

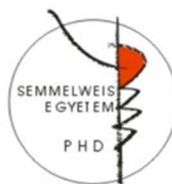
Az ultraibolya sugárzás szerepe a kísérletes és klinikai dermatológiában

Doktori tézisek

Dr. Gyöngyösi Nóra

Semmelweis Egyetem

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Prof. Dr. Wikonkál Norbert, Ph.D., DSc., egyetemi tanár
Konzulens: Prof. Dr. Marschalkó Márta, Ph.D., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Margittai Éva, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Lengyel Zsuzsanna, Ph.D., egyetemi adjunktus

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Arató András, Ph.D., DSc, egyetemi tanár

Tagok: Dr. Tory Kálmán, Ph.D., egyetemi adjunktus

Prof. Dr. Szabó László, Ph.D., főiskolai tanár

Budapest

2020

1. Bevezetés

Az ultraibolya sugárzás terápiás alkalmazása évszázados múltra tekint vissza. Az UV-tartományok biológiai hatásai a hullámhossztól függően eltérőek, hiszen mind a DNS károsító hatásuk módja, mind a penetrációs képességük tekintetében különböznek egymástól. A bőrt érő extrém UV-terhelésnek viszont sok káros bőrgyógyászati vonzata van, ezért célszerű a fototerápiánál az optimális haszon/kockázat arány elérésére törekedni, azaz a legszükségesebb UV-dózist leadni a legnagyobb terápiás hatás kiváltásáért. A fototerápia első lépése a minimális eritéma dózis, azaz a MED meghatározása, mely a klinikumban a fototerápiák kiindulási pontja. Nem csupán a fototerápiában használjuk, hanem fotodermatózisok diagnosztizálására, különböző gyógyszerek fényérzékenyítő hatásának vizsgálatára vagy fényvédő krémek hatékonyságának tanulmányozására is alkalmas. A fotobiológiai kísérleteknél egereken is ezt a terminológiát alkalmazzák, holott az egér bőrének UV-sugárzásra mutatott reakciója jelentősen eltér az emberétől, ráadásul az egyes egértörzsek reakciói is mások. Az egereknél ugyanis az egyszeri nagy dózisú UV-besugárzásra nem csupán eritéma, hanem törzsenként eltérő fokú, de minden esetben igen jelentős ödéma is társul a bőrreakcióhoz.

A fototerápia különböző típusait számos gyulladásozós bőrgyógyászati kórkép kezelésében alkalmazzuk, azonban a kezelésre jól reagáló betegségek között onkológiai betegségek, a cutan T-sejtes lymphomák is megtalálhatók. A cutan lymphomák között a második leggyakrabban előforduló kórkép, a lymphomatoid papulosis (LyP), mely terápiás lehetőségei meglehetősen limitáltak, így nagy jelentősége van a kizárólag a bőrre irányuló, szisztémás hatásokat többnyire nem okozó

fényterápiának. A LyP klasszifikációja a szövettani jellemzők megismerése és a molekuláris diagnosztika fejlődésével rendszeresen megújul, így még több információnk van ritkább fenotípusú variánsokról. A CD8 pozitivitást eddig csupán a LyP D típusával hozták kapcsolatba, azonban elszórtan jelentek meg esetközlések, ahol más LyP típusokban is volt CD8 pozitívitás észlelhető.

2. Célkitűzések

Munkánkban célul tűztük ki a fotobiológiai kísérletekben gyakran használt három eltérő genotípusú egértörzs bőrének vizsgálatát egyszeri UVB-besugárzás után. Standardizálni kívántuk a különböző genotípusú egerek fotoszenzitivitásának mérését, és egértörzsenként meghatározni a legkisebb, észlelhető bőrtünet jelentkezéséhez szükséges dózist.

Tisztázni kívántuk, hogy az SKH-1, C57BL/6 és Balb/c egértörzsek között észlelhető-e különbségek az UV-sugárzásra mutatott bőrreakció tekintetében, és ezek hogyan detektálhatóak klinikailag képalkotó módszerekkel. A különböző egértörzsekben vizsgálni kívántuk a bőrreakció részeként a bőrpírt, az ödéma mértékét, és a gyulladássos sejtek számát.

Célunk volt kimutatni továbbá, hogy az egerek bőrében milyen szövettani, immunhisztokémiával és citokin expresszió mérésekkel detektálható változások jönnek létre, amelyek az emberétől eltérő klinikai megjelenésért felelősek.

A fototerápia klinikumban történő felhasználását a Semmelweis Egyetem Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinikán 2008 és 2015 közötti időszakban CD8-pozitív lymphomatoid papulosissal kezelt betegek vonatkozásában szeretnénk volna

megvizsgálni. Célunk volt a klinikai jellemzők, a diagnosztikus nehézségek és a terápiás lehetőségek vizsgálata, különös tekintettel a fototerápia eredményességére. További célként tűztük ki, hogy a páciensek kórtörténetét visszanezve az esetleges propagációról és hosszú távú túlélésről, esetlegesen társuló malignitásról nyerjünk adatokat.

Kíváncsiak voltunk, hogy e ritka immunfenotípusú betegségcsoportban milyen szövettani jellemzőket találunk. Célunk volt ezek alapján a CD8-pozitív esetek szövettani típusokba történő besorolása, a klasszifikációjuk újragondolása.

3. Módszerek

1) Egyszeri UVB-sugárzás vizsgálata egérbőrön

A kísérletekben használt állatok

A vizsgálatainkban C57BL/6, Balb/c, és SKH-1 genotípusú nőstény egereket használtunk, csoportonként 20-20 darabot. Az állatok elhelyezése normál állatházi körülmények között történt. Táplálásuk nem volt korlátozva, normál rágcsáló táppal láttuk el őket. Az UV-besugárzás 8 hetes korukban történt.

UVB-besugárzás

Szőrrel fedett egértörzsek esetén a vizsgálat előtt 24 órával a szőrt eltávolítottuk, majd a bőrt UVB-vel sugaraztuk be hat darab, 1x1cm-es területen. Az egyes területeket 40, 50, 60, 80, 100, 150 mJ/cm² dózisu UVB-vel irradiáltuk. Kontrollként szimulált besugárzásnak kitett egereket használtunk, a bőrüket nem tapadó, UV sugárzást át nem eresztő fóliával takartuk. A

kezelés alatt az állatok intraperitonealisan adott Avertinnel voltak átmenetileg elaltatva.

A bőrpír és az ödéma értékelése

A kísérletek során fotókat készítettünk, ill. a bőrpír intenzitását két független személy vizsgálta 24 és 48 óra elteltével. A kialakuló eritéma megítélésére 0-3-ig terjedő skálán értékeltük a változást. Emellett a fotókat objektívizálás céljából Photoshop CS6© szoftverrel is értékeltük. Az in vivo észlelhető ödéma számszerűsítésére a bőr vastagságát mértük. Mind a besugarazott, mind a be nem sugarazott bőrfelületen mértük a bőrredő vastagságát és ennek hányadosát képeztük. 48 óra elteltével voltak a legjelentősebb változások, így a kísérletekben ezt az időpontot használtuk végpontként.

A bőr ödémájának ex vivo mérése optikai koherencia tomográffal

OCT vizsgálataink során a képek készítéséhez egy CAM-L kornea lencse adapterrel felszerelt RTVue-100 Fourier-domain OCT készüléket használtunk, 26000 axiális szken másodpercenkénti sebességgel és 5 mikrométer axiális felbontással. 48 órával a besugárzás után az állatokat elaltattuk, bőrmintákat metszettünk ki, és az ex vivo mintákon végeztük az OCT méréseket. Az epidermisz vastagságát ugyanazon vizsgáló által vakon végzett mérésekkel az OCT készülék beépített szoftveres mérőeszközével határoztuk meg. A különféle egércsoportok jellemző vastagságbeli növekedési paramétereit a besugarazott / szimulált-besugarazott arány alapján hasonlítottuk össze. Az átlagértékeket legalább 4 mérésből számítottuk ki.

Szövetani értékelés

Az egerek hátáról 1 x 1 cm nagyságú bőrmintákat távolítottunk el, melyek részben besugározott, részben be nem sugározott bőrfelületet tartalmaztak. A mintákat 10% pufferolt formalinnal fixáltuk és paraffinba ágyasztuk. A 4 μm -es metszeteket hematoxilinnel és eozinnal (H&E) festettük. Az immunfluoreszcenciás mérésekhez 0,5x1 cm-es bőrmintákat vettünk, az irradiált és nem irradiált bőrfelületek különálló helyeiről. Ezeket folyékony nitrogénben gyorsfagyasztással lefagyasztottuk és beágyasztuk Cryomatrix™ gélbe. A 10 μm vastag metszeteket anti-CD3 antitesttel festettük. A sejtmagokat propidium-jodiddal tettük láthatóvá. Továbbá mindhárom genotípusú egérből bőrt nyertünk egy órával az UV besugárzás után, klinikailag releváns dózissal, és a mintákat anti-CPD antitesttel festettük. Az epidermisz és a dermisz vastagságát és a gyulladásos sejtek jelenlétét H&E-nel való festés után a bőrben vizsgáltuk, öt látótérben, a besugározott és a szimuláltan besugározott területeken is értékelve a sejtes összetételt.

Bőr homogenizálása és citokin vizsgálatok

Az állatok hátbőréből 1 cm^2 bőrmintákat vettünk két helyről: a klinikailag releváns dózissal (CRD), és a legnagyobb, 150 mJ/cm^2 dózissal besugározott területből. Kontrollként szimulált irradiációnak kitett egerekből származó bőrt használtunk. A bőrmintákat analitikai mérleggel megmértük és T-PER fehérjeizoláló pufferbe mártottuk, kiegészítve proteáz- és foszfatázgátlókkal. A bőrt IKA Ultraturrax homogenizátorral homogenizáltuk és centrifugáltuk, a felülúszót 55 μl térfogatú részekre osztottuk és további vizsgálatokig -80°C -on tároltuk. A felülúszók fehérjekoncentrációját mikroBCA protein assay-vel kvantitatív módon határoztuk meg. Az IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- γ és TNF- α szintjét a lizátumokban Bio-Plex

ProTM egér Cytokine 6-Plex mágneses gyöngy esszével mértük Bio-Plex 200 rendszeren. A citokin analízishez mérésenként 1 mg fehérjét használtunk. A citokin vizsgálatokat két-két mintán végeztük mind a besugarazott, mind a szimulált irradiációnak kitett bőrminta esetén.

Statisztikai elemzések

A statisztikai elemzéseket Real Statistics, MedCalc és OriginPro szoftverek felhasználásával végeztük. A normalitást Saphiro-Wilks teszttel vizsgáltuk. A csoportokat összehasonlítottuk egyirányú ANOVA és unpaired T-tesztekkel. Nem normális eloszlás esetén a nem-paraméteres Kruskal-Wallis tesztet és a pár-pár összehasonlítást Mann-Whitney U-teszttel végeztük.

2) CD8+ Lyp páciensek klinikai és szövettani vizsgálata

Páciens minták, diagnózis felállítása

A Semmelweis Egyetem Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinika anyagából a 2008 és 2015 közötti időszakot áttekintve válogattuk ki azt a 14 páciens, akinél CD8+ lymphomatoid papulosis igazolódott. A klinikai anyagukat feldolgoztuk és ismételt kórszövettani vizsgálatokat végeztünk. A lymphomatoid papulosis diagnózisa egyfelől klinikailag volt felállítható, másrészt a kórszövettani eltérések WHO-EORTC és WHO klasszifikációin, harmadrészt a Cerroni-féle kézikönyv diagnosztikai ajánlásán alapultak. A páciens vizsgálata alapos fizikális vizsgálatból, rutin labor vizsgálatokból, mellkas Rtg-ből és CT vizsgálatból állt.

Vizsgálati minták

A perifériás vér érintettségének megítélésére áramlási citometriai és TCR gamma génátrendeződési vizsgálatok történtek. A szövettani értékelést formalinnal fixált, paraffinba ágyazott mintákon végeztük. A 14 beteg mindegyikéből sikerült ismételtlen a szövettani mintát megvizsgáljunk, mely szövettani újraértékelést két hematopatológus végezte.

Szövettani értékelés

A LyP HE-nel festett metszeteit vizsgálva a következő szövettani eltéréseket elemeztük: az epidermiszben észlelhető ulceráció, spongiózis, parakeratózis, a bazális réteg vakuoláris degenerációja, az epidermális hiperplázia mértéke, és fő paraméterként az epidermotropizmus mértéke. Utóbbinál 1-5 limfoid sejt/10 keratinocita aránynál enyhe, 6-15 közötti hányadosnál közepes és több mint 15 esetén erős epidermotropizmusnak véleményeztük a folyamatot. Ezenkívül értékelésre került a dermális infiltrátum alakja és jellege (felületes, ék alakú, perivaszkuláris, periadnexális, granulomatózus), a vaszkuláris érintettség (érfal károsodás és a vörösvértestek extravazációja); az infiltrátum szubkután szövetre való terjedése. Vizsgáltuk továbbá az epidermotróp és a dermiszben lévő limfoid sejtek méretét, az infiltrátum egyéb sejtjes összetételét.

Immunhisztokémiai és molekulás genetikai minták feldolgozása

Az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz az alábbi antitesteket használtuk: CD3, CD20, CD30, Ki67, granzyme B, MUM1, CD4, CD8 CD5, CD7, CD2, TIA-1 és PD1. Kontrollként humán tonsilla mintákat használtunk. Hat esetben molekuláris vizsgálatokat is tudtunk végezni, úgy, hogy DNS-t izoláltunk a

fagyasztott bőrmintákból vagy a paraffinba ágyazott biopsziás anyagból. A TCR g gén átrendeződési PCR vizsgálatokhoz a BIOMED-2 Concerted Action protokolt használtuk. A CD8+ LyP között eseteket a Medline által indexelt angol folyóiratokat áttekintve gyűjtöttük össze 1990-től 2016. januárig.

4. Eredmények

1) Egyszeri UVB- sugárzás vizsgálata egérbőrön

A sötét szőrű C57BL/6 egerek érzékenyebbek az UVB besugárzásra, mint az albínó Balb/c és SKH-1 egerek

Szignifikáns különbségeket találtunk a különböző genotípusú egereknél az éppen észlelhető bőrtünetekhez szükséges dózisokban. 48 órával az UVB besugárzás után a C57BL/6 egerekben 41,4 mJ/cm²-nél észleltünk eltéréseket, ami szignifikánsan alacsonyabb, mint a Balb/c-ben mért átlagos CRD-érték (54,3 mJ/cm²). Ezzel szemben az SKH-1 szőrtelen egerek esetén csupán 92,5 mJ/cm²-nél jelentkezett bőrtünet.

A C57BL/6 és Balb/c egerek esetén a CRD értéknél létrejövő eritéma kifejezettebb, mint az SKH-1 egereknél

A C57BL/6 és a Balb/c egerek egy közepes fokú eritémát produkáltak, szemben az SKH-1 típusú egerekkel, ahol alig volt bőrpír észlelhető, főként ödéma jött létre. Mivel a MED csak az eritémát írja le, új fogalmat alkottunk a klinikailag releváns dózis (CRD) formájában. Ez azt a legkisebb dózist jelöli, mely hatására klinikailag észlelhető tünet jelentkezik eritéma, ödéma, vagy a kettő együttes jelenlétének formájában. A legerősebb bőrreakció 48 óra elteltével jelentkezett az összes egértörzsben. Az eritéma objektív elemzését a Photoshop CS6 program

segítségével végeztük el fényképeken, leírására egy új paramétert, a relatív eritéma hányadost alkottuk meg, amelyet minden dózisonál értékeltünk. Az eritéma intenzitása szignifikánsan nagyobb volt a C57BL/6 és a Balb/c csoportokban, mint az SKH-1 egerekben, de a két szőrrel fedett egértörzs között nem volt szignifikáns különbség. A CRD értékű UVB besugárzás után nem volt szignifikáns különbség a CPD pozitív sejtek számában, ami azt igazolja, hogy ezek a dózisok sejt szinten is összehasonlítható fokú fénykárosodást eredményeznek, annak ellenére, hogy a dózisok abszolút értékei különbözőek.

A bőrödéma az eritémához hasonló fontosságú marker az egér bőrének UVB-sugárzásra mutatott reakciójában

A bőr vastagodásának numerikus leírása érdekében egy mérőszámot alkottunk, a bőrödéma hányadost. A C57BL/6 egerekben a bőrödéma aránya 1,46 volt, ami 46%-os vastagodást jelentett. A Balb/c és SKH-1 csoportokban a CRD-nél a megfelelő értékek 21% és 72% voltak. Ezenkívül a bőr vastagságát ex vivo optikai koherencia tomográfiával is meghatároztuk és azt találtuk, hogy az egér bőrének reakciója az UV-vel szemben jelentős fokú, dermiszre lokalizált ödémával jár a klinikailag releváns dózisban történő besugárzásnál. Amikor a bőr vastagodásának mértékét az OCT mérésekből számítottuk, hasonló értékeket találtunk, mint a tolómérővel történő méréseknél. A C57BL/6 egerek esetén a bőr vastagsága 1,61-szeresére növekedett, míg a Balb/c egerek CR dózisu besugárzása esetén 1,29-szeres növekedést mutattak. A legszembetűnőbb vastagságbeli változást az SKH-1 egereknél észleltük, 1,63-szoros értékkel

A bőrreakciókat a CRD besugárzásnál elemezve az alábbi különbségeket tapasztaljuk: az eritéma erősebb a Balb/c egereknél (52,85% eritéma vs 47,15% ödéma), míg a C57B/6 esetében (44,48% eritéma vs 55,52% ödéma) és az SKH-1 genotípusú egereknél az ödéma dominálja a kialakult bőrelváltozásokat (41,98% eritéma vs 58,02% ödéma).

A bőr vastagságának növekedése a gyulladással arányos klinikailag releváns dózisu besugárzás esetén

Mivel a bőrodéma nem látható az emberek bőrén végzett MED tesztek esetén, így tovább kívántuk ezt a jelenséget vizsgálni az általunk használt egérmodellek esetén. A CRD-vel besugárzott háti bőrfelületekből származó mintákat szövettani vizsgálatnak vetettük alá és az észlelt eltéréseket a kontroll hátbőrhöz hasonlítottuk. A gyulladás mértékét úgy számoltuk ki, hogy megszámláltuk a gyulladással sejtek számát az egyes törzsek CRD-nál történő besugárzása esetén. Az eredmények azt mutatták, hogy viszonylag kevés gyulladással sejt volt észlelhető a C57BL/6 (40 ± 10 gyulladással sejt/mm²) és Balb/c ($38 \pm 15,41$ sejt/mm²) egerekben. Ehhez képest szignifikánsan nagyobb fokú sejtes beszűrődést figyeltünk meg az SKH-1 csoportban ($332 \pm 136,63$ sejt/mm²). A legtöbb bőrt infiltráló sejt neutrofil leukocita volt, de limfociták is nagyobb számban voltak jelen. Az anti-CD3 immunhisztokémiai reakciót használva megerősítettük, hogy a dermiszbe történő limfocita beáramlás mértéke nagyobb volt a szőrtelen egereknél a CRD-nél is, mint a szőrrel fedett állatok esetén. A metszeteket toluidin-kékkel is megfestettük a masztociták kimutatására, azonban ezen sejtek száma nem mutatott növekedést az irradiált és nem irradiált bőrt összehasonlítva. A bőr vastagodásának mértékét a H&E-nel festett metszetekben az epidermisz és a

dermisz vastagságának mérésével is értékeltük. Ebben a vizsgálatban 1,45-szeres növekedést észleltünk a C57BL/6 egereknél és 1,29-szeres növekedés volt detektálható a Balb/c csoportban. A legnagyobb, 1,75-szeres ($SD \pm 0,20$) növekedést az SKH-1 törzsből lehetett megfigyelni. Az epidermiszt vizsgálva a legmarkánsabb hiperpláziát a szőrtelen egerekben észleltük: ez 2,26-szoros volt, szemben az 1,4-szeres értékkel a C57BL/6 egereknél és az 1,21-szeres változással a Balb/c csoportban.

48 órával az UV-besugárzás után az IL-1 β és IL-6 szintje jelentősen emelkedik

Annak érdekében, hogy azonosítsuk azt a fő szignált, ami a gyulladásos sejteket a bőrbe vonzza, az UV-besugárzott bőrmintákból meghatároztuk különféle citokinek szintjét. Az IL-1 β és IL-6 szintjében észleltük a besugárzás után a legjelentősebb változásokat. Magas dózisok mellett az IL-1 β volt az egyetlen vizsgált citokin, amely erősen szignifikáns növekedést mutatott a kontrollhoz képest minden genotípusban. Az IL-6 szint emelkedése csak a C57BL/6 egereknél volt szignifikáns, a maximális dózissal, 150 mJ/cm²-rel történő besugárzással 48 óra után. A genotípusok között nem volt további szignifikáns különbség, annak ellenére, hogy azok CRD értékei eltértek. A TNF- α , INF- γ , IL-10 és IL-17A citokinszintek nem mutattak pozitív korrelációt az UVB-vel. Ezeknél a citokineknél az ál-besugárzott csoportok alap expressziós szintje viszonylag magas volt, és a genotípusok között nem volt szignifikáns különbség.

2) CD8+ Lyp páciensek klinikai és szövettani vizsgálata

A LyP esetek klinikai áttekintése

A CTCL csoportján belül a LyP esetek többsége CD4+ immunfenotípusú, bár az elmúlt években leírásra kerültek ritkábban előforduló CD8+ esetek is. Klinikánk anyagát 2008-2015 között áttekintve 14 CD8+ LyP-ben szenvedő beteget sikerült azonosítanunk. A férfiak és nők aránya 1:1 volt, minden beteg fehér bőrű rasszba tartozott. A diagnózis felállításakor a betegek életkora 5 és 69 év között volt, 30,5 év medián értékkel. A betegség klinikailag eritémás, nekrotikus papulákkal jelentkezett, két esetben hólyagokat és eróziókat is lehetett észlelni a betegeken. Minden betegnél megfigyelhető volt a betegségre jellemző spontán regressziós hajlam, amit hosszabb–rövidebb tünetmentes időszak követett, majd a tünetek ismételten megjelentek. A kórképre általában jellemző módon minden betegnél több lézió jelentkezett egyszerre, a tünetek többnyire a törzsre és a végtagokra lokalizálódtak. A betegek közül 12-en kaptak kezelést: fototerápiát és/vagy lokális kortikoszteroidot. A klinikai gyakorlatban azt látjuk, hogy a LyP diagnózis felállítása gyakran nehezen történik meg, 13 betegnél a klinikai tünetek megjelenése és a szövettani diagnózis között eltelt idő 1-7 hónap volt (átlag $2,62 \pm 2,26$ hónap). A betegeknek nem voltak kapcsolódó szisztémás tüneteik, nem észleltünk kóros morfológiájú nyirokcsomót, illetve kizárható volt a perifériás vér vagy a belső szervek érintettsége. Két betegnél társult limfoproliferatív alapbetegség a LyP-hez. Egy páciens esetén korábban diagnosztizáltak CLL-t, ami szövettanilag is verifikált nyirokcsomó érintettséggel járt. Egy másik páciensnek már korábban igazolásra került MF, 1B stádiumban, CD8 pozitív/CD30 negatív immunfenotípussal. Az MF diagnózis felállítása után 8 évvel a combra lokalizált papulákkal jelent meg nála a LyP. Két beteg esetén diagnosztizáltak prosztatarákot a LyP követése során. A LyP

kezelését áttekintve azt láttuk, hogy a betegség többnyire a kezelés mellett mutatott regressziót. A betegek lokális szteroidokat, illetve fototerápia különböző formáit kapták. 2 esetben kezelés nélkül oldódott meg, bár otthoni napozást javasoltunk a betegeknek. Ezek a betegek a későbbiekben sem igényeltek kezelést. A közlemény publikálásakor az összes beteg életben volt, az utánkövetés időtartama 5-74 hónap volt (átlag 25,69 hónap).

Hisztopatológiai értékelés

Egy A típusú LyP esetet találtunk, melyre az volt jellemző, hogy kis limphoid sejtek enyhe epidermotropizmust mutatnak és a dermiszben nagyszámú szétszórt atípusos nagy sejt van jelen egy jórészt reaktív gyulladásos sejtekből álló alap mellett. Ez a háttér gyulladás főleg kicsi limphoid sejtekből és A típusú LyP-hez hasonló hisztocitákból állt. Eozinofilek és neutrofilek itt nem voltak jelen. A 14 esetből 4 esetben LyP B igazolódott: a minták szövettani megjelenése lényegében nem volt megkülönböztethető a CD8-pozitív MF-től. Itt a H&E festéssel mérsékelt epidermotropizmust mutató kicsi, enyhén atípusos tumorsejteket, és dermisz felső részében sávszerűen elhelyezkedő vagy perivaszkuláris infiltrátumot észleltünk. Három fiatalkori esetünk közül kettő ebbe az MF-szerű szövettípusba tartozott. Egy esetet leginkább a dermiszben lévő anaplasztikus nagysejtek tömeges jelenléte jellemezte. Ezek a sejtek eozinofilekkel keveredtek és minimális epidermotropizmust mutattak. Ez az eset C típusú LyP-k közé volt besorolható. Hét esetről a D típusú LyP típusos mikroszkopikus tulajdonságai voltak megfigyelhetők. Ezek az alábbiak voltak: epidermális hiperplázia és atípusos kicsi és közepes méretű sejtek jelenléte igen kifejezett

epidermotropizmussal, enyhe nukleáris atípiával. A fentiek esetenként parakeratózissal társultak, máshol spongis, a bazális keratinociták vakuoláris degenerációja és ulceráció is megfigyelhető volt. A dermális infiltrátum ék alakú volt, helyenként kifejezett perivaszkuláris jelleggel. A 7-ből kettő esetben a bőr alatti zsírba terjedve, többnyire kicsi, reaktív limfoid sejtekből álló, szétszórt atípusos infiltrátumot észleltünk közepes méretű sejtekkel és néhány nagy sejt aggregátumával. A hisztociták száma alacsony volt, a plazmasejtek hiánya állandó jellegzetességként jelen volt, az eozinofilek pedig csak egy esetben voltak megtalálhatók. Egy esetben fordult elő, hogy ék alakú dermiszbe terjedő infiltrátum volt észlelhető perifollikuláris beszűrődéssel és erős follikulotropizmust mutató sejtekkel, viszont follikuláris mucinosis és kifejezett epidermotropizmus nélkül. Ezek az eltérések leginkább az F típusú LyP-re jellemzőek, kissé a D típus jegyeivel keveredve.

Immunhisztokémiai vizsgálatok eredményei

Az atípusos limfoid sejtkeponens minden vizsgált esetben CD8 pozitív volt. Az anyagunk 14 esetéből 12-nél a sejtek 10–70%-a emellett CD30 pozitívást is mutatott. A CD30 pozitív sejtek mind a dermiszben, mind az epidermiszben láthatóak voltak a 14-ből 9 esetben. Egy páciensnél kizárólag a dermiszben és két esetben csak az epidermiszben voltak ilyen sejtek. Két B típusú eset CD30 negatív volt. A kis és közepes méretű epidermiszt infiltráló sejtek CD30 expressziója D és B típusokban minden esetben gyengébb volt a CD30-cal pozitívan festődő sejtekben, mint az A és C típusú dermális nagysejtek CD30 expressziója. Két esetben az intraepidermális atípusos sejtek gyengén expresszálták a CD4-et a sejtek 10-20%-ában.

A CD7 expresszió eltűnése csak egy esetben volt látható. A CD2 és CD5 expresszió megőrzött volt az összes vizsgált esetben. Az összes vizsgált esetből csak egy volt, ahol nem észleltünk legalább egy citotoxikus marker pozitivitását (TIA-1 vagy granzyme-B). Egyedül egy páciensnél nem volt egyik sem megfigyelhető. A PD1 expresszió 12 esetből 3-nál volt kimutatható és az expresszió nem volt egy szövettani típushoz sem köthető. Legalább fokális MUM1 expressziót 12 esetünk közül 9-nél találtunk, azonban 12 eset közül csak 2-nél volt a sejtek több mint 20 %-a pozitív, 2 további esetben 15-20% között volt a MUM1 antigént expresszáló sejtek aránya. A D típusú LyP esetek egyike sem mutatott értékelhető MUM1 expressziót.

Molekuláris vizsgálatok

A T-sejt receptor gén-átrendeződésének vizsgálatát 6 esetben tudtuk elvégezni. Monoklonális T-sejt génátrendeződést 3 esetben, míg a poliklonális jelleget a fennmaradó 3 esetben észleltünk. Annál az esetenél, akinél korábban MF diagnózis volt felállítható, klonális T-sejtpopulációt egyetlen mintában sem detektáltunk.

A CD8+ LyP kezelésében fototerápiával elért eredményeink

Az általunk gondozott és követett 14 páciens kezelésében 7 esetben alkalmaztunk fototerápiát. Azon betegek esetén, aki fototerápiát kapott, lényegesen hosszabb utánkövetési időről van adatunk. Náluk az átlagos követési idő 32,7 hónap volt szemben a fototerápiát nem kapó páciensek 17,5 hónapos átlagával. A követés során azt látjuk, hogy a fototerápiában részesült betegek közül 7 esetből 6-nál teljes válasz (CR), 1-nél parciális válasz (PR) alakult ki.

5. Következtetések

1) Egyszeri UVB- sugárzás vizsgálata egérbőrön

Elsőként vizsgáltuk különböző genotípusú egerek bőrének a válaszát egyszeri UVB besugárzás hatására standard körülmények között, in vivo és in vitro. Megállapítottuk, hogy a különböző egértípusok eltérő klinikai tünetet produkálnak ugyanolyan dózisu UVB irradáció után.

Megfigyeltük, hogy a fekete szőrű C57BL/6 egerek érzékenyebbek az UV besugárzásra, mint az albínó Balb/c és szőrtelen SKH-1 genotípusú egerek. Esetükben a látható bőrtünet kialakulásához szükséges UVB dózis 41,4 mJ/cm² volt, melyhez képest Balb/c egerekben 31%-kal, SKH-1 egerekben 120%-kal volt szükség nagyobb dózisa ahhoz, hogy klinikailag észlelhető bőrtünet kialakuljon.

Igazoltuk, hogy egér bőrének vizsgálatakor a MED terminológia elégtelen a valós klinikai megfigyelések leírására, mivel az egér bőrének reakciója jelentős fokú ödémából is állhat, genotípustól függően.

Megalkottunk egy új fogalmat, a klinikailag releváns dózist (CRD), mely fogalom definíciónk szerint az a legalacsonyabb dózis, ahol az eritéma vagy az ödéma először látható egyszeri UVB irradáció után. Javasoltuk, hogy ez a terminológia kerüljön használatra a MED helyett az egereken végzett kísérleti rendszerekben.

A klinikailag releváns dózissal végzett besugarozást követően nem csak a bőrvastagság növekszik, hanem a gyulladásosejtek száma is emelkedik. A legtöbb bőrt infiltráló sejt neutrofil leukocita és limfocita volt vizsgálataink szerint. A szőrtelen SKH-1 csoportban volt észlelhető a legnagyobb mértékű sejtbeszűrődés.

Az UVB-vel irradiált bőrminták citokin szintjeit vizsgálva arra a következtetésre jutottunk, hogy az IL-1 β szintje a kontrollhoz képest minden genotípusban növekszik mind CRD, mind a maximális, 150 mJ/cm²-es besugárzás után. Egy másik citokin, az IL-6 is szintje is emelkedik, azonban kizárólag a C57/BL6 genotípusú egereknél, a maximális dózisú irradiáció után. Ez a megfigyelés alátámasztja az IL-1 β univerzális, illetve az IL-6 genotípus specifikus szerepét az akut UVB által kiváltott gyulladásban.

Annak ellenére, hogy jelentős eltérés volt az egyes törzsek UV-toleranciájában, azaz a minimálisan észlelhető bőrelváltozásokhoz szükséges UV sugárzás dózisában, nem észleltünk szignifikáns eltérést a citokinek expressziós szintjében a vizsgált törzsek között. Ebből következően a CRD értékénél észlelt klinikai különbségek nem magyarázhatók a citokinek expressziójában észlelt különbségekkel.

Megállapítottuk, hogy a citokinszintek egerekben bekövetkező változásai hasonlóak az emberi UVB kísérletekben tapasztaltakhoz.

Megállapítottuk, hogy a humán bőr fiziológiás reakcióinak a modellezéséhez a C57BL/6 egér törzs használata a legmegfelelőbb, mivel esetükben főként eritémával járó reakció volt észlelhető az irradiáció után, csakúgy, mint az emberi bőrben.

2) CD8+ Lyp páciensek klinikai és szövettani vizsgálata

A Klinikánkon 14 olyan páciens esetét találtuk, akiknél a LyP ritka, CD8 pozitív variánsa került diagnosztizálásra. Bár a CD8+ esetek definíció szintjén D típusba sorolhatók, nem

tartozott minden esetünk ebbe a típusba az észlelt szövettani jellegzetességek alapján.

A páciensek klinikai adatainak feldolgozásával, hosszú időtartamú követésével megállapítottuk, hogy a fototerápia hatékony kezelési mód a CD8+ LyP típusok esetén.

Megfigyeltük, hogy mind a CD4+, mind a CD8+ Lyp klinikai tüneteinek megjelenése és dinamikája hasonló. A CD8+ Lyp egyes hisztológiai típusai esetén nem észleltünk különböző klinikai megjelenést, vagy a terápiára adott eltérő választ.

Áttekintettük a betegek szövettani jellemzőit is, típusok szerinti besorolását és a LyP klasszifikáció pontosítására tettünk javaslatot. Meglátásunk szerint a D típusú Lyp és a CD8 pozitivitás definíció szintjén történő összekapcsolása nem tanácsos, mert számos egyéb altípusnak (A-C típusnak) is létezik CD8+ variánsa. Azt javasoljuk, hogy a D típust az olyan CD8+ Lyp-re használjuk, amelyik a primer cutan agresszív epidermotrop T-sejtes lymphoma morfológiájával bír, hogy átláthatóbbá tegyük a hisztopatológiai felosztást, ezáltal a diagnosztikát.

Megállapítottuk, hogy a CD8+ bőrbetegség végleges diagnózisában a kórszövettani tulajdonságok ugyan fontosak, de a klinikai megjelenés és a betegség lefolyásának a követése az, ami a hasonló megjelenésű kórképek közül a helyes diagnózist meghatározza. Hangsúlyoztuk a követés fontosságát ezen páciensek között, az esetlegesen társuló másik malignitás mielőbbi diagnosztizálásának céljából. Pácienseink közül négy esetben figyeltünk meg társuló onkológiai betegséget, közülük két esetben az irodalomban ritkaságnak számító prosztatata karcinómát.

Ismereteink szerint mi közöltük le elsőként az F típusú lymphomatoid papulosis CD8 pozitív variánsának esetét.

6. Saját publikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények:

Gyöngyösi, N., Lőrincz, K., Keszeg, A., Haluszka, D., Bánvölgyi, A., Tátrai, E., Kárpáti, S., Wikonkál, N. M. (2016) Photosensitivity of murine skin greatly depends on the genetic background: clinically relevant dose as a new measure to replace minimal erythema dose in mouse studies. *Experimental Dermatology*, 25(7): 519–525.

IF: 2,532

Marschalkó, M., **Gyöngyösi, N.,** Noll, J., Károlyi, Z., Wikonkál, N., Hársing, J., Kuroli, E., Csomor, J., Matolcsy, A., Sarolta, K., Szepesi, Á. (2016) Histopathological aspects and differential diagnosis of CD8 positive lymphomatoid papulosis. *Journal of Cutaneous Pathology*, 43(11): 963–973.

IF: 1,317

A disszertációtól független közlemények:

Bánvölgyi A, Lőrincz K, Kiss N, Avci P, Fésűs L, Szipőcs R, Krenács T, **Gyöngyösi N,** Wikonkál N, Kárpáti S, Németh K. Efficiency of long-term high-dose intravenous ascorbic acid therapy in locally advanced basal cell carcinoma – a pilot study *Postepy Dermatologii i Alergologii - Advances in Dermatology and Allergology*

IF: 1,471

Kiss N, Avci P, Bánvölgyi A, Lőrincz K, Szakonyi J, **Gyöngyösi N,** Fésűs L, Lee G, Wikonkál N. (2019) Intralesional therapy for the treatment of keratoacanthoma. *Dermatologic Therapy*, 13:12872.

IF: 1,74 (2018)

Kiss N, Haluszka D, Lőrincz K, **Gyöngyösi N,** Bozsányi Sz, Bánvölgyi A, Szipőcs R, Wikonkál N. (2019)

Quantitative analysis on ex vivo nonlinear microscopy images of basal cell carcinoma samples in comparison to healthy skin
Pathology and Oncology Research, 25(3):1015-1021.

IF: 1,935

Lorincz K, Haluszka D, Kiss N, **Gyöngyösi N**, Banvolgyi A, Szipocs R, Wikonkál NM. (2017) Voluntary exercise improves murine dermal connective tissue status in high-fat diet-induced obesity. Archives of Dermatological Research 309(3):209-215.

IF: 2,148

Haluszka D, Lőrincz K, Kiss N, Szipőcs R, Kuroli E, **Gyöngyösi N**, Wikonkál NM. (2016) Diet-induced obesity skin changes monitored by in vivo SHG and ex vivo CARS microscopy. Biomedical Optics Express 7(11):4480-4489.

IF: 3,337

Lőrincz K, Kiss N, **Gyöngyösi N**, Wikonkál NM. (2016) Hidradenitis suppurativa, az újra felfedezett betegség
Bőrgyógyászati és Venerológiai Szemle, 92(5):209-213.

Gyöngyösi N, Lőrincz K, Mihály E, Herszényi L, Tulassay Zs, Wikonkál N. (2015) A gyulladáshoz kapcsolódó bélbetegségek immunszuppresszív és az anti-TNF-alfa-kezelésének bőrgyógyászati mellékhatásai Magyar Belorvosi Archívum, 68(1):34-45.

Gyöngyösi N, Timár B, Hársing J, Csomor J, Szepesi Á, Kárpáti S, Marschalkó M. (2015) CD8 pozitív mycosis fungoides. Bőrgyógyászati és Venerológiai Szemle, 91(1): 48-51.

Gyöngyösi N, Lőrincz K, Kárpáti S, Wikonkál N. (2013) Infliximabterápia mellett jelentkező lupus erythematosus
Orvosi Hetilap, 154(15): 590–598.