

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

Doktori tézisek

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

1. 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 hevesességét 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. Kevésbé ismert továbbá, hogy a különböző típusú TNF- α gátlók T-sejtekre kifejtett hatása eltér-e egymástól.

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. 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). Az 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 infliximab (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 (infliximab: IFX, etanercept: ETA és adalimumab: 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 percben 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.

3. MÓDSZEREK

3.1. Egészséges és beteg csoportok

3.1.1. Spondilitisz ankilopoetika

A vizsgálatokba tizenhárom magas betegség aktivitási indexsel (BASDAI) bíró, aktív AS-es beteget vontunk be. Az aktív betegség miatt a páciensek intravénás 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.

3.1.2. Reumatoid arthritisz

Tizenkilenc újonnan diagnosztizált, terápia naiv (korai) RA-s és harminckettő, a hagyományos kombinált DMARD terápiára nem reagáló (késői) RA-s lett bevonva a vizsgálatokba. A **korai RA-s betegek** a vizsgálatok előtt semmilyen RA specifikus gyógyszeres kezelésben nem részesültek. A diagnózis felállítását követően közepes dózisú orális glükokortikoszteroidot (GCS, 16 mg/nap metilprednizolon) kaptak monoterápiában 4 hétig. A GCS dózisát a 4. héttől lecsökkentették 8 mg/nap-ra, miközben elkezdték a metotrexátot (MTX) 10 mg/hét dózissal. A vérmintákat ezzel összhangban szintén három időpontban gyűjtöttük: a terápia megkezdése előtt (alap állapot), majd az azt követő 4. illetve 8. héten. A **késői RA-s betegek** 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 náluk 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.

3.1.3. 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.

3.2. Minta előkészítése

Minden résztvevőtől 24 ml vért vettünk lithium-heparinnal alvadásgátolt mintavételi csövekbe (BD Vacutainer, Beckton Dickinson & Co, Plymouth, UK), melyet minden esetben a vérvételt követő 4 órán belül feldolgoztunk. A perifériás vér mononukleáris sejtjeit (PBMC) sűrűség-grádiens centrifugálással szeparáltuk (Ficoll-Paque Plus, GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA, USA). A PBMC 20%-t (körülbelül 5×10^6 sejt) -80°C -on lefagyasztottuk a sejtfelszíni mérésekhez. A PBMC 80%-t (körülbelül 2×10^7 sejtet) pedig az intracelluláris festéshez 37°C -os módosított RPMI (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA) oldatban reszuszpendáltuk. A kalcium koncentrációját a módosított RPMI oldatban 2 mM-osra állítottuk be (kristályos CaCl_2 hozzáadásával).

3.3. Sejtfelszíni festés

A sejtfelszíni markerek meghatározásához a mintákhoz a gyártó által előírt protokoll szerint fluoreszcens molekulával jelölt konjugált antitestet tartalmazó festéket (Becton Dickinson, San Diego, California, USA) adtunk hozzá. Az alábbi sejteket (a sejtfelszíni markerrel) határoztuk meg: helper T-sejt (CD4^+), citotoxikus T-sejt (CD8^+), Th1 sejt ($\text{CD4}^+\text{CXCR3}^+$), Th2 sejt ($\text{CD4}^+\text{CCR4}^+$), Th17 sejt ($\text{CD4}^+\text{CCR4}^+\text{CCR6}^+$), regulátoros T-sejt (Treg, $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{CD127}^-$), naiv T-sejt ($\text{CD4}^+\text{CD45RA}^+$; $\text{CD8}^+\text{CD45RA}^+$) és memória/ effektor T-sejt ($\text{CD4}^+\text{CD45RO}^+$; $\text{CD8}^+\text{CD45RO}^+$). A sejtek prevalenciája mellett vizsgáltuk a CD4^+ és a CD8^+ limfociták korai (CD69) és késői (HLA-DR) aktivációs markereinek az expresszióját is.

3.4. Intracelluláris festés

Az immunológiai folyamatokban résztvevő sejtek csoportjainak szűkítése céljából a mintákat először CD4 és CD8 sejtfelszíni markerrel inkubáltuk, majd 4 egyenlő részre osztva 4 féle intracelluláris festékekkel jelöltük. A citoplazmatikus kalcium (cit-Ca^{2+}) monitorozásához Fluo-3-AM-t, a mitokondriális kalciumhoz (mit-Ca^{2+}) Rhod2/AM-t, a szabadgyök képződés jellemzéséhez dihidroetidiumot (DHE), a nitrogén monoxid (NO) termeléshez pedig DAF-FM diacetátot alkalmaztunk. Közvetlenül a mérés előtt a sejteket 20 mg/ml végkoncentrációjú fitohemagglutininnel (PHA) aktiváltuk, majd a fluoreszcens jelet 10 percig monitoroztuk.

3.5. Mérés és kiértékelés

A sejtfelszíni és az intracelluláris méréseket egyaránt egy BD FACSAria áramlási citométeren végeztük (Becton Dickinson, San Jose, California, USA). A **sejtprevalencia értékeket** hagyományos kapuzással a készülék saját FACSDiVa szoftverével határoztuk meg (Becton Dickinson, San Jose, California, USA). Az **intracelluláris paraméterek** kinetikus jellemzésére az R programot használtuk (R-projekt, Bécs, Ausztria). A mérés teljes tartományát 100 egyenlő hosszúságú időintervallumra osztotta, majd a medián fluoreszcens értékek meghatározását követően a medián értékekre lowess módszerrel simítást végzett. Az így kapott relatív paraméter értékekből az alábbi paramétereket adta meg: görbe alatti terület (AUC), maximum érték (Max) és a maximum elérésének ideje (t_{max}). A statisztikai számításokat a továbbiakban az AUC, a Max és a t_{max} értékeivel végeztük.

3.6. Statisztikai analízis

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

4. EREDMÉNYEK

4.1. 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]), $P < 0,0001$.

4.1.1. Sejtprevalencia vizsgálatok spondilitisz ankilopoetikában

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 szintén lecsökkent a kontrollhoz képest.

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

4.1.2. Funkcionális vizsgálatok spondilitisz ankilopoetikában

AS-ben **IFX kezelés előtt** a CD4+ és CD8+ limfocitákban egyaránt késleltetve emelkedett a cit-Ca²⁺ AS-ben a kontroll csoporthoz képest. A 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 Max érték és a 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).

4.2. Reumatoid arthritisz

4.2.1. Sejtprevalencia vizsgálatok reumatoid arthritiszben

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. 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 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.

4.2.2. Funkcionális vizsgálatok reumatoid artritiszben

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.

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.

5. 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 gyulladási folyamatok enyhítéséhez, egyben a jelentős klinikai javuláshoz.

6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

6.1. 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.

6.2. Az értekezéshez nem kapcsolódó közlemények

Összesített impakt faktor: 34,420

Nemzetközi közlemények:

- **Szalay B**, Mészáros G, Toldi G, Mezei G, Tamási L, Vásárhelyi B, Cserhádi 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 terápiás 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 sejtárányt. *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, Kovács 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.

7. 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.