

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

A PIKKELYSÖMÖR KLINIKAI, BIOKÉMIAI,
IMMUNOLÓGIAI ÉS GENETIKAI
JELLEGZETESSÉGEINEK VIZSGÁLATA

Dr. Gyulai Rolland PhD



Pécsi Tudományegyetem, ÁOK

Bőr-, Nemikórtani és Onkodermatológiai Klinika

PÉCS

2016

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
1. BEVEZETÉS	4
1.1. Bevezetés, a pikkelysömör jelentősége, klinikuma.....	4
1.2. A pikkelysömör genetikai háttere	4
1.3. A pikkelysömör immunpatogeneze	5
2. CÉLKITŰZÉSEK	7
3. BETEGEK, KÍSÉRLETI ÁLLATOK, MÓDSZEREK	8
3.1. A TNFSF15 és ERAP1/HLA-C gének polimorfizmus vizsgálata	8
3.2. A tünetmentes psoriasisos bőr szerkezetének vizsgálata	8
3.3. A Treg sejtek működésének vizsgálata psoriasisban	8
3.4. Az IL-1R expresszió vizsgálata psoriasisos T-sejteken	8
3.5. A TRPA1+ nociceptív neuronok szerepe psoriasiform bőrgyulladásban...9	
3.6. A betegség súlyossága, életminőség és kezelési szokások felmérése ..	10
3.7. A dohányzás szerepe a periodontitis kialakulásában psoriasisban	10
3.8. Citrullinált peptidek szerepe psoriasisban	10
3.9. TNF, TNFi, anti-TNFi antitest koncentráció meghatározása	10
3.10. A methotrexát kezelés klinikai gyakorlatának felmérése psoriasisban	10
4. EREDMÉNYEK	12
4.1. A TNFSF15 és ERAP1/HLA-C gének polimorfizmus vizsgálata	12
4.2. A tünetmentes psoriasisos bőr fehérje szerkezetének vizsgálata.....	13
4.3. A Treg-sejtek működésének vizsgálata psoriasisban	14
4.4. Humán Treg-marker azonosítása	15
4.5. Az IL-1R expresszió vizsgálata psoriasisos T-sejtek működésében	15
4.6. A TRPA1+ nociceptív neuronok szerepe psoriasiform bőrgyulladásban. 17	
4.7. A betegség súlyossága, életminőség és kezelési szokások felmérése ..	19
4.8. A dohányzás szerepe a periodontitis kialakulásában psoriasisban	20
4.9. Citrullinált peptidek vizsgálata psoriasisban és arthritis psoriaticában	21
4.10. TNF, TNFi, anti-TNFi antitest koncentráció meghatározása	21
4.11. A methotrexát kezelés klinikai gyakorlatának felmérése psoriasisban	22
5. MEGBESZÉLÉS	24
6. ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK.....	32
7. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK.....	34
8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	36

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ADA: anti-drug antibody/gyógyszer ellenes antitest.....	10
ATR-FTIR: gyengített teljes reflexiós Fourier transzformációs infravörös	8
BSA: body surface area/testfelszín érintettség	19
CARD14: caspase recruitment domain 14	5
CD: cluster of differentiation/differenciálódási klaszter	5
CLA: cutaneous leukocyte antigen/kután leukocita antigén	6
DAS28: disease activity score 28/betegség aktivitási érték 28	21
DLQI: dermatology life quality index/bőrgyógyászati életminőség index	19
DR3: death domain receptor 3/halál domén receptor 3	24
EDC: epidermal differentiation complex/epidermális differenciálódási komplex	5
ERAP1: endoplasmic reticulum aminopeptidase 1/endoplazmatikus retikulum aminopeptidáz 1	7
GARP: glycoprotein A repetitions predominant	15
GWAS: genome wide association scan/teljes genomra kiterjedő asszociációs vizsgálatok	5
HLA: humán leukocita antigén	5
IL: interleukin	6
IL-1R: interleukin-1 receptor	7
ILC: innate lymphoid cell/veleszületett limfoid sejt	6
KO: knock out/génhiányos	9
LASCA: laser speckle contrast analysis	9
LCE: late cornified envelope/késői szaru köpeny	5
LRRC: leucine rich repeat containing/leucin-gazdag ismétlődéseket tartalmazó	15
mAb: monoclonal antibody/monoklonális antitest	8
MCV: mutated citrullinated vimentin/mutáns citrullinált vimentin	10
MFI: mean fluorescence intensity/átlagos fluoreszcencia intenzitás	16
MHC: major histocompatibility complex/fő hisztokompatibilitási komplex	5
MTX: methotrexat	22
NF-κB: Nuclear factor kappa B	5
PASI: psoriasis area and severity index/psoriasis felszín és súlyossági index	19
PBMC: peripheral blood mononuclear cell/perifériás vér mononukleáris sejt	8
PIN: Psoriasis International Network	10
PSORS: psoriasis susceptibility locus/psoriasisra való fogékonysági lókuszt	4
PsV: psoriasis vulgaris	4
SNP: single nucleotide polymorphism/egypontos nukleotid-polimorfizmus	12
Th: T-helper sejt	5
TM: memória T-sejt	16
TN: naiv T-sejt	16
TNF: tumor nekrosis faktor	6
TNFSF15: TNF superfamily member 15/TNF szupercsalád, 15. tag	7
TRAF3IP2: TNF receptor associated factor 3 interacting protein 2	5
Treg: regulatory T cell/szabályozó T-sejt	6
Tresp: responder T-sejt	14
TRP: tranziens receptor potenciál	7
TRPA1: tranziens receptor potenciál ankyrin 1	7
VAS: vizuális analóg skála	19
WT: wild type/vad típusú	9

1. BEVEZETÉS

1.1. BEVEZETÉS, A PIKKELYSÖMÖR JELENTŐSÉGE, KLINIKUMA

A pikkelysömör (psoriasis) az egyik leggyakoribb, legrégebben ismert emberi bőrbetegség. A pikkelysömör lefolyása krónikus, fellángolásokkal tarkított, a betegség változatos klinikai képet mutat. Klasszikus esetben a tünetek morfológiailag erythema, infiltráció és hámlás kombinációjából állnak össze. Hisztológiailag a betegséget az epidermis proliferációja, a dermis kisereinek tágulata, kanyargóssá válása, valamint a kifejezett granulocitás és mérsékelt T-sejtes infiltráció jellemzi. Bár a psoriasis pontos patogenezise jelenleg is ismeretlen, a betegség kialakulását feltehetően a bőr veleszületett immunrendszerének eltúlzott reakciója indítja el. Ezt az 1-es típusú T-helper sejtek bevándorlása, aktiválódása, majd a hámsejtek abnormális proliferációja és differenciálódása követi. A folyamat háttéréül citokinek és kemokinek hálózata szolgál, krónikussá válásáért feltehetően a szabályozó T-sejtek kóros működése felelős.

A psoriasis incidenciája a fejlett országokban 1-2 százalékra tehető, de feltehetően etnikai, földrajzi és környezeti tényezők miatt jelentős változatosságot mutat. Előfordulása gyakoribb az egyenlítőttől távolabb fekvő országokban és a kaukázusi rassz tagjai között, míg bizonyos népcsoportokban, így például ausztráliai bennszülötteken és észak-amerikai indiánokon gyakorlatilag nem fordul elő. Közép-Európában a pikkelysömör előfordulása 1,5% körüli – ezt alapul véve Magyarországon mintegy 150 ezerre tehető a psoriasisban manifest vagy látens módon érintettek száma. A pikkelysömörös férfiak és nők aránya nagyjából azonos. Az arthritis psoriatica a legtöbb vizsgálat szerint a psoriasisos betegek kb. 5-10%-át érinti, nemi különbségek az ízületi betegséget tekintve sincsenek. A betegek mintegy 70-80%-a enyhe psoriasisban szenved, mely külső szerek alkalmazásával általában jól kezelhető. Bár napjainkban megfelelő kezeléssel hosszú távú tünetmentesség érhető el, a pikkelysömör véglegesen nem gyógyítható betegség.

1.2. A PIKKELYSÖMÖR GENETIKAI HÁTTERE

Mind a psoriasis vulgaris (PsV) mind az arthritis psoriatica erőteljes genetikai meghatározottságot mutat. Egyetétjük ikrekben a PsV 50-90%, a PsA 80-100%, kétetétjük ikrek esetén a PsV 20% körüli öröklődést mutat. Az a tény, hogy a konkordancia monoizigóta ikrek esetén sem éri el a 100%-ot, mind a PsV mind a PsA esetén a környezeti tényezők részleges patogenetikai jelentőségére utal.

Azokat a kromoszóma szakaszokat, melyekről úgy gondolták, hogy psoriasis géneket tartalmaznak, PSORS (psoriasis susceptibility – psoriasisra való fogékonyság)

lókuszoknak nevezték el. A legtöbb PSORS lókusz esetén azonban nem ismert a hajlamosító gén vagy gének. Az elsőként azonosított PSORS lókusz a 6. kromoszóman található PSORS1 volt. A fő hisztokompatibilitási komplex (MHC) régióján belül található génszakasz jelentőségét azóta számos, eltérő populációban elvégzett vizsgálat alátámasztotta. A PSORS1, illetve az azzal szoros kapcsoltsági viszonyban álló három allél [HLA (humán leukocytá antigén)-Cw6, HRC*WWCC és a HLA-asszociált S gén] jelenléte a pikkelysömörös esetek felében kimutatható. A HLA-Cw6 egy MHC I allélt kódol, így alapvető szerepet játszik a CD 8+ T-sejtek aktiválásában.

Az utóbbi 10 év során úgynevezett GWAS (Genome Wide Association Scan – teljes genomra kiterjedő asszociációs vizsgálatok) alkalmazásával számos új psoriasisra hajlamosító gén polimorfizmust sikerült azonosítani. Ezek többsége a T-sejtes illetve a veleszületett immunitással, kisebb részük a hám felépítését biztosító strukturális fehérjékkel áll összefüggésben.

A T-helper (Th)17 sejtek mellett egyre több adat támasztja alá a veleszületett immunrendszer jelentőségét is psoriasisban. Ezen gének által kódolt fehérjék közül több is az NF- κ B (nuclear factor kappa B) jelátviteli útvonallal áll kapcsolatban, így például a TRAF3IP2 (TNF receptor associated factor 3 interacting protein 2), vagy a PSORS2 lókuszon található CARD14.

A PSORS4 lókusz az úgynevezett epidermális differenciálódási komplex (EDC) régióan belül helyezkedik el. Ez a régió különleges jelentőséggel bír psoriasisban, ugyanis tartalmaz számos olyan gént, amely az epidermis felső részében fejeződik ki. Az EDC magában foglalja az LCE (late cornified envelope – késői szaru köpeny) gén klasztert is, mely a stratum corneum illetve a szaruköpeny fehérjéit kódolja, ezáltal az epidermis terminális differenciálódásában feltehetően fontos szerepet játszik.

A 6-os kromoszóma rövid karján lévő MHC régióban elhelyezkedő HLA B13, B17, B57 és Cw6 mutatja a legerősebb asszociációt a PsA-val. Valószínű, hogy az MHC psoriasisal való asszociációja a HLA-C régióhoz, míg az arthritisszel való asszociáció a HLA-B régióhoz közel vagy abban helyezkedik el.

1.3. A PIKKELYSÖMÖR IMMUNPATOGENEZISE

A pikkelysömör patogenezise komplex folyamat, melynek során genetikailag predisponált egyéneknél különféle iniciáló hatásokra sejtek és citokinek dinamikus interakciójának eredményeként a bőr immun-homeosztázisa felbomlik. A pikkelysömörös szövettani eltérések közül a legjellegzetesebb az epidermális keratinocyták hyperproliferációja és

hyperkeratosisa következtében kialakuló epidermális megvastagodás (acanthosis), a T-sejtek és egyéb immunológailag aktív sejtek infiltrációja, illetve a dermális erek megnyúlása, kanyargóssá válása. A psoriasisos plakk gyulladásos sejteinek többsége kután leukocyta antigént (CLA - cutaneous leukocyte antigen) expresszáló, azaz a bőrbe kivándorolni képes CD3+ T-lymphocyta. A CD3+ populáción belül a CD4+ és CD8+ sejtek aránya átlagosan 1:2. Míg a CD8+ lymphocyták csaknem kizárólag az epidermisben helyezkednek el, a CD4+ T-sejtek egyenletesen oszlanak el a dermisben és az epidermisben. A psoriasisos plakkban a T-sejtek mellett jelentős számú neutrophil granulocyta, hízósejt és aktivált dendritikus sejt is található.

Bár a psoriasisos bőrtünetek kialakulásának pontos mechanizmusa nem ismert, a kezdeti fázisban külső provokáló tényezők feltehetően a veleszületett immunrendszer aktiválásán keresztül vezetnek a pikkelysömörös tünetek kialakulásához. A veleszületett immunrendszer aktiválódása során termelődő citokinek közül legfontosabb a tumor nekrosis faktor (TNF) α és az interleukin (IL)-1 α . Feltehető, hogy a provokáló faktorkok által aktiválódott myeloid dendritikus sejtek a nyirokcsomóba vándorolnak, citokineket bocsátanak ki, melyek aktiválják a T-sejteket. A psoriasisos CD4+ T-sejtek elsősorban Th17 (pl. IL-17, IL-22) és Th1 citokineket (pl. IFN γ) termelnek. Bár a T-sejtek fokozott aktiválódásának és proliferációjának oka nem ismert, T-sejt receptor variabilitási vizsgálatok alapján elképzelhető, hogy valódi antigén-specifikus aktivációról van szó. A pikkelysömörös T-sejtek kóros aktivációjának egy újabb lehetséges magyarázata a CD4+CD25+ szabályozó T-sejtek (Treg) hibás működése. A közelmúltban írták le egy új immunsejt-típus, a limfoid vonalból származó, de antigén-specifikus receptorokat nem hordozó, IL-17 és IL-22 termelésére képes ILC (innate lymphoid cell/veleszületett limfoid sejt)3 sejtek szerepét a pikkelysömör patogenezisében. Bár a fenti kísérletek a T-sejtek központi szerepét támasztják alá, kétségtelen, hogy azok csak megfelelő, „psoriasisra hajlamosító” környezetben képesek a tünetek kialakítására. Bata-Csörgő és munkatársai igazolták, hogy a psoriasisos T-sejtekből felszabaduló Th1 citokinek megfelelő kombinációja fokozza a pikkelysömörös hámsejtek osztódását. A keratinocyták ugyanakkor számos proinflammatorikus citokint és kemokint (IL-8, growth-regulated oncogene- α , S100A7/ A8/A9 proteinek) termelnek, melyek neutrophil granulocytákat, T-sejteket aktiválhatnak vagy irányíthatnak a bőrbe, így kialakul egy öfenntartó gyulladásos kör a pikkelysömörös bőrben. A közelmúltban több genetikai és funkcionális vizsgálat igazolta, hogy a hám barrier funkciójának kialakításában részt vevő fehérjék közül az LCE család több tagja is szerepet játszik a psoriasis patogenezisében.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálataink célja a psoriasis kialakulásának, klinikai jellegzetességeinek, kezelésének jobb megismerése volt.

- I. A **psoriasis genetikai hátterének pontosabb feltérképezése**, genetikai polimorfizmusok [TNFSF15 (TNF (ligand) superfamily member 15/TNF szupercsalád 15.tag), ERAP1 (Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1 – endoplazmatikus retikulum aminopeptidáz 1) és a HLA-C gének) vizsgálata klinikailag jól karakterizált betegcsoportokban.
- II. A **psoriasis (immun)patogenezisének vizsgálata**
 - a. A tünetmentes psoriasisos bőr fehérje szerkezetének vizsgálata
 - b. A Treg sejtek működésének vizsgálata psoriasisban, a humán Treg sejtek azonosítására és szeparálására alkalmas sejtfelszíni marker azonosítása
 - c. Az IL-1 receptor (IL-1R) vizsgálata psoriasisos T-sejtek működésében
 - d. A tranziens receptor potenciál (TRP) csatornák és a TRPA1 (tranziens receptor potenciál ankyrin 1) pozitív nociceptív neuronok szerepének vizsgálata psoriasisban
- III. A **pikkelysömör klinikai jellemzőinek vizsgálata**
 - a. A psoriasis klinikai jellemzőinek és kezelési szokásainak felmérése
 - b. A dohányzás szerepének vizsgálata periodontitis kialakulásában psoriasisban
 - c. A citrullinált peptid ellenes antitestek jelentőségének vizsgálata psoriasisban és arthritis psoriaticában
 - d. A gyógyszer ellenes antitestek szerepének vizsgálata a psoriasis TNF gátló kezelésében
 - e. A methotrexát kezelés klinikai gyakorlatának felmérése psoriasisban

3. BETEGEK, KÍSÉRLETI ÁLLATOK, MÓDSZEREK

3.1. A TNFSF15 ÉS ERAP1/HLA-C GÉNEK POLIMORFIZMUS VIZSGÁLATA

A vizsgálatba 214 psoriasis vulgarisban (PsV) és 105 arthritis psoriaticában (PsA) szenvedő beteg került bevonásra. Kontroll csoportként 20 önkéntes szerepelt. A genom DNS-t a betegek és kontrollok vénás véréből BioRobot EZ rendszeren EZ1 DNA Blood Kit segítségével izoláltuk. Genotipizálásra PCR alapú Assay-by-Design módszert alkalmaztuk. A PCR amplifikációt követően a végpont meghatározást iQ5 vagy CFX 96 real-time PCR rendszereken végeztük.

3.2. A TÜNETMENTES PSORIASISOS BŐR SZERKEZETÉNEK VIZSGÁLATA

A vizsgálat során 6 pikkelysömörös betegtől és 20 egészséges önkéntestől került sor mintavételre. Az epidermis fehérje szerkezetének vizsgálatát gyengített teljes reflexiós Fourier transzformációs infravörös (ATR-FTIR) spektroszkópiával végeztük el 4000 és 400 cm^{-1} tartományban, 4 cm^{-1} optikai felbontással. A spektrumok feldolgozása a GRAMS/AI Suite szoftver segítségével történt. Az amid-I sáv komponenseit illetve az ehhez kapcsolódó intenzitásokat szemi-quantitatív módon, Gauss-Lorentz illesztési algoritmussal határoztuk meg az FTIR spektrum 1695–1600 cm^{-1} tartományában.

3.3. A TREG SEJTEK MŰKÖDÉSÉNEK VIZSGÁLATA PSORIASISBAN

A humán perifériás vér mononukleáris sejtek (PBMC) szeparálását heparinizált vénás vérből Histopaque denzitás grádiens centrifugálás segítségével végeztük. A CD4 sejteket a PBMC-ből negatív szelekcióval szeparáltuk. A CD25 pozitív sejteket pozitív szelekcióval különítettük el anti-CD25 antitesttel fedett mágneses mikrogöngyökkal. A CD4+CD25+ Treg sejtek aktiválásához CD3/CD28 monoklonális antitesteket (mAb) vagy mitomicin C-kezelt allogén APC-eket alkalmaztunk, IL-2 jelenlétében vagy nélkül. A sejtek proliferációját [^3H]timidin inkorporációs teszt segítségével mértük. A vér és bőrsejtek felszínén lévő markereket a megfelelően jelölt monoklonális antitesttel történő inkubálás és 4%-os paraformaldehidben történő fixálás után áramlási citometriával detektáltuk. Az intracelluláris antigének detektálására a sejteket 1%-os saponin oldattal történő permeabilizálás után jelöltük a megfelelő mAb-vel.

3.4. AZ IL-1R EXPRESSZIÓ VIZSGÁLATA PSORIASISOS T-SEJTEKEN

A CD4+ és a CD4+CD25+ sejteket Human T Regulatory Lymphocyte Isolation Set segítségével izoláltuk. A CD127-et alacsony intenzitással expresszáló sejteket anti-CD127 antitestekkel történő jelölést követően áramlási citometriás elválasztással szeparáltuk. A

T-sejtek aktiválására CD3/CD28 mikrogyöngyöket (1:4 gyöngy-sejt arány) alkalmaztunk, a sejteket 1,6, és 24 óráig (RT-PCR kísérletek), 48 óráig (áramlási citometriás kísérletek) vagy 72 óráig (ELISA kísérletek) tenyésztettük. A cDNS ampifikálását IL-1R1, IL-1R2, sIL-1R2, valamint 18S rRNS specifikus primerek segítségével végeztük, a kapott eredményeket a 18S rRNS gén eredményekkel normalizáltuk. Az aktivált és aktiválatlan sejtek felülcsúszójából a szolubilis IL-1R2 fehérje mennyiségét Human sIL-1R2 ELISA segítségével határoztuk meg.

3.5. A TRPA1+ NOCICEPTÍV NEURONOK SZEREPE PSORIASIFORM

BŐRGYULLADÁSBAN

Kísérleteinkben TRPA1 génhányos (KO, -/-) és vad típusú (WT, +/-) nőtény egerekkel dolgoztunk. A psoriasiform dermatitist Aldara krémmel (5% imiquimod, Meda Pharma) váltottuk ki, az epikután allergia tesztekben alkalmazott finn kamrákban vittük fel a krémeket az egerek leborotvált hátbőrére. A kezelést a 4 napos kísérlet minden napján ugyanazon a területen elvégeztük. A kísérlet végén az altatott állatokat cervikális diszlokációval leöltük. A kezelés során kialakuló szisztémás hatások vizsgálatának céljából a kísérlet végén az állatok lépszövetét eltávolítottuk, tömegét lemértük. A kapott értékeket az állat súlyához viszonyítottuk, és kezelést nem kapott, azonos korú állatok relatív léptömegéhez viszonyítva adtuk meg. A hátbőr vastagságát mikrométerrel mértük 0,1 mm pontossággal a kezelés előtt valamint a kezelést követően a megadott időpontokban (24h, 48h, 72h, 96h). Az adatokat a hátbőr vastagság %-os változásában adtuk meg a kontroll értékekhez viszonyítva. A szöveti vérátáramlást Laser Speckle Contrast Analysis (LASCA) lézer Doppler (Perimed, Svédország) módszerrel határoztuk meg az Aldara kezelést megelőzően, illetve a kezelése során minden nap. A kvantitatív valós idejű PCR vizsgálatokat Agilent MX3000P QPCR System segítségével végeztük. Az mRNS expressziós vizsgálatokhoz az alábbi primereket alkalmaztuk: interleukin-1 béta (IL-1 β), tumor necrosis factor alfa (TNF α), interleukin-17 (IL-17), interleukin-22 (IL-22) és interleukin-23 (IL-23). 4.8.6. Szöveti citokin fehérjék meghatározása céljából a fagyasztott hátbőr minták súlyát felolvasztás után lemértük, és 1 ml PBS/PMSF oldatban 4°C-on homogenizáltuk. A mintákat 4000 g-n 15 percig centrifugáltuk, a felülcsúszókat visszagyűjtöttük. Milliplex Map Kit Mouse Th17 Magnetic Bead Panel használatával meghatároztuk a minták IL-1 β , IL-17, IL-22, IL-23 és TNF α koncentrációját. A kimetszett bőrszöveteket 4%-os paraformaldehidben fixáltuk, majd a paraffinba ágyazott mintákból 4-6 μ m-es metszeteket készítettünk és hematoxin-eozinnal festettük a gyulladás általános szövettani elváltozásainak megállapítására.

3.6. A BETEGSÉG SÚLYOSSÁGA, ÉLETMINŐSÉG ÉS KEZELÉSI SZOKÁSOK FELMÉRÉSE

Az adatok gyűjtése kérdőívek segítségével, illetve a betegek megelőző egészségügyi adatainak áttekintésével történt. A kérdőívek az alábbi demográfiai és klinikai adatokra vonatkozó kérdéseket tartalmazták: életkor, nem, pikkelysömör vagy arthritis psoriatica a családi anamnesisben, korábbi és jelenlegi megbetegedések, életkor a tünetek kialakulásakor és a diagnózis felállításakor, korábbi, reumatológus által diagnosztizált enthesitis, enthesopathia vagy arthritis, a tünetek lokalizációja. Az egészségügyi erőforrások felhasználását az alábbi kérdések vizsgálták: pikkelysömör miatti kórházi kezelés vagy sebészeti beavatkozások száma, speciális járóbeteg szakrendeléseken történt vizitek száma, gyógyfürdő kezelések száma.

3.7. A DOHÁNYZÁS SZEREPE A PERIODONTITIS KIALAKULÁSÁBAN PSORIASISBAN

A klinikai vizsgálatban 82 psoriasisos beteg vett részt. A kontroll csoportban 89 egészséges önkéntes vettek részt. A betegek és a kontroll személyek demográfiai adatait és dohányzási szokásait kérdőív segítségével mértük fel, illetve a vizsgálat résztvevői periodontológus által végzett teljes periodontális vizsgálaton estek át.

3.8. CITRULLINÁLT PEPTIDEK SZEREPE PSORIASISBAN

A vizsgálatba 46 arthritis psoriaticás illetve 42 csak psoriasis vulgaris beteget vontunk be, kontrollként 40 egészséges önkéntest szerepelt. Az anti-MCV (mutated citrullinated vimentin/mutáns citrullinált vimentin) szintek meghatározására ELISA módszert alkalmaztunk, antigénként rekombináns MCV szolgált. A 20U/mL titernél magasabb cut-off értékek esetén tekintettük pozitívnak a vizsgálatot.

3.9. TNF, TNFi, ANTI-TNFi ANTITEST KONCENTRÁCIÓ MEGHATÁROZÁSA

A vizsgálatban összesen 77 psoriasisos beteg vett részt. A betegektől a tervezett biológiai terápiás infúzió/injekció napján 5-10 ml vért vettünk. A plazmából ELISA segítségével határoztuk meg a TNF koncentrációt, a TNFi (infliximab, adalimumab vagy etanercept) koncentrációt, valamint a gyógyszer ellenes antitestek (anti-drug antibody – ADA) jelenlétét.

3.10. A METHOTREXÁT KEZELÉS KLINIKAI GYAKORLATÁNAK FELMÉRÉSE PSORIASISBAN

Az internet alapú kérdőíveket a Psoriasis International Network (PIN) nemzeti koordinátorai juttatták el az adott ország bőrgyógyászaikhoz. A vizsgálatban összesen 481 bőrgyógyász vett részt. A kérdőív az alábbi demográfiai adatokat mérte fel: életkor, a bőrgyógyász

pikkelysömör kezelésében való jártasságának mértéke, a munkahely jellege (kórházi/járóbeteg, közfinanszírozott/magán). A metothrexát kezelésre vonatkozó kérdések a következő témákat érintették: a kezelést megelőző vizsgálatok, biztonságossági vizsgálatok a kezelés során, a gyógyszer alkalmazási módja, a gyógyszer kezdő és fenntartó dózisa, kiegészítő folsav kezelés, a hatékonyság felmérése, kombinációs terápia alkalmazása.

4. EREDMÉNYEK

Ebben a fejezetben röviden ismertetésre kerülnek a kísérletes munka eredményei. Az értekezésben terjedelmi okok miatt nem részletezett eredmények a publikációkban megtalálhatók.

4.1. A TNFSF15 ÉS ERAP1/HLA-C GÉNEK POLIMORFIZMUS VIZSGÁLATA

Vizsgálataink szerint a TNFSF15 gén rs6478109 SNP (single nucleotide polymorphism – egyponstos nukleotid-polimorfizmus) genotípus eloszlása szignifikánsan eltért a pikkelysömör és a kontroll populációk között: a mutáns allél gyakorisága magasabb volt a psoriasisos betegek között. Ha a psoriasis csoportot a csak bőrtünetekkel vagy ízületi tünetekkel is rendelkező alcsoportokra tovább bontva vizsgáltuk, a csak bőrtünetekkel rendelkező betegek esetén hasonló eredményt kaptunk, míg az arthritis psoriatica esetén nem volt szignifikáns eltérés a kontroll populációhoz viszonyítva. A vizsgált személyek (mind a betegek mind a pikkelysömörösök) mintegy fele a korábban már japán, koreai és kaukázusi populációkban közölt haplotípusokat hordozta. Az A és B haplotípusok eloszlásában nem találtunk szignifikáns különbséget a kontroll és a pikkelysömörös csoportok között, a C haplotípus eloszlása ugyanakkor szignifikánsan eltért a teljes pikkelysömörös csoport és a kontrollok között ($p=0,0041$). A csak bőrtünetekkel rendelkező betegek esetén is szignifikánsan eltérő volt a C haplotípus eloszlása a kontroll csoporttal összehasonlítva ($p=0,0250$), míg arthritis psoriatica esetén az eltérés a szignifikancia határán volt ($p=0,0524$).

Az egyik HLA-C SNP (rs10484554) és ERAP1 SNP (rs10050860) genotípus eloszlása szignifikánsan különbözött a teljes psoriasisos populációban az egészséges kontrollokhöz viszonyítva ($p=5,7 \times 10^{-6}$ és $p=0,0249$). A mutáns HLA-Cw*0602 (rs10484554 SNP) allélt hordozók aránya szignifikánsan magasabb volt a psoriasisos betegek között, mint az egészséges kontrollok esetén (58,3% és 36,5%), ugyanakkor a pikkelysömörös csoporton belül nem volt különbség a csak bőrtünetekkel vagy ízületi tünetekkel is rendelkező betegek alcsoportjai között (57,9% és 59,0%). Az rs10050860 ERAP1 SNP gyakorisága ugyanakkor szignifikánsan alacsonyabb volt a psoriasisos betegek között, mint a kontrollok esetén. Azaz, míg a HLA-Cw*0602 rs10484554 SNP erős hajlamosító tényező általában a pikkelysömör szempontjából, az ERAP1 rs10050860 SNP inkább protektív szerepet tölt be a pikkelysömör kialakulásával szemben. Az rs10484545 HLA-C SNP és a 4 másik ERAP1 SNP (rs27524, rs27525, rs30187 és rs17482078) esetén a genotípusok eloszlásában nem volt statisztikailag szignifikáns különbség az egészséges személyek és a psoriasisos betegek között.

A HLA-C rs10484554 SNP genotípus eloszlása mind a csak bőrtünetekkel rendelkező pikkelysömörös mind az arthritis psoriatica alcsoportokban szignifikánsan különbözött a kontroll csoporttól ($p=0,00007$ és $p=0,0001$), ami korábbi irodalmi adatoknak is megfelelt. Az rs10050860 mellett másik 2 ERAP1 SNP (rs27525 és rs17482078) genotípus eloszlása is szignifikánsan különbözött az egészségesek és a PsA betegek között (rs10050860: $p=0,0072$, rs27525: $p=0,0259$ és rs17482078 $p=0,0195$). Mindhárom SNP esetén a vad típusú allélt hordozó egyének aránya magasabb volt az egészségesek csoportjában, ami valószínűsíti, hogy az SNP-k ritka alléljai protektív szerepet játszhatnak az arthritis psoriatica szempontjából.

Az rs10484554 HLA-C SNP esetén csak a korai csoportban észleltünk szignifikáns különbségeket, ami korábbi közleményekkel egybevágott. A korábban leírt, arthritis psoriaticával asszociált 3 ERAP1 SNP (rs10050860, rs27525 és rs17482078) a korai psoriasisos csoporttal álltak kapcsolatban ($p=0,0142$, $p=0,0116$ és $p=0,0356$). Az rs10050860 SNP esetén a genotípus eloszlás csak a korai kezdetű teljes psoriasis csoportban volt eltérő ($p=0,0418$), a késői csoportban nem.

Eredményeink szerint a B haplotípus a psoriasisra hajlamosít, ugyanakkor csak a késői teljes psoriasis populáció ($p=0,0409$), illetve a késői arthritisszel társult psoriasis ($p=0,0413$) esetén észleltünk szignifikáns asszociációt.

Két ERAP1 SNP hajlamosító tényezőként viselkedett a HLA-C jelenléte esetén. Ezek egyike, az rs27524 ERAP1 SNP a HLA-C pozitív egyéneknél a psoriasis kialakulásának rizikóját 1,74-szeresére növelte ($p=0,0454$), a PsA rizikóját pedig 2,33-szorosra ($p=0,0185$). Az rs27525 ERAP1 SNP ugyanakkor a HLA-C pozitív egyéneknél csökkentette a PsA kialakulásának rizikóját (OR 0,42, $p=0,0339$). Azaz, ennek az SNP-nek a jelenléte a HLA-C pozitív egyének esetén védelmet biztosít a PsA kialakulásával szemben.

4.2. A TÜNETMENTES PSORIASISOS BŐR FEHÉRJE SZERKEZETÉNEK VIZSGÁLATA

Célkitűzésünk az volt, hogy a pikkelysömörös és az egészséges stratum corneum fehérje szerkezetét megvizsgáljuk gyengített teljes reflexiós FTIR (ATR-FTIR) spektroszkópia segítségével. A non-invazív módszer segítségével meghatározható volt a különböző másodlagos struktúrával rendelkező fehérje lánc részek jelenlétére utaló amid-I sávok komponenseinek hozzávetőleges gyakorisága. Vizsgálataink szerint az amid-I sávok intenzitása összességében is alacsonyabb volt a pikkelysömörös stratum corneumban mint az egészséges bőrben, a legkifejezettebb eltérést ugyanakkor az 1660 cm⁻¹-nél lévő sáv mutatta. A stratum corneum fehérjéi többnyire α -helikális szerkezetűek, az 1650 cm-

1-nél lévő sáv egy α -hélix jelenlétére utal. Az 1660 cm⁻¹-nél lévő sáv ugyanakkor a fehérjélancon belüli kanyarra jellegzetes. Ennek a sávnak az intenzitása gyakorlatilag nulla a psoriasisos mintákban, ami a kanyar szerkezetek gyakoriságának csökkenésére utal. Az utóbbi sáv intenzitásának a csökkenése azoknak a struktúráknak az elvesztését jelentheti, melyek a stratum corneum fehérjeinek rugalmasságát biztosítják.

4.3. A TREG-SEJTEK MŰKÖDÉSÉNEK VIZSGÁLATA PSORIASISBAN

A pikkelysömörös betegektől származó CD4+CD25- responder T-sejtek (Tresp) az alloantigén stimulációra fokozottabb proliferációval válaszoltak, mint a kontroll CD4+CD25-sejtek. Sem a pikkelysömörös sem a kontroll CD4+CD25magas Treg sejtek nem proliferáltak az alloantigének hatására. A Treg sejtek szabályozó aktivitása ugyanakkor károsodott volt psoriasisban. Míg a CD4+CD25- Tresp sejtek proliferációját az 1:1 arányban hozzáadott kontroll CD4+CD25magas Treg sejtek csaknem teljesen (átlagosan 87,8%-ban) képesek voltak gátolni, a psoriasisos Treg sejtek gátló képessége jelentősen csökkentnek bizonyult (átlagosan 60,6%, $p=0,0001$). Az 50%-os gátlás eléréséhez szükséges Treg:Tresp arány jelentősen eltért a kontroll és a psoriasisos sejtek között. Az egészséges Treg sejtek 1:8 és 1:16 közötti aránynál gátolták a Tresp sejt proliferációt 50%-os hatékonysággal, míg psoriasisos sejtek esetén mintegy 8-szor (1:2-1:1 arány) magasabb Treg sejt számra volt szükség hasonló mértékű gátláshoz. Sőt, a pikkelysömörös Treg sejtek még 2:1 arány mellett sem tudtak ugyanolyan hatékony, csaknem teljes gátlást biztosítani, mint az egészséges kontrolloktól származó Treg sejtek már 1:1 arány mellett.

A Treg:Tresp sejtek azonos arányánál az egészséges Treg sejtek 75,2%-ban gátolták a psoriasisos CD4+CD25- sejtek proliferációját (összehasonlításként, a gátlás 88,7%-os volt autológ Tresp sejtek esetén). Ugyanakkor a pikkelysömörös betegektől származó Treg sejtek csak 34,4%-ban voltak képesek gátolni a kontroll Tresp sejtek proliferációját (az autológ psoriasisos CD4+CD25- sejtek osztódását 52,6%-ban). Azaz a psoriasisos betegek CD4+CD25magas Treg sejtjei valóban lényegesen kevésbé hatékonyan képesek csak kontrollálni az egészséges CD4+CD25- Tresp sejtek proliferációját, mint az egészséges Treg sejtek. Az egészségesek CD4+CD25magas Treg sejtjei ugyanakkor jobban képesek gátolni a hiperreaktív psoriasisos CD4+CD25- Tresp sejtek proliferációját, mint a saját psoriasisos Treg sejtek.

A CLA+ sejtek a vérben lévő CD4+ populáció 14,6%-át tették ki egészségesekben ($n=7$), 17,2%-át psoriasisos betegekben ($n=6$). A CD4+CD25magas sejtek a CLA+CD4+ sejtek 11,4%-át alkották egészségesekben, és 11,2%-át psoriasisban. A CLA- és CLA+ Treg sejtek hasonló mértékben, de csak részlegesen voltak képesek a Tresp sejtek

proliferációjának gátlására. Eredményeink szerint, bár a Treg sejtek nagyobb arányban fordulnak elő mind a normál mind a pikkelysömörös CLA+CD4+ T-sejt populációban, a Treg sejtek a psoriasisos vérben nem korlátozódnak kizárólag a bőr felé elkötelezett (CLA+) populációra.

Eredményeink szerint a CD4+CD25+ regulátor sejt vs. CD4+CD25- effektor sejt arány a pikkelysömörös tünetes bőrben a dermisben 1:6, az epidermisben 1:2. A perifériás vérből izolált psoriasisos Treg sejtekhez hasonlóan a tünetes bőr Treg sejtjei is csökkent gátló aktivitást mutattak az egészséges vérből származó Treg sejtekhez képest. Továbbá, az *in vivo* szituációt szimuláló Treg:Tresp aránynál (14% vs. 86%, azaz 1:6) a dermális Treg sejtek gyakorlatilag nem voltak képesek az autológ effektor sejtek gátlására (88% maradék proliferáció). Ugyanilyen arányban a kontroll perifériás vérből izolált CD4+CD25magas Treg sejtek 50% körüli gátlásra képesek. Azaz a dermális Treg sejtek mind számukat mind funkciójukat tekintve képtelenek a Tresp sejtek proliferációjának megfelelő gátlására.

4.4. HUMÁN TREG-MARKER AZONOSÍTÁSA

Vizsgálataink kezdetekor a CD25 expresszió volt a legelfogadottabb sejtfelszíni marker a regulátor T-sejtek jellemzésére. Célunk az volt, hogy a humán Treg sejtek azonosítására és szeparálására alkalmas sejtfelszíni markert azonosítsunk. Előzetes gén chip vizsgálataink (Gyulai R, Sugiyama H: nem publikált adatok) során az egyik, a regulátoros T-sejtekben jelentősen magasabb mRNS expressziót mutató gén a GARP (glycoprotein A repetitions predominant) nevű, a leucin-gazdag ismétlődéseket tartalmazó fehérjék (Leucine rich repeat containing – LRRC) családjába sorolt fehérje génje volt. Eredményeink szerint a GARP mRNS nem fejeződött ki a CD4+CD25- T-sejteken sem aktiválatlan sem aktivált állapotban. Az aktiválatlan vagy csak anti-CD3 aktivált CD4+CD25+ T-sejtek ugyancsak nem expresszálták a GARP mRNS-t, míg az anti-CD3/anti-CD28 aktivált CD4+CD25+ T-sejtekben kismértékben, az anti-CD3/anti-CD28/IL-2 aktivált sejtekben pedig jelentősen megnőtt a GARP mRNS expresszió. Vizsgálataink szerint a GARP érzékenyebb a CD4+CD25+ T-sejtekben poliklonális stimuláció és IL-2 hatására létrejövő aktivációra mint a FOXP3, a GARP mRNS szintje ugyanis lényegesen nagyobb mértékben emelkedett meg, mint a FOXP3 mRNS.

4.5. AZ IL-1R EXPRESSZIÓ VIZSGÁLATA PSORIASISOS T-SEJTEK MŰKÖDÉSÉBEN

Mind az egészséges mind a pikkelysömörös aktiválatlan effektor T-sejtek igen alacsony szinten expresszálták a szignál transzdukcióért felelős receptor IL-1R1 mRNS-t. Az aktiválatlan effektor sejtekhez képest az egészségesekből szeparált nyugvó Treg sejtek IL-1R1 mRNS expressziója nagyságrendekkel magasabb volt, az aktiválatlan psoriasisos

Treg sejteké pedig még ezt is meghaladta. CD3/CD28 aktiváció hatására az IL-1R1 mRNS expresszió mind az egészséges mind a psoriasisos CD4+CD25- effektor sejtekben jelentős mértékben megemelkedett. Az egészséges CD4+CD25+CD127- Treg sejtekben aktiváció hatására szintén emelkedett az IL-1R1 mRNS kópiaszám. A psoriasisos Treg sejtekben ugyanakkor a már nyugalomban is magas IL-1R1 expresszió inkább csökkenő tendenciát mutatott aktiváció hatására. Összességében azonban aktivációt követően a pikkelysömörös CD4+CD25+CD127- T-sejtekben még mindig magasabb volt az IL-1R1 mRNS expresszió, mint az egészséges sejtekben.

Az aktiválatlan sejtek IL-1R2 és sIL-1R2 mRNS expressziójában nem volt szignifikáns különbség az egészséges és a psoriasisos CD4+CD25- és CD4+CD25+CD127- T-sejtek között. CD3/CD28 aktiváció hatására mindkét decoy receptor mRNS expressziója megemelkedett mind a CD4+CD25- mind a CD4+CD25+CD127- T- sejtekben. Az aktivációt követően a pikkelysömörös CD4+CD25- effektor sejtek szignifikánsan magasabb mértékben fejezték ki a csali receptoros mRNS-ét, mint az egészséges kontroll effektor sejtek.

Aktiválatlan T-sejtekben a Treg sejtpopuláció esetén észleltük a legmagasabb IL-1R1 expressziót, mind a pikkelysömörös mind az egészséges minták esetén (egészséges: 32,31%, psoriasis 31,87%). Az aktivált pikkelysömörös Treg sejtek több mint 80%-a volt IL-1R1 pozitív, míg az egészséges Treg sejtek szignifikánsan alacsonyabb arányban (68,4%, $p < 0,05$) mutattak csak IL-1R1 pozitivitást. Az egészséges Treg sejteken a CD3/CD28 aktiváció hatására ugyanakkor az IL-1R1 expresszió nemcsak arányában, hanem intenzitásában is jelentősen megnőtt (átlagos fluoreszcencia intenzitás [MFI] = 54,11, $p < 0,01$), míg a psoriasisos Treg sejteken az intenzitás gyakorlatilag változatlan maradt (MFI = 35,7). A Treg sejtekhez hasonlóan az egészséges memória T-sejtek (TM) esetén aktiváció hatására szignifikánsan emelkedett az IL-1R1 expresszió intenzitása (aktiválatlan TM: MFI = 23,32, aktivált TM: MFI = 45,83, $p < 0,01$), míg a psoriasisos TM sejteknél csak minimális, nem szignifikáns intenzitásbeli növekedést észleltünk (aktiválatlan TM: MFI = 31,71, aktivált TM: MFI = 35,86). Naiv T-sejtek (TN) esetén az IL-1R1 szám nem változott szignifikánsan sem az egészséges sem a psoriasisos mintákban. Ugyanakkor az egészséges TN sejtek esetén szintén szignifikáns emelkedést észleltünk az IL-1R1 expresszió intenzitásában aktiváció hatására. Összességében eredményeink szerint a CD3/CD28 aktiváció hatására az IL-1R1 expresszáló sejtek aránya jelentősen nő mind az egészséges mind a psoriasisos Treg és TM populációban, ugyanakkor a

receptorok sűrűsége csak az egészséges T-sejteken emelkedik, a pikkelysömörös sejteken gyakorlatilag változatlan marad.

A decoy IL-1R2 a nem aktivált sejteknek csak igen kis részén volt kimutatható. Sem a sejtípusok sem az egészséges vagy psoriasisos minták között nem észleltünk jelentős különbséget aktiválatlan sejtek esetén. Aktiválást követően ugyanakkor a Treg sejtek túlnyomó része IL-1R2 pozitívnak bizonyult mind az egészséges mind a pikkelysömörös mintákban (a növekedés mindkét esetben szignifikáns volt). Bár kisebb, de szintén szignifikáns mértékben emelkedett a TM populációban az IL-1R2 pozitív sejtek aránya, míg a naiv sejteken nem okozott lényegi változást a CD3/CD28 aktiváció. Az IL-1R2 expresszió intenzitás az egészséges Treg és TM populációban némileg (nem szignifikáns mértékben) emelkedett, míg a psoriasisos mintákban és az egészséges naiv T-sejteken gyakorlatilag változatlan maradt az aktiváció hatására.

Az aktiválatlan sejtek csak minimális mennyiségű sIL-1R2-t bocsátottak a környezetükbe, míg az aktiválás hatására jelentős növekedést észleltünk. Bár a CD4+CD25- effektor sejtek mind aktiválatlan mind aktivált állapotban nagyobb mennyiségben szekretálták a szolúbilis IL-1R2-t mint a Treg sejtek, a különbség nem volt szignifikáns a két sejtpopuláció között. Bár mind a CD25- mind a CD25+ aktivált T-sejtek esetén a pikkelysömörös mintákban magasabb sIL-1R2 koncentrációt mértünk, mint az egészséges minták esetén, a különbség itt sem volt szignifikáns.

4.6. A TRPA1+ NOCICEPTÍV NEURONOK SZEREPE PSORIASIFORM BŐRGYULLADÁSBAN

A jelenleg alkalmazott imiquimod indukálta psoriasiform dermatitis modellben az imiquimod kezelés igen jelentős szisztémás hatást vált ki. Kíváncsiak voltunk, hogy az általunk alkalmazott új kísérleti elrendezésben, melyben a psoriasiform bőrgyulladást kisebb mennyiségű krémmel, valamint az Aldara és a kontroll krém egyidejű alkalmazásával, Finn kamrák használatával váltottuk ki, mennyire érvényesülnek ezek a szisztémás hatások. Ennek érdekében nyomon követtük a lép tömegének változását Aldara kezelés során. Nem tapasztaltunk szignifikáns lépmegnagyobbodást az Aldara kezelt TRPA1 WT és kezeletlen kontroll egerek között egyik vizsgált időpontban sem. Ezzel szemben az Aldarával kezelt TRPA1 KO egerek esetében a lép tömegének szignifikáns növekedését figyeltük meg a kezeletlen egerekhez képest a 3. és 4. kezelést követően.

Az Aldara kezelés hatására kialakuló hátbőr gyulladás szövettani képén TRPA1 WT és KO törzsek esetében is megfigyelhetőek voltak a pikkelysömörös bőr jellegzetes hisztopatológiai elváltozásai: keratinociták hiperproliferációja, parakeratózis,

hiperkeratózis. Szemikvantitatív értékelés alapján a TRPA1 WT és KO törzsek Aldara indukálta hátbőr gyulladásának hisztopatológiai képe között szignifikáns különbséget tapasztaltunk, a TRPA1 KO törzsben fokozottabb volt a psoriasiform gyulladás.

Az imiquimod kezelés jelentős bőr infiltrációt okozott mind a TRPA1 WT mind a TRPA1 KO törzsekben. A TRPA1 WT törzs esetében a duzzadás a második kezelést követően érte el maximumát, a növekedés a kiindulási állapothoz képest 30% körüli volt. Ezzel szemben a TRPA1 KO törzs esetében a duzzadás mértéke már a 2. napon meghaladta a vad típusnál észlelteket, a harmadik kezelésig tovább növekedett, ekkor érte el 55-60%-os maximumát. A kísérlet 2. és 3. napján szignifikáns különbség volt megfigyelhető a TRPA1 WT és KO törzsek imiquimod kezelt hátbőr területeinek duzzadása során. A TRPA1 receptor hiánya tehát a duzzadás mértékét a kísérlet 2. és 3. napján szignifikáns mértékben, 20-30%-al növelte. Az Aldara hatására a TRPA1 WT egerekben már az első kezelési naptól mintegy 20%-os vérátáramlás-növekedést észleltünk, mely a kísérlet negyedik napjáig csaknem változatlan maradt. A TRPA1 KO egerekben ezzel szemben a kísérlet végéig folyamatosan növekvő áramlásfokozódást észleltünk, mely a 4. napon már meghaladta a 60%-os emelkedést, és szignifikánsan magasabb volt, mint a TRPA1 vad típusú egerekben mért értékek. Azaz, az imiquimod kiváltott psoriasiform bőrgyulladásban a TRPA1 az ödémaképződéshez hasonlóan a szöveti vérátáramlás szabályozásában is szerepet játszik, hiányában fokozott gyulladás alakul ki.

A TRPA1 vad genotípusú egerekben az imiquimod kezelés az irodalmi adatokkal megegyezően jelentősen fokozta az IL-1 β , IL-23, IL-17, IL-22 és TNF α mRNS expresszióját. A TNF α és az IL-23 esetén az mRNS expresszió értéke a 6 órás időpontban volt a legmagasabb, míg az IL-1 β , IL-17 és az IL-22 esetében később, a 48 órás időpontban. A 96 órás időpontban az mRNS expresszió az összes citokin esetén már csökkenő tendenciát mutatott. Az IL-1 β mRNS expressziója imiquimod kezelés hatására a TRPA1 KO egerekben már 6 órával az Aldara kezelést követően jelentősen megnőtt, és minden időpontban a WT-hoz képest 2-2,5-szer nagyobb expresszió növekedést mutatott. Hasonlóan, a TNF α és az IL-22 esetén is 1,5-25-szer magasabb mRNS értékeket mértünk a TRPA1 KO egerekben, mint a vad típusú állatokban imiquimod kezelés hatására. Az IL-23 mRNS expressziója már a 6 órás mintavételi időpontban elérte a maximumát mindkét törzs esetében, majd az ezt követő mintavételi időpontokban a génexpresszió fokozatos csökkenése volt megfigyelhető. Ugyanakkor sem az IL-23 sem az IL-17 gén mRNS expressziójában nem volt különbség a két törzs között – talán a TRPA1 WT törzsben

kisebb mértékben csökkent az RNS szint a késői időpontokban, mint a KO egerek esetében.

A következő lépésben a psoriasiform bőrtünetekben meghatároztuk a TNF α , IL-1 β , IL-17, IL-22 és IL-23 fehérjék koncentrációját a TRPA1 WT és a TRPA1 KO csoportok szövetmintáiban. Érdekes módon a TNF α , az IL-1 β és az IL-17 esetén is a szöveti citokin koncentráció már igen korán, 6 órával az imiquimod kezelést követően jelentősen megemelkedett (mind a WT mind a KO állatokban). Ugyanakkor a citokin mRNS expresszió vizsgálatokkal szemben a fehérje koncentrációk esetén egyik esetben sem volt szignifikáns különbség a KO és a WT csoportok között.

4.7. A BETEGSÉG SÚLYOSSÁGA, ÉLETMINŐSÉG ÉS KEZELÉSI SZOKÁSOK FELMÉRÉSE

Mivel a régió pikkelysömörös betegeiről nem rendelkezünk epidemiológiai adatokkal, a vizsgálat célja a psoriasis epidemiológiai jellemzőinek általános, áttekintő felmérése volt Kelet-Közép-Európában. A vizsgálatba bevont 913 beteg közül 123 volt magyar. A betegek csaknem 60%-a férfi volt, az átlagéletkor 46,8 év volt. A bőrtünetek átlagosan 29,1 éves korban jelentek meg, a diagnózis felállítása átlagosan egy évet késett a tünetek megjelenéséhez képest. A 913 betegből 222 (24%) esetén fordult elő szülők, 114 (12%) esetben testvérek, 169 (19%) esetben egyéb családtagok között psoriasis. Társbetegségekről 572 (63%) beteg számolt be az alábbi megoszlásban: magas vérnyomás betegség (n=285; 31%), obezitás (n=145; 16%), májbetegség (n=99; 11%), gyomor-bélrendszeri betegség (n=80; 9%), atherosclerosis (n=62; 7%), 2 típusú diabetes mellitus (n=65; 7%), szívelégtelenség (n=57; 6%). Reumatológus által diagnosztizált arthritis psoriatica 132 (14%) beteg esetén fordult elő. A komorbiditások tekintetében szignifikáns országok közti különbségek mutatkoztak.

Az átlagos testfelszín érintettség (BSA) 28,7% volt, az átlagos PASI (Psoriasis Area and Severity Index – Psoriasis Felszín és Súlyossági Index) érték 15. A betegek igen jelentős része számolt be súlyos életminőség romlásról [átlagos DLQI (Dermatology Life Quality Index – Bőrgyógyászati Életminőség Index) 11,4, átlagos VAS (vizuális analóg skála) 44]. Míg a magyar betegek tüneteinek aktivítása és életminőség mutatói is a régió átlagával csaknem megegyeztek, az orvosok az átlagosnál kevésbé voltak elégedettek a beteg korábbi kezelésének eredményével. Csaknem minden beteg (873, 96%) részesült a vizsgálatot megelőző három év során helyi kezelésben. 558 beteg (61%) kapott fénykezelést, míg 412 beteg (45%) valamilyen standard szisztémás kezelésben részesült. A 340 súlyos psoriasisos beteg között alig valamivel volt nagyobb azok aránya, akik korábban fényterápiában (58%) vagy szisztémás kezelésben (69%) részesültek, mint az

összes beteg esetén. A résztvevő országok között is jelentős eltérések voltak az alkalmazott gyógyszerek megoszlásában. A methotrexát alkalmazása a legmagasabb a Balti országokban és Romániában volt, a legalacsonyabb Szlovákiában. Ciklosporint ugyanakkor a legtöbben Szlovákiában szedtek, a dithranolt pedig leggyakrabban Lengyelországban alkalmazták. Azon 482 beteg közül, akiknek a kezelésével a kezelőorvos nem volt elégedett, 312 (68%) részére javasolta volna az orvos biológiai terápia beállítását.

4.8. A DOHÁNYZÁS SZEREPE A PERIODONTITIS KIALAKULÁSÁBAN PSORIASISBAN

Vizsgálataink szerint a dohányzó psoriasisos csoportban nem volt egészséges fogíny-státuszú beteg. A csoportban 5 betegnek (14%) korai, 13 betegnek (37%) középsúlyos, 17 betegnek (49%) súlyos periodontitise volt. A nem dohányzó pikkelysömörös betegek közül 10 (21%) volt egészséges fogíny-státuszú, míg 13 (28%) korai, 18 (39%) középsúlyos és 6 (12%) súlyos fogínygyulladásban szenvedett. A nem pikkelysömörös dohányzók közül 10 (42%) volt egészséges fogíny-státuszú, 8-nak (33%) korai, 4-nek (17%) középsúlyos, 2-nek (8%) súlyos periodontitise volt. A nemdohányzó kontroll csoportban 25 esetben (38%) egészséges fogínyt, illetve 19 (29%) korai, 17 (26%) középsúlyos és 4 (7%) súlyos periodontitist észleltünk. Tehát a dohányzó pikkelysömörös betegek és a nemdohányzó kontroll önkéntesek esetén ellenkező irányú tendenciát lehet megfigyelni. Míg a psoriasisos dohányosok között a súlyos periodontitis volt a leggyakoribb és nem észleltünk egészséges fogínyű beteget, addig a kontroll nemdohányzó csoportban az egészséges fogínyűek voltak többségben, és csak elvétve fordult elő súlyos fogínybetegség. Statisztikailag a pikkelysömör fennállása önmagában 4,373-szorosára (OR a nemdohányzó kontroll csoporthoz hasonlítva, $p < 0,05$) növelte a súlyos periodontitis kialakulásának valószínűségét, míg dohányzással együtt a rizikó 24,278 volt (OR a nemdohányzó kontroll csoporthoz hasonlítva, $p < 0,001$). Ez az esélyhányados 4,43-szor magasabb, mint a dohányzás (OR 1,25) és a psoriasis (4,373) esélyhányadosok kombinációja, ami a két tényező szinergista hatására utal a súlyos fogínybetegség kialakulásában. Más szavakkal, a súlyos periodontitis kialakulásának rizikója psoriasisos betegeken dohányzás esetén hatszor magasabb, mint dohányzás nélkül. A dohányzás ugyanakkor a pikkelysömörös betegek között szignifikánsan emelte a periodontitis mindhárom súlyossági fokozatának kialakulás valószínűségét ($p < 0,001$). Végül a dohányzás hossza ugyancsak szignifikáns módon emelte a középsúlyos és a súlyos periodontitis kialakulásának valószínűségét mind a psoriasisos ($\chi^2 = 12,204$, $p = 0,014$) mind a kontroll ($\chi^2 = 9,869$, $p = 0,02$) csoportban.

4.9. CITRULLINÁLT PEPTIDEK VIZSGÁLATA PSORIASISBAN ÉS ARTHRITIS PSORIATICÁBAN

A PsA betegek szérumában az anti-MCV antitestek átlagos koncentrációja $30,32 \pm 82,14$ U/ml volt, ami szignifikánsan magasabb, mint a csak bőrtünetekkel rendelkező psoriasisos betegek illetve kontrollok szérumában mért $8,71 \pm 7,41$ U/ml illetve $9,50 \pm 4,23$ U/ml átlagérték. A módszertanilag javasolt 20 U/ml küszöbérték alapján 11 PsA beteg (24%) és 3 PsV beteg (8%) volt anti-MCV antitest pozitív, míg a kontrollok közül mindenki anti-MCV antitest negatív. A PsA csoport értékei statisztikailag szignifikánsan eltértek mind a PsV mind a kontroll csoporttól, ugyanakkor a PsV és kontroll csoportok között nem volt statisztikailag értékelhető különbség. A PsV betegek esetén a magas anti-MCV titer súlyosabb bőrtünetekkel társult. A súlyos betegek anti-MCV szintje $9,73 \pm 7,54$ U/ml volt, szignifikánsan magasabb, mint az enyhe betegeké ($2,73 \pm 2,37$ U/ml) – bár mindkét csoportban az átlagok a gyártó által ajánlott cut-off érték alatt maradtak.

A középsúlyos-súlyos PsV csoporton belül a biológiai terápiában részesülő betegek anti-MCV szintjei ($14,01 \pm 6,22$ U/ml) szignifikánsan magasabbak voltak, mint a biológiai terápiában nem részesülő középsúlyos-súlyos betegek értékei ($3,01 \pm 3,34$ U/ml, $P < 0,01$). Ugyanakkor, az anti-MCV szintek nem mutattak összefüggést a psoriasis mintavétel idején meghatározott aktivitásával [PASI és DAS28 (Disease Activity Score 28 – Betegség Aktivitási Érték 28) értékek]. A korai kezdetű psoriasisban az anti-MCV szintek szignifikánsan magasabbak voltak, mint a késői kezdetű psoriasisos betegek esetén. Az arthritis psoriatica csoportban hasonló összefüggést nem észleltünk a betegség kezdetének időpontja és az anti-MCV szintek között.

4.10. TNF, TNFi, ANTI-TNFi ANTITEST KONCENTRÁCIÓ MEGHATÁROZÁSA

Pikkelysömör biológiai terápiája során gyógyszer ellenes antitesteket 77 betegből 15 esetében (19,5%) detektáltunk: az infliximab csoportban 7, az adalimumab csoportban 8 esetben. Az etanercept kezelésben részesülő betegek esetén nem észleltük ADA-k jelenlétét. Érdekes módon az esetek többségében (11/15) az ADA megjelenését az infliximab vagy adalimumab kezelést legfeljebb egy éve kapó betegeken észleltük ($p < 0,01$), annak ellenére, hogy a 12 hónapnál rövidebb vagy hosszabb ideje kezelésben részesülő betegek száma hasonló volt ($n=22$ és $n=33$). Infliximab és adalimumab esetén a gyógyszerek átlagos völgykoncentrációja az ADA-negatív betegekben szignifikánsan magasabb volt, mint az ADA-pozitív betegekben. A gyógyszer ellenes antitestek kialakulása tehát mind az infliximab mind az adalimumab esetén alacsonyabb TNF-gátló gyógyszer szinteket eredményezett a vérben a kezelési ciklusok végén. A plazmában mért TNF koncentráció ugyanakkor szignifikánsan alacsonyabb volt az ADA-negatív

betegekben mint az ADA-pozitívokban infliximab és adalimumab kezelés során. Bár az etanercept csoportban nem detektáltunk gyógyszer ellenes antitesteket, a betegek vérében mért átlagos TNF koncentráció szignifikánsan magasabb volt, mint az ADA-negatív infliximab és adalimumab kezelésben részesülő betegek esetén. Az ADA-negatív betegek kezelés alatti PASI értékei szignifikánsan alacsonyabbak voltak, mint az ADA-pozitív betegek esetén mind az infliximab mind az adalimumab csoportban.

4.11. A METHOTREXÁT KEZELÉS KLINIKAI GYAKORLATÁNAK FELMÉRÉSE PSORIASISBAN

Bár már több mint 50 éve alkalmazzák a pikkelysömör kezelésében, a metothrexát (MTX) használata nem egységes a klinikai gyakorlatban. Ezért érdemesnek tartottuk megvizsgálni azt, hogy a bőrgyógyászok milyen módon alkalmazzák a napi gyakorlatuk során a pikkelysömör kezelésében a methotrexátot. 2012 április 2-a és augusztus 7-e között 63 ország 481 bőrgyógyásza töltötte ki a kérdőívet, a legtöbben Európából és Dél-Amerikából. A férfi és női kitöltők száma gyakorlatilag megegyezett (240 és 241), a válaszadók többsége középkorú, tapasztalt bőrgyógyász volt. A felmérés legfontosabb eredményei az alábbiak voltak.

A leggyakoribb methotrexát kezdődózis hetente 7,5 mg volt. A bőrgyógyászok kétharmada heti 10 mg vagy annál kisebb dózist javasolt kezdő dózisként. A válaszadók több mint harmada a 4. héten csak 10 mg maximális dózist javasol. A leggyakoribb fenntartó MTX dózis gyakorlatilag megegyezett a negyedik heti dózissal, és a bőrgyógyászok jelentős része javasolt 10 mg-os vagy annál kisebb dózisokat fenntartó terápiaként. Az átlagos maximális heti dózis $22,1 \pm 5,3$ mg volt. A maximális kumulatív dózisok tekintetében fontos megjegyezni, hogy a válaszadó bőrgyógyászok jelentős része ($n=187$, 38.9%) nem tartja fontosnak a terápia folytatásának eldöntésekor a maximális kumulatív dózist. A kezdő MTX dózis szignifikánsan magasabb volt az afrikai országokban, mint más régiókban, és a 4. héten még mindig az afrikai bőrgyógyászok alkalmazzák a legmagasabb heti dózisokat, míg az ázsiai bőrgyógyászok a legalacsonyabbakat. A fenntartó időszak során viszont a legmagasabb fenntartó és maximális dózisokat az észak amerikai bőrgyógyászok alkalmazzák. Az átlagos fenntartó és maximális heti dózisok Ázsiában szignifikánsan alacsonyabbak, mint bármely másik régióban.

A válaszadó bőrgyógyászok többsége elsősorban orálisan alkalmazható methotrexátot javasol, az intramusculáris és subcutan alkalmazást csak néhány bőrgyógyász választja elsődleges beviteli módnak. Míg az alkalmazási mód nem függ a felíró bőrgyógyász nemétől, a földrajzi régió erősen meghatározó ebben a tekintetben. Az afrikai

bőrgyógyászok több mint egy harmada elsődlegesen intramuscularis methotrexátot alkalmaz, míg a subcutan formát kizárólag Európában használják. A válaszadó bőrgyógyászok többsége javasol folsav szupplementációt methotrexát kezelés során.

Teljes vérképet és májfunkciós vizsgálatokat csaknem valamennyi válaszadó javasol a methotrexát kezelés beállítása előtt, míg némileg kisebb számú, de jelentős része a bőrgyógyászoknak vesefunkciós vizsgálatokat is kér. Hepatitis B és C szerológiai vizsgálatot a válaszadók mintegy kétharmada végeztet. Tuberculosis szűrés céljából csaknem a bőrgyógyászok fele javasol mellkas röntgen vizsgálatot, Mantoux vizsgálatot és gamma interferon felszabaduláson alapuló teszteket azonban csak kevesen alkalmaznak. Májcirrhosis kimutatására ugyancsak nagyon kisszámú bőrgyógyász javasol prokollagén vizsgálatot vagy tranziens elasztográfiát a kezelést megelőzően. A kezelés alatt továbbra is sokan kérnek vérkép, májfunkciós és vesefunkciós vizsgálatokat, ugyanakkor csak kevesen hepatitis, HIV, mellkas röntgen, Mantoux, IGRA, vagy antinukleáris antitest teszteket. A májkárosodás hosszú távú ellenőrzésére a prokollagén és tranziens elasztográfia vizsgálatok az európai bőrgyógyászok körében voltak a legnépszerűbbek. Észak Amerikában és a Közel Keleten a bőrgyógyászok jelentős hányada javasol továbbra is májbiopsziát, míg Európában ez nem az általános gyakorlat.

5. MEGBESZÉLÉS

Genetikai vizsgálatok

Vizsgálatunk, a TNFSF15 genetikai variánsainak első magyarországi felmérése szerint a TNFSF15 gén rs6478109 SNP-je hozzájárul a psoriasisra való hajlamhoz, míg a gén C haplotípusának hordozása csökkentheti a pikkelysömör kialakulásának veszélyét. A TNFSF15 gén közös pont lehet az IBD és a pikkelysömör patogenezisében. A főként limfocitákból, monocitákból és dendritikus sejtekből származó TNFSF15 a DR3-mal (death domain receptor 3 – halál domén receptor 3) kapcsolódva komplexet képez. A TNFSF15/DR3 rendszer aktiválódása szerepet játszhat krónikus gyulladásos betegségek, pl. az IBD, RA vagy psoriasis patogenezisében.

Eredményeink megerősítették a pikkelysömör és a HLA-Cw6 illetve ERAP1 közötti genetikai asszociációt. Az HLA-Cw*0602 rs10484554 SNP-je nagyon erős hajlamosító tényezőnek bizonyult a psoriasis esetén, és az asszociáció erőteljesen szignifikáns volt mind a PsV mind a PsA tekintetében. Eredményeink szerint, korábbi vizsgálatokkal egyezően, csak a korai pikkelysömör asszociált HLA-C-vel. Az ERAP1 gén rs27525, rs17482078 és rs10050860 SNP-i esetén a ritka allélokot hordozó egyének a pikkelysömör kialakulásával szemben bizonyos mértékben védettek. Az ERAP1 és a HLA-C illetve a psoriasis közötti asszociáció nem csak a teljes psoriasisos populációban volt kimutatható, hanem a csak bőrtünetekkel és a csak ízületi tünetekkel rendelkező csoportokban is. A betegek korai és késői kezdetű csoportokba sorolása a pikkelysömör genetikai hátterének életkorral való összefüggését igazolta: ezek az SNP-k a korai kezdetű psoriasisal erőteljesebb asszociációt mutattak. Az általunk vizsgált psoriasisos populációban az ERAP1 B haplotípus (rs17482078/rs10050860/rs30187-CCT), az AS-hez hasonlóan,(56) a késői kezdetű psoriasisban és késői kezdetű arthritis psoriaticában hajlamosító tényezőnek bizonyult ($p=0,0409$ és $p=0,0413$).

Az ERAP1 és a HLA-C gének genetikai variációi tehát a psoriasis kialakulását fenotípusfüggő módon befolyásolják. Késői életkorban jelentkező pikkelysömör esetén a HLA-Cw*0602 asszociáció lényegesen gyengébb, azaz a psoriasist indokolt a tünetek 40 éves életkor alatti és feletti jelentkezése szerint csoportosítani, és ez a csoportosítás genetikai értelemben is megfelelő. Az eredményeink másrészt ráirányítják a figyelmet arra is, hogy mennyire fontos a betegek tünetek szerinti stratifikálása. A soktényezős betegségek pontos csoportosítása a tünetek és a megjelenési életkor alapján egyre inkább jelentőséggel bír nem csak kutatási okból, hanem a személyre szabott orvoslás szempontjából is.

A psoriasis immunpatogenezisére vonatkozó vizsgálatok

Vizsgálataink szerint a tünetmentes pikkelysömörös epidermisben a fehérje szerkezet eltér az egészséges bőrtől. Az, hogy ez a szerkezeti változás pontosan melyik fehérjéket érinti, illetve, hogy milyen funkcionális eltérésekkel jár, jelenleg nem ismert. Ugyanakkor több olyan epidermális struktúrfehérje (pl. LCE3B, LCE3C) is ismert, melyek fontos szerepet játszanak az epidermális barrier kialakításában, és genetikai eltéréseik psoriasisal asszociáltak. Ebből adódóan elképzelhető, hogy a vizsgálataink során észlelt fehérje szerkezeti eltérések akár az LCE fehérjék változásaiból is származhatnak, így funkcionális jelentőséggel bírhatnak. A hámréteg celluxszal történő eltávolítása az ATR-FTIR spektroszkópiával kombinálva egyszerű, gyors, nem invazív módszer a pikkelysömörös epidermis tanulmányozására, illetve esetlegesen az antipszoriátikus terápia hatékonyságának monitorizálására.

Vizsgálataink igazolták, hogy pikkelysömörben a regulátor T-sejtek nem megfelelő működése hozzájárulhat a betegség kialakulásához/fenntartásához. Eredményeink szerint a pikkelysömörös Treg sejtek funkcionálisan károsodottak, és nem képesek az effektor T-sejtek gátlására. Bár ez a funkciócsökkenés nem teljes mértékű, azonos gátló hatás eléréséhez a psoriasisos Treg sejtekből lényegesen többre van szükség, mint az egészséges Treg sejtekből. Sőt, a pikkelysömörös Treg sejtek még a legmagasabb alkalmazott koncentrációban sem képesek teljes mértékben gátolni az effektor sejtek proliferációját. A keresztezési kísérletek segítségével sikerült egyértelműen bizonyítanunk, hogy az észlelt háttérben valóban a Treg sejtek csökkent gátló hatása, és nem az effektor sejtek fokozott proliferációs készsége áll. Ezen eredményeinket később számos további vizsgálat is megerősítette, illetve igazolódott, hogy a csökkent gátlási funkció háttérben részben az IL-6, részben a Stat-3 jelátviteli útvonalak kóros működése áll. Mind a psoriasisos epidermisben mind a dermisben jelentős Treg populáció van jelen, amit a bőrben lévő CD4+CD69- T-sejt populáción belüli CD25+CTLA-4+ sejtek kimutatásával igazoltunk. Ezek a pikkelysömörös Treg sejtek azonban a keringő Treg sejtekhez hasonló mértékben funkcionálisan károsodottak. Bár a gátló hatás kiesése részlegesen kompenzálható magasabb Treg sejtszámok alkalmazásával, ezek az arányok nem valószínű, hogy in vivo, a pikkelysömörös bőrben megvalósulnának.

A pikkelysömör kezelésében alkalmazott terápiák némelyike (például kortikoszteroidok, ciklosporin A) esetén a kezelést követően gyors visszaeséssel kell számolni. Feltételezhető, hogy ezek a szerek mind az effektor mind a regulátor T-sejt populáció csökkenését eredményezik. Más terápiák (pl. fényterápia) általában hosszabb remissziót

eredményeznek, aminek a háttérében korábbi vizsgálatok alapján feltételeztük, hogy a patogén sejtek eliminálása mellett regulátor T-sejtek indukciója is állhat. Ezt a feltételezésünket később vizsgálatokkal is alátámasztották. A Treg sejtek azonosítása és izolálása azért is fontos, mert lehetőséget teremthet kóros T-sejt proliferációval járó betegségek kezelésére. Vizsgálataink egyértelműen igazolták, hogy a Treg sejteket emberben is izolálni lehet a perifériáról, és kísérletes bizonyítékot szolgáltatott arra, hogy a Treg sejtek megfelelő arány mellett a patogén sejtek aktivitását gátolni képesek. Azaz, a Treg populáció adoptív transzferrel történő visszaállítása pikkelysömörben meggátolhatja az effektor T-sejtek aktivációját és expanszióját, ezáltal tartós remissziót eredményezhet. A Treg adoptív transzfer terápia koncepció megvalósíthatóságát azóta számos további vizsgálat igazolta.

Elsőként sikerült azonosítanunk egy specifikus Treg markert (GARP), amely szelektíven jelent meg a CD4+CD25+ T-sejtekben, aktiváció hatására sem expresszálták a nem regulátor T-sejtek, és sejtfelszíni expressziója miatt alkalmas a sejtek szeparálására. A GARP szelektív expresszióját az aktivált Treg sejtekben később mások is megerősítették, és a GARP elleni monoklonális ellenanyagokon alapuló módszereket saját munkacsoportunk és mások is sikerrel alkalmazták T regulátor sejtek izolálására. Újabb vizsgálatok alapján úgy tűnik, hogy a GARP expresszió elengedhetetlen a Treg sejtek szuppresszív funkciójához, működését valószínűleg a TGF- β befolyásolásán keresztül fejti ki.

Vizsgálataink igazolták, hogy az IL-1R család tagjai eltérő módon fejeződnek ki a pikkelysömör és az egészséges T-sejteken. Bár a regulátor, memória, naív és naív regulátor T-sejt populációk aránya a teljes CD4+ T-sejt állományon belül nem különbözik a psoriasisos betegek és az egészségesek között, az IL-1 receptorok eltérő, különös tekintettel aktivációt követően markánsan különböző expressziója, hozzájárulhat a pikkelysömör patogeneziséhez. Az eredményeink további információt szolgáltatnak az effektor és regulátor sejtek tulajdonságairól, ugyanis a két sejtípus alapvetően eltérő módon expresszálta a jelátvitelt biztosító és a nem jelátvivő IL-1 receptorokat.

Igazoltuk, hogy az IL-1R1 konstitutív módon expresszálódik a nyugvó Treg sejteken. Aktiváció határása a receptor megjelenik más T-sejt populációkon is, de Treg sejteken továbbra is lényegesen magasabb szinten expresszálódik. Az IL-1R1-t expresszáló Treg sejtek gátló képessége ugyanakkor nem különbözött az IL-1R1- sejtétől. A nem jelátvivő IL-1R2 nem volt detektálható a nyugvó Treg sejteken, viszont TCR stimulációt követően röviddel megjelent, de csak a Treg sejteken volt megfigyelhető. Az aktivált Treg sejtek

képesek voltak az IL-1 β neutralizálására, ami a nem jelátvivő IL-1R2 receptorok funkcionális szerepére utal. Eredményeink felvetik, hogy az IL-1 receptorok eltérő expressziója pikkelysömörben funkcionális következményekkel járhat. Érdekes módon, míg a nyugvó Treg sejtek IL-1R1 expressziójában nincs jelentős különbség a pikkelysömörös és az egészséges minták között, aktiváció hatására az IL-1R1 expresszió lényegesen nagyobb mértékben emelkedik a pikkelysömörös Treg sejteken.

A TRPA1 KO egereken végzett vizsgálataink eredménye szerint a TRPA1+ neuronok a TRPV1+ nociceptorokkal éppen ellentétes funkciókért felelősek. Vizsgálataink során a TRPA1 KO állatokban az imiquimod hatására kifejezettebb szöveti vérátáramlás növekedést és duzzanatot, szöveti infiltrációt észleltünk, mint a vad típusú egerekben. Az IL-1 β , a TNF α és az IL-22 esetén is lényegesen magasabb mRNS értékeket mértünk a TRPA1 KO egerekben, mint a TRPA1 vad genotípusú állatokban. Ugyanakkor sem az IL-23 sem az IL-17 gén mRNS expressziójában nem volt különbség a két törzs között. Meglepő módon a szöveti citokin fehérje koncentrációk csak részben korreláltak a citokin mRNS expressziós értékekkel, és egyértelmű különbség nem volt igazolható a WT és a KO egerek között. Érdekes módon az IL-1 β , a TNF α és az IL-17 esetén is a szöveti citokin koncentráció már igen korán, 6 órával az imiquimod kezelést követően jelentősen megemelkedett (mind a WT mind a KO állatokban), annak ellenére, hogy például az IL-17 esetén ebben az időpontban még csak minimális citokin mRNS expressziót észleltünk. Feltehető, hogy a szöveti citokin tartalom legalább két részből tevődik össze: részben a helyben, de novo szintetizált fehérjékből, részben a beáramló sejtekből felszabaduló preformált citokinekből. Egy közelmúltban megjelent vizsgálat szerint a pikkelysömörös bőrben a neutrofilek alkotják a legnagyobb IL-17 tartalmú sejtcsoportot. Ugyanakkor a plakkokból izolált neutrofilokban az IL-17 mRNS-t nem lehetett kimutatni, azaz ezek a sejtek a bőrbe vándorolva előre elkészített IL-17-t juttathatnak a környezetükbe. Feltehető, hogy az IL-17 gátló gyógyszerek igen gyors hatása is a nagy mennyiségű, neutrofil eredetű IL-17 neutralizálásában rejlik. Arra, hogy a TRPA1 KO egerekben észlelt fokozott psoriasisform gyulladás hátterében a neutrofilek fokozott beáramlása állna, egyelőre nincs bizonyítékunk. A kísérleteinkben a TRPA1 KO egerekben észlelt fokozottabb gyulladás magyarázatául szolgálhat, hogy a TRPA1+ aktiválása a nociceptív neuronokból antiinflammatorikus hatású neuropeptidek (CGRP és somatostatin) felszabadulását eredményezi. Ismert, hogy a CGRP a bőrben erőteljes gyulladáscsökkentő hatással bír, így TRPA1 KO egerekben a kisebb mennyiségben felszabaduló CGRP végső soron fokozottabb gyulladást tehet lehetővé. Előzetes eredményeink szerint az imiquimod képes

aktiválni a TRPA1 csatornákat, így közvetlenül is kiválthatja az antiinflammatorikus neuropeptidek felszabadulását a kezelt bőrben.

Vizsgálataink során a psoriasiform egérmódellet is módosítottuk. A jelenleg elterjedt alkalmazott modellben az imiquimod kezelés igen jelentős szisztémás hatást vált ki, ami szignifikáns módon befolyásolhatja a bőrben észlelt változásokat. Az általunk kidolgozott új kísérleti elrendezésben, melyben a psoriasiform bőrgyulladást kisebb mennyiségű hatóanyaggal, valamint az imiquimod és a kontroll krémek egy állaton történő alkalmazásával váltjuk ki, a szisztémás mellékhatások ugyan észlelhetők, de csaknem elhanyagolhatóan alacsony mértékben jelentkeznek. Összefoglalva, eredményeink a neuroimmun szabályozás újabb aspektusára világítanak rá. Feltehető, hogy a különböző TRP csatornák aktiválása eltérő módon befolyásolja a kialakuló immun reakciókat az adott szövetben, így a TRP csatornák fontos szerepet játszanak a szövetspecifikus immunreakciók finomhangolásában. A TRP csatornák specifikus aktiválására vagy gátlására új célpont lehet a bőr immunmediált betegségeinek kezelésében.

A pikkelysömör klinikai jellemzőinek vizsgálata

Elsőként végeztünk a pikkelysömörre vonatkozó átfogó epidemiológiai vizsgálatot Közép-Kelet Európában. A vizsgálatba 9 országból csaknem 1000 beteg került bevonásra, közülük 123 magyar volt. A betegek mintegy egyharmadának súlyos tünetei voltak, és 15%-nak volt ízületi érintettsége. A vizsgált populációban magas vérnyomás betegség, elhízás, érelmeszesedés, cukorbetegség és szívelégtelenség fordult elő társuló betegségként. A betegek több mint felének ($n=539$, 59%) a PASI értéke magasabb volt, mint 10, és hasonló arányú ($n=467$, 51%) volt a 10-nél magasabb DLQI-val rendelkező betegek csoportja. A leggyakoribb kezelési módot az általunk vizsgált populációban is a lokális terápiák képezték, ezen belül is a kortikoszteroid externák. A szisztémás szerek közül a methotrexátot a betegek 21%-a részére javasolta a bőrgyógyásza, ami csaknem kétszerese egy nem sokkal korábban publikált németországi adatnak (10,1%). A vizsgálat eredményei általában összevethetőek voltak a korábban végzett hasonló felmérések eredményeivel. Ugyanakkor egyes esetekben a vizsgált országok között jelentős különbségeket is észleltünk.

Vizsgálataink szerint a pikkelysömör a súlyos periodontális betegség kialakulásának valószínűségét több mint négyszeresére növeli (a nemdohányzó kontrollokhoz képest), míg a dohányzás ezt tovább fokozza, több mint 24-szeresre növeli. Azaz, azokban a pikkelysömörös betegekben, akik dohányoznak is, mintegy hatszor nagyobb valószínűséggel alakul ki súlyos periodontális betegség, mint azokban a betegekben, akik

nem dohányoznak. A dohányos pikkelysömörös betegek esetén észlelt érték nem egyszerűen a psoriasis és dohányzás okozta hatások összegződéséből hanem a két tényező (psoriasis és dohányzás) közötti szinergisztikus hatásból ered. Azt, hogy a dohányzás és a psoriasis hogyan fejt ki szinergisztikus hatást a periodontális betegség kialakulása szempontjából, csak részlegesen tudjuk megmagyarázni. Ismert, hogy az enyhe és súlyos periodontális betegség között az egyik legkifejezettebb különbség, hogy a késői stádiumokban a gyulladásos reakcióban a T-sejtek helyett a B-sejtek dominálnak. Feltételezhető, hogy a B-sejtek aktiválására is képes psoriasis-citokinek, pl. IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, TNF α és INF γ végső soron B-sejtes immunválasz felé tolják el a gyulladásos reakciót. A cigaretta füst továbbá a TLR4 expressziójának fokozásán keresztül a T-sejtek INF γ termelését aktiválhatja, ami ugyancsak a B-sejt irányú polarizáció irányába hathat. Eredményeink, amellett, hogy alátámasztják a pikkelysömör és a periodontális betegség kapcsolatáról szóló korábbi megfigyeléseket, új adatokat is szolgáltatnak a dohányzás és a psoriasis szinergisztikus hatásáról a periodontális betegség előidézésében.

Eredményeink szerint az anti-MCV antitestek a pikkelysömörös betegek egyes alcsoportjainak elkülönítésére is alkalmazhatók. Bár az átlagos antitest szint a PsA csoportban egyértelműen emelkedett volt, hozzávetőleg egy nagyságrenddel elmaradt az RA-s betegek esetén korábban publikált több száz U/ml szinttől. A PsA korai, enyhe formáinak diagnosztizálása jelentős kihívás elé állíthatja a klinikust, így ezekben az esetekben az anti-MCV pozitivitás megerősítheti a PsA klinikai diagnózist. Továbbá klinikailag manifest arthritises tünetek hiányában a magasabb anti-MCV titer psoriasisban súlyosabb betegség lefolyást jelezhet előre. Az általunk vizsgált populációban a köröm tünetek szignifikánsan gyakrabban fordultak elő az anti-MCV pozitív PsA betegek között, mint az anti-MCV szeronegatív betegekben (64% vs. 17%). A körömlemez termelését végző köröm mátrix és a DIP ízület extensor inainak szoros mikroanatómiai viszonya miatt kézenfekvőnek tűnik azt feltételezni, hogy az anti-MCV szintek körömtünetekkel való asszociációja végső soron az enteritis és az anti-MCV szintek összefüggéséből ered. Így, az anti-MCV szint emelkedése a szisztémás enteritis markere lehet PsA-ban.

A biológiai terápiák elleni antitestek általunk detektált gyakorisága megfelelt a korábban közölt eredményeknek. Vizsgálataink szerint psoriasisban infliximab és adalimumab kezelés során a gyógyszer ellenes antitestek kialakulása közvetlenül összefügg a csökkent plazma TNF-inhibitor koncentrációval és a fokozott plazma TNF szinttel. Az ADA-pozitív betegek esetén észlelt klinikai javulás szignifikánsan kisebb volt, mint az ADA-negatív csoportban. Az átlagos plazma TNF koncentráció szignifikánsan magasabb volt az ADA

pozitív infliximabbal és adalimumabbal kezelt betegekben, mint az ADA-negatívokban. A vizsgálat ugyanakkor nem igazolt egyértelmű statisztikai összefüggést a plazma TNF szint és a pikkelysömör TNF-inhibitor kezelés alatti klinikai aktivitása között. Ezt részben a betegcsoportok viszonylag kis létszáma is okozhatta, hiszen a jól reagáló betegeknel általában alacsonyabb TNF szinteket detektáltunk. Az is feltételezhető ugyanakkor, hogy a plazma TNF koncentráció nem áll szükségszerűen közvetlen kapcsolatban a TNF-gátló terápia hatékonyságával. Más tényezők, mint például a léziós bőr TNF koncentrációja, szorosabban korrelálhatnak a klinikai tünetek aktivitásával. Bár jelenleg nem egyértelmű, hogy a TNFi kezelés alatt a vérben mért TNF koncentráció a betegség klinikai aktivitásának indikátora lehet-e, egyre több adat igazolja, hogy a plazma TNFi és ADA koncentráció mérése a klinikai gyakorlatban is segítheti a terápiás döntéseket TNF-gátló kezelés során.

A methotrexát klinikai alkalmazásának felmérése számos új, részben meglepő eredménnyel szolgált. Az MTX dózisok általában alacsonyabban voltak, mint amit az irányelvek ajánlanak. A bőrgyógyászok két harmada 10 mg-mal vagy annál alacsonyabb dózissal kezdi a kezelést, és több mint 40% 10 mg-ot vagy alacsonyabb dózist alkalmaz fenntartó kezelésként. A bőrgyógyászok jelentős része a kumulatív dózist nem tartja fontosnak a kezelés folytatásának eldöntésekor. Ez arra utalhat, hogy a hepatotoxicitás monitorizálására alkalmas új eljárások megváltoztathatják az MTX kezeléssel kapcsolatos elképzeléseket. Talán a legérdekesebb eredmények a földrajzi különbségekből adódnak. Afrikában a bőrgyógyászok magas dózissal kezdenek, azonban a fenntartó adagok már alacsonyabbak, mint sok más régióban, és a kezelés időtartama is rövidebb. Észak Amerikában alkalmazzák a legmagasabb fenntartó és maximális heti dózisokat, illetve maximális kumulatív dózisokat. Ázsiában éppen ennek ellentettje látható, itt az értékek legalább 25%-kal alacsonyabbak minden kategóriában. Ez Ázsiában talán az MTX okozta mellékhatások magasabb számának is tulajdonítható, így érthető, ha az ázsiai bőrgyógyászok óvatosabbak a methotrexát felírásakor. Bár a kezelést megelőző és a kezelés alatt végzett vizsgálatok terén vannak hasonlóságok, mint például a máj- és vesefunkciós tesztek és a vércép vizsgálat, jelentős különbséges is észlelhetők. A HIV, mellkas röntgen és Mantoux tesztek viszonylag magas száma Afrikában feltehetően a HIV és a tuberkulózis magas gyakoriságával magyarázható. Ugyanakkor az IGRa, prokollagén és tranziens elasztográfiás vizsgálatok elterjedését jelentősen behatárolja azok magas költsége. Úgy tűnik, hogy a hosszú távú hepatotoxicitás monitorizálására a prokollagén és tranziens elasztográfiás vizsgálatok Európában helyettesítik a májbiopsziát. Érdekes módon Észak Amerikában még mindig viszonylag gyakran javasolnak májbiopsziát.

Eredményeink szerint az MTX dozírozása a klinikai praxisban jelentősen eltér az irányelvekben ajánlottaktól. Figyelembe kell vennünk ugyanakkor, hogy randomizált klinikai vizsálatokból csak korlátozott mértékben áll rendelkezésre bizonyíték a methotrexát pikkelysömörben alkalmazott dózisával kapcsolatban, és a meglévő adatok csaknem kizárólag európai vagy észak amerikai klinikai vizsgálatokból származnak. Mivel a jelenlegi irányelvek ezen evidenciákon alapulnak, nem meglepő, hogy az európai és észak amerikai válaszadók szorosabban követik az irányelveket, mint más régió bőrgyógyászai. Amint azt korábban is említettük, ezek az eltérések szabályozási különbségekből, a populációk fiziológiai különbségeiből, illetve gyógyszer felírási tradíciókból egyaránt adódhatnak. Mindazonáltal ezek az eredmények egyértelműen jelzik, hogy egy adott földrajzi régióban elvégzett klinikai vizsgálat adatainak extrapolálása egy másik területre kockázatos lehet.

6. ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK

1. Elsőként vizsgáltuk meg magyarországi psoriasisos és arthritis psoriaticás populációban a TNF szupercsaládba tartozó TNFSF15 gén variánsait. Igazoltuk, hogy a gén egyik polimorfizmusa (rs6478109) genetikai rizikó faktorként, C haplotípusa ugyanakkor protektív tényezőként szerepelhet a psoriasis vulgaris kialakulása szempontjából.
2. Kimutattuk, hogy az ERAP1 gén rs27524 és rs30187 SNP-i, illetve a HLA-C gén rs10484554 SNP-je hozzájárulnak a pikkelysömörös hajlam kialakulásához. Az ERAP1 gén rs27525, rs17482078 és rs10050860 SNP-i esetén a ritka allélokot hordozó egyének a pikkelysömör kialakulásával szemben bizonyos mértékben védettek. Igazoltuk, hogy az ERAP1 két kódoló (rs17482078 rs10050860) illetve egy nem kódoló (rs30187) SNP-je között kapcsoltsági egyensúlyhiány áll fenn psoriasisban, és a három SNP által alkotott haplotípusok közül a B (rs17482078/rs10050860/rs30187-CCT) a késői kezdetű psoriasisban és a késői kezdetű arthritis psoriaticában hajlamosító tényezőként szerepel. Elsőként igazoltuk továbbá, hogy HLA-C pozitív egyénekben az rs27524 ERAP1 SNP jelenléte növeli a psoriasis és a PsA kialakulásának esélyét.
3. Kimutattuk, hogy a pikkelysömörös nem tünetes bőr fehérje szerkezete az all amide-I sáv komponenseiben (1660 cm^{-1} -nél) és a β -lap szerkezet esetén (1630 cm^{-1} -nél) jelentős eltérést mutat a normál bőrhöz viszonyítva. Igazoltuk, hogy az ATR-FTIR gyors és egyszerű nem invazív módszert jelenthet a pikkelysömör diagnosztizálásához, a kezelés eredményességének követéséhez.
4. Elsőként igazoltuk, hogy pikkelysömörben a CD4+CD25+ regulátor T-sejtek funkcionálisan károsodottak, nem képesek az effektor T-sejtek megfelelő gátlására. A regulátor T-sejtek funkcionális károsodása az egyik fontos oka lehet annak, hogy pikkelysömörös betegekben a bőr gyulladásos folyamatai nem tudnak megfelelően lecsengeni, ezáltal a bőrt ért gyulladásokeltő hatások esetén psoriasisos bőrtünetek alakulnak ki. Igazoltuk továbbá, hogy a pikkelysömörös betegek vérében a CD4+CD25-effektor T-sejtek között egy magas proliferációs kapacitással bíró populáció is jelen van, mely az egészségesek vérében nem mutatható ki.
5. Kimutattuk, hogy az LRRC csoportba tartozó GARP fehérje specifikus markere a regulátor T-sejteknek. Eredményeink alapján kifejlesztettünk egy módszert, melynek segítségével a regulátor T-sejtek izolálhatók a többi T-sejt közül a sejtfelszíni GARP expresszió alapján.
6. Igazoltuk, hogy az IL-1 szignál transzdukcióját végző IL-1R1 magasabb mértékben fejeződik ki psoriasisos effektor és regulátor T-sejteken, mint egészséges kontroll

sejmények T-sejtjein, illetve aktiváció hatására az IL-1R1 fehérje expressziója is magasabb a pikkelysömörös T-sejteken. Aktiváció hatására a psoriasisos T-sejtek magasabb szinten fejezik ki a szignál transzdukcióra nem képes (decoy) IL-1R2 sejtfelszíni és szolubilis (sIL-1R2) formájának mRNS-ét, illetve több sIL-1R2 fehérjét termelnek, mint az egészséges T-sejtek, ami szerepet játszhat a psoriasis patogenezisében.

7. Elsőként írtuk le a TRPA1 szerepét a bőr gyulladásos folyamatainak csillapításában. Új módszert dolgoztunk ki az imiquimod által kiváltott psoriasiform bőrgyulladáshoz, mely kevesebb szisztémás hatással jár, és egyazon állaton lehetséges mind az aktív mind a kontroll hatás vizsgálata.

8. Átfogó felmérést készítettünk a közép-kelet európai pikkelysömörös betegek klinikai állapotáról. Megállapítottuk, hogy a betegek több mint egy harmada súlyos betegségben szenved, a betegek több mint fele a kezelő orvosa szerint nem megfelelő kezelésben részesül, illetve a betegek több mint egy harmada esetén az orvosok biológiai terápia beállítását tervezik (2009-2010-es adatok).

9. Igazoltuk, hogy a dohányzás és a psoriasis független rizikótényezők a periodontitis kialakulása szempontjából. A súlyos periodontális betegség kialakulásának valószínűsége psoriasisos betegekben dohányzás esetén hatszor nagyobb, mint a nem dohányzó betegek esetén.

10. Kimutattuk, hogy az szérum anti-MCV szint arthritis psoriaticában szenvedő betegekben magasabb, mint a csak bőrtünetekkel rendelkező psoriasisos betegekben. Az emelkedett anti-MCV szint a PsA betegekben körömpsoriasis fennállásával állt összefüggésben. A csak bőrtünetekkel rendelkező pikkelysömörös betegekben az anti-MCV emelkedés súlyosabb betegség lefolyással és a bőrtünetek korai megjelenésével állhat összefüggésben.

11. Igazoltuk, hogy a pikkelysömörös betegek anti-TNF biológiai terápiája során a gyógyszer ellenes antitestek megjelenése fordított összefüggésben áll a szérumban mérhető gyógyszerszinttel, illetve magasabb TNF szinthez vezet, ami a hatékonyság csökkenését eredményezheti infliximab és adalimumab kezelés esetén.

12. Internetes kérdőív segítségével 63 ország 481 bőrgyógyászának véleménye alapján felmértük a metothrexát psoriasisban történő alkalmazásának gyakorlatát. Eredményeink alapján a kezelési szokásokban (pl. az alkalmazott dózisokban, az alkalmazás módjában, az ellenőrző vizsgálatok típusában) jelentős eltérések tapasztalhatók. A különbségek szempontjából leginkább meghatározó paraméterek: az ország, ahol a bőrgyógyász praktizál, a bőrgyógyász neme és szakmai tapasztalata.

7. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

1. Kui R, Gál B, Gaál M, Kiss M, Kemény L, Gyulai R: Presence of antidrug antibodies correlates inversely with the plasma tumor necrosis factor (TNF)-alpha level and the efficacy of TNF-inhibitor therapy in psoriasis. JOURNAL OF DERMATOLOGY DOI: 10.1111/1346-8138.13301 (2016); IF: 1,577; Idézők száma: 0
2. Gyulai R, Bagot M, Griffiths CE, Luger T, Naldi L, Paul C, Puig L, Kemény L: Current practice of methotrexate use for psoriasis: results of a worldwide survey among dermatologists. JOURNAL OF THE EUROPEAN ACADEMY OF DERMATOLOGY AND VENEREOLOGY 29:(2) pp. 224-231. (2015); IF: 3,029; Idézők száma: 6
3. Antal M, Braunitzer G, Mattheos N, Gyulai R, Nagy K: Smoking as a permissive factor of periodontal disease in psoriasis. PLOS ONE 9:(3) Paper Ne 92333. 7 p. (2014); IF: 3,234; Idézők száma: 3
4. Bebes A, Kovács-Sólyom F, Prihoda J, Kui R, Kemény L, Gyulai R: Interleukin-1 receptors are differentially expressed in normal and psoriatic T cells. MEDIATORS OF INFLAMMATION 2014: Paper 472625. 9 p. (2014); IF: 3,236; Idézők száma: 6
5. Balázs B, Farkas G, Berkesi O, Gyulai R, Berkó S, Budai-Szűcs M, Szabó-Révész P, Kemény L, Csányi E: Protein structure is changed in psoriatic skin on the unaffected region – imaging possibility with ATR-FTIR spectroscopy. MICROCHEMICAL JOURNAL 117: pp. 183-186. (2014); IF: 2,746; Idézők száma: 3
6. Képiró L, Széll M, Kovács L, Keszthelyi P, Kemény L, Gyulai R: Genetic risk and protective factors of TNFSF15 gene variants detected using single nucleotide polymorphisms in Hungarians with psoriasis and psoriatic arthritis. HUMAN IMMUNOLOGY 75:(2) pp. 159-162. (2014); IF: 2,138; Idézők száma: 7
7. Dalmády S, Kiss M, Képiró L, Kovács L, Sonkodi G, Kemény L, Gyulai R: Higher levels of autoantibodies targeting mutated citrullinated vimentin in patients with psoriatic arthritis than in patients with psoriasis vulgaris. CLINICAL AND DEVELOPMENTAL IMMUNOLOGY 2013: Paper 474028. 9 p. (2013); IF: 2,934; Idézők száma: 9
8. Palota T, Szepietowski JC, Pec J, Arenberger P, Giurcaneanu C, Gyulai R, Miljkovic J, Parna E, Mikazans I, Grusauskas N, Hodik M: A survey of disease severity, quality of life, and treatment patterns of biologically naive patients with psoriasis in central and eastern Europe. ACTA DERMATOVENEROLOGICA CROATICA 18:(3) pp. 151-161. (2010); IF: 0,272; Idézők száma: 9
9. Gyulai R, Kui R, Bali G, Tabák R, Kemény L: Pikkelysömörhöz társuló súlyos körömtünetek jelentős javulása infliximab kezelés során. BŐRGYÓGYÁSZATI ÉS VENEROLÓGIAI SZEMLE 85:(6) pp. 279-282. (2009); IF: 0; Idézők száma: 0
10. Gyulai R, Gaál M, Tabák R, Bali G, Kui R, Bata-Csörgő Zs, Kemény L: Citokinek, kemokinek és terápiás befolyásolásuk lehetőségei psoriasisban. BŐRGYÓGYÁSZATI ÉS VENEROLÓGIAI SZEMLE 85:(2) pp. 37-41. (2009); IF: 0; Idézők száma: 0
11. Kui R, Bali G, Tabák R, Gyulai R, Kemény L: Tapasztalataink súlyos pikkelysömör adalimumab kezelésével. BŐRGYÓGYÁSZATI ÉS VENEROLÓGIAI SZEMLE 85:(6) pp. 283-289. (2009); IF: 0; Idézők száma: 0
12. Gyulai R, Kemény L: A pikkelysömör immunológiája: Az alaputatástól a betegágyig [The immunology of psoriasis: From the basic research to the bedside]. ORVOSI HETILAP 147:(46) pp. 2213-2220. (2006); IF: 0; Idézők száma: 8

13. Kemény L, Kinyó Á, Baltás E, Csoma Zs, Dósa P, Gyulai R, Bata Zs, Dobozy A: A 308 nm-es excimer lézer a psoriasis kezelésében. BÖRGYÓGYÁSZATI ÉS VENEROLÓGIAI SZEMLE 82:(2) pp. 67-71. (2006); IF: 0; Idézők száma: 0
14. Sugiyama H, Gyulai R, Toichi E, Garaczi E, Shimada S, Stevens SR, McCormick TS, Cooper KD: Dysfunctional blood and target tissue CD4(+)CD25(high) regulatory T cells in psoriasis: Mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. JOURNAL OF IMMUNOLOGY 174:(1) pp. 164-173. (2005); IF: 6,387; Idézők száma: 331
15. Bata-Csörgő Z, Farkas Á, Garaczi E, Gyulai R, Kemény L, Kenderessy-Szabó A, Koreck AI, Széll M: A pikkelysömör betegség: gyógyítás és kutatómunka a Szegedi Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinikán Dobozy Attila Professzor úr tanszékvezetése alatt. BÖRGYÓGYÁSZATI ÉS VENEROLÓGIAI SZEMLE 80:(5) pp. 251-254. (2004); IF: 0; Idézők száma: 0

Könyvfejezetek

1. Gyulai R: Papulosus és papulosquamosus bőrbetegségek. In: Kárpáti S, Kemény L, Remenyik É (szerk.) Bőrgyógyászat és venerológia. 1135 p. Budapest: Medicina Könyvkiadó, 2013. pp. 381-404. (ISBN:978-963-226-393-2)
2. Holló P, Gyulai R: Szakmai irányelv a psoriasis biológiai terápiájáról. In: Kárpáti Sarolta (szerk.) Bőrgyógyászati útmutató, 2008: Szakmai irányelvek a bőrgyógyászati megbetegedések kórismézéséhez, kezeléséhez és gondozásához. 152p. Budapest: Meditio Kiadó, 2008. pp. 45-65. (Klinikai Irányelvek Kézikönyve)
3. Gyulai R, Kiss CG: Psoriasis - arthritis psoriatica. In: Cziráj L (szerk.) Klinikai immunológia 941 p. Budapest: Medicina Könyvkiadó, 2006. pp. 350-363. (ISBN:963-226-057-0)

Olalmi formák

1. Cooper K, Garaczi E, Gyulai R, McCormick T, Sugiyama H: Methods and reagents for identifying/isolating t regulatory (treg) cells and for treating individuals. Lajstromszám: WO 2006103639 A3. Közzététel éve: 2009
2. Garaczi E, Sugiyama H, Gyulai R, Cooper KD, McCormick TS: Methods and reagents for identifying/isolating T regulatory (Treg) cells and for treating individuals. Lajstromszám: US 8815526 B2. Közzététel éve: 2014

A disszertáció alapjául szolgáló közlemények: összesített impakt faktora: 25,553
 független idéző: 362
 függő idéző: 20
 összes idéző: 382

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálás köszönettel tartozom **Dobozy Attila** akadémikus úrnak és **Hunyadi János** professzor úrnak azért, hogy orvostanhallgatóként a bőrgyógyászat és azon belül a kutató bőrgyógyászat, dermatimmunológia területére irányítottak. Korábbi munkahelyi vezetőmnek, **Kemény Lajos** professzor úrnak köszönöm szakmai tanácsait és az egész pályámmal kapcsolatos útmutatását, támogatását.

Korom Irma főorvosnőnek, **Husz Sándor** professzor úrnak, **Bata Zsuzsanna** és **Oláh Judit** professzornőknek köszönöm, hogy megmutatták és megtanították a bőrgyógyászat és az orvoslás szépségeit. **Kiss Máriának**, **Kenderessy Szabó Annának**, **Széli Mártának**, **Nagy Ferencnek** és **Ádám Évának** hálás vagyok, hogy bevezettek a kutató labormunka rejtelmeibe.

Bebes Attila, **Gaál Magdolna**, **Garaczi Edina** és **Nagy Szilvia** kollégáim munkája nélkülözhetetlen volt a disszertáció alapját képező közlemények elkészítéséhez. Korábbi és jelenlegi PhD hallgatóim, **Dalmády Szandra**, **Horváth Szabina**, **Képiró László**, **Kovács-Sólyom Ferenc**, **Kui Róbert**, **Prihoda Judit** szorgalmas munkájáért hálás vagyok.

Az Egyesült Államokban és Németországban eltöltött évek alatt kapott önzetlen segítséget köszönöm **Szabó Saroltának**, **Hideaki Sugiyama**-nak, **Kevin D Cooper** professzornak, **Thomas McCormick**-nak és **Thomas Ruzicka** professzornak.

Köszönettel tartozom a **Szegedi Tudományegyetem Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika** és a **Pécsi Tudományegyetem Bőr-, Nemikórtani és Onkodermatológiai Klinika** valamennyi munkatársának, kollégáimnak és barátaimnak.

A kollaborációban végzett kutatásokért, ötletekért hálás vagyok az SZTE és a PTE társintézeteiben dolgozó kollégáimnak és barátaimnak, **Antal Márknak**, **Berki Tímea** professzornőnek, **Csányi Erzsébetnek**, **Kemény Ágnesnek**, **Keszthelyi Péternek**, **Kovács Lászlónak**, **Molnár Tamás** professzornak, **Nagy Katalin** professzornőnek, **Pintér Erika** professzornőnek, **Sonkody Gábornak**.

Hálás vagyok, hogy **Szüleim**, **Családom** és **Barátaim** szeretetére és támogatására nem csak ennek a dolgozatnak az elkészítése során, hanem egész életemben számíthattam. **Feleségemnek**, **Évának** és **gyermekeimnek**, **Barnabásnak** és **Dorkának** pedig külön köszönöm a sok-sok türelmet és jó szót, illetve megértést és biztatást, amit a dolgozat elkészítése és a munkám során kaptam.