A szisztémás lupus erythematosus klinikai képét alakító immunológiai eltérések vizsgálata

PhD tézisek

Dr. Deák Magdolna

Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar,
Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ,
Reumatológiai Klinika

Szeged, 2015

Közleménylista

A PhD dolgozat témakörében megjelent teljes közlemények:

Deak M, Szvetnik A , Balog A , Sohar N , Varga R , Pokorny G , Toth G , Kiss M , Kovacs L
Neuroimmune Interactions in Sjogren's Syndrome: Relationship of Exocrine Gland Dysfunction with Autoantibodies to Muscarinic Acetylcholine Receptor-3 and Mental Health Status Parameters
NEUROIMMUNOMODULATION 20:(2) pp. 79-86.(2013)
IF: 1.779

Deak M, Bocskai M , Burcsar S , Danyi O , Fekete Z , Kovacs L
Non-thromboembolic risk in systemic lupus erythematosus associated with antiphospholipid syndrome.
LUPUS 2014: Paper DOI 10.1177/0961203314531839. 6 p. (2014)
IF: 2.481*

Deak M, Hornung A , Novak J , Demydenko D , Szabo E , Czibula A , Fajka-Boja R , Kriston-Pal E , Monostori E , Kovacs L
Novel role for galectin-1 in T-cells under physiological and pathological conditions
IMMUNOBIOLOGY 220:(4) pp. 483-489. 2015)
IF: 3.180**

A PhD dolgozat témakörében megjelent idézhető absztraktok

Deák M, Árgyelán N , Hulló D , Balog A , Sohár N , Pokorny G , Szvetnik A , Kiss M , Tóth G , Kovács L
Detection of anti-muscarinic receptor-3 autoantibodies in secondary Sjögren's syndrome.
ANNALS OF THE RHEUMATIC DISEASES 70:(Suppl3) p. 676. (2011)

Deák M, Szvetnik A , Kiss M , Tóth G , Kovács L
Anti-muscarinic-receptor 3 autoantibodies in primary and secondary Sjögren's syndrome.
EUROPEAN JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION 42:(Suppl 1) p. 61. 1 p. (2012)

Deák M, J Novák, Á Czibula , R Fajka-Boja , É Monostori , L Kovács
Galectin-1 and immunoregulatory dysfunction in systemic lupus erythematosus
EUROPEAN JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION 43:(Suppl. 1) p. 86. 1 p. (2013)

Deak M, Bocskai M , Burcsar S , Danyi O , Fekete Z , Kovacs L
Non-thromboembolic risk in SLE and associated antiphospholipid syndrome
ANNALS OF THE RHEUMATIC DISEASES 72:(3) p. 913. 1 p.(2013)

Hornung Ákos , Deák Magdolna, Novák Julianna , Szabó Enikő , Czibula Ágnes , Fajka-Boja Roberta , Monostori Éva , Kovács László
A galektin-1 T-sejtekre gyakorolt apoptotikus hatásának vizsgálata szisztémás lupus erythematosusban
MAGYAR REUMATOLÓGIA 54: p. 157. 1 p. (2013)

További teljes közlemények:

Toldi G , Szalay B , Beko G , Bocskai M , Deák M, Kovács L , Vásárhelyi B , Balog A
Plasma soluble urokinase plasminogen activator receptor (suPAR) levels in systemic lupus erythematosus
BIOMARKERS 17:(8) pp. 758-763. (2012)
IF: 1.879

Szalay B , Meszaros G , Cseh A , Acs L , Deak M, Kovacs L , Vasarhelyi B , Balog A
Adaptive Immunity in Ankylosing Spondylitis: Phenotype and Functional Alterations of T-Cells before and during Infliximab Therapy.
CLINICAL AND DEVELOPMENTAL IMMUNOLOGY 2012: Paper 808724. 8 p. (2012)
IF: 3.064
Független idéző: 2 Összesen: 2

Novak J , Kriston-Pal E , Czibula A , Deak M, Kovacs L , Monostori E , Fajka-Boja R

GM1 controlled lateral segregation of tyrosine kinase Lck predispose T-cells to cell-derived galectin-1-induced apoptosis.
MOLECULAR IMMUNOLOGY 57:(2) pp. 302-309. (2014)
IF: 3.003*

Szalay B , Vasarhelyi B , Cseh A , Tulassay T , Deak M, Kovacs L , Balog A
The impact of conventional DMARD and biological therapies on CD4+ cell subsets in rheumatoid arthritis: a follow-up study.
CLINICAL RHEUMATOLOGY 33:(2) pp. 175-185. (2014)
IF: 1.774*
Független idéző: 3 Összesen: 3

A PhD dolgozat témakörében megjelent teljes közlemények összesített impakt faktora: 7.44

Összes teljes közlemény összesített impakt faktora: 17.15

Összes teljes közlemény független idézettsége: 5

Bevezetés

A szisztémás lupus erythematosus (SLE) igen heterogén szisztémás autoimmun betegség, melyet számos autoantitest és immunkomplexek képződése, a celluláris és a humorális immunitás komplex zavara jellemez. Az immun-mediált gyulladás bármely szervet érintheti, elsősorban ízületi, vese, bőr, idegrendszeri és haematológiai eltéréseket okoz. A beteg neme, az egyes szervek érintettsége és az immunszerológiai profil jelentős mértékben meghatározza a betegség lefolyását.

SLE-ben összetett B és T sejtes defektus vezet az immunszabályozás zavarához, ugyanakkor a pathogenezisben elsődleges szerepe a kóros T sejteknek van. Ezen T sejtek fokozott aktivációs készséget mutatnak, melynek hátterében megváltozott T sejt receptor-asszociált szignalizációs folyamatok és módosult sejtmembrán struktúrák állnak, azonban az SLE T sejtek anerg tulajdonságokkal is rendelkeznek.

SLE-hez gyakran Sjögren szindróma (SS) társul. Primer SS-ben (pSS) anti-muscarin receptor-3 (m3AChR) antitestek detektálhatók, melyek gátló

hatása közrejátszik a glanduláris diszfunkció kialakulásában. Az anti-m3AChR prevalenciája, epitóp specificitása és ezek klinikai asszociációi SLE-SS overlap szindrómában nem tisztázottak, továbbá a sicca tünetek kiváltásában a depresszió és stressz okozta mentális eltérések szerepe is felmerül.

Antiphospholipid syndroma (APS) szintén gyakran kíséri az SLE-t. A thromboembóliás rizikót fokozza az antiphospholipid antitestek (APA) jelenléte, ami ezen felül accelerált atherosclerosishoz is vezet. Kevés az adat arról, hogy az APA-k termelődése és az APS társulása a thrombotikus szövődményeken túl az SLE milyen más klinikai tüneteinek megjelenésére hajlamosít és ez a betegség súlyosságára milyen hatású.

A Galektin-1 (Gal-1) egy immunszuppresszív hatású fehérje, mely az aktivált T sejtek apoptózisát indukálja, és állatkísérletek igazolták a közreműködését számos autoimmun betegég kialakulásában. A Gal-1 funkcióját eddig nem vizsgálták humán pathológiás körülmények közt, így nem ismert, hogy az SLE T sejtek kóros működésében van-e szerepe a Gal-1 fehérjének.

Célkitűzések

1. Az anti-m3AChR prevalencia és epitóp specificitás meghatározása SLE-ben rheumatoid arthritis (RA) és pSS betegekkel összevetve, és ezek klinikai asszociációinak vizsgálata SS overlap esetén, a megfelelő immundiagnosztikai módszer kidolgozása, valamint mentális paraméterek sicca tüneteket kiváltó szerepének megítélése SLE-ben.

2. A nem-thrombotikus SLE manifesztációk gyakoriságának összehasonlítása APA-pozitív és APA-negatív betegek közt illetve APS társulása és hiánya esetén, továbbá ezek hatásának megítélése az SLE kórlefolyásának súlyosságára.

3. Az SLE T sejtek érzékenységének vizsgálata a Gal-1 mediált apoptózisra, és ezen eltérések betegségaktivitással való összefüggéseinek felmérése.

Betegek és módszerek

Az SLE-SS overlap vizsgálatához 103 SLE, 65 RA, 76 pSS beteget és 50 kontrollt vontunk be. A sicca komplex diagnózisa az SLE és RA betegekben az Amerikai-Európai Konszenzus Kritériumok alapján történt, továbbá számos egyéb klinikai, immunszerológiai és terápiás paraméterük rögzítve lett. A m3AchR három immunodomináns epitópja elleni autoantitestek (AGSE, YNIP, TRIC) jelenlétét vizsgáltuk ELISA-val a betegcsoportokban a kontrollokkal összevetve. Az antitest detektálás elősegítése céljából az AGSE és YNIP peptideket GST-vel fúzionálva és az AGSE peptidet BSA-val többszörösen konjugálva is vizsgáltuk. SLE és RA esetén SF-36 és FACIT kérdőívekkel értékeltük a betegséggel összefüggő mentális egészséget.

Az SLE-APS overlap vizsgálata céljából 224 SLE beteg adatait dolgoztuk fel. Az APS diagnózisát a Sidney kritériumoknak megfelelően állítottuk fel. Összesen 31-féle SLE manifesztációt, az immunszerológiai leleteket és az alkalmazott

immunszuppresszív terápiákat értékeltük. Külön vizsgáltuk APA pozitivitás és az APS társulás szerepét az SLE-vel összefüggő nem-thrombotikus megbetegedések megjelenésében, és az SLE kórlefolyására kifejtett hatásukat.

A Gal-1 indukált T sejt apoptózis vizsgálatához 18 aktív (SLEDAI-2K >/= 7) SLE beteget és 20 kontrollt vontunk be. Hatékony immunszuppresszív terápiát követően 10 inaktív (SLEDAI-2K < 7 vagy SLEDAI-2K csökkenés >/= 7) SLE betegnél ismételtük meg a kísérleteket. A betegségaktivitást jelző anti-dsDNS és süllyedés értékeket is rögzítettük mindkét alkalommal. A vérből izolált majd aktivált T sejtek Gal-1 mediált apoptózisát ko-kultúrás vizsgálatban értékeltük, mely során a T sejteket 16 órán át inkubáltuk Gal-1 termelő és nem-termelő HeLa tumor sejtekkel. Az apoptotikus T sejteket Annexin-V fluoreszcens festékkel jelöltük, majd fluoreszcens mikroszkóp alatt készített fotók alapján határoztuk meg a Gal-1 indukált relatív apotózis rátát (RAR)

Eredmények

Az anti-m3AChR antitestek ELISA vizsgálata során a szintetikus peptideket alkalmazva szignifikánsan magasabb átlagos antitest szinteket találtunk az AGSE és YNIP ellen SLE és pSS esetén is a kontrollokhoz képest, míg az RA csoport csupán borderline eltérést (p=0,067) mutatott a kontrollokkal összevetve. Az AGSE-GST fúziós peptiddel végzett vizsgálat szignifikánsan alacsonyabb átlagos antitest szintet mutatott RA-ban a másik két betegcsoporthoz képest. Az AGSE-BSA konjugátummal végzett vizsgálatban mindhárom betegcsoport különbözött ugyan a kontrolloktól, azonban a betegcsoportokat nem különítette el egymástól. A TRIC peptid ellen alig termelődtek antitestek. Az AGSE és YNIP rövid peptidekkel kimutatott antitest gyakoriságok szignifikánsan magasabbak voltak mindhárom betegcsoportban a kontrolloknál, ugyanakkor a GST fúziós formák az SLE és pSS betegcsoportokat is elkülönítették RA-tól. Az YNIP-GST peptid bizonyult a leghasznosabbnak, mivel szignifikáns antitest-

prevalencia különbségeket igazolt az összes betegcsoport közt is a következő sorrendben: pSS > SLE > RA >kontroll. Sicca komplex az SLE betegek 26.2%-ában, az RA betegek 21.5%-ában volt jelen. A vizsgált anti-m3AChR antitestek gyakoriságai és átlagos szintjei nem különböztek a sicca és nem sicca SLE ill. RA betegekben. A klinikai eltéréseket vizsgálva ezen betegcsoportokban a sicca betegek idősebbek voltak SLE és RA esetén is. Továbbá a sicca SLE betegekben pszichoorganikus szindróma, stroke és anti-SSA pozitivitás gyakrabban, míg nephritis és lymphopenia ritkábban fordult elő, mint nem sicca társaikban (borderline szignifikáns eltérések). Bár a FACIT kérdőív nem mutatott különbségeket, az SF-36 eredménye szignifikánsan rosszabb mentális egészséget igazolt sicca lupusban a nem sicca SLE betegekkel összevetve.

Az SLE-APS overlap vizsgálata során a nephritis, tüdőérintettség, myocarditis, endocarditis, pszichoorganikus szindróma, konvulzió és pszichózis megjelenését major SLE manifesztációnak tekintettük, mivel ezek súlyossága kiemelkedő az SLE

lefolyásában. Az SLE betegek 47%-a volt APA pozitív, és az összes beteg 23%-ában társult APS (az APA pozitív betegek 49%-a). Az APA pozitív betegekben az APA negatívakkal összevetve szignifikánsan gyakrabban fordult elő thromboembólia, thrombocytopenia és haemolytikus anaemia, továbbá non-infekt endocarditist csak az APA pozitív betegekben észleltünk. SLE-APS overlap esetén az APS diagnosztikus tünetein túl szignifikánsan gyakoribb volt a nephritis, intersticiális tüdőbetegség, pleuritis, myocarditis, pszichoorganikus szindróma és thrombocytopenia az APS nélküli betegekhez viszonyítva. Az SLE-APS overlap klinikai lefolyásának súlyosságát jelezte az, hogy nagyobb gyakorisággal fordultak elő major manifesztációk, valamint váltak szükségessé erélyes immunszuppresszív terápiák, mint APS hiányában ($p < 0,05$).

A Gal-1 mediált T sejt apoptózis vizsgálatai azt mutatták, hogy az aktív SLE betegek T sejtjei alig érzékenyek az extracelluláris Gal-1 apoptotikus hatására, és a Gal-1 tartalmú ko-kultúrában észlelt relatív apoptózis rátájuk (RAR) szignifikánsan

alacsonyabb, mint a kontroll T sejteké. Azonban az immunszuppresszív terápiát követően, a betegség inaktív fázisában, a lupusos T sejtek visszanyerték az extracelluláris Gal-1 jelenlétében mutatott apoptózis hajlamukat, melyet a RAR szignifikáns emelkedése jelzett. Az inaktív SLE T sejteknél a RAR már nem mutatott szignifikáns különbséget a kontrollokkal összevetve. Munkacsoportunk a Gal-1 intracelluláris expresszióját vizsgálva más kísérletekben kimutatta, hogy az aktivált T sejtekben intracellulárisan expresszálódó Gal-1 érzékenyíti a sejteket az extracelluláris Gal-1 indukált apoptózisra, és az SLE T sejtek Gal-1 mRNS tartalma szintén szignifikánsan alacsonyabb aktív betegségben az egészséges szintnél, majd szignifikánsan emelkedik a betegség kezelését követően. Vizsgálataink alapján ugyanakkor az SLE T sejtek apoptózis zavara, nem mutatott korrelációt a különböző betegségaktivitási paraméterekkel, mintSLEDAI-2K, anti-dsDNS titer, süllyedés (mint ahogy a Gal-1 mRNS tartalom sem).

Diszkusszió

Vizsgálataink során két új paramétert azonosítottunk, melyek befolyásolhatják az exocrin glanduláris funkciót SLE-hez társuló SS esetén: a m3AChR ellen termelődő különböző autoantitesteket, melyek direkt gátló hatást fejthetnek ki a vegetatív innerváció befolyásolása révén, és a sicca tünetekhez társuló mentális eltéréseket, amelyek pedig központi gátló mechanizmusnak tekinthetőek. A pSS-hez hasonlóan polyclonalis autoantitest képződést mutattunk ki a m3AChR többféle epitópja ellen SLE-ben és RA-ban is. Az eredményeink alapján a primer és az overlap SS immunodiagnosztikájában hasznos lehet az antigén peptidek fúziója GST-vel. Továbbá a stressz és a rossz pszichoszociális körülmények szintén szerepet játszhatnak a sicca tünetek kialakulásában SLE betegeknél.

Az SLE-ben jelentkező APS esetén igazoltuk, hogy nem csupán az APS-specifikus megbetegedések, hanem számos nem-thrombotikus SLE manifesztáció is gyakrabban alakul ki azon lupusos betegekkel

összehasonlítva, akiknél nincs jelen APS. Ez az APS-hez társuló rizikó kiemelt jelentőségű azt figyelembe véve, hogy az APS fennállása különösen a major SLE tünetek prevalenciáját emeli meg. Az SLE kórlefolyása ezáltal súlyosabb és kifejezettebb szervi károsodások kialakulásával kell számolnunk. Az APA-k szűrése, az SLE-APS overlap betegcsoport kiemelt figyelemmel kísérése illetve az antikoaguláns terápián túl a megfelelő immunszuppresszió megválasztása különösen fontos a szövődmények megelőzésében.

Elsőként vizsgáltuk a Gal-1 szerepét az SLE T sejtek pathológiás működésében. Bemutattuk, hogy a fiziológiás folyamattal megegyezően az SLE T sejtek Gal-1 tartalma befolyásolja érzékenységüket az extracelluláris Gal-1 mediált apoptózisra. Az aktív SLE betegek T sejtjeinek csökkent Gal-1 expressziója az apoptózis zavarával társul, és ezen eltérések az immunszuppresszív terápia hatására rendeződnek. A leírt Gal-1 függő mechanizmus szerepet játszhat az SLE pathogenezisében igazolt fokozott T sejt aktivitásban és az immunregulációs defektusokban.

Köszönetnyilvánítás

Hálával tartozom Kovács Lászlónak, az SZTE Reumatológiai Klinika tanszékvezető docensének a kiemelkedő tudományos támogatásáért és témavezetői munkájáért, továbbá Monostori Éva professzor asszonynak, aki szaktudásával működött közre munkám elkészítésében. Köszönöm Hornung Ákos, Fajka-Boja Roberta és Novák Julianna alapos segítségét a Galectin-1 kísérletek és statisztikák kivitelezésében, továbbá köszönöm Gercsó Andrea és Pördi Szilvia pontos labormunkáját.