

XXXII. OTDK Biológia Szekció

Folikuláris helper T-sejtek vizsgálata szisztémás autoimmun kórképekben

készítette: KOVÁCS ANTONIETTA

témavezető: Dr. SIMON DIÁNA
PTE KK Immunológiai és Biotechnológiai Intézet



PÉCS, 2014

TARTALOMJEGYZÉK

1. Rövidítések	- 3 -
2. Irodalmi bevezetés	- 4 -
2.1 Szervezet védelmi vonalai	- 4 -
2.2 Limfociták, sejtfelszíni markerek	- 4 -
2.2.1 T-limfociták	- 5 -
2.2.1.1 T-limfociták jellemzői	- 5 -
2.2.1.2 Helper T-sejtek	- 7 -
2.2.1.3 Follikuláris helper T-sejtek	- 8 -
2.3 Autoimmunitás	- 9 -
2.3.1 Autoimmun betegségek	- 9 -
2.3.2 Sjögren-szindróma	- 9 -
2.3.3 Rheumatoid arthritis	- 11 -
2.3.4 Szisztémás lupus erythematosus	- 12 -
3. Célkitűzések	- 14 -
4. Anyag és módszer	- 14 -
4.1 Jelölési protokoll	- 16 -
4.2 Áramlási citometria	- 17 -
4.3 Minták analízise	- 19 -
4.4 Statisztikai kiértékelés	- 23 -
5. Eredmények	- 24 -
6. Eredmények megbeszélése	- 28 -
7. Összefoglalás	- 29 -
8. Irodalmi hivatkozások	- 31 -
9. Köszönetnyilvánítás	- 35 -
10. Függelék	- 35 -
10.1 Tételes szerzői hozzájárulás	- 35 -

1. Rövidítések

anti-CCP – anticiklikus citrullinált peptid

APC – allophycocianin

APC – antigén-prezentáló sejt

APS – antifoszfolipid szindróma

Bcl6 – B-sejtes limfóma-6

BSA – borjú szérum albumin

CD – Cluster of Differentiation

DC – dendritikus sejt

DLE – Discoid lupus erythematosus

FDC – follikuláris dendritikus sejt

FITC – fluoreszcein-izotiocianát

FL – fluorescens jel

FSC – forward scatter

GN – glomerulonephritis

HLA – humán leukocita antigén

ICOS – inducible T cell costimulator

IFN – interferonok

KCS – keratoconjunctivitis sicca

NK – természetes ölősejt

PAMP – Pathogen Associated Molecular Pattern

PBS – foszfát puffer

PE – phycoerythrin

PRR – Pattern Recognition Receptors

RA – Sheumatoid arthritis

RF – rheumatoid faktor

RIM – reggeli ízületi merevség

SAM – sejtfelszíni adhéziós molekulák

SAP – szérumamiloid foszfor

SCLE – Subcut cutan lupus erythematosus

SE – shared epitope

sig. – szignifikancia szint

SLE – Szisztémás lupus erythematosus

SS – Sjögren-szindróma

SSC – side scatter

TBC – tuberkulózis

Tfh – follikuláris helper T-sejt

TGF β – transforming growth factor

Th – helper T-sejt

TNF – tumor nekrosis faktor

Treg – regulatórikus T-sejt

VVT – vörösvérsejt

2. Irodalmi bevezetés

2.1 Szervezet védelmi vonalai

A szervezet különböző mechanizmusokkal védi magát a környezet ártalmaitól. A legkülső védelem egy fizikai-kémiai barrier, ami próbálja meggátolni a kórokozók bejutását. Ilyen funkciót lát el a bőr, bél, légutak epitélisejtjeinek a szoros záródása, bél normál baktériumflórájának antimikrobiális anyag (pl.: tejsav) termelése. Ha a kórokozó valamilyen sérülésen keresztül átjut ezeken a fizikai-kémiai barrieren, akkor találkozik az első immunológiai védelmi vonallal, a veleszületett immunitás elemeivel, amik állandóan jelen vannak a szervezetben és kórokozót érzékelve azonnal aktiválódnak. A védekezés ilyen módja nem fajlagos, így szinte válogatás nélkül elpusztítanak minden kórokozót. A veleszületett immunrendszer sejtjei: monociták, makrofágok, dendritikus sejtek (DC-k), granulociták, hízósejtek, follikuláris dendritikus sejtek (FDC-k), természetes ölősejtek (NK-sejtek). A monociták, makrofágok, neutrofil granulociták, dendritikus sejtek fagocitózisra képesek. A veleszületett immunrendszert követően az adaptív immunrendszer aktiválódik, amire jellemző a fajlagosság, diverzitás, memória, klonalitás. A veleszületett immunitás elemei prezentálják az antigéneket, az általuk termelt citokinek indukálják az adaptív immunrendszer sejtjeit, a B- és T-limfocitákat. Ezek antigénkötő receptorokkal rendelkeznek, így az antigén-prezentáló sejtek (APC) segítségével kölcsönhatásba tudnak kerülni az antigénnel és aktiválódnak. Az adaptív immunválasz három szakaszra tagolható: kezdeti – felismerési, központi, végrehajtó. A kezdeti szakaszban történik az antigén prezentálás, limfocita aktiválódás, proliferáció, differenciálódás. A központi szakaszban képződnek olyan pusztító hatású citotoxikus T-sejtek, amik képesek a kórokozót közvetlenül elpusztítani. Ezt nevezzük celluláris immunválasznak. A humorális immunválasz során olyan immunglobulinok termelődnek, amik az antigént közvetlenül nem tudják elpusztítani, de olyan effektor mechanizmusokat aktiválnak, amik képesek erre. A végrehajtó szakaszban történik a kórokozó elpusztítása. (ERDEI és mtsi., 2012; GERGELY és mtsi., 2006)

2.2 Limfociták, sejtfelszíni markerek

Egy átlagos, egészséges felnőtt embernek $2 \cdot 10^{12}$ limfoid sejtje van. Naponta 10^9 limfocita keletkezik, de a nagy része elpusztul, a maradék a keringésbe jut, azonban itt is elpusztulnak néhány napon belül, ha nem találkoznak antigénnel. Felszínükön különböző sejtfelszíni molekulák találhatók, amik segítségével a populációkat el lehet különíteni. Ezek a molekulák immunglobulinok, integrinek, szelektinek, proteoglikánok. Az immunglobulinok a

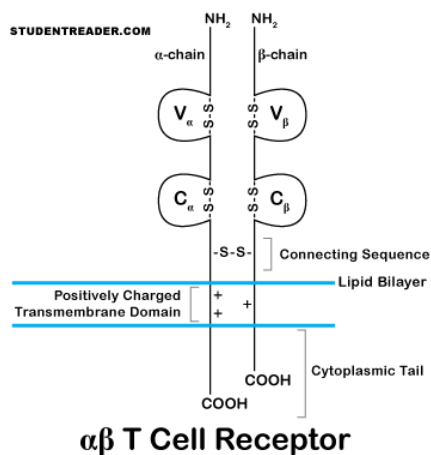
fajlagos immunválaszban fontos szerepet játszó fehérjék, egy vagy több immunglobulin-domént tartalmaznak. Ilyenek például a TRC-, BRC-, MHC- és CD-molekulák. A CD-molekulák elnevezése CD- rövidítés (Cluster of Differentiation) és egy szám. Három típusa van. A sejtvonalmarkerek olyan molekulák, amik csak egy sejt típusra jellemzőek, például a CD3 csak a T-limfocitákon jelenik meg. Az érési markerek egy sejt típus adott érettségi állapotában jelennek meg a sejten. Továbbá az aktivációs markerek az aktivált sejteken találhatók csak meg. (ERDEI és mtsi., 2012)

2.2.1 T-limfociták

2.2.1.1 T-limfociták jellemzői

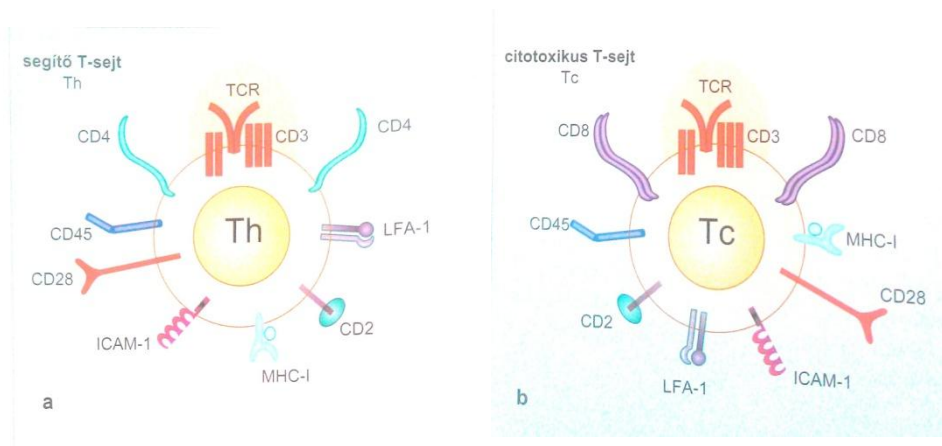
A T-limfociták előalakja a csontvelőben képződik, onnan vándorolnak a tímusz kéreg alatti zónájába és a külső kéregállományba. Timocitáknak nevezzük őket, nincs TCR-, CD4-, CD8-molekulájuk. Megfelelő hatásokra a kéregállományba vándorolnak és érési folyamatok indulnak be a tímusz epitelsejtjei, makrofágjai, dendritikus sejtjei segítségével. (ERDEI és mtsi., 2012) Először a TCR molekula expresszálódik, így rendelkeznek az antigént fajlagosan felismerni képes receptorokkal. majd a CD4- vagy CD8-marker. (ABBAS, 2011) Minden T-limfocita rendelkezik CD3-markerrel. Az érést követően a tímusz velőállományába vándorolnak, majd a perifériás nyirokszervekbe. Ellenanyagot nem képesek termelni, az antigént is csak az APC-k membránján megjelenő MHC-molekulák kötött formájában ismerik fel. Az antigént felismerő struktúrájuk a TCR, ami a sejtmembránban nyolc polipeptidláncból álló komplex. A T-sejtek a TCR szerkezetük alapján két csoportra oszthatók: az $\alpha\beta$ -láncból álló TCR-rel rendelkezők (humán perifériás vér T-sejtjeinek 90-95%-a) és a $\gamma\delta$ -láncból álló TCR-rel rendelkezők (humán perifériás vér T-sejtjeinek 5-10%-a). Egy T-sejten csak az egyik szerkezetű TCR lehet jelen. Az $\alpha\beta$ -TCR egy α - és egy β -láncból álló heterodimer, a láncok erősen glikolizáltak, diszulfid híd kapcsolja őket össze. Mindkét lánc két extracelluláris résszel rendelkezik. A membrántól távolabbi a variábilis (V), a közelebbi a konstans (C). A konstans részt egy transzmembrán szakasz köti össze az intracelluláris résszel. (1. ábra) A variábilis rész 102-119 aminosavat tartalmaz, a bennünk található 2-2 cisztein miatt a láncon belül is kialakulnak diszulfid hidak, amik 1-1 hurkot képeznek. A láncok térszerkezete β -redőzött lemez. Négy hipervariábilis régiót tartalmaz, amiből három az antigén kötő hely, a negyedik egyéb funkciót lát el. A konstans régiók 138-179 aminosav hosszúak, itt is hurkok alakulnak ki a diszulfid hidak miatt. Egy β -lemezt tartalmaz, így rugalmasság jellemzi. A transzmembrán szakasz 20-24 aminosavból áll, az α -lánc részén egy lizin, a β -lánc részén egy

lizin és egy arginin található, amelyek erősen destabilizálják a heterodimert. Ezért önmagában a TCR struktúra nem képes megjelenni, CD3 és ζ -polipeptidekkel alakít ki kapcsolatot. (ERDEI és mtsi., 2012)



1. ábra: TCR-molekula felépítése (<http://studentreader.com/t-cell-receptor/>)

A TCR-molekula nem alkalmas jelátvitelre, ezt a CD3-at felépítő heterodimer és homodimer molekulák végzik. (ERDEI és mtsi., 2012) Az $\alpha\beta$ -TCR-t tartalmazó T-sejtek további alcsoportokra oszthatók: $CD4^+$ -segítő (helper) és $CD8^+$ -ölő (citotoxikus) sejtek. (2. ábra) (ABBAS, 2011)

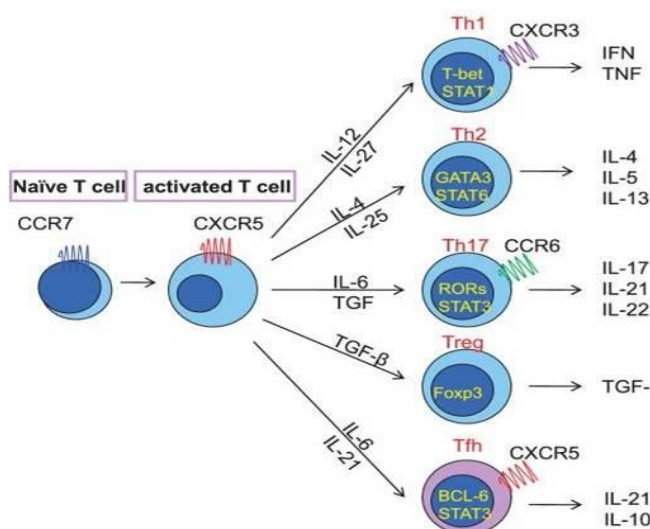


2. ábra: Segítő T-sejt és citotoxikus T-sejt sejtfelszíni markerei (ERDEI és mtsi., 2012)

Arányuk a perifériás vérben állandó, előbbi a $\alpha\beta$ -TCR-sejtek kétharmadát teszi ki, míg utóbbi az egyharmadát. A helper T-sejtek az MHC-II-, míg a citotoxikus T-sejtek az MHC-I-molekulával asszociált antigéneket ismerik fel. (ERDEI és mtsi., 2012)

2.2.1.2 Helper T-sejtek

A helper T-sejtek (Th-sejtek) kialakulása naiv T-sejtek aktivációja után, a tímuszban történik, ahol kialakul a CD4-markerjük, ilyenkor Th0-sejteknek nevezzük őket, majd ezután további differenciálódás következik, az antitesttel való találkozás után. Jellemző ezekre a sejtekre a citokinek termelése, (ERDEI és mtsi., 2012) amik kis méretű glikoproteinek, (CRUSE, 2004) előidézik a T- és B-sejtek, makrofágok, stb. proliferációját, differenciálódását és a gyulladásban fontos szerepet játszó sejteket a helyszínre vonzzák. (ERDEI és mtsi., 2012) Citokin termelés alapján további öt csoportra osztjuk a helper T sejteket. (3. ábra) Ezek az alpopulációk: Th1-sejtek, Th2-sejtek, Th17-sejtek, regulatórikus T-sejtek (Treg), follikuláris helper T sejtek (Tfh). (LUCKHEERAM és mtsi., 2012)



3. ábra: Helper T-sejtek típusai (ZHANG és mtsi., 2013)

A Th1-sejtek IFN (interferon) és TNF (tumornekrózis-faktor) citokineket termelnek, amiknek a gyulladás kialakulásában, másodlagos nyirokszervek differenciációjában, vírus- és tumor-

ellenes válaszreakciókban van fontos szerepük. Így a veleszületett és szerzett immunitás folyamataiban is fontos szerepet játszanak. A Th2-sejtek IL-4, IL-5, IL-13 (interleukinek) citokineket termelnek, leginkább a B-sejtek aktiválása a feladatuk. A Th17-sejtek IL-17, IL-21, IL-22 citokineket termelnek, amik a gyulladásos folyamatokat erősítik fel. A Treg sejtek TGF β -t (transforming growth factor) termelnek, aminek feladata összetett: immunválasz szabályozása, tolerancia fenntartása, sejtproliferáció gátlása, APC és T-sejtek gátlása. (ERDEI és mtsi., 2012)

2.2.1.3 Follikuláris helper T-sejtek

Az utolsó csoport a Tfh sejtek, ez a legfiatalabb csoport, nem rég különítették el őket. Szerepük a humorális immunválaszban van a B-sejtek aktivációjának és differenciálódásának szabályozása révén. (LI és mtsi., 2013) Jellemző rájuk az IL-6, IL-21 citokin termelése (WEINSTEIN és mtsi., 2012; ETO és mtsi., 2011) és STAT3, Bcl6 transzkripciós faktor expressziója. (LUCKHEERAM és mtsi., 2012) Az IL-6 citokin a B-sejt differenciálódásra, az ellenanyag termelésére és a Th-17 differenciálódásra van hatással. Az IL-21 szabályozza a Th-1, Th-2, Th-17 differenciációját. (ERDEI és mtsi., 2012; SPOLSKI és mtsi., 2009) A Bcl6 a B-sejt-limfóma-6, ami egy erősen konzervált cink-ujj domént tartalmazó transzkripciós represszor. Elősegíti a Tfh sejteken a molekulák kifejezését, ami szükséges a működésükhöz. (CRAFT, 2012; KROENKE és mtsi., 2012) A STAT3 egy jelátvivő és transzkripciós aktivátor molekula. (SPOLSKI és mtsi., 2009, MA és mtsi., 2012) A follikuláris T helper sejtekre jellemző sejtfelszíni markerek a CXCR5, ICOS, CD4 és a PD1. (CROTTY, 2010; LI és mtsi., 2013; LAURENT és mtsi., 2010) A CD4 egy sejtfelszíni glikoprotein, ami jellemző a helper T-sejtekre. A fajlagos immunválasz szempontjából a legfontosabb sejtfelszíni fehérjék közé tartozik. Fontos szerepe van a T-sejtek aktivációjában. Ligandja az MHC-II molekula. A CXCR5 molekula (CD185/BLR1) az 5-ös típusú chemokin receptor, a helper T-sejteken kívül megtalálható még a B-sejteken és a Burkitt limfóma sejteken. (CHEVALIER és mtsi., 2011) A CD278 (ICOS, inducible T cell costimulator) az aktivált T-sejteken fordul elő. Fontos szerepe van a T-sejtek differenciálásában, T- és B-sejtek kölcsönhatásában a humorális immunválasz (POHOLEK és mtsi., 2009; ROLF és mtsi., 2010) során és az IL-4 citokin termelésben. A CD279 (PD-1) molekulának a jelentősége a perifériás toleranciában és az autoimmun betegségekben van. Aktivált T- és B-sejteken fordul elő. Mivel a Tfh sejteknek fontos szerepe van a B-sejtek aktiválódásában és így az antitest termelésben is, ezért fontos szerepet játszanak az autoimmun folyamatokban, hozzájárulhatnak a különböző szisztémás autoimmun kórképek kialakulásához, mint például Szisztémás lupus erythematosus, Sjögren-szindróma,

Rheumatoid arthritis. Korábbi tanulmányok szerint a Sjögren-szindrómában szenvedő betegek perifériás vérében emelkedett számban vannak jelen a Tfh sejtek. (CRAFT, 2012; MORITA és mtsi., 2011)

2.3 Autoimmunitás

2.3.1 Autoimmun betegségek

Az immunrendszer működése problémákat is okozhat, amikor a védelmet biztosító folyamatok a szervezet ellen fordulnak. Ez történik az autoimmunbetegségek és az allergiás reakciók esetében. Az autoimmunbetegségek nagy része nehezen vagy nem is gyógyítható, mert a folyamatot elindító autoantigén nem iktatható ki. A terápiák csak a betegség tüneteit gyógyítják, magát az autoimmun folyamatot csak enyhítik. Az autoimmunitás nagyon gyakori, de általában enyhe, a súlyosabb tünetek ritkábban alakulnak ki, általában fiatal felnőttek körében. (ERDEI és mtsi., 2012) Az autoimmunitás során a szervezet saját elemeit támadják meg az immunrendszer sejtjei, ennek egyik oka az immuntolerancia megszűnése. Az autoimmunbetegségek lehetnek szerv specifikusak vagy szisztémásak. (GERGELY és mtsi., 2006) A szerv specifikusak esetében egy szervet érint a betegség, mert szövet specifikus ellenanyagok, T-sejtek képződnek. A szisztémásak az egész szervezetet érintik, mert a reakciók olyan autoantigének ellen irányulnak, amik több szövetre is jellemzőek. Az autoimmunbetegségekre általánosan jellemző, hogy multifaktoriálisak, tehát a mechanizmusukban több tényező is szerepet játszik, elsődleges szerepük van a genetikai faktoroknak, de lényegesek a környezeti tényezők is, nem befolyásolják a reprodukív képességet, szóval egy családban halmozottan előfordulhatnak. Jelentősebb szisztémás autoimmun betegségek: Szisztémás lupus erythematosus (SLE), Rheumatoid arthritis (RA), Sjögren-szindróma (SS), Szisztémás sclerosis (scleroderma), Vasculitisek (érfalgyulladások). (ERDEI és mtsi., 2012)

2.3.2 Sjögren-szindróma

A Sjögren-szindróma (SS) a külső elválasztású mirigyeket, leginkább a nyál- és könnymirigyeket érintő autoimmun gyulladásos betegség. Szinonimái: Mikulicz-betegség, Gougerot-szindróma, Sicca-szindróma, autoimmun exocrinopathia. (CZIRJÁK, 2006) 100 emberből 1 szenved ebben a betegségben, (<http://immunkozpont.hu/>) leginkább a 40-50 éves nőket érinti. 10 SS-s betegből csak 1 férfi. Magyarország dél-dunántúli részében 1,2%-os gyakorisággal fordul elő. Lassan alakul ki, akár több év kell a tünetek megjelenéséhez. Főbb

klinikai jellemzői a nyálkahártyák szárazsága, xerostomia (szájszárazság), xerotrachea (légcsőszárazság), szemszárazság, vaginális szárazság, nagy nyálmirigyek duzzanata, non-erosiv polyarthritis (több ízület egy idejű gyulladása), tüdő-, vese-, máj epithelialis szöveteinek limfocitás infiltrációjának következményei, bőrvasculitis, perifériás neuropathia. (SZABÓ és mtsi., 2013) Immunpatológiájára jellemző, hogy a nyálmirigyekben fokális limfocitagyülem alakul ki, legalább 50 limfocita 4 mm²-es területén a szövetnek, ez egy fókusznak felel meg. A gyulladás fokozódásával a fókuszok számának növekedése egyenesen arányos. A felszaporodó sejtek leginkább helper T-sejtek, de akadnak köztük B-sejtek és makrofágok is. A betegség kialakulásához három fő tényező járul hozzá: az autoimmun gyulladásos folyamat, ami környezeti tényezők és a genetikai hajlam együttes következménye, az autoimmun reaktivitás kialakulása, végül szövetkárosodások a gyulladás miatt. A betegség kialakulásának második szakaszában a betegek vérszérumára jellemző a hypergammaglobulinaemia, ami azt jelenti, hogy a szérum emelkedett autoantitestet tartalmaz. A betegség jellegzetes antitestjei a celluláris ribonukleoprotein antigének (Ro /A/, La /B/) ellen termelődnek. Ezek az antitestek ritkán más betegségekben is előfordulnak, de az anti-Ss-B a SS-ra kifejezetten specifikus. A Ro(Ss-A) antigének a hY-RNA-k ribonukleoprotein részei, a fő autoimmun targetet képezik. A La(Ss-B)-ek intracelluláris proteinek, az ezek ellen termelt antitestek a betegek 80%-nál megjelennek. Az antigén az RNS-polimeráz III termékeiből és proteinrészekskéből épül fel. Génje a 2-es kromoszómán található. Az exokrin mirigyekbe felgyülemelő limfociták okozzák a gyulladást, majd ezzel a harmadik szakaszt, a szövetkárosodást. Ezek a limfociták aktiváltak, 70%-uk helper T-limfocita. A T-sejtek aktivációját mutatja az IL-2 termelés. Mivel az IL-2 citokin egyik fő feladata a T- és B-sejtek proliferációjának fokozása, aktiválása, ezért a limfociták felszaporodnak a mirigyekben. A betegség kimutatására használható, hogy a nyálmirigyekben megnövekszik a citokinek (IL-1 α , IL-6, TNF- α , INF- γ , IL-4, TGF- β) mennyisége és az, hogy IgM és IgG immunglobulinok találhatók benne, az egészséges mirigyekkel szemben, ahol IgA-t figyelhetünk meg. A betegség jeleként sok tünet megfigyelhető. Szemészeti tünetek a könnytermelés mennyiségi és minőségi változása, szaruhártya száradása, ami a cornea és a bubaris conjunctiva epithelsejtjeinek károsodásához vezethet (keratoconjunctivitis sicca/KCS). Ezeket égő szemfájdalom és idegentest érzés kíséri. Oropharyngealis tünetek a szájszárazság – a nyálmirigyek csökkent szekréciója miatt, parotis és submandibularis nyálmirigyek duzzadása (betegek 30%-nál), szájnyalkahártya-égés, ízérzésváltozás, lepedékes nyelvfelszín – gombás fertőzés okozza a szervezet védekezőképességének csökkenése miatt. Gyakori az orrszárazság, bronchusok nyálkahártyájának szárazsága, tüdők gyulladása, amit köhögés

kísér, továbbá bőr és vaginális szárazság. Ezeket a tüneteket a glanduláris tünetek közé soroljuk. Az extraglanduláris tünetek közé tartoznak például a gastrointestinalis és hepatobiliaris tünetek. Az oropharynx nyálkahártyájának szárazsága miatt nehező a nyelés, hányinger és epigastriális fájdalom jelenik meg. Jellemző a gastritis, ami a gyomor, főleg a mucosa gyulladása és a hypochlorhydria, a kórosan kevés sósav a gyomorban. A pancreatitis ritka, de a szerv érintettségét jelezheti az emelkedett amiláz jelenléte. Általában az SS kapcsolatban áll májbetegségekkel, ez enyhe hepatomegaliával jár. Veseérintettség csak az SS-s betegek 5%-nál alakul ki interstitialis nephritis, ritkábban glomerulonephritis formában. Jellemző a renalis tubularis acidosis, ami a vese csökkent vizelet savanyító képessége, ekkor a plazmában alacsony a bikarbonát szint, de magas a hidrogén- és kloridion koncentráció. Továbbá jellemző a hypokalaemia, ami kórosan kevés káliumiont jelent a vérben, ez a vese működésének romlását vagy vesekőképződést okozhat. A betegek 5-10%-nál fordul elő a vasculitis, ami a kis és közepes ereket érinti, purpura (bőrbevérzés), urticaria (viszkető kiütés), bőrfekély okozója. Gyakran más autoimmunbetegségekkel együtt fordul elő, például RA, SLE szisztémás sclerosis. Legjellemzőbb a RA-szel való társulás, ez a betegek 60%-nál előfordul. Az arthritis megjelenése myalgia (izomfájdalom), arthralgia (ízületi fájdalom), ízületi merevség formájában jelenik meg. (CZIRJÁK, 2006)

2.3.3 Rheumatoid arthritis

A rheumatoid arthritis a végtagok kis ízületeinek krónikus, hegesedő, deformációjával, majd mozgáskorlátozottsággal járó gyulladásos betegség. Kezelés hiányában az ízületek tönkre mehetnek, tartós rokkantságot okozhat. (CZIRJÁK, 2006) Gyakori betegség, a lakosság 3%-a szenved benne, leginkább 20-50 éves nők, jellemző rá a családi halmozódás. (<http://immunkozpont.hu/>) Kialakulása a genetikai hajlamtól és mikrobáktól függ. Utóbbiak a következők lehetnek: Mycobacterium spp., Proteus spp., Chlamydia spp., herpeszvírusok, parovírus B19, rubeola, HIV-vírus. A betegséget kezdetben levertség, fáradékonyság, étvágytalanság, fogyás jellemzi, majd hónapok elteltével megjelennek az ízületi gyulladások. Legelőször a csuklók, kéz kisízületeinek szimmetrikus arthritise. A beteg kézösszeszorításkor fájdalmat érez. Később a térd ízülete lesz nyomás érzékeny, beduzzad, passzív mozgatáskor fájdalom jelentkezik. Egyik fő tünet a reggeli ízületi merevség (RIM), ami akár órákig is eltarthat. Idő elteltével ízületi deformitás alakul ki. (CZIRJÁK, 2006) A betegek között a rheumatoid csomó 20-30%-nál, míg a valódi több szervet érintő csak 5-10%-nál jelentkezik. A rheumatoid csomók fibroid nekrozist mutató centrummal jelentkező granulómák, legkivül egy limfocita-plazmasejt réteggel. (ERDEI és mtsi., 2012) A RA-s betegeknél előfordul a

rheumatoid vasculitis, ami abban nyilvánul meg, hogy a körömágy barnás fekete lesz és lábszárfehély alakul ki. Gyakori a pleuritis, ritkán rheumatoid csomók jelennek meg a tüdőben tumort vagy tuberkulózist (TBC) utánozva. Neurológiai szövődményként a perifériás idegek károsodhatnak. A betegek 60-70%-nál osteoporosis alakul ki. A RA nem tekinthető teljes mértékben autoimmun betegséggnek, mert a három fázisa közül, csak a központiban van autoimmun folyamat. (CZIRJÁK, 2006) Nem jellemző a specifikus autoantitest sem, csak a rheumatoid faktor (RF) és az utóbbi időben leírt anticiklikus citrullinált peptid (anti-CCP). (CHAKERA és mtsi., 2012) Utóbbi a betegség korai szakaszaiban a betegek 60-70%-ban megtalálható. (CZIRJÁK, 2006)

2.3.4 Szisztémás lupus erythematosus

A Szisztémás lupus erythematosus (SLE) több szervet érintő autoimmunbetegség. 10000 emberből 5-t érint, (<http://immunkozpont.hu/>) leginkább a reprodukív korban (16-40) lévő nőknél fordul elő. A betegségre jellemző az akut és krónikus, visszatérő periódusokból álló gyulladásos állapot. A tünetek nem egységesek, megjelenésük függ nemtől, kortól, szervi lokalizációtól. Kialakulásában szerepet játszik a genetika – családi halmozódást mutat, hormonok – női dominancia, környezeti faktorok, például bizonyos vírusok, ultraibolya sugárzás, stressz, gyógyszerek. A SLE az immunrendszer komplex zavara miatt alakul ki, patomechanizmusának legfontosabb elemei a tolerancia megszűnése, autoantigének kínálatának növekedése, sejtörmelék eltakarító funkció hibája. Autoreaktív T- és B-sejtek jönnek létre, sokszorozódnak, fokozódik az autoantitest termelés. A képződött autoantitestek direkt szervkárosodásokat okoznak. A helyszínen gyulladásos mediátorok szabadulnak fel, gyulladásos kaszkád indul el, ami komplementaktivációból, fibrindepozícióból és további sejtek odavonzásából és aktiválásából áll. Ez a folyamat tartósan fennáll. Specifikus és nem specifikus tünetek alakulnak ki. Utóbbiak a gyengeség, fáradtság, láz, fogyás. Kialakulásuknak több együttes oka lehet, a gyulladások, az autoantitestek direkt hatása, gyógyszer mellékhatások. A speciális tünetek több különböző szervben jelentkeznek. A bőr és nyálkahártya érintettség megjelenése a fényérzékenység, pillangószárny-erythmia, petechia, ami a tühegytől a gombostűfej nagyságúig terjedő kis bevérzett foltokat jelent a bőrön, továbbá bőrfekély, urticaria, teleangiectasia (hajszálértágulat), panniculitis, ami a subcutan zsírszövet gyulladása. Előfordulhat livedo reticularis antifoszfolipid antitestek jelenléte esetén. Ilyenkor fixen, nem csak hideghatásra márvány vagy villámcsapás rajzolat-szerű bőrelváltozás jelentkezik. A nyálkahártya problémák általában fájdalommentesek, csak a

betegség kezdetén jelentkeznek. A betegek 90%-nál jelentkezik nem erozív polyarthrit, esetleg tendinitis (ínhüvelygyulladás), myositis (izomgyulladás), csontelhalás. A SLE-re jellemző a tüdő manifesztáció. Leggyakoribbak a pleuritis (mellhártyagyulladás), az alveolitis (alveolusok gyulladása), haemoptoe (véres köpet). Ezek ventilációs zavart, csökkent vitálkapacitást, diffúziós kapacitást és végül pulmonalis hypertensiot okozhatnak. Szív érintettség esetén a tünetek a pericardiumot, myocardiumot, endocardiumot, ingerületvezető és -képző rendszert, billentyűket és a coronaria ereket is érinthetik. Leggyakrabban pericarditis – a pericardium gyulladása fordul elő. A billentyűk érintettsége leginkább a Libmann-Sacks-féle nonbacterialis verrucosus endocarditis fomájában jelenik meg. A billentyűk kifeléyesedett felszínén fibrinosus rögök jelennek meg. Ez az antifoszfolipid antitestek jelenlétével függ össze. Gyakori jelenségek az antifoszfolipid szindróma (APS) által okozott vascularis tünetek is. Ilyenek az alsó végtagban mélyvénás thrombosis és a thrombocytopenia – csökkent trombocita szám. SLE-s betegeknél az idegrendszer bármelyik része érintett lehet. A betegek 20%-nál fordul elő pszichoorganikus szindróma, ami a kognitív funkciók károsodását, tájékozódási és érzékelési zavart jelent. Mentális és viselkedészavar (psychosis) a betegek 10%-nál, epilepsziás rohamok a 15%-nál fordulnak elő. Megjelenhet cranialis és perifériás vagy akár kevert neuropathia is. A veseérintettség változékony, de a betegek 50%-nál előfordul, és ezek közül terápia nélkül az 5-22%-nál végstádiumú veseelégtelenséghez vezethet. A lupus nephritisnek három főbb klinikai formája van: proteinuria és microhaematuria, nephrosis szindróma (40-60%-nál, a vese tubuláris epitheliumának degenerációját jelenti), progresszív vesebetegség. (CZIRJÁK, 2006)

3. Célkitűzések:

Korábbi tanulmányok szerint a Sjögren-szindrómában szenvedő betegek perifériás vérében jellemző a fokozott follikuláris helper T-sejt megjelenése. Mivel ezek a sejtek fontos szerepet játszanak a B-sejtek aktiválódásában és differenciálódásában, ezért fontos szerepük lehet a patogén autoellenanyagok termelésében, így az autoimmun betegségek kialakulásában. (SZABÓ és mtsi., 2013) Célunk ezért Sjögren-szindrómás perifériás vérben található Tfh sejtek arányát hasonlítani egészséges mintákhoz képest, továbbá a klinikai adatok alapján összehasonlítani a glanuláris és extraglanduláris tünetekkel rendelkező betegek vérének Tfh sejtjeinek arányát és az anti-Ss-A és anti-Ss-B pozitív és negatív betegek vérének Tfh sejtjeinek arányát egymáshoz és az egészséges kontrollokhoz képest. Emellett vizsgáljuk a Szisztémás lupus erythematosus és a Rheumatoid arthritises betegek vérében is a Tfh sejtek arányának változását kontrollhoz és SS-hez képest, mert vannak leírások arról is, hogy ezekben a betegségekben is megnövekedett a Tfh sejtek száma. (MA és mtsi., 2012; LE COZ és mtsi., 2013)

4. Anyag és módszer:

A kutatás során autoimmun betegek és egészséges egyének perifériás vérmintáját vizsgáltuk meg. A mintákat 5 különböző csoportba soroltuk: kontroll, SS-ban, SLE-ben, RA-ban szenvedők és az egyéb kategóriába vegyesen más autoimmunbetegségben szenvedő betegek kerültek. A megvizsgált minták száma 40. Ebből a kontrollok száma 12 db, a SS-ben szenvedő betegek száma 7, RA-esek száma 10 db, SLE-s 4 db és egyéb autoimmun betegségben szenvedők száma pedig 7 db. A SS-es betegeket további csoportokra osztottuk. A glanduláris tünetekkel rendelkező betegek száma 3, az extraglanduláris tünetekkel rendelkezőké 4. Anti-Ss-A és anti-Ss-B pozitív betegek 3 db, negatív pedig 4 db.

		darabszám
kontroll		12
beteg minták		28
	SS	7
	antitest pozitív	3
	antitest negatív	4
	glanduláris tünetek	3
	extraglanduláris tünetek	4
SLE		4
RA		10
egyéb		7
összesen		40

1. táblázat: Minták csoportosítása

A perifériás vérmintákban a follikuláris helper T-sejtek arányát vizsgáltuk. Ezek azonosítására a rájuk jellemző sejtfelszíni molekulákat (CD4, CXCR5, CD278, CD279) használtuk fel, fluoreszcens festékekkel megjelölt ellenanyagok segítségével. (2. táblázat) A korábbi kutatásokban felhasznált follikuláris helper T-sejtek azonosítására alkalmas sejtfelszíni molekulákat alkalmaztuk.. (SZABÓ és mtsi., 2013)

Antitest	Fluoreszcens festék	Optikai csatorna
anti-CD4	PerCP	FL-3
anti-CXCR5	FITC	FL-1
anti-CD278	PE	FL-2
anti-CD279	PE	FL-3

2. táblázat: Sejtfelszíni jelöléshez használt antitestek, hozzájuk kötött fluoreszcens festék és a detektálásra alkalmas optikai csatorna

A megjelölt mintákat áramlási citométerrel (flow cytometer) mértük le, ami képes a sejtek detektálására több tulajdonság alapján, majd az így kapott eredményeket a CellQuest programmal analizáltuk, majd az SPSS statisztikai programmal értékeltük azokat. Normalitás vizsgálat után Kruskal-Wallis, majd Mann-Whitney tesztekkel használtunk, végül boxploton ábrázoltuk az eredményeket.

4.1 Jelölési protokoll

- **Antitestek, minta bemérése**

A minták sejtfelszíni jelölése egy kötött protokoll alapján történt (COLIGAN és mtsi, 2009), függetlenül attól, hogy beteg vagy egészséges mintát jelöltünk. Három FACS kémcsövet használtunk, amit a legelején feliratoztunk. Az első kémcső az autofluorescens kémcső, amibe nem kerül ellenanyag, a második kémcső tartalma anti-CD4-PerCP/anti-CXCR5-FITC/anti-CD278-PE. A harmadik kémcső tartalma anti-CD4-PerCP/anti-CXCR5-FITC/anti-CD279-PE. Először az ellenanyagokat mértük a kémcsőbe. anti-CD4-PerCP-ből 5 μ l-t, anti-CXCR5-FITC-ből 2 μ l-t és anti-CD278-PE, anti-CD279-PE-ből 10-10 μ l-t. Ezután bemértük a vérmintát, 50 μ l-t, ügyelve, hogy a kémcső falára ne kerüljön, mert akkor a falon ragadt vöröscseppekben lévő sejtek nem jelölődnek és a további lépéseknél, mérésnél is problémát okozhatnak.

- **Inkubálás**

A mintákat felvortexeltük, letakartuk, 30 percig, sötétben inkubáltuk, hogy a fluoreszcens festékek ne károsodjanak.

- **Lízálás**

Az inkubálás ideje alatt a FACS lízispuffert tízszeresére hígítottunk, majd a 30 perc lejártá után 1-1 ml-t adtunk a mintákhoz. Ennek a puffernek a célja a vörös vértetek (VVT) szétroncsolása hipotóniás közeg létrehozása révén. Ha a lízis nem megfelelő a VVT-k a citométeres mérés során zavaróak lesznek, az analízis nem lesz pontos.

- **Inkubálás**

A lízispuffer hozzáadása után a mintákat összeráztuk, majd 15 percig inkubáltuk.

- **Mosás**

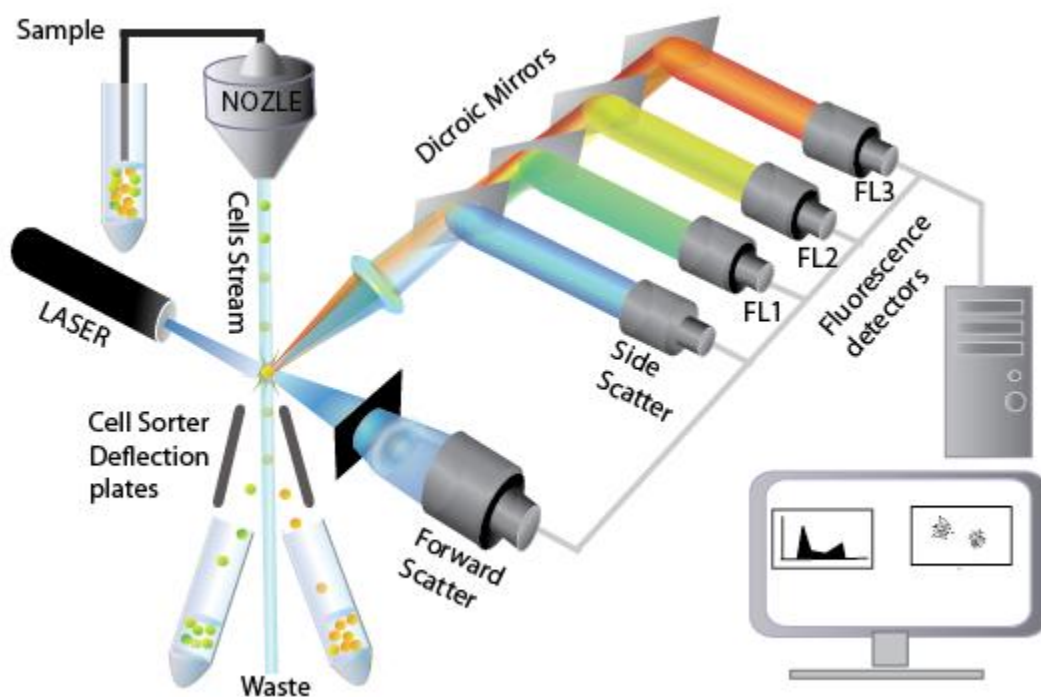
A következő lépés, hogy mintánként 2 ml PBS/BSA/NAN3-t adtunk hozzá, majd 5 percig 1000 rpm-en centrifugáltuk. Célja a szétroncsolt VVT-k, nem kötődött ellenanyagok kimosása. A megjelölt sejtek a centrifugálás során a kémcső aljára kerülnek. Ezt követően a felülúszót leöntöttük, az utolsó cseppeket pipettával leszívtuk.

- **Fixálás**

350 μ l FACSFIX-t adtunk hozzá, ami PBS-t és formaldehidet tartalmaz – az antitestekkel jelölt sejtek fixálásához. A mintákat letakarva, hideg helyen tároltuk a mérés idejéig. (HAY és mtsi., 2002)

4.2 Áramlási citometria

A minták mérése áramlási citométerrel történt, esetünkben 1998-as BD FACS Calibur típusú eszközzel. Ez a multiparaméteres sejtanalízis eszköze, mert alkalmas vegyes sejtpopulációkban az egyes sejtcsoportok elkülönítésre a nagyságuk, granuláltságuk alapján és sejt szinten több hullámhosszon azok fluoreszcens jelének detektálására. A sejtekről szóródó fényt detektáló sejt számláló készülékek (Coulter-számláló) továbbfejlesztésének eredménye. Egyre több kutatás területén elterjedt, például az alapkutatásokban és a klinikumban is. Előnyei, hogy egy adott sejtpopuláció többtulajdonsága is vizsgálható egyidejűleg, perceként akár 10000 sejtről is nyerhető információ, fixált mintákat és élő sejtet is használhatunk és lehetséges a heterogén sejtpopulációk vizsgálata is. Az áramlási citométer felépítése: (4. ábra) a mintacsőből a sejtek az áramlási rendszerbe kerülnek (lineáris sejtáram), amin keresztül jutnak a mérőcellába (kapilláris), hol megvilágítja őket a lézer. A szóródó fényeket a dikroikus tükrök és optikai szűrők segítségével a detektorok konvertálják analógból digitális jelekké, amik a számítógépbe jutnak. A feleslegessé vált minták a hulladéktartályba folynak. (GIVAN, 2001)



4. ábra: Citométer felépítése

(<http://utbiorad.casaccia.enea.it/facs-flow-cytometry.html>)

A citométer pontos működése, hogy a vizsgálandó sejtek szuszpenzióját egy zárt, kettős keringési rendszerben a mintát koncentrikusan körbefogó köpenyfolyadékkal egy mérőcella szűk nyílása koncentrálja. Az áramlás sebességét a nyomáskülönbség változtatásával állíthatjuk. A nyílás átmérője és a hidrodinamikai fókuszálás biztosítja, hogy a sejtek közepén, egyesével áramoljanak. (SHAPIRO, 2003) A kapillárisban a sejteket lézerek világítják meg, a sejtek a lézerfényt elnyelik és szórják, aminek eredményeként három féle jel keletkezik, előre irányuló fényszórás, oldalirányú fényszórás, fluoreszcencia. Az előre irányuló fényszórás (forward scatter-FSC) úgy jön létre, hogy a lézernyaláb a köpenyfolyadék és a sejt határán, az eltérő optikai sajátosságok miatt megtörik és szóródik. Ezt a szóródó fényt a lézerrel egy irányba álló fotódióda érzékeli. A jel erőssége arányos a sejt méretével és alakjával. Az oldalirányú fényszórás (side scatter-SSC) a sejtbe bejutó, sejtalkotókon megtörő, majd a sejtet elhagyó és ismét megtörő lézernyaláb hozza létre. A fotondetektor a lézerrel merőlegesen áll. A jel arányos a sejtek granuláltságával, összetételével, optikai sűrűségével. A fluoreszcens jel (FL) kialakulásának elve, hogy a sejthez kötődő fluoreszcens ellenanyag a lézerfény hatásra gerjesztődik és egy magasabb hullámhosszú, fluoreszcens fényt bocsát ki. (3. táblázat) Ezt a fotoelektron-sokszorozók érzékelik, amik merőlegesen állnak a lézerrel. Citométer fajtájától függően 3-9 különböző hullámhosszú fluoreszcens fény is detektálható egyidejűleg külön optikai csatornában (FL-1, FL-2, FL-3, stb.). Az optikai csatornák szétválasztása dikroikus tükrök és a csatornák előtt elhelyezett emissziós optikai szűrők segítségével történik. A keletkezett jel a sejtek fluoreszcenciájának intenzitásával arányos. Ezután a sejtekről érkező fotonok számával arányos analóg elektromos jeleket erősíti, digitalizálja, majd a számítógép feldolgozza és tárolja. (ERDEI, 2006; BERKI és mtsi., 2005)

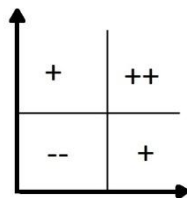
festék	jelzett molekula	lézer	gerjesztési hullámhossz (nm)	emissziós hullámhossz (nm)	optikai csatorna
Fluoreszcein-izotiocianát (FITC)	fehérje	Ar-ion	488	525	FL-1
Phycoerythrin (PE)	fehérje	Ar-ion	488	575	FL-2
PerCP	fehérje	Ar-ion	488	680	FL-3

3. táblázat: A mérés során használt festékek és lézerek (ERDEI és mtsi., 2012; BERKI és mtsi., 2005)

4.3 Minták analízise

A számítógépben tárolt adatok megjelenítésének több módja van. Az egy paraméteres gyakorisági hisztogram, az izometrikus és a kétparaméteres adatmegjelenítés. Az egyparaméteres gyakorisági hisztogram esetében a vízszintes tengelyen a sejt valamelyik tulajdonságára utaló jelet (FSC, SSC, FL-1, stb.) állítjuk be, míg a függőlegesen a tulajdonsággal rendelkező sejtek számát. Így egy eloszlási hisztogram alakul ki. Az izometrikus adatmegjelenítéskor a program a két paraméteres ábrázolást háromdimenziósra terjeszti ki és úgy jeleníti meg. A két paraméteres adatmegjelenítés során dot-ploton ábrázoljuk a sejteket, úgy, hogy két tetszőleges tulajdonságot állítunk be a vízszintes és függőleges tengelyen egymás függvényében. Minden sejt, mint egy pont (dot) a diagramon a jel nagyságának megfelelően ábrázolódik. A mintáink analízise során mi a két paraméteres ábrázolást használtuk. Az analízis során szükség van bizonyos sejtek kizárására, ha csak bizonyos alpopulációkra vagyunk kíváncsiak. Ezt a kapuzás (gating) funkcióval érhetjük el. A kapuzás lehet negatív vagy pozitív, a mi esetünkben a pozitív kapuzásra volt szükség. A sejt mintákból készített két paraméteres dot-plot diagramon (tengelyek: FSC, SSC) kapuval kijelölve a limfociták populációját a továbbiakban már csak ezeket a sejteket vizsgálja a program. A sejtek analízise során fenotípusmarkerek szerint osztályozzuk őket, aminek módszere a kvadránsanalízis. A két paraméteres fluoreszcencia megjelenítésekor kijelöljük a negatív és pozitív határokat a két tengelyen. Így a dot-plot mező négy részre osztódik, ezeket

kvadránsoknak nevezzük. Kialakul egy darab dupla negatív, egy darab dupla pozitív és két darab egyszeresen pozitív kvadráns. (5. ábra)

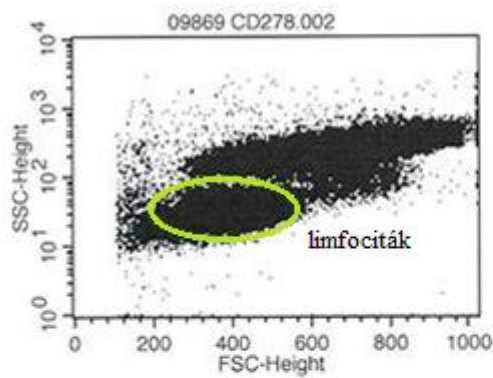


5. ábra: Dot-plot diagram kvadránsanalízise

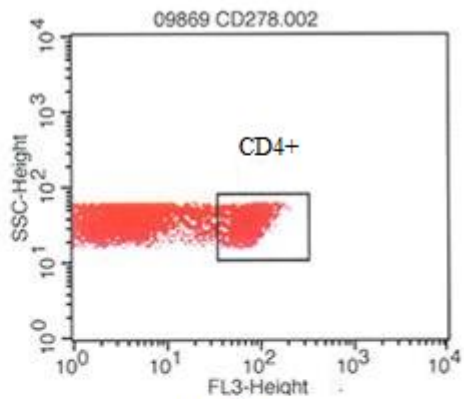
A kétszeresen pozitív kvadránsba azok sejtek esnek, amelyekre mindkét fluoreszcencia jellemző, az egyszeresen pozitívba, amelyekre csak az egyik, a kétszeresen negatívba meg azok a sejtek kerülnek, amelyekre egyik tulajdonság sem jellemző. Így megkapjuk az egyes kvadránsokba található sejtek arányát, az alapján, hogy a diagramon szereplő összes sejt a 100%. Lényeges, hogy az antigének jelölése olyan fluoreszcens festékkel konjugált ellenanyaggal történjen, amelyek elkülönülnek egymástól, tehát az emissziós spektrumuk ne fedjen át. Az átfedést kompenzációs eljárással meg lehet oldani, úgy, hogy a két optikai csatorna jeleinek átfedését elektronikusan egyenlítjük ki a két csatorna erősítési arányait szabályozva. Ehhez egyszeresen jelölt mintákra van szükség a beállításkor. (ERDEI 2006)

Az analízishez a CellQuest nevű programot használtuk. A minták megjelenítése két paraméteres dot-ploton történt. Először a függőleges tengelyen az oldalirányú szóródást (tehát a sejtek granuláltságát), vízszintes tengelyen az előre irányuló szóródást (a sejtek méretét) állítottuk be. Ezen a diagramon megjelentek a perifériás vérben elkülönülő sejtpopulációk, a granulociták, a monociták és a limfociták. Itt a limfocita populációra kapuztunk, helyzetüket korábbi tanulmányok alapján tudtuk meghatározni. (6.1 ábra) A következő diagramon a függőleges tengely maradt az SSC, a vízszintes tengelyre az FL-3-t állítottuk be, ami a CD4 pozitív sejteket jelöli. El is különült egy populáció, amire szintén kaput helyeztünk. (6.2 ábra) A továbbiakban már csak ezeket a sejteket vizsgáltjuk, tehát a CD4 pozitív limfocitákat, amelyek a helper T-sejtek. További négy diagramot készítettünk. Ezek közül az elsőn FL-1 a függőleges tengely, a vízszintes FL-2, tehát a CXCR5/CD4 kettős pozitív sejtek számára voltunk kíváncsiak, ezek a centrális memória sejtek. (6.3 ábra) A harmadik diagramon ugyanezt ábrázoltuk csak a másik kémcső tartalmával, de az eredmény ugyanaz, hiszen a anti-CD4-PerCP és anti-CXCR5-FITC megegyezik mindkét kémcsőben. (6.5 ábra) A második és

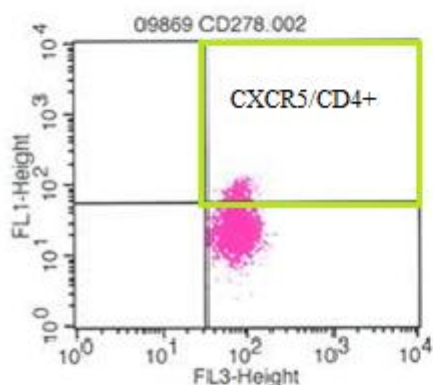
negyedik kémcső beállításai, hogy a függőleges tengelyen FL-1, a vízszintesen FL-2. Az FL-1 mindkét esetben anti-CXCR5-FITC jelölést jelent, viszont az FL-2 a második diagramon anti-CD278-PE (6.4 ábra), a negyediken anti-CD279-PE (6.6 ábra) jelölést jelent. A második diagramon megkapjuk a CXCR5/ICOS/CD4 pozitív (6.4 ábra), a negyediken a CXCR5/PD-1/CD4 pozitív sejteket (6.6 ábra). Ezek a sejtek a follikuláris helper T-sejtek. A kvadránsanalízis során ügyelni kellett a különböző minták kvadránsainak egységes beállítására.



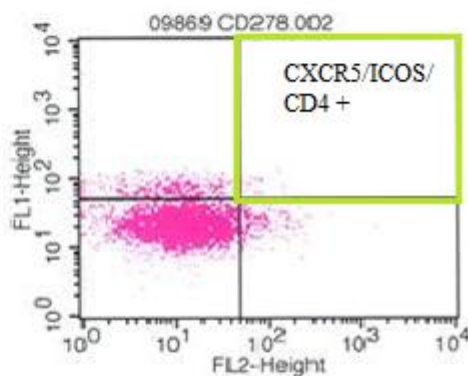
6.1 ábra



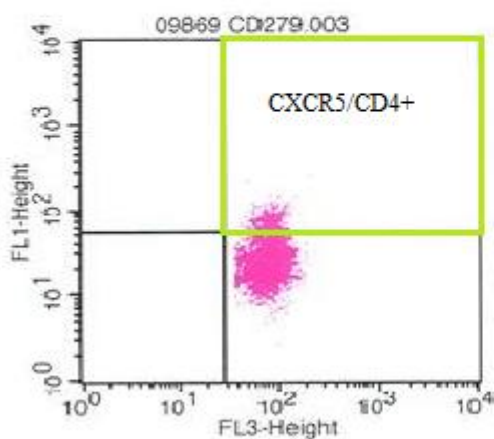
6.2 ábra



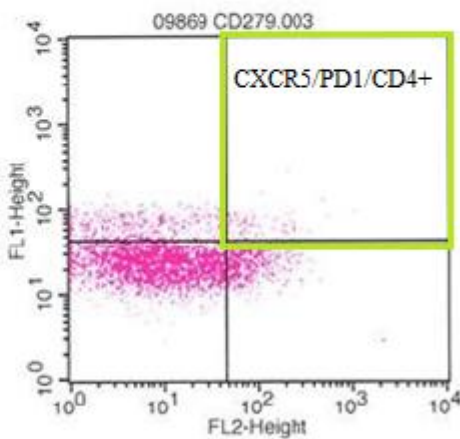
6.3 ábra



6.4 ábra



6.5 ábra



6.6 ábra

6. ábra: CellQuest program analízis

A CellQuest program megadja a négy kvadránsban található sejtek százalékos arányát a lemerített 10000 sejtben belül. Az így kapott számokat táblázatokban rögzítettük. Ezután már lehetséges az adatok statisztikai értékelése.

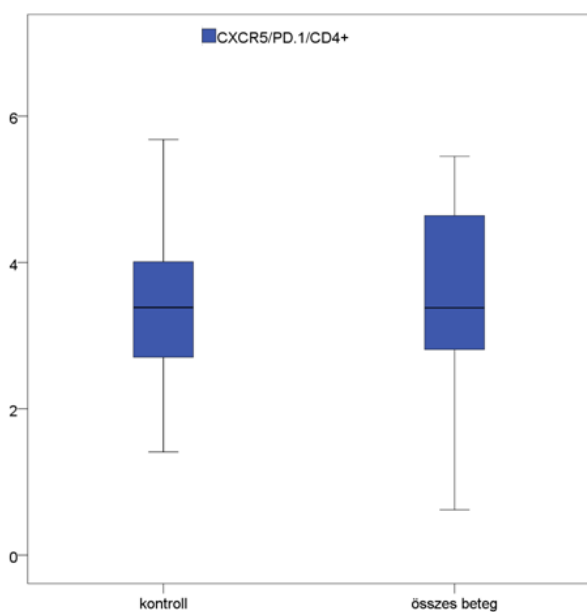
4.4 Statisztikai elemzés

A továbbiakban statisztikai elemzéseket végeztünk az SPSS programmal. Első lépésként normalitás vizsgálatot végzünk. A program ebben az esetben az adatok eloszlását vizsgálja, ami szükséges információ ahhoz, hogy a további statisztikai eljárások közül a megfelelőt ki tudjuk választani. (HAJTMAN, 2012) Normál eloszlás esetén $p < 0,05$; nem normál eloszlás esetén $p > 0,05$. Ha a normalitás vizsgálat után nem normál eloszlást kaptunk, akkor Kruskal-Wallis tesztet végzünk. Ez a több független mintás teszt, ami rendezett mintán alapul, nullhipotézise, hogy minden minta azonos eloszlású alapsokaságból származik. Ezután az adatsorokat párosával vizsgáljuk, amihez Mann-Whitney tesztet használunk. Ez a két független mintás teszt. A nullhipotézis, hogy a két sokaság ugyanabba az eloszlásba tartozik. Mindkét teszt esetén szignifikánsnak tekintjük az eredményeket, ha $p < 0,05$. (HUZSVAI és mtsi., 2012) Végül boxploton ábrázoluk az eredményeket.

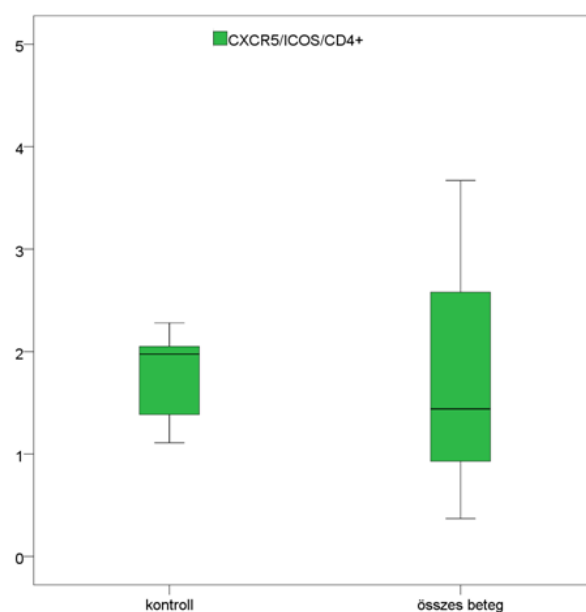
5.Eredmények

A normalitás vizsgálat során nem normál eloszlást tapasztaltunk, ezért a továbbiakban nem paraméteres teszteket használtunk. Első lépésben a kontrollt hasonlítottuk az összes beteghez Mann-Whitney tesztel. Szignifikáns különbséget nem kaptunk (CXCR5/PD-1/CD4+ $p=0,774$; CXCR5/ICOS/CD4+ $p=0,510$), de tovább vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a CXCR5/ICOS/CD4+ sejtek nem voltak magasabb számban a betegeknél (átlag – kontroll: 22,92; összes beteg: 20,21) (7.2 ábra), a CXCR5/PD-1/CD4+ sejtek viszont igen (átlag – kontroll: 20,17; összes beteg: 21,34) (7.1 ábra).

Kontroll és összes beteg perifériás vérmintáinak Tfh sejteinek arányának összehasonlítása



7.1 ábra

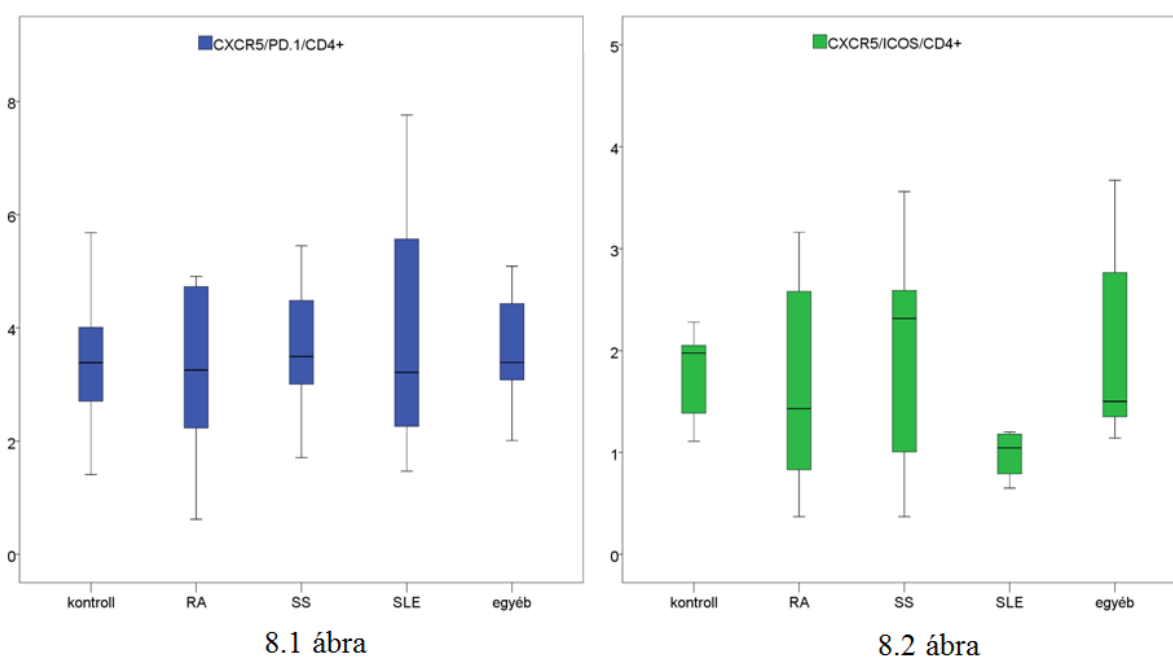


7.2 ábra

7. ábra: Kontroll és összes beteg perifériás vérmintáinak Tfh sejteinek arányának összehasonlítása

A következő lépésben Kruskal-Wallis tesztet vizsgáltuk a kontroll, SS, RA, SLE, egyéb betegek adatait. Itt sem szignifikáns (CXCR5/PD-1/CD4+ $p=0,985$; CXCR5/ICOS/CD4+ $p=0,251$), viszont a boxploton látható a különbség. A Tfh sejtek aránya a legnagyobb mértékben a SS-nál emelkedett. (8. ábra) CXCR5/PD-1/CD4+ sejteknél az átlag 22,56, a CXCR5/ICOS/CD4+ sejteknél pedig 24,13.

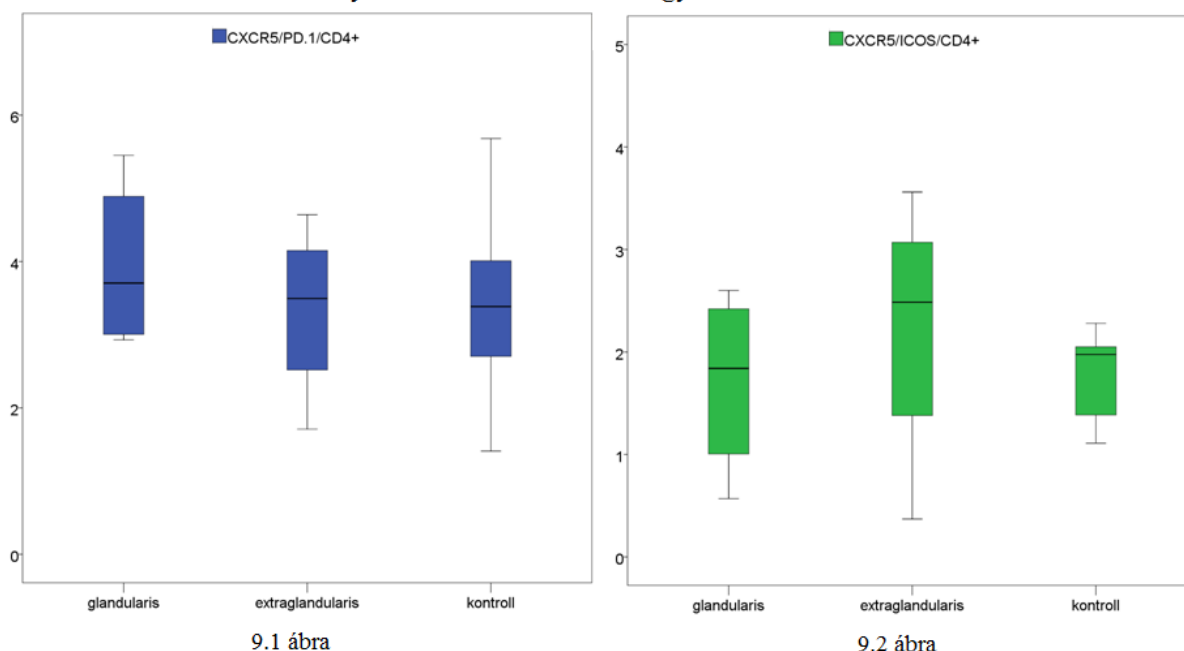
Kontroll, RA, SS, SLE és egyéb perifériás vérminták Tfh sejteinek arányának összehasonlítása



8. ábra: Kontroll, RA, SS, SLE és egyéb perifériás vérminták Tfh sejteinek arányának összehasonlítása

A SS-s adatokat tovább bontottuk glanduláris és extraglanduláris csoportokra és ezeket egymáshoz és kontrollhoz hasonlítottuk Kruskal-Wallis teszt segítségével. Azt tapasztaltuk, hogy a glanduláris és extraglanduláris mintákban a Tfh arány magasabb volt, az egészséges mintákhoz képest, különösen az extraglandulárisnál a CXCR5/ICOS/CD4+ sejt mintákban. (9. ábra) A CXCR5/PD-1/CD4+ sejtek esetén az átlag – glanduláris: 12,00; extraglanduláris: 10,75; kontroll: 9,92. A CXCR5/ICOS/CD4+ sejteknél: glanduláris: 10,00; extraglanduláris: 13,5; kontroll: 9,67. A különbségek egyik esetben sem szignifikánsak. Előbbinél $p=0,827$, utóbbinál $p=0,523$.

Glanduláris, extraglanduláris tünetekkel rendelkező SS-s perifériás vérminták Tfh sejtjeinek arányának összehasonlítása egymással és kontrollal

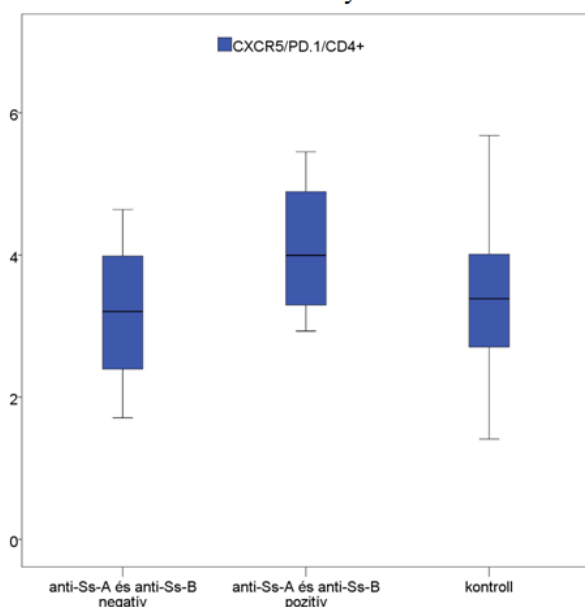


9. ábra: Glanduláris, extraglanduláris tünetekkel rendelkező SS-s perifériás vérminták Tfh sejtjeinek arányának összehasonlítása egymással és kontrollal

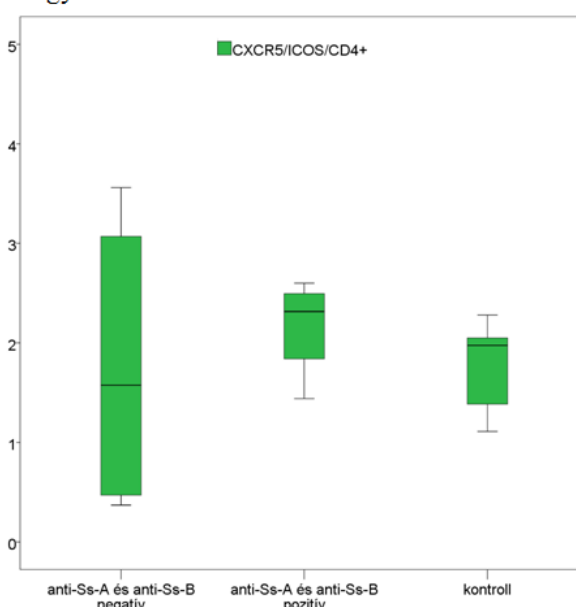
A Kruskal-Wallis teszt után Mann-Whitney teszt segítségével kettesével is összehasonlítottuk a glanduláris-extraglanduláris, glanduláris-kontroll, extraglanduláris-kontroll csoportokat. Így is arra az eredményre jutottunk, hogy az extraglanduláris mintákban emelkedett a legnagyobb mértékben a Tfh sejtek aránya. A glanduláris és a kontroll között viszont nem találtuk azt a különbséget, mint az előbbi tesztben. A különbségek itt sem szignifikánsak.

További csoportosítás a SS-s adatoknál az anti-Ss-A vagy anti-Ss-B antitesttel rendelkező betegektől származó adatok és az antitesttel nem rendelkező betegek kettébontása. Ezt a két csoportot hasonlítottuk össze egymással és a kontrollokkal Kruskal-Wallis teszttel. Azoknál a betegeknél, ahol jelen volt az anti-Ss-A vagy anti-Ss-B antitest, ott növekedett az Tfh arány a kontrollhoz képest, viszont az antitesteket nem tartalmazó mintáknál ezt nem tapasztaltuk, ahogy ez a 10. ábrán nagyon jól látható. A CXCR5/PD-1/CD4⁺ sejtek esetén az átlag – antitest negatív: 9,5; antitest pozitív: 13,25; kontroll: 9,92. A CXCR5/ICOS/CD4⁺ sejteknél: antitest negatív: 10,00; antitest pozitív: 13,5; kontroll: 9,67. A különbségek nem szignifikánsak. Első esetben a $p=0,578$, a második esetben $p=0,523$.

Anti-Ss-A és anti-Ss-B negatív és pozitív SS-s betegek vérmintáinak Tfh sejteinek arányának összehasonlítása egymással és kontrollal



10.1 ábra



10.2 ábra

10. ábra Anti-Ss-A és anti-Ss-B negatív és pozitív SS-s betegek vérmintáinak Tfh sejteinek arányának összehasonlítása egymással és kontrollal

A Kruskal-Wallis teszt után kettesével Mann-Whitney teszttel hasonlítottuk őket össze. Az eredmények a fentiekkel megegyeznek. Az antitest negatív minták Tfh sejteinek aránya és a kontroll között nem találtunk számottevő különbséget. Az antitest pozitívakat a kontrollhoz hasonlítva viszont jelentős emelkedést tapasztaltunk. A pozitívakat a negatívakhoz hasonlítva azt láttuk, hogy az antitest pozitívak emelkedettek.

6. Eredmények megbeszélése

A kísérlet során leginkább a várt eredményeket kaptuk. Összehasonlítottuk az egészséges perifériás vérmintákban lévő Tfh sejtek arányát szisztémás autoimmun betegségekben (SS, RA, SLE, egyéb) szenvedő betegek mintáival. A CXCR5/ICOS/CD4+ sejtek nem voltak magasabb számban a betegeknél, ellenben a CXCR5/PD-1/CD4+ sejtek esetében emelkedést találtunk. A megnövekedett sejtszám érthető lenne autoimmun betegségek esetén, hiszen a Tfh sejtek segítik a B sejtek aktiválódását, proliferációját, autoantitestek termelését, így a fokozott autoimmunitást. (LI és mtsi., 2013)

Tovább osztottuk betegeket (SS, RA, SLE, egyéb), vizsgálva őket a kontrollhoz és egymáshoz képest. Fő célunk a SS-s minták Tfh sejteinek arányának vizsgálata volt a kontrollhoz képest, mivel korábbi tanulmányokban leírták a sejtek arányának emelkedését. (SZABÓ és mtsi., 2013) Ezt mi is tapasztaltuk. Az összes betegség közül a SS-s mintákban emelkedett leginkább a Tfh sejtek aránya a kontrollhoz képest. Ezt a CXCR5/PD-1/CD4+ és CXCR5/ICOS/CD4+ sejtek esetén is tapasztaltuk. A többi betegség mintáival amiatt végeztük el a kísérletet, mert találhatók leírások arról is, hogy esetükben is emelkedett a Tfh sejtek aránya. A RA esetén találhatók cikkek Tfh sejtek arányának növekedéséről (MA és mtsi., 2012), és arról is, hogy ezt nem tapasztalták (CHAKERA és mtsi., 2012). Mi az utóbbit tudjuk alátámasztani, mert sem a CXCR5/PD-1/CD4+ és sem a CXCR5/ICOS/CD4+ sejtek esetén sem tapasztaltunk emelkedést az egészséges vérmintákhoz képest. Korábban SLE-s vérmintákban is találtak Tfh sejt arány emelkedést (LE COZ és mtsi., 2013), azonban ezt mi nem tapasztaltuk, sem a CXCR5/PD-1/CD4+, sem a CXCR5/ICOS/CD4+ sejtek esetén.

A SS-s betegeket a klinikai szempontok szerinti vizsgálathoz további csoportokba osztottuk a tünetek és az autoantitest pozitivitás alapján, mivel előttünk vizsgálták már ezeket a csoportokat egymáshoz és a kontrollhoz képest. (SZABÓ és mtsi., 2013) A korábbi eredményekkel megegyező eredményeket kaptunk, a glanduláris és az extraglanduláris csoportban emelkedett a Tfh sejtek aránya a kontrollhoz képest, kifejezetten az extraglanduláris csoportba tartozó betegek mintáiban. Ennek oka az lehet, hogy az extraglanduláris tünetek az általános tünetek mellett már egyéb szervi érintettséget is jelentenek (CZIRJÁK, 2006), az autoimmunitás nagyobb mértékben okoz károkat a szervezetben, így előfordulhat, hogy a Tfh sejtek is nagyobb számban fordulnak elő a perifériás vérben.

Az anti-Ss-A vagy anti-Ss-B antitesttel rendelkező betegektől származó adatok és az antitesttel nem rendelkező betegek adatainak összehasonlítása egymással és kontroll

csoporttal. Azoknál a betegeknél, ahol nem volt jelen az anti-Ss-A vagy anti-Ss-B antitest nem tapasztaltunk Tfh arány növekedést a kontrollhoz képest, viszont az antitesteket tartalmazó mintáknál Tfh arány növekedést figyeltünk meg. Az anti-Ss-A és anti-Ss-B antitest a SS jellegzetes antitestjei (CZIRJÁK, 2006), így a várt emelkedést tapasztaltuk a pozitív betegeknél. Azonban mivel az antitest negatív betegek is SS-ban szenvednek, ezért ott is emelkedést vártunk volna.

Több esetben is eltérést tapasztaltunk a CXCR5/PD-1/CD4 pozitív és a CXCR5/PD-1/CD4 pozitív sejtek eredményei között. Ennek oka az lehet, hogy nem ugyanolyan mértékben specifikus a Tfh sejtekre a PD-1 és ICOS marker. Valószínűleg az ICOS a specifikusabb. Arra a következtetésre jutottunk, hogy a legcélszerűbb, ha a továbbiakban PD-1/ICOS kettős pozitív jelölést alkalmazni.

Az analízis során kapott eredmények valószínűsíthetően az alacsony mintaszámok miatt nem szignifikánsak. A különbségekben talált tendenciák megerősítésére további minták analízisét tervezzük.

Amennyiben a további vizsgálatok is ezeket az eredményeket mutatják, bebizonyosodik a Tfh sejtek kapcsolata az autoimmun betegségek kialakulásával, így a perifériás vérmintában megemelkedett arányuk előre jelezheti az autoimmun folyamatok beindulását a betegségek korai szakaszában.

7. Összefoglalás:

A szervezet immuntoleranciájának megszűnése autoimmun betegségek kialakulásához vezet, mint például Sjögren szindróma (SS), Szisztémás lupus erythematosus (SLE), Rheumatoid arthritis (RA). A SS a külső elválasztású mirigyeket érintő gyulladásos betegség, jellemző antitestje az anti-Ss-A és anti-Ss-B. A betegek csoportosíthatók glanduláris és extraglanduláris tünetek alapján. Korábbi tanulmányoknál leírták, hogy a follikuláris helper T-sejtek (Tfh) száma megemelkedett az SS-es perifériás vérben. Célunk Sjögren-szindrómás perifériás vérben található Tfh sejtek arányát hasonlítani egészséges mintákhoz képest, továbbá a klinikai adatok alapján további összehasonlításokat végezni.

A mintákat csoportokba soroltuk: kontroll, SS, SLE, RA és egyéb, majd a Tfhra jellemző sejtfelszíni molekulák felhasználásával, fluoreszcens festékekkel megjelölt ellenanyagok (anti-CD4-PerCP, anti-CXCR5-FITC, anti-CD278-PE, anti-CD279-PE) segítségével vizsgáltuk a perifériás vérmintákban a Tfh sejtek arányát. A megjelölt mintákat áramlási citométerrel mértük le, a kapott eredményeket a CellQuest programmal analizáltuk. A továbbiakban statisztikai elemzéseket végeztünk az SPSS programmal. Normalitás vizsgálat után Kruskal-Wallis, majd Mann-Whitney tesztekkel értékeltük az adatokat, végül boxploton ábrázoluk az eredményeket.

A beteg mintákban a kontrollhoz hasonlítva emelkedett Tfh arányt tapasztaltunk, különösen az SS-s mintákban. A SS-s adatokat további csoportokra bontva, azt tapasztaltuk, hogy a glanduláris és extraglanduláris mintákban a Tfh arány magasabb volt, az egészséges mintákhoz képest, különösen az extraglandulárisnál. Azoknál a betegeknél, ahol jelen volt az anti-Ss-A vagy anti-Ss-B antitest, ott növekedett az Tfh arány a kontrollhoz képest, viszont az antitesteket nem tartalmazó mintáknál ezt nem tapasztaltuk.

Bár az eredmények nem szignifikánsak, az eltérések tendenciája alapján feltételezhető, hogy a Tfh sejtek a B-sejtek aktiválása és antitest termelésük fokozása révén fontos szerepet játszanak a szisztémás autoimmun betegségek pathomechanizmusában, SS esetén az extraglanduláris tünetek kialakulásához és az autoantitestek megjelenéséhez is hozzájárulhat.

8. Irodalmi hivatkozások

- ABUL ABBAS, ANDREW H. LICHTMAN, SHIV PILLAI (2011): Cellular and molecular Immunology. Saunders, USA.
- ALICE LONGOBARDI GIVAN (2001): Flow Cytometry: First Principles. Wiley-Liss, New York.
- AMANDA C. POHOLEK, JOE CRAFT (2009): Competing For Help: New Insights into the Function of Follicular Helper T Cells. *Immunology and cell biology*, **87(6)**: 438-439.
- ARON CHAKERA, SPOHIA C. BENNETT, OLIVER MORTEAU, PAUL BOWNESS, RAASHID A. LUQMANI, RICHARD J. CORNALL (2012): The Phenotype of Circulating Follicular-Helper T Cells in Patients with Rheumatoid Arthritis Defines CD200 as a Potential Therapeutic Target. *Clinical and Developmental Immunology*, 948218.
- BERKI T., BOLDIZSÁR F., ENGELMANN P., NÉMETH P., PÁLINKÁS L. (2005): Immunológiai technikák a klinikai kutatásban és diagnosztikában. Peproflex Kiadó és Nyomda Kft., Pécs, pp: 53-55.
- CAMILLE LAURENT, NICOLAS FAZILLEAU, PIERRE BROUSSET (2010): A novel subset of T-helper cells: follicular T-helper cells and their markers. *Haematologica*, **95(3)**: 356-358.
- CINDY S. MA, DANIELLE T. AVERY, ANNA CHAN, MARCEL BATTEN, JACINTA BUSTAMANTE, STEPHANIE BOISSON-DUPUIS, PETER D. ARKWRIGHT, ALEXANDRA Y. KREINS, DIANA AVERBUCH, DAN ENGELHARD, KLAUS MAGDORF, SARA S. KILIC, YOSHIYUKI MINEGISHI, SHIGEAKI NONOYAMA, MARTYN A. FRENCH, SHARON CHOO, JOANNE M. SMART, JANE PEAKE, MELANIE WONG, PAUL GRAY, MATTHEW C. COOK, DAVID A. FULCHER, JEAN-LAURENT CASANOVA, ELISSA K. DEENICK, STUART G. TANGYE (2012): Functional STAT3 deficiency compromises the generation of human T follicular helper cells. *Blood*, **119(17)**: 3997-4008.
- CHEVALIER N., JARROSSAY D., HO E., AVERY DT., MA CS., YU D., SALLUSTO F., TANGYE SG., MACKAY CR. (2011): CXCR5 expressing human central memory CD4 T cells and

- their relevance for humoral immune responses. *Jurnal of Immunology*, **186(10)**: 5556-68.
- CZIRJÁK L. (2006): Klinikai immunológia. Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, pp: 139-156, 191-211, 215-224.
- DANELLE ETO, CHRISTOPHER LAO, DANIEL SÍTORO, BURTON BARNETT, TANIA C. ESCOBAR, ROBIN KAGEYAMA, ISHARAT YUSUF, SHANE CROTTY (2011): IL-21 and IL-6 Are Critical for Different Aspects of B Cell Immunity and Redundantly Induce Optimal Follicular Helper CD4 T Cell (Tfh) Differentiation. *Plos one*, **6(3)**: e17739.
- ELISSA K. DEENICK, CINDY S. MA (2011): The regulation and role of T follicular helper cells in immunity. *Immunology*, **134(4)**: 361-367.
- ERDEI A. (2006): Immunológiai módszerek. Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, pp: 206-226.
- ERDEI A., SÁRMAY G., PRECHL J. (2012): Immunológia. Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest.
- FRANK C. HAY, OLWYN M. R. WESTWOOD (2002): Practical Immunology. Blackwell Science, Oxford.
- GERGELY J., ERDEI A. RAJNAVÖLGYI É., LÁSZLÓ G., SÁRMAY G. (2006): Immunbiológia. Medicina Könyvkiadó Rt., Budapest.
- HAJTMAN BÉLA (2012): Bevezetés a biostatistikába nem csak orvosoknak. Edge 2000 Kiadó, Budapest, pp: 19-20.
- HOWARD M. SHAPIRO (2003): Practical Flow Cytometry. John Wiley & Sons, New Jersey.
- HUZSVAI LÁSZLÓ, VINCZE SZILVIA (2012): SPSS-könyv. Seneca Books.
- JASON S. WEINSTEIN, SAIRY G. HERNANDEZ, JOE CRAFT (2012): T Cells That Promote B-Cell Maturation in Systemic Autoimmunity. *Immunological Reviews*, **247(1)**: 160-171.

- JIE MA, CHENLU ZHU, BIN MA, JIE TIAN, SAMUEL ESSIEN BAIDOO, CHAOMING MAO, WEI WU, JIANGUO CHEN, JIA TONG, MIN YANG, ZHIJUN JIAO, HAUXI XU (2012): Increased Frequency of Circulating Follicular Helper T Cells in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Clinical and Developmental Immunology*, 827480.
- JOHN E. COLIGAN, STEFANIE N. VOGEL (2009): Current Protocols in Immunology. John Wiley & Sons.
- JOSEPH E. CRAFT (2012): Follicular helper T cells in immunity and systemic autoimmunity. *Nature Reviews Rheumatology*, **8(6)**: 337-347.
- JULIUS CRUSE, ROBERT LEWIS, HUAN WANG (2004): Immunology Guidbook. Academic press, pp: 339-392.
- LE COZ C., JOUBLIN A., PASQUALI JL., KORGANOW AS., DUMORTIER H., MONNEAUX F. (2013): Circulating TFH subset distribution is strongly affected in lupus patients with an active disease. *Plos one*, **8(9)**: e75319.
- MARK A. KROENKE, DANIELLE ETO, MICHELA LOCCI, MICHAEL CHO, TERENCE DAVIDSON, ELIAS HADDAD, SHANE CROTTY (2012): Bcl6 and Maf cooperate to instruct human follicular helper CD4 T cell (Tfh) differentiation. *Journal of Immunology*, **188(8)**: 3734-3744.
- NAMRATA SINGH, PHILIP L. COHEN (2012): The T cell in Sjogren's syndrome: Force majeure, not spectateur. *Journal of autoimmunity*, **39(3)**: 229-233.
- QIUJU LI, ZHENFENG LIU, ERLE DANG, LIANG JIN, ZHENG HE, LUTING YANG, XIAOWEI SHI, GANG WANG (2013): Follicular Helper T Cells (Tfh) and IL-21 Involvement in the Pathogenesis of Bullous Pemphigoid. *Plos one*, **8(7)**: e68145.
- RIMPEI MORITA, NATHALIE SCHMITT, SALAH-EDDINE BENTEBIBEL, RAJARAM RANGANATHAN, LAURE BOURDERY, GERARD ZURAWSKI, EMILE FOUCAT, MELISSA DULLAERS, SANGKON OH, NATALIE SABZGHABAEI, ELIZABETH M. LAVECCHIO, MARILYNN

- PUNARO, VIRGINIA PASCUAL, JASQUES BANCHEREAU, HIDEKI UENO (2011): Human Blood CXCR5+CD4+ T Cells Are Counterparts of T Follicular Cells and Contain Specific Subsets that Differentially Support Antibody Secretion. *Immunity*, **34(1)**: 108-121.
- RISHI VICÓSHAL LUCKHEERAM, RUI ZHOU, ASHA DEVI VERMA, BING XIA (2012): CD4+ T Cells: Differentiation and Functions. *Clinical and Developmental Immunology*, 925135.
- ROLF J., FAIRFAX K., TURNER M. (2010): Signaling pathways in T follicular helper cells. *Journal of Immunology*, **184(12)**: 6563-8.
- ROSANNE SPOLSKI, WARREN J. LEONARD (2009): IL-21 and T follicular helper cells. *International Immunology*, **22(1)**: 7-12.
- SHANE CROTTY (2010): Follicular Helper CD4 T Cells (TFH). *Annual Review of Immunology*, **29**: 621-663.
- SZABÓ K., PAPP G., BARÁTH G., GYIMESI E., SZÁNTÓ A., ZEHER M. (2013): Follicular helper T cells may play an important role in the severity of primary Sjögren's syndrome. *Clinical Immunology*, **147**: 95-104.
- XIN ZHANG, SHARON ING, AUSTIN FRASER, MINZI CHEN, OMAR KHAN, JERALD ZAKEM, WILLIAM DAVIS, ROBERT QUINET (2013): Follicular helper T cells: new insights into mechanisms of autoimmune diseases. *The Ochsner Journal*, **13(1)**: 131-139.

weboldalak:

<http://utbiorad.casaccia.enea.it/facs-flow-cytometry.html>

<http://studentreader.com/t-cell-receptor/>

<http://immunkozpont.hu/>

9. Köszönetnyilvánítás:

Ezúton szeretném megköszönni a PTE KK Immunológiai és Biotechnológiai Intézetnek a lehetőséget, összes dolgozójának a rengeteg segítséget. Külön szeretném megköszönni témavezetőmnek Dr. Simon Diánának és Dr. Berki Tímeának az útmutatást és segítséget a tudományos munkámban.

10. Függelék

10.1 Tételes szerzői hozzájárulás

Tételes szerzői hozzájárulás

Alulírott KOVÁCS ANTONIETTA..... a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül a

- sejtek jelölése – protokoll begyakorlás után
- minták leérése áramlási citométerrel – témavezető felügyeletével
- analízis CellQuest programmal
- statisztikai elemzés SPSS programmal
- eredmények ábrázolása boxploton

önállóan végeztem el.

Pécs, 2014.07.11.

Kovács Antonietta.....
aláírás