Pathophysiological links between rheumatoid arthritis and the Epstein-Barr virus: an update. *Joint Bone Spine*, 74: 418-426.
30. Szekanecz Z. A rheumatoid arthritis etiopatogenezise. In: Gömör B (szerk.), *Klinikai reumatológia*. Medicina Könyvkiadó Rt., Budapest, 2005: 299-316.
31. Sakaguchi N, Takahashi T, Hata H, Nomura T, Tagami T, Yamazaki S, Sakihama T, Matsutani T, Negishi I, Nakatsuru S, Sakaguchi S. (2003) Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice. *Nature*, 426: 454-460.
32. Harre U, Georgess D, Bang H, Bozec A, Axmann R, Ossipova E, Jakobsson PJ, Baum W, Nimmerjahn F, Szarka E, Sarmay G, Krumbholz G, Neumann E, Toes R, Scherer HU, Catrina AI, Klareskog L, Jurdic P, Schett G. (2012) Induction of

osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin. *J Clin Invest*, 122: 1791-1802.

33. Mackay F, Woodcock SA, Lawton P, Ambrose C, Baetscher M, Schneider P, Tschopp J, Browning JL. (1999) Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations. *J Exp Med*, 190: 1697-1710.

34. Bosello S, Youinou P, Daridon C, Tolusso B, Bendaoud B, Pietrapertosa D, Morelli A, Ferraccioli G. (2008) Concentrations of BAFF correlate with autoantibody levels, clinical disease activity, and response to treatment in early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 35: 1256-1264.

35. Zhang J, Roschke V, Baker KP, Wang Z, Alarcon GS, Fessler BJ, Bastian H, Kimberly RP, Zhou T. (2001) Cutting edge: a role for B lymphocyte stimulator in systemic lupus erythematosus. *J Immunol*, 166: 6-10.

36. Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, Moore S, Warnes G, Isenberg DA, Mauri C. (2004) Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J Exp Med*, 200: 277-285.

37. McInnes IB, Schett G. (2007) Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol*, 7: 429-442.

38. Lundberg I, Ulfgren AK, Nyberg P, Andersson U, Klareskog L. (1997) Cytokine production in muscle tissue of patients with idiopathic inflammatory myopathies. *Arthritis Rheum*, 40: 865-874.

39. Tews DS, Goebel HH. (1996) Cytokine expression profile in idiopathic inflammatory myopathies. *J Neuropathol Exp Neurol*, 55: 342-347.

40. Wolf P. (1967) The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol*, 13: 269-288.

41. Gyorgy B, Szabo TG, Pasztoi M, Pal Z, Misjak P, Aradi B, Laszlo V, Pallinger E, Pap E, Kittel A, Nagy G, Falus A, Buzas EI. (2011) Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci*, 68: 2667-2688.

42. Pap E, Pallinger E, Pasztoi M, Falus A. (2009) Highlights of a new type of intercellular communication: microvesicle-based information transfer. *Inflamm Res*, 58: 1-8.

43. Baka Z, Senolt L, Vencovsky J, Mann H, Simon PS, Kittel A, Buzas E, Nagy G. (2010) Increased serum concentration of immune cell derived microparticles in polymyositis/dermatomyositis. *Immunol Lett*, 128: 124-130.
44. Thery C, Ostrowski M, Segura E. (2009) Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol*, 9: 581-593.
45. Mesri M, Altieri DC. (1998) Endothelial cell activation by leukocyte microparticles. *J Immunol*, 161: 4382-4387.
46. MacKenzie A, Wilson HL, Kiss-Toth E, Dower SK, North RA, Surprenant A. (2001) Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. *Immunity*, 15: 825-835.
47. Nauta AJ, Trouw LA, Daha MR, Tijssma O, Nieuwland R, Schwaeble WJ, Gingras AR, Mantovani A, Hack EC, Roos A. (2002) Direct binding of C1q to apoptotic cells and cell blebs induces complement activation. *Eur J Immunol*, 32: 1726-1736.
48. Barry OP, Kazanietz MG, Pratico D, FitzGerald GA. (1999) Arachidonic acid in platelet microparticles up-regulates cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin formation via a protein kinase C/mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *J Biol Chem*, 274: 7545-7556.
49. Gasser O, Schifferli JA. (2004) Activated polymorphonuclear neutrophils disseminate anti-inflammatory microparticles by ectocytosis. *Blood*, 104: 2543-2548.
50. Jodo S, Xiao S, Hohlbaum A, Strehlow D, Marshak-Rothstein A, Ju ST. (2001) Apoptosis-inducing membrane vesicles. A novel agent with unique properties. *J Biol Chem*, 276: 39938-39944.
51. Camussi G, Deregibus MC, Bruno S, Grange C, Fonsato V, Tetta C. (2011) Exosome/microvesicle-mediated epigenetic reprogramming of cells. *Am J Cancer Res*, 1: 98-110.
52. Distler JH, Pisetsky DS, Huber LC, Kalden JR, Gay S, Distler O. (2005) Microparticles as regulators of inflammation: novel players of cellular crosstalk in the rheumatic diseases. *Arthritis Rheum*, 52: 3337-3348.
53. Sellam J, Proulle V, Jungel A, Ittah M, Miceli Richard C, Gottenberg JE, Toti F, Benessiano J, Gay S, Freyssinet JM, Mariette X. (2009) Increased levels of circulating

microparticles in primary Sjogren's syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis and relation with disease activity. *Arthritis Res Ther*, 11: R156.

54. Pereira J, Alfaro G, Goycoolea M, Quiroga T, Ocqueteau M, Massardo L, Perez C, Saez C, Panes O, Matus V, Mezzano D. (2006) Circulating platelet-derived microparticles in systemic lupus erythematosus. Association with increased thrombin generation and procoagulant state. *Thromb Haemost*, 95: 94-99.

55. Knijff-Dutmer EA, Koerts J, Nieuwland R, Kalsbeek-Batenburg EM, van de Laar MA. (2002) Elevated levels of platelet microparticles are associated with disease activity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 46: 1498-1503.

56. Berckmans RJ, Nieuwland R, Tak PP, Boing AN, Romijn FP, Kraan MC, Breedveld FC, Hack CE, Sturk A. (2002) Cell-derived microparticles in synovial fluid from inflamed arthritic joints support coagulation exclusively via a factor VII-dependent mechanism. *Arthritis Rheum*, 46: 2857-2866.

57. Skriner K, Adolph K, Jungblut PR, Burmester GR. (2006) Association of citrullinated proteins with synovial exosomes. *Arthritis Rheum*, 54: 3809-3814.

58. Boilard E, Nigrovic PA, Larabee K, Watts GF, Coblyn JS, Weinblatt ME, Massarotti EM, Remold-O'Donnell E, Farndale RW, Ware J, Lee DM. (2010) Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science*, 327: 580-583.

59. Messer L, Alsaleh G, Freyssinet JM, Zobairi F, Leray I, Gottenberg JE, Sibilia J, Toti-Orfanoudakis F, Wachsmann D. (2009) Microparticle-induced release of B-lymphocyte regulators by rheumatoid synoviocytes. *Arthritis Res Ther*, 11: R40.

60. Nomura S, Inami N, Ozaki Y, Kagawa H, Fukuhara S. (2008) Significance of microparticles in progressive systemic sclerosis with interstitial pneumonia. *Platelets*, 19: 192-198.

61. Guiducci S, Distler JH, Jungel A, Huscher D, Huber LC, Michel BA, Gay RE, Pisetsky DS, Gay S, Matucci-Cerinic M, Distler O. (2008) The relationship between plasma microparticles and disease manifestations in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*, 58: 2845-2853.

62. Klareskog L, Catrina AI, Paget S. (2009) Rheumatoid arthritis. *Lancet*, 373: 659-672.

63. Mammen AL. (2011) Autoimmune myopathies: autoantibodies, phenotypes and pathogenesis. *Nat Rev Neurol*, 7: 343-354.
64. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, 3rd, Birnbaum NS, Burmester GR, Bykerk VP, Cohen MD, Combe B, Costenbader KH, Dougados M, Emery P, Ferraccioli G, Hazes JM, Hobbs K, Huizinga TW, Kavanaugh A, Kay J, Kvien TK, Laing T, Mease P, Menard HA, Moreland LW, Naden RL, Pincus T, Smolen JS, Stanislawska-Biernat E, Symmons D, Tak PP, Upchurch KS, Vencovsky J, Wolfe F, Hawker G. (2010) 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis*, 69: 1580-1588.
65. Nienhuis RL, Mandema E. (1964) A New Serum Factor in Patients with Rheumatoid Arthritis; the Antiperinuclear Factor. *Ann Rheum Dis*, 23: 302-305.
66. Young BJ, Mallya RK, Leslie RD, Clark CJ, Hamblin TJ. (1979) Anti-keratin antibodies in rheumatoid arthritis. *Br Med J*, 2: 97-99.
67. Simon M, Girbal E, Sebbag M, Gomes-Daudrix V, Vincent C, Salama G, Serre G. (1993) The cytokeratin filament-aggregating protein filaggrin is the target of the so-called "antikeratin antibodies," autoantibodies specific for rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*, 92: 1387-1393.
68. Union A, Meheus L, Humbel RL, Conrad K, Steiner G, Moereels H, Pottel H, Serre G, De Keyser F. (2002) Identification of citrullinated rheumatoid arthritis-specific epitopes in natural filaggrin relevant for antifilaggrin autoantibody detection by line immunoassay. *Arthritis Rheum*, 46: 1185-1195.
69. Masson-Bessiere C, Sebbag M, Girbal-Neuhauser E, Nogueira L, Vincent C, Senshu T, Serre G. (2001) The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific antifilaggrin autoantibodies are deiminated forms of the alpha- and beta-chains of fibrin. *J Immunol*, 166: 4177-4184.
70. Szekanecz Z, Soos L, Szabo Z, Fekete A, Kapitany A, Vegvari A, Sipka S, Szucs G, Szanto S, Lakos G. (2008) Anti-citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: as good as it gets? *Clin Rev Allergy Immunol*, 34: 26-31.
71. Soos L, Szekanecz Z, Szabo Z, Fekete A, Zeher M, Horvath IF, Danko K, Kapitany A, Vegvari A, Sipka S, Szegedi G, Lakos G. (2007) Clinical evaluation of

anti-mutated citrullinated vimentin by ELISA in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 34: 1658-1663.

72. Vossenaar ER, Zendman AJ, van Venrooij WJ, Pruijn GJ. (2003) PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease. *Bioessays*, 25: 1106-1118.

73. Foulquier C, Sebbag M, Clavel C, Chapuy-Regaud S, Al Badine R, Mechin MC, Vincent C, Nachat R, Yamada M, Takahara H, Simon M, Guerrin M, Serre G. (2007) Peptidyl arginine deiminase type 2 (PAD-2) and PAD-4 but not PAD-1, PAD-3, and PAD-6 are expressed in rheumatoid arthritis synovium in close association with tissue inflammation. *Arthritis Rheum*, 56: 3541-3553.

74. Gyorgy B, Toth E, Tarcsa E, Falus A, Buzas EI. (2006) Citrullination: a posttranslational modification in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 38: 1662-1677.

75. Baka Z, Gyorgy B, Geher P, Buzas E, Falus A, Nagy G. (2012) Citrullination under physiological and pathological conditions. *Joint Bone Spine*, in press

76. James EA, Moustakas AK, Bui J, Papadopoulos GK, Bondinas G, Buckner JH, Kwok WW. (2010) HLA-DR1001 presents "altered-self" peptides derived from joint-associated proteins by accepting citrulline in three of its binding pockets. *Arthritis Rheum*, 62: 2909-2918.

77. Snir O, Widhe M, von Spee C, Lindberg J, Padyukov L, Lundberg K, Engstrom A, Venables PJ, Lundeberg J, Holmdahl R, Klareskog L, Malmstrom V. (2009) Multiple antibody reactivities to citrullinated antigens in sera from patients with rheumatoid arthritis: association with HLA-DRB1 alleles. *Ann Rheum Dis*, 68: 736-743.

78. Zhao X, Okeke NL, Sharpe O, Batliwalla FM, Lee AT, Ho PP, Tomooka BH, Gregersen PK, Robinson WH. (2008) Circulating immune complexes contain citrullinated fibrinogen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 10: R94.

79. Hill JA, Bell DA, Brintnell W, Yue D, Wehrli B, Jevnikar AM, Lee DM, Hueber W, Robinson WH, Cairns E. (2008) Arthritis induced by posttranslationally modified (citrullinated) fibrinogen in DR4-IE transgenic mice. *J Exp Med*, 205: 967-979.

80. Lundberg K, Nijenhuis S, Vossenaar ER, Palmblad K, van Venrooij WJ, Klareskog L, Zendman AJ, Harris HE. (2005) Citrullinated proteins have increased

immunogenicity and arthritogenicity and their presence in arthritic joints correlates with disease severity. *Arthritis Res Ther*, 7: R458-467.

81. Bowes J, Barton A. (2008) Recent advances in the genetics of RA susceptibility. *Rheumatology (Oxford)*, 47: 399-402.

82. Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. (1987) The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 30: 1205-1213.

83. van der Helm-van Mil AH, Huizinga TW, Schreuder GM, Breedveld FC, de Vries RR, Toes RE. (2005) An independent role of protective HLA class II alleles in rheumatoid arthritis severity and susceptibility. *Arthritis Rheum*, 52: 2637-2644.

84. van der Helm-van Mil AH, Verpoort KN, Breedveld FC, Huizinga TW, Toes RE, de Vries RR. (2006) The HLA-DRB1 shared epitope alleles are primarily a risk factor for anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and are not an independent risk factor for development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 54: 1117-1121.

85. Begovich AB, Carlton VE, Honigberg LA, Schrodi SJ, Chokkalingam AP, Alexander HC, Ardlie KG, Huang Q, Smith AM, Spoerke JM, Conn MT, Chang M, Chang SY, Saiki RK, Catanese JJ, Leong DU, Garcia VE, McAllister LB, Jeffery DA, Lee AT, Batliwalla F, Remmers E, Criswell LA, Seldin MF, Kastner DL, Amos CI, Sninsky JJ, Gregersen PK. (2004) A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet*, 75: 330-337.

86. Padyukov L, Silva C, Stolt P, Alfredsson L, Klareskog L. (2004) A gene-environment interaction between smoking and shared epitope genes in HLA-DR provides a high risk of seropositive rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 50: 3085-3092.

87. Linn-Rasker SP, van der Helm-van Mil AH, van Gaalen FA, Kloppenburg M, de Vries RR, le Cessie S, Breedveld FC, Toes RE, Huizinga TW. (2006) Smoking is a risk factor for anti-CCP antibodies only in rheumatoid arthritis patients who carry HLA-DRB1 shared epitope alleles. *Ann Rheum Dis*, 65: 366-371.

88. Pedersen M, Jacobsen S, Klarlund M, Pedersen BV, Wiik A, Wohlfahrt J, Frisch M. (2006) Environmental risk factors differ between rheumatoid arthritis with and

without auto-antibodies against cyclic citrullinated peptides. *Arthritis Res Ther*, 8: R133.

89. Lee DM, Phillips R, Hagan EM, Chibnik LB, Costenbader KH, Schur PH. (2009) Quantifying anti-cyclic citrullinated peptide titres: clinical utility and association with tobacco exposure in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 68: 201-208.

90. Klareskog L, Stolt P, Lundberg K, Kallberg H, Bengtsson C, Grunewald J, Ronnelid J, Harris HE, Ulfgren AK, Rantapaa-Dahlqvist S, Eklund A, Padyukov L, Alfredsson L. (2006) A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum*, 54: 38-46.

91. Pedersen M, Jacobsen S, Garred P, Madsen HO, Klarlund M, Svejgaard A, Pedersen BV, Wohlfahrt J, Frisch M. (2007) Strong combined gene-environment effects in anti-cyclic citrullinated peptide-positive rheumatoid arthritis: a nationwide case-control study in Denmark. *Arthritis Rheum*, 56: 1446-1453.

92. van der Helm-van Mil AH, Verpoort KN, le Cessie S, Huizinga TW, de Vries RR, Toes RE. (2007) The HLA-DRB1 shared epitope alleles differ in the interaction with smoking and predisposition to antibodies to cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum*, 56: 425-432.

93. Verpoort KN, Papendrecht-van der Voort EA, van der Helm-van Mil AH, Jol-van der Zijde CM, van Tol MJ, Drijfhout JW, Breedveld FC, de Vries RR, Huizinga TW, Toes RE. (2007) Association of smoking with the constitution of the anti-cyclic citrullinated peptide response in the absence of HLA-DRB1 shared epitope alleles. *Arthritis Rheum*, 56: 2913-2918.

94. Michou L, Teixeira VH, Pierlot C, Lasbleiz S, Bardin T, Dieude P, Prum B, Cornelis F, Petit-Teixeira E. (2008) Associations between genetic factors, tobacco smoking and autoantibodies in familial and sporadic rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 67: 466-470.

95. Lee HS, Irigoyen P, Kern M, Lee A, Batliwalla F, Khalili H, Wolfe F, Lum RF, Massarotti E, Weisman M, Bombardier C, Karlson EW, Criswell LA, Vlietinck R, Gregersen PK. (2007) Interaction between smoking, the shared epitope, and anti-cyclic

citruillinated peptide: a mixed picture in three large North American rheumatoid arthritis cohorts. *Arthritis Rheum*, 56: 1745-1753.

96. Mikuls TR, Hughes LB, Westfall AO, Holers VM, Parrish L, van der Heijde D, van Everdingen M, Alarcon GS, Conn DL, Jonas B, Callahan LF, Smith EA, Gilkeson G, Howard G, Moreland LW, Bridges SL, Jr. (2008) Cigarette smoking, disease severity and autoantibody expression in African Americans with recent-onset rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 67: 1529-1534.

97. Masdottir B, Jonsson T, Manfredsdottir V, Vikingsson A, Brekkan A, Valdimarsson H. (2000) Smoking, rheumatoid factor isotypes and severity of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 39: 1202-1205.

98. Saag KG, Cerhan JR, Kolluri S, Ohashi K, Hunninghake GW, Schwartz DA. (1997) Cigarette smoking and rheumatoid arthritis severity. *Ann Rheum Dis*, 56: 463-469.

99. Nyhall-Wahlin BM, Jacobsson LT, Petersson IF, Turesson C. (2006) Smoking is a strong risk factor for rheumatoid nodules in early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 65: 601-606.

100. Struthers GR, Scott DL, Delamere JP, Sheppard H, Kitt M. (1981) Smoking and rheumatoid vasculitis. *Rheumatol Int*, 1: 145-146.

101. de Jonge WJ, Ulloa L. (2007) The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor as a pharmacological target for inflammation. *Br J Pharmacol*, 151: 915-929.

102. Green GM, Carolin D. (1967) The depressant effect of cigarette smoke on the in vitro antibacterial activity of alveolar macrophages. *N Engl J Med*, 276: 421-427.

103. Ortega E, Barriga C, Rodriguez AB. (1994) Decline in the phagocytic function of alveolar macrophages from mice exposed to cigarette smoke. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 17: 77-84.

104. Nguyen Van Binh P, Zhou D, Baudouin F, Martin C, Radionoff M, Dutertre H, Marchand V, Thevenin M, Warnet JM, Thien Duc H. (2004) Modulation of the primary and the secondary antibody response by tobacco smoke condensates. *Biomed Pharmacother*, 58: 527-530.

105. Yamaguchi E, Itoh A, Furuya K, Miyamoto H, Abe S, Kawakami Y. (1993) Release of tumor necrosis factor-alpha from human alveolar macrophages is decreased in smokers. *Chest*, 103: 479-483.

106. Choi JM, Cho YC, Cho WJ, Kim TS, Kang BY. (2008) Hydroquinone, a major component in cigarette smoke, reduces IFN-gamma production in antigen-primed lymphocytes. *Arch Pharm Res*, 31: 337-341.
107. Glossop JR, Dawes PT, Matthey DL. (2006) Association between cigarette smoking and release of tumour necrosis factor alpha and its soluble receptors by peripheral blood mononuclear cells in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 45: 1223-1229.
108. Petrescu F, Voican SC, Silosi I. (2010) Tumor necrosis factor-alpha serum levels in healthy smokers and nonsmokers. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 5: 217-222.
109. Hasnis E, Bar-Shai M, Burbea Z, Reznick AZ. (2007) Cigarette smoke-induced NF-kappaB activation in human lymphocytes: the effect of low and high exposure to gas phase of cigarette smoke. *J Physiol Pharmacol*, 58 Suppl 5: 263-274.
110. Baron JA, La Vecchia C, Levi F. (1990) The antiestrogenic effect of cigarette smoking in women. *Am J Obstet Gynecol*, 162: 502-514.
111. Kannel WB, Wolf PA, Castelli WP, D'Agostino RB. (1987) Fibrinogen and risk of cardiovascular disease. The Framingham Study. *JAMA*, 258: 1183-1186.
112. Pryor WA, Stone K, Zang LY, Bermudez E. (1998) Fractionation of aqueous cigarette tar extracts: fractions that contain the tar radical cause DNA damage. *Chem Res Toxicol*, 11: 441-448.
113. Kannel WB, D'Agostino RB, Belanger AJ. (1987) Fibrinogen, cigarette smoking, and risk of cardiovascular disease: insights from the Framingham Study. *Am Heart J*, 113: 1006-1010.
114. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. (2010) Rheumatoid arthritis. *Lancet*, 376: 1094-1108.
115. Xuzhu G, Komai-Koma M, Leung BP, Howe HS, McSharry C, McInnes IB, Xu D. (2012) Resveratrol modulates murine collagen-induced arthritis by inhibiting Th17 and B-cell function. *Ann Rheum Dis*, 71: 129-135.
116. Schulze J, Bickert T, Beil FT, Zaiss MM, Albers J, Wintges K, Streichert T, Klaetschke K, Keller J, Hissnauer TN, Spiro AS, Gessner A, Schett G, Amling M, McKenzie AN, Horst AK, Schinke T. (2011) Interleukin-33 is expressed in differentiated osteoblasts and blocks osteoclast formation from bone marrow precursor cells. *J Bone Miner Res*, 26: 704-717.

117. Morita Y, Kitaura H, Yoshimatsu M, Fujimura Y, Kohara H, Eguchi T, Yoshida N. (2010) IL-18 inhibits TNF-alpha-induced osteoclastogenesis possibly via a T cell-independent mechanism in synergy with IL-12 in vivo. *Calcif Tissue Int*, 86: 242-248.
118. Chen L, Wei XQ, Evans B, Jiang W, Aeschlimann D. (2008) IL-23 promotes osteoclast formation by up-regulation of receptor activator of NF-kappaB (RANK) expression in myeloid precursor cells. *Eur J Immunol*, 38: 2845-2854.
119. Volin MV, Koch AE. (2011) Interleukin-18: a mediator of inflammation and angiogenesis in rheumatoid arthritis. *J Interferon Cytokine Res*, 31: 745-751.
120. Choi YS, Choi HJ, Min JK, Pyun BJ, Maeng YS, Park H, Kim J, Kim YM, Kwon YG. (2009) Interleukin-33 induces angiogenesis and vascular permeability through ST2/TRAF6-mediated endothelial nitric oxide production. *Blood*, 114: 3117-3126.
121. Lundy SK, Sarkar S, Tesmer LA, Fox DA. (2007) Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. T lymphocytes. *Arthritis Res Ther*, 9: 202.
122. Lubberts E, Koenders MI, van den Berg WB. (2005) The role of T-cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: lessons from animal models. *Arthritis Res Ther*, 7: 29-37.
123. Chabaud M, Durand JM, Buchs N, Fossiez F, Page G, Frappart L, Miossec P. (1999) Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum*, 42: 963-970.
124. Morgan ME, Flierman R, van Duivenvoorde LM, Witteveen HJ, van Ewijk W, van Laar JM, de Vries RR, Toes RE. (2005) Effective treatment of collagen-induced arthritis by adoptive transfer of CD25+ regulatory T cells. *Arthritis Rheum*, 52: 2212-2221.
125. Brennan FM, Chantry D, Jackson A, Maini R, Feldmann M. (1989) Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis. *Lancet*, 2: 244-247.
126. Mussener A, Litton MJ, Lindroos E, Klareskog L. (1997) Cytokine production in synovial tissue of mice with collagen-induced arthritis (CIA). *Clin Exp Immunol*, 107: 485-493.

127. Tak PP, Smeets TJ, Daha MR, Kluin PM, Meijers KA, Brand R, Meinders AE, Breedveld FC. (1997) Analysis of the synovial cell infiltrate in early rheumatoid synovial tissue in relation to local disease activity. *Arthritis Rheum*, 40: 217-225.
128. Keffer J, Probert L, Cazlaris H, Georgopoulos S, Kaslaris E, Kioussis D, Kollias G. (1991) Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J*, 10: 4025-4031.
129. Thorbecke GJ, Shah R, Leu CH, Kuruvilla AP, Hardison AM, Palladino MA. (1992) Involvement of endogenous tumor necrosis factor alpha and transforming growth factor beta during induction of collagen type II arthritis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89: 7375-7379.
130. Williams RO, Feldmann M, Maini RN. (1992) Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89: 9784-9788.
131. Feldmann M, Maini RN. (2002) Discovery of TNF-alpha as a therapeutic target in rheumatoid arthritis: preclinical and clinical studies. *Joint Bone Spine*, 69: 12-18.
132. Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG, Tak PP. (2008) Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther*, 117: 244-279.
133. Chan AC, Carter PJ. (2010) Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation. *Nat Rev Immunol*, 10: 301-316.
134. Hill CL, Zhang Y, Sigurgeirsson B, Pukkala E, Mellemkjaer L, Airio A, Evans SR, Felson DT. (2001) Frequency of specific cancer types in dermatomyositis and polymyositis: a population-based study. *Lancet*, 357: 96-100.
135. Constantin T, Ponyi A, Orban I, Molnar K, Derafalvi B, Dicso F, Kalovics T, Muller J, Garami M, Sallai A, Balogh Z, Szalai Z, Fekete G, Danko K. (2006) National registry of patients with juvenile idiopathic inflammatory myopathies in Hungary--clinical characteristics and disease course of 44 patients with juvenile dermatomyositis. *Autoimmunity*, 39: 223-232.
136. Bohan A, Peter JB. (1975) Polymyositis and dermatomyositis (second of two parts). *N Engl J Med*, 292: 403-407.
137. Bohan A, Peter JB. (1975) Polymyositis and dermatomyositis (first of two parts). *N Engl J Med*, 292: 344-347.

138. Sultan SM, Isenberg DA. (2010) Re-classifying myositis. *Rheumatology (Oxford)*, 49: 831-833.
139. Gunawardena H, Betteridge ZE, McHugh NJ. (2009) Myositis-specific autoantibodies: their clinical and pathogenic significance in disease expression. *Rheumatology (Oxford)*, 48: 607-612.
140. Hirakata M. (2005) Autoantibodies to aminoacyl-tRNA synthetases. *Intern Med*, 44: 527-528.
141. Wang HB, Zhang Y. (2001) Mi2, an auto-antigen for dermatomyositis, is an ATP-dependent nucleosome remodeling factor. *Nucleic Acids Res*, 29: 2517-2521.
142. Fujita N, Jaye DL, Geigerman C, Akyildiz A, Mooney MR, Boss JM, Wade PA. (2004) MTA3 and the Mi-2/NuRD complex regulate cell fate during B lymphocyte differentiation. *Cell*, 119: 75-86.
143. Williams CJ, Naito T, Arco PG, Seavitt JR, Cashman SM, De Souza B, Qi X, Keables P, Von Andrian UH, Georgopoulos K. (2004) The chromatin remodeler Mi-2beta is required for CD4 expression and T cell development. *Immunity*, 20: 719-733.
144. Arnett FC, Targoff IN, Mimori T, Goldstein R, Warner NB, Reveille JD. (1996) Interrelationship of major histocompatibility complex class II alleles and autoantibodies in four ethnic groups with various forms of myositis. *Arthritis Rheum*, 39: 1507-1518.
145. Karpati G, Pouliot Y, Carpenter S. (1988) Expression of immunoreactive major histocompatibility complex products in human skeletal muscles. *Ann Neurol*, 23: 64-72.
146. Nagaraju K, Raben N, Loeffler L, Parker T, Rochon PJ, Lee E, Danning C, Wada R, Thompson C, Bahtiyar G, Craft J, Hooft Van Huijsduijnen R, Plotz P. (2000) Conditional up-regulation of MHC class I in skeletal muscle leads to self-sustaining autoimmune myositis and myositis-specific autoantibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 9209-9214.
147. Nagaraju K, Casciola-Rosen L, Lundberg I, Rawat R, Cutting S, Thapliyal R, Chang J, Dwivedi S, Mitsak M, Chen YW, Plotz P, Rosen A, Hoffman E, Raben N. (2005) Activation of the endoplasmic reticulum stress response in autoimmune myositis: potential role in muscle fiber damage and dysfunction. *Arthritis Rheum*, 52: 1824-1835.
148. Behrens L, Kerschensteiner M, Misgeld T, Goebels N, Wekerle H, Hohlfeld R. (1998) Human muscle cells express a functional costimulatory molecule distinct from

B7.1 (CD80) and B7.2 (CD86) in vitro and in inflammatory lesions. *J Immunol*, 161: 5943-5951.

149. Wiendl H, Mitsdoerffer M, Schneider D, Melms A, Lochmuller H, Hohlfeld R, Weller M. (2003) Muscle fibres and cultured muscle cells express the B7.1/2-related inducible co-stimulatory molecule, ICOSL: implications for the pathogenesis of inflammatory myopathies. *Brain*, 126: 1026-1035.

150. Sugiura T, Kawaguchi Y, Harigai M, Takagi K, Ohta S, Fukasawa C, Hara M, Kamatani N. (2000) Increased CD40 expression on muscle cells of polymyositis and dermatomyositis: role of CD40-CD40 ligand interaction in IL-6, IL-8, IL-15, and monocyte chemoattractant protein-1 production. *J Immunol*, 164: 6593-6600.

151. Casciola-Rosen L, Nagaraju K, Plotz P, Wang K, Levine S, Gabrielson E, Corse A, Rosen A. (2005) Enhanced autoantigen expression in regenerating muscle cells in idiopathic inflammatory myopathy. *J Exp Med*, 201: 591-601.

152. Oppenheim JJ, Dong HF, Plotz P, Caspi RR, Dykstra M, Pierce S, Martin R, Carlos C, Finn O, Koul O, Howard OM. (2005) Autoantigens act as tissue-specific chemoattractants. *J Leukoc Biol*, 77: 854-861.

153. Isenberg DA, Allen E, Farewell V, Ehrenstein MR, Hanna MG, Lundberg IE, Oddis C, Pilkington C, Plotz P, Scott D, Vencovsky J, Cooper R, Rider L, Miller F. (2004) International consensus outcome measures for patients with idiopathic inflammatory myopathies. Development and initial validation of myositis activity and damage indices in patients with adult onset disease. *Rheumatology (Oxford)*, 43: 49-54.

154. Chang X, Han J, Pang L, Zhao Y, Yang Y, Shen Z. (2009) Increased PADI4 expression in blood and tissues of patients with malignant tumors. *BMC Cancer*, 9: 40.

155. Schellekens GA, Visser H, de Jong BA, van den Hoogen FH, Hazes JM, Breedveld FC, van Venrooij WJ. (2000) The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum*, 43: 155-163.

156. Szarka E, Babos F, Magyar A, Hudecz F, Nagy G, Sármay G. (2010) Identification of a new citrullinated epitope on filaggrin for the early diagnosis of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 69: A1.

157. Pap E, Pallinger E, Falus A, Kiss AA, Kittel A, Kovacs P, Buzas EI. (2008) T lymphocytes are targets for platelet- and trophoblast-derived microvesicles during pregnancy. *Placenta*, 29: 826-832.
158. Chang X, Han J. (2006) Expression of peptidylarginine deiminase type 4 (PAD4) in various tumors. *Mol Carcinog*, 45: 183-196.
159. Wang L, Chang X, Yuan G, Zhao Y, Wang P. (2010) Expression of peptidylarginine deiminase type 4 in ovarian tumors. *Int J Biol Sci*, 6: 454-464.
160. Baka Z, Barta P, Losonczy G, Krenacs T, Papay J, Szarka E, Sarmay G, Babos F, Magyar A, Geher P, Buzas EI, Nagy G. (2011) Specific expression of PAD4 and citrullinated proteins in lung cancer is not associated with anti-CCP antibody production. *Int Immunol*, 23: 405-414.
161. Dong S, Zhang Z, Takahara H. (2007) Estrogen-enhanced peptidylarginine deiminase type IV gene (PADI4) expression in MCF-7 cells is mediated by estrogen receptor-alpha-promoted transactors activator protein-1, nuclear factor-Y, and Sp1. *Mol Endocrinol*, 21: 1617-1629.
162. Szekanecz Z, Szekanecz E, Bako G, Shoenfeld Y. (2011) Malignancies in autoimmune rheumatic diseases - a mini-review. *Gerontology*, 57: 3-10.
163. Szekanecz E, Andras C, Sandor Z, Antal-Szalmas P, Szanto J, Tamasi L, Kiss E, Szekanecz Z. (2006) Malignancies and soluble tumor antigens in rheumatic diseases. *Autoimmun Rev*, 6: 42-47.
164. Lefevre S, Knedla A, Tennie C, Kampmann A, Wunrau C, Dinser R, Korb A, Schnaker EM, Tarner IH, Robbins PD, Evans CH, Sturz H, Steinmeyer J, Gay S, Scholmerich J, Pap T, Muller-Ladner U, Neumann E. (2009) Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. *Nat Med*, 15: 1414-1420.
165. Moscarello MA, Wood DD, Ackerley C, Boulias C. (1994) Myelin in multiple sclerosis is developmentally immature. *J Clin Invest*, 94: 146-154.
166. Musse AA, Li Z, Ackerley CA, Bienzle D, Lei H, Poma R, Harauz G, Moscarello MA, Mastronardi FG. (2008) Peptidylarginine deiminase 2 (PAD2) overexpression in transgenic mice leads to myelin loss in the central nervous system. *Dis Model Mech*, 1: 229-240.

167. Tanikawa C, Ueda K, Nakagawa H, Yoshida N, Nakamura Y, Matsuda K. (2009) Regulation of protein Citrullination through p53/PADI4 network in DNA damage response. *Cancer Res*, 69: 8761-8769.
168. Tuomi T, Heliövaara M, Palosuo T, Aho K. (1990) Smoking, lung function, and rheumatoid factors. *Ann Rheum Dis*, 49: 753-756.
169. Omary MB, Ku NO, Liao J, Price D. (1998) Keratin modifications and solubility properties in epithelial cells and in vitro. *Subcell Biochem*, 31: 105-140.
170. Risch A, Plass C. (2008) Lung cancer epigenetics and genetics. *Int J Cancer*, 123: 1-7.
171. Vaissiere T, Hung RJ, Zaridze D, Moukeria A, Cuenin C, Fasolo V, Ferro G, Paliwal A, Hainaut P, Brennan P, Tost J, Boffetta P, Herceg Z. (2009) Quantitative analysis of DNA methylation profiles in lung cancer identifies aberrant DNA methylation of specific genes and its association with gender and cancer risk factors. *Cancer Res*, 69: 243-252.
172. Wang J, Wilcken DE, Wang XL. (2001) Cigarette smoke activates caspase-3 to induce apoptosis of human umbilical venous endothelial cells. *Mol Genet Metab*, 72: 82-88.
173. Ishii T, Matsuse T, Igarashi H, Masuda M, Teramoto S, Ouchi Y. (2001) Tobacco smoke reduces viability in human lung fibroblasts: protective effect of glutathione S-transferase P1. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 280: L1189-1195.
174. Morissette MC, Parent J, Milot J. (2011) The emphysematous lung is abnormally sensitive to TRAIL-mediated apoptosis. *Respir Res*, 12: 105.
175. Benveniste O, Herson S, Salomon B, Dimitri D, Trebeden-Negre H, Jean L, Bon-Durand V, Antonelli D, Klatzmann D, Boyer O. (2004) Long-term persistence of clonally expanded T cells in patients with polymyositis. *Ann Neurol*, 56: 867-872.
176. Bradshaw EM, Orihuela A, McArdel SL, Salajegheh M, Amato AA, Hafler DA, Greenberg SA, O'Connor KC. (2007) A local antigen-driven humoral response is present in the inflammatory myopathies. *J Immunol*, 178: 547-556.
177. Brouwer R, Hengstman GJ, Vree Egberts W, Ehrfeld H, Bozic B, Ghirardello A, Grondal G, Hietarinta M, Isenberg D, Kalden JR, Lundberg I, Moutsopoulos H, Roux-Lombard P, Vencovsky J, Wikman A, Seelig HP, van Engelen BG, van Venrooij WJ.

(2001) Autoantibody profiles in the sera of European patients with myositis. *Ann Rheum Dis*, 60: 116-123.

178. Greenberg SA, Pinkus GS, Amato AA, Pinkus JL. (2007) Myeloid dendritic cells in inclusion-body myositis and polymyositis. *Muscle Nerve*, 35: 17-23.

179. Brogan PA, Shah V, Brachet C, Harnden A, Mant D, Klein N, Dillon MJ. (2004) Endothelial and platelet microparticles in vasculitis of the young. *Arthritis Rheum*, 50: 927-936.

180. Shirafuji T, Hamaguchi H, Higuchi M, Kanda F. (2009) Measurement of platelet-derived microparticle levels using an enzyme-linked immunosorbent assay in polymyositis and dermatomyositis patients. *Muscle Nerve*, 39: 586-590.

181. Distler JH, Jungel A, Huber LC, Seemayer CA, Reich CF, 3rd, Gay RE, Michel BA, Fontana A, Gay S, Pisetsky DS, Distler O. (2005) The induction of matrix metalloproteinase and cytokine expression in synovial fibroblasts stimulated with immune cell microparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 2892-2897.

182. Targoff IN. (2000) Update on myositis-specific and myositis-associated autoantibodies. *Curr Opin Rheumatol*, 12: 475-481.

12. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

12.1. A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

Baka Z, György B, Géher P, Buzás EI, Falus A, Nagy G. (2012) Citrullination under physiological and pathological conditions. *Joint Bone Spine*, in press. **IF: 2,460**

Baka Z, Barta P, Losonczy G, Krenács T, Pápay J, Szarka E, Sármay G, Babos F, Magyar A, Géher P, Buzás EI, A, Nagy G. (2011) Specific expression of PAD4 and citrullinated proteins in lung cancer is not associated with anti-CCP antibody production. *Int Immunol*, 23: 405-414. **IF: 3,301**

Baka Z, Senolt L, Vencovsky J, Mann H, Sebestyén SP, Kittel Á, Buzás E, Nagy G. (2010) Increased serum concentration of immune cell derived microparticles in polymyositis/dermatomyositis. *Immunol Lett*, 128: 124-130. **IF: 2,511**

Baka Z, Buzás E, Nagy G (2009) Smoking and rheumatoid arthritis: putting the pieces together. *Arthritis Res Ther*, 11: 238. **IF: 4,271**

12.2. A disszertációhoz nem kapcsolódó közlemények

Baka Z, Tóth S, Buzás I E, Falus A, Nagy G. (2011) A nem szerepe rheumatoid arthritisben. *Magyar Reumatológia*, 52: 91-95.

Baka Z, Nagy G. (2010) Nanoantitestek. *Magyar Reumatológia*, 51: 278-280.

Baka Z, Nagy G. (2010) Biomechanika kicsit más szemmel. *MediArt*, 3: 3-6.

Mendler L, **Baka Z**, Kovács-Simon A, Dux L. (2008) Androgens negatively regulate myostatin expression in an androgen-dependent skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*, 361: 37–242. **IF: 2,749**

Mendler L, Kiricsi M, Pintér L, **Baka Z**, Dux L. (2007) The regeneration of reinnervated rat soleus muscle is accompanied by fiber transition toward a faster phenotype. *J Histochem Cytochem*, 56: 111-123. **IF: 2,823**

Összesített impaktfaktor (csak eredeti közlemény): **11,384**

Összesített impaktfaktor (eredeti közlemény és összefoglaló cikk): **18,115**

13. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Először is témavezetőmnek, Dr. Nagy Györgynek szeretnék köszönetet mondani, hogy végig támogatta és koordinálta munkámat. Önállóságra tanított mind a kísérletek tervezése és kivitelezése, mind az eredmények kiértékelése terén, ami bár kihívást jelentett számomra, valahol épülésemre szolgált.

Hálával tartozom Prof. Dr. Buzás Editnek, aki mindig készséggel meghallgatta kísérleti ötleteinket, és tanácsaival előmozdította a munkát.

Köszönöm Falus András professzor úrnak, hogy lehetővé tette a PhD-programban való részvételemet.

A kísérleti munkában való segítségért a következő kollégáknak tartozom köszönettel:

dohányzástéma: Babos Fruzsina, Dr. Barta Péter, Prof. Dr. Géher Pál, Dr. Krenács Tibor, Prof. Dr. Losonczy György, Dr. Magyar Anna, Dr. Pápay Judit, Parsch Edit, Prof. Dr. Sármay Gabriella és Szarka Eszter;

mikrovezikula-téma: Dr. Kittel Ágnes, Dr. Herman Mann, Dr. Ladislav Senolt, Simonné Sebestyén Piroska és Prof. Dr. Jiri Vencovsky.

Hálával tartozom a diákkörös munkámban való segítségért Dr. Mandler Lucának és Prof. Dr. Dux Lászlónak.

Köszönöm családom folyamatos támogatását és gondoskodását.