

# T sejt és kemokinek változásának vizsgálata SLE pulmonalis manifesztációjában

Doktori tézisek

**dr. Vincze Krisztina**

Semmelweis Egyetem  
Klinikai orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Müller Veronika, DSc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Tamási Viola Ph.D., egyetemi docens  
Dr. Bogos Krisztina, Ph.D., osztályvezető főorvos

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Buzás Edit, DSc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Múzes Györgyi, Ph.D., egyetemi docens  
Dr. Böszörményi Nagy György, Ph.D., egyetemi tanár

Budapest  
2017

## 1. BEVEZETÉS

A szisztémás lupus erythematosus (SLE) az egyik leggyakoribb autoimmun poliszisztémás megbetegedés. Főként a reprodukív korban lévő, ezen belül leginkább nőket érintő betegség. Klinikai tünetei nagyon változatosak, mely mellé jellegzetes immunszerológiai eltérések is társulnak. Magyarországon az SLE betegek száma kb. 5-6000 főre tehető. A betegség prognózisa nagyban függ a nemtől, életkortól, szervi érintettségtől, akut gyulladás valamint az irreverzibilis szervkárosodás mértékétől. SLE diagnózisa egy nemzetközi SLE kutató munkacsoport 2012-ben revideált SLICC/ACR kritériumrendszere alapján történik: 4 kritériumnak kell teljesülni a diagnózishoz, melyből minimum egy kritérium klinikai és további minimum egy kritérium immunoszerológiai eltérés. A kezelés kialakításában legfőbb szempont a szervi manifesztációk fennállása, gyulladásos aktivitás igazolása valamint az irreverzibilis szervkárosodás mértékének felmérése. SLE terápiájában elsődleges az immunszuppresszív kezelés, a legújabb ajánlások a szervi érintettség szerinti különböző terápiás irányelveket fogalmaznak meg.

SLE-ben a pulmonalis manifesztáció gyakoriságáról kevés irodalmi adat áll rendelkezésünkre, megközelítőleg az SLE betegek 4,9-30%-a közé tehető az érintettek aránya. Egy felmérésben igazolták, hogy pulmonalis tünetek kb. 48%-ban jelentkeztek SLE-s betegekben. A diagnosztikus kritériumrendszerben is szereplő serositis kiemelt fontosságú tüdőgyógyászati szempontból, mint az egyik leggyakoribb pulmonalis érintettség. Gyakran első tünetként is jelentkezhet, pleuralis folyadékkal társulva. A mellkasi fluidum antinuclearis antitest (ANA) és dupla szálú (ds)DNS antitest kimutatása diagnosztikus értékű. Az SLE betegek kevesebb, mint egyötödében jelenkezik vascularis manifesztáció, mely főként a pulmonalis hypertonia, pulmonalis

embolia, pulmonalis vasculitis és az extrém ritka az acut reverzibilis hypoxaemia. Parenchymalis eltérések közül a súlyos, gyakran letális acut lupus pneumonitis és interstitialis tüdőbetegség (ILD) említendő. A légúti manifesztációk közül az acut cricoarytenoiditis, valamint az alsó légúti bronchiectasia és bronchiolitis obliterans jelenhet meg. A viszonylag ritka, de SLE-re jellemző muszkulosceletális érintettség a shrinking lung szindróma (SLS).

Mint a többi autoimmun szisztémás betegségben, SLE-ben is igazolták a T helper (Th)1/Th2 sejtarány, valamint Th17/Tregulátorikus (Treg) sejtarány eltolódását. Az autoimmun betegségek szervi érintettsége szempontjából kiemelt jelentőségű a lokális környezet citokin/kemokin miliója a Th0 sejtek polarizálódása szempontjából. Az egyes autoimmun betegségekben akár szervspecifikusan változhat a domináns Th sejt subpopuláció, az általa közvetített immunválasz, valamint a termelt citokin és kemokin mintázat. SLE-ben perifériásan Th1 sejt dominanciája igazolható, továbbá Th1 asszociált citokin (TNF- $\alpha$ , INF $\gamma$ )/kemokin (IP-10, MCP-1) termelődés emelkedése. Ezzel párhuzamosan a Th2 sejtek csökkent szintje igazolható. Az autoimmun folyamatokban a Th17 sejtek emelkedett szintje, valamint emelkedett proinflammatorikus citokin (IL-17, IL-21, IL-22, IL-23) szintjei igazolódtak. A Treg sejtek rendkívül fontos szerepet töltenek be SLE pathogenezisében, de nem egyértelműek az irodalmi adatok a perifériás vér sejttség változásának tekintetében. Vizsgálataink az SLE tüdőérintettségre, továbbá az adaptív immunválasz T sejttes elemeinek eltéréseire irányultak SLE pulmonalis manifesztációjával rendelkező betegcsoportokban.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

1. Az SLE milyen pulmonalis manifesztációkkal jár együtt, főként mely korosztály érintett és mik a pulmonalis manifesztációval járó SLE legfontosabb klinikai tünetei?
2. SLE pulmonalis manifesztációval járó eseteiben milyen funkcionális eltérések jelentkeznek a pulmonalis manifesztációt nem mutató SLE betegekhez képest?
3. A perifériás vérben hogyan változik a Th1, Th2, Th17 és Treg sejtek aránya SLE pulmonalis manifesztációval járó és nem járó eseteiben?
4. Igazolható-e összefüggés perifériás Th sejtek változása és a funkcionális eltérések között SLE pulmonalis érintettsége kapcsán?
5. Milyen perifériás vér citokin/kemokin változásokkal jellemezhető az SLE pulmonalis manifesztációja?

### 3. MÓDSZEREK

#### Betegcsoportok

Vizsgálatunk első részében 28 SLE beteget vontunk be, akinek az átlag életkora  $35,4 \pm 2,9$  év volt. Ezen belül két csoportot vizsgáltuk: a pulmonalis manifesztációval rendelkező SLE betegek ( $SLE_{pulm}$ ) és a azon SLE betegek, akiknek nem volt pulmonalis érintettsége ( $SLE_c$ ).  $SLE_{pulm}$  csoportban az átlag életkor, az SLE diagnózis felállításakor életkor, továbbá a dohányzók száma magasabb volt, illetve több betegnél volt magas az SLE aktivitását jellemző SLEDAI pontszám az  $SLE_c$  csoporthoz képest. Mindkét csoportban tartósan methylprednizolonnal kezelt SLE-s betegek voltak, azonban a napi szteroid dózisa  $SLE_{pulm}$  csoportban szignifikánsan magasabb volt. A T sejt subpopuláció meghatározáshoz 22 SLE-s beteget vontunk be.  $SLE_{pulm}$  csoportban (N=9, átlag életkor:  $44,0 \pm 4,7$  év, nő/férfi arány: 7:2) többen dohányoztak, magasabb volt SLEDAI pontszám, mint  $SLE_c$  csoportban (N=13; átlag életkor:  $24,8 \pm 3,7$  év, nő/férfi arány: 10:3). A perifériás T sejt meghatározásnál 40 korbán és nemből illesztett egészséges kontroll mintái alapján értékeltük az eltéréseket. A szérumban citokin és kemokin meghatározás vizsgálatában 9  $SLE_{pulm}$  (átlag életkor:  $38,23 \pm 5,46$ , nő/férfi arány: 7:2,) páciens adatait 9  $SLE_c$  csoport (átlag életkor:  $50,48 \pm 2,69$ , nő/férfi arány: 9:0) adatait, valamint 9 korbán és nemből illesztett egészséges kontroll páciens adatait elemeztük.

#### Általános pulmonológiai vizsgálatok

Az SLE betegnél minden esetben részletes anamnézis felvétel mellett a pulmonológiai panaszok kikérdezése történt fizikális vizsgálattal. Emellett mellkasi röntgen, mellkasi átvilágítás, vérgáz (Stat Profile® pHox Plus®, Nova

Biomedical Corporation, Waltham MA, USA) és légzésfunkciós és diffúziós kapacitás mérés (Elektromos spirométer és testpletizmográf PDD-301/s, Piston, Budapest, Hungary), EKG és laboratóriumi vizsgálatok.

### **T sejt subpopuláció meghatározás mérések**

A laboratóriumi vizsgálatok során plusz 1 cső nátrium-heparinizált vénás vérmintát vettünk az SLE betegektől és az egészséges kontroll pácienseitől. A perifériás vér mononuklearis sejtjeinek (PBMC) izolálása után az előírt tisztításokat követően  $-80^{\circ}\text{C}$ -ra fagyasztottuk a mintákat a mérésig. Felolvasztást követően a fehérvérsejteken sejtfelszíni festést alkalmaztunk.

**1.táblázat. A CD4+ T sejt identifikálásához tartozó sejtfelszíni festékeket tartalmazó panel.**

| <b>Festék</b> | <b>FITC</b> | <b>PE</b> | <b>PECy5/PerCP</b> | <b>PECy7</b> | <b>APC</b> | <b>APCCy7</b> |
|---------------|-------------|-----------|--------------------|--------------|------------|---------------|
| <b>Th1</b>    |             | CCR4      | CD62L              | CD4          | CXCR3      | CD8           |
| <b>Th2</b>    | CD45RA      | CD45RO    | HLA-DR             | CD4          | CD69       | CD8           |
| <b>Th17</b>   |             | CCR4      | CCR6               | CD4          | CXCR3      | CD8           |
| <b>Treg</b>   | CD25        |           |                    | CD4          | CD127      | CD8           |

Az áramlási citometriai mérések a Semmelweis Egyetem I. sz. Gyermekgyógyászati Klinika, MTA Gyermekgyógyászati és Nefrológiai Kutatócsoport laboratóriumában történtek. Áramlási citométerrel (BD FACS Aria, Beckton Dickinson & Co, Plymouth, UK) történt az egyes immunsejt subpopulációk előfordulási gyakoriságának meghatározása. A mérési eredményeket dot-plot valamint hisztogram segítségével tudtuk ábrázolni. A hisztogramon a sejtek megoszlását ábrázoltuk a jelintenzitás alapján.

## **Plazma citokinek/kemokinek vizsgálata**

A perifériás vérből nyert plazmákat -80 C-on fagyasztva tároltuk, majd közvetlenül a mérések előtt használtuk fel. A mérések a Semmelweis Egyetem III. sz. Belgyógyászati Klinika Kutatólaboratóriumában zajlottak. A plazma citokin és kemokin szint meghatározásához előre gyártott Cytokine Antibody Array Kiteket (RayBiotech Inc., Norcross, GA, USA) használtunk. Egy array-n párhuzamosan több faktort tudunk mérni, az általunk meghatározott panel a következőket tartalmazta: 4BB-1, interferon gamma-indukálta fehérje 10 (IP-10), interleukin-12 , p70 (IL12p70), interleukin-17 (IL-17), CC kemokin ligand 14a (CCL14), CC kemokin ligand 21 (CCL21), CC kemokin ligand 28 (CCL28), monocyta kemotaktikus fehérje 1 (MCP-1), monocyta kemotaktikus fehérje 4 (MCP-4), interferon-indukálta T sejt alpha kemoattraktáns (I-TAC). Jelintenzitásokat rögzítettük és egy kemiluminescens képalkotó rendszer (Syngene Chemigenius 2 and GeneTools, Synoptics Ltd. Cambridge, UK) segítségével válogattuk szét az adatokat.

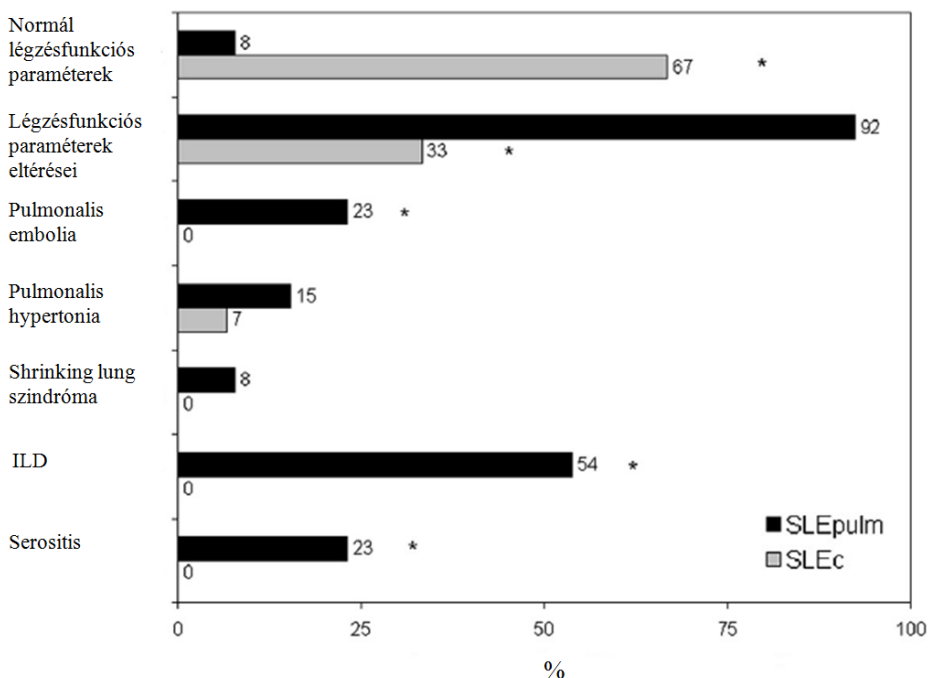
## **Statisztikai analízis**

A statisztikai analízis a GraphPad (Graph Pad Prism 5.0 by Graph Pad Software Inc., San Diego, USA) szoftver segítségével történt. A normál eloszlású adatokat egymintás t-tesztel és ANOVA-val elemeztük. Amennyiben az ANOVA teszt alapján szignifikáns különbséget találtunk ( $p < 0,05$ ), akkor a Neuman-Keuls többszörös összehasonlítású post-hoc tesztet használtuk a további elemzéshez. Kategórikus adatok analizálására a  $\chi^2$  vagy a Fisher-egzakt tesztet alkalmaztuk. Két csoport esetén a parametrikus adatok összehasonlítására a t-tesztet használtuk. Az adatokat átlag  $\pm$  átlag szórása (SEM) formában adtuk meg, más adat esetén ezt külön jelöltük. A  $p < 0,05$  értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1. SLE PLEUROPULMONALIS MANIFESZTÁCIÓJA

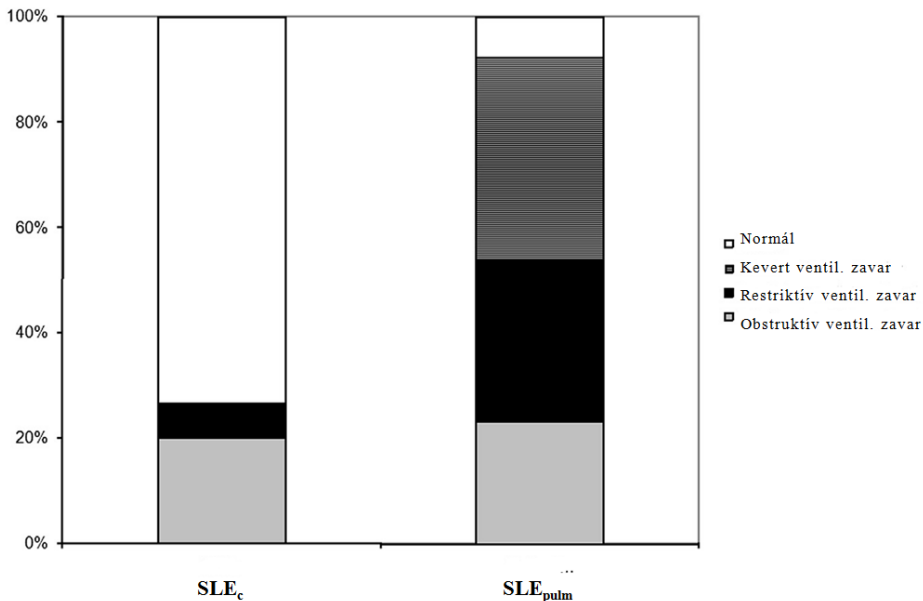
Az SLE<sub>pulm</sub> csoportban jelentősen több tünetet, valamint oxigenizációs (pO<sub>2</sub>) csökkenést észleltünk szemben SLE<sub>c</sub> csoport tagjai között (Terhelési dyspnoe SLE<sub>pulm</sub>: 85% vs. SLE<sub>c</sub>: 7%; pO<sub>2</sub> SLE<sub>pulm</sub>: 70,23±3,51 Hgmm vs. SLE<sub>c</sub>: 92,73±2,28 Hgmm). Szignifikánsan magasabb számban találtunk serositist, SLS-t, pulmonalis vascularis érintettséget az SLE<sub>pulm</sub> csoportban, ugyanakkor a legkifejezettebb különbség a légzésfunkciós eltérés arányában (SLE<sub>pulm</sub>: 92% vs SLE<sub>c</sub>: 33%; p<0,0001) és ILD előfordulásában (SLE<sub>pulm</sub>: 54% vs. SLE<sub>c</sub>: 0%; p<0,0001) mutatkozott (1. ábra).



1.ábra. SLE<sub>pulm</sub> és SLE<sub>c</sub> betegek pulmonalis manifesztáció megoszlása.

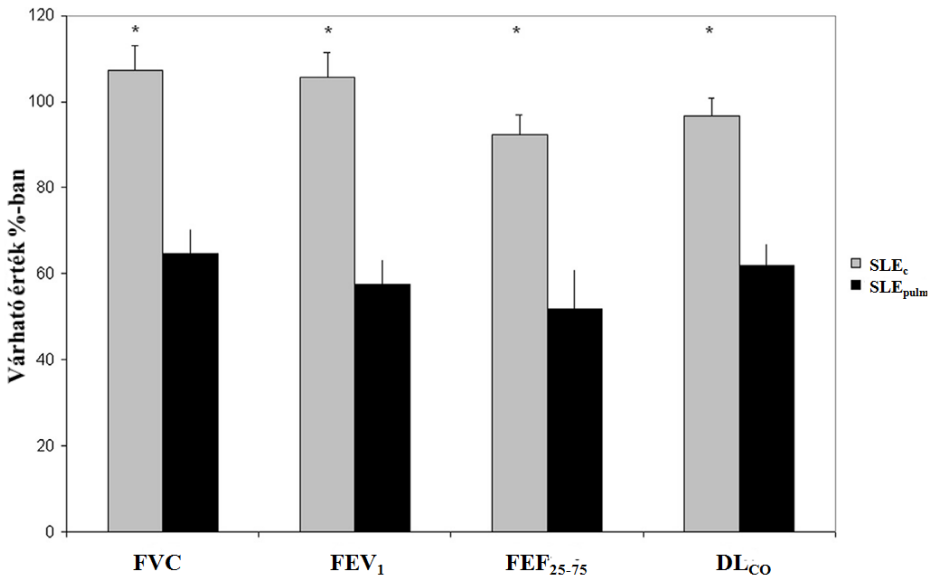
\* p<0,0001 vs. SLE<sub>pulm</sub>.





**2.ábra. Légzésfunkciós ventilációs zavarok megoszlása SLE<sub>c</sub> és SLE<sub>pulm</sub> csoportokban.  $p=0,0018$  vs. SLE<sub>pulm</sub>.**

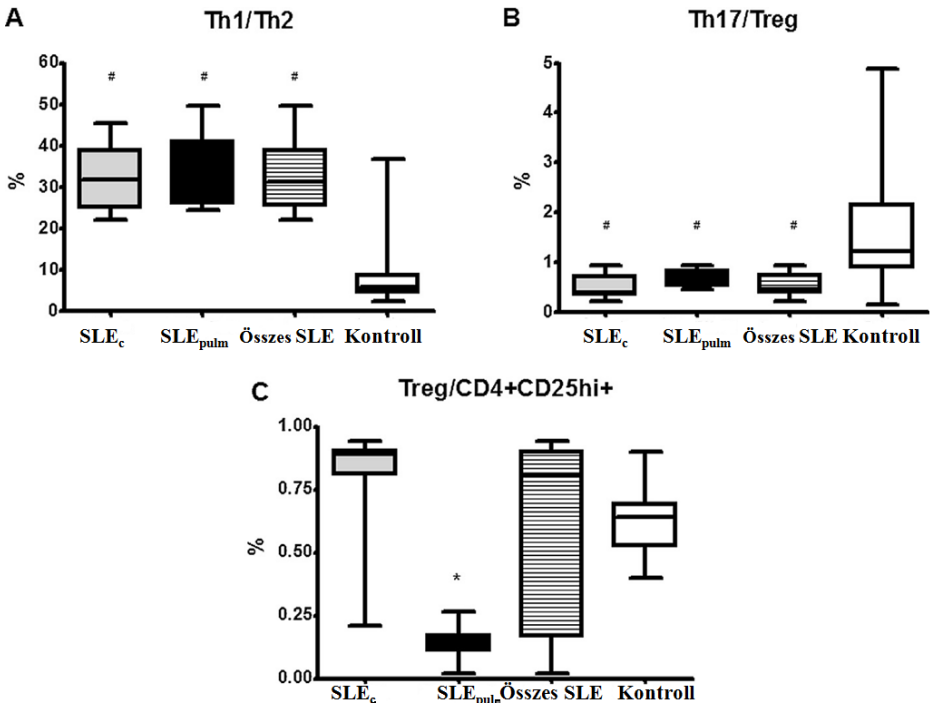
Szignifikánsan alacsonyabb értékeket mértünk a forszírozott vitál kapacitás (FVC), a másodperc alatt kilélegzett levegő volumen (FEV<sub>1</sub>) és maximális kilégzési áramlás (FEF<sub>25-75</sub>) paraméterek tekintetében az SLE<sub>pulm</sub> csoportban, mint SLE<sub>c</sub> csoportnál. A szénmonoxid diffúziós kapacitás (DL<sub>CO</sub>) (96,7±4,1 vs. 61,8±5,1;  $p<0,01$ ) és KL<sub>CO</sub> (102,9±7,1 vs. 72,5±3,4;  $p<0,01$ ) értékek is szignifikánsan alacsonyabbak voltak az SLE<sub>pulm</sub> csoportban, mint SLE<sub>c</sub> betegeknél (3.ábra).



**3.ábra. Légzésfunkciós paraméterek SLE<sub>c</sub> és SLE<sub>pulm</sub> csoportban.** Átlag ± SEM értékek láthatók az alábbi paraméterekre: FVC %, FEV<sub>1</sub>%, FEF<sub>25-75</sub>% és a DL<sub>CO</sub> %-os értéke. \* p < 0,05 vs. SLE<sub>pulm</sub>.

#### **4.2. CD4+ TH SEJT SUBPOPULÁCIÓK MEGOSZLÁSA SLE-S BETEGEKBEN**

A Th1 sejtek prevalenciájában nem volt különbség az SLE páciensek csoportjai és az egészségesek között, viszont a Th2 sejtek számában jelentős csökkenés volt mérhető egészségesekhez képest. Ennek eredményeként a Th1/Th2 aránya emelkedett SLE-ben a kontroll csoporthoz képest. Nem volt azonban különbség a Th1, Th2 subpopuláció vagy a Th1/Th2 egyensúly tekintetében az SLE<sub>pulm</sub> és SLE<sub>c</sub> csoportja között (4. ábra A része).

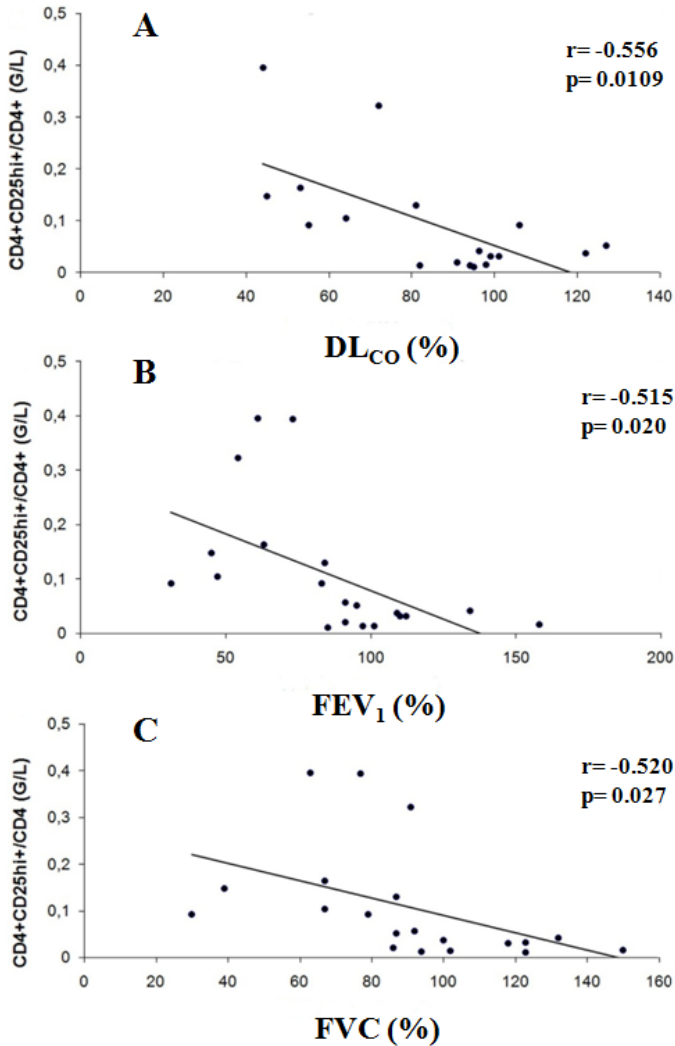


**4.ábra. [A]: Th1/Th2 sejt prevalenciája; [B]: Th17/Treg sejt prevalenciája; [C]: Treg/CD4+CD25hi+ sejt prevalenciája az SLE<sub>c</sub>, SLE<sub>pulm</sub>, az összes SLE-s csoportban és kontrollcsoportban. \*p<0,05 vs. SLE<sub>pulm</sub>; # p < 0,05 vs. kontrollcsoport.**

Szignifikánsan alacsonyabbnak mértük a Th17 és Treg prevalenciáját mindkét SLE csoportban a kontrollcsoportéhoz képest. Érdekes, hogy SLE páciensekben Th17/Treg alacsonyabb értéket mutatott, mint az egészséges kontrollban (4. ábra B része). További elemzéssel igazoltuk, hogy a CD4+CD25hi+ sejtek prevalenciája szignifikánsan magasabb az SLE<sub>pulm</sub> csoport tagjainál, mint SLE<sub>c</sub> vagy kontroll csoportban. Hasonlóan csökkent a

CD4+CD25hi+ sejtek Treg sejtekhez viszonyított aránya az SLE<sub>pulm</sub> csoport tagjainál, mint SLE<sub>c</sub>, illetve kontroll csoportban (4.ábra C része).

Szignifikáns összefüggést igazoltuk a FVC, FEV<sub>1</sub> és DL<sub>CO</sub>, valamint a CD4+CD25hi+ vagy Treg/CD4+CD25hi+ arány között (5.ábra).



5.ábra. Korreláció az összes SLE-s beteg légzésfunkciós paramétereit és CD4+CD25hi+ sejt számait és Treg/CD4+CD25hi+ arányát között.

[A]: DL<sub>CO</sub> (referencia %-os értéke); r=-0,556, p=0,0109;

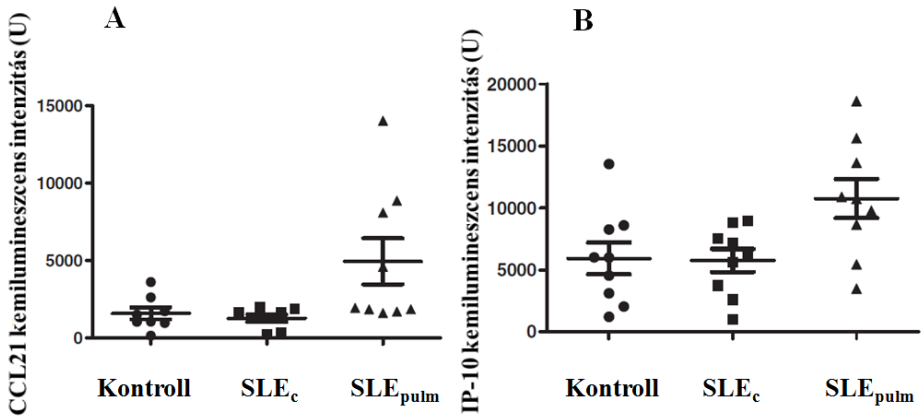
[B]: FEV<sub>1</sub> (referencia %-os értéke); r=-0,515, p=0,020;

[C]: FVC (referencia %-os értéke); r=-0,520, p=0,027.

### **4.3. CITOKIN/KEMOKIN SZINT VÁLTOZÁSA SLE<sub>Pulm</sub> ÉS SLE<sub>c</sub> CSOPORTBAN**

A microarray mérése során számos citokin és kemokin plazma szintje (pl.: 4BB-1, IL12p70, IL-17, CCL28, MCP-4 és I-TAC) a kimutathatósági határérték alatt volt. Emiatt csak CCL21, IP-10, MCP-1 és CCL14 adatait értékeltük.

A 6. ábra mutatja, hogy a CCL21 kemolumineszcens intenzitása szignifikánsan magasabbnak bizonyult az SLE<sub>pulm</sub> csoportban, mint SLE<sub>c</sub> páciensek és kontroll egyének esetén (4949±1481 vs. 1272±236,1 vs. 1581±382,1 U; p<0,05) (6. ábra A része). A keringő IP-10 kemilumineszcens intenzitása szignifikánsabb magasabb volt az SLE<sub>pulm</sub> csoportban, mint SLE<sub>c</sub> és a kontroll csoportban (5923±1278 vs. 5759±926 vs. 10762±1584 U; p<0,05) (6. ábra B része).

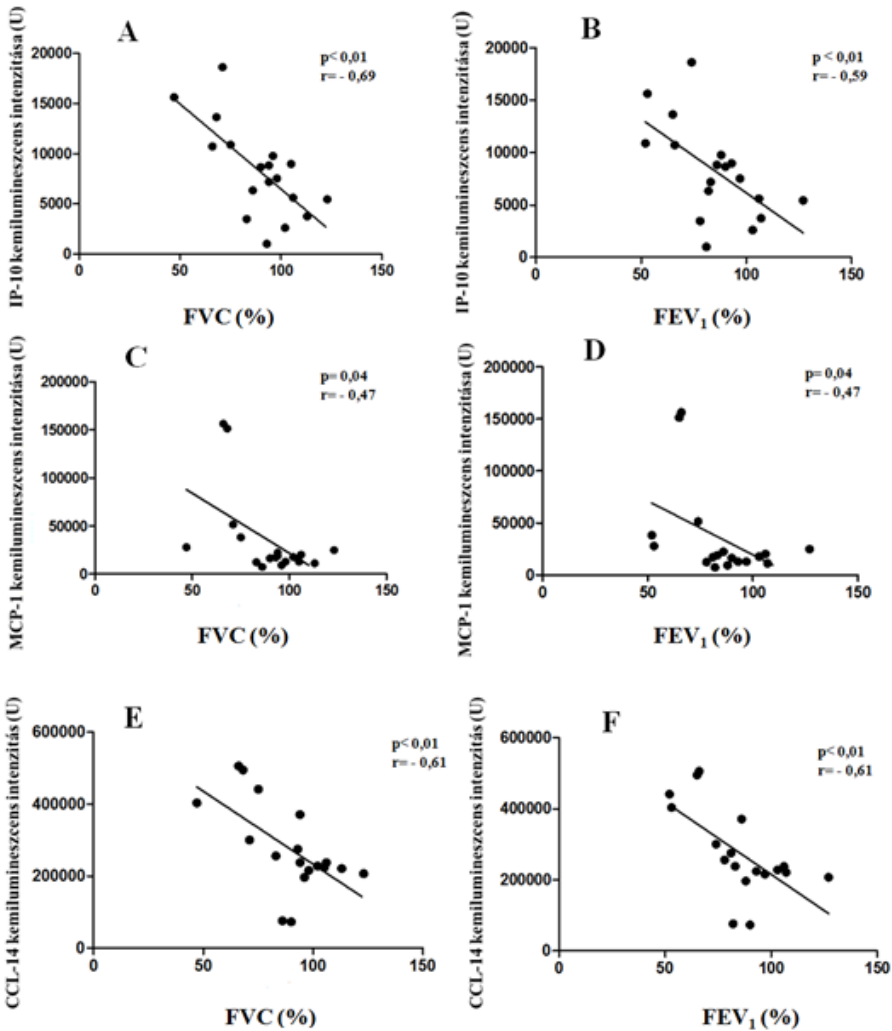


**6.ábra. CCL21 [A] és IP-10 [B] szintek összehasonlítása egészséges kontroll csoportban és SLE-s betegekben.**

[A]: SLE<sub>pulm</sub> vs. kontroll és SLE<sub>c</sub>;  $p < 0,05$

[B]: SLE<sub>pulm</sub> vs. kontroll és SLE<sub>c</sub>;  $p < 0,05$

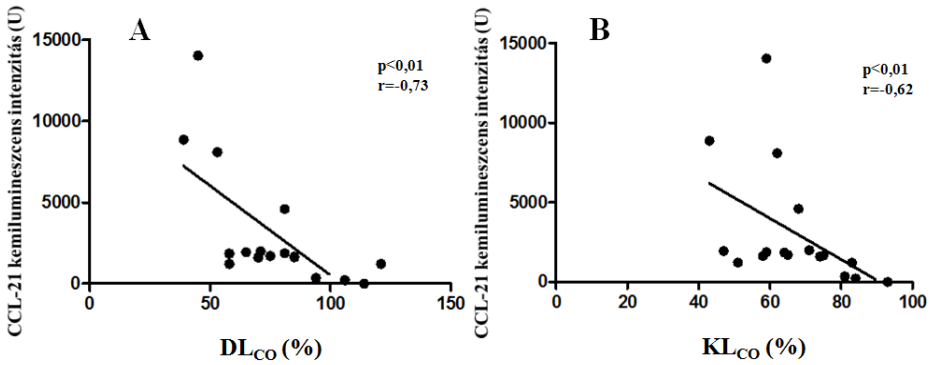
Az SLE-s betegek FVC és FEV<sub>1</sub> paraméterei, valamint az IP-10, MCP-1, CCL14 tekintetében szignifikáns negatív összefüggést igazoltunk (7.ábra).



7.ábra. FVC (referencia %) és FEV<sub>1</sub> (referencia %) paraméterek összefüggése IP-10 (ábra A és B része), MCP-1 (ábra C és D része) és CCL-14 (ábra E és F része) SLE-s betegekben.

Korreláció analízis során a CCL-21 kemilumineszcens intenzitása és a diffúziós kapacitás paraméterek között szoros korreláció volt igazolható: a

DL<sub>CO</sub> értékeit ( $r=-0,73$ ;  $p<0,01$ ) és KL<sub>CO</sub> értékeit ( $r=-0,62$ ;  $p<0,02$ ) a 8. ábra mutatja.



**8.ábra.** Az SLE-s betegekben CCL-21 kemilumineszcens intenzitása és DL<sub>CO</sub> valamint KL<sub>CO</sub> (referencia %) paraméterek közötti összefüggés.



## 5. KÖVETKEZTETÉSEK

1. SLE-ben gyakori a pulmonalis manifesztáció, különösen az idősebb betegek érintettek. Az általunk vizsgált SLE-s pácienseknél főként ILD, SLS és kislégúti érintettség igazolódott. A betegek vezető tünete a dyspnoe és a csökkent terhelhetőség.

2. Az általunk vizsgálat SLE<sub>pulm</sub> csoport jelentős részénél (92%) igazolódott légzésfunkciós eltérés. A pulmonalis érintettséggel rendelkező SLE-s betegek spirometriai és vérgáz vizsgálata során jelentősen csökkent értékeket mértünk az FVC, FEV<sub>1</sub>, FEF<sub>25-75</sub>, DL<sub>CO</sub> és pO<sub>2</sub> paraméterek tekintetében.

3. SLE-ben a perifériás Th1/Th2 arány és a Th17/Treg arányának változását korábban igazolták, melyet vizsgálatainkkal megerősítettük. Az SLE tüdőérintettsége kapcsán nem igazoltunk eltérés ezen Th sejtek arányában.

4. Pozitív korrelációt tudtunk kimutatni perifériás CD4+CD25hi+ aktivált T lymphocyták és légzésfunkciós paraméterek (FVC, FEV<sub>1</sub>), valamint DL<sub>CO</sub> értékek között pulmonalis érintettséggel rendelkező SLE-s betegben. Vizsgálatunkban először igazoltuk a CD4+CD25hi+ aktivált T sejt csoport lehetséges szerepét a tüdőérintettség kialakulásában SLE-ben.

5. SLE pulmonalis érintettségében emelkedett IP-10 és CCL21 értékeket tudtunk kimutatni a betegek plazmájában, mely szoros összefüggést mutatott a légzésfunkciós paraméterek változásaival.

## 6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

### Az értekezés alapjául szolgáló angol nyelvű közlemények:

1. **Vincze K**, Kovats Z, Cseh A, Pasti K, Kiss E, Polgar A, Vasarhelyi B, Szabo AJ, Bohacs A, Tamasi L, Losonczy G, Muller V. Peripheral CD4+ cell prevalence and pleuropulmonary manifestations in systemic lupus erythematosus patients. *Respiratory Medicine* 2014;108(5): 766-774. IF: 3,086
2. Odler B, Bikov A, Streizig J, Balogh C, Kiss E, **Vincze K**, Barta I, Horvath I, Muller V. CCL21 and IP-10 as blood biomarkers for pulmonary involvement in systemic lupus erythematosus patients. *Lupus*. 2017;26(6):572-579. IF: 2,118

### Az értekezés témájával összefüggő hazai szakmai lapokban megjelent közlemény:

1. **Vincze K**, Odler B, Müller V. A szisztémás lupus erythematosus pulmonalis manifesztációi. *Orv Hetilap* 2016;157(29): 1154-1160.

### Egyéb, az értekezés témájától független angol nyelvű közlemények:

1. Tamasi L, Muller V, Eszes N, Kardos T, Budai M, **Vincze K**, Losonczy G, Szilasi M. Patterns of erythropoiesis-stimulating agent use for chemotherapy-induced anemia in lung cancer: results of a retrospective Hungarian real-life clinical data analysis. *Exp Op Drug Safety*. 2011;10(4):503-507. IF: 3,015
2. Müller V, **Vincze K**, Eszes N, Zahorecz G, Bohács A, Losonczy G, Tamási L. Supportive care of palliative chemotherapy for advanced

stage lung cancer patients: Summary for the daily practice. Journal of Nursing Education and Practice 2013;4(3):101-111.

**Egyéb, az értekezés témájától független magyar nyelvű közlemények:**

1. Ivancsó I, **Vincze K**, Juhász M, Tamási L. Sarcoidosis atípusos mycobacteriosissal  
Medicina Thoracalis 2011; 64:(6):317-321.
2. Müller V, Horváth G, Tamási L, Eszes N, Bohács A, **Vincze K**, Kováts Z, Lázár Z, Odler B, Kornafeld A, Erdély T, Somogyi V, Losonczy G. Obstruktív tüdőbetegségekben alkalmazott inhalációs gyógyszerek célpontjai: receptorok a légúti felszín sejtjein Medicina Thoracalis 2015; 68:(1): 6-12.