

Válasz Dr. Szűcs Gabriellának

Dr. Nagy György MTA Doktori Értekezésre adott opponensi véleményére

Köszönöm Dr. Szűcs Gabriella részletes, bírálatait, megjegyzéseit. A megfogalmazott kérdésekre az alábbiakban válaszolok:

Mi lehet a magyarázat az anti-GAG antitestek védő szerepre vonatkozóan, úgy, hogy a szérumban magasabb a titer mint a synovialis folyadékban? GAG ürül a porcszövetből gyulladáskor a synoviumba illetve kijuthat a szérumba. Van-e különbség a szérum és synovium GAG szint között?

A GAG-ok ellen termelődő természetes autoantitestek gyulladásra kifejtett hatása nem ismert pontosan. Eredményeink szerint a kondroitin-szulfát specifikus IgM-szintje fordított korrelációt mutatott az RA klinikai aktivitásával, ennek alapján feltételezzük, hogy az általunk vizsgált természetes antitestek védő hatásúak lehetnek. A hialuronsav-degradációs termékek damage associated molecular patternként (DAMP) viselkedhetnek [Taylor KR et al. *J Biol Chem.* 2004, Apr 23;279(17):17079-84.]. Az egyik lehetséges magyarázat ennek alapján az lehet, hogy a degradálódó mátrixkomponensekhez kötődve a GAG-ok ellen termelődő antitestek gátolhatják a DAMP-receptorok aktiválódását. Így a GAG elleni természetes autoantitestek védő szerepet játszhatnak RA-ban.

Irodalmi adatok alapján a synovialis folyadék GAG-szintje magasabb a szérum-GAG-szintnél RA-ban [Bensouyad A et al. *Ann Rheum Dis.* 1990, 49(5):301-307.]. A GAG elleni antitestek aktív betegség során a porcból nagyobb mennyiségben ürülő GAG-hoz kötődnek, ez magyarázhatja a fordított korrelációt az antitestszint és a betegségaktivitás között. A synovialis folyadékban nagyobb mennyiségben jelenlévő GAG hasonlóan magyarázhatja a synovialis folyadékban alacsonyabb és a szérumban magasabb anti-GAG antitest-szinteket ($p < 0,001$). A természetes autoantitestek fiziológiás és az autoimmun kórképekben betöltött szerepének további vizsgálata hozzájárulhat a toleranciasérülés és az autoimmunitás patomechanizmusának jobb megértéséhez.

A természetes autoantitestek szerepére vonatkozóan van-e új irodalmi adat SLE-ben?

A természetes autoantitestek SLE-ben betöltött szerepéről kevés jelentős eredményről beszámoló cikk jelent meg az elmúlt években. Állatkísérletekkel igazolták, hogy az apoptotikus testek ellen termelődő természetes autoantitestek gátolják az immunkomplexek proinflammatorikus hatását [Vas J et al. *Arthritis Rheum.* 2012, Oct;64(10): 3388–98.]. Szintén állatkísérletes rendszerben

igazolták a közelmúltban, hogy a természetes IgM-hiánya a centrális toleranciát és a B-sejt-differenciálódást befolyásolva az SLE-hez hasonló autoimmun betegséghez vezet [Nguyen TT et al. *J Immunol.* 2015, Feb15;194(4):1489-502].

Érdekes eredmény a galektin-8 TT polimorfizmus RA-ra hajlamosító antagonisztikus pleiotrop hatása (fiatal korban védő, idősebb korban hajlamosító). Van-e más gén RA-asszociációban a galektin 8 génnel együtt, ami még befolyásolhatja a kettő együttes hatását?

A galectin-8-polimorfizmus RA-ban betöltött szerepéről, más gének esetleges hatásáról, a munkánk alapján a galectin-8-nak tulajdonítható antagonisztikus pleiotropiáról érdemi új eredményt nem publikáltak a közleményünk 2012-ben történt megjelenése óta.

A citrullináció immunogenitásának vizsgálata tüdőrákban alapvetés, ahol RA-s minta csak kontrollként szerepel. Az alapfolyamat a dohányzás hatására bekövetkező PAD4 aktiváció, majd a fehérjék ezáltal citrullinációja. A PAD4 szérumszintje emelkedett volt a dohányos tumoros betegekben, ugyanakkor nem volt különbség a dohányos és nem dohányos betegek tumorszövetein kimutatott PAD4 és CK7 expresszió között. Hogyan magyarázható a folyamatban a PAD4 szérumszint és szöveti expresszió mértékének szétválása? Vannak-e RA-ban adatok a PAD4 szintre vonatkozóan? Ha igen, lehet-e különbség benne olyan RA-s betegek esetében, akiknél például van vagy nincs pulmonális manifesztáció az RA-hoz társulva?

A szérum PAD4-szintje magasabb volt a dohányos tüdőrákos betegek mintáiban, mint az egészséges kontrollokéban, ugyanakkor a nem dohányos tüdőrákos betegek mintáiban nem mértünk a kontrollokénál magasabb szérum-PAD4-szintet. A PAD4 intracelluláris enzim, a szöveti kifejeződéstől, a sejtekből történő PAD4-felszabadulástól és a szérum PAD4-clearance-től is függ a szérumszintje. Munkacsoportunk eredményei alapján RA-ban a szérum-PAD4-szint nem magasabb az egészséges kontrollokénál. Irodalmi adatok alapján a PAD4 elleni antitestek csökkenthetik az enzim aktiválódásához szükséges Ca^{2+} -szintet, így ezek az antitestek rossz prognosztikus tényezőt jelenthetnek RA-ban [Darrah E et al. *Sci Transl Med.* 2013, 5(186):186ra65.]. A pulmonális manifesztáció és a szérum-PAD4-szint korrelációja ma még nem ismert.

Klinikailag különbözhetnek-e az RA-s betegek, attól függően, hogy a szérumaik különböző citrullinált peptidokkal reagálnak (pl. filaggrin, vimentin vagy kollagénnel)?

Az RA-s betegek autoantitestjei a kereskedelmi forgalomban elérhető ACPA ELISA kitékhez hasonlóan reagálnak citrullinált filaggrin, vimentin és kollagén peptidekkel. Eddigi munkánk során nem találtunk klinikai különbséget a különböző citrullinált peptidekkel reagáló antitesteket termelő betegek között (263 beteg adatainak a feldolgozása alapján).

SLE-ben elsősorban arra van adatunk, hogy polyarthritisz esetén milyen gyakorisággal fordul elő ACPA antitest. A citrullináció folyamatára vonatkozóan van-e más szervi manifesztációra vonatkozó adat SLE-ben?

Irodalmi adatok alapján lupus nephritisben immunhisztokémiai módszerrel vizsgálva a biopszias minták 70 százalékában citrullináció igazolódott. Továbbá minden vizsgált lupus nephritiszes betegtől származó biopsziás mintában az endothelialis és a minták 70 százalékában az indukálható nitrogén-monoxid-szintetáz (NOS) kifejeződését is igazolták. Az SLE-ben megfigyelhető fokozott nitrogén-monoxid (NO) -termelés mellett szól a NOS- és a citrullinkifejeződés is, hiszen az NO-szintézis során citrullin keletkezik [Bollain-y-Goytia JJ et al. *Inflamm Res.* 2009, 58:61-6.].

Hova helyezi a jelölt az anti-C1 inhibitor meghatározást a klinikai gyakorlatban?

SLE-ben, különösen a betegség aktív szakaszában jellemző a komplementrendszer aktivációja. A poliklonális B-sejt-aktiváció szintén jellemző lupusban és a következményes antitest-termelés, illetve immunkomplex-képződés hozzájárul a komplementrendszer aktivációjához. Mindezek miatt vizsgáltuk a C1-inhibitor ellen termelődő antitestek szintjét. Az anti-C1-inhibitor szérumszintje magasabb volt az SLE-s betegek mintáiban, mint az egészséges kontrollokéban. Az anti-C1-inhibitor esetleges klinikai és patogenetikai szerepének meghatározása természetesen további vizsgálatokat igényel.

A NO szerepének a vizsgálata igen szépen, következetesen felépített vizsgálat, amely során a jelölt megerősítette, hogy a T-lymphocytáknak a NO mitokondrium membrán hyperpolarizációt indukál. A kísérletekben az eNOS és nNOS 15x emelkedést mutatott a T sejt aktivációkor, de nem mérhető iNOS aktiváció. SLE-ben vizsgálva a folyamatot azonos nyugalmi NO szint igazolódott az SLE-s és kontroll T-sejtekben, míg RA-ban magas volt a sejtek NO termelése. Emellett az SLE-s T-sejtek több és nagyobb mitokondriumot tartalmaztak a kontrollhoz képest, míg RA-ban nem volt nagyobb a mitokondrium mennyiség. Milyen patogenetikai szerepe lehet ennek a különbségnek a két betegség pathogenezisében?

Eredményeink alapján a T-lymphocyta-aktiváció során termelődő NO hozzájárul a sejtaktivációhoz és a mitokondriális membránpotenciál növekedéséhez. Több és nagyobb mitokondriumot tartalmaznak az SLE-s betegek T-lymphocytái, mint az egészséges kontrollokból nyert sejtek. Az SLE-s betegek monocytái lényegesen több NO-t termelnek, míg a T-sejtek NO-termelése nem fokozott lupusban az egészséges kontrollokéhoz képest. Érdekes módon SLE-s betegek T-sejteiben ATP-depléció mérhető. Az oxidatív foszforiláció során keletkezhetnek reaktív oxigénintermedierek (ROI), a mitokondriumok a ROI-k fő forrását képezik. A ROI-k intracelluláris hatásai közé tartozik a lipidperoxidáció, károsíthatják a DNS-t, a membránokat, így a mitokondriumokat is. SLE-ben a T-sejtek ROI-termelése fokozott az egészséges kontrollokból nyert sejtekéhez képest, aminek szerepe lehet a betegség patogenezisében [**Nagy G et al. Arthritis Res Ther. 2010, 12:210.**]. SLE-s betegek T-sejtjein a sejthalált indukáló hatásokra az apoptózis helyett jellemzően nekrozis alakul ki, amely összefüggésben lehet a csökkent ATP-szinttel, nagyobb mitokondriummennyiséggel, hozzájárulhat az autoantigének prezentálásához és az autoimmunitáshoz.

Eredményeink szerint RA-s betegek T-lymphocytáinak az egészséges kontrollokénál magasabb az NO-termelése, TNF- α -blokkoló kezelés során az NO-termelés csökken. Ugyanakkor a mitokondriális membránpotenciál és a mitokondriummennyiség az RA-s betegek T-lymphocytáiban az egészséges kontrollokból nyert sejtekéhez hasonló. A fokozott NO-termelésnek az RA patogenezisében is lehet szerepe. RA-ban magasabb a szérumnitritszint a kontrollokénál, egyes megfigyelések szerint a nitritszint korrelál a betegség aktivitásával és a radiológiai progresszióval. A synovitis során számos sejttípus, így osteoclastok, osteoblastok, makrofágok, fibroblastok, neutrophil granulocyták és endotheliális sejtek is termelhetnek NO-t [**Pham TN et al. J Rheumatol. 2003, Dec;30(12):2529-34.; Onur O et al. Rheumatol Int. 2001, May;20(4):154-8. Nagy G et al. Immunol Lett. 2007, Jul 31;111(1):1-5.**]. Az NO saját eredményeink és irodalmi adatok alapján szabályozza a proinflammatorikus és az antiinflammatorikus citokinek termelését [**Nagy G et al. Immunol Lett. 2007, Jul 31;111(1):1-5.; Guzik TJ et al. J. Physiol and Pharmacol. 2003, 54(4):469-87.**] és szabályozhatja a T-lymphocyta-differenciálódást is [**Niebdala W et al. PNAS 2002, 99:16186-91.**].

SLE-ben a monocyták, míg RA-ban a T-sejtek NO-termelése fokozott, a monocyták jelentősen nagyobb mennyiségű NO-t termelnek, ennek szerepe lehet a mitokondriummennyiség növekedésére SLE-ben. Mindezek alapján az SLE-ben és RA-ban is megfigyelhető fokozott NO-termelésnek eltérő hatásai vannak a T-lymphocytákra.

Érdekes az a megfigyelés is, hogy az SLE-s monocytákban magasabb volt a NO szintézis, de nem volt hasonló vizsgálat RA-s monocytákkal. Ismert-e adat ezzel kapcsolatban és lehet a két betegség között ebben is különbség, tekintettel arra, hogy az RA pathogenezisében nagyobb szerepet játszanak a monocyták mint SLE-ben?

A monocyták az RA és az SLE patogenetisében is központi szerepet játszanak, RA-ban igen jelentős a monocytákban a proinflammatorikus citokinek termelése. Eredményeink szerint az RA-s betegekből szeparált monocyták NO-termelése nem tér el szignifikánsan az egészséges kontrollokétól.

Az eltérő NO termelésnek ismert-e szerepe az RA és SLE-hez társuló accelerált arteriosclerosisban?

RA-ban és SLE-ben is a cardiovascularis mortalitás jelentősen nagyobb az egészséges kontrollpopulációhoz képest. Az NO fokozhatja és gátolhatja is az atherosclerost, az atheroscleroticus plakkokban az endothelialis, az indukálható és a neuronális (eNOS, iNOS és nNOS) izoforma is kifejeződik. Az eNOS és nNOS védő hatású, míg az iNOS fokozza az érlemezésedést [Lowenstein C. *Atheriocler Thromb Vasc Biol.* 2006, 26:1417-8]. A fokozott NO-termelésnek szerepe lehet az RA-ban és SLE-ben megfigyelhető fokozott cardiovascularis rizikóban, ennek részletei azonban ma még nem ismertek [Levesque MC et al. *Curr Mol Med.* 2004, Nov;4(7):777-86.].

Infliximab kezelés mellett 6 hét alatt csökkent a betegekben a T-lymphocyták NO termelése. A vizsgálat 5 betegen történt. Van-e azóta több irodalmi adat erre vonatkozóan?

Hazai munkacsoport Vásárhelyi Barna professzor vezetésével vizsgálta a T-lymphocyták NO-termelését RA-ban, a mi eredményeinkhez hasonló eredményeiket 2014-ben közölték a [Szalay B et al. *PLoS ONE* 2014, Aug 6;9(8):e104298.] További vizsgálatok szükségesen az NO patogenetikai szerepének vizsgálatára és biomarkerként történő alkalmazásának értékelésére.

A hisztamin szerepének vizsgálata HDC-KO egértörzs T-lymphocytáin történt, ahol a kontroll vad törzshöz képest nem volt különbség a T-lymphocytá eNOS, nNOS és iNOS kifejeződésben, de stimulálásra fokozott volt a sejtek IFN- γ termelése. Az RA és SLE vonatkozásában a megbeszélés rész felveti a hasonlóságokat a kísérleti eredmények és a betegségek pathogenezise között. Milyen tényleges adatok állnak rendelkezésre az eredmények megszületése óta az irodalomban a hisztamin illetve a hisztamin receptorok szerepére vonatkozóan arthritisen vagy SLE-ben. A T-sejt subpopulációk között van-e

olyan alcsoport, aminek működését fokozottabban befolyásolhatják a hisztamin receptoron keresztüli válaszok (pl. Th-17 sejtek)?

A hisztamin (β -imidazolil-etilamin) a gyulladás szabályozásában meghatározó szerepet játszó biogén amin, termelésének helyén növeli a kapillárisok permeabilitását, proinflammatorikus hatású. A H4 hisztaminreceptor kópiaszám-variabilitását leírták SLE-ben, a nagyobb H4-receptor-kópiaszám növelte az SLE esélyét és korrelált az arthritissel, proteinuriával és az ANA-pozitivitással [Yu et al. **British Journal of Dermatology**. 2010, 163:935–40.]. A közelmúltban publikált állatkísérletes adatok szerint a H4-receptornak szerepe lehet a Th17 -sejt differenciálódásában és a polyarthritis kialakulásában [Cowden JM et al. **Ann Rheum Dis**. 2014, March;73(3):600–8.]. Munkacsoportunk is tervezi vizsgálni a hisztamin és a hisztaminreceptorok szerepét a Th17-sejt-differenciálódásban és -aktivációban.

RA-s sejteken csak a SLAP expresszió vizsgálta történt, talán szemléletesebb lett volna itt is együtt nézni a CD3- ζ expresszióval, még akkor is, ha ez RA-ban már volt vizsgálva az irodalomban. A TNF- α mellett van-e szerepe a SLAP expresszió befolyásolásában az RA-ban szereplő más domináns gyulladásos citokinnek (pl. IL-6)?

A SLAP-kifejeződésre irányuló kísérleteinknél a CD3- ζ -lánc-expressziót is mértük. Még nem közölt eredményeink szerint a TNF-hez hasonlóan más proinflammatorikus és antiinflammatorikus citokinek (IL-6, IL-8, IL-10, IL-17 és az IL-35) is csökkentik, ugyanakkor az IL-1, IL-2 és az IL-4 nem befolyásolják a CD4 T-lymphocyták CD3- ζ -lánc-expresszióját, különböző citokinek SLAP-ra kifejtett hatását is tervezzük vizsgálni.

A munkában 31 RA-s beteg mintáit vizsgálták, akiknél a betegség aktivitás közepes/magas volt (átlag We 28 mm/h, CRP 22.16 mg/l). Milyen terápián voltak ezek a betegek – csak DMARD vagy biológiai terápia is? Van-e arra adat, hogy a gyakorlatban alkalmazott TNF- α gátlók befolyásolják-e a glikozidázok kifejeződését?

Munkacsoportunk korábbi eredményei és irodalmi adatok alapján a glikozidázoknak szerepe lehet az RA-ban zajló porcdegradációban. Eredményeink szerint a HCgp-39, a HexA és a HexB is expresszálódott a synovialis fibroblastokban. Ezen vizsgálataink során szintetikus DMARD-kezelésben részesülő betegek mintáit tanulmányoztuk. A TNF- α -gátlók hatása a fibroblastok glikozidázkifejeződésére még nem ismert.

A bevont RA-s betegek átlag DAS28 értéke elég magas volt (5.69). befolyásolja-e a synovialis folyadék MV tartalmát a gyulladásos aktivitás illetve maga a tradicionális vagy biológiai DMARD kezelés?

Eredményeink szerint a betegségaktivitás nem korrelált a microvesiculák számával, de ennek pontosabb megítélésére további vizsgálatok szükségesek több beteg bevonásával. A gyógyszeres kezelésnek az extracelluláris vesiculákra kifejtett hatását RA-ban, SLE-ben és juvenilis idiopathias arthritisben (JIA) is tervezzük vizsgálni.

A JIA-ban kapott eltérő eredmények az RA-hoz képest vajon csak annak tudhatóak be, hogy a betegek oligoarticularis fómájú JIA-val bírtak vagy egyébként is lehet a MV-nak eltérő patogenetikai szerepe a JIA és RA vonatkozásában?

Jelenleg csak az oligoarticularis JIA-ról vannak adataink, tervezzük további betegcsoportok vizsgálatát is. Feltételezésünk szerint az MV-knek eltérő patogenetikai szerepe lehet szisztémás reumatológiai betegségekben, jelenleg is az egyik fő kutatási területünk ennek a vizsgálata.

Az ugyancsak vizsgált RANK, RANKL+ MV jelezhetik-e az erózív folyamat mértékét RA-ban?

Nem találtunk szignifikáns különbséget a RANK+ és RANKL+ MV-k számában az arthrosisos, RA-s és JIA-s betegcsoportok között. A RANK, RANKL és az erózív folyamat korrelációjának további vizsgálatához több beteg és longitudinális vizsgálatok szükségesek.

Milyen egyéb microvesiculákkal kapcsolatos vizsgálatokat tervez a jelölt a munka folytatásaként?

Az extracelluláris vesiculák fiziológias és patogenetikai szerepének vizsgálata munkacsoportunk egyik fő kutatási területe. Vizsgáljuk az EV-k szerepét gyulladásos reumatológiai kórképekben. Az EV-k biomarkerként szolgálhatnak, patogenetikai faktorok lehetnek, így terápiás célpontot is képezhetnek. Legújabb, még nem közölt eredményeink szerint az EV-k szabályozzák az osteoclast-differenciálódást, így központi szerepük lehet az RA és az arthritis psoriatica patogenezisében is.

Ismételten köszönöm Dr. Szűcs Gabriella alapos bírálatát és kérem a válaszaim elfogadását.

Budapest, 2015. május 2.

Tisztelettel:



Dr. Nagy György
egyetemi docens