

**PhD tézisek**

**Az adaptív immunválasz vizsgálata  
immunmediált kórképekben**

**Dr. Dulic Sonja**

**Témavezető: Dr. habil Balog Attila, PhD**

*Szegedi Tudományegyetem*

*Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola*

*Általános Orvostudományi Kar*

*Reumatológiai és Immunológiai Klinika*

**Szeged, 2018**

## **Bevezetés**

A rheumatoid arthritis (RA), a spondylitis ankylopoetica (SPA) és a gyulladásoos bélbetegségek (inflammatory bowel disease – IBD) krónikus immunmediált betegségek, amelyekben a tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) kóroki szerepe kiemelhető, így ebből kifolyólag terápiás célpontként is szerepel. Az anti-TNF kezelések mindhárom betegség kórlefolyását meghatározó mértékben javítják. Hatásmechanizmusuk kevésbé tisztázott, ezért primer illetve szekunder módon kialakuló ineffektivitásukat előre jelző biomarkerek azonosítására van szükség.

Az adaptív immunrendszer kiegyensúlyozott működését a T-lymphocya altípusok aránya és aktivitása alapvetően határozza meg. A tumor necrosis faktor gátlók hatással vannak a T sejt alcsoportok megoszlására és funkciójára, amelyet több munkacsoport vizsgált; leginkább az egyes effektor T helper sejtvonalakra fókuszálva. Munkacsoportunk rövidtávú anti- TNF kezelés mellett RA-ban és SPA-ban végzett, számos T-lymphocya szubtípusra kiterjesztett vizsgálatát követően

eredményeinket hosszútávú vizsgálat keretében hasonlítjuk össze, valamint a szintén adaptív immunválasz eltéréseivel összefüggésbe hozott IBD betegségcsoporttal egészítjük ki. Ezen kiegészítés az SPA-val, illetve spondylarthropathia betegségcsoporttal történő társulás, valamint a T sejtek kiemelt szerepe miatt bizonyul kézenfekvőnek; a lymphocyták élettartamát figyelembe véve pedig feltételezhető, hogy a definitív elváltozások detektálása szignifikánsan több követési időt igényel. Rövidtávú eredményeink között kiemelhető a regulator T-sejtek (Treg) arányának normalizálódási tendenciája - ennek további vizsgálata a T-sejt repertoire változási mechanizmusait jellemzi, amelynek karaktere hosszútávú vizsgálat során alakul ki egyértelműen. Az immunrendszer funkciója szempontjából jelentős, memória és aktivált T sejtek számának alakulását is figyelemmel kísérjük, amelynek fontosságát a tartós biológiai terápia következményeinek (daganat-kialakulásban induktív szerepük, fertőzésekkel szembeni fogékonyság, stb.) megítélése adja.

## **Célok**

1. RA, SPA, IBD betegségekben a T-sejt repertoire meghatározása, anti-TNF – valamint RA-ban interleukin 6 receptor (IL6-R) gátló terápia előtt.
2. Ezen mérési eredmények összehasonlítása hosszútávú – azaz legalább három hónapon át zajló biológiai terápiás kezelést követően.
3. T-sejt fenotípus és változásainak összehasonlítása a klinikai képpel – betegség specifikusan.
4. Olyan predikív biomarkerek keresése, amelyek a biológiai terápia indítása előtt mérve a terápiás válaszkészségről adnak információt.

## **Beteganyag**

### *Rheumatoid arthritis*

Kilencvenkettő RA-s beteg vett részt a vizsgálatban, közülük 49 anti-TNF, 43 pedig IL6-R blokkoló kezelést kapott. Az anti-TNF csoportot tovább osztottuk az EULAR válaszkritériumok alapján responder illetve non-responder alcsoportra. Az IL6-R gátló kezelték mind responderek voltak. Longitudinális követés 13 beteg esetében volt, biológikum-naív állapottól kiindulva. Harminc egészséges kontroll önkéntest válogattunk életkor, nem szerint illesztve, valamint 19 frissen diagnosztizált RA-s terápia-naív beteget.

### *Spondylitis ankylopoetica*

Huszonkettő módosított New York-i kritérium szerint diagnosztizált SpA-s beteg került beválasztásra. Az RA-s vizsgálatához hasonlóan responder (n=15) és non-responder (n=7) csoportot különítettünk el, ASAS válaszkritériumoknak megfelelően. Kontrollcsoportunk 10 egészséges önkéntesből állt.

*Gyulladásos bélbetegségek*

RA-hoz hasonlóan mind keresztmetszeti, mind longitudinális vizsgálati elrendezést alkalmaztunk. Így összesen 114 beteg mintáját dolgoztuk fel megadott szempontok alapján. Crohn betegség (CD) és colitis ulcerosa (UC) elkülönítésre került; responder és non-responder csoportot a két előző vizsgálatunkhoz hasonlóan ezúttal is meghatároztunk. Prospektív módon UC-ben és CD-ben is 16 beteg kórlefolását követtük, anti-TNF kezelés indítása után. Kontroll vérvétel mindkét entitásban 6 esetben történt, minimum három hónappal a biologikum indítását követően. A keresztmetszeti részben 31 CD, 16 UC páciens adatait hasonlítottuk össze, valamint bontottuk tovább az anti-TNF-re adott terápiás válasz szerint. Egészséges (n=30), terápia naív, aktív (n=7, UC-ben és CD-ben is), illetve hagyományos kezeléssel remisszióban lévő betegeket (n CD=14, n UC=7) alkalmaztunk kontroll csoportként.

Mindhárom betegség esetén feljegyeztük a legfontosabb demográfiai adatokat, betegség-specifikus mutatókat,

komorbiditásokat, laboratóriumi és eszközös diagnosztikai paramétereket.

### **Laboratóriumi módszerek**

Tizenöt ml, anticoagulált vérmintát használtunk, amelyet áramlási citometer segítségével analizáltunk. Felszíni festéssel a következő T sejt szubtypusokat különítettük el: helper T (CD4+), Th1 (CD4+CXCR3+), Th2 (CD4+CCR4+), Th17 (CD4+CCR4+CCR6+), Treg (CD4+CD25<sup>high</sup>CD127<sup>-</sup>), naiv T (CD4+CD45RA+) és memória T sejtek (CD4+CD45RO+). Különböző aktivációs markerrel rendelkező (korai – CD69, késői – HLA-DR és intermedier – CD25) T-sejteket is elkülönítettük.

## **Eredmények**

### *Rheumatoid arthritis*

Hosszútávú biológiai kezelés mellett- annak típusától függetlenül, az egészséges kontrollokhöz viszonyítva, a regulátor T sejtek aránya normalizálódik, a naiv CD4 és CD8 lymphocyták mennyisége csökken, memóriasejtek aránya növekszik. A Th2 és Th17 sejtek aránya magasabb lesz, legkifejezettebben az IL6R blokkolóval kezelt betegekénél. Az aktivált alcsoportok közül a késői aktivációs jelzéssel rendelkező lymphocyták aránya az anti- TNF és IL6-R blokkoló responderekben emelkedik, míg a CD8 vonalon a korai aktivációs markerrel bíró, valamint a CD4CD25 altípusok esetén csökken mindkét anti-TNF csoportban, az egészséges kontrolcsoporttal összehasonlítva. Az IL6R-blokkolóval kezelt betegek esetében a CD8 sejtek előfordulási gyakorisága minden más kezelt, és az egészséges populációval összehasonlítva alacsonyabb; a CD8CD69 sejteké azonban emelkedik.

Ha CD4CD69 lymphocyták kiindulási aránya alacsonyabb, mint 2,13%, akkor ez 71,4%-os szenzitivitással és 83,3% specificitással jelzi előre a



respondernek minősíthető terápiás választ, anti-TNF esetén (likelihood ratio: 4,29). A CD4CD69 és CD8CD69 sejtek aránya magasabb volt azokban az IL6R gátlóval kezelt betegekben, akiknél korábban több anti-TNF váltás történt inefektivitás miatt.

### *Spondylitis ankylopoetica*

A naiv CD4 és CD8 sejtek aránya ebben a gyulladásos reumatológiai betegségben is jelentősen alacsonyabb volt az egészséges kontrollcsoporthoz viszonyítva. A Treg sejtek aránya normalizálódott (ahogyan RA-ban is), míg a Th1 és Th17 lymphocyták előfordulási gyakorisága nőtt. Az anti-TNF non-responderekben a Th2 arány is emelkedett a nem beteg populációhoz hasonlítva. A késői aktivált sejtek frekvenciája responderekben magasabb volt, mint az egészségesekben. Rövidtávon szerzett eredményeinkkel összevetve azt tapasztaltuk, hogy a fent ismertetett eltérések csak három hónap után alakulnak ki.

*Gyulladásos bélbetegségek*

Az aktív IBD-s betegek és egészséges személyek összehasonlítása számos eltérést tárt fel az immunfenotípusban: a Th2 és Th17, a HLA-DR és a CD69 pozitív sejtek aránya magasabb, míg a naiv T sejtek aránya alacsonyabb volt a gyulladásos bélbeteg csoportokban. A CD8CD69 sejtek előfordulási gyakorisága CD-ben magasabb volt frissen diagnosztizált aktív betegekben, mint nem-biológiai terápiával kezelt inaktív CD-sekben. Anti-TNF kezelés mellett jóval kevesebb T-sejt szubtypus változást láttunk, mint gyulladásos reumatológiai betegségekben. A CD4 arány responder UC betegekben alacsonyabb volt a non-responderekhez viszonyítva. A CD8 memóriasejt prevalencia magasabb volt non-responder UC-s betegekben az anti-TNF naivakkal összehasonlítva. Prospektív vizsgálat során CD8CD69 sejtek gyakorisága a második vérvétel idejében sokkal nagyobb mértékben csökkent UC responderekben, mint non-responderekben. Több sejttypus marker kapcsolható a terápiás válaszkészséghez és/vagy a betegségaktivitáshoz. A CD4 memóriasejtek 49,05% -nál kisebb aránya CD-ben,

a biológiai kezelés hatékonyságát vetíti előre. A remisszió időtartama egyenesen arányos volt CD-ben a CD4HLA-DR sejtek, valamint a Th2 és Th17 lymphocyták prevalenciájával UC-ben.

### **Összegzés**

Mindhárom betegség esetén az T-sejt alcsoportok megoszlásának és változásainak eddigi legrészletesebb feltérképezését végeztük el. Biologikumok mellett tapasztalható eltéréseket korreláltattuk az adott klinikai képpel.

Gyulladásos rheumatológiai betegségek esetén számos hasonlóságot tártunk fel, míg az IBD-s csoportban bekövetkező eltérések kevésbé voltak az eddigi autoimmun változásokhoz illeszthetők, amelynek magyarázata a főképpen nyálkahártyában végbemenő gyulladásos reakciók, amelyek perifériás vérben kevésbé markánsan detektálhatóak.

Az adaptív immunrendszer abban az esetben is a betegségre jellemző aktivált karakterisztikus jegyeket

tükrözi (egyres effektor T-helper illetve aktivált T-lymphocyta alcsoprtok aránya magas marad, naiv sejtek aránya csökken), amikor a betegség biológiai kezelés mellett tartós nyugalmi állapotba kerül. Kiemelendő ugyanakkor, hogy a gyulladáros rheumatológiai kórképekben biológiai terápia mellett a T-reg arány normalizálódik, vagyis az egészséges kontrolloknál mérttel azonos lesz.

Különösen RA-ban és IBD-ben találtunk olyan sejt altípusokat, amelyek prevalenciája prognosztikai jelentőséggel bír, így személyre szabott terápia megválasztásában kiemelt jelentőségű biológiai markerként használhatók fel.

### **Köszönetnyilvánítás**

Köszönettel tartozom dr. Balog Attila témavezetőmnek tanulmányaim ideje alatt nyújtott folyamatos, önzetlen szakmai segítségéért, bátorításáért, iránymutatásáért, építő kritikáiért és dr. Kovács Lászlónak a gördülékény munkavégzés biztosításáért. Köszönöm továbbá dr. Toldi Gergelynek és munkacsoportja tagjainak, kiemelten dr. Florentina Savanak, Vásárhelyi Zsófiának, Berta Lászlónak valamint Pördi Szilviának a kísérletekben nyújtott segítségüket és társszerzői munkájukat, Prof. Dr. Molnár Tamásnak és munkatársainak az IBD-s betegeket érintő vizsgálatok szervezésének megkönnyítéséért. Köszönöm a családomnak, elsősorban dr. Tepper Ádámnak, Dulic Katalinnak, Dulic Gavronak és dr. Tepper Ágnesnek a folyamatos támogatásukat és bátorításukat.

### **Felhasznált közlemények**

**I.** Dulic S, Vasarhelyi Z, Sava F, Berta L, Szalay B, Toldi G, Kovacs L, Balog A. T-Cell Subsets in Rheumatoid Arthritis Patients on Long-Term Anti-TNF or IL-6 Receptor Blocker Therapy. *MEDIATORS OF INFLAMMATION* 2017: Paper 6894374. 19 p. (2017)  
**IF: 3,549**

**II.** Dulic S, Vasarhelyi Z, Bajnok A, Szalay B, Toldi G, Kovacs L, Balog A. The Impact of Anti-TNF Therapy on CD4+ and CD8+ Cell Subsets in Ankylosing Spondylitis. *PATHOBIOLOGY* 85:(3) pp. 201-210. (2018) **IF: 1,592**

### **Felhasznált konferencia előadások**

Dulic S, Toldi G, Vásárhelyi Z, Balog A. The impact of Biologic Therapies on CD4+ and CD8+ Cell Subsets in Rheumatoid Arthritis: A Long Term Follow Up Study. *ANNALS OF THE RHEUMATIC DISEASES* 75:(Suppl. 2.) pp. 182-183. (2016)

Dulic S, Vásárhelyi Z, Bajnok A, Szalay B, Toldi G, Kovács L, Balog A. Analysis of the T-cell subset

composition in ankylosing spondylitis patients with long-standing anti-TNF therapy. ANNALS OF THE RHEUMATIC DISEASES 76:(Suppl.2) p. 780. 1 p. (2017)

### **Disszertációban fel nem használt közlemények**

Gál B, Dulic S, Kiss M, Groma G, Kovács L, Kemény L, Bata-Csörgő Z. Increased circulating anti- $\alpha 6$ -integrin autoantibodies in psoriasis and psoriatic arthritis but not in rheumatoid arthritis JOURNAL OF DERMATOLOGY 44:(4) pp. 370-374. (2017) **IF: 2,788**

Kern A, Balog A, Dulic S, Barabas E, Kiszlak M, Vasarhelyi B. Alterations of the thrombin generation profile in rheumatoid arthritis. JOURNAL OF THROMBOSIS AND THROMBOLYSIS 41: pp. 359-364. (2016) **IF: 2,142**

Rosztoczy A, Izbeki F, Nemeth IB, Dulic S, Vadaszi K, Roka R, Gecse K, Gyokeres T, Lazar G, Tizslavicz L, Wittmann T. Detailed esophageal function and morphological analysis shows high prevalence of gastroesophageal reflux disease and Barrett's esophagus

in patients with cervical inlet patch. DISEASES OF THE  
ESOPHAGUS 25:(6) pp. 498-504. (2012) **IF: 1,642**