

Immunfenotípus és rövid távú T-limfocita aktiváció spondilitisz ankilopoetikában és reumatoid artritiszben

Doktori értekezés

Dr. Szalay Balázs

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



- Témavezető: Dr. Balog Attila, Ph.D., egyetemi adjunktus
- Hivatalos bírálók: Dr. Nagy György, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Kitajka Klára, Ph.D., tudományos főmunkatárs
- Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Buzás Edit, az MTA doktora, egyetemi tanár
- Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Pállinger Éva, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Varga Viktor Sebestyén, Ph.D.

Budapest
2015

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
2. BEVEZETÉS	7
2.1. SPONDILITISZ ANKILOPOETIKA (AS)	8
2.2. REUMATOID ARTRITISZ (RA)	9
2.3. AZ IMMUNOLÓGIAI FOLYAMATOK SEJTES ELEMEI	11
2.3.1. <i>T-limfociták</i>	12
2.3.2. <i>CD4 és CD8 limfociták</i>	13
2.3.3. <i>Th1 és Th2 limfociták</i>	15
2.3.4. <i>Th17-sejtek</i>	17
2.3.5. <i>Regulátoros T-sejtek</i>	19
2.3.6. <i>Aktivációs markerek</i>	20
2.4. SEJTAKTIVÁCIÓ ÉS INTRACELLULÁRIS FOLYAMATOK	21
2.4.1. <i>Citoplazmatikus és mitokondriális kalcium</i>	22
2.4.2. <i>Szabadgyök képződés</i>	23
2.4.3. <i>Nitrogén monoxid termelés</i>	24
3. CÉLKITŰZÉS	25
4. MÓDSZEREK	26
4.1. EGÉSZSÉGES ÉS BETEG CSOPORTOK	26
4.1.1. <i>Spondilitisz ankilopoetika</i>	26
4.1.2. <i>Reumatoid artritisz</i>	26
4.1.3. <i>Egészséges kontrollok</i>	28
4.2. MINTA ELŐKÉSZÍTÉSE	28
4.3. SEJTFELSZÍNI FESTÉS	30
4.4. INTRACELLULÁRIS FESTÉS	31
4.5. MÉRÉS ÉS KIÉRTÉKELÉS	32
4.5.1. <i>Sejtprevalencia meghatározása</i>	32
4.5.2. <i>A kinetikus görbe jellemzése</i>	32
4.5.3. <i>Statisztikai analízis</i>	33

5. EREDMÉNYEK	34
5.1. SPONDILITISZ ANKILOPOETIKA	34
5.1.1. <i>Sejtprevalencia vizsgálatok</i>	34
5.1.2. <i>Funkcionális vizsgálatok</i>	36
5.2. REUMATOID ARTRITISZ	38
5.2.1. <i>Sejtprevalencia vizsgálatok</i>	38
5.2.2. <i>Funkcionális vizsgálatok</i>	40
6. MEGBESZÉLÉS	46
6.1. SPONDILITISZ ANKILOPOETIKA	46
6.1.1. <i>Sejtprevalencia vizsgálatok infliximab kezelés előtt</i>	46
6.1.2. <i>Sejtprevalencia vizsgálatok infliximab kezelés után</i>	47
6.1.3. <i>Funkcionális vizsgálatok infliximab kezelés előtt</i>	48
6.1.4. <i>Funkcionális vizsgálatok infliximab kezelés után</i>	50
6.2. REUMATOID ARTRITISZ	53
6.2.1. <i>Sejtprevalencia vizsgálatok korai RA-ban</i>	53
6.2.2. <i>Sejtprevalencia vizsgálatok késői RA-ban</i>	57
6.2.3. <i>Funkcionális vizsgálatok korai RA-ban</i>	62
6.2.4. <i>Funkcionális vizsgálatok késői RA-ban</i>	64
7. KÖVETKEZTETÉSEK	67
8. ÖSSZEFOGLALÁS	70
9. SUMMARY	71
10. IRODALOMJEGYZÉK	72
11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	87
11.1. AZ ÉRTEKEZÉSHEZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK	87
11.2. AZ ÉRTEKEZÉSHEZ NEM KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK	88
12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	92

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ADA	adalimumab
APC	antigén prezentáló sejt
AS	spondilitisz ankylopoetica
ATP	adenozin trifoszfát
AUC	görbe alatti terület
BASDAI	Bath spondilitisz ankilopoetika betegség aktivitási index
BD	Becton Dickinson
CaMK	kalmodulin-függő protein kináz
CD	cluster of differentiation
cit-Ca ²⁺	citoplazmatikus kalcium
CRAC	kalcium felszabadulás aktiválta kalcium csatorna
CRP	C-reaktív protein
CTLA-4	citotoxikus T-limfocita antigén-4
DAF-FM	4,5-diaminofluorescein
DAG	diacil-glicerol
DAS-28	betegség aktivitási pontszám (28 ízületre vonatkoztatva)
DHE	dihidroetidium
DMARD	betegségmódosító antireumatikus gyógyszer
DMSO	dimetil-szulfoxid
eNOS	endoteliális nitrogén monoxid szintetáz
ER	endoplazmás retikulum
ETA	etanercept
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FCS	fötális borjúsavó
FoxP3	forkhead box P3 transzkripció faktor
GCS	glükokortikoszteroid
GITR	glükokortikoid indukálta tumor nekrosis faktor receptor
HLA	humán leukocita antigén
IFN- γ	interferon-gamma
IFX	infliximab

IL	interleukin
iNOS	indukálható nitrogén-monoxid szintetáz
IP ₃	inozitol-1,4,5-triszfoszfát
iTreg	adaptív vagy indukált Treg
LF	leflunomid
Max	maximum érték
MCU	mitokondriális kalcium uniporter
MCV	mutated citrullinated vimentin
MHC	fő hisztokompatibilitási komplex
mit-Ca ²⁺	mitokondriális kalcium
MTX	metotrexát
NFAT	aktivált T-sejtek nukleáris faktora
NFκB	nukleáris faktor kappa B
NK-sejt	természetes ölő sejt
NKT-sejt	természetes ölő T sejt
nNOS	neuronális nitrogén monoxid szintetáz
NO	nitrogén monoxid
NOS	nitrogén monoxid szintetáz
NSAID	nem-szteroid gyulladáscsökkentő gyógyszer
nTreg	természetes regulátoros T-sejt
PBMC	perifériás vér mononukleáris sejt
PBS	foszfát-pufferelt fiziológiás sóoldat
PLC-γ	foszfolipáz C-gamma
PHA	fitohemagglutinin
PIP ₂	foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát
PKC	protein kináz C
PMCA	plazma membrán kalcium ATPáz
RA	reumatoid artritisz
RF	reumatoid faktor
RORγt	retinoic acid-related orphan receptor gamma t
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute medium
SERCA	szarko/endoplazmás retikulum kalcium ATPáz

SLE	szisztémás lupus erythematosus
SOCE	sejtraktárok által szabályozott kalcium beáramlás
SpA	spondilartropátia
STAT	szignál transzdukció és transzkripció
T-bet	T-box expressed in T-cells
Tc	citotoxikus T-sejt
TCR	T-sejt receptor
TGF- β	transzformáló növekedési faktor béta
Th	helper T-sejt
t_{\max}	a maximum elérésének ideje
TNF- α	tumor nekrozis faktor-alfa
Treg	regulátoros T-sejt

2. BEVEZETÉS

A reumatológiai kórképek patomechanizmusában a gyulladásnak kitüntetett szerepe van. Spondilitisz ankilopetikában (AS) és reumatoid artritiszben (RA) egyaránt megváltozik az immunrendszer működése, beleértve az adaptív immunfolyamatokat is.

Az adaptív immunrendszer központi elemét jelentik a CD4+ és a CD8+ T-limfociták. Ezek működése, aktivációja alapvetően meghatározza az (auto)immun folyamatok heveségét és irányát. AS és RA esetében több megfigyelés szerint is megváltozhat a CD4+ és CD8+ limfociták aránya, sejtes környezete, illetve működése. Azonban egyes keresztmetszeti vizsgálatokat leszámítva nincsenek olyan prospektív klinikai tanulmányok, melyek a CD4+ és a CD8+ sejtekre jellemző paramétereket a betegség lefolyásával és a kezelésre adott válasszal összefüggésben vizsgálták volna.

A sejtek prevalenciájának eltérései mellett feltételezhetően a sejtaktivációs folyamatok is eltérhetnek a normálistól, és így a sejtek funkciói módosulhatnak. A technikai nehézségek miatt azonban az ilyen irányú vizsgálatok száma meglehetősen korlátozott. A reumatológiai kórképek közül egyedül RA-ban voltak korábban olyan próbálkozások, melyek intracelluláris folyamatok jellemzésére irányultak.

PhD hallgatóként olyan potenciális biomarkerek kutatásában vettem részt, amelyeket különböző stádiumú, súlyosságú és/vagy módon kezelt AS-ben és RA-ban szenvedő betegekben vizsgáltunk. Munkám során a laboratóriumunkban kifejlesztett új áramlási citometriás technikák segítségével értékeltem ebben a két kórképben a betegre jellemző immunfenotípust, és a T-sejt funkció szempontjából kiemelkedő fontosságú intracelluláris folyamatokat.

Több betegcsoport bevonásával azonosítottunk olyan, az adaptív immunválaszt érintő eltéréseket, melyek az AS és az RA bizonyos stádiumában jelen lehetnek. Megfigyeléseink reményeink szerint segíthetik ezeknek a kórképeknek a jobb megértését, esetleg diagnosztikus és terápiás döntési célpontok azonosítását.

2.1. Spondilitisz ankilopoetika

A spondilitisz ankilopoetika (AS) vagy más néven Bechterew-kór egy krónikus gyulladással járó ízületi megbetegedés, a spondilarthritiszek legjellegzetesebb képviselője. Elsősorban a gerinc és a szakroiliakális (keresztcsonti-csípőcsonti) ízületet érinti. Perifériás ízületi aktivitás esetén általában asszimmetrikus, dominálónan alsó végtagi nagy ízületi gyulladásként jelentkezik (térd, boka, váll) [1]. A csigolyák ízületeinek krónikus gyulladása (spondilitisz) jellegzetesen a szalagok tapadási helyének gyulladásával, következményes szalagmeszesedéssel jár. Az enthesitis szintén jellegzetes extra-axiális klinikai eltérés AS-ben, mely az ínak tapadási helyének gyulladása. A gerinc krónikus gyulladásának kezdetben specifikus klinikai és radiomorfológiai jelei nincsenek. Az idő előrehaladtával azonban csontképződés indul el, ami végül a csigolyák közötti összeköttetések összeolvadását (ankilózis) és az ízületek teljes elmerevedését eredményezheti [2]. A betegség leggyakrabban 20 és 30 éves kor között jelentkezik és férfiakban 2-3-szor gyakoribb [3].

Az AS pontos patogenezise ismeretlen, egy immun-mediált krónikus gyulladással járó betegségnek tekinthető, amelyben a genetikai és a környezeti faktorok egyaránt szerepet játszanak. Szoros összefüggést mutat az MHC I-es típusba sorolható HLA-B27 sejtfelszíni genetikai markerrel [4]. Az AS szisztémás immun-mediált jellegére utal, hogy a betegség bármely szakában előfordulhatnak gyulladással járó reakciók és ezek a perifériás ízületek mellett egyéb szervekben is manifesztálódhatnak. Az axiális érintettség (AS) gyakran nem önálló entitás, hanem egy tágabb betegségcsoport a spondilartropátiába (SpA) tartozó valamelyik kórkép első klinikai jele. Ennek megfelelően az extra-artikuláris érintettség bőrtünet (arthritis pszoriátika), béltünet (enteropátiás arthritis), konjunktivitisz (reaktív arthritis), uveitis formájában a leggyakoribb [5]. A szisztémás jellegre utalnak azok az elváltozások is, melyeket a perifériás vér limfocitáiban figyeltek meg. AS-ben emelkedik a Th2 limfociták [6] valamint a Th17 sejtek aránya [7], az immun folyamatokat féken tartó regulátoros T-sejtek (Treg) prevalenciája pedig csökken [8]. Ezek az elváltozások a krónikus gyulladás fenntartásában, és így az AS patomechanizmusában fontos szerepet játszhatnak.

A sejtek prevalenciájának eltérései mellett feltételezhetően a sejtaktivációs folyamatok is eltérhetnek a normálistól AS-ben. RA-ban, egy szintén krónikus autoimmun reumatológiai betegségben ugyanis megfigyelték, hogy T-limfocitákban az intracelluláris nitrogén monoxid (NO) termelés fokozódott, a citoplazmatikus kalcium koncentráció pedig emelkedett volt [9]. Ez a megállapítás megerősítette azt az elképzelést, hogy autoimmun reumatológiai kórképekben a T-limfociták funkcionális eltérései a gyulladásos folyamat fenntartásában és a progresszióban is szerepet játszhatnak. AS-ben eddig hasonló vizsgálatokat nem végeztek, a T-limfociták intracelluláris folyamataival összefüggő rövid-távú funkcionális eltéréseit nem vizsgálták.

Az AS kezelése hosszú évtizedekig a fizioterápia és a sebészi beavatkozás mellett a nem szteroid gyulladáscsökkentő gyógyszerekre (NSAID) támaszkodott. [10]. Forradalmi változást jelentett a gyulladásos reumatológiai kórképek, így az AS kezelésében is a biológiai terápiás készítmények megjelenése. AS-ben a biológiai terápiás szerek közül egyelőre egyes tumor nekrosis faktor (TNF)- α gátló készítmények bizonyultak hatékonynak [3]. Az NSAID-okat elsősorban a tüneti kezelésre alkalmas szereknek tekintjük, melyek feltehetően a betegség lefolyását nem befolyásolják. Ezzel szemben a TNF- α gátlók a gyulladásos folyamatot fenntartó legfontosabb citokin hatását semlegesítik, ami potenciálisan a betegség progressziójára is hatással lehet (RA-ban a progressziót kedvezően befolyásolják). Az immunsejtek prevalenciáját módosító hatását olyan immun-mediált kórképekben igazolták, mint a Crohn-betegség [11], a colitis ulcerosa [12] vagy a RA [13]. A TNF- α gátlók immunfenotípust befolyásoló hatására AS-ben kevés irodalmi adat áll rendelkezésre

2.2. Reumatoid artritisz

A reumatoid arthritis a leggyakoribb krónikus autoimmun ízületi megbetegedés, amely a fejlett világban a felnőtt emberek 0.5– 1 %-t érinti [14,15]. Számos gén, környezeti faktor, autoantigén és sok tisztázatlan faktor játszik szerepet azokban a patológiai folyamatokban, amelyek végül az immunrendszer szisztémás aktivációját eredményezik [16]. A T-limfociták kóros működése központi szerepet játszik azokban az autoimmun folyamatokban, amelyek a RA kialakulásához vezetnek. Ezt támasztja alá

az a számos eltérés, melyet a különböző CD4+ és CD8+ sejtpopulációkban találtak. Ezek a sejttípusok fontos szerepet játszanak az immunválasz harmonizált működésében, RA-ban azonban a prevalenciájuk proinflammatorikus irányba tolódik. Kimutatták, hogy a Th1, a Th2 és a Th17 sejtek prevalenciája RA-ban emelkedik [6,13], míg a Treg-sejteké csökken [17] perifériás vérben. A proinflammatorikus citokinek (elsősorban a TNF- α , IL-1 és IL-6) fokozott termelése és a különböző proteázok aktivációja egy olyan kaszkádot eredményez, amely végső soron az ízületek erozív, destruktív károsodásához vezet. A folyamat első jele RA-ban a szinovitis, melyet az inak és a bursák gyulladása is kísérhet [18].

A gyógyszeres terápiás lehetőségek szélesebb arzenálja áll rendelkezésre RA-ban az AS-hez képest mind a hagyományos betegségmódosító antireumatikus gyógyszerek (DMARD, disease modifying antirheumatic drugs), mind a biológiai terápiás készítmények vonatkozásában. A legfontosabb DMARD terápiás szerek a metotrexát (MTX), a leflunomid (LF), a sulfasalazin és a chloroquin. A legtöbb klinikai vizsgálat a biológiai terápiás szereket szignifikánsan hatékonyabbnak írta le MTX-szel kombinálva, így az MTX az első vonalban választandó DMARD. A glükokortikoszteroidokat (GCS) általában átmenetileg a kezdeti aktivitáskor illetve relapszusok esetén alkalmazzuk. Az igen hatékony tüneti terápiás hatáson túl kedvező betegségmódosító hatásuk is ismert. Amennyiben a DMARD vagy kombinált DMARD terápia nem hatékony, biológiai terápiás készítmények választhatók. A biológiai terápia a gyulladáshoz vezető patomechanizmus egy jól ismert lépésének pontját támadja, tudatosan fejlesztett molekulák alkalmazását jelenti. A biológiai terápia elsődlegesen nagy molekulatömegű, fehérjetermészetű, általában monoklonális antitest vagy szolubilis receptorok alkalmazását jelenti. A biológiai terápia kifejezés helyett a célzott terápia elnevezés is elfogadott. A számtalan potenciális támadáspont és terápiás kísérlet közül az anti-citokin terápia, citokin receptor antagonisták, a B-sejt inhibitorok illetve a T-sejt kostimuláció gátlás kapcsán már a mindennapi gyógyítás számára is elérhető terápiás készítményekkel rendelkezünk. A biológiai terápia bevezetése óta eltelt több mint két évtized alatt az első vonalbeli alkalmazást továbbra is a TNF- α gátlók jelentik. A TNF- α központi szerepe az RA patogenezisében régóta közzismert, de a hatékony gátlására a biológiai terápia megjelenéséig nem volt lehetőség. Világszerte a legrégebben bevezetett három klasszikus TNF- α blokkoló az infliximab (IFX), az etanercept (ETA)

és az adalimumab (ADA). (További továbbfejlesztett szerek (golimumab, certolzumab) is rendelkezésre állnak, de ezek a tézis alapjául szolgáló kísérletek megkezdésekor még nem álltak rendelkezésre.) Bár mindhárom klasszikus készítmény feladata, hogy megakadályozza a TNF- α kötődését a receptorához és hogy ezáltal kifejtse a hatását, apró eltérések mégis mutatkoznak. Az IFX egy egér/humán kiméra monoklonális antitest, az ADA egy tisztán humán monoklonális antitest, az ETA pedig egy fúziós fehérje, mely szolubilis TNF- α receptorként működik. Terápiás hatásuk egyenértékűnek tekinthető és jól működnek egymás alternatívájaként, azért apró hatásbeli különbségek, egyéni reakciók és mellékhatások mégis mutatkoznak [19,20].

2.3. Az immunológiai folyamatok sejtjes elemei

Az immunrendszer pontos megértéséhez vezető út egyik kulcs momentuma Jim Gowans nevéhez fűződik, aki 1962-ben leírta a klonális szelekcióban résztvevő limfocitákat és ezzel megalapozta az adaptív immunitás tudományát [21]. Ezt követően a limfociták nagyobb csoportjaira is fény derült, és funkciójuk alapján a humorális immunitásért felelős B-limfocitákra, valamint a sejt-mediált immunitásban fontos szerepet játszó T-limfocitákra osztották őket [22]. Már a 70-es években sikerült felismerni, hogy ez a felosztás is pontosításra szorul, ugyanis sok különböző sejt van egy csoportba sorolva. A felszíni antigének vizsgálatával a sejtek azonosítása, ill. megismerése jelentősen felgyorsult és elkezdtek leírni a különböző limfocita alcsoportokat, elsőként a CD4+ helper (Th) és a CD8+ citotoxikus T-limfocitákat (Tc) [23]. Egy további mérföldkő volt Mosmann és Coffman 1989-es felfedezése, akik a helper T-sejtek alcsoportjait különítették el a citokin termelésük alapján, így létrejött a Th1 és Th2 típusú sejtek koncepciója [24]. A sejtek azonosítása azóta is töretlenül zajlik, a folyamatosan bővülő tárházunk pedig ma már elképzelhetetlen lenne olyan sejtek nélkül, mint a regulátoros T-sejtek vagy a Th17 sejtek.

2.3.1. T-limfociták

A limfociták kétharmadát kitevő T-limfociták (T-sejtek) a sejt-mediálta immunválasz legfontosabb képviselői. A B-limfocitákkal együtt képesek specifikusan felismerni és elpusztítani a szervezet számára idegen anyagokat és sejteket.

Nevüket onnan kapták, hogy a csontvelőben képződött multipotens limfoid progenitor sejtek átkerülnek a thymusba (csecsemőmirigy) és itt alakulnak át érett T-sejtekké. Az érés során alakulnak ki a különböző receptorok, melyek alapján eddig több száz féle T-limfocitát azonosítottak. Innen a naiv, azaz antigénnel még nem találkozott T-sejtek a vérbe, a nyirokkeringésbe és a nyirokszervekbe vándorolnak, ahol szükség esetén a megfelelő stimulus hatására aktiválódnak [25]. Közös jellemzőjük a T-sejt receptor (TCR), mely az antitestekhez hasonló szerkezetű molekula, azonban míg az antitestek homodimer szerkezetűek, addig a TCR két glikoprotein láncból felépülő heterodimer. Ez a T-sejtek 90-95%-ban egy alfa (α) és egy béta (β) láncból áll, a maradék 5-10%-ban pedig egy gamma (γ) és egy delta (δ) láncból [26]. Az utóbbi $\gamma\delta$ sejtek a veleszületett és az adaptív immunitás közti kapcsolatban játszanak szerepet, jelentőségük pedig egyre több kórképben (fertőzés, malignus betegségek) kerül felismerésre [27]. Munkánk során a $\gamma\delta$ sejteket nem vizsgáltuk, így a dolgozatban a T-sejt kifejezés az $\alpha\beta$ T-limfocitákat jelöli.

A TCR felelős az antigének specifikus felismeréséért, mely az adaptív immunválasz alapját képezi. A T-sejtek csak a fő hisztokompatibilitási komplexhez (MHC, emberben humán leukocita antigén – HLA) kötött antigéneket képesek felismerni, a szolubilis antigéneket nem. Az MHC molekulákat a funkciójuk és az elhelyezkedésük alapján két nagy csoportra oszthatjuk. Az MHC-I osztályú molekulák minden sejtmaggal rendelkező sejt felszínén megtalálhatóak és azokat az antigéneket kötik, amelyek a citoplazmatikusan degradált fehérjékből származnak. Ezzel az intracelluláris patogénekre (pl. vírusok) hívják fel a figyelmet. Az MHC-II molekulák ezzel szemben az exogén eredetű antigéneket kötik és csak bizonyos sejteken expresszálódnak. Főleg az antigén prezentáló sejteken (APC), mint a dendritikus sejtek, a makrofágok ill. a B-sejtek [28].

2.3.2. CD4 és CD8 limfociták

A T-limfociták aktivációjának első lépése, hogy a TCR felismerje és kötődjön az MHC molekulához (és az antigénhez). Ez a kötődés azonban a receptorok alacsony affinitása miatt nem lenne elegendő a T-sejtek aktivációjához, ezért a folyamatot koreceptorok egészítik ki. A legfontosabb koreceptorok a T-sejtek felszínén található CD4 vagy CD8 molekula. Az MHC I-hez kizárólag a CD8 koreceptor, az MHC II.-höz pedig kizárólag a CD4 képes kötődni. A T-sejtek érésük során kezdetben egyik koreceptorral sem rendelkeznek, később mindkettő megtalálható a felszínükön, de még a sejtek perifériára való kikerülése előtt kisselektálódnak a kettős pozitív és a mindkét receptora negatív sejtek (kettős negatív). A folyamat végén a CD4 receptortal rendelkező sejtek lesznek a helper T-sejtek, míg a CD8 receptort hordozók lesznek a citotoxikus T-sejtek [29]. Újabb kutatások szerint azonban ez a szelekció nem minden esetben történik meg, ugyanis CD4-re és CD8-ra kettős negatív illetve kettős pozitív sejtek nem csak köztes alakként funkcionálnak a T-sejtek érése során, hanem mint érett effektor sejtek a periférián és a nyirokszervekben is megtalálhatóak. A periférián a T-sejtek kb. 1%-át kitevő kettős negatív limfocitákról kimutatták, hogy főleg citokinek termelése révén szerepük lehet autoimmun betegségekben, gyulladásban, fertőzésben és daganatokban azáltal, hogy képesek az immunválaszt serkenteni vagy a megfelelő stimulus hatására gátolni [30]. Ennek a kettős hatásnak a szabályozása még vizsgálat tárgyát képezi. A kettős pozitív sejtekről még ennél is kevesebb ismeret áll rendelkezésre, de az esetükben is leírták immunszuprimáló hatásukat [31] amellet, hogy citotoxikus képességekkel is bírnak [32]. A perifériás vérben és a másodlagos nyirokszervekben található T-sejtek azonban főleg egyszeresen pozitív CD4 (60-70%) vagy CD8 sejtek (30-40%).

A **CD4+ helper** T-sejteknek fontos szerepük van az immunválasz beindításában. Az adaptív immunrendszer minden folyamatában részt vesznek, így mint egy karmester szabályozzák a kialakuló immunválaszt. Ahogy a nevük is sugallja, segítenek a többi sejtnak, hogy effektor sejtekké differenciálódjanak és ezáltal ellássák feladatukat. Elsősorban citokinek termelése révén, de közvetlen sejt-sejt kapcsolat által is segítik a B-limfociták antitest termelődését, növelik a makrofágok fagocitáló képességét és részt vesznek a CD8 citotoxikus T-sejtek aktivációjában. További fontos szerepük a

patogénnel szembeni immunológiai memória kialakításában van [33]. A legújabb vizsgálatok alapján úgy tűnik, hogy a jól ismert helper funkció nem kizárólagos tulajdonságuk a CD4 sejteknek. Megfigyelték, hogy antigén aktivációt követően a CD4 helper sejtek egy csoportja transzkripciós faktoraik gátlása révén képes átprogramozni magát úgy, hogy citotoxikus feladatokat is ellásson. Mindezt úgy, hogy a CD4 koreceptor továbbra is kifejeződik a sejtmembránon [34].

A CD4+ helper T-sejtek működéséhez elengedhetetlen, hogy előbb maguk is effektor sejtekké differenciálódjanak. Az immunsejtek érése során keletkező naiv (antigénnel még nem találkozott) CD4+ helper limfociták aktiválása az APC felszínén történik. A nyugvó naiv sejtek citokint alig termelnek, az aktivációt követően azonban IL-2-t szekretáló Th0 sejtekké alakulnak át. A Th0 sejtek a környezet szignáljaira reagálva különböző irányokba képesek tovább differenciálódni. In vitro körülmények között a citokinek változtatásával lehet szabályozni, hogy a CD4+ Th0 sejtek milyen effektor sejtekké differenciálódjanak. In vivo azonban ennél lényegesen összetettebb folyamatról van szó. A citokinek mellett transzkripciós faktorok, epigenetikai mechanizmusok és a mikro RNS-ek is befolyásolják a Th0 sejt differenciálódását. Ezeknek a hatásoknak a végeredményeként a Th0 sejtek számos, egymástól jól elkülöníthető funkcióval bíró effektor sejtekké differenciálódhatnak. Ide tartoznak többek közt a Th1-sejtek, a Th2 sejtek, a Th17-sejtek és a regulátoros T-sejtek (1.ábra). Részletes ismertetésüket lásd később.

A T-limfociták másik nagy csoportját a **CD8+ citotoxikus T-sejtek** alkotják. Ezek a sejtek az intracelluláris patogénnel (vírus, baktérium, paraziták) szemben jelentenek védelmet azért, hogy a megfertőződött sejtet közvetlenül pusztítsák el. A patogénből származó antigének a sejtben belül kapcsolódnak az MHC I-hez és így helyeződnek ki a sejt felszínre. A citotoxikus T-sejt ezt felismerve aktiválódik és válik effektor sejtté. Mivel MHC I-et szinte minden magvas sejt expresszál, a Tc-sejtek majdnem minden sejtet képesek felismerni és szükség szerint elpusztítani. A fertőzött sejtek eliminálása 2 fő mechanizmussal történik. Az egyik lehetőség, hogy a Tc-sejt kiüríti citoplazmatikus granulumait, amelyből felszabadulnak a perforinok és a granzimek. A perforinok a célsejt membránjába ágyazódva pórusokat hoznak létre, melyeken keresztül a granzimek bejutnak a célsejtbe. A granzimek, mint szerin proteázok a kaspáz kaskádát aktiválják, ami a sejt apoptózisához vezet [35,36]. A

másik lehetőség a célsejt elpusztítására a Fas receptor aktiválása. A citotoxikus T-sejtek aktiválódása során megnő a Fas ligand expressziója, ami a célsejten található Fas receptorhoz kötődve szintén apoptózist indukál a fertőzött sejtben [37]. A CD8 sejteknek 2 altípusát lehet elkülöníteni, a IFN- γ termelő Tc1-et és az IL-4 termelő Tc2-t [38]. Mindkettő a Tc-sejtekhez hasonló feladatot lát el, a pontos szerepük azonban még nem tisztázott. Az bizonyos, hogy az autoimmun kórképekre a CD8 sejtek kiszámíthatatlan hatással bírnak ami feltehetően összefügg citokintermelésükkel is. A CD8 sejtek képesek az autoimmun betegségeket elindítani, támogatni, máskor akár gátolni [39].

2.3.3. Th1 és Th2 limfociták

Az utóbbi évtizedekben a CD4⁺ helper T-sejteken belül számos alcsoportot sikerült elkülöníteni, melyek mind a naiv Th0 sejtek differenciálódása során keletkeznek. Ezek közül elsőként, 1989-ben az eltérő citokin termelésük alapján a Th1 és Th2 limfocitákat írták le [24].

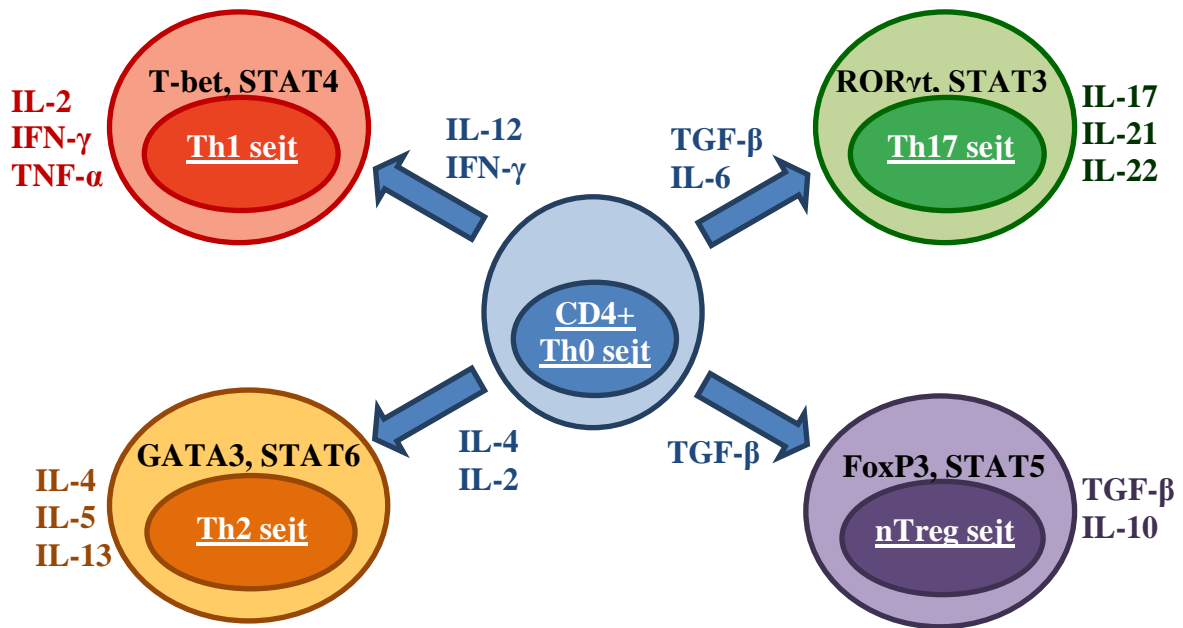
A **Th1 sejtek** az IL-12 és a IFN- γ jelenlétében alakulnak ki és kezdenek proliferálni. Az IL-12-t az APC-k termelik nagy mennyiségben, ami az NK-sejtek IFN- γ szekrécióját is serkenti. Th1 sejtek differenciálódásához a citokinek mellett transzkripciós faktorokra is szükség van, elsősorban a T-bet-re (T-box expressed in T-cells) és a STAT4-re (szignál transzdukció és transzkripció-4) [40]. A transzkripciós faktorok mellett, hogy aktiválják azokat a géneket, melyek az adott fenotípusú sejt kialakulásához szükségesek képesek gátolni a párhuzamos sejtvonalak differenciálódását. Effektor funkciójukat olyan citokinek termelése révén fejtik ki, mint a IFN- γ , az IL-2 és a TNF- α . A IFN- γ fokozza a makrofágok és a neutrofil granulociták fagocitáló képességét, valamint aktiválja az NK-sejteket. A kórokozók eliminációját azáltal is segíti, hogy fokozza az MHC expressziót, és ezáltal az antigén prezentációt. Ugyanakkor növeli a B-sejtek IgG termelését is [29]. Az IL-2 növeli a CD8 sejtek citolitikus hatását, valamint a T-reg sejtek túlélésében és aktiválásában is közrejátszik [41]. A TNF- α szintén fokozza a makrofágok fagocitáló képességét, kemoattraktáns a neutrofil granulocitákra nézve és központi szerepet játszik az immunválasz regulációjában. A TNF- α ugyanis képes apoptózist indukálni az immunsejtekben

(valamint a rákos sejtekben), így szabályozva a pro- és antiinflammatorikus hatásokat [42].

Összefoglalva a Th1 sejtek elsősorban az intracelluláris patogének (baktérium, vírus) eliminálásában vesznek részt, de a túlzott citokin termelés révén felboríthatják az immunválasz egyensúlyát. Az így kialakult proinflammatorikus túlsúly fontos szerepet játszik a krónikus gyulladós kórképek és az autoimmun folyamatok (SLE, RA, gyulladós bélbetegségek) kialakulásában és fellángolásában [43,44]. A Th1 sejtek nagy mennyiségben expresszálják az érésükhöz elengedhetetlen CXCR3 kemokin receptort, mely a CD4-el együtt lehetővé teszi ezen sejtek azonosítását [45].

A **Th2 sejtek** differenciálódásához az IL-2 és IL-4 citokinekre (melyet a APC-k és az NK-sejtek termelnek), valamint a GATA3 és a STAT6 transzkripciós faktorokra van szükség [41]. Feladatuk a Th1 sejtektől teljesen különbözik, ami az eltérő citokin profiljukból adódik. A Th2 sejtek nagy mennyiségben szekretálnak IL-4-et, IL-5-öt, IL-10-et és IL-13-at. Az IL-4 és az IL-13 a B-sejtek IgE termelését fokozza, ami a hízósejtek degranulációjához vezet. Az így kiszabaduló hisztamin és prosztaglandin a korai típusú allergiás reakciót eredményezi [46]. Az IL-5 növeli az eozinofil granulociták kemotaxisát, osztódását és aktivációját, amely a késői típusú allergiás reakció kialakításában játszik központi szerepet, de a bélférgek elleni védelemben is kiemelkedő fontosságú [47]. Az anti-inflammatorikus tulajdonságokkal bíró IL-10 szekréciójával a Th2-sejtek képesek az immunválasz regulálására. Amellett, hogy saját képződésüket gátolják (az IL-4 csökkentése révén) negatívan hatnak a monocitákra, az eozinofilekre és az APC-kre [48].

Összességében tehát a Th2-sejtek az allergiás reakciók kialakításában és az extracelluláris patogénekkal szembeni védelemben játszanak fontos szerepet, de a Th1-sejtekhez hasonlóan ők is képesek autoimmun folyamatokat elindítani. Az IL-4 ugyanis gátolja az autoreaktív B-sejtek apoptózisát, ami autoantitestek termelése által autoimmun kórképek kialakulását indukálhatja [49]. Ezzel szemben azonban védelmet is képesek biztosítani a Th2 típusú citokinek a Th1-sejtek (IL-4 és IL-10 hatására) és a Th17-sejtek (IL-13 hatására) közvetlen gátlásával [43]. Legfontosabb kemokin receptora a CCR4, mely a Th2-sejtek identifikálására használható [48].



1.ábra A CD4+ Th0 sejtek differenciálódása Th1, Th2, Th17 és Treg sejtekké. A szerzett és az adaptív immunitás sejtjei által termelt citokinek (kék színnel) és a transzkripciós faktorok (feketével) együttes hatása dönti el, hogy a Th0 sejt milyen effektor sejté differenciálódik. Az így létrejövő sejtpopulációk eltérő citokin expressziójuknak (piros, sárga, zöld, lila) köszönhetően eltérő funkcióval bírnak. FoxP3 - forkhead box P3 transzkripciós faktor, IFN- γ - interferon-gamma, IL – interleukin, ROR γ t - retinoic acid-related orphan receptor gamma t, STAT - szignál transzdukció és transzkripció, T-bet - T-box expressed in T-cells, TGF- β - transzformáló növekedési faktor béta, Th - helper T-sejt, TNF- α - tumor nekrozis faktor-alfa, Treg - regulátoros T-sejt

2.3.4. Th17-sejtek

A Th1 és Th2 sejtek elkülönítését követően egyre több olyan citokint azonosítottak illetve több olyan sejtfunkciót írtak le, ami egyik sejt típusra sem volt jellemző. Számos állatkísérletet és in vitro megfigyelést követően 2005-ben két munkacsoport egymástól függetlenül definiálta emberben az IL-17 expresszáló CD4+ helper limfocitákat, a Th17 sejteket [50,51].

A többi CD4+ sejttypushoz hasonlóan a Th17 sejt vonal is a Th0 sejtekből differenciálódik, melynek a szabályozásában a TGF- β és az IL-6 játszik döntő szerepet (1.ábra). A folyamathoz a két citokin együttes hatására van szükség, kizárólag TGF- β jelenlétében a differenciálódás a T-reg sejt irányába mozdul el. A transzkripciós faktorok közül a ROR γ t elengedhetetlen az IL-17 szekrécióhoz, de a végső differenciálódáshoz a STAT3 is kulcsfontosságú. Eredetileg az IL-17 (IL-17A) termelésük alapján azonosították őket, de effektor citokinjeik közé tartozik még az IL-17F, az IL-21 és az IL-22 is [52]. A Th17 sejtek hatását elsősorban az IL-17 és az IL-17F határozza meg. A neutrofil granulociták toborozása és aktiválása mellett fokozzák a szerzett immunitás sejtjei által szekretált proinflammatorikus citokinek (TNF- α , IL-1), kemokinek ill. egyéb gyulladásos mediátorok (prostaglandinok) mennyiségét, ami a már meglévő gyulladás fenntartását eredményezi. A Th17 sejtek elsősorban tehát nem az immunválasz beindításában vesznek részt, hanem a már meglévő folyamatok felerősítésében és elnyújtásában [53]. Ezek a hatások pozitív feed-back révén tovább fokozzák az IL-17 szekréciót, ami megfelelő reguláció hiányában könnyen autoimmun folyamatot eredményezhet. A Th17 szerepét számos kórképben, többek közt RA-ban, SLE-ben és szklerózis multiplexben igazolták [43]. Állatmodellben a Th17 (és Th1) sejtek injektálásával sikerült indukálni a kísérletes autoimmun encephalitist (a szklerózis multiplex egérmodelljét) [54], aminek a kifejlődését azonban az IL-17 előzetes genetikai gátlásával, vagy IL-17 gátló antitestekkel sikerült megakadályozni [55]. Az IL-21 révén a Th17 sejtek képesek aktiválni az NK-sejteket, a B-sejteket illetve egyéb T-limfocitákat, IL-22 termelésüknek köszönhetően pedig koordinálják a veleszületett és az adaptív immunválaszt [48].

Kimutatásuk a felszíni CCR4 és a CCR6 kemokin receptor együttes expressziója alapján történik [56].

2.3.5. Regulátoros T-sejtek

Az immunrendszer kiemelkedő fontosságú feladata, hogy a létrejövő immunválasz ne lépje túl a szükséges mértéket és a kiváltó ágens eliminálása után a folyamat visszafordítható legyen. Ebben a szabályozásban negatív feed-back révén az adaptív immunitás számos sejtje vesz részt (Th1, Th17), de központi irányító szerepe a regulátoros T sejteknek (Treg) van.

A korábban szuppresszor sejtnek definiált Treg-ek koncepciója már a 70-es években felmerült, de évtizedekig nem sikerül azonosítani olyan markert, mellyel ezek a sejtek jellemezhetőek lettek volna. 1995-ben azonban Sakaguchi és mtsai a CD4 és a CD8 sejteken belül egyaránt leírt egy jól definiálható regulátoros limfocitát, ami az IL-2 receptor α láncát (CD25) expresszálja az immunválaszra pedig gátló hatással bír [57]. A Treg-ek kutatása ezzel új fordulatot vett, és az évek alatt több alcsoportot is sikerült leírni. A sejtek funkciójának vizsgálatán túl a markerek is sokat segítettek az azonosításban. A CD25 mellett ma már fontos Treg marker a FoxP3, a CD127, a GITR (glükokortikoid indukálta tumor nekrosis faktor receptor) és a CTLA-4 (citotoxikus T-limfocita antigén-4) is. A CD4 Treg-eken belül két fő csoportot lehet elkülöníteni. Az egyik a thymusban keletkező természetes Treg (nTreg) a másik pedig a periférián differenciálódó adaptív vagy indukált Treg (iTreg).

Az nTreg nevét onnan kapta, hogy már a főtális korban differenciálódik a TGF- β hatására a CD4+ Th0 sejtekből és így már a születéskor természetesen jelen vannak. A CD4 marker mellett nagy mennyiségben expresszálják a sejt felszíni CD25 markert, illetve az intracelluláris FOXP3 és STAT5 transzkripciós faktort. Fő citokinjük az antiinflammatorikus TGF- β és az IL-10 (1.ábra). Elsődleges feladatuk az alábbi sejtek gátlása: CD4+ és CD8+ T-sejtek, B-sejtek, dendritikus sejtek, NK és NKT sejtek, monociták, makrofágok, hízósejtek, és a bazofil ill. eozinofil granulociták [58].

Az iTreg ezzel szemben születéskor még nincs jelen, antigének által kiváltott immunaktiváció hatására alakul ki a periférián a naiv CD4 T-sejtekből. Ezért is nevezik adaptív vagy indukálható Treg-nek. Az iTregeken belül 2 típust lehet elkülöníteni, az IL-10 indukálta IL10 szekretáló Tr1 sejteket és a TGF- β által indukált TGF- β termelő Th3 regulátoros T-sejtet [59]. A citokinprofiljukból adódóan mindkét sejt típus

immunszuppresszív hatással bír, de a célsejtek csak részben egyeznek meg az nTreg-nél leírtakkal. Az eltérés adódhat többek közt abból is, hogy amíg az nTreg-ekre jellemző CD25 és FoxP3 marker folyamatosan expresszálódik, addig a Tr1 és Th3 sejtekre ez csak átmenetileg jellemző, de akár teljes mértékben hiányozhat is [60,61]. Munkánk során az iTreg sejteket nem vizsgáltuk, így a továbbiakban a Treg kifejezés az nTreg sejtekre vonatkozik.

A Treg-ek immunmoduláló hatásukat a gátló citokinek szekréciója mellett egyéb mechanizmusokkal is képesek elérni. A Treg képes a CTLA-4-el kapcsolódni az APC CD80 vagy CD86 receptorához és down-regulálja őket. Ezzel egy nélkülözhetetlen kostimulációs mechanizmus gátlódik, ami végeredményben csökkent immunválaszt eredményez. A Tregok a CD8 citotoxikus T-sejtekhez hasonlóan granzimeket és perforinokat képesek termelni, ami a célsejtek citolíziséhez és apoptózisához vezet. A CD39 és a CD73 segítségével hidrolizálják az ATP (adenozin-trifoszfát) molekulát az antiinflammatorikus tulajdonsággal bíró adenzinné. Az adenzin többek közt csillapítja az effektor T-sejtek aktivációját és proliferációját. A Treg sejtek a CD25 receptorukkal megkötik a környező IL-2 citokineket, mely nagy mértékben hozzájárul a T-sejtek klonális expanziójához [62].

Vizsgálataink során a Treg-ek azonosításához a CD4 és CD25 marker mellett nem az intracelluláris FoxP3-at használtuk, hanem az újabban alkalmazott sejtfelszíni CD127 markert. A CD127 az IL-7 receptor α lánc, expressziója a FoxP3-al ellentétesen változik, így negativitása jól korrelál a Treg-sejtekkel [63,64].

2.3.6. Aktivációs markerek

A T-limfociták működésük során aktivációs markereket expresszálnak, melyek funkciója nem minden esetben ismert, de jelenlétükkel egyértelműen elkülöníthetőek az aktivált limfociták a naiv (nyugvó) sejtektől. Ezek a markerek lehetnek receptor fehérjék, kostimulációs molekulák, adhéziós molekulák vagy kemokin receptorok [65].

A naiv és az aktivált T-sejtek elkülönítésére régóta ismert lehetőség a CD45 családba tartozó tirozin foszfatázok expressziójának vizsgálata. A naiv sejtek ennek a nagyobb CD45RA formáját expresszálják szemben az aktivált (effektor, majd később memória) sejtekkel, melyeken a kisebb molekulatömegű CD45RO izoforma jelenik

meg [66]. A naiv sejtek citokint nem termelnek, effektor funkcióval nem bírnak, mindössze a megfelelő stimulusra várnak. Az antigén prezentációt követően proliferációba kezdenek és kialakulnak az antigén-specifikus T-sejt-klónok, melyek végül rövid életű effektor sejtekké differenciálódnak. A proliferációt kiváltó ágens eliminációját követően az effektor T-limfociták jelentős része apoptotizál, de kis hányaduk hosszú életű memória T-sejtté alakul át. Az effektor/memória sejtek a CD45RO mellett számos adhéziós molekulát és kemokin receptort is expresszálnak, melyek egy későbbi proliferáció során jelentős mértékben megnövelik az antigénre adott válasz mértékét. A naiv és az effektor/memória sejtek egyaránt megtalálhatóak a CD4+ és CD8+ limfociták közt [67].

A T-sejt aktiváció során az egyik legkorábban indukálható glikoprotein a CD69. Ez a korai aktivációs marker egy C-típusú lektin-szerű domént tartalmazó transzmembrán fehérje [68]. A T-limfociták mellett a természetes ölösejtek aktivációja során is fokozódik az expressziója in vitro és in vivo egyaránt. A CD69-nek szerepe van a limfociták osztódásának szabályozásában, de jelátvivő receptorként is viselkedik [69].

Ezzel szemben a HLA-DR egy olyan sejt felszíni marker, ami a T-limfocita aktivációjának késői fázisában jelenik meg. A HLA-DR az MHC II. osztályba tartozó heterodimer HLA fehérje. A T-sejt függő immunválaszban játszik szerepet, illetve fokozott expresszióját írták le néhány autoimmun kórképben [70,71].

2.4. Sejtaktiváció és intracelluláris folyamatok

Ahhoz, hogy egy T-sejt proliferáljon és differenciálódjon először aktiválnia kell. Ehhez az APC-k által biztosított felületre, receptorokra és kostimulációs molekulákra van szükség. Első lépésként az MHC-hez kötött antigén-t a TCR/CD3 komplex variábilis szakasza ismer fel. A TRC által generált szignál (szignál 1) az aktiváláshoz létfontosságú, de önmagában nem elégséges. Az aktiválási kaszkád kiteljesedéséhez további kostimulátorok (szignál 2) és citokinek (szignál 3; IL-2, IL-12) együttes hatására van szükség [72]. A kapcsolódás affinitását növeli elsőként a korábban részletezett CD4 és a CD8 koreceptorok kötődése, de fontos szerepet játszanak az APC-k felszínén található kostimulátor fehérjék is. Ilyen kostimulátorok a B7 fehérjék (CD80, CD86), melyeket a T sejtek felszínén található CD28 receptor köt.

Az effektor T-sejtek egy pozitív visszacsatolás révén megnövelik az APC-k B7 expresszióját, amivel tovább erősítik a saját aktivációjukat. A B7 fehérjék kostimulációs hatása olyan jelentős, hogy ha a T-sejt aktivációja kizárólag a TCR/CD3, az MHC és a CD4,CD8 közreműködésével történik, akkor a T-sejt apoptotizál vagy egy olyan anergiás fázisba lép, ahonnan többé nem aktiválható [73]. A szervezet ezzel biztosítja, hogy a T-sejtek csak a szükséges stimulus hatására váljanak effektor sejtekké, a saját antigénnel szemben pedig toleranciát alakítsanak ki.

A megfelelő szignálok hatására aktiválódnak azok az intracelluláris jelátviteli útvonalak, melyek végül a génexpresszió szabályozása révén a T-sejtek differenciálódásához vezetnek.

2.4.1. Citoplazmatikus és mitokondriális kalcium

A sejtaktiváció során egyszerre több intracelluláris jelátviteli folyamat is működésbe lép (protein kinázok révén), melyek közül T-limfocitákban a foszfolipáz C- γ (PLC- γ) által beindított kalcium-jelnek döntő szerepe van. A TCR/CD3 komplex aktivációját követően több fehérje is foszforilálódik (zeta lánc, ZAP-70), majd létrejön a PLC γ aktív alakja. A PLC γ a sejtmembrán egy foszfolipid komponensét, a foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfátot (PIP₂) hasítja, aminek hatására diacil-glicerol (DAG) és inozitol-1,4,5-triszfoszfát (IP₃) képződik. A DAG a membránhoz kötve marad és aktiválja a protein kináz C-t (PKC), ami a nukleáris faktor kappá B (NF κ B) transzkripciós faktor aktiválása révén a T-sejtek génexpresszióját szabályozza [74]. Ezzel párhuzamosan az IP₃ több forrásból is jelentősen megemeli a citoplazmatikus Ca²⁺ (cit-Ca²⁺) szintet. Az aktiváció korai fázisában az IP₃ kötődik az endoplazmás retikulumon (ER) található receptorához és csatornaként funkcionálva rövid idő alatt nagy mennyiségben engedi át a tárolt Ca²⁺-t a citoplazmatikus térbe. Ezt a kezdeti Ca²⁺ flux-ot egy fenntartott fázis követi, melynek elsődleges kalcium forrása az extracelluláris tér. Az ER Ca²⁺ raktárainak kiürülése jelenleg nem teljesen tisztázott mechanizmus útján (sejtraktárok által szabályozott kalcium beáramlás, SOCE) megnyitja a plazmamembrán kalcium felszabadulás aktiválta kalcium csatornáit (CRAC), amin keresztül megtörténik a Ca²⁺ felvétele az intracelluláris térbe [75]. Az emelkedett cit-Ca²⁺ percekben belül hat többek közt a limfociták mozgására és a

granulumaik exocitózisára. Hosszabb távon pedig az emelkedett kalcium létfontosságú a kalmodulin-függő protein kináz (CaMK) és a szintén kalmodulin-függő foszfatáz, a calcineurin aktiválásában. Ezek a jelátviteli fehérjék a különböző transzkripciós faktorokra hatva szabályozzák végül a génextpressziót. Az egyik ilyen útvonalon a calcineurin az aktivált T-sejtek nukleáris faktorát (NFAT) defoszforilálja, ami a sejtmagban felhalmozódva fokozza az IL-2 gén expresszióját, mely a T-sejtek proliferációjáért felelős [76].

A cit- Ca^{2+} emelkedés azonban csak átmeneti és a kiáramlással párhuzamosan beindulnak a kalcium visszavételéért felelős folyamatok is. A Ca^{2+} részben az ER-ba kerül visszavételre, melyet a szarko/endoplazmás retikulum kalcium ATPáz (SERCA) szabályoz, részben pedig kikerül a sejtől a plazma membrán kalcium ATPáz (PMCA) működése révén. A kezdeti szakaszban azonban a mitokondrium Ca^{2+} felvétele is fontos szabályozója a Ca^{2+} -jel kialakulásának. A CRAC csatornákon beáramló Ca^{2+} ionok egy része a mitokondriális kalcium uniporter (MCU)-en keresztül beáramlik a mitokondriumokba, ami csökkenti a CRAC csatornák kalciumfüggő negatív-feedback gátlását és segíti a folyamatos beáramlást az extracelluláris térből. A sejtaktiváció későbbi szakaszában is nagy mennyiségű Ca^{2+} -ot vesznek fel és tárolnak a mitokondriumok, így a cit- Ca^{2+} és a mitokondriális kalcium (mit- Ca^{2+}) szorosan összefügg egymással [77,78].

2.4.2. Szabadgyök képződés

Szabadgyöknek nevezzük az olyan atomokat, vagy molekulákat, melyek párosítatlan elektront tartalmaznak, és emiatt igen nagy a reakciókészségük. Nevezetes példa rájuk a szuperoxid-anion, a hidroxil-, a peroxil- és az alkoxil-gyök, vagy a hidrogén-peroxid [79]. A szervezetben belül intra- és extracellulárisan egyaránt keletkezhetnek a különböző enzimek és egyéb oxido-redukciós folyamatok hatására. T-limfocitákban a szabadgyökök elsősorban a mitokondrium működése során keletkeznek, mint a sejtlegzés mellékterméke. Ahogy az elektronok végighaladnak az elektrontranszport láncon, egy részük kiszabadul és egy oxigén molekulával reagálva szuperoxid anion keletkezik. A szabadgyökök spontán reakciókészségük miatt sok káros élettani hatással bírnak, de számos védekező funkcióban is kimutatták a

szerepüket. Közvetlenül károsítják a fehérjéket, a lipideket, a DNS-t, a sejtmembrán és a sejtorganelumokat [80], amely következményeként sérül a sejt szerkezete és funkcióját, de akár a sejt nekrotizálásához is vezethet. Ezek a folyamatok az idegen sejtekben (baktérium) szintén végbemennek, ami hozzájárul a fagocita rendszer hatékony működéséhez. A szabadgyökök károsító hatását a szervezet antioxidánsokkal ellensúlyozza (pl. szuperoxid dizmutáz vagy kataláz enzim). Amennyiben az egyensúly a két ellentétes folyamat közt felborul, oxidatív stresszről beszélünk [81]. A szabadgyökök közvetlen károsító hatása mellett azonban másodlagos hírvivő funkcióját is igazolták a sejten belül. Szerepük van a sejtproliferációban és differenciációban, de közrejátszanak egyes gének expressziójában, a sejtek közti adhézió szabályozásában és az apoptózist is befolyásolják [82].

2.4.3. Nitrogén monoxid termelés

A nitrogén monoxid (NO) egy fontos szignál molekula, mely fontos szerepet játszik számos fiziológiás folyamatban. Elsőként endotél eredetű vazodilatátorként azonosították [83]. Az endogén NO argininből képződik három különböző kalmodulin-függő NO szintetáz (NOS) közreműködésével: neuronális NOS (nNOS), endoteliális NOS (eNOS) és indukálható NOS (iNOS). Az nNOS és az eNOS kis mennyiségben, de folyamatosan termelődik, szemben az iNOS-al, amely csak bizonyos ingerek hatására képződik, de a sejt nagy mennyiségben képes előállítani [84]. Az iNOS által katalizált hosszan tartó és nagy mennyiségű NO citotoxikus hatása révén közrejátszik a makrofágok antimikrobiális és tumor sejt ellenes hatásához [85]. A NO a T-sejt aktivációt különböző módokon befolyásolja: serkenti a IFN- γ , de gátolja az IL-2 szintézist. Emellett szabályozza a mitokondriális hiperpolarizációt, a mitokondriális biogenezist és képes serkenteni vagy gátolni az apoptózist. Vizsgálatok alapján egyre bizonyosabb, hogy a NO kis mennyiségben elengedhetetlen a fiziológiás sejtfunkciókhoz, nagy mennyiségben azonban közrejátszik autoimmun kórképet (RA, SLE) kialakulásában [86].

3. CÉLKITŰZÉS

Munkánk első fázisában arra kerestük a választ, hogy AS-es betegekben hogyan változik az adaptív immunitás legfontosabb képviselőinek sejtprevalenciája (CD4+ és CD8+ limfocita, Th1, Th2, Th17 és Treg sejt). Azt vizsgáltuk továbbá, hogy milyen aktivációs állapot figyelhető meg, azaz milyen a CD4+ és a CD8+ naiv és memória/effektor sejtek prevalenciája és az aktivációs markerek expressziója.

Az alap állapot meghatározása mellett célunk volt megvizsgálni AS-ben az immun fenotípus változásait az IFX kezelés után 2 illetve 6 héttel.

Ezt követően az említett adaptív immunitás képviselőit meghatároztuk terápia naiv korai RA-ban valamint a hagyományos DMARD terápiára nem reagáló késői RA-s betegpopulációban egyaránt.

Az RA esetében szintén prospektív vizsgálat volt a célunk mind az immunfenotípus, mind az aktivációs folyamatok vonatkozásában. Korai RA esetén megvizsgáltuk a sejtprevalenciákat a 4. héten GCS terápiát követően, majd a 8. héten (4 hét MTX kezelés után). Késői RA-ban pedig 3 különböző TNF- α gátló (IFX, ETA és ADA) adaptív immunitásra kifejtett hatását vizsgáltuk 4 illetve 8 héttel a terápia megkezdése után.

Munkánk második fázisában célunk volt jellemezni a CD4+ és a CD8+ T-limfociták rövid-távú aktivációját AS-ben és RA-ban. Vizsgálataink során áramlási citométerrel jellemeztük a fitohemagglutinin (PHA) stimuláció hatására az első 10 percen bekövetkező citoplazmatikus kalcium (cit-Ca²⁺), mitokondriális kalcium (mit-Ca²⁺), szabadgyök képződés és nitrogén monoxid (NO) termelés kinetikus változásait.

Az alap állapot mellett meghatároztuk AS-ben az IFX, korai RA-ban a GCS és az MTX, késői RA-ban pedig az IFX, az ETA és az ADA hatását az említett intracelluláris folyamatokra.

4. MÓDSZEREK

4.1. Egészséges és beteg csoportok

Minden vizsgálatot a Tudományos Kutatásértékelési Bizottság engedélyezett, a munkát pedig az 1964-es Helsinkii Deklarációval összhangban végeztük. A betegek és az egészséges kontrollok a mintavételt megelőzően beleegyező nyilatkozatot írtak alá. A betegek diagnosztizálása és kezelése a Szegedi Tudományegyetem, Reumatológiai Klinikáján történt.

4.1.1. Spondilitisz ankilopoetika

A vizsgálatokba tizenhárom beteget vontunk be aktív AS-el. A diagnózis a módosított New York-i kritériumok szerint lett felállítva [87]. A betegek életkora (medián [interkvartilis tartomány]) 40,0 [35,5-54,5] év, a betegség fennállásának ideje pedig 10,0 [4,0-13,0] év volt. A beválogatás alapkövetelményei:

- 1.) A betegség aktivitási index (BASDAI-index) 1-10-ig terjedő skálán nagyobb legyen 4-nél [88].
- 2.) Adekvát (két különböző, nem szteroid gyulladáscsökkentő maximális, vagy tolerálható dózisban adva) gyógyszeres kezelés ellenére sem javuló tünetek.
- 3.) HLA-B27 pozitivitás (ez nem diagnosztikai kritérium, de a homogén betegbeváltás miatt törekedtünk az egységes HLA-B27 státuszra)

Az aktív betegség miatt a páciensek intravénás infliximab (IFX) terápiában részesültek 5 mg/ttkg dózisban a 0., a 2., és a 6. héten, majd ezt követően 8 hetente. Vérmintát ezzel összhangban 3 alkalommal vettünk: az IFX terápia megkezdése előtt, majd az azt követő 2. illetve 6. héten az esedékes infúzió előtt. A vizsgálatban való részvételt kizárta az AS mellett bármilyen komorbiditás megléte, valamint egyéb gyógyszeres kezelés (az 1 féle NSAID és 1 féle protonpumpa gátló mellett).

4.1.2. Reumatoid artritisz

Tizenkilenc újonnan diagnosztizált, terápia naiv (korai) RA-s és harminckettő, a hagyományos kombinált DMARD terápiára nem reagáló (késői, DMARD

nonreszponder) RA-s lett bevonva a vizsgálatokba. A páciensek részletes klinikai adatait az 1. táblázat foglalja össze.

A **korai RA-s betegek** (n=19) a vizsgálatok előtt semmilyen RA specifikus gyógyszeres kezelésben nem részesültek. A diagnózis felállítását követően az alábbi terápiás protokoll alapján részesültek kezelésben: közepes dózisú orális glükokortikoszteroidot (GCS, 16 mg/nap metilprednizolon) kaptak monoterápiában 4 hétig. A GCS dózist a 4. héttől lecsökkentették 8 mg/nap-ra, miközben elkezdték a metotrexátot (MTX) 10 mg/hét dózissal. A vérmintákat ezzel összhangban három időpontban gyűjtöttük: a terápia megkezdése előtt (alap állapot), majd az azt követő 4. illetve 8. héten, tehát 4 hét közepes dózisú GCS terápia után és további 4 hét alacsony dózisú GCS és MTX kombináció mellett.

A **késői RA-s betegek** (n=32) a vizsgálatba való részvétel kezdetén MTX (15 mg/hét) és leflunomid (LF, 20 mg/nap) kombinációban részesültek legalább három hónapja. A továbbra is 5.1 feletti DAS-28 betegségaktivitást figyelembe véve a hatályos terápiás és finanszírozási protokollnak megfelelően TNF- α gátló készítmény került bevezetésre. Az LF-t elhagyták, miközben az MTX változatlan formában tovább folytatódott. A biológiai terápiát az alábbi protokoll szerint adagolták: intravénás IFX a 0., a 2., és a 6. héten 3mg/ttkg dózisban (n=8), vagy szubkután ETA 50 mg/hét dózisban (n=12); vagy szubkután ADA 40 mg/2 hét dózisban (n=12). Vérmintát ebben az esetben is három alkalommal gyűjtöttünk, a biológiai terápia megkezdése előtt, majd 4 illetve 8 héttel a kezelés után. Az esetszám növelését nehezítette, hogy a vizsgálatba olyan biológiai terápiára szoruló beteget választottunk, akik a lehető leghomogénebb populációt alkotják és így a legkisebb az eltérés a klinikai jellemzőikben (életkor, betegség időtartama, reumatoid faktor, anti-MCV státusz, DAS-28, CRP és süllyedés). Részletek az 1. táblázatban. A késői RA-s betegek közül mindenki hosszú távú MTX és LF kombinációs kezelésben részesült (legalább 3 hónapja) és közülük senkit sem kezeltek az elmúlt 12 hétben per os vagy intra-artikuláris GCS-el, vagy egyéb immunszuppresszív készítménnyel. A RA mellett más komorbiditás nem volt jelen.

Méréstechnikai okok miatt nem minden betegnél sikerült egy mintavétel kapcsán a sejtfelszíni és az intracelluláris mérések egyidejű meghatározása RA-ban. Ezért a korábban megadott esetszámok a sejtfelszíni mérésekre vonatkoznak. Az intracelluláris

folyamatok jellemzése a korai betegeknél 12 esetben, a késői RA-nál pedig 22 esetben történtek meg (IFX: n=7; ETA: n=7; ADA: n=8). A kontroll esetszáma 9-re csökkent.

4.1.3. Egészséges kontrolllok

AS-ben kilenc, RA-ban tíz nem- és életkor szerint illesztett egészséges kontroll lett a vizsgálatokba bevonva. Az egészséges kontrolllok munkaalkalmassági vizsgálaton vettek részt, közöttük semmilyen reumatológiai és egyéb eltérést nem tapasztaltunk. A részletes fizikai vizsgálat és a laboratóriumi lelet nem mutatott eltérést. A kontroll egyének gyógyszeres kezelésben nem részesültek a vérvételt megelőző 1 évben. Életkor AS-ben: 39,0 [36,0-41,5] év, RA-ban: 50 [46,5-56,0] év.

4.2. Minta előkészítése

Minden résztvevőtől 24 ml vért vettünk lithium-heparinnal alvadásgátolt mintavételi csövekbe (BD Vacutainer, Beckton Dickinson & Co, Plymouth, UK). Minden esetben a vérvételt követő 4 órán belül a minta feldolgozásra került. Első lépésként a perifériás vér mononukleáris sejteket (PBMC) szeparáltuk sűrűség-grádiens centrifugálással. Ehhez a teljes vért a gyártó által ajánlott aránynak megfelelően Ficoll oldatra (Ficoll-Paque Plus, GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA, USA) rétegeztük, majd centrifugáltuk. A Ficoll és a vérplazma határán található PBMC-eket (buffy-coat) leszívtuk és kétszer mostuk foszfát-pufferelt fiziológiás sóoldatban (PBS, Semmelweis Egyetem Központi Gyógyszertár, Budapest). A PBMC 20%-t (körülbelül 5×10^6 sejt) 0,5 ml főtális borjúsavóban (FCS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) reszuszpendáltuk, majd cseppenként 0,4 ml FCS és 0,1 ml dimetil-szulfoxidból (DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) álló oldatot adtunk hozzá. Az így elkészített PBMC-t -80°C -on lefagyasztottuk a későbbi sejtfelszíni mérésekhez. Az intracelluláris mérésekhez a PBMC 80%-t (körülbelül 2×10^7 sejt) módosított RPMI (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA) oldatban reszuszpendáltuk és a vizsgálat teljes időtartalma alatt (festés és mérés) ebben a médiumban tartottuk. A kalcium koncentrációját a módosított RPMI oldatban 2 mM-osra állítottuk be (kristályos CaCl_2 hozzáadásával).

1. táblázat. Korai és késői RA-s betegek legfontosabb klinikai paramétereit. Az adatok medián [interkvartilis tartomány] formátumban vannak megadva. * vs. alap állapot $p < 0,05$; # vs. 4. hét $p < 0,05$. GCS = glükokortikoszteroid; MTX = metotrexát; LF = leflunomid; IFX = infliximab; ETA = etanercept; ADA = adalimumab; RA = reumatoid arthritisz; anti-MCV = anti-mutated citrullinated vimentin; DAS-28 = betegség aktivitási pontszám (28 ízületre vonatkoztatva)

	Életkor (év)	Nem (férfi/nő)	Betegség időtartama (év)	Reumatoid faktor (IU/ml)	Anti- MCV (IU/ml)	Mintavétel időpontja	DAS-28	CRP (mg/l)	Süllyedés (mm/óra)
Korai RA (n=19)	55 [55-64]	8/11	0,3 [0,2-0,3]	104,7 [73,8-136,1]	157,0 [50,9-831,4]	Alap állapot (terápia nélkül)	6,6 [5,7-7,2]	63,5 [15,3-91,2]	64 [32-93]
						4. hét: közepes dózisu GCS terápia után	4,0 [3,0-4,5]*	3,6 [2,0-7,9]*	15 [13-45]*
						8. hét: alacsony dózisu GCS és MTX kombináció után	2,5 [2,2-3,3]*#	3,8 [2,1-7,8]*	22 [12-28]*
Késői RA IFX terápiával (n=8)	54 [48-57]	5/3	10,0 [5,0-13,3]	170,0 [38,1-303,8]	23,3 [11,0-393,0]	Alap állapot (MTX és LF terápia mellett)	6,3 [5,7-6,7]	13,7 [11,8-19,7]	35 [29-48]
						4 hét IFX és MTX terápia után	5,1 [4,4-5,5]	3,1 [2,1-5,3]	19 [14-26]*
						8 hét IFX és MTX terápia után	4,0 [3,4-4,4]*	2,0 [2,0-4,9]*	17 [11-20]*
Késői RA ETA terápiával (n=12)	55 [52-61]	0/12	7,5 [5,3-9,8]	120,4 [27,6-218,5]	863,3 [58-1000]	Alap állapot (MTX és LF terápia mellett)	6,2 [5,5-6,5]	20,5 [12,4-36,0]	45 [40-57]
						4 hét ETA és MTX terápia után	3,5 [3,0-4,0]	3,0 [2,0-4,8]*	20 [14-27]*
						8 hét ETA és MTX terápia után	2,8 [2,6-3,2]*	2,2 [2,0-3,8]*	16 [11-23]*
Késői RA ADA terápiával (n=12)	55 [50-61]	1/11	7,5 [5,3-10,0]	101,2 [20,6-206,4]	250,1 [23,6-661,5]	Alap állapot (MTX és LF terápia mellett)	6,1 [5,2-6,5]	17,8 [15,8-31,3]	48 [39-56]
						4 hét ADA és MTX terápia után	3,4 [2,8-4,5]*	6,2 [2,0-14,2]	28 [19-36]*
						8 hét ADA és MTX terápia után	3,4 [2,7-3,5]*	4,7 [2,0-7,3]*	25 [14-39]*

4.3. Sejtfelszíni festés

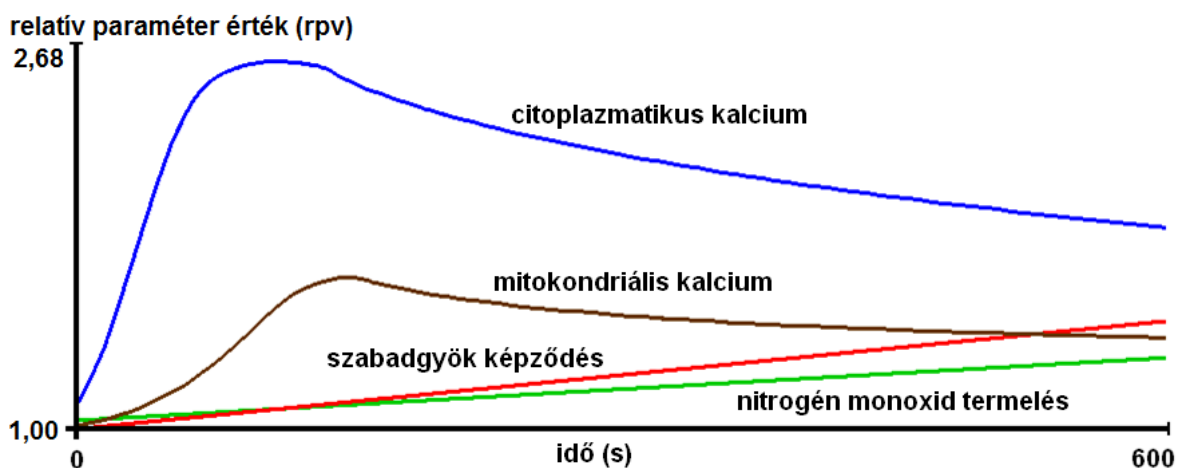
A fagyasztott mintákat PBS oldatban két alkalommal mostuk, majd aliquotokra osztva a gyártó által előírt protokoll szerint fluoreszcens molekulával jelölt konjugált antitestet tartalmazó festéket (Becton Dickinson, San Diego, California, USA) adtunk hozzá. A nem kötődött festéket lemostuk, majd PBS-ben reszuszpendálva fénytől védve hűtőben tároltuk a mérés kezdetéig, amit a festést követő 1 órán belül elvégeztük. Minden méréshez legalább 300.000 eseményt rögzítettünk. A különböző sejttípusokat és aktivációs markereket az 2. táblázatban feltüntetett markerekkel jellemeztük.

Sejtfelszíni markerek	
Paraméter	Marker
Helper T-sejt	CD4+
Citotoxikus T-sejt	CD8+
Th1 sejt	CD4+ CXCR3+
Th2 sejt	CD4+ CCR4+
TH17 sejt	CD4+ CCR4+ CCR6+
Regulátoros T-sejt	CD4+ CD25+ CD127-
Naiv T-sejt	CD4+ CD45RA+ ; CD8+ CD45RA+
Memória/effektor T-sejt	CD4+ CD45RO+ ; CD8+ CD45RO+
Korai aktivációs marker	CD69
Késői aktivációs marker	HLA-DR
Intracelluláris markerek	
Paraméter	Marker
Citoplazmatikus kalcium	Fluo-3-AM
Mitochondriális kalcium	Rhod2/AM
Szabadgyök képződés	Dihydroethidium (DHE)
Nitrogén monoxid termelés	DAF-FM diacetát

4.4. Intracelluláris festés

A frissen izolált sejteket 4 egyenlő részre osztottuk és 37°C-os módosított RPMI-ben reszuszpendáltuk. A fiziológias környezet modellezése érdekében a minta melegen tartását a mérés végéig fenntartottuk (a gyártó előírásának megfelelően a festés alatt egyes paramétereknél a hőmérsékletet 30°C-ra csökkentettük). Az immunológiai folyamatokban résztvevő sejtek csoportjainak szűkítése céljából a mintákat először CD4 és CD8 sejtfelszíni markerrel inkubáltuk, majd a 4 különböző részt 4 féle intracelluláris festékekkel jelöltük (Molecular Probes, Carlsbad, California, USA).

A citoplazmatikus kalcium (cit-Ca^{2+}) monitorozásához Fluo-3-AM-t, a mitokondriális kalciumhoz (mit-Ca^{2+}) pedig Rhod2/AM-t használtunk, míg a szabadgyök képződés jellemzéséhez DHE-t, a nitrogén monoxid (NO) termeléshez pedig DAF-FM diacetátot alkalmaztunk (2. ábra, 2. táblázat). A cit-Ca^{2+} és a mit-Ca^{2+} festéshez 0,02% Pluronic F-127-et (Molecular Probes, Carlsbad, California, USA) is használtunk. Közvetlenül a mérés előtt a sejteket 20 mg/ml végkoncentrációjú fitohemagglutininnel (PHA, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) aktiváltuk, majd a fluoreszcens jelet 10 percig monitoroztuk.



2.ábra. T-limfociták általunk vizsgált intracelluláris folyamatainak sematikus ábrázolása fitohemagglutininnel történt aktiváció után.

4.5. Mérés és kiértékelés

A sejtfelszíni és az intracelluláris méréseket egyaránt egy BD FACSAria áramlási citométeren végeztük (Becton Dickinson, San Jose, California, USA).

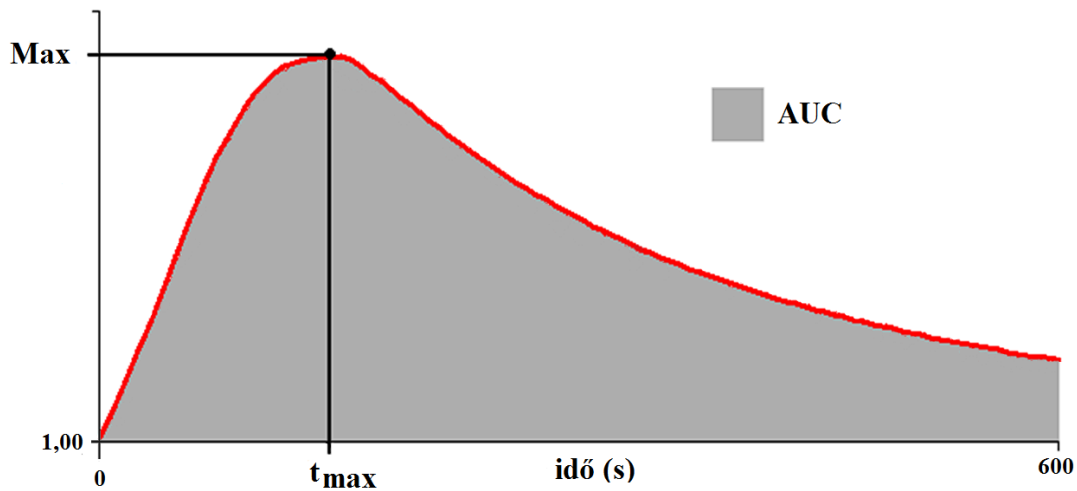
4.5.1. Sejtprevalencia meghatározása

A sejtprevalencia értékeket hagyományos kapuzással a készülék saját FACSDiVa szoftverével határoztuk meg (Becton Dickinson, San Jose, California, USA). Az adatokat százalékban adtuk meg, ami minden esetben a vizsgált sejtpopulációt megelőző csoporton belül adja meg az előfordulási gyakoriságot. A CD4+ helper T-sejt és a CD8+ citotoxikus T-sejt %-os eloszlását tehát a PBMC populáción belül adtuk meg. A Th1, Th2, Th17 és a regulátoros T-sejt prevalenciája a CD4+ sejteken belül értendő. A naiv (CD45RA) és a memória/effektor (CD45RO) T-sejt, valamint az aktivációs markerek (CD69 és HLA-DR) pedig a CD4+ és a CD8+ sejteken belül egyaránt meg lett adva.

4.5.2. A kinetikus görbe jellemzése

Az intracelluláris paraméterek kinetikus jellemzésére az R programot használtuk (R-projekt, Bécs, Ausztria). A mérés teljes tartományát 100 egyenlő hosszúságú időintervallumra osztotta, majd mindegyik intervallum medián fluoreszcens értékét kiszámolta. A medián értékekre ezután lowess módszerrel simítást végzett, végül standardizált úgy, hogy minden egyes értéket a mérés legelején kapott értékhez viszonyított, úgy, hogy a simított görbe 1-ről kezdődjön. A kapott értékeket relatív paraméter érték (r_{pv}) formában határozta meg. A teljes mérés jellemzésére az r_{pv}-kből az alábbi paramétereket tudtuk megadni: görbe alatti terület (AUC), maximum érték (Max) és a maximum elérésének ideje (t_{max}) (3. ábra). Az AUC értékének 1 egysége (U) egyenértékű 1 r_{pv}-vel egy másodpercben. Ezen paraméterek és a különböző kinetikus mérések jellemzésére használatos számítási módszereket részletesen a munkacsoportunk egy korábbi írásában tüntettük fel [89]. A statisztikai számításokat a továbbiakban az AUC, a Max és a t_{max} értékeivel végeztük.

relatív paraméter érték (rpv)



3.ábra. A kinetikus mérések egy reprezentatív görbéje és az elemzést követő legfontosabb számított paraméterek.

AUC - görbe alatti terület, Max - maximum érték, t_{max} - a maximum elérésének ideje

4.5.3. Statisztikai analízis

A statisztikai számításokat a Statistica 7 szoftvercsomaggal (Statsoft, Tulsa, Okla, USA) végeztük.

Mivel az előzetesen elvégzett Kolmogorov-Smirnoff teszt alapján a vizsgált populáció nem a Gauss-féle eloszlást követte, ezért a mérési eredményeinket nem paraméteres tesztekkel elemeztük és az adatokat medián [interkvartilis tartomány: 25-75 percentilis] formátumban adtuk meg.

Nem párosított két csoport összehasonlítására a Mann-Whitney tesztet, míg párosított esetben a Wilcoxon tesztet alkalmaztuk. Szintén párosított, azonban három vagy több csoport összehasonlítására pedig a Friedman teszt szolgált, a Dunn-féle poszt-hoc teszttel kiegészítve. A 0,05-nél kisebb eltéréseket vettük szignifikánsnak.

Eredményeink ábrázolására az ún. „box-whiskers” (doboz-bajusz) diagramot használtuk, ahol a középvonal a mediánt, a doboz az interkvartilisek, míg a bajusz a tartományt jelölte.

5. EREDMÉNYEK

5.1. Spondilitisz ankilopoetika

A betegség aktivitási index (BASDAI) a vizsgálat kezdetén minden AS-es betegnél magas volt (6,88 [6,07–7,60]), majd 6 héttel az IFX terápia megkezdése után szignifikánsan lecsökkent (1,79 [0,60–3,83]), $P < 0,0001$.

5.1.1. Sejtprevalencia vizsgálatok

AS-ben mért sejtprevalencia értékeket a 3. táblázat foglalja össze. A vizsgálat során először az IFX kezelés előtt álló betegpopulációt hasonlítottuk össze a kontroll csoporttal.

A **CD4+ sejtek** prevalenciája a limfocitákon belül a kontroll csoporthoz képest emelkedett volt. A korai (CD69) és a késői (HLA-DR) aktivációs marker expressziója a CD4+ sejteken a kontroll csoporthoz képest nem változott. A Th1 irányba elkötelezett sejtek prevalenciája hozzávetőlegesen 30 %-al emelkedett, míg a Th2-é a kontroll csoport kétszerese volt AS-ben. A helper sejtek Th2 irányba történő eltolódása miatt a Th1/Th2 arány jelentősen lecsökkent. A Th17 sejtek prevalenciája 70%-al emelkedett volt a beteg populációban, míg a Treg-sejtek, a CD4+ naiv (CD45RA+) és CD4+ memória/effektor sejtek (CD45RO+) az IFX kezelés előtt a kontroll csoporttól nem tértek el.

Az összes vizsgált **CD8+ sejt és aktivációs markereik** a kontroll csoportban mért értékekkel voltak egyenértékűek AS-ben az IFX terápia megkezdése előtt.

Munkánk következő fázisában az IFX terápia hatását vizsgálatuk a 2. és a 6. héten. **CD4+ sejtekben** a terápia előtt megfigyelt eltérésekre az IFX kezelés nem volt hatással. Ennek megfelelően a helper sejtek, a Th1, a Th2 és a Th17 sejtek prevalenciája továbbra is emelkedett volt. A Treg-sejtek, a CD69, valamint a HLA-DR aktivációs marker pedig továbbra is a kontroll csoporttal volt egyenértékű. Ezzel szemben a CD4+ naiv sejtek prevalenciája 2 hét IFX kezelés után lecsökkent, és ez a 6. hétre is

megmaradt. A CD4+ memória/effektor sejtek a 2. héten a kontroll csoporttal megegyeztek, a 6. hétre azonban prevalenciájuk megemelkedett a kontrollhoz képest.

A CD8+ sejtek és aktivációs markereik 2. ill. 6. hét IFX terápia hatására sem mutattak változást AS-ben.

3. táblázat Az adaptív immunitásban résztvevő sejtípusok és aktivációs markereik spondilitisz ankylopoetikában (AS) infliximab (IFX) kezelés előtt és alatt. *Esetszám: kontroll, n= 9; AS, n=13. „Az adatok medián [interkvartilis tartomány] formátumban vannak megadva. ^Avs. kontroll $p<0,05$; ^Bvs. alap állapot $p<0,05$*

Vizsgált paraméter	Kontroll	Alap állapot (IFX terápia előtt)	IFX után 2 héttel	IFX után 6 héttel	
CD4	PBMC-ben CD4+ (%)	35,80 [29,43-40,95]	42,7 [38,35-48,65] ^A	47,10 [43,00-49,10] ^A	44,30 [42,15-48,85] ^A
	CD4+CD45RA+ naiv sejt (%)	49,50 [40,68-61,68]	50,80 [45,20-65,95]	50,90 [36,20-55,40] ^B	42,55 [39,55-60,78] ^B
	CD4+CD45RO+ memória sejt(%)	42,95 [33,33-49,65]	41,50 [29,40-49,55]	45,50 [37,80-54,60]	47,45 [33,10-54,78] ^B
	CD4+CD69+ (%)	3,23 [2,83-4,48]	3,05 [2,72-3,28]	3,04 [2,69-3,43]	2,88 [2,21-3,36]
	CD4+HLA-DR+ (%)	2,80 [2,53-3,81]	3,03 [2,09-3,46]	1,95 [1,56-2,33]	2,89 [2,21-3,51]
CD8	CD4-ben Th1 (%)	9,81 [8,95-12,53]	12,90 [11,75-13,80] ^A	14,00 [11,50-15,70] ^A	13,80 [12,43-18,83] ^A
	CD4-ben Th2 (%)	4,54 [4,19-4,84]	9,18 [7,32-11,45] ^A	8,70 [7,98-11,30] ^A	10,90 [8,32-12,50] ^A
	Th1/Th2 arány	2,38 [1,95-2,64]	1,31 [1,06-1,85] ^A	1,40 [1,16-1,83] ^A	1,38 [1,11-1,72] ^A
	CD4-ben Th17 (%)	0,69 [0,60-0,77]	1,18 [1,02-1,69] ^A	1,2 [0,84-1,55] ^A	1,26 [0,91-1,51] ^A
	CD4-ben Treg (%)	4,42 [3,76-5,58]	4,45 [3,57-5,51]	4,29 [3,66-5,72]	4,42 [4,05-5,24]
	Th17/Treg arány	0,14 [0,13-0,21]	0,27 [0,19-0,45] ^A	0,25 [0,17-0,39] ^A	0,29 [0,18-0,37] ^A
CD8	PBMC-ben CD8+ (%)	18,00 [14,35-27,98]	17,70 [14,65-21,45]	18,30 [14,20-21,90]	16,65 [14,43-21,60]
	CD8+CD45RA+ naiv sejt (%)	62,85 [53,38-75,78]	70,30 [61,70-78,75]	69,10 [55,20-72,50]	60,20 [54,43-70,33]
	CD8+CD45RO+ memória sejt(%)	23,65 [15,90-28,15]	19,40 [14,25-28,20]	26,30 [19,10-34,90]	28,45 [18,53-40,20]
	CD8+CD69+ (%)	4,0 [3,53-12,78]	4,88 [3,37-5,89]	3,71 [3,26-6,77]	5,06 [3,55-6,27]
	CD8+HLA-DR+ (%)	3,58 [3,10-5,31]	3,43 [2,95-4,33]	4,37 [2,93-5,15]	3,57 [2,91-5,15]
	CD4/CD8 arány	2,07 [1,32-2,83]	2,26 [2,02-3,15]	2,61 [1,99-3,21]	2,82 [1,90-3,36]

5.1.2. Funkcionális vizsgálatok

AS-ben a T-limfociták intracelluláris folyamatainak vizsgálata során kapott legfontosabb eredményeket a 4. táblázat foglalja össze.

IFX kezelés előtt a CD4+ és CD8+ limfocitákban egyaránt késleltetve emelkedett a citoplazmatikus kalcium jel (cit-Ca²⁺) AS-ben a kontroll csoporthoz képest. A mitokondriális kalcium (mit-Ca²⁺) a CD8+ sejtekben hasonlóan kóros kinetikát mutatott (időben szintén később érkezett a csúcs), míg a CD4+ limfocitákban a mit-Ca²⁺ a kontroll csoporttal azonos módon viselkedett. A nitrogén monoxid termelés relatív értéke (AUC), a termelés maximum értéke (Max) és a maximum érték eléréséhez szükséges idő (t_{max}) is szignifikánsan nagyobb volt AS-ben a kontroll csoporthoz képest a CD4+ és a CD8+ sejtekben egyaránt. A szabadgyök képződés mindkét vizsgált limfocita típusban a kontroll csoporttal volt egyenértékű.

IFX kezelés megkezdése után két héttel a cit-Ca²⁺ jel a CD4+ és a CD8+ sejtekben továbbra is késleltetve jelent meg, és ez a CD4 sejtek esetében a 6. hétre sem változott. A CD8+ limfocitákban azonban a cit-Ca²⁺ jel kinetikája lecsökkent és a görbe maximum értéke a kontroll csoportban mérttel egy időbe esett. A mit-Ca²⁺ szintén változatlan kinetikát mutatott a CD8+ sejtekben 2 hét IFX kezelés után, a 6. hétre azonban a cit-Ca²⁺-hoz hasonlóan a kontroll csoporttal lett azonos, azaz a görbe maximum csúcsa időben előbbre tolódott. A mit-Ca²⁺ a CD4+ limfocitákban továbbra is a kontrollhoz hasonló kinetikát mutatott 2. ill. 6. hét IFX kezelés után is. A legmarkánsabb változás az NO termelés esetén mértük IFX hatására. A kezdeti emelkedés már a 2. hétre is szignifikánsan lecsökkent, így mindhárom vizsgált paraméter (AUC, Max, t_{max}) a kontrollal vált egyenértékűvé. Ez a csökkenés a 6. hétre tovább folytatódott (de a kontrolltól nem tért el).

4. táblázat. Spondilitisz ankipoetikában (AS) a CD4+ és CD8+ T-limfociták intracelluláris folyamatait leíró görbék legfontosabb paraméterei, az infliximab (IFX) terápia előtt és alatt. *Esetszám: kontroll, n= 9; AS, n=13. Az adatok medián [interkvartilis tartomány] formátumban vannak megadva.^Avs. kontrol p<0,05; ^Bvs. alap állapot p<0,05. AUC = görbe alatti terület, Max = maximum érték, t_{max} = maximum elérésének ideje*

Vizsgált paraméter	Kontroll	Alap állapot (IFX terápia előtt)	IFX után 2 héttel	IFX után 6 héttel	
Citoplazmatikus Ca²⁺					
CD4+	AUC (U)	63,24 [58,00 – 107,9]	82,43 [64,22 – 255,8]	93,57 [56,89 – 201,0]	96,21 [87,13 – 158,10]
	Max (rpv)	1,156 [1,132 – 1,256]	1,268 [1,174 – 1,623]	1,321 [1,149 – 1,477]	1,254 [1,216 – 1,420]
	t _{max} (s)	258,4 [192,1 – 283,5]	527,5 ^A [327,9 – 595,3]	471,1 ^A [288,2 – 594,3]	594,7 ^A [290,5 – 595,5]
CD8+	AUC (U)	48,76 [38,53 – 93,22]	88,52 [54,65 – 327,8]	104,8 [42,14 – 180,8]	81,55 [58,51 – 407,1]
	Max (rpv)	1,139 [1,089 – 1,262]	1,247 [1,124 – 1,852]	1,318 [1,120 – 1,434]	1,220 [1,125 – 1,819]
	t _{max} (s)	228,6 [162,1 – 593,2]	594,3 ^A [294,6 – 595,6]	594,4 ^A [422,9 – 596,1]	282,7 [232,9 – 531,0]
Mitokondriális Ca²⁺					
CD4+	AUC (U)	61,64 [37,97 – 94,43]	66,00 [41,55 – 95,52]	64,87 [42,90 – 105,4]	67,60 [49,29 – 104,2]
	Max (rpv)	1,194 [1,121 – 1,272]	1,207 [1,103 – 1,241]	1,149 [1,114 – 1,281]	1,172 [1,159 – 1,266]
	t _{max} (s)	594,0 [211,9 – 594,9]	593,3 [384,7 – 595,3]	595,2 [593,0 – 596,2]	595,1 [386,6 – 596,4]
CD8+	AUC (U)	106,9 [71,64 – 144,5]	87,79 [62,47 – 101,4]	71,31 [53,46 – 175,0]	118,8 [67,55 – 249,9]
	Max (rpv)	1,250 [1,152 – 1,404]	1,187 [1,130 – 1,217]	1,154 [1,131 – 1,400]	1,259 [1,143 – 1,539]
	t _{max} (s)	144,2 [121,6 – 160,6]	577,1 ^A [167,8 – 594,2]	468,8 ^A [165,3 – 594,7]	198,7 [169,8 – 248,4]
Nitrogén monoxid termelés					
CD4+	AUC (U)	3,318 [-8,315 – 18,84]	47,76 ^A [1,727 – 97,18]	22,20 [-8,903 – 37,95]	-3,055 ^B [-13,24 – 9,005]
	Max (rpv)	1,013 [1,000 – 1,043]	1,113 ^A [1,011 – 1,282]	1,046 [1,000 – 1,081]	1,001 ^B [1,000 – 1,034]
	t _{max} (s)	198,7 [34,55 – 321,8]	594,3 ^A [228,2 – 594,8]	331,2 [0,000 – 556,5]	107,9 ^B [0,000 – 252,5]
CD8+	AUC (U)	-9,481 [-19,97 – 24,30]	41,31 ^A [6,068 – 109,8]	9,641 [-11,20 – 29,92]	-11,80 ^B [-29,93 – 4,094]
	Max (rpv)	1,003 [1,000 – 1,051]	1,099 ^A [1,011 – 1,330]	1,025 [1,001 – 1,078]	1,000 ^B [1,000 – 1,001]
	t _{max} (s)	51,08 [0,000 – 185,2]	594,2 ^A [185,2 – 594,8]	289,1 [54,03 – 553,5]	0,001 ^B [0,000 – 130,5]
Szabadgyök képződés					
CD4+	AUC (U)	79,27 [64,68 – 88,90]	75,65 [70,70 – 92,61]	82,64 [58,40 – 96,68]	70,99 [56,09 – 83,99]
	Max (rpv)	1,247 [1,213-1,265]	1,242 [1,218-1,279]	1,266 [1,194-1,311]	1,235 [1,189-1,291]
	t _{max} (s)	594,6 [594,1-595,3]	595,2 [594,2-596,0]	595,9 [593,1-596,4]	594,4 [593,9-595,8]
CD8+	AUC (U)	73,15 [62,21 – 80,33]	74,97 [61,28 – 98,75]	83,87 [58,13 – 90,74]	60,34 [51,38 – 85,42]
	Max (rpv)	1,216 [1,207-1,251]	1,242 [1,222-1,285]	1,258 [1,193-1,292]	1,203 [1,181-1,293]
	t _{max} (s)	594,6 [594,1-595,3]	594,7 [593,7-596,0]	594,8 [593,9-595,8]	594,2 [593,7-595,5]

5.2. Reumatoid arthritisz

5.2.1. Sejtprevalencia vizsgálatok

A **kezeletlen korai RA-s** betegeknél **alap állapotban** a kontrollhoz képest emelkedett Th1, Th2 és Th17 sejt prevalenciát mértünk, miközben a Treg-sejtek aránya és a CD8 sejteké lecsökkent (5 és 6. táblázat, 6. ábra). A CD4 limfociták prevalenciája a kontrolltól nem tért el, így összességében a CD4/CD8 arány emelkedett volt. A Th1 és a Th2 emelkedés hasonló mértékű volt, ezért a helper sejtek arányaiban nem tértek el a kontroll csoporttól. Miközben a CD4+ naiv (CD45RA+) sejtek prevalenciája csökkent a kontrollhoz képest, az effektor/memória (CD45RO+) sejteké emelkedett, arányaiban tehát a két sejt az aktiváció irányába tolódott. Ezzel összhangban a korai (CD69) és a késői (HLA-DR) aktivációs markerek expressziója a CD4+ sejteken szintén emelkedett. A CD8+ naiv és effektor/memória sejtek alap állapotban nem mutattak eltérést a kontrolltól, ahogy a HLA-DR expresszió sem. Egyedül a CD69 expressziója emelkedett a kontroll csoporthoz képest a CD8+ sejteken.

4 hét GCS terápia után a Th2 prevalencia szignifikánsan lecsökkent, miközben a Th1 továbbra is emelkedett maradt. A megnövekedett Th1/Th2 arány ennek megfelelően Th1 irányú eltolódást mutatott. A CD69 aktivációs markerek expressziója a CD4+ és a CD8+ sejteken egyaránt normalizálódott, ahogy a HLA-DR is a CD4+ sejteken. A CD8+ sejtek HLA-DR expressziója azonban az alap állapothoz képest emelkedett. A Th17, a Treg sejtek, a CD4+ naiv és memória/effektor sejtek prevalenciája nem változott és továbbra is az alap állapothoz hasonló kóros mintázatot mutatott. A CD8+ naiv sejtek a kontrollhoz képest lecsökkentek, míg az effektor/memória sejtek prevalenciája nőtt.

A 8. hétre (4 héttel az után, hogy a GCS terápia dózisa lecsökkent és bevezetésre került az MTX kezelés) a Th17 prevalenciája szignifikánsan lecsökkent a 4. héthez képest, de a kontrollnál továbbra is magasabb volt. Érdekes módon a Th1 és a Th2 sejtek prevalenciája megemelkedett a 4. héthez képest. Szintén emelkedett a CD4+ limfociták prevalenciája és a CD8+ sejtek CD69 expressziója (a kontrollhoz képest).

Ezzel egy időben viszont lecsökkent a CD8+ sejtek HLA-DR expressziója és normalizálódott a CD8+ naiv ill. memória/effektor sejtek prevalenciája. A többi vizsgált sejtípus a 8. hétre érdemben nem változott.

A hagyományos **DMARD terápia**ra nem reagáló késői RA-s csoportban a naiv páciensekhez hasonlóan a Th1, a Th2, és a Th17 prevalenciája **kezdetben** magasabb volt a kontrollhoz képest, míg a Treg-sejtek és a CD8+ citotoxikus T-sejtek prevalenciája csökkent (az IFX kezelt csoportban a CD8+ T-sejtek csökkent prevalenciája nem bizonyult szignifikánsnak, szemben a ETA és az ADA kezelt populációban). A részletes adatok megtalálhatók az 5. és 6. táblázatban és a 7. ábrán.

A CD4+ helper sejtek, és a CD4+ ill. CD8+ naiv és memória/effektor sejtek prevalenciája normális volt kezdetben a késői RA-s betegeknél, ha őket egy csoportként kezeltük. Külön szedve azonban érdekes módon az IFX csoportban a CD4+ naiv (CD45RA+) sejtek csökkent, míg a memória/effektor (CD45RO+) sejtek emelkedett prevalenciát mutattak a kontrollhoz képest. A CD4+ limfociták az ADA csoportban mutattak emelkedést a kontrollhoz képest. Az aktivációs markerek (CD69 és HLA-DR) expressziója sem a CD4+, sem a CD8+ limfociták esetében nem tért el a kontrolltól.

A T-sejtek eloszlása hasonlóan változott a különböző **TNF- α gátló készítmények hatására**, bár bizonyos eltérések mégis mutatkoztak. Az ADA csoportban megfigyelt CD4+ limfocita emelkedés a 4. és a 8. hétre normalizálódott, míg az IFX kezelés hatására a prevalenciája a 4. hétre szignifikánsan megnőtt a kontrollhoz képest. A 8. héten minden vizsgált csoportban normalizálódott a CD4+ limfocita prevalenciája. Ezzel szemben a CD8+ sejtekét a TNF- α gátló készítmények egyike sem befolyásolta, az minden esetben az alap állapottal volt egyenértékű.

A Th1 prevalencia a 4. és a 8. hétre fokozatosan tovább emelkedett az IFX és az ETA kezelt betegeknél, miközben az ADA csoportban konstans maradt. A Th2 ezzel szemben az ADA és az IFX csoportban egyaránt változatlan prevalenciát mutatott, szemben az ETA kezelés hatására, ahol a Th2 normalizálódott (lecsökkent a 4. hétre majd változatlan maradt a 8. héten). A biológiai terápia egyike sem befolyásolta a Th17 sejtek prevalenciáját (4 és 8 hét után sem), miközben már 4 hét kezelést követően nőtt a Treg-ek aránya. Ez az emelkedés az ETA és az IFX esetén a 8. hétre tendenciózusan

folytatódott, de az eredmény nem bizonyult szignifikánsnak. Egyedül az ADA kezelés növelte szignifikáns módon a Treg-ek prevalenciáját a 8. hétre a 4.-hez viszonyítva. Bár az emelkedés mindhárom esetben jelentős volt, a kontroll csoporthoz viszonyítva a 8. hétre is csökkent T-reg prevalenciákat mértünk késői RA-ban.

A CD4+ naiv és memória/effektor sejtek eloszlása immunaktivációt jelzett, de nem azonos időpontokban. IFX esetében az alap állapotban megfigyelt csökkent CD4+ naiv és emelkedett memória sejtprevalencia a 4. és a 8. hétre is változatlanul megmaradt. Ugyanez a csökkent naiv/memória sejtarány volt megfigyelhető a 4. héten az ADA kezelésnél és a 8. héten az ETA kezelésnél. Az ADA kezelt betegeknél a 8. hétre a memória/effektor sejtek továbbra is magasabb prevalenciát mutattak, de ez az eltérés nem bizonyult szignifikánsnak (szemben a naiv sejtekkel, melyek aránya a 8. hétre is szignifikánsan csökkent maradt). A CD8+ naiv és memória/effektor sejtek a kezelés hatására sem változtak, mindvégig a kontrollal azonos arányokat mutattak.

Az aktivációs markerek is mutattak eltéréseket a különböző kezelésektől függően. Az alap állapothoz képest a HLA-DR expresszió a CD4+ sejteken a 4. és a 8. hétre emelkedett ETA és ADA kezelés hatására, míg az IFX nem befolyásolta. A CD4+ sejtek CD69 expressziója sem változott egyik kezelés hatására sem. A CD8+ sejtek esetében a HLA-DR nőtt ETA és ADA kezelés után, de csak a 8. hétre, az IFX azonban egyáltalán nem befolyásolta. A CD69 expresszió a CD8+ sejteken IFX kezelés esetén nőtt a 4. hétre, majd normalizálódott a 8. hétre, míg az ETA hatására lecsökkent a 4. hétre és megemelkedett a 8. hétre. Az ADA nem volt hatással a CD8+ sejtek CD69 expressziójára.

5.2.2. Funkcionális vizsgálatok

RA-ban a T-limfociták intracelluláris folyamataival kapcsolatos eredményeket a 7. és a 8. táblázat foglalja össze.

A terápia naiv, korai RA csoportban a vizsgált paraméterek (cit-Ca²⁺, mit-Ca²⁺, szabadgyök képződés és nitrogén monoxid termelés) egyike sem mutatott eltérést alap állapotban a kontrollhoz képest sem a CD4+ sem a CD8+ limfocitákban.

5. táblázat. CD4+ T-sejtek prevalencia értékei és arányai reumatoid artritiszben (RA) a hagyományos ill. a biológiai terápia előtt és alatt. Az adatok medián [interkvartilis tartomány] formátumban vannak megadva. ^Avs. kontroll $P<0,05$; ^Bvs. alap állapot $P<0,05$; ^Cvs. 4. hét $P<0,05$. MTX=metotrexát, GCS= glukokortikoszteroid, , LF=leflunomid, IFX=infliximab, ETA=etanercept, ADA=adalimumab, NO=nitrogén monoxid, Treg=regulátoros T-sejt

		CD4-ben Th1 (%)	CD4-ben Th2 (%)	Th1/Th2 arány	CD4-ben Th17 (%)	CD4-ben Treg (%)	Th17/ Treg arány	CD4-ben CD45RA+ (naiv sejt) (%)	CD4-ben CD45RO+ (memória sejt) (%)	naiv/ memória sejt arány	CD4-ben CD69+ (%)	CD4-ben HLA- DR+ (%)
	Kontroll (n=10)	9,12 [8,79-9,96]	6,07 [4,83-6,85]	1,53 [1,27-1,94]	1,05 [0,83-1,11]	5,68 [4,82-6,49]	0,17 [0,15-0,22]	56,50 [50,83-64,05]	38,05 [27,83-44,50]	1,56 [1,15-2,11]	2,34 [1,91-2,11]	2,62 [2,10-3,22]
Korai RA (n=19)	Alap állapot (terápia nélkül)	12,15 ^A [10,20-14,70]	9,25 ^A [8,84-11,5]	1,31 [1,04-1,61]	1,76 ^A [1,61-1,98]	3,14 ^A [2,81-3,66]	0,56 ^A [0,51-0,63]	46,95 ^A [34,90-53,50]	48,60 ^A [37,80-61,50]	1,00 ^A [0,57-1,41]	2,72 ^A [2,43-3,50]	3,47 ^A [2,99-4,56]
	4. hét: közepes dózisú GCS terápia után	11,65 ^A [10,70-12,00]	5,84 ^B [5,61-6,4]	1,86 ^B [1,80-2,04]	1,99 ^A [1,90-2,24]	2,87 ^A [2,77-2,93]	0,72 ^A [0,59-0,76]	44,55 ^A [35,60-55,00]	50,70 ^A [41,90-59,10]	0,85 ^A [0,60-1,31]	2,41 ^B [2,13-2,83]	2,88 ^B [2,67-3,18]
	8. hét: kis dózisú GCS és MTX kombináció után	12,95 ^{A,C} [12,40-13,90]	8,98 ^{A,C} [8,55-9,32]	1,41 ^C [1,40-1,70]	1,55 ^{A,C} [1,41-1,70]	3,07 ^A [3,06-3,26]	0,49 ^{A,C} [0,37-0,53]	42,65 ^A [40,00-51,20]	45,85 ^A [44,30-51,50]	0,90 ^A [0,72-1,08]	2,57 [2,22-2,84]	2,77 ^B [2,65-3,69]
Késői RA IFX terápiával (n=8)	Alap állapot (MTX és LF terápia mellett)	12,80 ^A [11,45-13,90]	7,14 ^A [6,67-9,42]	1,65 [1,18-1,91]	1,90 ^A [1,77-2,37]	3,01 ^A [2,64-3,09]	0,76 ^A [0,56-0,82]	40,20 ^A [28,7-48,45]	53,60 ^A [45,88-65,05]	0,75 ^A [0,44-1,07]	2,50 [1,89-2,97]	2,60 [1,48-7,10]
	4 hét IFX és MTX terápia után	12,90 ^A [12,20-14,75]	7,92 ^A [6,88-9,74]	1,58 [1,35-2,02]	1,86 ^A [1,69-2,35]	3,93 ^{A,B} [3,22-4,39]	0,46 ^A [0,38-0,66]	40,30 ^A [32,00-47,90]	58,20 ^A [46,95-61,33]	0,66 ^A [0,53-1,04]	2,72 [2,13-3,13]	1,99 [1,16-4,86]
	8 hét IFX és MTX terápia után	16,20 ^{A,B,C} [13,35-16,75]	7,06 ^A [5,71-9,91]	2,21 ^A [1,71-2,42]	1,82 ^A [1,43-2,29]	4,25 ^{A,B} [4,15-4,65]	0,39 ^{A,B} [0,31-0,55]	40,30 ^A [28,7-47,8]	54,80 ^A [43,15-66,90]	0,74 ^A [0,43-1,13]	2,65 [1,92-3,47]	3,17 [1,71-6,20]
Késői RA ETA terápiával (n=12)	Alap állapot (MTX és LF terápia mellett)	11,70 ^A [10,80-13,10]	6,75 ^A [5,55-9,39]	1,60 [1,30-1,97]	1,66 ^A [1,09-2,23]	3,09 ^A [2,74-3,40]	0,56 ^A [0,39-0,66]	54,30 [45,05-67,23]	38,60 [26,03-49,60]	1,32 [0,92-2,58]	2,46 [1,97-2,89]	2,89 [2,10-4,36]
	4 hét ETA és MTX terápia után	13,25 ^A [11,38-14,73]	6,37 [5,84-8,44]	1,80 [1,60-2,17]	1,66 ^A [1,62-1,91]	3,81 ^{A,B} [3,61-4,65]	0,43 ^A [0,38-0,46]	53,35 [42,93-58,98]	42,05 [35,03-53,50]	1,27 [0,81-1,69]	2,36 [2,13-2,73]	4,20 ^{A,B} [2,98-5,56]
	8 hét ETA és MTX terápia után	14,30 ^{A,B,C} [14,05-15,40]	6,02 [5,11-7,93]	2,37 ^{A,B,C} [1,79-2,77]	1,82 ^A [1,36-2,15]	4,56 ^{A,B} [3,88-5,39]	0,39 ^A [0,31-0,50]	51,65 ^B [38,55-54,70]	42,80 ^B [36,10-54,98]	1,26 ^B [0,70-1,46]	2,56 [1,99-2,68]	3,88 ^A [3,07-5,73]
Késői RA ADA terápiával (n=12)	Alap állapot (MTX és LF terápia mellett)	11,55 ^A [10,50-13,93]	7,69 ^A [6,14-9,06]	1,53 [1,30-1,89]	1,93 ^A [1,49-2,15]	3,31 ^A [2,73-3,56]	0,53 ^A [0,47-0,68]	53,75 [39,60-61,85]	40,70 [36,10-51,85]	1,33 [0,79-1,72]	2,53 [1,77-3,06]	3,90 [1,94-5,58]
	4 hét ADA és MTX terápia után	11,90 ^A [10,14-13,20]	8,00 ^A [6,86-9,42]	1,48 [1,06-2,06]	1,92 ^A [1,64-2,19]	4,09 ^{A,B} [3,44-4,59]	0,49 ^A [0,38-0,59]	46,85 ^A [28,25-56,05]	47,75 ^{A,B} [39,93-64,02]	0,98 ^A [0,44-1,44]	2,23 [1,70-3,20]	4,11 ^A [2,92-5,35]
	8 hét ADA és MTX terápia után	11,50 ^A [10,60-12,53]	7,52 ^A [5,93-9,42]	1,48 [1,27-2,03]	1,72 ^A [1,33-2,34]	5,06 ^{A,B,C} [4,49-5,48]	0,36 ^A [0,26-0,43]	49,20 ^A [31,33-54,43]	44,40 [38,28-61,95]	1,13 ^A [0,50-1,39]	2,33 [1,56-3,08]	4,79 ^A [3,42-5,62]

6. táblázat. CD8 T-sejtek prevalencia értékei és arányai reumatoid artritiszben (RA) a hagyományos ill. a biológiai terápia előtt és alatt. Az adatok medián [interkvartilis tartomány] formátumban vannak megadva. ^Avs. kontroll $P<0,05$; ^Bvs. alap állapot $P<0,05$; ^Cvs. 4. hét $P<0,05$. MTX=metotrexát, GCS= glukokortikoszteroid, , LF=leflunomid, IFX=infliximab, ETA=etanercept, ADA=adalimumab, NO=nitrogén monoxid, Treg=regulátoros T-sejt

	PBMC-ben CD4+ (%)	PBMC-ben CD8+ (%)	CD4/CD8 arány	CD8-ban CD45RA+ (naiv sejt) (%)	CD8-ban CD45RO+ (memória sejt) (%)	naiv/ memória sejt arány	CD8-ban CD69+ (%)	CD8-ban HLA-DR+ (%)
Kontroll (n=10)	41,55 [36,78-43,8]	21,80 [16,85-29,50]	1,81 [1,37-2,69]	72,45 [61,78-78,65]	21,55 [15,50-29,20]	3,61 [2,14-5,16]	1,69 [1,02-1,99]	2,07 [1,58-2,56]
Alap állapot (terápia nélkül)	43,90 [37,60-62,00]	12,4 ^A [10,10-17,90]	3,95 ^A [2,56-5,28]	64,80 [57,80-74,30]	28,25 [21,60-33,60]	2,32 [1,85-3,44]	2,59 ^A [1,91-3,34]	2,77 [1,84-3,82]
Korai RA (n=19)								
4. hét: közepes dózisú GCS terápia után	44,00 [33,10-53,90]	12,55 ^A [9,68-16,9]	3,25 ^A [2,90-5,76]	58,40 ^A [54,30-69,10]	40,05 ^A [23,60-42,30]	1,42 ^A [1,28-2,81]	1,67 ^B [1,45-2,54]	3,21 ^{A,B} [2,67-3,46]
8. hét: kis dózisú GCS és MTX kombináció után	48,00 ^A [45,30-49,60]	11,45 ^A [10,60-15,60]	4,50 ^A [2,90-5,06]	66,25 [58,50-71,60]	27,45 [25,00-40,60]	2,20 [1,52-2,92]	2,03 ^{A,B} [1,83-2,15]	1,77 ^C [1,72-1,87]
Késői RA IFX terápiával (n=8)								
Alap állapot (MTX és LF terápia mellett)	44,00 [32,48-49,45]	16,80 [13,95-22,83]	2,59 [1,39-3,52]	67,3 [53,05-73,40]	26,60 [20,73-45,68]	2,62 [1,28-3,43]	2,04 [1,85-3,10]	2,12 [1,97-2,88]
4 hét IFX és MTX terápia után	51,00 ^A [47,5-57,08]	17,70 [15,70-18,40]	2,86 [2,69-3,39]	54,80 [48,35-71,58]	37,10 [21,63-42,68]	1,47 [1,18-3,35]	2,20 ^A [1,94-2,27]	2,08 [1,56-2,58]
8 hét IFX és MTX terápia után	49,85 [35,2-50,88]	18,70 [14,30-21,45]	2,78 [1,63-3,50]	62,70 [50,20-74,58]	25,85 [21,55-46,25]	2,51 [1,11-3,44]	1,87 [1,62-2,05]	2,37 [1,83-2,97]
Késői RA ETA terápiával (n=12)								
Alap állapot (MTX és LF terápia mellett)	51,95 [39,53-64,95]	12,35 ^A [6,49-18,70]	4,81 ^A [2,79-5,38]	75,55 [67,05-80,50]	20,60 [15,25-27,20]	3,58 [2,36-5,28]	2,04 [1,65-3,08]	2,49 [1,58-3,15]
4 hét ETA és MTX terápia után	44,00 [39,00-49,35]	12,55 ^A [9,73-18,40]	3,29 ^{A,B} [2,44-4,02]	72,90 [69,23-77,88]	23,40 [18,73-26,65]	3,06 [2,73-4,15]	1,64 ^B [1,39-2,30]	2,40 [2,20-2,51]
8 hét ETA és MTX terápia után	44,15 [40,08-49,78]	11,55 ^A [9,40-17,63]	3,56 ^A [2,55-4,86]	71,55 [69,30-72,93]	22,70 [18,98-26,35]	3,24 [2,68-3,91]	2,32 ^A [1,71-2,72]	3,28 ^A [2,58-3,76]
Késői RA ADA terápiával (n=12)								
Alap állapot (MTX és LF terápia mellett)	46,80 ^A [42,75-53,00]	15,25 ^A [11,06-19,10]	2,99 ^A [2,62-4,53]	72,50 [61,30-78,33]	21,55 [15,38-26,20]	3,21 [2,21-5,24]	2,35 [1,51-4,05]	2,65 [2,25-3,76]
4 hét ADA és MTX terápia után	44,90 [37,80-50,93]	16,20 ^A [10,48-21,30]	2,99 [2,01-4,31]	66,20 [59,75-74,45]	26,95 [15,85-33,43]	2,46 [1,79-4,44]	2,64 [1,55-3,55]	2,37 [1,73-3,13]
8 hét ADA és MTX terápia után	47,40 [38,45-50,08]	15,40 ^A [10,47-20,83]	3,12 [4,04]	66,50 [60,85-71,68]	23,60 [21,95-26,83]	2,71 [2,28-3,06]	2,34 [1,65-3,77]	2,88 ^A [2,24-3,48]

4 hét GCS terápia után a PHA aktivációt követő cit-Ca²⁺ válasz a kontroll csoporthoz képest mindkét sejtpopulációban lecsökkent. A CD4+ limfociták esetében az első 10 percben megfigyelt szabadgyök képződés is szignifikáns csökkenést mutatott a kontroll csoporthoz és az alap állapothoz képest.

A 8. héten, a csökkentett dóziszú GCS és az MTX terápia mellett a cit-Ca²⁺ válasz normalizálódott a CD4+ és a CD8+ limfocitákban, így az alap állapottal illetve a kontroll csoporttal azonos mértéket mutatott. A szabadgyök képződés a 8. hétre további csökkenést jelzett a CD4+ limfocitákban és ezzel párhuzamosan a CD8 limfociták szabadgyök képződése is lecsökkent a 8. hétre a kontroll csoporthoz képest. A mit-Ca²⁺ és a nitrogén monoxid termelés kinetikája DMARD terápiát követően sem mutatott eltérést.

A kombinált DMARD nonreszpondereknél a TNF- α kezelést megelőzően fokozott cit-Ca²⁺ válasz jelentkezett a kontroll csoporthoz képest a CD4+ és a CD8+ limfocitákban egyaránt. A többi vizsgált paraméter nem mutatott eltérést alap állapotban, kivéve az ETA csoportot, ahol a szabadgyök képződés a kontrollhoz képest emelkedett volt a CD4+ limfocitákban.

A biológiai terápia **4. hetén** a cit-Ca²⁺ válasz mindhárom (IFX, ETA és ADA) csoportban normalizálódott mindkét limfocita populációban. Ezzel párhuzamosan a szabadgyök képződés is szignifikánsan lecsökkent az alap állapothoz képest (IFX esetén pedig a kontrollhoz képest is a CD4+ sejtekben) minden vizsgált csoportban, kivéve az ADA kezelés esetében, ahol a CD8+ limfocitákban a szabadgyök képződés nem változott. A mit-Ca²⁺-ra egyedül az IFX volt hatással a CD8+ limfocitákban, ahol a kezelés hatására elnyújtott és fokozott mit-Ca²⁺ válasz volt megfigyelhető. Az NO termelésre 4 hét után nem volt hatással a TNF- α gátló terápia.

A 8. hétre a kezeléstől függetlenül semmilyen változást nem észleltünk egyik vizsgált paraméterben sem, így a 4. héten megfigyelt kinetikák állandósultak.

7. táblázat. Reumatoid artritiszben (RA) a CD4+ T-limfociták intracelluláris folyamatait leíró görbék legfontosabb paraméterei.

^A vs. kontroll $P < 0,05$; ^B vs. alap állapot $P < 0,05$. Az adatok medián [interkvartilis tartomány] formátumban vannak megadva. AUC = görbe alatti terület, Max = maximum érték, t_{max} = maximum elérésének ideje, GCS = glukokortikoszteroid, MTX = metotrexát, LF = leflunomid, IFX = infliximab, ETA = etanercept, ADA = adalimumab, NO = nitrogén monoxid

	Citoplazmatikus Ca ²⁺			Szabadgyök képződés			NO termelés	Mitokondriális Ca ²⁺
	AUC (U)	Max (rpv)	t_{max} (s)	AUC (U)	Max (rpv)	t_{max} (s)	AUC (U)	AUC (U)
Kontroll (n=9)	89,06 [62,60-131,5]	1,211 [1,149-1,326]	444,8 [192,3-594,4]	75,43 [68,01-88,80]	1,239 [1,217-1,263]	594,5 [594,3-595,3]	5,501 [-6,919-35,98]	64,18 [42,85-97,89]
Alap állapot (terápia nélkül)	90,54 [73,45-206,5]	1,221 [1,166-1,581]	458,9 [172,6-594,5]	74,36 [50,26-90,26]	1,245 [1,178-1,308]	594,5 [594,0-595,2]	34,11 [-0,103-76,15]	63,03 [33,70-97,45]
Korai RA (n=12)								
4. hét: közepes dózisú GCS terápia után	44,55 ^{A,B} [21,11-74,37]	1,127 ^A [1,068-1,201]	234,2 [209,0-594,1]	48,47 ^{A,B} [36,15-79,09]	1,172 [1,145-1,237]	594,7 [594,3-595,4]	-9,670 [-11,43-10,73]	40,11 [25,71-58,89]
8. hét: kis dózisú GCS és MTX kombináció után	60,67 [12,22-111,6]	1,232 [1,046-1,295]	306,5 [289,5-594,1]	49,75 ^A [45,87-54,55]	1,170 ^A [1,165-1,179]	594,6 [594,5-594,8]	3,180 [-12,39-11,74]	55,83 [19,47-72,22]
Késői RA (n=7)								
Alap állapot (MTX és LF terápia mellett)	145,1 ^A [126,8-207,4]	1,374 ^A [1,315-1,510]	594,1 [342,8-594,6]	65,04 [53,47-86,19]	1,223 [1,170-1,258]	594,6 [594,4-595,2]	24,62 [-7,701-95,59]	51,86 [44,98-81,62]
IFX terápiaval (n=7)								
4 hét IFX és MTX terápia után	96,97 [4,403-162,7]	1,240 [1,032-1,352]	594,5 [276,2-594,6]	39,92 ^{A,B} [33,42-67,93]	1,146 ^A [1,141-1,230]	594,4 [593,7-595,2]	19,82 [-14,59-30,06]	83,87 [51,44-166,5]
8 hét IFX és MTX terápia után	115,9 [59,33-141,1]	1,328 [1,242-1,347]	593,9 [288,0-594,9]	56,16 ^A [45,14-71,85]	1,186 ^A [1,167-1,220]	593,6 [593,1-595,5]	-2,549 [-16,00-25,92]	67,37 [42,57-118,9]
Késői RA (n=7)								
Alap állapot (MTX és LF terápia mellett)	141,2 ^A [109,1-235,6]	1,319 ^A [1,271-1,535]	372 [216,7-593,5]	94,55 ^A [81,39-111,0]	1,293 [1,242-1,372]	594,9 [594,2-595,6]	-0,087 [-12,70-22,17]	70,62 [59,08-128,8]
ETA terápiaval (n=7)								
4 hét ETA és MTX terápia után	125,7 [64,09-159,1]	1,304 [1,147-1,396]	383,8 [246,1-594,1]	73,49 ^B [59,69-81,87]	1,235 ^B [1,188-1,275]	594,8 [594,1-595,3]	21,72 [-4,121-87,42]	50,93 [34,75-82,80]
8 hét ETA és MTX terápia után	92,11 [49,82-222,8]	1,231 [1,182-1,491]	312,5 [174,3-593,9]	72,37 [49,84-105,9]	1,226 [1,163-1,300]	593,9 [593,7-594,8]	8,466 [-8,267-62,04]	77,45 [26,15-94,89]
Késői RA (n=8)								
Alap állapot (MTX és LF terápia mellett)	144,4 ^A [128,0-199,8]	1,399 ^A [1,320-1,484]	557,9 [217,8-594,4]	81,89 [69,52-106,8]	1,258 [1,220-1,343]	594,5 [594,0-594,9]	15,86 [1,704-116,9]	77,94 [66,09-90,10]
ADA terápiaval (n=8)								
4 hét ADA és MTX terápia után	93,91 [77,45-157,3]	1,227 [1,188-1,347]	497,4 [256,4-594,6]	63,21 ^B [34,48-77,15]	1,212 [1,155-1,240]	594,7 [594,2-595,5]	25,87 [-6,588-99,43]	66,84 [41,83-92,19]
8 hét ADA és MTX terápia után	107,6 [50,18-158,5]	1,262 [1,146-1,364]	432,4 [226,6-594,5]	73,95 [61,69-78,82]	1,230 [1,211-1,241]	594,2 [593,6-594,9]	60,43 [26,93-133,0]	71,77 [62,20-95,48]

8. táblázat. Reumatoid artritiszben (RA) a CD8+ T-limfociták intracelluláris folyamatait leíró görbék legfontosabb paraméterei.

^A vs. kontroll $P < 0,05$; ^B vs. alap állapot $P < 0,05$. Az adatok medián [interkvartilis tartomány] formátumban vannak megadva. AUC = görbe alatti terület, Max = maximum érték, t_{max} = maximum elérésének ideje, GCS = glukokortikoszteroid, MTX = metotrexát, LF = leflunomid, IFX = infliximab, ETA = etanercept, ADA = adalimumab, NO = nitrogén monoxid

	Citoplazmatikus Ca ²⁺			Szabadgyök képződés			NO termelés	Mitokondriális Ca ²⁺
	AUC (U)	Max (rpv)	t_{max} (s)	AUC (U)	Max (rpv)	t_{max} (s)	AUC (U)	AUC (U)
Kontroll (n=9)	66,93 [30,26-125,4]	1,159 [1,076-1,318]	593,5 [212,9-594,1]	72,27 [63,06-81,29]	1,229 [1,201-1,250]	594,3 [593,7-594,7]	-8,283 [-14,03-32,58]	95,27 [65,04-123,8]
Alap állapot (terápia nélkül)	113,6 [78,25-271,3]	1,280 [1,165-1,578]	417,7 [225,1-594,4]	73,45 [46,86-91,89]	1,237 [1,163-1,296]	594,4 [593,5-595,1]	27,11 [-4,81-84,51]	97,91 [66,78-130,9]
Korai RA (n=12)								
4. hét: közepes dózisú GCS terápia után	51,84 [36,76-62,66]	1,136 [1,086-0,171]	204,0 ^A [172,6-314,6]	55,50 [38,25-82,20]	1,175 [1,135-1,236]	594,5 [594,0-594,8]	-2,612 [-23,17-20,68]	62,0 [54,09-92,09]
8. hét: kis dózisú GCS és MTX kombináció után	47,27 [-29,74-90,85]	1,124 [1,038-0,221]	227,9 [160,9-264,5]	48,37 ^A [41,21-52,04]	1,150 ^{A,B} [1,146-1,173]	594,5 [594,3-594,8]	-1,95 [-16,37-20,87]	72,12 [67,42-108,9]
Késői RA IFX terápiával (n=7)								
Alap állapot (MTX és LF terápia mellett)	185,1 ^A [116,6-243,3]	1,395 ^A [1,277-1,624]	282,4 [221,7-594,2]	70,10 [54,39-86,25]	1,214 [1,183-1,233]	594,6 [593,4-595,4]	14,26 [2,377-99,16]	103,5 [28,5-147,2]
4 hét IFX és MTX terápia után	108,6 [72,64-152,6]	1,230 [1,159-1,337]	512,8 [414,2-593,7]	52,00 [44,86-79,63]	1,210 [1,160-1,266]	594,4 [593,7-595,2]	25,01 [-9,913-37,25]	149,9 ^{A,B} [111,0-174,1]
8 hét IFX és MTX terápia után	135,2 [93,39-192,9]	1,400 [1,250-1,533]	594,0 [239,6-594,9]	51,33 ^B [27,14-65,36]	1,166 ^{A,B} [1,117-1,186]	593,5 [593,1-594,7]	0,598 [-10,1-15,56]	120,4 [92,63-177,2]
Késői RA ETA terápiával (n=7)								
Alap állapot (MTX és LF terápia mellett)	141,7 ^A [81,3-166,8]	1,310 ^A [1,181-1,370]	233,7 [180,2-594,5]	82,04 [59,80-90,76]	1,248 [1,198-1,320]	595,5 [594,8-595,7]	3,144 [-20,79-20,4]	99,13 [72,83-119,2]
4 hét ETA és MTX terápia után	123,0 [80,64-222,7]	1,262 [1,197-1,464]	593,1 [204,1-594,3]	62,68 [54,58-65,66]	1,192 [1,179-1,231]	593,9 [593,1-594,5]	10,21 [-13,53-66,18]	99,82 [58,25-175,5]
8 hét ETA és MTX terápia után	85,58 [15,71-174,2]	1,245 [1,081-1,360]	564,8 [299,7-595,0]	63,48 [33,88-91,21]	1,180 [1,144-1,262]	594,8 [593,9-595,2]	6,344 [-11,89-44,72]	118,4 [89,4-135,4]
Késői RA ADA terápiával (n=8)								
Alap állapot (MTX és LF terápia mellett)	167,8 ^A [92,92-299,8]	1,433 ^A [1,247-1,668]	426,2 [213,0-594,4]	77,61 [69,66-104,1]	1,242 [1,213-1,316]	594,1 [593,6-594,7]	13,38 [-6,351-123,1]	117,1 [81,13-179,3]
4 hét ADA és MTX terápia után	107,3 [62,06-205,1]	1,257 [1,149-1,453]	522,4 [280,6-594,6]	63,42 [36,41-72,28]	1,205 [1,123-1,239]	594,2 [593,4-594,6]	19,68 [-8,922-85,39]	118,6 [47,75-151,9]
8 hét ADA és MTX terápia után	109,1 [93,76-185,2]	1,249 [1,204-1,439]	516,8 [348,1-594,5]	69,88 [60,48-74,83]	1,210 [1,193-1,247]	595,0 [594,6-595,4]	96,51 [20,34-126,9]	106,2 [92,88-123,6]

6. MEGBESZÉLÉS

6.1. Spondilitisz ankilopoetika

Az AS a gerinc ismeretlen eredetű krónikus gyulladása, mely a gerinc érintettsége mellett enthesitissel és perifériás ízületi gyulladással is társulhat [3]. A patogenezis pontos mechanizmusa még ismeretlen, de a betegség kialakulásában az adaptív immunitás elemeinek [1,6,90] és bizonyos intracelluláris folyamatoknak [91] fontos szerepe lehet.

6.1.1. Sejtprevalencia vizsgálatok infliximab kezelés előtt

A makrofágok, a B-limfociták és a T-limfociták egyes képviselőinek számbeli eltérései régóta ismertek AS-ben [92]. Korábbi vizsgálatok széleskörűen tanulmányozták a különböző T-sejt populációk prevalenciáját AS-es betegek különböző testváladékaiból. Leírták, hogy perifériás vérben a CD4+ [93] és a CD8+ [94] sejtek aránya AS-ben megemelkedik. Ezzel összhangban mi is emelkedett CD4+ prevalenciát mértünk a kontrollhoz képest. Ezzel párhuzamosan vizsgálatunkban a Th1 és a Th2 sejtek száma is emelkedett. Ez az eredmény alátámasztja azt a megfigyelést, hogy AS-ben a normálnál magasabb Th2 arány figyelhető meg [6]. A Th1 sejtekre vonatkozó irodalmi adatot nem találtunk. Munkánk során egy Th2 irányú eltolódást is megfigyelhettünk, ugyanis a Th1 marker CXCR3 prevalenciája kisebb mértékben emelkedett, mint a Th2 marker CCR4-é. A felszíni markerek vizsgálatával megerősítettük Rudwaleit és mtsai citokintermelésre vonatkozó megállapítását, miszerint AS-re a Th2 dominancia jellemző [95]. (A CXCR3 és a CCR4 széleskörben elfogadott sejt felszíni markerei a Th1 és a Th2 sejteknek [6,13].)

Az adaptív immunitás szabályozásában eltöltött központi szerepük miatt a Treg-sejteket és a Th17 sejteket is vizsgáltuk. Az antiinflammatorikus Treg-sejtek csökkent prevalenciája számos autoimmun betegségben (RA, 1-es típusú cukorbetegség) megfigyelhető [96,97]. Az immunválasz ilyen esetben fokozódik, különösképpen, ha ezzel párhuzamosan a proinflammatorikus Th17 sejtek aránya pedig emelkedik [98,99]. Wu és mtsai kimutatták, hogy AS-ben a Th17/Treg arány emelkedik. Az immunfenotípus ez irányú változásának fontos szerepe lehet a betegség

patomechanizmusában [8]. Támogatva ezt az elméletet, az általunk vizsgált betegpopulációban mi is eltolódást találtunk a Th17/Treg arányban az emelkedett Th17 és a normál Treg prevalancia következtében. A korábbi vizsgálatokban ismertetett alacsony prevalenciájú és az általunk mért normál Treg közti eltérés a Treg-ek azonosításához alkalmazott technikai eltérések adhatnak magyarázatot. Amíg Wu és mtsai a Treg-sejteket az intracelluláris FoxP3 transzkripció faktor expresszió alapján azonosította, addig mi a CD4 és a CD25 pozitivitás, valamint a CD127 negativitás szerint definiáltuk (CD4+CD25+CD127- Treg). Habár kimutatták, hogy CD4+ sejteken a CD127 fordítottan arányos a FoxP3 expresszióval [63] és hogy a CD127 marker hiánya a FoxP3 transzkripció faktor alternatívájának tekinthető [64], újabban megkérdőjeleződött a két módszer összehasonlításának pontossága. Klein és mtsai szerint a kétféle módon azonosított Treg populáció bár sok átfedést mutat, nem teljesen ugyanazt a sejttípust jelöli, így a különböző tanulmányok eredményeit nem tanácsos összevetni [100]. Ha azonban a Treg-ek azonosítására a FoxP3 előtt elterjedt CD4+CD25+ pozitivitást [101] alkalmaztuk, akkor vizsgálatunkban szintén csökkent expressziót mértünk AS-ben a kontroll csoporthoz képest.

Míg egyes autoimmun kórképekben a CD45RA+ és a CD45RO+ (naiv és memória/effektor) T-sejteknek fontos szerepe van [102], AS-ben (másokhoz hasonlóan [90]) nekünk sem sikerült semmilyen eltérést kimutatni a kontroll csoporthoz képest IFX kezelés előtt. A korai és a késői (CD69, HLA-DR) aktivációs markerek is a kontroll csoporttal voltak egyenértékűek [103], ahogy a CD8+ sejtcsoportok egyike sem mutatott eltérést a kontroll csoporttól.

Fontos megjegyezni, hogy mérési eredményeink perifériás vérmintákra vonatkoznak, így a lokálisan zajló ízületi gyulladáshoz kapcsolódó sejtprevalencia értékei ettől eltérhetnek.

6.1.2. Sejtprevalencia vizsgálatok infliximab kezelés után

Vizsgálataink során AS-ben elsőként nyomon követtük a sejtprevalencia értékek rövid távú változásait az IFX kezelés alatti 6 hétben. Ez az időintervallum terápiás szempontból az úgynevezett indukciós terápiás időszaknak felel meg. Miközben az IFX kezelés hatására a BASDAI érték szignifikánsan lecsökkent, a sejtprevalencia értékek

közvetlenül nem követték ezt a változást. A kontrolltól való eltérés az IFX kezelés előtti állapothoz hasonlóan megmaradt, sőt egyetlen hatásként a korábban érintetlen CD4+ naiv és memória/effektor sejtek ellentétes irányú változása a memória/effektor sejtek javára billentette az arányukat. Joggal feltételezhetjük tehát, hogy az IFX kedvező klinikai hatását az általunk vizsgált sejtprevalenciák befolyásolásától függetlenül fejti ki. Ez az eredmény ellentmond azoknak a megfigyeléseknek, amelyeket más kórképekben, de szintén IFX kezelt betegekben találtak. Az IFX fokozza a CD4+, a CD8+ [11] és a Treg-sejtek [104] prevalenciáját Crohn betegségben, valamint a Th1 elkötelezett T-limfocitákét RA-ban [13,105].

Ez a diszkrepancia a mi eredményeink és az irodalmi adatok között egyrészt az alkalmazott markerek közötti különbségnek tulajdoníthatók (a Treg esetében mi a jelenleg egyre szélesebb körben elfogadott felszíni markereket választottuk, nem pedig a korábban használt intracelluláris FoxP3 faktort). Másrészt felvetik annak a lehetőségét, hogy az IFX adaptív immunitásra gyakorolt hatásai betegség-specifikusak lehetnek.

6.1.3. Funkcionális vizsgálatok infliximab kezelés előtt

Reumatológiai kórképek patomechanizmusának egyik kulcs momentuma a fokozott TNF- α termelés, ami AS-ben is megfigyelhető [106]. Ez a krónikus folyamat helyi és szisztémás gyulladást indukálhat, ami a betegség klinikai képét és a tüneteket is nagymértékben meghatározza [107]. Az utóbbi időben egyre több jel mutat arra, hogy a kóros TNF- α expozíció a T-sejtek intracelluláris jelátvitelére is hatással van [108,109]. Az eltérő sejtprevalenciák mellett tehát feltételeztük, hogy a sejtműködés esetében is különbségek lesznek AS-ben. Munkánk kiterjesztéseként ezért adatokat gyűjtöttünk arra vonatkozóan, hogy a T-limfociták aspecifikus aktivációját kísérő intracelluláris folyamatok kinetikája eltérő-e AS-ben a kontrollhoz képest.

Normál sejtműködés során a T-sejt receptor (TCR) stimulációja fokozza a citoplazmatikus Ca²⁺ jelet azáltal, hogy az inozitol-1,4,5-triszfoszfát (IP₃) az aktiváció korai fázisában az endoplazmás retikulumból (ER) kalciumot szabadít fel. Ezzel egy időben a Ca²⁺ visszavétele is azonnal megindul az ER-ba és a mitokondriumba. Ezt a folyamatot a vizsgálatunk során a CD4+ és a CD8+ limfociták esetén is reprodukálni

tudtuk: a PHA adagolást követően a cit- Ca^{2+} jel és ezzel párhuzamosan a mit- Ca^{2+} jel is egy meredek emelkedést mutatott az aktiváció után, majd egy fenntartott fázist követően lecsengett. Fontos megjegyezni, hogy a cit- Ca^{2+} emelkedés AS-ben késleltetett volt a CD4^+ és a CD8^+ sejtekben egyaránt a kontroll sejtek kinetikájához viszonyítva. Ezzel összhangban a mit- Ca^{2+} is később érte el a maximumát AS-ben (a CD8^+ sejtek esetében). A CD4^+ sejteknél az ilyen irányú megfigyelést nehezítette, hogy a mit- Ca^{2+} jel maximuma sok esetben a mért időn kívülre esett a kontroll és a beteg populációban egyaránt (4. Ábra). További eltolódást tehát jelen vizsgálati körülmények között nem tudunk mérni. A késleltetett Ca^{2+} jel összhangban van azzal a megfigyeléssel, amit in vitro körülmények között mértek TNF- α hatásnak kitett T-sejtekben. Church és mtsai megállapították, hogy a TNF- α kezelés csökkentette a PHA stimulációt követő cit- Ca^{2+} jel csúcsát T-sejtekben [109]. Ez annak az összetett TNF- α hatásnak lehet az eredménye, amely a jelátviteli kaszkádot több ponton is módosítja. A TNF- α down-regulálja a CD3 zéta-láncot [110], csökkenti a ZAP-70 foszforilációt [111], de közvetlenül a Ca^{2+} mobilizációját is gátolja [109]. AS-ben mindössze egy tanulmányban vizsgálták az intracelluláris Ca^{2+} változást PHA stimulációt követően. Lee és mtsai perifériás limfociták cit- Ca^{2+} koncentrációját mérték, de nem találtak szignifikáns eltérést a beteg populáció és a kontroll csoport között [112]. Ez a vizsgálat azonban több ponton is eltér a miénktől, ugyanis az általuk vizsgált sejtcsoport heterogénebb és más az alkalmazott Ca^{2+} szelektív festék. Ráadásul a Ca^{2+} görbe kinetikus jellemzése helyett mindössze a Ca^{2+} koncentrációkat hasonlították össze.

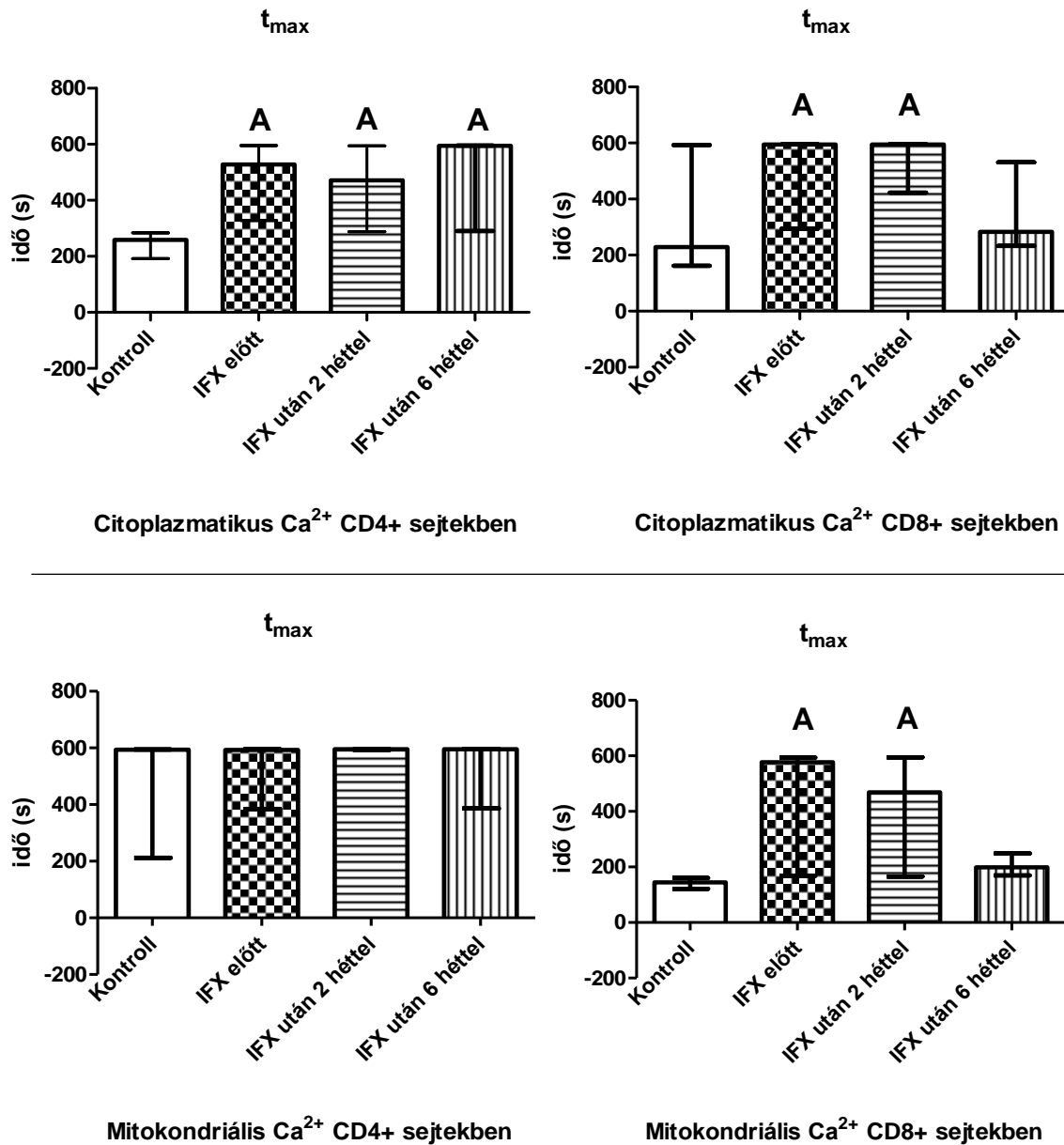
A TCR stimuláció hatására emelkedő Ca^{2+} szint mellett számos intracelluláris folyamat aktiválódik a jelátviteli kaszkádnak köszönhetően. Ezek közé tartozik az NO termelés is, amely TCR aktivációt követően fokozódik [113]. A pontos intracelluláris NO mennyiség azonban a különböző serkentő és gátló mechanizmusok egyensúlyának eredménye. A TCR aktivációval egy időben egy negatív feedback mechanizmus is megindul, amelyben a magas NO szint gátolja a TCR-en keresztüli jelátvitelt azáltal, hogy csökkenti a zéta-lánc expresszióját [91]. A TNF- α -ról pedig kimutatták, hogy több sejttípusban (makrofág, endothél sejt, simaizom sejt) növeli az intracelluláris NO termelést az indukálható nitrogén-oxid-szintetáz (iNOS) aktivitásának a fokozása révén [114,115]. Magas TNF- α mellett tehát fokozott NO termelés feltételezhető. Ezt az elméletet munkánk során sikerült teljes mértékben alátámasztani, ugyanis a kontrollhoz

képest az NO termelés fokozódott AS-ben (5.ábra). RA-ban Nagy és mtsai hasonló eredményre jutottak [9], bár ők statikus mérést végeztek, míg mi a kinetikát próbáltunk leírni.

6.1.4. Funkcionális vizsgálatok infliximab kezelés alatt

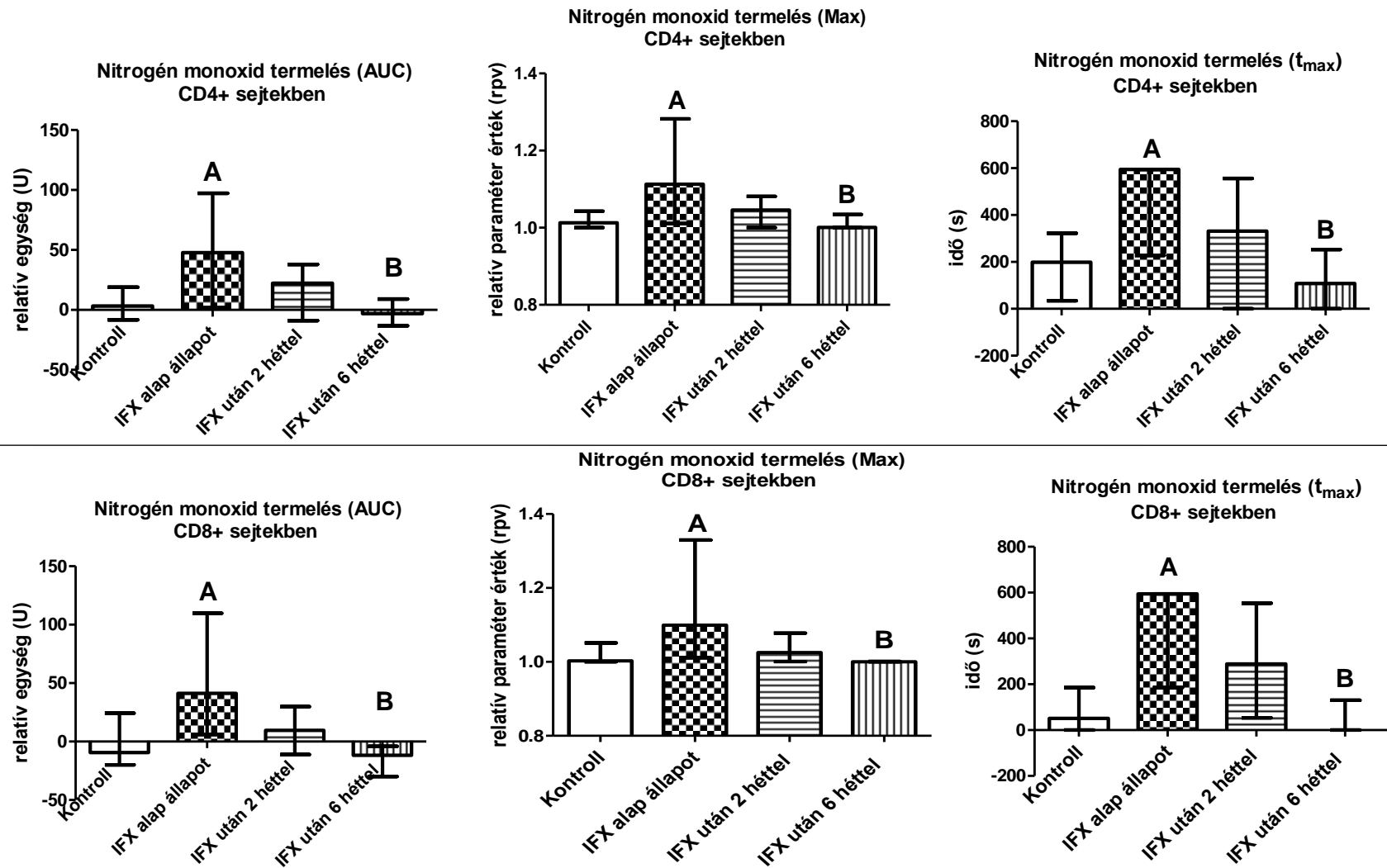
Munkánk második fázisába az IFX hatását vizsgálva AS-ben megállapítottuk, hogy a CD8+ T-sejtek intracelluláris Ca^{2+} válasza (cit- Ca^{2+} és mit- Ca^{2+} szint) a 6. hétre normalizálódott (de nem a 2. hétre). A CD4+ sejtek cit- Ca^{2+} jele továbbra is kóros maradt, annak ellenére, hogy az IFX terápia jelentősen javította a betegek klinikai státuszát. Az NO metabolizmus azonban már 2 hét biológiai terápia után is javult a CD4+ és a CD8+ sejtekben egyaránt. Ez a változás a 6. hétre is megmaradt, azaz az NO termelés a kontrol csoporthoz hasonló kinetikát írt le. Megállapíthatjuk tehát, hogy az IFX terápia hatása eltérő a Ca^{2+} válaszra és az NO termelésre. Mivel az aktivált T-sejtekben az NO termelés hetekkel a Ca^{2+} kinetika előtt normalizálódott valószínűsíthető, hogy más faktorok játszanak szerepet a két folyamatban. Feltehetően azok az elváltozások, amelyek az IFX kezeletlen betegekben a kóros NO termelést fenntartották a Ca^{2+} influxtól függetlenül működnek. Ráadásul az általunk vizsgált valamennyi beteg klinikai állapota 2 hét IFX kezelés után is jelentősen javult, így joggal feltételezhetjük, hogy az aktivált T-limfociták intracelluláris Ca^{2+} válaszai nem játszanak olyan fontos szerepet AS-ben, mint az intracelluláris NO termelés. Erre enged következtetni az is, hogy irodalmi adatok alapján RA-s betegekben a szérumban NO szint lecsökkent IFX kezelés hatására [115]. Ezt az iNOS aktivitás megszűnésének tulajdonították (amit a TNF- α gátlás eredményezett), ami az általunk megfigyelt intracelluláris NO csökkenésre is magyarázatot adhat. Az iNOS enzim fiziológiája a T-limfocitákban azonban kevésbé ismert.

A Ca^{2+} jel és az NO termelés mellett a szabadgyök képződés kinetikáját is vizsgáltuk aktivált T-sejtekben, de sem az IFX kezelés előtt, sem alatt nem találtunk eltérést a kontroll csoporthoz képest. Mások munkájával ezt a megfigyelést a irodalmi adatok teljes hiánya miatt összevetni nem tudtuk.



4. Ábra. A CD4+ és a CD8+ sejtek aktivációját követő citoplazmatikus és a mitokondriális Ca^{2+} jelhez tartozó t_{max} (a maximum elérésének ideje) AS-ben az infliximab (IFX) kezelés előtt és alatt. (Whiskers box-plot: a doboz teteje a mediánt, a bajusz a tartományt jelöli).

Esetszám: kontroll, $n=9$; AS, $n=13$. ^Avs. kontroll $p<0,05$



5. Ábra. A CD4+ és a CD8+ sejtek aktivációját követő NO termeléshez tartozó kinetikus görbe jellemzői AS-ben az infliximab (IFX) kezelés előtt és alatt. (Whiskers box-plot: a doboz teteje a mediánt, a bajusz a tartományt jelöli). *Esetszám: kontroll, n= 9; AS, n=13.*
^Avs. kontroll $p < 0,05$; ^Bvs. alap állapot $p < 0,05$. AUC = görbe alatti terület, Max = maximum értéke, t_{max} = maximum elérésének ideje.

6.2. Reumatoid arthritisz

Munkánk során elsőként állítottunk össze egy olyan vizsgálati sorozatot, mely utánkövetéses módszerrel 8 héten át vizsgálja terápia naiv (korai) és TNF- α gátló kezelésre szoruló (késői) RA-s betegek perifériás T-sejtjeiben bekövetkező prevalencia változásokat a hagyományos DMARD és a biológiai terápia három képviselőjének alkalmazása során. A vizsgálat második fázisában ugyanazon betegeknél meghatároztuk a PHA stimuláció hatására végbemenő intracelluláris folyamatok kinetikus változásait a CD4+ és a CD8+ sejtekben a különböző terápiás protokollok megkezdése előtt és alatt (a 4. illetve a 8. héten).

6.2.1. Sejtprevalencia vizsgálatok korai RA-ban

A terápia naiv, **korai RA-s csoportban a kezelés előtt** az immunválasz szabályozásáért felelős legfőbb T-limfociták eloszlása proinflammatorikus irányba tolódott el (6.ábra). Erre az aktivációra utal az emelkedett Th1 és Th2 prevalencia. Ez összhangban van azzal a megfigyeléssel, hogy RA-ban döntően a Th1 emelkedés dominál [116], miközben a Th2 prevalenciája is kóros mértékben nő [6]. A csökkent CD8+ limfocita prevalencia pedig megerősíti azokat a korábbi megfigyeléseket, amelyek a CD8 hiányát összefüggésbe hozták az RA patogenezisével [117].

Az egészséges immun homeosztázishoz elengedhetetlen a pro- és az anti-inflammatorikus hatások dinamikus egyensúlya. Ebben régóta ismert fontos szerepe van az immunrendszer gátlásában központi szerepet játszó Treg-sejteknek. Szintén egyre több figyelem irányul az IL-17 termelő proinflammatorikus Th17 sejtekre is, mint a Treg-ek ellenpólusára [118]. A Th17 túlsúly RA-ban hozzájárul a gyulladáshoz, a porckárosodáshoz és a csont erózióhoz is [119]. Korábbi vizsgálatokhoz hasonlóan [120,121] munkánk során korai RA-s betegekben emelkedett Th17 és csökkent Treg prevalenciát találtunk. A Th17/Treg arány proinflammatorikus irányba történő eltolódásának az eredménye a T-limfociták fokozott aktivációja. Eredményeink is ezt az aktív immun fenotípust támaszják alá, miután mindkét vizsgált aktivációs marker expressziója emelkedett volt a CD4+ sejteken, a CD69 pedig a CD8+ sejteken.

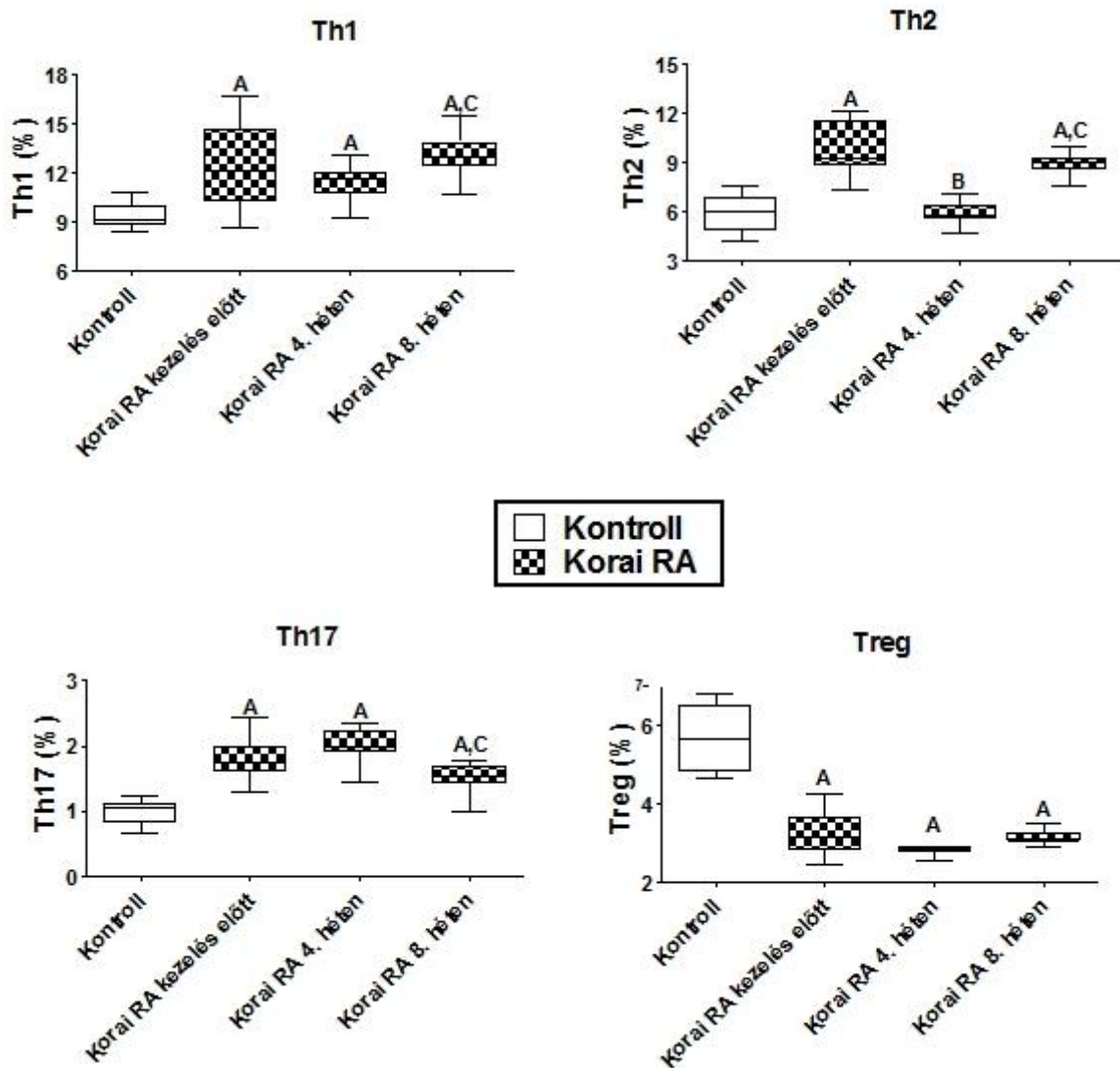
A CD69 korai aktivációs marker fokozott expresszióját RA-ban korábban szinoviális folyadékából vett mintákból sikerült kimutatni [122]. A CD69 emelkedése RA-ban a lokális gyulladós folyamatokban szintén ismert [123]. Méréseink során perifériás vérből sikerült kimutatni korai (terápia naiv) RA-s betegekben a fokozott CD69 expressziót a CD4+ és a CD8+ limfocitákon, és a HLA-DR expressziót a CD4+ sejteken. Azt már korábban kimutatták RA-ban, hogy a HLA-DR és a CD69 expresszió szinoviális folyadékban egymással parallel módon változik [124], de perifériás vérben ez a jelenség ismeretlen volt.

Az aktivált immun státusz további jele lehet RA-ban a naiv sejtek fokozott átalakulása memória/effektor sejtekké [125], amit a csökkent naiv/memória sejtarányokkal sikerült alátámasztanunk a CD4+ limfocitákon.

Ezek a megfigyelések alátámasztják azt, hogy RA-ban az immunrendszer szabályozásában szisztémás zavarok mutatkoznak. Miután az általunk vizsgált kezeletlen korai RA-s betegeknél extaartikuláris komplikációk nem voltak megfigyelhetők, feltehetően a perifériás vérben található immun fenotípus abnormalitások az RA szisztémás progresszióját megelőzve jelentkeznek. A helyi folyamatok klinikai tüneteket is mutató eltérései ezt követően alakulhatnak ki.

Érdekes módon a **korai RA-s csoportban a 4. héten a GCS terápia** nem indukált jelentős változásokat a vizsgált CD4+ T-limfociták csoportjaiban (Th1, Th17, Treg). Kiemelendő változás azonban 4 hét GCS terápia után a CD4+ limfocita CD69 és a HLA-DR normál expressziója és a Th2 sejtek prevalenciájának a csökkenése. Az aktivációs markerekre vonatkozó irodalmi adatot GCS terápiával összefüggésben nem találtunk, a csökkent Th2 prevalenciát pedig mindössze asztma bronchiáléban sikerült eddig kimutatni [126]. Ez a csökkenés a Th1 irányába növelte a Th1/Th2 arányt, ami egy proinflammatorikus stimulusnak is tekinthető figyelembe véve a Th1 típusú citokinek hatását. Ez a jelenség ellentétben áll azzal a megfigyeléssel, hogy a gyulladós paraméterek (CRP, süllyedés stb.) a kezelés alatt lecsökkentek és a betegek tünetei jelentősen javultak. A betegek állapotának a javulásával a CD4+ sejtek CD69 és a HLA-DR aktivációs markereinek csökkenése mutatott összefüggést. A gyulladós folyamatok csökkenésére utal továbbá, hogy bár a CD8+ sejtek prevalenciája nem változott (továbbra is alacsony volt), a fokozott aktivációjuk azonban egyértelműen

kimutatható volt (fokozott HLA-DR expresszió és csökkent CD8+ naiv, növekedett CD8+ memória/effektor sejtprevalencia). A GCS terápia hatása RA-ban 4 hét után tehát feltehetően nincs összefüggésben a perifériás Th1, Treg, Th17 és a CD4+ naiv ill. memória/effektor sejtek prevalenciájával.



6. Ábra. A Th1, a Th2, a Th17 és a Treg-sejtek prevalenciája korai RA-ban a DMARD kezelés előtt és alatt. (Whiskers box-plot: a középvonal a mediánt, a doboz az interkvartilist, a bajusz a tartományt jelöli).

Esetszám: kontroll, n= 10; korai RA, n=19. ^Avs. kontroll $p < 0,05$; ^Bvs. kezelés előtt $p < 0,05$. ^Cvs. 4. hét $p < 0,05$. RA = reumatoid arthritisz; IFX = infliximab; ETA = etanercept; ADA = adalimumab; Treg = regulátoros T-sejt

A 8. héten, a csökkentett dózisu GCS és az újonnan bevezetett MTX terápia mellett emelkedett Th1 és Th2, valamint csökkent Th17 sejtprevalenciát figyeltünk meg a 4. héthez képest. Vizsgálatunk jellegéből adódóan azt nem lehet eldönteni, hogy ez a hatás a csökkentett GCS-nek vagy a bevezetett MTX terápiának vagy a kettőnek az együttes eredménye. Irodalmi adatok alapján úgy tűnik mindkét elképzelés lehetséges. Ahogy a kezdeti nagyobb dózisu GCS terápia csökkentette a Th2 prevalenciát, úgy a kisebb GCS terápia dózis mellett ez az immunfenotípusra kifejtett hatás megszűnhet, ami az ismételt Th2 emelkedés irányába hathat. Az MTX monoterápiában bizonyítottan emelte a Th2 sejtek arányát RA-ban [127], habár ugyanez a tanulmány a Th1 sejteknél csökkenést mért, ami a mi mérési eredményeinkkel ellentétes. Az MTX Th17 sejtekre kifejtett hatását kutató korábbi tanulmányok meglehetősen vegyes képet alkotnak. In vitro körülmények között Li és mtsai nem találtak eltérést a Th17 sejtek százalékos eloszlásában MTX kezelést követően [128]. Hasonló eredményre jutottak más munkacsoportok is, akik az MTX monoterápia hatásait vizsgálták RA-ban, de a Th17 sejtek érintetlenek maradtak 12 hét [129], ill. 30 hét kezelés után is [130]. Ezzel szemben Yue és mtsai 12 hét MTX kezelés után csökkent Th17 prevalenciát mértek RA-s betegekben [131]. A 8. héten mi is a Th17 sejtek csökkent prevalenciáját találtuk, és ezt mindössze 4 hét MTX terápia után sikerül kimutatnunk. Fontos ismét megjegyezni, hogy ebben a hatásban az MTX mellett a GCS lecsökkentett dózisa is közre játszhatott. Az is vita tárgyát képezi, hogy ez a csökkenés a Th17 sejteknél mennyire marad tartós. A 8. hétre lecsökkent Th17 sejtprevalencia ugyanis még ekkor is szignifikánsan magasabb volt a kontroll csoporthoz képest. A további csökkenésre tehát adott a lehetőség. A kérdés megválaszolására a betegek további hosszútávú prospektív követése adhat választ, mely a jelenlegi dolgozat keretein túlmutat.

Eredményeinket a Treg-sejtek vonatkozásában is nehéz interpretálni, lévén, hogy a kimutatásukra használt markerek az utóbbi években jelentős fejlődésen mentek keresztül. Ezt a sejttípust elsőként CD4+CD25+ sejtekként jellemezték [101], majd ahogy próbálták leszűkíteni egy specifikusabb populációra, a CD4+CD25^{high} meghatározás terjedt el [132,133]. A markerek sora ezt követően az intracelluláris FoxP3 expresszióval egészült ki, így évekig a CD4+CD25+FoxP3+ számított arany standardnak [134,135]. Az utóbbi időben pedig az általunk is preferált CD4+CD25+CD127- fenotípus kezd elterjedni [63,64]. A 8. hétre az MTX terápia nem

volt hatással a Treg-sejtek prevalenciájára RA-ban, mely összhangban van azokkal a korábbi tanulmányokkal, melyek szintén érintetlen CD4+CD25^{high} [136] és CD4+CD25+FoxP3+ [129] sejtprevalenciákat közöltek. Mindezek alapján úgy tűnik, hogy az MTX nincs közvetlen hatással a regulátoros T-sejtekre, így a kedvező klinikai hatását ezektől a sejtektől függetlenül fejt ki. A 8. hétre a CD8+ naiv és memória/effektor sejtek normalizálódásán túl a CD69 és HLA-DR aktivációs markerek, valamint a CD4+ naiv és memória/effektor sejtek nem mutattak érdemi változást RA-ban. Irodalmi adatot az MTX ilyen irányú hatásával összefüggésben nem találtunk.

6.2.2. Sejtprevalencia vizsgálatok késői RA-ban

A hagyományos kombinált DMARD terápiára nem reagáló késői RA csoportban **a TNF- α gátló terápia megkezdése előtt** a Th1, a Th2, és a Th17 sejtek a korai RA csoporttal azonos módon emelkedett, míg a Treg-sejtek és a CD8+ T-sejtek (az ETA és az ADA csoportban) csökkent prevalenciát mutattak (7. ábra). Ami ennek megfelelően ezeknél a betegeknél is a klinikai aktivitással is egybecsengő proinflammatorikus irányba eltolt immunstátuszt igazolja. A képet azonban árnyalja, hogy a korai betegekkel szemben késői RA-ban a CD4+ és CD8+ naiv és memória/effektor sejtek, valamint aktivációs markereik (CD69 és HLA-DR) sem mutattak eltérést a kontroll csoporthoz képest. A nyilvánvaló gyulladás (emelkedett CRP, süllyedés, aktivitási index stb.) ellenére megfigyelhető normális aktivációs paraméterek egy általános T-sejt anergiára utalnak, melyet korábbi munkacsoportok is feljegyeztek. A jelenséget a magas TNF- α termelés krónikus hatásának tulajdonítják [137], ugyanis a TNF- α a T-sejt receptor/CD3 komplexen keresztül rontja a T-sejt aktivációt [110], és ezzel a válasz készséget. Ehhez adódik hozzá az MTX immunmoduláló hatása is, amit a korai RA-s betegeknél is megfigyelhettünk. Fontos ugyanis kiemelni, hogy a késői RA-s betegek a mintavétel időpontjában MTX és LF terápia alatt is álltak, amely szintén befolyásolhatta az aktivált sejtek prevalenciáját. (Érdekes módon az IFX csoportnál alap állapotban a kontrollhoz képest csökkent a CD4+ naiv/memória sejtek aránya, de ez kizárólag a véletlenből adódhatott, miután a betegek besorolása a különböző terápiás csoportokba véletlenszerűen történt.

4 hét TNF- α gátló terápia mellett a betegek általános állapota szignifikánsan javult mindhárom RA csoportban. Az immun fenotípus ezúttal sem minden esetben tükrözte ezt a javulást, és a változások eltérést mutattak az egyes TNF- α gátlók vonatkozásában. Az IFX és az ETA csoportban 4 hét után egy emelkedő Th1 tendenciát figyeltünk meg, amely a 8. hétre vált szignifikánssá. Ez összhangban áll Aeberli és mtsai munkájával, ahol 6 hét ETA vagy IFX kezelést követően emelkedett a Th1 prevalencia RA-ban [13]. A Th1/Th2 arány Th1 irányú eltolódása az ETA csoportban jelentősebb volt, köszönhetően az ezzel egy időben megfigyelhető Th2 prevalencia csökkenésnek, amely az IFX kezelt csoportban nem volt kimutatható. Az ETA Th2 prevalenciát csökkentő hatását (ami már 4 hét után jelentkezett) Aeberli és mtsai nem írták le. A periférián megfigyelhető Th1 irányú immun fenotípus változás paradox módon a biológia terápia hatékonyságára utalhat. Megfigyelték ugyanis, hogy a helper sejtek ilyen irányú eltolódása a Th1 típusú limfociták szelektív átcsoportulásának lehet az eredménye a szinoviális tér felől a perifériára [138,139]. Érdekes, hogy vizsgálatunk során az ADA egyik T-helper populációra sem volt hatással. Lehetséges, hogy ez a különbség a TNF- α gátlók eltérő molekuláris szerkezetéből adódik, miután az ADA egy tisztán humán antitest, szemben az IFX-el, ami egy egér/humán kiméra, az ETA pedig egy fúziós fehérje. In vitro körülmények között sikerült alátámasztani ezt a feltételezést, amely szintén jelentős biológiai hatásbeli különbséget mutatott ki a 3 készítmény között [140].

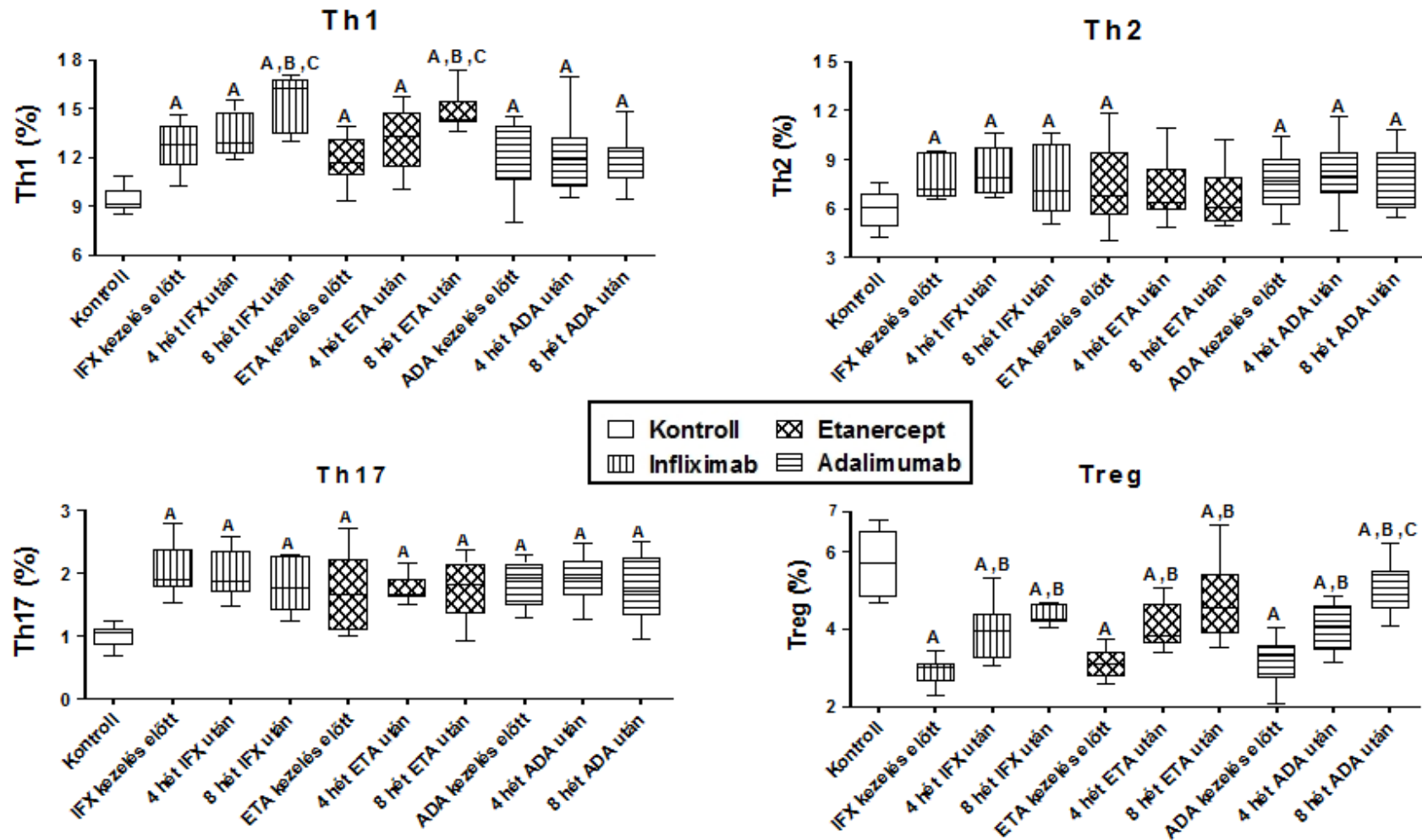
RA-ban a biológiai terápia hatását a Th17 sejtekre több tanulmány is vizsgálta. Kimutatták, hogy a periférián csökken a Th17 sejtek prevalenciája IFX [130], ETA [141] vagy ADA [131] kezelést követően. Ezek a megfigyelések, egy hosszabb terápiás időszakot foglaltak magukba (12 és 30 hetet), szemben a mi vizsgálatunkkal, amely 4 ill. 8 hétig követte a betegeket. Ezen időszak alatt a TNF- α gátlók három legrégebbi képviselője nem változtatott a perifériás Th17 sejtek eloszlásán. Annak ellenére, hogy az IFX és az ADA kezelés hatására valamelyest csökkent a Th17 sejtek prevalenciája, ez a változás nem érte el a szignifikáns szintet. Az eredményünk tehát arra utal, hogy a TNF- α gátló kezelésnek 8 hétnél több időre van szüksége, hogy RA-ban a perifériás Th17 sejtek eloszlását befolyásolni tudja.

Ezzel szemben a Treg-sejtek prevalenciája a 4. héten szignifikánsan megemelkedett mindhárom vizsgált csoportban az alap állapothoz képest. Az elmúlt évtizedben számos vizsgálat foglalkozott a TNF- α gátló kezelést követő Treg-sejt változásokkal RA-ban, de a DMARD terápiához hasonlóan az eredmények nem minden esetben fedik egymást. Valencia és mtsai szerint az IFX kezelés hatására a FoxP3 transzkripciós faktor RNS szintézise és fehérje expressziója egyaránt megemelkedik a CD4+CD25^{high} sejtekben. Ennek köszönhetően visszaáll a Treg-sejtek immungátló funkciója, amely korábban down-regulálódott a TNF- α hatására [142]. Ehrenstein munkacsoportja szintén emelkedett Treg (CD4+CD25+) aktivitást mért RA-s betegek perifériás vérében IFX kezelést követően, de csak annál a csoportnál, amelyik a kezelés hatására javuló klinikai tüneteket mutatott. A terápiára nem reagáló csoportban az IFX nem befolyásolta a Treg-sejtek prevalenciáját [143]. Egy másik munkacsoport is emelkedett CD4+CD25^{high}Foxp3+ Treg prevalenciát írt le, ezúttal ETA és MTX kombinációs terápia után [129]. Vigna-Pérez és mtsai 15 nap ADA terápiát követően mutatott ki emelkedett CD4+CD25^{high} Treg arányt, mely azonban csak átmenetinek bizonyult és a 180. vizsgálati napra lecsökkent [144]. A fenti vizsgálatokkal ellentétben Blache és mtsai sem ADA, sem ETA terápiát követően nem tudtak százalékos (vagy abszolút számbeli) eltérést kimutatni a perifériás CD4+CD25^{high} Treg-sejtekben 6 és 12 hét kezelés után RA-s betegekben [145]. A mi vizsgálatunkban az IFX, az ETA és az ADA által indukált Treg-sejt prevalencia emelkedés a 4. héten hasonló volt és minden esetben alacsonyabb maradt a kontroll csoporthoz képest. A 8. hétre ez az emelkedés tovább folytatódott, de csak az ADA kezelt csoportban érte el a szignifikáns mértéket. Ez alapján feltételezhetnénk, hogy az ADA specifikusabban hat a Treg-sejtekre, mint az IFX vagy az ETA, de hosszú távú következtetéseket ezek alapján nem vonhatunk le. Vigna-Pérez tanulmánya éppen az ADA kezelésről mutatta ki, hogy a 3. héten mért hatás a 26. hétre eltűnt [144].

Munkánk során a T-limfociták aktivációs állapotának a vizsgálatára is kitértünk. A TNF- α gátló készítmények hatására csökkent a CD4+ naiv és nőtt a memória/effektor sejtek prevalenciája (azaz csökkent a naiv/memória sejt arány), ami az immunrendszer általános aktivált állapotára utal RA-ban [125]. Az alap állapotban ismertetett T-sejt anergiát a biológiai terápiának tehát sikerült visszafordítania, ahogy arról korábbi munkacsoportok is beszámoltak [110,137]. Eredményeink alapján azonban úgy tűnik,

hogy ez a hatás függ az alkalmazott TNF- α blokkolótól, és a terápia hosszától. Az ADA már 4 hét kezelés után csökkentette a CD4+ naiv/memória sejtarányokat a kontrollhoz képest, és ez a csökkentés a 8. hétre változatlanul megmaradt. Az ETA csoport ezzel ellentétben nem tért el a kontroll csoporttól, de a 8. hétre szignifikánsan lecsökkent a naiv/memória sejtarány a 4. héthez képest. Az IFX esetében a 4. és 8. héten is csökkent naiv/memória sejtarányokat figyeltünk meg a kontroll csoporthoz képest. Mivel ebben a csoportban az alap állapot is hasonló képet mutatott a kezelés tovább már nem módosított a sejtek prevalenciáján. A CD8+ naiv/memória sejtarányok kezdeti normális értékei a kezelés hatására sem változtak

A CD69 aktivációs marker expressziója vizsgálatunk alatt egyáltalán nem változott (sem a CD4+ sem a CD8 sejtek esetében). A HLA-DR a CD8+ sejteken a kezelések alatt szintén változatlan volt, expressziójuk a CD4+ sejteken pedig eltérő módon reagált az egyes TNF- α gátlókra. Az ADA és az ETA hatására nőtt a HLA-DR expresszió a 4. héten a kontrollhoz képest, ami a 8. hétre tovább már nem változott. Az IFX esetében nem találtunk változást. Összefoglalva a TNF- α gátlók különböző mértékben és időben befolyásolták a CD4+ sejtek aktivációs paramétereit, aminek a hátterét további vizsgálatokkal kell feltárni. Az immun fenotípusban észlelt különbségek ellenére azonban a klinikai hatások minden esetben hasonlóak voltak, ami az egyes TNF- α gátlók TNF- α neutralizáló hatásán túli további, egyben egymástól eltérő hatásmechanizmusaira hívja fel a figyelmet.



7. Ábra. A Th1, a Th2, a Th17 és a Treg-sejtek prevalenciája késői RA-ban a TNF- α gátló terápia előtt és alatt. (Whiskers box-plot: a középvonal a mediánt, a doboz az interkvartilist, a bajusz a tartományt jelöli). ^Avs. kontroll $p < 0,05$; ^Bvs. kezelés előtt $p < 0,05$. ^Cvs. 4. hét $p < 0,05$. Esetszám: kontroll, $n = 10$; IFX csoport, $n = 8$; ETA csoport, $n = 12$; ADA csoport, $n = 12$. RA = reumatoid arthritis; IFX = infliximab; ETA = etanercept; ADA = adalimumab; Treg = regulátoros T-sejt

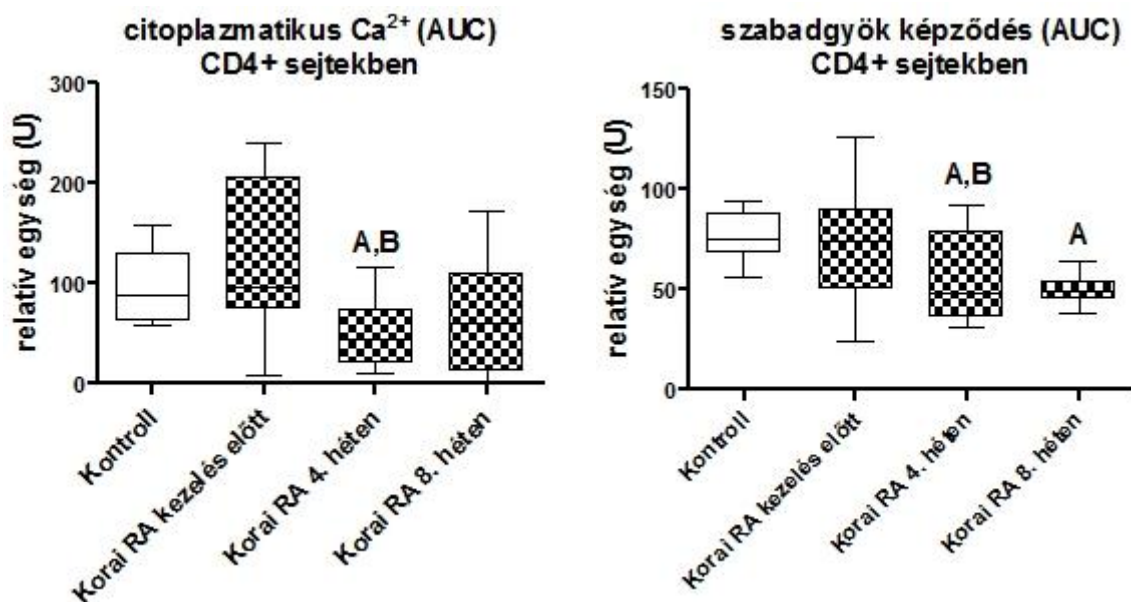
6.2.3. Funkcionális vizsgálatok korai RA-ban

A T-sejt aktivációban résztvevő intracelluláris folyamatokat vizsgáló tanulmányok száma meglehetősen korlátozott. A kevés rendelkezésre álló adat alapján úgy tűnik, hogy aktív betegségben szenvedő RA-s betegekben fokozott NO szintézis [86], emelkedett intracelluláris Ca^{2+} koncentráció [9] és fokozott szabadgyök képződés figyelhető meg [146]. Ezek a változások pedig közrejátszhatnak a sejtek kóros működéséhez.

Kezelés előtt az általunk vizsgált korai RA-s populációban azonban az intracelluláris folyamatok kinetikája nem bizonyult kórosnak a kontroll csoporthoz képest sem a CD4+ sem a CD8+ limfociták esetében (a CD4+ sejteket lásd a 8. ábrán). Ennek az irodalomtól való eltérésnek egyik lehetséges magyarázata, hogy munkacsoportunk a RA-n belül egy olyan populációt gyűjtött össze, akiknél az RA klinikai tünetei mindössze pár hete, maximum egy két hónapja jelentkeztek, szemben az idézett tanulmányokkal, ahol egy kevésbé homogén betegcsoportot vizsgáltak. (Ezzel ellentétben vizsgálatunk későbbi részében, aktív, évek óta RA-ban szenvedő betegeknel az irodalmi adatokhoz hasonlóan mi is találtunk eltérést az intracelluláris folyamatokban.)

4 hét GCS terápiát követően a CD4+ és a CD8+ sejtek cit- Ca^{2+} válasza és a CD4+ sejtek szabadgyök képződése lecsökkent az alap állapothoz és a kontroll csoporthoz képest. A szabadgyök képződés a CD8+ sejtek esetében is csökkent tendenciát mutatott, de nem bizonyult szignifikánsnak. In vitro és in vivo állatkísérletekben a GCS a T-sejtek normális működéséhez elengedhetetlen aktivációs kaszkádot intracellulárisan több ponton is gátolta [147]. A GCS terápia korlátozta a PIP_2 hidrolízist és az IP_3 képződést [148], valamint down-regulálta az IP_3 receptor expresszióját [149] és kimerítette az intracelluláris Ca^{2+} kompartmenteket [150]. Ezeknek a folyamatoknak az eredménye a csökkent sejtaktiváció és a csökkent Ca^{2+} válasz. A GCS terápia emellett Marumo és mtsai szerint humán aorta simaizomsejtben csökkentette a szabadgyök képződést [151]. Az általunk kapott eredmények RA-ban összhangban vannak ezekkel a beszámolókkal és felhívják a figyelmet arra, hogy a GCS terápia jelentős hatással bír a T-sejt funkciókra, ami közrejátszhat a terápiás hatékonyságukra.

A 8. héten, az MTX bevezetése után 4 héttel a korábban csökkent cit- Ca^{2+} válasz a CD4+ és a CD8+ sejtekben egyaránt normalizálódott, ami az MTX Ca^{2+} mobilizáló hatására lehet bizonyíték. Korábban in vitro állatkísérletek kimutatták, hogy az MTX-nak IP_3 -szerű hatása van és az endoplazmás retikulumból receptor aktiváció nélkül képes Ca^{2+} -t felszabadítani [152]. A 4. héthez képes megemelkedett cit- Ca^{2+} jel ezt a hatást tükrözheti. Ezzel egy időben a szabadgyök képződés MTX kezelés hatására tovább csökkent a CD4+ sejtekben és a 4. héten megfigyelt csökkent tendencia a 8. hétre szignifikáns lett a CD8+ sejtekben. Az MTX kedvező klinikai hatásának egyik fontos magyarázata lehet a szabadgyökképződést kedvezően befolyásoló hatása, hiszen a fokozott szabadgyök képződés kulcsfontosságú az RA patogenezisében [153]. A szabadgyök extracelluláris károsító hatása mellett azt is kimutatták, hogy az intracelluláris túltermelés felerősíti a szinovium gyulladással járó folyamatokat, és a proliferációt [154]. Emellett a kóros T-sejt funkcióért is felelős RA-ban [155]. Az MTX szabadgyök képződésre kifejtett gátló hatását RA-ban eddig mindössze szinoviális sejtekben sikerült bizonyítani [156]. Vizsgálatunknak perifériás T-sejtek rövid távú aktivációja során sikerült ezt a jelenséget kimutatnia.



8. Ábra. A CD4+ sejtek aktivációját követő citoplazmatikus Ca^{2+} jelhez és szabadgyök képződés tartozó görbe alatti terület (AUC) korai RA-ban az IFX kezelés előtt és alatt. (Whiskers box-plot: a középvonal a mediánt, a doboz az interkvartilist, a bajusz a tartományt jelöli). ^A vs. kontroll $p < 0,05$; ^B vs. kezelés előtt $p < 0,05$. Esetszám: kontroll, $n = 9$; korai RA, $n = 12$
RA = reumatoid artritisz

6.2.4. Funkcionális vizsgálatok késői RA-ban

Munkánk következő fázisában a kombinált DMARD terápiára nem reagáló (késői) RA-s betegeknél határoztuk meg a CD4+ és CD8+ T-sejtek intracelluláris folyamatainak kinetikáját. Emellett a különböző TNF- α gátlók intracelluláris folyamatok kinetikájára kifejtett hatásait is elemeztük.

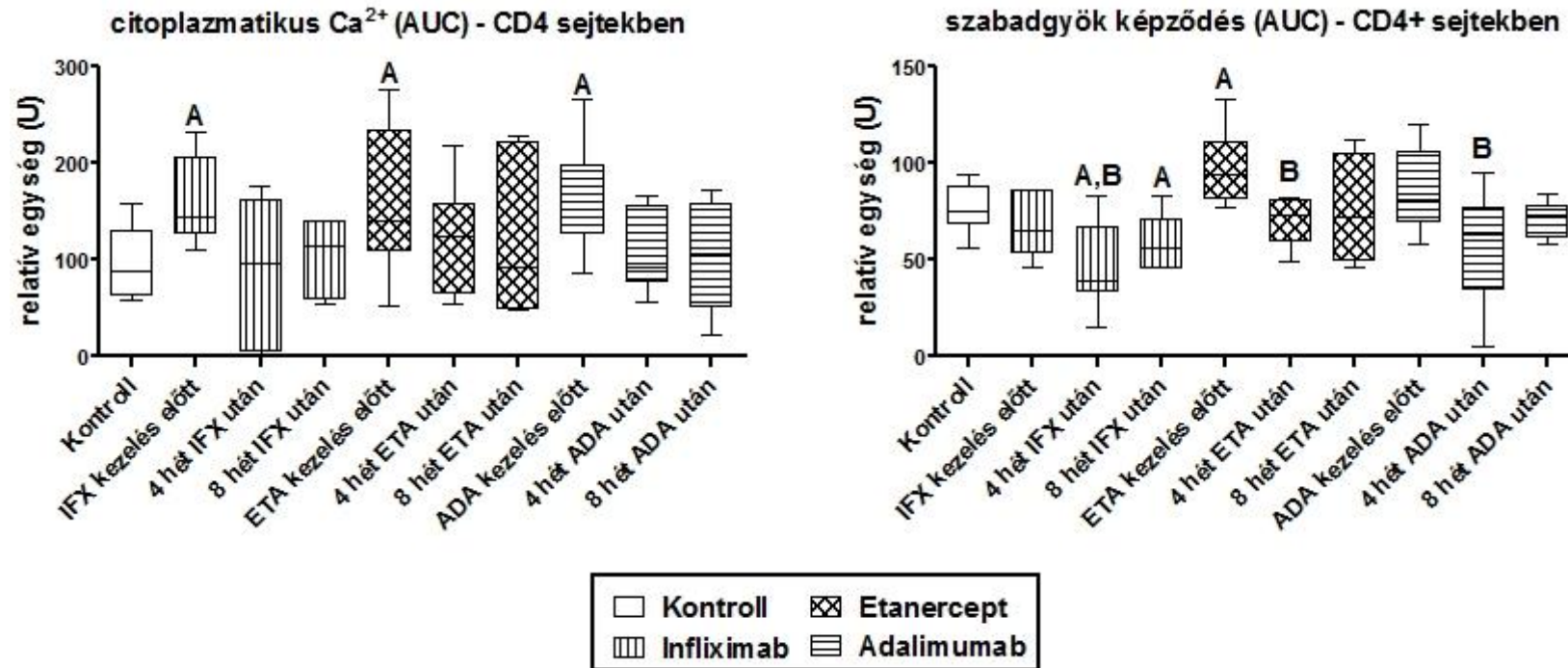
Kezdetben (**közvetlenül a TNF- α gátló terápia megkezdése előtt**) a kontroll csoporthoz képest késői RA-ban fokozott cit-Ca²⁺ választ figyeltünk meg a CD4+ és a CD8+ sejtekben egyaránt (a CD4+ sejteket lásd a 9. ábrán). Ez ellentétes azokkal a korábbi vizsgálatokkal, amelyek RA-s betegek T-limfocitáiban csökkent válaszkészséget (és csökkent kalcium flux-ot) írtak le [157,158]. Az irodalmi adatok és saját eredményeink közti ellentmondásra lehet magyarázat a vizsgálatok során bevont eltérő RA-s populáció. A korábbi közlemények során bevont betegek elsősorban NSAID terápián voltak, melynek ismeretlen a T-sejtek intracelluláris kalcium-metabolizmusára kifejtett hatása. Mi azonban olyan betegektől gyűjtöttünk mintát, akik MTX és LF terápián voltak, de a kezelés nem bizonyult hatékonynak. A LF terápia hatása a T-sejtek Ca²⁺ válaszára szintén ismeretlen, míg az MTX képes emelni az intracelluláris Ca²⁺-t [152]. Az eredmények alapján úgy tűnik, hogy a cit-Ca²⁺ válasz emelkedése egy olyan RA csoportra karakterisztikus, akiknél a kombinált DMARD (MTX és LF) terápia mellett is aktív marad a betegség.

4 héttel azután, hogy az LF helyett egy TNF- α gátló indítása történt, a cit-Ca²⁺ válasz mindhárom (IFX, ETA és ADA) csoportban normalizálódott (a CD4+ és a CD8+ sejtekben egyaránt), és ez a **8. hétre** is megmaradt.

A szabadgyök képződésben hasonló változásokat figyeltünk meg a vizsgált csoportokban, bár kisebb eltérések mutatkoztak. A fokozott intracelluláris szabadgyök képződés a korábban említetteknek megfelelően hozzájárulhat az elhúzódó gyulladáshoz RA-ban, így a csökkentése kedvező hatással bír a betegségre. Az ETA csoportban **alap állapotban** a kontrollhoz képest fokozott szabadgyök képződés mértünk a CD4+ sejtekben, ami az ADA esetében is emelkedő tendenciát mutatott, bár ebben az esetben az eltérés nem bizonyult szignifikánsnak. Bár a fokozott TNF- α termelés az egyik kulcsmomentum az RA patogenezisében, és a szabadgyök képződés is fontos szereppel bír, a köztük kapcsolataról, valamint a TNF- α gátlók szerepéről a

szabadgyök képződésben kevés információ áll rendelkezésre. Ismereteink RA-ban főleg neutrofil granulociták vizsgálatára korlátozódnak. Pay és mtsai kimutatták, hogy az IFX kezelés gátolta neutrofilek szabadgyök termelését in vitro [159]. Ezzel szemben mások különböző TNF- α gátlókat alkalmazva sem mutattak ki hatást neutrofilek szabadgyök képzésére RA-ban [160,161]. A CD4+ és CD8+ limfociták esetében mi **4 hét TNF- α gátló alkalmazása mellett** szignifikáns csökkenést mértünk a szabadgyök képződés mértékében az alap állapothoz képest (és/vagy a kontroll csoporthoz képest), függetlenül attól, hogy az alap állapotban milyen eltérés volt megfigyelhető. Ez a hatás legkevésbé az ADA csoportban jelentkezett (ahol a CD8+ sejtek csökkent szabadgyök képződése nem volt megfigyelhető, csak a CD4+ sejteké), a legnagyobb mértékűnek pedig az IFX kezelésnél bizonyult. A **8. héten** további változást nem észleltünk, egyedül csak az IFX kezelt csoport szabadgyök képződése volt csökkent mértékű a kontroll csoporthoz képest. Eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a szabadgyök képződés mértékének a csökkentése perifériás T-sejtekben jól nyomon követhető a különböző TNF- α gátlók alkalmazása után, és ez a csökkenés összefüggésben lehet a TNF- α gátlók klinikai hatékonyságával is.

A késői RA-s csoportban a többi vizsgált intracelluláris paraméter közül az NO termelés és a mit-Ca²⁺ kinetikája a T-sejtek rövid távú aktivációja során a vizsgálat teljes időtartama alatt nem változott, kivéve a IFX kezelt betegeknél, ahol a mit-Ca²⁺ válasz a 4. héten fokozódott a CD8+ sejtekben. Irodalmi adatok hiányában ezt hatást az IFX intracelluláris folyamatokra kifejtett eltérő hatásának feltételezzük (a többi TNF- α gátlóhoz képest).



9. Ábra. A CD4⁺ sejtek aktivációját követő citoplazmatikus Ca²⁺ jelhez és szabadgyök képződés tartozó görbe alatti terület (AUC) korai RA-ban az IFX kezelés előtt és alatt. (Whiskers box-plot: a középvonal a mediánt, a doboz az interkvartilist, a bajusz a tartományt jelöli). ^Avs. kontroll $p < 0,05$; ^Bvs. 4. hét $p < 0,05$. *Esetszám: kontroll, n = 9; IFX csoport, n = 7; ETA csoport, n = 7; ADA csoport, n = 8. AUC = görbe alatti terület; IFX = infliximab; ETA = etanercept; ADA = adalimumab*

7. KÖVETKEZTETÉSEK

- 1) AS-ben az adaptív immunfenotípust proinflammatorikus dominancia jellemzi. Ennek a fokozott immunválasznak a jele az alap állapotban (a kezelés előtt) a kontrollhoz képest emelkedett Th1 és Th2 sejtprevalencia (Th2 túlsúllyal), valamint az emelkedett Th17/Treg sejtarány.
- 2) Bár az IFX kezelés az AS-es betegek klinikai állapotát szignifikánsan javította, a vizsgált sejtpopulációkra nem volt jelentős hatással, így a kezdeti sejtprevalencia eltérések a kezelés 2. és 6. hetére is megmaradtak. Az IFX indukciós terápiás szakaszban kifejtett kedvező klinikai hatása AS-ben az adaptív immunfenotípus módosításától független.
- 3) AS-ben megváltozott a CD4+ és a CD8+ limfociták intracelluláris folyamatainak a kinetikája, így a sejtprevalencia értékek mellett az adaptív immunitásban résztvevő sejtek funkciója is módosult. Ez az eltérés nem volt homogén, ugyanis amíg a késleltetett cit-Ca²⁺ és a fokozott NO termelés mindkét limfocita populációban megfigyelhető volt, addig a CD8+ sejtek esetében a mit-Ca²⁺ is késleltetve jelentkezett.
- 4) AS-ben az IFX kezelés eltérő hatással bír a cit-Ca²⁺, a mit-Ca²⁺ válaszra, illetve az NO termelésre. A CD4+ limfocitákban az IFX nem volt hatással a cit-Ca²⁺ válaszra, míg CD8+ sejtek esetében a cit-Ca²⁺ és a mit-Ca²⁺ is normalizálódott a 6. hétre. Az NO termelés ezzel szemben már 2 hét kezelés után a kontrollal volt egyenértékű (mindkét limfocita populációban). Mivel a betegek klinikai állapota már a 2. héten javult, AS-ben az NO-nak jelentősebb szerepe lehet, mint az intracelluláris Ca²⁺ válasznak.
- 5) AS-ben a CD8+ sejtek funkcionális változásai járulnak hozzá a kórkép patomechanizmusához. Megfigyelésünk alapján bár a CD8+ sejtek prevalenciája és az aktivációs markereik expressziója nem tért el sem a kezelés előtt, sem az IFX kezelés alatt, az intracelluláris folyamataik azonban több ponton is változtak. A CD4+ sejtek funkciója és prevalenciája egyaránt szerepet játszik.

- 6) Korai RA-ban AS-hez hasonlóan proinflammatorikus irányba tolódik az immunválasz azáltal, hogy megemelkedik a Th1, a Th2, ill. a Th17, és csökkent a CD8+ limfociták és a Treg-ek prevalenciája. Az immunaktivációt támaszja alá a CD4+ és a CD8+ limfociták fokozott aktivációs marker expressziója, és a CD4+ naiv sejtek átalakulása memória/effektor sejtekké.
- 7) A perifériás vérben megfigyelhető immun fenotípus változások megelőzik az RA progressziója során fellépő klinikai komplikációkat, miután naiv betegekben a sejtprevalencia eltérések az extraartikuláris elváltozások kialakulása előtt megjelennek.
- 8) Naiv RA-s betegnél alkalmazott DMARD terápia a kóros sejtprevalencia értékeket részben normalizálta, de a különböző sejtekre eltérő mértékben hatott. Amíg a GCS terápia elsősorban a CD8+ és a Th2 sejtekre fejtett ki hatást, addig az MTX a Th1, a Th2, a Th17 és a CD8 sejtek prevalenciájára hatott.
- 9) Korai RA kezdeti szakaszában (a kezelés előtt) az intracelluláris folyamatok érintetlenek. A DMARD terápia azonban jelentős eltéréseket eredményezett: 4 hét GCS terápia után a cit-Ca²⁺ és a szabadgyök képződés is lecsökkent a CD4 és a CD8+ limfocitákban egyaránt. A MTX ezt követően normalizálta a cit-Ca²⁺ választ, de tovább csökkentette a szabadgyök képződést. Ezek a folyamatok hozzájárulhatnak a készítmények terápiás hatékonyságához.
- 10) Késői RA-ban (a kombinált DMARD terápia mellett is aktív RA-s betegekben) a proinflammatorikus immunfenotípus szintén megfigyelhető volt, de a sejtaktivációs állapot hiányából kifolyólag egyfajta általános anergia kíséretében.

- 11) A TNF- α gátlók ezt az anergiát megszüntetik késői RA-ban, illetve a sejtprevalencia értékekre is bizonyos mértékben hatnak, bár eltérő intenzitással és különböző időpontokban.
- 12) Késői RA-ban az intracelluláris folyamatok közül egyedül a cit-Ca²⁺ válasz emelkedett konzekvensen a TNF- α gátló kezelés előtt (a CD4+ és a CD8+ limfocitákban egyaránt). Ez a jelenség akár prognosztikai értékű is lehet RA-ban, és felhívhatja a figyelmet a terápia váltásra, a TNF- α gátló kezelés indítására.
- 13) A TNF- α gátlók késői RA-ban a cit-Ca²⁺ választ normalizálták és a szabadgyök képződést is csökkentették. Ezek a folyamatok is hozzájárulhatnak a gyulladós folyamatok enyhítéséhez, egyben a jelentős klinikai javuláshoz.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

Bevezetés: A gyulladásos reumatológiai kórképek közül spondylitis ankylopoetikában (AS) és reumatoid artritiszben (RA) is megfigyelhető az adaptív immunitás zavara. A kórképek pontos patomechanizmusa nem ismert, azonban a sejtek prevalenciájának eltérései mellett a sejtaktivációs folyamatok is eltérhetnek a normálistól.

Célkitűzés: Célunk volt meghatározni aktív AS-ben, valamint újonnan diagnosztizált (korai) és a hagyományos DMARD terápiára rezisztens (késői) RA-ban az adaptív immunitásban résztvevő sejtek prevalenciáját (CD4, CD8, Th1, Th2, Th17, Treg, naív ill. memória sejt) és jellemezni kívántuk a CD4+ és a CD8+ limfociták intracelluláris folyamatait (citoplazmatikus és mitokondriális Ca^{2+} , szabadgyök és NO képződés). A változásokat az adekvát terápiák (DMARD vagy TNF- α gátlók) alatt is követtük.

Eredmények: AS-ben emelkedett a Th1, a Th2 és a Th17 sejtek prevalenciája, melyre az IFX kezelés nem volt jelentős hatással. A CD4+ limfocitákban késleltetett cit- Ca^{2+} és fokozott NO termelés, míg a CD8+ sejtekben ezen felül késleltetett mit- Ca^{2+} is megfigyelhető volt. Az IFX kezelés hatására az NO termelés előbb normalizálódott mint a kalcium válasz. Korai RA-ban nőtt a prevalenciája a Th1, a Th2, a Th17 és a CD4+ memória sejteké, de csökkent a CD8, a Treg-ek és a CD4+ naív sejtekké. Míg a GCS terápia elsősorban a CD8 és a Th2 sejtekre hatott, az MTX a Th1, a Th2, a Th17 és a CD8 sejtek prevalenciáját normalizálta. Az intracelluláris folyamatok korai RA-ban nem mutattak eltérést, a GCS terápia azonban csökkentette a cit- Ca^{2+} választ és a szabadgyök képződést. Az MTX ezzel szemben a cit- Ca^{2+} -t megemelte, míg a szabadgyök képződést tovább csökkentette. Késői RA-ban a korai csoporthoz hasonló proinflammatorikus immunfenotípus látható. A TNF- α gátlók főleg a Treg-ek prevalenciáját emelték. A cit- Ca^{2+} válasz emelkedett volt alap állapotban. Ez a TNF- α gátlók hatására normalizálódott, a szabadgyök képződés pedig lecsökkent.

Következtetések: Alap állapotban mindhárom vizsgált betegpopulációban egy proinflammatorikus irányba eltolt immunfenotípus volt megfigyelhető, melyre a kezelések eltérő módon hatottak. AS-ben az IFX terápia főleg a sejtfunció változtatása révén járult hozzá a betegség progressziójának a megakadályozásához, míg korai és késői RA-ban a funkcionális változások mellett a sejtprevalencia értékek is összefügghetnek a készítmények terápiás hatékonyságával.

9. SUMMARY

Background: Ankylosing spondylitis (AS) and rheumatoid arthritis (RA) are chronic inflammatory rheumatic disorders characterized by a general dysfunction of the adaptive immune system. The pathogenesis of AS and RA are still unclear, but besides changes in cell prevalence, the cellular activation processes could also be altered.

Aim: The aim of our study was to assess the prevalence of major regulatory cells of adaptive immunity (CD4, CD8, Th1, Th2, Th17, Treg, naive and memory cells) and to evaluate intracellular processes (cytoplasmic and mitochondrial Ca^{2+} level, reactive oxygen species - ROS - and NO generation) of CD4+ and CD8+ lymphocytes in active AS, in newly diagnosed (naive) RA and in DMARD nonresponding RA patients. The changes were monitored during adequate therapies (DMARDs or TNF- α inhibitors).

Results: In AS we found higher Th1, Th2 and Th17 prevalence, that was not affected significantly by IFX therapy. CD4+ lymphocytes presented with a delayed increase in cyt-Ca^{2+} and higher NO generation, while in CD8+ lymphocytes we also found delayed mit-Ca^{2+} kinetics. NO generation normalized sooner upon IFX than calcium response. In naive RA there was an increase in Th1, Th2, Th17, CD4+ memory cell prevalence and a decrease in CD8 cells, Tregs and CD4+ naive cells. While GCS therapy mainly influenced CD8 and Th2 cells, MTX normalized Th1, Th2, Th17 and CD8 cell prevalence values. All intracellular processes were comparable to normal in naive RA at baseline, however GCS therapy decreased cyt-Ca^{2+} response and ROS production. The decreased cyt-Ca^{2+} response normalized after MTX therapy, while ROS production decreased even further. In DMARD non-responders we found a similar proinflammatory immune phenotype as seen in early RA. Anti-TNF- α agents mainly increased Treg prevalence in different time periods and in a slightly different manner. At baseline we found an increased cyt-Ca^{2+} response. Anti-TNF- α therapy normalized the cyt-Ca^{2+} response and decreased the production of reactive oxygen species.

Conclusions: At baseline the immune phenotype of all examined patient groups was shifted to a proinflammatory status that was effected differently by the therapies. IFX therapy in AS mainly contributes to the prevention of disease progression by influencing cell functions, while the effects of DMARD therapy and anti-TNF- α agents in RA may be related to cell functions and cell prevalence values as well.

10. IRODALOMJEGYZÉK

1. Braun J, Sieper J (2007) Ankylosing spondylitis. *Lancet* 369: 1379-1390.
2. Zhang X, Aubin JE, Inman RD (2003) Molecular and cellular biology of new bone formation: insights into the ankylosis of ankylosing spondylitis. *Curr Opin Rheumatol* 15: 387-393.
3. Sieper J, Braun J, Rudwaleit M, Boonen A, Zink A (2002) Ankylosing spondylitis: an overview. *Ann Rheum Dis* 61 Suppl 3: iii8-18.
4. Colbert RA, DeLay ML, Klenk EI, Layh-Schmitt G (2010) From HLA-B27 to spondyloarthritis: a journey through the ER. *Immunol Rev* 233: 181-202.
5. van der Horst-Bruinsma IE, Lems WF, Dijkmans BA (2009) A systematic comparison of rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. *Clin Exp Rheumatol* 27: S43-49.
6. Yang PT, Kasai H, Zhao LJ, Xiao WG, Tanabe F, Ito M (2004) Increased CCR4 expression on circulating CD4(+) T cells in ankylosing spondylitis, rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 138: 342-347.
7. Jandus C, Bioley G, Rivals JP, Dudler J, Speiser D, Romero P (2008) Increased numbers of circulating polyfunctional Th17 memory cells in patients with seronegative spondylarthritides. *Arthritis Rheum* 58: 2307-2317.
8. Wu Y, Ren M, Yang R, Liang X, Ma Y, Tang Y, Huang L, Ye J, Chen K, Wang P, Shen H (2011) Reduced immunomodulation potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells induced CCR4+CCR6+ Th/Treg cell subset imbalance in ankylosing spondylitis. *Arthritis Res Ther* 13: R29.
9. Nagy G, Clark JM, Buzas E, Gorman C, Pasztoi M, Koncz A, Falus A, Cope AP (2008) Nitric oxide production of T lymphocytes is increased in rheumatoid arthritis. *Immunol Lett* 118: 55-58.
10. Braun J, Baraliakos X (2009) Treatment of ankylosing spondylitis and other spondyloarthritides. *Curr Opin Rheumatol* 21: 324-334.
11. Ferkolj I, Ihan A, Markovic S, Veceric Z, Pohar M (2006) Infliximab reduces the number of activated mucosal lymphocytes in patients with Crohn's disease. *J Gastrointest Liver Dis* 15: 231-235.

12. Dahlén R, Strid H, Lundgren A, Isaksson S, Raghavan S, Magnusson MK, Simrén M, Sjövall H, Öhman L (2013) Infliximab inhibits activation and effector functions of peripheral blood T cells in vitro from patients with clinically active ulcerative colitis. *Scand J Immunol* 78: 275-284.
13. Aeberli D, Seitz M, Jüni P, Villiger PM (2005) Increase of peripheral CXCR3 positive T lymphocytes upon treatment of RA patients with TNF-alpha inhibitors. *Rheumatology (Oxford)* 44: 172-175.
14. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW (2010) Rheumatoid arthritis. *Lancet* 376: 1094-1108.
15. Tobón GJ, Youinou P, Saraux A (2010) The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis. *J Autoimmun* 35: 10-14.
16. Klareskog L, Catrina AI, Paget S (2009) Rheumatoid arthritis. *Lancet* 373: 659-672.
17. Chavele KM, Ehrenstein MR (2011) Regulatory T-cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *FEBS Lett* 585: 3603-3610.
18. Appel H, Loddenkemper C, Miossec P (2009) Rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis - pathology of acute inflammation. *Clin Exp Rheumatol* 27: S15-19.
19. Van den Brande JM, Braat H, van den Brink GR, Versteeg HH, Bauer CA, Hoedemaeker I, van Montfrans C, Hommes DW, Peppelenbosch MP, van Deventer SJ (2003) Infliximab but not etanercept induces apoptosis in lamina propria T-lymphocytes from patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 124: 1774-1785.
20. Benucci M, Saviola G, Manfredi M, Sarzi-Puttini P, Atzeni F (2012) Tumor necrosis factors blocking agents: analogies and differences. *Acta Biomed* 83: 72-80.
21. GOWANS JL, MCGREGOR DD, COWEN DM (1962) Initiation of immune responses by small lymphocytes. *Nature* 196: 651-655.
22. Claman HN, Chaperon EA, Triplett RF (1966) Thymus-marrow cell combinations. Synergism in antibody production. *Proc Soc Exp Biol Med* 122: 1167-1171.
23. Cantor H, Boyse EA (1975) Functional subclasses of T-lymphocytes bearing different Ly antigens. I. The generation of functionally distinct T-cell subclasses is a differentiative process independent of antigen. *J Exp Med* 141: 1376-1389.

24. Mosmann TR, Coffman RL (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7: 145-173.
25. Xu X, Ge Q (2014) Maturation and migration of murine CD4 single positive thymocytes and thymic emigrants. *Comput Struct Biotechnol J* 9: e201403003.
26. Chaplin DD (2010) Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol* 125: S3-23.
27. Latha TS, Reddy MC, Durbaka PV, Rachamalla A, Pallu R, Lomada D (2014) $\gamma\delta$ T Cell-Mediated Immune Responses in Disease and Therapy. *Front Immunol* 5: 571.
28. Bjorkman PJ (1997) MHC restriction in three dimensions: a view of T cell receptor/ligand interactions. *Cell* 89: 167-170.
29. Parkin J, Cohen B (2001) An overview of the immune system. *Lancet* 357: 1777-1789.
30. D'Acquisto F, Crompton T (2011) CD3+CD4-CD8- (double negative) T cells: saviours or villains of the immune response? *Biochem Pharmacol* 82: 333-340.
31. Overgaard NH, Jung J, Steptoe RJ, Wells JW (2015) CD4+/CD8+ double-positive T cells: more than just a developmental stage? *J Leukoc Biol* 97: 31-38.
32. Kitchen SG, Jones NR, LaForge S, Whitmire JK, Vu BA, Galic Z, Brooks DG, Brown SJ, Kitchen CM, Zack JA (2004) CD4 on CD8(+) T cells directly enhances effector function and is a target for HIV infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 8727-8732.
33. Zhu J, Yamane H, Paul WE (2010) Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu Rev Immunol* 28: 445-489.
34. Cheroutre H, Husain MM (2013) CD4 CTL: living up to the challenge. *Semin Immunol* 25: 273-281.
35. Peters PJ, Borst J, Oorschot V, Fukuda M, Krähenbühl O, Tschopp J, Slot JW, Geuze HJ (1991) Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J Exp Med* 173: 1099-1109.
36. Catalfamo M, Henkart PA (2003) Perforin and the granule exocytosis cytotoxicity pathway. *Curr Opin Immunol* 15: 522-527.
37. Demers KR, Reuter MA, Betts MR (2013) CD8(+) T-cell effector function and transcriptional regulation during HIV pathogenesis. *Immunol Rev* 254: 190-206.

38. Thomas MJ, MacAry PA, Noble A, Askenase PW, Kemeny DM (2001) T cytotoxic 1 and T cytotoxic 2 CD8 T cells both inhibit IgE responses. *Int Arch Allergy Immunol* 124: 187-189.
39. Gravano DM, Hoyer KK (2013) Promotion and prevention of autoimmune disease by CD8+ T cells. *J Autoimmun* 45: 68-79.
40. Annunziato F, Romagnani C, Romagnani S (2014) The 3 major types of innate and adaptive cell-mediated effector immunity. *J Allergy Clin Immunol*.
41. Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B (2012) CD4⁺T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol* 2012: 925135.
42. Kollias G, Kontoyiannis D (2002) Role of TNF/TNFR in autoimmunity: specific TNF receptor blockade may be advantageous to anti-TNF treatments. *Cytokine Growth Factor Rev* 13: 315-321.
43. Raphael I, Nalawade S, Eagar TN, Forsthuber TG (2014) T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine*.
44. Faustman D, Davis M (2010) TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases. *Nat Rev Drug Discov* 9: 482-493.
45. Groom JR, Luster AD (2011) CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions. *Immunol Cell Biol* 89: 207-215.
46. Steinke JW, Borish L (2001) Th2 cytokines and asthma. Interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists. *Respir Res* 2: 66-70.
47. Minai-Fleminger Y, Levi-Schaffer F (2009) Mast cells and eosinophils: the two key effector cells in allergic inflammation. *Inflamm Res* 58: 631-638.
48. Borish LC, Steinke JW (2003) 2. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol* 111: S460-475.
49. Illera VA, Perandones CE, Stunz LL, Mower DA, Ashman RF (1993) Apoptosis in splenic B lymphocytes. Regulation by protein kinase C and IL-4. *J Immunol* 151: 2965-2973.
50. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C (2005) A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 6: 1133-1141.

51. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT (2005) Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 6: 1123-1132.
52. Torchinsky MB, Blander JM (2010) T helper 17 cells: discovery, function, and physiological trigger. *Cell Mol Life Sci* 67: 1407-1421.
53. Zambrano-Zaragoza JF, Romo-Martínez EJ, Durán-Avelar MeJ, García-Magallanes N, Vibanco-Pérez N (2014) Th17 cells in autoimmune and infectious diseases. *Int J Inflam* 2014: 651503.
54. Jäger A, Dardalhon V, Sobel RA, Bettelli E, Kuchroo VK (2009) Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes. *J Immunol* 183: 7169-7177.
55. Bonilla FA, Oettgen HC (2010) Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol* 125: S33-40.
56. Miossec P, Korn T, Kuchroo VK (2009) Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med* 361: 888-898.
57. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M (1995) Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155: 1151-1164.
58. Peterson RA (2012) Regulatory T-cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression. *Toxicol Pathol* 40: 186-204.
59. Shevach EM (2006) From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity* 25: 195-201.
60. Gregori S, Goudy KS, Roncarolo MG (2012) The cellular and molecular mechanisms of immuno-suppression by human type 1 regulatory T cells. *Front Immunol* 3: 30.
61. Cools N, Ponsaerts P, Van Tendeloo VF, Berneman ZN (2007) Regulatory T cells and human disease. *Clin Dev Immunol* 2007: 89195.
62. Grant CR, Liberal R, Mieli-Vergani G, Vergani D, Longhi MS (2015) Regulatory T-cells in autoimmune diseases: challenges, controversies and--yet--unanswered questions. *Autoimmun Rev* 14: 105-116.

63. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Fazekas de St Groth B, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, Bluestone JA (2006) CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *J Exp Med* 203: 1701-1711.
64. Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A, Solomon M, Selby W, Alexander SI, Nanan R, Kelleher A, Fazekas de St Groth B (2006) Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* 203: 1693-1700.
65. Shipkova M, Wieland E (2012) Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation. *Clin Chim Acta* 413: 1338-1349.
66. Summers KL, O'Donnell JL, Hart DN (1994) Co-expression of the CD45RA and CD45RO antigens on T lymphocytes in chronic arthritis. *Clin Exp Immunol* 97: 39-44.
67. Mackay CR (1999) Dual personality of memory T cells. *Nature* 401: 659-660.
68. Llera AS, Viedma F, Sánchez-Madrid F, Tormo J (2001) Crystal structure of the C-type lectin-like domain from the human hematopoietic cell receptor CD69. *J Biol Chem* 276: 7312-7319.
69. Marzio R, Mauël J, Betz-Corradin S (1999) CD69 and regulation of the immune function. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 21: 565-582.
70. Reddy M, Eirikis E, Davis C, Davis HM, Prabhakar U (2004) Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: an in vitro model to monitor cellular immune function. *J Immunol Methods* 293: 127-142.
71. Turesson C (2004) Endothelial expression of MHC class II molecules in autoimmune disease. *Curr Pharm Des* 10: 129-143.
72. den Haan JM, Arens R, van Zelm MC (2014) The activation of the adaptive immune system: cross-talk between antigen-presenting cells, T cells and B cells. *Immunol Lett* 162: 103-112.
73. Abbas AK, Janeway CA (2000) Immunology: improving on nature in the twenty-first century. *Cell* 100: 129-138.
74. Cheng J, Montecalvo A, Kane LP (2011) Regulation of NF- κ B induction by TCR/CD28. *Immunol Res* 50: 113-117.

75. Lewis RS (2001) Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 19: 497-521.
76. Oh-hora M (2009) Calcium signaling in the development and function of T-lineage cells. *Immunol Rev* 231: 210-224.
77. Duszyński J, Kozieł R, Brutkowski W, Szczepanowska J, Zabłocki K (2006) The regulatory role of mitochondria in capacitative calcium entry. *Biochim Biophys Acta* 1757: 380-387.
78. Hoth M, Fanger CM, Lewis RS (1997) Mitochondrial regulation of store-operated calcium signaling in T lymphocytes. *J Cell Biol* 137: 633-648.
79. Halliwell B, Cross CE (1994) Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect* 102 Suppl 10: 5-12.
80. Yang Z, Matteson EL, Goronzy JJ, Weyand CM (2015) T-cell metabolism in autoimmune disease. *Arthritis Res Ther* 17: 29.
81. Gutteridge JM (1995) Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 41: 1819-1828.
82. Werner E, Werb Z (2002) Integrins engage mitochondrial function for signal transduction by a mechanism dependent on Rho GTPases. *J Cell Biol* 158: 357-368.
83. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526.
84. Brecht DS (1999) Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. *Free Radic Res* 31: 577-596.
85. MacMicking J, Xie QW, Nathan C (1997) Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 15: 323-350.
86. Nagy G, Koncz A, Telarico T, Fernandez D, Ersek B, Buzás E, Perl A (2010) Central role of nitric oxide in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 12: 210.
87. van der Linden S, Valkenburg HA, Cats A (1984) Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria. *Arthritis Rheum* 27: 361-368.

88. Garrett S, Jenkinson T, Kennedy LG, Whitelock H, Gaisford P, Calin A (1994) A new approach to defining disease status in ankylosing spondylitis: the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index. *J Rheumatol* 21: 2286-2291.
89. Kaposi AS, Veress G, Vásárhelyi B, Macardle P, Bailey S, Tulassay T, Treszl A (2008) Cytometry-acquired calcium-flux data analysis in activated lymphocytes. *Cytometry A* 73: 246-253.
90. Dejaco C, Duftner C, Klauser A, Schirmer M (2010) Altered T-cell subtypes in spondyloarthritis, rheumatoid arthritis and polymyalgia rheumatica. *Rheumatol Int* 30: 297-303.
91. Nagy G, Clark JM, Buzás EI, Gorman CL, Cope AP (2007) Nitric oxide, chronic inflammation and autoimmunity. *Immunol Lett* 111: 1-5.
92. Inman RD, El-Gabalawy HS (2009) The immunology of ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis: a tale of similarities and dissimilarities. *Clin Exp Rheumatol* 27: S26-32.
93. Duftner C, Goldberger C, Falkenbach A, Würzner R, Falkensammer B, Pfeiffer KP, Maerker-Hermann E, Schirmer M (2003) Prevalence, clinical relevance and characterization of circulating cytotoxic CD4+CD28- T cells in ankylosing spondylitis. *Arthritis Res Ther* 5: R292-300.
94. Schirmer M, Goldberger C, Würzner R, Duftner C, Pfeiffer KP, Clausen J, Neumayr G, Falkenbach A (2002) Circulating cytotoxic CD8(+) CD28(-) T cells in ankylosing spondylitis. *Arthritis Res* 4: 71-76.
95. Rudwaleit M, Siebert S, Yin Z, Eick J, Thiel A, Radbruch A, Sieper J, Braun J (2001) Low T cell production of TNF α and IFN γ in ankylosing spondylitis: its relation to HLA-B27 and influence of the TNF-308 gene polymorphism. *Ann Rheum Dis* 60: 36-42.
96. Vorobjova T, Uibo O, Heilman K, Rågo T, Honkanen J, Vaarala O, Tillmann V, Ojakivi I, Uibo R (2009) Increased FOXP3 expression in small-bowel mucosa of children with coeliac disease and type I diabetes mellitus. *Scand J Gastroenterol* 44: 422-430.
97. Banica L, Besliu A, Pistol G, Stavaru C, Ionescu R, Forsea AM, Tanaseanu C, Dumitrache S, Otelea D, Tamsulea I, Tanaseanu S, Chitonu C, Paraschiv S, Balteanu M, Stefanescu M, Matache C (2009) Quantification and molecular

- characterization of regulatory T cells in connective tissue diseases. *Autoimmunity* 42: 41-49.
98. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ (2005) IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 201: 233-240.
 99. Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, Blumenschein W, McClanahan T, Kastelein RA, Sedgwick JD, Cua DJ (2003) Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med* 198: 1951-1957.
 100. Klein S, Kretz CC, Krammer PH, Kuhn A (2010) CD127(low/-) and FoxP3(+) expression levels characterize different regulatory T-cell populations in human peripheral blood. *J Invest Dermatol* 130: 492-499.
 101. van Amelsfort JM, Jacobs KM, Bijlsma JW, Lafeber FP, Taams LS (2004) CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in rheumatoid arthritis: differences in the presence, phenotype, and function between peripheral blood and synovial fluid. *Arthritis Rheum* 50: 2775-2785.
 102. Bossowski A, Urban M, Stasiak-Barmuta A (2003) Analysis of changes in the percentage of B (CD19) and T (CD3) lymphocytes, subsets CD4, CD8 and their memory (CD45RO), and naive (CD45RA) T cells in children with immune and non-immune thyroid diseases. *J Pediatr Endocrinol Metab* 16: 63-70.
 103. Cauli A, Dessoie G, Fiorillo MT, Vacca A, Marnetti A, Bitti P, Passiu G, Sorrentino R, Mathieu A (2002) Increased level of HLA-B27 expression in ankylosing spondylitis patients compared with healthy HLA-B27-positive subjects: a possible further susceptibility factor for the development of disease. *Rheumatology (Oxford)* 41: 1375-1379.
 104. Ricciardelli I, Lindley KJ, Londei M, Quarantino S (2008) Anti tumour necrosis-alpha therapy increases the number of FOXP3 regulatory T cells in children affected by Crohn's disease. *Immunology* 125: 178-183.
 105. Maurice MM, van der Graaff WL, Leow A, Breedveld FC, van Lier RA, Verweij CL (1999) Treatment with monoclonal anti-tumor necrosis factor alpha antibody results in an accumulation of Th1 CD4+ T cells in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 42: 2166-2173.

106. Sonel B, Tutkak H, Düzgün N (2002) Serum levels of IL-1 beta, TNF-alpha, IL-8, and acute phase proteins in seronegative spondyloarthropathies. *Joint Bone Spine* 69: 463-467.
107. Gratacós J, Collado A, Filella X, Sanmartí R, Cañete J, Llena J, Molina R, Ballesta A, Muñoz-Gómez J (1994) Serum cytokines (IL-6, TNF-alpha, IL-1 beta and IFN-gamma) in ankylosing spondylitis: a close correlation between serum IL-6 and disease activity and severity. *Br J Rheumatol* 33: 927-931.
108. Aspalter RM, Wolf HM, Eibl MM (2005) Chronic TNF-alpha exposure impairs TCR-signaling via TNF-RII but not TNF-RI. *Cell Immunol* 237: 55-67.
109. Church LD, Goodall JE, Rider DA, Bacon PA, Young SP (2005) Persistent TNF-alpha exposure impairs store operated calcium influx in CD4+ T lymphocytes. *FEBS Lett* 579: 1539-1544.
110. Cope AP, Londei M, Chu NR, Cohen SB, Elliott MJ, Brennan FM, Maini RN, Feldmann M (1994) Chronic exposure to tumor necrosis factor (TNF) in vitro impairs the activation of T cells through the T cell receptor/CD3 complex; reversal in vivo by anti-TNF antibodies in patients with rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 94: 749-760.
111. Isomäki P, Panesar M, Annenkov A, Clark JM, Foxwell BM, Chernajovsky Y, Cope AP (2001) Prolonged exposure of T cells to TNF down-regulates TCR zeta and expression of the TCR/CD3 complex at the cell surface. *J Immunol* 166: 5495-5507.
112. Lee H-T, Chen W-S, Chen M-H, Tsai C-Y, Chou C-T (2009) The expression of proinflammatory cytokines and intracellular minerals in patients with ankylosing spondylitis *Formosan Journal of Rheumatology* 23.
113. Nagy G, Koncz A, Perl A (2003) T cell activation-induced mitochondrial hyperpolarization is mediated by Ca²⁺ and redox-dependent production of nitric oxide. *J Immunol* 171: 5188-5197.
114. Ferret-Bernard S, Sai P, Bach JM (2004) In vitro induction of inhibitory macrophage differentiation by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, stem cell factor and interferon-gamma from lineage phenotypes-negative c-kit-positive murine hematopoietic progenitor cells. *Immunol Lett* 91: 221-227.

115. Gonzalez-Gay MA, Garcia-Unzueta MT, Berja A, Vazquez-Rodriguez TR, Miranda-Fillooy JA, Gonzalez-Juanatey C, de Matias JM, Martin J, Dessein PH, Llorca J (2009) Short-term effect of anti-TNF-alpha therapy on nitric oxide production in patients with severe rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 27: 452-458.
116. Aarvak T, Chabaud M, Thoen J, Miossec P, Natvig JB (2000) Changes in the Th1 or Th2 cytokine dominance in the synovium of rheumatoid arthritis (RA): a kinetic study of the Th subsets in one unusual RA patient. *Rheumatology (Oxford)* 39: 513-522.
117. Carvalheiro H, da Silva JA, Souto-Carneiro MM (2013) Potential roles for CD8(+) T cells in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 12: 401-409.
118. Selmi C (2011) Autoimmunity in 2010. *Autoimmun Rev* 10: 725-732.
119. Peck A, Mellins ED (2009) Breaking old paradigms: Th17 cells in autoimmune arthritis. *Clin Immunol* 132: 295-304.
120. Shen H, Goodall JC, Hill Gaston JS (2009) Frequency and phenotype of peripheral blood Th17 cells in ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 60: 1647-1656.
121. Chen DY, Chen YM, Chen HH, Hsieh CW, Lin CC, Lan JL (2011) Increasing levels of circulating Th17 cells and interleukin-17 in rheumatoid arthritis patients with an inadequate response to anti-TNF- α therapy. *Arthritis Res Ther* 13: R126.
122. Ortiz AM, Laffon A, Gonzalez-Alvaro I (2002) CD69 expression on lymphocytes and interleukin-15 levels in synovial fluids from different inflammatory arthropathies. *Rheumatol Int* 21: 182-188.
123. Rueda B, Fernandez-Gutierrez B, Balsa A, Pacual-Salcedo D, Lamas JR, Raya E, Gonzalez-Gay MA, Martin J (2008) Investigation of CD69 as a new candidate gene for rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* 72: 206-210.
124. Afeltra A, Galeazzi M, Sebastiani GD, Ferri GM, Caccavo D, Addessi MA, Marcolongo R, Bonomo L (1997) Coexpression of CD69 and HLADR activation markers on synovial fluid T lymphocytes of patients affected by rheumatoid arthritis: a three-colour cytometric analysis. *Int J Exp Pathol* 78: 331-336.

125. Mamoune A, Durand V, Le Goff P, Pennec YL, Youinou P, Le Corre R (2000) Abnormal distribution of CD45 isoforms expressed by CD4+ and CD8+ T cells in rheumatoid arthritis. *Histol Histopathol* 15: 587-591.
126. Kurashima K, Fujimura M, Myou S, Kasahara K, Tachibana H, Amemiya N, Ishiura Y, Onai N, Matsushima K, Nakao S (2001) Effects of oral steroids on blood CXCR3+ and CCR4+ T cells in patients with bronchial asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 164: 754-758.
127. Xinqiang S, Fei L, Nan L, Yuan L, Fang Y, Hong X, Lixin T, Juan L, Xiao Z, Yuying S, Yongzhi X (2010) Therapeutic efficacy of experimental rheumatoid arthritis with low-dose methotrexate by increasing partially CD4+CD25+ Treg cells and inducing Th1 to Th2 shift in both cells and cytokines. *Biomed Pharmacother* 64: 463-471.
128. Li Y, Jiang L, Zhang S, Yin L, Ma L, He D, Shen J (2011) Methotrexate attenuates the Th17/IL-17 levels in peripheral blood mononuclear cells from healthy individuals and RA patients. *Rheumatol Int*.
129. Lina C, Conghua W, Nan L, Ping Z (2011) Combined treatment of etanercept and MTX reverses Th1/Th2, Th17/Treg imbalance in patients with rheumatoid arthritis. *J Clin Immunol* 31: 596-605.
130. Shen H, Xia L, Lu J, Xiao W (2010) Infliximab reduces the frequency of interleukin 17-producing cells and the amounts of interleukin 17 in patients with rheumatoid arthritis. *J Investig Med* 58: 905-908.
131. Yue C, You X, Zhao L, Wang H, Tang F, Zhang F, Zhang X, He W (2010) The effects of adalimumab and methotrexate treatment on peripheral Th17 cells and IL-17/IL-6 secretion in rheumatoid arthritis patients. *Rheumatol Int* 30: 1553-1557.
132. Lawson CA, Brown AK, Bejarano V, Douglas SH, Burgoyne CH, Greenstein AS, Boylston AW, Emery P, Ponchel F, Isaacs JD (2006) Early rheumatoid arthritis is associated with a deficit in the CD4+CD25high regulatory T cell population in peripheral blood. *Rheumatology (Oxford)* 45: 1210-1217.
133. Chamouard P, Monneaux F, Richert Z, Voegeli AC, Lavaux T, Gaub MP, Baumann R, Oudet P, Muller S (2009) Diminution of Circulating CD4+CD25 high T cells in naïve Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 54: 2084-2093.

134. Jiao Z, Wang W, Jia R, Li J, You H, Chen L, Wang Y (2007) Accumulation of FoxP3-expressing CD4+CD25+ T cells with distinct chemokine receptors in synovial fluid of patients with active rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 36: 428-433.
135. Corthay A (2009) How do regulatory T cells work? *Scand J Immunol* 70: 326-336.
136. Boissier MC, Assier E, Biton J, Denys A, Falgarone G, Bessis N (2009) Regulatory T cells (Treg) in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 76: 10-14.
137. Berthelot JM, Maugars Y (2004) Role for suppressor T cells in the pathogenesis of autoimmune diseases (including rheumatoid arthritis). Facts and hypotheses. *Joint Bone Spine* 71: 374-380.
138. Norii M, Yamamura M, Iwahashi M, Ueno A, Yamana J, Makino H (2006) Selective recruitment of CXCR3+ and CCR5+ CCR4+ T cells into synovial tissue in patients with rheumatoid arthritis. *Acta Med Okayama* 60: 149-157.
139. Mohan K, Issekutz TB (2007) Blockade of chemokine receptor CXCR3 inhibits T cell recruitment to inflamed joints and decreases the severity of adjuvant arthritis. *J Immunol* 179: 8463-8469.
140. Mitoma H, Horiuchi T, Tsukamoto H, Tamimoto Y, Kimoto Y, Uchino A, To K, Harashima S, Hatta N, Harada M (2008) Mechanisms for cytotoxic effects of anti-tumor necrosis factor agents on transmembrane tumor necrosis factor alpha-expressing cells: comparison among infliximab, etanercept, and adalimumab. *Arthritis Rheum* 58: 1248-1257.
141. Lu TT, Zhu P, Li XY, Fan CM (2008) [Functional status of T helper cells in rheumatoid arthritis and effect of etanercept]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 24: 495-497.
142. Valencia X, Stephens G, Goldbach-Mansky R, Wilson M, Shevach EM, Lipsky PE (2006) TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells. *Blood* 108: 253-261.
143. 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.
144. Vigna-Pérez M, Abud-Mendoza C, Portillo-Salazar H, Alvarado-Sánchez B, Cuevas-Orta E, Moreno-Valdés R, Baranda L, Paredes-Saharopulos O, González-

- Amaro R (2005) Immune effects of therapy with Adalimumab in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 141: 372-380.
145. Blache C, Lequerré T, Roucheux A, Beutheu S, Dedreux I, Jacquot S, Le Loët X, Boyer O, Vittecoq O (2011) Number and phenotype of rheumatoid arthritis patients' CD4+CD25hi regulatory T cells are not affected by adalimumab or etanercept. *Rheumatology (Oxford)* 50: 1814-1822.
146. Phillips DC, Dias HK, Kitas GD, Griffiths HR (2010) Aberrant reactive oxygen and nitrogen species generation in rheumatoid arthritis (RA): causes and consequences for immune function, cell survival, and therapeutic intervention. *Antioxid Redox Signal* 12: 743-785.
147. Van Laethem F, Baus E, Smyth LA, Andris F, Bex F, Urbain J, Kioussis D, Leo O (2001) Glucocorticoids attenuate T cell receptor signaling. *J Exp Med* 193: 803-814.
148. Baus E, Andris F, Dubois PM, Urbain J, Leo O (1996) Dexamethasone inhibits the early steps of antigen receptor signaling in activated T lymphocytes. *J Immunol* 156: 4555-4561.
149. Harr MW, Rong Y, Bootman MD, Roderick HL, Distelhorst CW (2009) Glucocorticoid-mediated inhibition of Lck modulates the pattern of T cell receptor-induced calcium signals by down-regulating inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *J Biol Chem* 284: 31860-31871.
150. Lam M, Dubyak G, Distelhorst CW (1993) Effect of glucocorticosteroid treatment on intracellular calcium homeostasis in mouse lymphoma cells. *Mol Endocrinol* 7: 686-693.
151. Marumo T, Schini-Kerth VB, Brandes RP, Busse R (1998) Glucocorticoids inhibit superoxide anion production and p22 phox mRNA expression in human aortic smooth muscle cells. *Hypertension* 32: 1083-1088.
152. Pagadigorria CL, Marcon F, Kelmer-Bracht AM, Bracht A, Ishii-Iwamoto EL (2006) Effects of methotrexate on calcium flux in rat liver mitochondria, microsomes and plasma membrane vesicles. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 143: 340-348.
153. Hassan SZ, Gheita TA, Kenawy SA, Fahim AT, El-Sorougy IM, Abdou MS (2011) Oxidative stress in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis

- patients: relationship to disease manifestations and activity. *Int J Rheum Dis* 14: 325-331.
154. Hitchon CA, El-Gabalawy HS (2004) Oxidation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 6: 265-278.
155. Griffiths HR, Dunston CR, Bennett SJ, Grant MM, Phillips DC, Kitas GD (2011) Free radicals and redox signalling in T-cells during chronic inflammation and ageing. *Biochem Soc Trans* 39: 1273-1278.
156. Sung JY, Hong JH, Kang HS, Choi I, Lim SD, Lee JK, Seok JH, Lee JH, Hur GM (2000) Methotrexate suppresses the interleukin-6 induced generation of reactive oxygen species in the synoviocytes of rheumatoid arthritis. *Immunopharmacology* 47: 35-44.
157. Allen ME, Young SP, Michell RH, Bacon PA (1995) Altered T lymphocyte signaling in rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 25: 1547-1554.
158. Carruthers DM, Naylor WG, Allen ME, Kitas GD, Bacon PA, Young SP (1996) Characterization of altered calcium signalling in T lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis (RA). *Clin Exp Immunol* 105: 291-296.
159. Pay S, Musabak U, Erdem H, Simsek I, Pekel A, Sengul A, Dinc A (2005) Chimerical anti-TNF-alpha, infliximab, inhibits neutrophil chemotaxis and production of reactive oxygen species by blocking the priming effect of mononuclear cells on neutrophils. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 27: 187-198.
160. den Broeder AA, Wanten GJ, Oyen WJ, Naber T, van Riel PL, Barrera P (2003) Neutrophil migration and production of reactive oxygen species during treatment with a fully human anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 30: 232-237.
161. Capsoni F, Sarzi-Puttini P, Atzeni F, Minonzio F, Bonara P, Doria A, Carrabba M (2005) Effect of adalimumab on neutrophil function in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 7: R250-255.

11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

11.1. Az értekezéshez kapcsolódó közlemények

Összesített impakt faktor: 8,372

Nemzetközi közlemények:

- **Szalay B**, Mészáros G, Cseh Á, Ács L, Deák M, Kovács L, Vásárhelyi B, Balog A. Adaptive immunity in Ankylosing Spondylitis: phenotype and functional alterations of T-cells before and during infliximab therapy. Clin Dev Immunol. 2012;2012:808724. [IF: 3,064]
- **Szalay B**, Vásárhelyi B, Cseh Á, Tulassay T, Deák M, Kovács L, Balog A. The impact of conventional DMARD and biological therapies on CD4+ cell subsets in rheumatoid arthritis: a follow-up study. Clin Rheumatol. 2014;33(2):175-85. [IF: 1,774]
- **Szalay B**, Cseh Á, Mészáros G, Kovács L, Balog A, Vásárhelyi B. The impact of DMARD and anti-TNF therapy on functional characterization of short-term T-cell activation in patients with rheumatoid arthritis--a follow-up study. PLoS One. 2014;9(8):e104298. [IF: 3,534]

Könyvfejezet:

- Kaposi A, Toldi G, Mészáros G, **Szalay B**, Veress G, Vásárhelyi B. Experimental conditions and mathematical analysis of kinetic measurements using flow cytometry - the FacsKin method. In: Flow Cytometry/Book 1. Schmid I (ed.). Intech, 2012. pp. 299-324.. ISBN 979-953-307-355-1.

11.2. Az értekezéshez nem kapcsolódó közlemények

Összesített impakt faktor: 34,420

Nemzetközi közlemények:

- **Szalay B**, Mészáros G, Toldi G, Mezei G, Tamási L, Vásárhelyi B, Cserháti E, Treszl A: FoxP3+ regulatory T cells in childhood allergic rhinitis and asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2009;19(3):238-40. [IF: 1,189]
- Rónai AZ, Király K, Szebeni A, Szemenyei E, Prohászka Z, Darula Z, Tóth G, Till I, **Szalay B**, Kató E, Barna I: Immunoreactive endomorphin 2 is generated extracellularly in rat isolated L4,5 dorsal root ganglia by DPP-IV. *Regul Pept.* 2009;157(1-3):1-2. [IF: 2,160]
- Király K, **Szalay B**, Szalai J, Barna I, Gyires K, Verbeken M, Rónai AZ: Intrathecally injected Ile-Pro-Ile, an inhibitor of membrane ectoenzyme dipeptidyl peptidase IV, is antihyperalgesic in rats by switching the enzyme from hydrolase to synthase functional mode to generate endomorphin 2. *Eur J Pharmacol.* 2009;620(1-3):21-6. [IF: 2,585]
- Gyarmati B, Beko G, **Szalay B**, Cseh Á, Vásárhelyi B, Treszl A: Maternal cytokine balance on 3rd postpartum day is not affected by the mode of delivery after healthy pregnancies. *J Int Med Res.* 2010;38:208-13. [IF: 1,068]
- Cseh Á, Vásárhelyi B, **Szalay B**, Molnár K, Nagy-Szakál D, Treszl A, Vannay Á, Arató A, Tulassay T, Veres G: Immune phenotype of children with newly diagnosed and gluten-free diet treated coeliac disease. *Dig Dis Sci.* 2011;56(3):792-8. [IF: 2,117]
- Cseh Á, Molnár K, Pintér P, **Szalay B**, Szebeni B, Treszl A, Arató A, Vásárhelyi B, Veres G: Regulatory T cells and T helper subsets in breast-fed infants with hematochezia caused by allergic colitis. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2010;51:675-7. [IF: 2,180]

- Cseh Á, Vasarhelyi B, Molnar K, **Szalay B**, Svec P, Treszl A, Dezsofi A, Lakatos PL, Arato A, Tulassay T, Veres G: Immune phenotype in children with therapy-naïve, remitted and relapsed Crohn's disease. *World J Gastroenterol.* 2010;16:6001-9. [IF: 2,240]
- Gál K, Cseh A, **Szalay B**, Rusai K, Vannay A, Lukácsovits J, Heemann U, Szabó AJ, Losonczy G, Tamási L, Müller V: Effect of cigarette smoke and dexamethasone on Hsp72 system of alveolar epithelial cells. *Cell Stress Chaperones.* 2011;16(4):369-78. [IF: 3,013]
- Cseh Á, Bohács A, **Szalay B**, Losonczy G, Tulassay T, Vásárhelyi B, Tamási L: Peripheral dendritic cells in asthma. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 2010;20:533-5. [IF: 1,489]
- Rusai K, Prókai A, Szebeni B, Mészáros K, Fekete A, **Szalay B**, Vannay A, Degrell P, Müller V, Tulassay T, Szabó AJ.: Gender Differences in Serum and Glucocorticoid Regulated Kinase-1 (SGK-1) Expression during Renal Ischemia/Reperfusion Injury. *Cell Physiol Biochem.* 2011;27(6):727-38. [IF: 2,857]
- Mészáros G, **Szalay B**, Toldi G, Kaposi A, Vásárhelyi B, Treszl A: Kinetic measurements using flow cytometry: new methods for Monitoring intracellular processes. *Assay Drug Dev Technol.* 2012;10(1):97-104. [IF: 1,727]
- Gyarmati B, Szabó E, **Szalay B**, Czuczy N, Toldi G, Cseh Á, Vásárhelyi B, Takáts Z.Á.: Serum maternal hepcidin levels 3 days after delivery are higher compared to those measured at parturition. *J Obstet Gynaecol Res.* 2011;37(11):1620-4. [IF: 0,942]
- **Szalay B**, Acs L, Vásárhelyi B, Kovács L, Balog A: Successful use of tocilizumab in a patient with rheumatoid arthritis following severe pancytopenia during etanercept therapy. *J Clin Rheumatol.* 2011;17(7):377-9. [IF: 1,364]

- Toldi G, Biró E, **Szalay B**, Stenczer B, Molvarec A, Rigó J, Vásárhelyi B, Bekő G: Soluble urokinase plasminogen activator receptor (suPAR) levels in healthy pregnancy and preeclampsia. *Clin Chem Lab Med.* 2011;49(11):1873-6. [IF: 2,150]
- Toldi G, Szalay B, Bekő G, Bocskai M, Deák M, Kovács L, Vásárhelyi B, Balog A: Plasma soluble urokinase plasminogen activator receptor (suPAR) levels in systemic lupus erythematosus. *Biomarkers.* 2012 Dec;17(8):758-63. [IF: 1,879]
- Toldi G, **Szalay B**, Bekő G, Kovács L, Vásárhelyi B, Balog A: Plasma soluble urokinase plasminogen activator receptor (suPAR) levels in ankylosing spondylitis. *Joint Bone Spine.* 2013 Jan;80(1):96-8. [IF: 3,218]
- Rusai K, Prokai A, Juanxing C, Meszaros K, **Szalay B**, Pásti K, Müller V, Heemann U, Lutz J, Tulassay T, Szabo AJ: Dexamethasone protects from renal ischemia/reperfusion injury: a possible association with SGK-1. *Acta Physiol Hung.* 2013 Jun;100(2):173-85. [IF: 0,747]
- Cseh A, Farkas KM, Derzbach L, Muller K, Vasarhelyi B, **Szalay B**, Treszl A, Farkas V: Lymphocyte subsets in pediatric migraine. *Neurol Sci.* 2013 Jul;34(7):1151-5. [IF: 1,495]

Hazai közlemények:

- Cseh Á, Szebeni B, **Szalay B**, Vásárhelyi B: Akt enzim: új terápia célpont rákban és cukorbetegségben? *Orvosi Hetilap* 2009;150(8):373-8.
- Gyarmati B, Szabó E, **Szalay B**, Cseh Á, Czuczy N, Toldi G, Vásárhelyi B, Takáts Z: Emelkedett hepcidinszint nőgyógyászati műtéteket követő harmadik napon. *Orvosi Hetilap* 2010;151:1790-4

- Cseh Á, Bohács A, Müller V, **Szalay B**, Losonczy Gy, Tulassay T, Vásárhelyi B, Tamási L: Az asztma megváltoztatja a perifériás dendritikus sejtarányt. *Medicina Thoracalis* 2010;LXIII: 358-362.
- Gál K, Cseh Á, **Szalay B**, Rusai K, Vannay Á, Lukácsovits J, Heeman U, Szabó A, Losonczy Gy, Tamási L, Kováts Zs, Müller V: Dohányfüst és szteroid hatása tüdő-epithelsejtek hősokkfehérje (HSP) 72 rendszerére. *Medicina Thoracalis* 2011;64:(3) pp. 152-160.
- Balog A, **Szalay B**: A jelenlegi és a közeljövőben várható terápiás célpontok a rheumatoid arthritis kezelésében. 1. rész. *Figyelő (Aktualitások a reumatológia és a dermatológia területéről)*. 2011. január. I. évfolyam 1. szám
- **Szalay B**, Balog A: A jelenlegi és a közeljövőben várható terápiás célpontok a rheumatoid arthritis kezelésében. 2. rész. *Figyelő (Aktualitások a reumatológia és a dermatológia területéről)*. 2011. június. I. évfolyam 2. szám
- Balog A, **Szalay B**: A jelenlegi és a közeljövőben várható terápiás célpontok a rheumatoid arthritis kezelésében. 3. rész, a kinázgátlók. *Figyelő (Aktualitások a reumatológia és a dermatológia területéről)*. 2012. január. II. évfolyam 1. szám
- **Szalay B**: Alvadási paraméterek változásai akut appendicitisben [folyóirat referátum]: *Orvosi Hetilap* 2012;153(10):400.

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt köszönettel tartozom Dr. Tulassay Tivadar Professzor Úrnak, aki biztosította számomra a kutatómunka elvégzéséhez szükséges szellemi műhelyt, és akinek az irányítása alatt működő kutatócsoport tagjaként elsajátíthattam egy vizsgálat kivitelezésének minden lépését.

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Balog Attilának, hogy a kezdetektől fogva támogatta és segítette munkámat a minták gyűjtésétől a disszertáció megírásáig és amellett, hogy felbecsülhetetlen szakmai tanácsokkal látott el, a nehezebb időszakokban is tartotta bennem a lelket.

Különös hálával tartozom Dr. Vásárhelyi Barna Professzor Úrnak, hogy már TDK hallgatóként felkarolt és segítségével elsajátíthattam a tudományos kutatáshoz szükséges ismereteket. Észrevételeivel jelentős mértékben hozzájárult az eredmények helyes értelmezéséhez és biztosította a közlemények szakmai alapját.

Szeretném köszönetemet kifejezni Dr. Szabó Attila Professzor Úrnak és Dr. Szabó András Professzor Úrnak, hogy lehetővé tették és támogatták PhD munkám elvégzését.

Köszönettel tartozom Dr. Cseh Áron PhD hallgató társamnak, hogy segítségével az áramlási citométer használatát és az alapvető laboratóriumi munkát elsajátíthattam, továbbá az eredmények kiértékeléséhez szükséges statisztikai számításokat biztosította.

Köszönöm Dr. Toldi Gergely, Dr. Mészáros Gergő és Dr. Kaposi Ambrus PhD hallgató társaim önzetlen segítségét és az I. Sz. Gyermekgyógyászati Klinika Kutatólaboratóriumában dolgozó valamennyi munkatársamnak, hogy egy olyan légkört sikerült kialakítanunk, amelyben öröm volt dolgozni.

Külön köszönöm Bernáth Máriának, hogy a laboratóriumi munkához szükséges gyakorlati tudás elsajátításában fáradhatatlanul segítségemre volt és a labor baráti hangulatának kialakításában is kiemelkedő szerepet vállalt.

Köszönöm Szüleimnek és Húgomnak, hogy mindvégig mellettem álltak és kezdetektől fogva mindenben támogattak.

Végül, de nem utolsó sorban hálámat fejezem ki Feleségemnek és Kislányomnak, akik szeretete és megértő türelme nélkül ezeket az eredményeket nem érhettem volna el.