

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

SZISZTÉMÁS AUTOIMMUN BETEGSÉGEK IMMUNPATHOLÓGIÁJÁNAK ÉS KLINIKUMÁNAK EGYES KÉRDÉSEI

Dr. Kovács László



Szegedi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ

Reumatológiai és Immunológiai Klinika

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	3
1. Bevezetés.....	6
2. Célkitűzések.....	18
3. Módszerek.....	19
4. Eredmények.....	37
5. Megbeszélés.....	84
6. Új tudományos eredmények összefoglalása.....	94
7. Köszönetnyilvánítás.....	95
8. Irodalomjegyzék.....	97
9. Tudományos közlemények listája.....	118
10. Szcientometriai adatok.....	128

Rövidítések jegyzéke

ACPA	Anti-citrullinált peptid antitest
ANOVA	Variancia-analízis (analysis of variance)
anti- β 2GPI	anti- β 2-glycoprotein-I antitest
anti-CL	Anti-cardiolipin antitest
anti-dsDNS	Kettősszálú (double stranded) DNS elleni antitest
ANA	Antinuclearis antitest
AP	Arthritis psoriatica
APA	Antiphospholipid antitest
APS	Antiphospholipid szindróma
AS	Spondylitis ankylopoetica (ankylosing spondylitis)
BASDAI	Bath Spondylitisi Ankylopoetica Betegség-aktivitási Index (Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index)
bDMARD	biológiai betegség-módosító antirheumatikus gyógyszer (disease modifying antirheumatic drug)
BILAG	British Isles Lupus Activity Group
BSA	Bovin szérum albumin
cDMARD	konvencionális betegség-módosító antirheumatikus gyógyszer (disease modifying antirheumatic drug)
cDNS	complementer DNS
Ct	Threshold ciklus
DAB	Diamino-benzidin
DAS28	28 ízületet vizsgáló betegség-aktivitási pontszám (Disease activity score 28)
DMARD	Betegséglefolyás-módosító reumaellenes gyógyszer (Disease-modifying antirheumatic drug)
DTT	Dithiol-treitol

EULAR	Európai Reumaellenes Liga (European League Against Rheumatism)
FACIT	Krónikus Betegség-terápia funkcionális felmérése (Functional Assessment of Chronic Illness Therapy)
FACS	Áramlási citofluorimetria (Flow-assisted cell sorting)
FCS	Foetalis borjúsérum (Foetal calf serum)
FITC	Fluoreszcein-izotiocianát
Gal-1	Galektin-1
GlcNAC	N-acetyl-glükózamin
GST	Glutathion-S-transzferáz
HRPO	Tormagyökér (horseradish) peroxidáz
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IRF	Interferon regulatory factor
KO	génkiütött (knock-out)
LA	Lupus anticoaguláns
LAcNAc	N-acetyl-laktózamin
m3AChR	muscainszerű acetylcholin receptor 3. altípusa
MAVS	Mitochondrial antiviral signaling protein
MHC	Major Histocompatibilitási Complex
MSC	Mesenchymalis őssejt (mesenchymal stem cell)
OD	Optikai denzitás
OPD	Ortofenilén-diamin (Ortophenilene diamine)
PHA	Phytohaemagglutinin
PBMC	Perifériás vér mononuclearis sejt (Peripheral blood mononuclear cell)
PBS	Foszfát-pufferolt sóoldat (Phosphate-buffered saline)
pSS	Primer Sjögren szindróma
RA	Rheumatoid arthritis

RAR	Relatív apoptózis-arány (Relative apoptosis ratio)
RF	Rheumatoid faktor
RT-qPCR	Kvantitatív valós idejű reverz-transzkriptáz polimeráz láncreakció (Real time reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction)
SD	Standard deviáció
SDS-PAGE	Nátrium-dodecil szulfát (Sodium dodecyle sulphate) poliakrilamid gél elektroforézis
SEM	Az átlag standard hibája (Standard error of mean)
SF-36	36 kérdéses egészségi kérdőív rövid változat (36-item short form health survey)
SLE	Szisztémás lupus erythematosus
SLEDAI-2K	SLE Disease Activity Index-2000
SS	Sjögren szindróma
sSS	Szekunder Sjögren szindróma
STING	Stimulator of interferon genes
TBST	Tris-pufferolt sóoldat (Tris-buffered saline)
Th	T-helper sejt
TLR	Toll-like receptor
TMEM203	Transmembrane protein-203
TNF	Tumor necrosis factor
tsDMARD	célzott (targeted) szintetikus betegség-módosító antirheumatikus gyógyszer (disease modifying antirheumatic drug)
VIP	Vasoactive intestinal peptide

Az ismertetett lektinek és glikozilációs enzimek rövidítéseit a 3. *Táblázatban* mutatom be

1. Bevezetés

1.1. Áttekintés

A PhD dolgozatom óta eltelt másfél évtizedben kutatási tevékenységem három fő témakör köré csoportosítható. Először a Sjögren szindrómában (SS) kimutatott autonóm idegrendszeri működészavarok további vizsgálata érdekében acetylcholin-receptor elleni autoantitestek kimutatását célzó módszer kifejlesztését tűztük ki célul munkatársaimmal, majd az eljárást felhasználva megkíséreltük az antitestek klinikai jelentőségének, differenciál-diagnosztikai értékének kimutatását SS-ben, majd később más szisztémás autoimmun betegségeken, így szisztémás lupus erythematosusban (SLE) és rheumatoid arthritisben (RA) is. Emellett, immun-elektronmikroszkópos vizsgálatokkal igyekeztünk adatokat találni arra vonatkozóan, hogy az antitesteknek lehet-e pathogenetikai szerepe.

Második témakör az SLE kialakulásában nagyon fontos szerepet játszó, komplex T-sejtes működészavar vizsgálatára koncentrált, és arra voltunk kíváncsiak, hogy a galektin-1 (Gal-1), ami egy immunregulátor szerepet betöltő lektin fehérje, eltérő expressziót valamint hatást mutat-e SLE-ben, mind egészségesekben. Mivel a Gal-1, lektin lévén, a fehérjék szénhidrát oldalláncaihoz kapcsolódva fejti ki hatásait, kézenfekvő volt, hogy gondolkodásunk a T-lymphocyták sejtfelszíni glikozilációs mintázatának eltérései irányába forduljon, és megvizsgáljuk ennek különbségeit SLE-s betegek és egészséges személyek között. Emellett egy másik potenciális mediátor, a hipotézisünk szerint az I. típusú interferonok jelátvitelében részt vevő TMEM203 szerepét is vizsgáltuk. Végül, egy klinikai jellegű kutatásban az antifoszfolipid antitestek szerepét mértük fel az SLE komplex klinikai képének alakításában, különösen az addig feltáratlan kapcsolatukat a nem-thromboemboliás mechanizmusú szervi manifesztációkkal.

Emellett, harmadik témaként, elkezdtük annak a kérdésnek a vizsgálatát, hogy RA-ban és spondylitis ankylopoetica-ban (ankylosing spondylitis – AS) milyen megfontolások alapján lehet a biológiai terápiás kezelések leállítását megfontolni akkor, ha a beteg már hosszú ideje remisszióban van e gyógyszerek mellett. Jelen dolgozatomban minden fejezetben e három kérdéskörre tagolva mutatom be kutatásaim eredményeit.

1.2. Szisztémás autoimmun betegségek

A mai napig már több mint 100 autoimmun betegséget azonosítottak, melyek közül kiemelt jelentőségűek a szisztémás autoimmun kórképek, más elnevezés szerint autoimmun kötőszöveti betegségek. Komplex immun-pathomechanizmusuk következtében e betegségek egyszerre több szervet, szervrendszert támadnak meg, gyakran súlyos, életveszélyes állapothoz vezetnek, és sokszor irreverzibilis szervi károsodást okoznak. Kezelésük gyakran intenzív immunszuppresszív kezelést igényel, legtöbbjük krónikus, recidiváló lefolyású, ezért évtizedeken át tartó szoros gondozást tesz szükségessé.

1.2.1. *Sjögren szindróma*

A Sjögren szindróma alapjelensége az exokrin mirigyek, elsősorban a könny- és nyálmirigyek autoimmun eredetű gyulladása, melynek kapcsán mirigyműködési zavar, szem- és szájszárazság alakul ki. A mirigyekben intenzív, gócos T- és B-lymphocytás beszűrődés látható, és az autoimmun válasz elsődleges célpontját nagy valószínűséggel a mirigyek kivezető csöveinek hámsajtjeiben azosították (1). A folyamat nemritkán a légutak, a gyomor-bélrendszer és a genitális tractus exokrin mirigyeit is érinti, valamint további epithelialis-ductalis rendszert tartalmazó szerveket is, mint a máj vagy a vese, illetve az endokrin mirigyek közül gyakori a pajzsmirigy érintettsége. Az intenzív lymphocytás beszűrődés ez esetekben már nem szárazságban, hanem peritubularis infiltrációban, következményes szervi károsodásban mutatkozik meg, így a tüdőben a terminalis bronchiolusok felől a parenchymát infiltráló sejtek lymphocytás interstitialis pneumonitist, a vesében tubulo-interstitialis nephritist, a májban primer biliaris cirrhosisra emlékeztető lymphocytás cholangitist, a gastrointestinumban chronicus gastritist, glutén-szenzitív enteropathiát, lymphocytás colitist, a pajzsmirigyben pedig Hashimoto thyreoiditist okoznak (2). E spektrum miatt találó az SS-sel kapcsolatosan az „autoimmun epitheliitis” elnevezés (3). Emellett, mint több más szisztémás autoimmun kórképben, SS-ben is találkozhatunk arthritis, anaemia, leukopenia, Raynaud-tünet, vasculitis, perifériás neuropathia vagy serositis tüneteivel. Antinuclearis antitesteket (ANA), elsősorban anti-Ro(SSA) vagy anti-La (SSB) antitesteket és rheumatoid faktort (RF) lehet kimutatni a betegek többségében. Immunpatológiailag az exokrin mirigyekben CD4+ T-sejtes dominanciájú fokális infiltrátum mutatható ki (4). A folyamat előrehaladtával a T-és B-sejtes infiltráció térben egyre jobban elkülönül, a B-sejtes régiók ectopiás nyiroktüsző szerkezetbe rendeződnek, mely a fokozódó polyclonalis immunglobulin-termelés helyszíne lesz. További kölcsönös T- és B-sejtes stimuláció során megteremtődik az esélye egy-egy monoclonalis B-sejtvonal kialakulásának, majd B-sejtes lymphomába történő elfajulásának, ami a betegség legsúlyosabb potenciális kimenetelét jelenti (5).

1.2.2. *Szisztémás lupus erythematosus*

Az SLE a legváltozatosabb, egyik leggyakoribb és legsúlyosabb szisztémás autoimmun betegség. Csaknem valamennyi szervet érintheti, így a leggyakoribb ízületi és bőrtüneteken kívül sűrűn előfordulnak haematológiai cytopeniák, serositisek (pleuritis, pericarditis), és Raynaud jelenség is (6). Az esetek közel felében klinikailag szignifikáns glomerulonephritis alakul ki, mely kezelés nélkül gyakran végstádiumú veseelégtelenséghez vezet (7-10). További életfontos szervek is gyakran célpontjai az autoimmun gyulladásnak, így a tüdő, szív (endocarditis, myocarditis), a központi és perifériás idegrendszer. A betegség pathogenesisét igen komplex immunszabályozási zavar jellemzi. A polygénés alapú genetikai meghatározottsághoz kiterjedt epigenetikai elváltozások, elsősorban a genom globális hypometiláltsága társul. Környezeti tényezők közül az ultraibolya sugárzás, fertőzések, bizonyos gyógyszerek, női nemi hormonok (terhesség, fogamzásgátló kezelés), illetve dohányzás emelendő ki. Mind a veleszületett, mind az adaptív immunrendszerben sokrétű működészavar alakul ki, melynek fő eleme a sejtmagi komponensekkel kapcsolatos immunológiai tolerancia elvesztése (11, 12). A fiziológiás apoptosissal szemben, amikor a sejt halálát követően a maganyag effektor immunválasz indukálása nélkül kerül feldolgozásra a

fagocita sejtekben, SLE-ben a patológiás apoptózis, a sejtnecrosis vagy a neutrophil extracelluláris csapdák (neutrophil extracellular trap - NET) keletkezése kapcsán az elpusztuló sejtek kromatinállománya aktiváló módon kerül prezentálásra a T-sejtek felé (11, 13). A nucleinsav-tartalmú particulumok Toll-like receptorok (TLR) közvetítésével aktiválják a plasmacytoid dendritikus sejteket, melyek nagy mennyiségű I. típusú interferont (IFN) termelnek. Az IFN- α és - β nagyszámú gén transzkripcióját indukálja (interferon-szignatúra), melyek számos útvonalon át serkentik mind a T- és B-lymphocyták, mind a plasmasejtek működését. Igen fontos tényezője az SLE pathogenesisének a T-lymphocyták működészavara (14), mivel a T-sejtek funkciói számos ponton térnek el az egészséges személyek sejtjeitől. Néhány alapvető ilyen eltérés: a sejtfelszíni lipid-raftok korai aggregációs hajlama, a T-sejt receptor komplex összetételének megváltozása, a jelátviteli utak következményes eltolódása (a calcium-jel a normálnál intenzívebb lesz, de pl. a MAP-kináz útvonal károsodik), a mitokondrium biogenesis és membrán-potenciál patológiássá válása (15, 16). Ezeken kívül még számtalan eltérés vezet ahhoz, hogy az SLE-s T-sejtek ingerküszöbe alacsonyabb lesz az autoantigén-stimulusokkal szemben, az aktivált T-sejtek apoptózis-érzékenysége csökken, B-sejt stimuláló képességük fokozódik, ugyanakkor interleukin-2 (IL2) termelésük gátolt lesz, így károsodik pl. a regulátor T-sejt irányú differenciációs képességük is. (11, 17, 18). Mint látható, az apoptózis-reguláció károsodása számos ponton játszhat szerepet az SLE kifejlődésében (13).

1.2.3. Rheumatoid arthritis

Az RA a leggyakoribb krónikus polyarthritis, prevalenciája hazánkban 1:200, bármely felnőtt korosztályt érinthet, leggyakrabban az 5-6. évtizedben kezdődik. A szimmetrikus sokízületi gyulladás leggyakrabban a kezek és lábak kisízületeit, csuklókat és bokákat érinti, de az esetek többségében a térd, vállak, könyökök gyulladása is kialakul. A kórkép jellegzetessége a proliferatív, destruktív synovitis, mely kezelés nélkül a porcok és az ízület-környéki csontállomány pusztulásához, irreverzibilis ízületi deformitásokhoz, egyre súlyosbodó funkcionális károsodáshoz, mozgáskorlátozottsághoz vezet. Számos extraarticularis manifesztáció (interstitialis tüdőbetegség, pleuritis, pericarditis, vasculitis, mononeuritis multiplex, rheumatoid csomók) mellett egyre nagyobb szerepet tulajdonítunk az utóbbi időben az accelerált atherosclerosisnak, ami döntő szerepet játszik a betegségben megfigyelhető emelkedett mortalitásban (19).

A betegek többségében RF és citrullilnált fehérjék elleni antitestek (ACPA) mutathatók ki. A kórkép – elsősorban a fenti antitestekre pozitív forma – pathogenesisében domináló a gén-környezet interakciók egyik legjobban feltárt formája, a HLA-DR4 shared epitóp hordozás és a dohányzás szinergisztikus hatása: a shared epitópok valamelyikét hordozó személyekben a dohányzás hatására indukálódó szájüregi és légúti (szubklinikus vagy manifeszt) gyulladásos (parodontitis, chronicus bronchitis) környezetben a dohányfüst hatására fokozódó citrullinációs folyamat ACPA képződéséhez vezet (20, 21).

Az antitestek további, nagyrészt ismeretlen lépések során a periarticularis osteoclastokhoz vagy a synoviocytákhoz történő közvetlen kapcsolódás révén gyulladásos cytokinek és chemokinek (IL1, IL6, tumor necrosis factor (TNF)- α , IL8, stb.) termelődését indítják be (22).

A fibroblast-szerű synoviocyta tartós, epigenetikusan rögzült proinflammatorikus fenotípus-változásuk révén a fenti citokineken kívül angiogenetikus, valamint porc- és csontbontó anyagok széles skáláját termelik, a chemokin-túlermelés és endothel-aktiváció lymphocyták, macrophagok, hízósejtek, plasmasejtek infiltrációját indukálja, és egy önfenntartó gyulladásos hálózattal bíró, proliferáló gyulladásos massa – pannus –alakul ki az érintett ízületekben (23).

Az utóbbi években számos új gyógyszeres kezelési lehetőség vált elérhetővé, melyek alapvetően átírták a korábban leginkább csak a fájdalmas tünetek kontrolljára szorítkozó terápiás gyakorlatot. Manapság az elvárás a korai diagnózis, még az irreverzibilis elváltozások kialakulása előtt, és a hatékony betegségmódosító (disease-modifying antirheumatic drug – DMARD) kezelés indítása. Amennyiben a hagyományos DMARD (conventional - cDMARD) kezeléssel – methotrexát, leflunomid, ritkábban sulfasalazin, chloroquin, cyclosporin – nem érhető el a gyulladásos folyamat teljes kontrollja, a tartós remisszió (egyes esetekben alacsony betegség-aktivitás is elfogadható), biológiai DMARD-ok (bDMARD) adása indokolt. E monoclonalis antitestek közül jelen tézisek írásakor TNF- α -t, IL6-receptort, B-sejteket (anti-CD20), valamint a T-sejt kostimulációt gátló (CTLA4) monoclonalis antitestek állnak rendelkezésre, valamint újabban bevezetésre kerültek már a kis molekulájú szerek új generációját képviselő célzott szintetikus DMARD-ok (targeted synthetic DMARD – tsDMARD), ezen belül RA-ban konkrétan a Janus kináz gátló gyógyszerek is. Utóbbi két gyógyszer család a cDMARD-oknál hatékonyabban és célzottabban képes gátolni az RA aktivitását, ezáltal megállítani a csontdestrukciót jelző radiológiai progressziót, javítani a funkcionális állapotot és életminőséget, csökkentve a fáradékonyságot, a megnövekedett cardiovascularis kockázatot és megőrizve a munkaképességet.

1.3. Háttér, problémafelvetés

1.3.1. Sicca tünetek pathogenesisise SS-ben– acetylcholin receptor elleni antitestek potenciális szerepe

Az SS-ben kialakuló sicca tünetcsoport eredetéről a klasszikus elképzelés az, hogy az autoimmun gyulladásos folyamat által okozott mirigyállomány-pusztulás közvetlenül vezet a szekréciós kapacitás kimerüléséhez. Azonban a kezdetektől fogva tudott, hogy a gyulladás fokális, és az intenzíven infiltrált területek mellett a szövettani minták kiterjedten tartalmaznak látszólag ép mirigystruktúrákat (24). Klinikai tapasztalat és kutatási eredmények is azt mutatják, hogy az exokrin insuficiencia mértéke fluktuációt mutat, és javulás is észlelhető a nyál- és könnytermelésben (25). Pontos hisztomorfológiai mérések nem mutattak összefüggést a nyáltermelés csökkenése és a nyálmirigyek szöveti destrukciójának mértéke között (26). Mivel SS-ben is viszonylag magas előfordulási gyakorisággal találkozhatunk autonóm neuropathiára utaló tünetekkel (27-37), és mivel pl. diabetes mellitusban az autonóm neuropathia gyakran jár együtt xerostomiával ill. xerophthalmiával (38-39), ami egyes gyógyszerek anticholinerg mellékhatásai között is előfordulhat, felmerült bennünk, hogy a cholinerg stimuláció károsodása, mint egy potenciálisan reverzibilis tényező, szerepet játszhat

az SS-ben kialakuló száraz tünetek kialakulásában (40-43). Egy korábbi vizsgálatunkban azt találtuk, hogy az intracutan adott cholinerg agonista carbachol hatására SS-s betegekben szignifikánsan csökkent microvascularis vasodilatatio alakul ki, mint az egészséges kontrollokban, sőt gyakran teljes válaszképtelenséget tapasztaltunk a cholinerg agonistával szemben (44). Mivel e kísérleti elrendezésben az agonistát közvetlenül a célszervhez (dermalis kiserek) juttattuk, a csökkent válaszkészséget nem lehetett autonóm neuropathiával magyarázni, hanem receptorális vagy posztreceptorális szinten kellett az eltérést keresni. Hipotézisünk az volt, hogy autoantitestek alakulnak ki az acetylcholin-receptorral szemben, melyek gátolják a cholinerg neurotranszmissziót.

E feltételezés alátámasztására a fenti kísérleteink idején két állatkísérletes közlemény szolgáltatott támogatást. Bacman és munkatársai patkány nyálmirigy extractumok vizsgálata során igazolták radioizotópos receptorkötési assay segítségével, hogy antitestek mutathatók ki SS-s betegek vérében, melyek a nyálmirigyekben domináns m3 altípusú muscarinszerű acetylcholin-receptoron (m3AChR) keresztül – specifikusan kötődnek a patkány nyálmirigyhez (45). Robinson és munkatársai pedig genetikailag módosított NOD-egerekben mutatták ki, hogy SS-s betegek széruma m3AChR-specifikusan gátolja a nyáltermelést a kísérleti állatokban (46). Humán receptorral szemben autoantitesteket azonban nem sikerült kimutatni: ugyan egy 25 aminosavból álló szintetikus peptiddel szemben leírtak immunreaktivitást SS-ben (47), de utóbb kiderült, hogy ez nem az m3AChR, hanem az m4AChR második extracelluláris hurokszakaszának felelt meg. Egy másik munkacsoport is sikertelenül próbálkozott ezen peptid elleni antitestek kimutatásával (48), sőt e második kutatócsoport már az m3AChR releváns peptidszakaszával is elvégezte ugyanezen ELISA méréseket, és szintén nem tudtak antitest-pozitivitást kimutatni (48). Így kísérleteink elindításakor kérdéses volt, hogy SS-ben léteznek-e humán m3AChR-rel reagáló antitestek, és semmi további adat nem állt rendelkezésre ezen, egyelőre csak állatkísérletben felvetett antitestek funkciójáról, illetve további jellemzőiről.

Ezért a 2000-es évek elején igyekeztünk elsőként megbízható vizsgálóeljárást kifejleszteni a humán AChR elleni autoantitestek kimutatására. Munkacsoportunk korábbi tapasztalatai alapján a viszonylag rövidebb peptid-szekvenciák jobban felveszik az eredeti térbeli formájukat, ha nagyobb fehérjéhez, pl. glutathion-S-transzferázhoz (GST) kapcsoljuk fúziós formában (49). Így a nagy molekulák többnyire konformációs jellegű epitópjainak antigénként történő felhasználása során nagyobb hatékonyság várható a GST-fúziós formától, mint a „tiszt” lineáris peptidszakasztól. Kísérleteink során létrehoztunk rekombináns technikával egy AChR-specifikus peptidszakaszt és glutathion-S-transzferázt (GST) tartalmazó fúziós fehérjét. A peptidszakasz 25 aminosavból állt (első és utolsó 2-2 aminosav alapján KRAI-ként rövidítettük), kiválasztását a rendelkezésre álló szakirodalmi ismeretek alapján végeztünk (47), és ennek megfelelően az m4AChR második extracelluláris hurkán helyezkedik el. ELISA módszerrel teszteltük a KRAI peptidet egyrészt szintetikus peptid formában, másrészt az előbb említett GST-KRAI fúziós fehérje formában prezentálva antigénként. A szintetikus peptiddel szemben mi sem tudtunk az egészséges kontrolloktól különböző immunreaktivitást kimutatni SS-s és RA-s betegek szérumában, de a fúziós fehérjével szemben SS-ben szignifikánsan magasabb átlagos antitest-titert tapasztaltunk, mint

egészségesekben vagy RA-ban (50). Mivel kísérleteink során m4AChR-specifikus peptidszakaszt használtunk antigénként, a méréseknek konkrét relevanciája nem volt az SS pathogenesisével kapcsolatban, de megteremtette a metodikai feltételét annak, hogy a releváns, m3AChR vizsgálatát tűzhessük ki célként.

1.3.2. A klinikai képet alakító pathogenetikai eltérések vizsgálata SLE-ben

1.3.2.1. A galektin-1 szerepe az SLE-ben észlelhető T-sejt dysfunctio kialakításában

A lektinek szénhidrátkötő fehérjék, melyek nagy affinitással és specifikusan kötődnek meghatározott cukorláncokhoz. A glikoproteinek szénhidrát-oldalláncaihoz kapcsolódva számos élettani folyamatot befolyásolnak. Így a fehérje-fehérje kölcsönhatásokon túl a fehérje-szénhidrát kapcsolatoknak is meghatározó szerepük van pl. a szövetek, szervek fejlődésében, a daganatok képződésében, valamint az immunrendszer jelátviteli folyamataiban. A Gal-1 a β -galaktozid-kötő lektinek családjába tartozik, specifikusan az emlőssejtek felszínén elhelyezkedő, elágazó N-glikánokon és O-glikánokon elhelyezkedő terminális N-acetyl-laktózin motívumokhoz kapcsolódik (51). Számos ilyen struktúrát tartalmazó glikán található szinte minden sejt felszínén, így a Gal-1 és ligandjai fontos szabályozó funkciót töltenek be többek között a sejtadhézióban (52), sejt migrációban (53), és az immunregulációban (54).

A Gal-1 két anti-parallel β -lemezből áll, harmadlagos szerkezetében az N- és C-terminálisok a molekula egyik pólusán, míg a szénhidrátkötő hely a másik póluson helyezkedik el. Natív állapotban többnyire homodimer formában fordul elő, de kisebb koncentráció esetén monomer formára disszociál, megtartva ugyanakkor affinitását a rá jellemző szénhidrát-struktúrák iránt (55). Kórélettani szempontból fontos, hogy a ligandjait képező glikánok szialinsav tartalma nagymértékben befolyásolja kötődését: a szénhidrát-oldalláncok terminális α -2,3 vagy α -2,6-szialisációjára részben vagy teljesen meggátolja a kötődését (55-57).

A Gal-1-t az immunrendszer számos sejtje expresszálja, így különösen a macrophagok (58), B-sejtek (59) és aktivált T-sejtek (60, 61), valamint mesenchymalis stromasejtek, melyek immunosuppresszív funkciókkal rendelkező multipotens őssejtek (62, 63). További forrásai a nyirokszervek és a gyulladásos szövetek endothelsejtjei (64). Nem hagyományos módon szekretálódik (65, 66), és mivel szekréciója után gyorsan visszakötődik a sejt felszíni glikánokhoz vagy a kötőszöveti mátrix molekuláihoz, munkacsoportunk korábbi eredményei is alátámasztják, hogy hatásait elsősorban közvetlen sejt-sejt kontaktus révén fejti ki (67-70). Számos immunregulátor funkciót tölt be, különösen az aktivált T-sejtekre hatva (71, 72). Egyrészt azok apoptózisát okozza, mely hatás az aktivált T-helper-1 (Th1) és Th17 sejteken a legkifejezettebb, így elősegíti a Th2 és Treg irányú polarizációt. Ennek magyarázata az lehet, hogy a Th2 vagy Treg irányba differenciálódó T-sejtek felszínén intenzívebb szialisáció fejlődik ki, mely védi őket a Gal-1 apoptotikus hatásától (73). A Gal-1-ről kimutatták, hogy a T-lymphocytaon számos sejt felszíni struktúrához kötődhet, például CD45 (74), CD7 (75), vagy a különösen az immunológiai szinapszis fontos alkotóelemét képező GM1 gangliozid

(66,76), de ezen felül még számos, a kötési specificitásának megfelelő szénhidrát-motívumot hordozó glikoprotein is közvetítheti hatásait. Apoptotikus hatásmechanizmusának tisztázásához munkacsoportunk korábbi munkái is döntően hozzájárultak: eszerint nem Fas/FasL útvonalon (60, 77), hanem ismeretlen receptoron keresztül indítja el az apoptotikus folyamatot. Az általunk leírt mechanizmus szerint az Lck és ZAP70 kinázok aktiválódnak (78-79), melyet ceramid-felszabadulás (80) és a mitochondriális membránpotenciál csökkenése követ. Végül kaszpáz-aktiváció révén az intracelluláris fehérjék és a kromoszómális DNS fragmentálódása következik be (81). Szintén munkacsoportunk tagjai voltak, akik rámutattak, hogy a Gal-1 nem szolubilis formában, hanem közvetlen sejt-sejt kontaktus révén fejt ki hatását (71).

A Gal-1 hatásmechanizmusának további fontos eleme az, hogy a Treg sejtek igen nagy mennyiségben expresszálják, ami aktivációt követően tovább emelkedik (82). A Gal-1 blokkolása neutralizáló antitest segítségével jelentősen csökkenti a Treg sejtek gátló hatásait, mind humán, mind egér modellekben (82).

A Gal-1 az immunprivilegizált helyek kialakításában is kulcsszerepet játszik. A test ezen helyein az antigének nem váltanak ki gyulladást, ami aktív immunszuppresszív folyamatok eredménye. A természetes immunprivilegizált szervek, pl. here, elülső szemcsarnok, központi idegrendszer (83-85) mellett az anyai-magzati határfelszínen, illetve sajnos szolid tumorok környezetében is kialakul az immunválasz helyspecifikus gátoltsága (86-87). Az immunprivilegizált szervek kötőszövet sejtjeinagy mennyiségben termelnek Gal-1-t. Ezzel összhangban kimutatták, hogy spontán abortusból származó placentaris szövetben szignifikánsan kevesebb Gal-1 található, mint arteficiális abortusból származóban (88), és a Gal-1 közvetlen immunprivilegizáló hatását is igazolták trophoblast sejtek vizsgálatával (89). A tumorok egyebek mellett a Gal-1 termelése révén tudnak „elrejtőzni” az immun-surveillance elől (87). A Gal-1 gátlását mint terápiás lehetőséget vetették fel colon (90), emlő (91), vagy tüdő (92) carcinoma kezelésére.

A Gal-1 eddig leírt, funciói, beleértve az immunszabályozó funkciót is, a molekula extracelluláris lektin szerepével függenek össze, míg az aktivált T-sejtekben *de novo* szintetizálódó, Gal-1 intracelluláris funkcióiról csak minimális ismereteink vannak. Egyik ismert feladata, hogy a Gemin4 fehérjével asszociációban elősegíti a spliceosomák összeszerelődését és így a pre-mRNS splicing-ot (93). A másik, eddig feltárt funkciója pedig, hogy a hRAS nanocluster részeként részt vesz az intracelluláris jelátviteli folyamatokban (94).

Immunregulátor funciói ismeretében nem meglepő, hogy több gyulladásos illetve autoimmun betegség állatmodelljében is fontos szerepe derült ki. Gal-1 előkezelés dózisfüggő módon gátolta a concanavalin-A-indukált hepatitis, és ennek részeként a hepaticus T-sejtes infiltráció kialakulását egérben (77). Kísérletes colitisben Gal-1 adása csökkentette a betegség aktivitási jeleit, és gátolta a bélnyálkahártya lamina propriájában levő T-sejtek IFN- γ termelését (95). Gal-1-deficiens egerekben erősebb Th1/Th17 választ kaptak *in vivo* antigén-prezentáció hatására, és az ilyen állatok hajlamosabbak voltak experimentális autoimmun encephalomyelitis kialakulására, mint a kontroll egyedek (73).

SLE egérmodelljében (mrl/lpr egerekben) is vizsgálta egy munkacsoport a szolubilis Gal-1 hatásait, és azt találták, hogy adása gátolta a betegség kifejlődését, csökkentette az aktivált T-sejtek számát, fokozta a FoxP3 expresszióját, ezáltal növelte az állatok túlélését (96). A Gal-1 rheumatoid arthritis állatmodellben is terápiás hatásának bizonyult (97). Azonban humán mintákon még nem vizsgálták a Gal-1 SLE-ben betöltött szerepét.

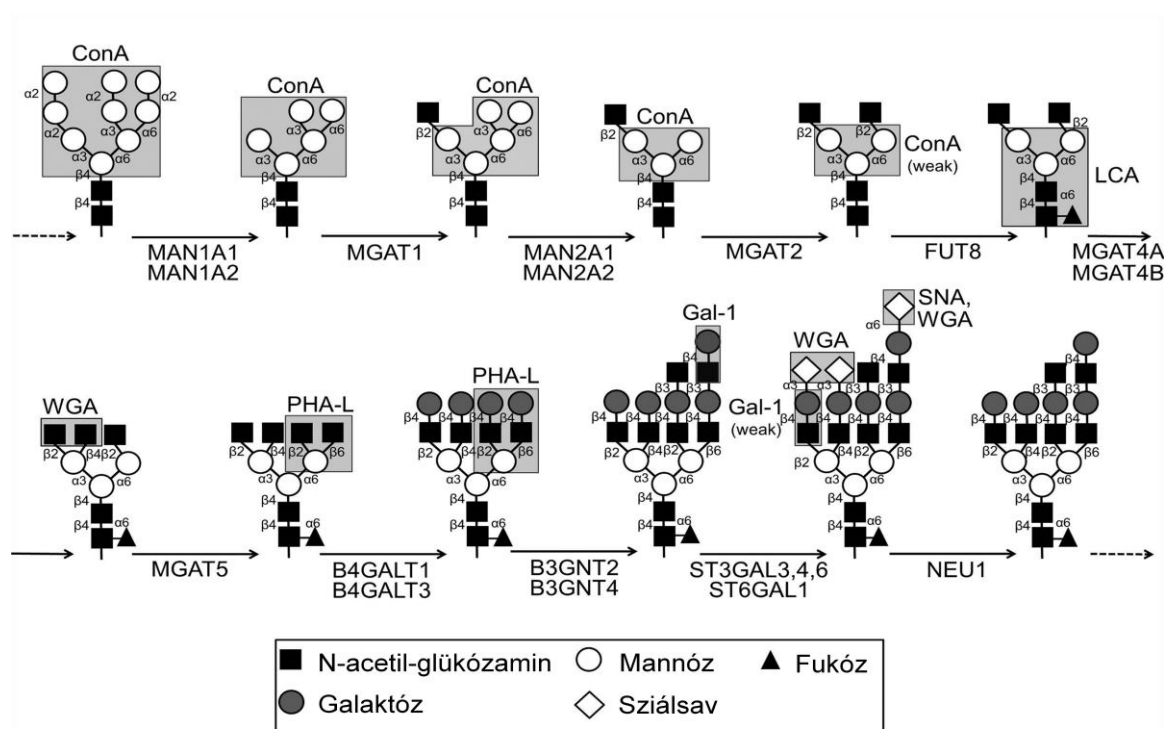
1.3.2.2. Sejtfelszíni glikozilációs mintázat és a lektinkötődés következményes eltérései T-sejteken SLE-ben

Az immunsejtek felszínének glikozilációs mintázata nagyban befolyásolja a környezeti hatásokra adott válaszukat. Specifikus kötődési tulajdonságaik miatt a lektineknek, mint jelzőanyagoknak, a sejtfelszíni „cukor-kód” kísérletes feltérképezésében is fontos szerepük van mind egészséges (98), mind beteg sejteken (99, 100). A proteoglikánok jellemzően igen komplex szénhidrát láncokat tartalmaznak, melyek számos, egymást követő glikozilációs lépés következtében épülnek fel és érik el végül érett, végleges formájukat (101). E glikozilációs lépések elsősorban az endoplazmás retikulum belsejében és a Golgi apparátusban történnek, az egyes szénhidrát-elemek hozzáadását az épülő lánchoz glikozil-transzferázok, lehasításukat glikozidázok jól szervezett, szekvenciális működése biztosítja. Ezen lépéseket az *1. ábrán* foglaltam össze. E két enzimsaládnak emberben több mint 200 tagja van, mennyiségüket és aktivitásukat transzkripciójuk, valamint sejten belüli lokalizációjuk szabályozása határozza meg (101, 102).

Jelen munkánk szempontjából fontos glikozilációs lépéseket a következőkben foglaljuk össze: Az alfa-mannozidázok, mint pl. a MAN1A1-2 and MAN2A1-2 felelősek a mannózmolekulák eltávolításáért az N-glikánok szénhidrát láncairól a Golgi apparátusban (103). Ez a kezdeti lépés fontos a kezdetleges, mannózból gazdag láncok alkalmassá tételére további komplex, változatos lektinkötési specificitású szénhidrát-struktúrák kiépítése szempontjából (104). Ezt követően az N-acetylglükózaminil-transzferáz I-V (MGAT1-5) enzimek elágazásokat hoznak létre az N-glikán oldalláncokban. Ennek során a mannóz alapláncához az oldallánc első aminoglükozidjai, majd további N-acetyl laktózamin (LacNAc) egységek kapcsolódhatnak (105), létrehozva a Gal-1 nagy affinitású kötőhelyeit. Minél több elágazást tartalmaz egy szénhidrátlánc, annál nagyobb affinitása van a Gal-1 iránt (106). A létrejövő komplex poly-N-acetylaktózamin láncok végül szíálsav, „sapkát” kapnak az ST6GAL1 (α -2,6 szíálsav), illetve az ST3GAL3,4 és ST3GAL6 (α -2,3 szíálsav) szialil-transzferáz enzimek működésének következtében (107). E terminális szializáció részben (α -2,3 szíálsav) vagy teljesen (α -2,6 szíálsav) meggátolja a Gal-1 kötődését a szénhidrát-lánchoz (108). A neuraminidáz enzimek a szialil-transzferázok hatásait antagonizálják azáltal, hogy lehasítják a terminális szíálsavat. A legfontosabb neuraminidázok, melyek a plazmamembránhoz kapcsolódnak a NEU3 és a lizoszómákban és a plazma membránban egyaránt előforduló NEU1, melyek a szialil-transzferázokkal együtt kulcsszerepet játszanak a sejtfelszíni glikánok szerkezetének és így funkciójának végleges kialakításában (109).

A sejtfelszíni glikoprotein mintázat fontos szerepet játszik többek között a sejtadhézióban, migrációban, valamint az extracelluláris jelek érzékelésében és továbbításában a sejt belseje felé (110, 111). Számos veleszületett vagy szerzett betegségben

mutatták ki, hogy megváltozik a sejtfelszíni glikozilációs mintázat, pl. sokféle tumortípusban és autoimmun betegségekben is (112-115). Malignus daganatok esetében diagnosztikus és prognosztikus célokra is felhasználhatjuk a szénhidrát-struktúrák vizsgálatát (114, 116). Autoimmun betegségek vonatkozásában, legjobban az immunglobulinok glikozilációs állapotának változásait vizsgálták (117), és kimutatták, hogy az egyes immunglobulin-alosztályok effektor funkcióit jelentősen befolyásolják a fehérjelánchoz kapcsolódó szénhidrát-struktúrák (118, 119). Több érdekes adat szól amellett, hogy a T-sejtek felszíni glikozilációjának változásai kapcsolatosak lehetnek autoimmun betegségek kialakulásával. A T-sejt receptor N-glikozilációjának zavara egerekben súlyos glomerulonephritis kialakulásához vezet (120). A szénhidrát-oldalláncok szerkezete fontos szabályozó szerepet tölt be a Major Histocompatibility Complex (MHC) antigén-prezentáló molekulák vagy a T-sejt receptor antigén-kötésében és a következményes T-sejt aktiváció folyamatában, és ennek zavarait összefüggésbe hozták pl. gyulladásos bélbetegségek vagy sclerosis multiplex kialakulásával (121-125). A mannozidáz-II enzim hiánya állatmodellben immunkomplex-mediált glomerulonephritist, hypocomplementaemiát és ANA-pozitivitást, vagyis lupus-szerű betegséget okoz (126). Azonban, hasonlóan a Gal-1-hez, a T-lymphocyták sejtfelszíni molekuláinak glikozilációs eltéréseit sem vizsgálták humán SLE-ben.



1. ábra. Az N-kapcsolt protein-glikoziláció folyamata emlőssejtekben.

Az ábra a fontosabb enzimatikus lépéseket, valamint az így kialakuló glikozilációs mintázat alapján létrejövő lektinkötő helyeket mutatja. Az emberi glikozilációs enzimeket kódoló géneket a megfelelő nyilak alatt tüntettük fel. Az adott lektin kötését meghatározó mintázatokat a szürke mezők emelik ki. Forrás: Cummings et al (127). A gének és a lektinek teljes nevét a 3.2.2. alfejezetben adjuk meg.

1.3.2.3. *A TMEM203 szerepének vizsgálata SLE-ben*

Jól ismert, hogy az SLE, és több más szisztémás autoimmun betegség pathogenesisében az I. típusú IFN-k, vagyis az INF- α és IFN- β kulcsszerepet játszanak (128,129). A betegség legfontosabb autoantigénjeinek számító nucleoproteinek endosomális vagy cytoplasmaticus mintázatfelismerő receptorokhoz kötődnek a természetes immunrendszer sejtjeiben, így a monocyta-macrophag sejtekben és a dendriticus sejtekben (130). Ezt követően különböző szignálutakon keresztül specifikus transzkripciós faktorok, az interferon-regulatory factorok (IRF-k) aktiválódását okozzák, megindítva az I. típusú IFN-ok transzkripcióját (131). Egyik ilyen jelpálya a Tank-binding kinase-1 (TBK1)/IRF3 útvonal, melynek fontos komponense az endosomális STimulator of INterferon Genes (STING) fehérje (132). SLE szempontjából fontos, hogy a STING-et a kettős szálú DNS aktiválja, és ennek következménye a fokozott I. típusú IFN-termelés (133, 134). SLE-s betegek szérumából származó, apoptotikus termékeket tartalmazó microvesiculák IFN-termelést és ún. IFN szignatúrát (az IFN-ek által indukált gének összességét) indukálnak, részben a STING közvetítésével (135). A STING által indukált folyamatok pontos jellemzése, különösen SLE-ben, azonban még nem történt meg.

Kollaborációs partner kutatócsoportunk tagjai korábbi, új proinflammatorikus mediátorokat kutató vizsgálataik során számos gént azonosítottak egér macrophag sejtvonalban, melyek addig ismeretlen, feltételezhetően gyulladást keltő fehérjéket kódolnak (136). Egyik ilyen endoplazmatikus fehérje a Transmembrane protein-203 (TMEM203) (137). Hiányában jelentősen csökken a TLR4 által indukált CXCL4 chemokin termelése, így felmerül, hogy kapcsolatban lehet a STING-mediált, I. típusú IFN-indukciós folyamatokkal. Mindezek miatt hasznosnak gondoltuk megvizsgálni expresszióját SLE-s betegekben egészséges kontrollokkal összehasonlítva, és összefüggést keresni a TMEM203 expresszió és az SLE aktivitása ill. egyéb jellemzői között.

1.3.2.4. *Antifoszfolipid antitestek szerepe az SLE nem-thromboemboliás mechanizmusú szervi manifesztációinak kialakulásában*

Az SLE-ben a mindennapi gyakorlatban használt autoantitest-meghatározások közül kiemelt szerepe van az antifoszfolipid antitestek (antiphospholipid-antitest: APA) ismeretének. Ezen ellenanyagok vizsgálatára legelterjedtebb az anti-cardiolipin (anti-CL) és az anti- β 2-glikoprotein-I (anti- β 2-GPI) antitestek, valamint a lupus anticoaguláns (LA) meghatározása. Kimutatásuk nemcsak az SLE diagnózisához járul hozzá, ahogy a jelenleg elterjedt osztályozási rendszernek is részei, hanem az egyik legjobban definiált klinikai alcsoportot jellemzik a lupus-betegség-spektrumon belül. Az APA-pozitív betegekben jelentősen emelkedett mind a vénás, mind az artériás thromboemboliás események, valamint az ismétlődő magzati elhalás kockázata, és amennyiben ezen események már bekövetkeztek, antifoszfolipid-szindrómáról (APS) beszélünk (138). Az APA-k egyértelműen patogén szerepet töltenek be az APS tüneteinek kialakulásában (139, 140). Az APA-k az akut klinikai tüneteket okozó, makroszkópos méretű vérrög-képződésen kívül több olyan szervi manifesztáció kialakításában is részt vesznek, ahol a microcirculatio vagy az endothel-funkció tartós és csak mikroszkópos vagy sejtlejtani mérésekkel detektálható károsodása szerepel a háttérben, pl. a Raynaud tünet, migrén vagy akcelerált atherosclerosis (141-144). Nem

meglepő ezek ismeretében, hogy az APA jelenléte a visszafordíthatatlan szervi károsodás kialakulásának és a várható élettartam csökkenésének kockázatát hordozza (145).

Bár az APA-pozitivitás és a vascularis események, valamint azok következményeinek kapcsolatát számos vizsgálat igazolta, nem foglalkoztak korábban azzal a kérdéssel, hogy ha SLE-s betegben APA mutatható ki, vagy APS-sel társul, ez milyen hatással van a nem-thromboemboliás szervi manifesztációk kialakulásának esélyére. Tudjuk, hogy SLE-ben számos autoantitest-pozitivitás egy-egy jól definiálható betegség-alcsoport, vagy szervi manifesztáció kialakulásával jár együtt (146). Így az anti-SSA-pozitivitás a subcutan lupus vagy a magzati atrioventricularis blokk, az anti-C1q-pozitivitás a nephritis (147), vagy, sok adat szerint, az anti-riboszomális-P és az anti-NMDA-receptor antitest-pozitivitás a neuropszichiátriai manifesztációk, pl. a psychosis kifejlődésével mutat szoros asszociációt (148, 149). Az SLE igen heterogén kórlefolyása miatt fontos, hogy a diagnóziskor tapasztalt autoantitest-repertoár ismeretében pontosabban tudjuk előrejelezni a kórkép lefolyását, súlyosságát, fokozottan figyeljünk egyes szervi manifesztációk korai jeleire.

1.3.3. A biológiai terápia leépítésének lehetőségei krónikus arthritisekben

A rekombináns technikával előállított ún. biológiai terápiák, vagy újabb hivatalos nevezéktan szerint biológiai betegség-módosító terápiák a gyulladásos reumatológiai kórképek kezelését forradalmasító, az egyes kórképek pathogenesisének kulcsmolekuláival specifikusan reagáló fehérje természetű gyógyszerek. A célzott hatásmechanizmus a hatékonyság ugrásszerű növekedését eredményezte, ami teljes paradigmaváltást hozott a reumatológiai betegségek kezelésében (150,151). A gyógyszerek a betegek jelentős részében a gyulladásos folyamat remissziójához vezetnek, és kb. 10 évvel bevezetésük után kezdett előtérbe kerülni az a kérdés, hogy el lehet-e hagyni e gyógyszereket valaha is, ha egyszer RA-ban vagy AS-ben elindítottuk a kezelést. A kérdést részben a gyógyszerek hosszú távú esetleges káros hatásaival kapcsolatos óvatosság, másrészt a sok éves, évtizedes terápiák költséghatékonyságával kapcsolatos szempontok tették fontossá.

Vizsgálataink indításakor, a 2010-es évek elején nagyon kevés információ állt rendelkezésre e téren. Az EULAR (European League Against Rheumatism) 2010-ben megjelentett ajánlása szerint RA kezelése során tartós remisszió estében először a corticosteroid terápia fokozatos csökkentése szükséges, majd steroidmentes további tartós remisszió esetén szóba jön a biológiai terápia elhagyása, legvégül pedig a DMARD terápia leépítése fontolható meg. 2010-ben Saleem és munkatársai (152) kerestek a remisszió fennmaradásával kapcsolatba hozható paramétereket. A felmérés során fizikális vizsgálat, képalkotó valamint immunológiai vizsgálatok alapján értékelték, hogy hogyan alakult a betegségaktivitás a sikeres anti-TNF kezelés leállítását követően. Az egyetlen szignifikáns prediktornak a diagnózis és a kombinált DMARD, illetve az anti-TNF kezelés indítása közötti minél rövidebb idő eltelte bizonyult. Az akkor legnagyobb esetszámú BeSt vizsgálat (153) során négyféle kezelési stratégiát hasonlítottak össze (szekvenciális monoterápia, step-up kombináció, kezdeti kombináció steroiddal, kezdeti kombináció infliximabbal). Tartós remisszió (a DAS44 értéke 2,4 alatt marad hat hónapon át) esetén elkezdték a terápiák leépítését, így a kezdeti infliximab

csoportban is, és csak a hagyományos DMARD kezeléssel folytatták a terápiát. A kezelési ágra került 120 beteg közül 77-nél sikerült tartós remissziót elérni infliximab kezeléssel, majd ennek elhagyása után 67 betegben (87%) az alacsony betegség-aktivitás és a radiológiai progresszió gátlása fennmaradt a következő két év során is (154). A betegek 56%-a pedig a további, átlagosan 7,2 év hosszú utánpótlás során is remisszióban maradt biológiai kezelés nélkül is (155). Ezen eredmények inspiráltak további vizsgálatokat, köztük saját kutatásainkat is. Ellentétben a BeSt vizsgálattal, melybe rövid betegség-fennállású betegek kerültek, az RRR vizsgálatban, melyet 102 japán beteg bevonásával végeztek, átlagosan 5,9 éves betegség-fennállás mellett vontak be olyan pácienseket, akiknél infliximab kezeléssel legalább 24 héten át tartó alacsony betegség-aktivitást ($\text{DAS28} < 3,2$) sikerült elérni. Az anti-TNF kezelés leállítását követően 56 betegnél (55%) megmaradt az alacsony betegség-aktivitás egy éven át (156) és radiológiai vagy funkcionális progresszió sem következett be. Azok a betegek, akinél mégis szükséges volt az infliximab visszaadása, nem tapasztaltak gyakoribb allergiás mellékhatást az ismételt infúziók során. Hasonló arányban őrizték meg az alacsony betegség-aktivitást a HONOR vizsgálat betegei is, akiknél a sikeres adalimumab terápiát állították le, és a 6 hónapos adatok alapján 73%-uk betegség-aktivitása továbbra is 3,2-es DAS28 alatt maradt (157). Végül egy másik friss, nagy esetszámú vizsgálat, az OPTIMA study korai RA-s betegeinél (átlagosan 3,9 hónapos fennállás) 24 héten át methotrexát + adalimumab kezelést alkalmaztak, és ennek hatására 44%-uk alacsony betegség-aktivitás állapotába került. Majd ismételt randomizációt követően terápiájukat methotrexát + placebo vagy methotrexát + adalimumab adásával folytatták, és azon betegek 66%-ában is megmaradt az alacsony aktivitás, akiknél az adalimumab leállításra került (158). Elmondható volt tehát, hogy érdemes megfontolni az anti-TNF kezelés leállítását RA-ban hosszabb ideje fennálló remisszió esetén, az EULAR ajánlással is összhangban, de a relapsus esélye nem elhanyagolható, ami miatt a leállításban érintett betegek pontosabb azonosítása elengedhetetlen.

Ami az AS-t illeti, Baraliakos és munkatársai adatai alapján a vizsgált betegek 24 %-ának betegsége már 12 héttel a leállítás után aktív volt, és a 36. hétig a betegek 90,5 %-ánál relapsus alakult ki (Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index /BASDAI/ > 4) (159). Egy másik vizsgálatban a szerzők azt találták, hogy sikeres etanercept kezelés felfüggesztése után 12 héten belül a betegek 75%-ánál relapsus alakul ki, és a 24. hétre pedig az összes vizsgált személy betegség-aktivitása visszatért (160).

A részben ellentmondó adatok motiváltak minket, hogy további adatokat gyűjtsünk a biológiai terápia leállítását követő természetes betegség-lefolyásról, részben a hazai helyzet felmérése, részben a nemzetközi adatok bővítése érdekében. Ennek megfelelően felmértük három magyarországi arthritis centrum adatait, feldolgozva a biológiai terápia tartós leállítását követően a kórlefordulás alakulását RA, AS és arthritis psoriatica (AP) esetében, hogy meghatározzuk a relapsusok gyakoriságát, a remisszió hosszát, illetve olyan tényezőket keressünk, amelyek összefüggést mutatnak a remisszió fennmaradásával, illetve a relapsus fellépésével.

2. Célkitűzések

2.1.1. Megvizsgálni, hogy különböző módszerrel előállított humán m3AChR-specifikus antigének használatával kimutathatók-e anti-m3AChR autoantitestek SS-s betegekben.

2.1.2. Amennyiben igen, meghatározni ezen autoantitestek előfordulási gyakoriságát, klinikai korrelációit SS-ben, valamint felmérni az anti-m3AChR antitest-meghatározás diagnosztikus értékét SS-ben

2.1.3. A feltételezett anti-m3AChR antitestek pathogenetikai szerepének megítélése céljából megvizsgálni kötődésüket a célszerv (nyálmirigy) antigénjeihez humán SS-s mintákon

2.1.4. Az SS-ben észlelhető exokrin insuficiencia okainak feltárása érdekében az anti-m3AChR antitestek, valamint a vegetatív idegrendszert potenciálisan befolyásoló pszichológiai tényezőknek a feltérképezése, és korreláció keresése ezen paraméterek és az exokrin insuficiencia között primer és szekunder SS-ben

2.2.1. Az aktivált T-lymphocyták exogén Gal-1-re adott apoptotikus válaszána és endogén Gal-1 termelésének összehasonlítása SLE-s és egészséges személyek között

2.2.2. A Gal-1 aktivált T-sejtekre kifejtett hatásai mechanizmusának felderítése: az endogén Gal-1 expresszió és az exogén Gal-1 által okozott apoptosis összefüggése, valamint a Gal-1 hatása az Lck enzim lokalizációjára

2.2.3. A sejtfelszíni glikozilációs mintázat, mint a Gal-1 (és számos más immunmoduláns lektin) kötődés egyik meghatározó tényezőjének analízise, és a proteoglikánok szénhidrát oldalláncainak szintézisét végző enzimek expressziójának vizsgálata SLE-s és egészséges kontroll személyek aktivált T-lymphocytáin

2.2.4. Az I. típusú interferonok indukciójában szerepet játszó TMEM203 expressziójának és a betegség aktivitásával való kapcsolatának felmérése SLE-ben

2.2.5. Az antifoszfolipid antitestek szerepének vizsgálata az SLE klinikai képének alakításában, a nem-thromboemboliás mechanizmusú szervi manifesztációk előfordulásával és a betegség-súlyossággal való összefüggés felderítése révén

2.3.1. A biológiai terápia leállítását követő betegség-lefolyás vizsgálata RA-ban és AS-ben, a biologikum-mentes remisszió prediktorainak keresése

3. Módszerek

3.1. Sicca tünetek pathogenesisise SS-ben– acetylcholin receptor elleni antitestek potenciális szerepe

3.1.1. Anti-humán m3AChR antitestek kimutatására szolgáló eljárás kidolgozása és klinikai jelentőségének felmérése primer SS-ben

Mivel felmerült bennünk, hogy SS-ben a sicca tünetek pathogenesisében az autonóm neurotransmisszió receptorális szintű gátlása is szerepet játszhat, célul tűztük ki, hogy m3AChR-rel reagáló autoantitestek kimutatására szolgáló vizsgálóeljárást fejlesszünk ki. Amennyiben anti-m3AChR antitesteket tudunk kimutatni, a továbbiakban ezek gyakoriságát és klinikai asszociációit is fel kívántuk mérni.

3.1.1.1. Betegek

Az első munkaszakaszban 40 primer SS beteg szérumát teszteltük (2002-es Amerikai-Európai Konszenzus Kritériumok (161); 38 nő, 2 férfi; átlagéletkor: 55 év /30-82/ - az átlagéletkor megadása után a dolgozatban végig dőlt zárójelben az életkori tartományt adom meg). A dolgozatban a Sjögren szindróma nómenklatúrát és az SS rövidítést használok végig a primer SS betegekre történő utalásként, követve azt a nemzetközi trendet, hogy a korábban elterjedt primer SS és sekunder SS megkülönböztetés helyett csak Sjögren szindrómáról beszélnek, mely, ha másik autoimmun betegséghez társul, overlap Sjögren szindrómaként kerül jelölésre. Csak azokban az esetekben, ahol mindenképpen fontos volt megkülönböztetni primer és szekunder SS-t, hangsúlyoztam ki ezt a tényt. Kontrollként 40 egészséges személy vérmintáit használtuk (átlagéletkor: 49 /23-62/ év).

Miután e betegpopuláción igazoltuk az anti-m3AChR-ek jelenlétét SS-ben (lásd alább), egy másik betegkohorszon arra a kérdésre kerestünk választ, hogy mennyire hasznos az anti-m3AChR meghatározása a primer SS differenciál-diagnózisában, valamint a primer SS-s betegek csoportján belül asszociációt mutat-e az antitest jelenléte valamely klinikai paraméterrel. Ebben a programban 73 primer SS (pSS) beteget vizsgáltunk (70 nő, átlagéletkor: 55 /30-82/ év, Amerikai-Európai Konszenzus Csoport 2002-es kritériumai (161). A klinikai jelentőség megítélése érdekében négyféle, a pSS-től eltérő betegcsoporttal és egy egészséges kontrollcsoporttal hasonlítottuk össze a pSS-s betegek eredményeit: 1: RA-s betegek (36 nő, átlagéletkor: 56 /27-80/ év, Amerikai Reumatológiai Kollégium 1987-es osztályozási kritériumai (166); 2. 19 SLE-s beteg (16 nő, átlagéletkor: 40 /26-73/ év, Amerikai Reumatológiai Kollégium 1997-es átdolgozott kritériumai (167), 3. 14 sekunder SS-s (sSS) beteg (mindegyikük nő, átlagéletkor: 53 /32-63/ év, Amerikai-Európai Konszenzus Csoport 2002-es kritériumai (161); és 4. 22 olyan beteg, akit SS gyanújával utaltak Klinikánkra, de akinél végül a kivizsgálás végén nem igazolódott SS (21 nő, átlagéletkor: 52 /21-78/ év – SS-suspect /SSsusp/csoport). Az egészséges kontrollokat 40 egészséges véradó alkotta (mindegyikük nő, átlagéletkor: 49 /23-62/ év). Az RA-s és SLE-s betegek között (1. és

2. csoport) nem lehettek olyanok, akiknél sSS felmerült (szubjektív száraz tünetek az osztályozási kritériumokban ismertetett kérdések (161) alapján, vagy csökkent könny vagy nyáltermelés /Schirmer teszt < 5 mm, stimulált nyáltermelés <2,7 ml/2 min). A 3. csoportban az SS-hez társuló betegség 7 esetben RA, 5 esetben SLE, 2 esetben pedig szisztémás sclerosis volt. A 4. csoportban a végső diagnózisok: hypothyreosis, fibromyalgia, depresszió, hepatitis C-asszociált száraz szindróma, gyógyszer-indukált száraz szindróma voltak.

3.1.1.2. *Antigén-készítés*

Először számítógépes program (Peptide Companion Version 1.231 - Coshisoft/PeptiSearch) segítségével immundomináns epitópokat prediktáltunk a humán m3AChR fehérjén (Swiss-Prot databank Acc. No P20309). A három talált epitóp közül a fehérje második extracelluláris hurkán elhelyezkedő KRTVPPGECFIQFLSE (KRSE, m3AChR₂₁₃₋₂₂₈) szekvenciát készítettük el kétféle módszerrel: Egyrészt szolid-fázis technikával (tBoc) (162) a peptidláncokat p-metilhidrilamin gyantán (0.48 mmol/g) elongáltuk ABI 430A automata segítségével, majd reverz-fázis HPLC technikával tisztítottuk és tömegspektrometriával ellenőriztük (49).

Másrészt az 1.3.1. pontban említett tapasztalataink alapján a kiválasztott epitópot rekombináns fúziós fehérje formában is elkészítettük. A GST-KRSE fehérje előállításának fő lépései a következők voltak: a KRSE peptid complement DNS-ének (cDNS) szintézise (163); GST (pGEX-6P-1, Pharmacia) C-terminális végéhez kapcsolása egy Gly-Ser spacer dipeptid közbeiktatásával; BamHI vektorral klónozás majd expresszió Escherichia coli-ban (164); tisztítás glutation-Sepharose affinitás kromatográfiával (Pharmacia). A GST-KRSE fúziós fehérjét nátrium-dodecil-szulfát – poliakrilamid gél-elektroforézissel (SDS-PAGE) jellemeztük. Az SDS gélben szétválasztott fehérjéket Coomassie blue festéssel vizualizáltuk. Az első munkafázisban mindkét antigént alkalmaztuk az ELISA mérések során, míg a második szakaszban már csak az első fázisban hasznosabbnak bizonyult GST-KRSE fúziós fehérjét.

3.1.1.3. *pSS-s betegek szérumából származó anti-KRSE monospecifikus ellenanyagok tisztítása*

pSS-s betegek szérumából anti-KRSE (m3AChR₂₁₃₋₂₂₈) specifikus ellenanyagot tisztítottunk a következő módon: a GST-KRSE fúziós fehérjét GST Orientation kit (Pierce) segítségével kovalensen glutathion szilárd mátrixhoz kapcsoltuk a gyártó által leírtak szerint. A betegek teljes szérumát 1 órán át inkubáltuk a mátrix-szal, majd a kötődött ellenanyagokat (anti-KRSE) glicin pufferrel (pH 2,8) eluáltuk, majd dializáltuk. Az eluátum fehérjetartalmát Bradford módszerrel mértük. A szérumokban levő anti-m3AChR ellenanyagokat és az affinitás kromatográfiával tisztított anti-m3AChR specifikus immunoglobulin frakció aktivitását Western blottinggal vizsgáltuk. A Western blottinghoz GST-KRSE fúziós fehérjét és kontrollként GST-t futtattunk SDS PAGE-n. A gélből a fehérjéket nitrocellulóz membránra (0,2 µm, Schleicher and Schuell) transzferáltuk. A nitrocellulóz membránt SuperBlock Blocking Bufferrel (Pierce); blokkoltuk. majd teljes szérummal, vagy tisztított ellenanyaggal, majd tormagyökér peroxidázzal (HRPO) jelzett kecske anti-humán IgG-vel (Sigma)

hibridizáltuk Végül a reakciót H_2O_2 (szubsztrát) és 3,3'-diaminobenzidin tetrahidrokloriddal (kromogén) hívtuk elő.

3.1.1.4 ELISA mérések

A kiválasztott m3AChR szakasz antigenitását ELISA vizsgálattal mértük fel. Ennek során szintetikus peptidet (KRSE - m3AChR₂₁₃₋₂₂₈, 8 µg/lyuk) (well) kötöttünk az ELISA tálcához (ThermoLabs), és 4°C-on egy éjszakán át inkubáltuk. Oldószerként foszfát-pufferolt sóoldatot (PBS) (pH 7,4) használtunk. Egy órán át szobahőn SuperBlock Blocking Buffer (Pierce) oldattal blokkoltuk, majd az SS-s betegek ill. kontrollok szérumát (blokkoló oldatban 1:50 arányban hígítva) 2 órán át 37 °C-on inkubáltuk. Mosás után HRPO-val jelzett kecske anti-humán IgG-t (1:10 000, Sigma) adtunk a reakcióhoz, és egy óra inkubáció után foszfát-citrát pufferben (pH 5,0) oldott H_2O_2 -dal és o-fenilén-diaminnal (OPD) vizualizáltuk (30 perc sötétben történő inkubálás). A reakciót 4N kénsavval állítottuk le, majd a színreakció erősségét 492 nm hullámhosszon mértük fotométerrel.

A rekombináns fúziós fehérjét hasonló lépések során teszteltük. Az eltérések a peptid ELISA-tól a következők voltak: a használt antigén mennyisége 0,9 µg/lyuk volt a GST-nél és 1 µg/lyuk a GST-KRSE fúziós fehérjénél, mivel a két komponens móltömege alapján ez biztosította az arányos GST-tartalmat. A fehérjét 0,1 M Na_2CO_3 pufferben (pH 9,6) oldottuk, mely 10 mM dithiol-treitol (DTT)-t is tartalmazott. A betegek és kontrollok szérumát pedig 1:100 arányban hígítottuk. Az egyes minták KRSE-specifikus optikai denzitás (OD) értékeit úgy kaptuk meg, hogy az adott egyén fúziós fehérje OD értékéből kivontuk a GST-vel szembeni reakció OD értékét.

3.1.1.5 Gátlási assay

Az antigén-antitest kötődés specificitását gátlási assay segítségével ellenőriztük. Öt beteg szérumát, mely minták magas pozitív reakciót adtak a KRSE-vel szemben, 1:50 arányban hígítottuk SuperBlock Blocking Buffer oldatban, majd 500 µg/ml koncentrációban KRSE szintetikus peptidet adtunk az oldathoz. Másik kísérletben a gátlás koncentráció-függését mértük fel, ennek során a fenti öt szérumból kettőt választottunk ki, és hígítási sort készítettünk 0-200 µg/ml KRSE peptid koncentrációkkal, a szérumot pedig 1:100 arányban hígítottuk a blokkoló oldatban. Irreleváns peptid kontrollként egy bullosus pemphigoid antigén peptidet használtunk (PGSTFERKTHVTRHAYEG - PGEG₁₂₉₋₁₄₆). A hígított szérumokat KRSE peptiddel előinkubáltuk (1 óra 37 °C-on, majd éjszakán át 4 °C-on), majd a peptid ELISA fent leírt lépéseit ismételtük meg. Ezen inhibíciós vizsgálatokat a GST-KRSE, GST és PGEG₁₂₉₋₁₄₆ kompetitor antigénnel is elvégeztük (1:200 szérumhígítás, 500 µg/ml GST vagy GST-KRSE). Az antitestkötés százalékos gátlását a következő képlettel számoltuk: $(1 - \text{OD}_{492}^{\text{szérum+inhibitor}} : \text{OD}_{492}^{\text{szérum}}) \times 100$.

3.1.1.6 Statisztikai módszerek

Jelen dolgozatban az értékeket mindenhol átlag ± standard deviáció (SD) (normál eloszlás) vagy medián [25-75 percentilis] (nem-normál eloszlás), vagy esetszám /tartomány/ formában tüntetem fel. Statisztikailag szignifikánsnak mindenhol a $p < 0,05$ értéket tekintettem, a további

határértékeket (pl. $p < 0,01$, stb.) mindenhol külön jelölöm. A továbbiakban az egyes kísérletek statisztikai módszereinél csak az adott mérésekre specifikus eljárásokat ismertettem.

Az SS-s és kontroll csoportot kétmintás t-próbával (folyamatos változók) vagy χ^2 próbával (kategorikus változók) hasonlítottuk össze. Az anti-KRSE ill. anti-GST-KRSE mérések kóros tartományainak határértékét (cut-off) a kontroll személyek OD értékeinek átlaga + 2 SD-ben határoztuk meg.

Az GST-KRSE antitestek mennyiségének összefüggését a különböző betegség-paraméterekkel Pearson korrelációs teszttel (folyamatos változók, pl. életkor, betegség-fennállás) vagy Spearman signed rank teszt (kategorikus változók, pl. immunszerológiai pozitivitás vagy szervi manifesztáció megléte) vizsgáltuk. Az extraglandularis manifesztációk számával fennálló korreláció vizsgálatát Jonckheere-Terpstra teszttel végeztük. A pSS-s és a többi csoport közötti összehasonlításokra variancia-analízist (ANOVA – post hoc tesztként: Dunnett-féle többszörös összehasonlító teszt) vagy χ^2 tesztet végeztünk. Az anti-m3AChR antitest pozitivitás differenciál-diagnosztikai értékének felmérésénél meghatároztuk a teszt szenzitivitását és specificitását a primer SS vs egyenként az egyes egyéb betegcsoportok összehasonlítására, valamint a pozitív és negatív valószínűségi arányt („likelihood ratio”), utóbbit a standard képletekkel: pozitív valószínűségi arány: szenzitivitás/1-specificitás, negatív valószínűségi arány: (1-szenzitivitás/specificitás).

3.1.2. Az anti-m3AChR antitestek nyálmirigybéli kötődésének vizsgálata

Miután igazoltuk a humán m3AChR-rel reagáló autoantitestek jelenlétét SS-ben, eredeti kérdésfelvetésünknek megfelelően arra kerestünk választ, hogy mennyiben játszhatnak ezek az antitestek szerepet az SS pathogenesisében. Állati szöveteket és humán nyálmirigy daganatos sejtvonalakat használva több kutatócsoport talált adatokat arra, hogy a SS-s betegek szérum immunglobulin frakciója gátló hatást fejt ki az m3AChR-mediált neurotranszmisszióra, azonban SS-s mintákon nem történtek vizsgálatok az anti-m3AChR antitestek reakcióiról. A kérdés megválaszolásához fontosnak tartottuk igazolni, hogy a vérben keringő autoantitestek egyáltalán kapcsolódnak-e a feltételezett célszerv, a nyálmirigyek m3AChR-jeihez.

3.1.2.1. Betegek

4 SS-s betegtől (3 nő, átlagéletkor: 54 /47-62/, mindegyik pSS, Amerikai-Európai Konszenzus Csoport 2002-es kritériumai), vettünk vérmintát. Hármuktól a rutin ajakbiopsziás mintából különítettünk el a diagnosztikához szükséges szövetmennyiségen kívül kutatásunk számára kisnyálmirigy-szövetet. Továbbá, normális kisnyálmirigy szövetmintát nyertünk egyébként egészséges, autoimmun betegségben nem szenvedő két személytől, akiknél egyéb okból (mucokela) került sor az ajkon szövet-eltávolítással járó műtetre. Negatív kontroll szérummintákat egészséges önkéntesektől kaptunk.

3.1.2.2. Fénymikroszkópos immunohisztokémia

Az ajakbiopsziás mintákat Zamboni-féle fixáló oldattal (4% paraformaldehid, 0.1% glutáraldehid és 0.19% pikrinsav PBS-ben) rögzítettük. 20 µm vékony sorozatmetszeteket készítettünk cryostat-tal.

1. Indirekt immunohisztokémia: Ennek során a két egészséges kontroll személy nyálmirigymintáinak metszeteit SS-s betegek szérumának 1:200 hígítású oldatával inkubáltuk 48 óráig, majd peroxidázzal jelzett anti-humán IgG (SigmaAldrich) 1:666 hígított oldatával jelöltük meg a kötődést. A reakciót 3,3-diaminobenzidin (DAB) és 0,003% H₂O₂ oldattal történő 15 perces inkubáció után vizualizáltuk.

2. Direkt immunohisztokémia: Három SS-s nyálmirigymintát közvetlenül reagáltattuk a jelzett másodlagos antitesttel, hogy megítéljük, milyen mintázatban találhatunk a nyálmirigybe már eleve (a betegben) bekötött IgG autoantitesteket. A lépések egyebekben megegyeztek az indirekt immunohisztokémiánál leírtakkal. Az egyes lépések között intenzív mosást végeztünk.

3.1.2.3. Elektronmikroszkópos immuncitokémia

A Zamboni fixáló oldatban levő ajakbiopsziás mintákat éjszakára, 4 °C-on, glutáraldehid-mentes fixáló oldatba tettük át, mely 10% szukrózt tartalmazott. Negyven µm vékony szeleteket vágunk Vibroslices eszközzel. Az egészséges nyálmirigy-mintákat SS-s szérumokkal (1:500 hígítás) inkubáltuk 24 vagy 48 órán át (indirekt immunhisztokémia), míg a SS-s szövetmintákat kezeletlenül hagytuk (direkt immunhisztokémia). A szövetmetszeteken az immunreakciót Avidin-biotin immunoperoxidáz kit (Vectastain ABC, Vector Laboratories) segítségével DAB-bal hívtuk elő. Végül a mintákat 1% ozmium-tetroxid-dal utófixáltuk 60 percig, dehidráltuk és Epon gyantába ágyasztuk. Ultravékony metszeteket készítve, uranil-acetáttal és ólom-citráttal festve, Jeol 100 elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

A SS-s szövetmintákat direkt immuncitokémiával vizsgáltuk, melynek során mindenben az előző bekezdésben írtak szerint jártunk el, kivéve, hogy elsődleges antiszérum adása nem szerepelt benne.

Annak érdekében, hogy igazoljuk a vizsgált szérumok m3AChR-specifikus kötődését az indirekt fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatokban, a következő kontroll eljárásokat alkalmaztuk:

1. A primer antiszérum kihagyása
2. Egészséges személyekből származó szérum alkalmazása elsődleges antiszérumként, mind a fénymikroszkópos immunhisztokémia (1:200 hígításban), mind az elektronmikroszkópos immuncitokémia (1:500) során (negatív kontroll).
3. A 3.1.1.3. pont szerint tisztított és jellemzett anti-m3AChR-monospecifikus ellenanyag 70 µg/ml koncentrációjú oldatát használtuk primer antiszérumként, 1:10, illetve 1:200 hígításban a fény-, illetve elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz. Az eluált oldat 70 µg/ml töménységben tartalmazott fehérjét, melynek specificitását a 3.1.1.4. pontban leírt ELISA módszerrel is igazoltuk.

4. Az anti-m3AChR monospecifikus ellenanyag előinkubálása a KRSE peptiddel elektronmikroszkópos vizsgálatnál (inhibíciós vizsgálat). Ennek során a tisztított monospecifikus antitestet 1 mg/ml szintetikus KRSE peptiddel inkubáltuk 1 óra hosszat 37 °C-on, majd 4 °C-on éjszakán át. A következő lépések megegyeztek az alapkísérleteknél írtakkal. Mértük, hogy az antigén-kötőhelyek KRSE peptiddel történő előzetes telítése specifikusan meggátolja-e a szérum kötődését.

5. Szintén csak az elektronmikroszkópos vizsgálatoknál, primer antiszérumként polyclonalis anti-vasoactive intestinal polypeptide (VIP) szérumot is használtunk (1:1000 hígítás; Peninsula Lab) elsődleges antitestként. Ennek alapja az volt, hogy a VIP szintén a cholinerg idegvégékészülékekben raktározódik, acetylcholinnal ko-lokalizációban (168), így jelenléte specifikusan rámutat a cholinerg idegvégződésekre

3.1.3. Anti-m3AChR antitestek, valamint pszicho-szociális tényezők szerepe a sicca tünetek pathogenesisében primer és secunder SS-ben

Végül a sicca tünetek kialakulását kissé tágabb perspektívából igyekeztünk megközelíteni, részben változatlanul az anti-m3AChR antitestek oldaláról, részben a szem- és szájszárazság háttérében gyakran felmerülő krónikus stressz és egyéb pszicho-szociális tényezők felől. E vizsgálatokat primer SS-s betegek kivül egyéb autoimmun betegségekhez társuló secunder SS-s betegek is elvégeztük. Célunk az volt, hogy megvizsgáljuk, egy jó definiált krónikus sicca tünetcsoportot mutató autoimmun betegcsoport körében milyen mértékben járul hozzá a fenti két tényező a klinikai kép alakításához. Emellett az időközben megjelent eredmények alapján igyekeztünk fejleszteni az anti-m3AChR ELISA eljárásunk pontosságát is, részben újonnan prediktált további antigenikus epitópok, részben további antigén-prezentációs technikák tesztelése révén.

3.1.3.1. Betegek

65 RA-s, 103 SLE-s, 76 pSS-s beteget vontunk be a vizsgálatba, és kontrollként 50 egészséges személy vérmintáit használtuk. Mindhárom betegcsoport tagjai megfeleltek a korábban említett három osztályozási kritériumrendszer feltételeinek. A betegcsoportok demográfiai adatai a következők voltak (nő/férfi arány, átlagéletkor /életkori tartomány/): RA: 54/11, 58 /22-82/ év; SLE: 94/9, 48 /25-74/; pSS: 74/2, 56 /30-76/.

Mindegyik RA-s és SLE-s beteget szisztematikusan felmértünk sicca szindróma irányában, ami az Amerikai-Európai Konszenzus Kritériumok 1-4. pontja szerint történt: szubjektív sicca tünetcsoport fennállását állapítottuk meg, ha az első két kérdéscsoport 3-3 kérdéséből legalább egyre pozitív választ adott a beteg, míg objektív mirigyműködési zavart akkor tekintettük igazoltnak, ha a Schirmer teszt vagy a nem-stimulált nyáltermelés-mérés a kritériumokban rögzített tartományban volt. Ha legalább két alkalommal mind a szem, mind a száj vonatkozásában a szubjektív sicca tünetcsoport igazolódott, és ehhez legalább az egyik szerv vonatkozásában objektíven igazolható mirigyműködési zavar is társult, a beteget sicca szindrómásként kategorizáltuk. Ugyan törekedtünk arra, hogy a Kritériumok szerinti secunder

SS-t is igazoljuk, de mivel ehhez sok esetben ajakbiopsziás minta pozitivitása is szükséges lett volna, és e beavatkozást csupán a jelen kutatás céljaira nem tartottuk etikailag elfogadhatónak, így a vizsgálataink során secunder SS helyett a sicca szindróma definíciójának teljesüléséhez ragaszkodtunk.

A betegek fő klinikai és immunszerológiai adatainak rögzítésén túl feljegyeztük a betegek kezelésében szereplő immunszuppresszív szereket (corticosteroid, methotrexát, leflunomid, azathioprin, chloroquin, mycophenolát mofetil, cyclosporin A, cyclophosphamid, sulfasalazin, anti-TNF, rituximab), valamint mindazon szereket, melyek anticholinerg vagy más mechanizmussal sicca tüneteket okozhatnak – antidepresszánsok, antipsychoticumok, antiepilepticumok, antihistaminok, stb. Egyik típusú gyógyszer szedése sem mutatott statisztikailag szignifikáns korrelációt a sicca tünetekkel a beteganyagunkban.

3.1.3.2. Antigén-előállítás

Mivel ezt a vizsgálatsorozatot több évvel a kezdeti munkánk után végeztük, az antigének kiválasztását és elkészítését, bár az alapkoncepció megegyezett a korábbiakkal, részben eltérő metodikával végeztük. Ezért jelen dolgozatban részletesen bemutatom ezen eltéréseket, míg a megegyező lépéseknél csak utalok a 3.1.1 alfejezetben leírtakra.

A betegek vérében humán m3AChR-hez kötődő ellananyagokat kerestünk, ezért először ismét antigén-predikciót végeztünk, és jelen kísérleteinkhez a fehérje három immundomináns epitópját választottuk ki a “Peptide Companion” Version 1.231 (Coshisoft/PeptiSearch) segítségével. A 185-228 aminosav-szekvenciát (AGSE) a második extracelluláris hurokról, amely a ligandkötőhelyet is magában foglalja (ez teljesen átfed a korábban használt KRSE peptiddel [m3AChR₂₁₃₋₂₂₈]), valamint az 506-521 (YNIP) peptidet a harmadik extracelluláris hurokról és a 360-377 (TRIC) peptidet a harmadik intracelluláris hurokról (<https://www.uniprot.org/uniprot/P20309>). Utóbbit azért választottuk, mert ugyan intracellulárisan helyezkedik el, de a prediktáló program – csupán a fehérje kémiai tulajdonságai alapján – nagy valószínűséggel jelölte epitópnak. A szolid fázisú peptidszintézis lépései megegyeztek a 3.1.1.2. alfejezetben leírtakkal.

Korábbi tapasztalatunk alapján, mely szerint a peptid antigéneknél jobb eredményeket adnak ELISA mérések során a makromolekulákhoz konjugált epitópok, GST-fúziós peptid formában is elkészítettük az AGSE és az YNIP epitópot. A rekombináns peptid szintézisét és tisztítását a 3.1.1.2. alfejezetben ismertetett módon végeztük a jelen kísérleteink során is. Végül az AGSE peptidet, mely elhelyezkedése és az antigenitás-predikció alapján a legvalószínűbb autoantigén-jelölt volt, bovin szérum albuminnal (BSA) konjugált formában is elkészítettük, melynek során egy BSA molekulához 15-20 AGSE peptidet illesztettünk.

3.1.3.3. ELISA mérések

Az ELISA tálcák lyukaiba a fenti antigének oldatait pipettáztuk (1 µg/ml AGSE, 2 µg/ml YNIP és TRIC szintetikus peptidet, valamint 10 µg/ml GST-fúziós peptidet és BSA-konjugált antigént). Az ELISA mérések egyebekben a 3.1.1.4. pontban leírtak szerint történtek azzal a kivétellel, hogy a betegek és kontrollok szérumát 1:200 arányban PBS-TWEEN-ben

hígítottuk, a peroxidázzal jelölt anti-humán IgG-t pedig 1:2500 arányban, szintén PBS-TWEEN-ben. A konjugált formáknál az antigénikus epitópra specifikus OD értéket úgy kaptuk, hogy a tálcán minden szérummintát GST-vel vagy BSA-val is reagáltattunk, majd ezek OD értékét kivontuk a konjugált formákéból.

3.1.3.4. A pszichés státuszra vonatkozó állapotfelmérés

Annak megítélésére, hogy az immunológiai tényezőkön kívül milyen mértékben járulhatnak hozzá pszichés faktorok a száraz tünetek kialakulásához, minden betegnél elvégeztük az SF-36 (36-item short form health survey) és a FACIT (Functional Assessment of Chronic Illness Therapy) validált kérdőívek kitöltését (169, 170). Az SF-36 kérdőív a mentális és a testi jólét számos indikátorát vizsgálja, melynek segítségével a társadalmi funkciók, viselkedés, közérzet, életkedv, stressz és vitalitás számos paramétere rögzíthető. A FACIT fáradtság skála egy rövidebb, 13 kérdésből álló eszköz, mely az elmúlt hét során a különböző napi tevékenységek során megnyilvánuló fáradtság mértékét számszerűsíti.

3.1.3.5. Statisztikai módszerek

A három betegcsoport közötti átlagos OD értékek közötti különbség statisztikai szignifikanciáját variancia-analízissel vizsgáltuk, az egyes csoportokat Bonferroni-féle korrekcióval analizáltuk. Az autoantitest-pozitivitást mutató betegek arányait χ^2 teszttel hasonlítottuk össze a kontrollok és az egyes betegcsoportok között. A száraz tünetekkel jelentkező vagy azt nem mutató RA-s és SLE-s betegek között – attól függően, hogy folyamatos vagy kategorikus változóról volt-e szó – t-próbával vagy Fisher exact teszttel hasonlítottuk össze a demográfiai, klinikai és immunszerológiai paramétereket, valamint az anti-m3AChR antitest-titerek és az SF-36 és FACIT skála eredményeit.

3.2. A klinikai képet alakító pathogenetikai eltérések vizsgálata SLE-ben

Ebben a fejezetben azon kísérleteinket gyűjtöttem össze, melyek az SLE pathogenesisének és a klinikai tünetek kialakulásának biológiai alapjait kutatták. A nagyrészt transzlációs jellegű kutatások SLE-s betegek aktivált T-sejtjeinek különböző paramétereit vizsgálták, a klinikai képpel összevetve. Ehhez kapcsolódva a vizsgált folyamatok élettani alapjainak humán és állatkísérletes minták segítségével végzett modellezését, másrészt – klinikai felmérés keretében – a már gyakorlatban használt immundetektálási metodikák (antifoszfolipid antitestek) klinikai asszociációinak vizsgálatát is elvégeztük.

3.2.1. A galektin-1 szerepe az SLE-ben észlelhető T-sejt dysfunctio kialakításában

A Gal-1 számos olyan sejtfolyamatot befolyásol, aminek SLE-ben is fontos szerepet tulajdonítanak, mint pl. T-sejt differenciáció vagy apoptózis-reguláció, és több autoimmun betegség állatmodelljében felmerült már szerepe, de SLE-ben még nem vizsgálták. Ezért célul tűztük ki expressziójának és sejtszintű hatásainak vizsgálatát SLE-s betegek aktivált T-

lymphocytáin, valamint egérből, Jurkat T-sejtvonalból és egészséges személyekből származó sejtek felhasználásával.

3.2.1.1. Betegek

Felnőtt, aktív SLE-s betegeket vizsgáltunk. Feltétel volt, hogy megfeleljenek az Amerikai Reumatológiai Kollégium 1997-ben módosított kritérium-rendszerének (167). Az aktivitás feltétele az volt, hogy az SLE Disease Activity Index-2000 (SLEDAI-2K) index legalább 6 legyen. A betegek lehettek frissen diagnosztizált esetek, vagy már diagnosztizált betegek, akiknél relapszus lépett fel. A méréseket megismételtük inaktív betegség-stádiumban (SLEDAI-2K<6), miután immunosuppresszív kezeléssel a betegség nyugalomba került. Fertőzés, tumor vagy társuló egyéb szisztémás autoimmun betegség kizárási ok volt. A második vérvétel idején feltétel volt, hogy 20 mg-nál kisebb adag prednisonnak megfelelő corticosteroid kezelést kapjanak, és az egyéb fenntartó immunosuppresszív kezelés adagja is stabil legyen a megelőző két hónap során. Korban és nemben illesztett egészséges személyeket használtunk kontrollként.

3.2.1.2. Perifériás vér mononuclearis sejtek (PBMC) szeparálása és aktiválása

Ficoll (GE Healthcare) grádiens centrifugálással izoláltunk perifériás mononuclearis sejteket (PBMC) a vizsgálati alanyok véréből. Egyes méréseket nyugalmi állapotban is elvégeztünk, míg a sejtek másik részét 5 µg/ml phytohaemagglutinin-M-mel (PHA-M) vagy 1 µg/ml PHA-L-lel stimuláltuk (SigmaAldrich) 72 órán át, 37°C-on 100 IU penicillinnel, 100 µg/ml streptomycinnel, 2mM L-glutaminnal és 10% foetalis borjúsérummal (FCS) kiegészített RPMI-1640 médiumban (Gibco).

3.2.1.3. Apoptosis teszt

Mint említettem, a Gal-1 aktivált T-sejtekre kifejtett apoptotikus hatását nem szolubilis formában, hanem az indukáló (effektor) sejtek felszínén expresszáldva, sejt-sejt kontaktus révén fejt ki, így vizsgálatára kokultúras kísérleteket végeztünk. A Gal-1 indukált apoptózishoz effektor sejtneként HeLa humán cervix adenocarcinoma sejteket alkalmaztunk, melyeket Gal-1 complementer DNS-sel transzfektáltunk a korábban leírtak szerint (HeLa^{Gal}) (71). Kontrollként mock transzfektált (HeLa^{mock}) sejtvonalat használtunk. A HeLa humán cervix adenocarcinoma sejtvonalat 37°C hőmérsékleten 5% CO₂ mellett tenyésztettük MEM (Gibco, Invitrogen) médiumban 100 IU/ml penicillinnel 100 µg/ml streptomycinnel, 2 mM L-glutaminnal és 10% FCS-sel kiegészítve. Az effektor (HeLa) sejteket 5×10³ sejt/minta mennyiségben 12 mm átmérőjű üveg fedőlemezre ültettük ki 24-lukú lemezben. A célsejteket (PHA-aktivált T-sejtek 2×10⁵ sejt/minta) Hoechst 33342 (100 ng/ml, 30 min, 37 °C) festékkel jelöltük, és 400 µL médiumban a kitapadt HeLa sejtekhez adtuk és 16 óráig tartottuk őket kokultúrában. Utána a sejteket 4% paraformaldehiddel fixáltuk szobahőn 4 percre, majd 1:20 hígításban AlexaFluor488 fluoreszcens festékkel konjugált Annexin V (Invitrogen) fehérjével jelöltük 30 percre szobahőmérsékleten sötétben a gyártó által meghatározott kalciumos kötő pufferben, majd a kokultúras körlemezeket Fluoromount-G (Southern Biotech) segítségével tárgylemezre rögzítettük. A mintákat Axioskop 2Mot fluoreszcens mikroszkóp (Carl Zeiss) alatt (20x nagyítású objektív) AxioCam kamerával

fényképeken rögzítettük, és AxioVision 3.1 szoftverrel analizáltuk. A kontrasztot a könnyebb analizálhatóság érdekében Adobe Photoshop CS4 Extended programmal fokoztuk. Az apoptotikus sejtek arányát (relatív apoptosis arány – RAR) mintánként legalább 100 sejt leszámlálásával határoztuk meg, a következő képlet segítségével: % Annexin V-pozitív sejtarány a HeLa^{Gal-1} kokultúrában/Annexin V-pozitív sejtarány a HeLa^{mock} kokultúrában (171).

3.2.1.4. Kvantitatív valós idejű reverz-transzkriptáz polimeráz láncreakció (RT-qPCR)

A MIQE irányelveit követve (172) végeztük el az RT-qPCR vizsgálatokat. A PBMC-t ($1-3 \times 10^6$ sejt) $1 \mu\text{g/ml}$ PHA-L-lel aktiváltuk 72 órán át, majd mosás (kétszer PBS-sel) után az össz-RNS-t Nucleospin RNA II izoláló kit használatával (Macherey-Nagel) vontuk ki a gyártó előírásainak megfelelően. Complementer DNS (cDNS) reverz transzkripciójához reakciónként $2 \mu\text{g}$ RNS-ből indultunk ki, és 50 pmol oligo(dT₁₈) és random hexamer primert, 0.5 mM dNTP-t, 20 U RiboLock RNase Inhibitor és 200 U RevertAid H Minus Reverse Transcriptase-t (Thermo Fisher Scientific) használtunk. A reakciót 60 percig 42°C -on végeztük, amit 10 perces 70°C -os hőinaktiválás követett. Az RT-qPCR-t AccuPower 2X Greenstar qPCR Master Mix (Bioneer) felhasználásával $0.5 \mu\text{M}$ adott primer koncentráció mellett a RotoGene3000 készülékben (Corbett Life Science, Qiagen) végeztük a következő programbeállítással: 10 perc 95°C -os aktiválás után 95°C -on 15 mp majd 60°C -on 45 mp inkubáció ciklikus ismétlődése az amplifikáláshoz. A relatív génexpresszió meghatározáshoz endogén RPL27 expresszióját használtuk, és küszöbérték (threshold cycle, Ct) használatával a relatív mRNS mennyiségeket (R) a következő képlet segítségével számoltuk ki: $R = 2^{\text{Ct(RPL27)} - \text{Ct(Lgals-1)}}$. A felhasznált primer szekvenciákat az 1. Táblázat mutatja.

	RPL27	LGALS1
forward	5'-CGCAAAGCTGTCATCGTG-3	5'-GTCACCTTTGCGGGGGTAG-3'
reverse	5'-CGCCAGCAACCTGAATCT-3'	5'-CAGGTTCAGCACGAAGCTCT-3'.

1. Táblázat. A Galectin-1 gén (LGALS) valamint a kontrollként használt RPL27 expressziójának méréséhez használt primerek szekvenciái

3.2.1.5. Jurkat sejtek

Jurkat sejteket (human T-lymphocytás leukaemia eredetű T-sejtvonal) a Gal-1 cDNS-t hordozó retrovirális pLXSN vektorral transzfektáltuk, e sejtvonalat a továbbiakban J^{Gal}-ként jelöljük. Kontrollként üres vektorral transzfektált Jurkat sejteket használtunk, melynek jele J^{mock}. A Gal-1 expresszióját Western blotting módszerrel ellenőriztük a J^{Gal} és J^{mock} sejtekben. A Jurkat sejteket 37°C hőmérsékleten 5% CO₂ mellett tartottuk 100 IU/ml penicillint, 100 ug/ml streptomycint, 2 mM L-glutamint és 5% FCS-t (Gibco, Invitrogen) tartalmazó RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen) médiumban.

3.2.1.6. Egér T-sejtek

A Gal-1-indukált apoptózis mechanizmusainak jobb megértése érdekében végzett kísérleteinkhez egér eredetű T-sejteket használtunk fel, melyeket C57BL/6 egér vad típusú és Gal-1 génkiütött törzseinek (B6.Cg-Lgals1tm1Rob/J, 006337, Jackson Laboratory) nyirokcsomóiból szeparáltunk. A nyirokcsomókat RPMI tápoldatban szétnyomkodtuk, majd az így nyert homogén sejt-szuszpenziót kétszer mostuk PBS-sel és centrifugálással üleptítettük. Ezt követően a sejteket 10% FCS-t és 50 μ M β -mercaptoethanol tartalmazó RPMI médiumban vettük fel, és 7,5 μ g/ml Concanavalin A-val (Sigma-Aldrich) aktiváltuk őket 72 órán keresztül.

3.2.1.7. Western blot analízis

A sejteket lízis pufferben (10 mM Tris pH 7.5, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF) lizáltuk (2×10^7 sejt/mL puffer). A lizátumot 12%-os SDS-poliakrilamid gélen Page Ruler™ előre festett fehérje molekulásúly marker mellett (Fermentas) futtattuk, majd az elválasztott fehérjéket elektromos árammal (20V feszültséggel, 16 órán át és 4°C-on) nitrocellulóz membránra (Whatman® Protran®) transzferáltuk. A membránt 1 órán keresztül 3% zselatint (Sigma-Aldrich) és 0,05% Tween® 20-at tartalmazó (Sigma-Aldrich) Tris pufferelt sóoldatban (TBST) szobahőn telítettük. A membrán szabad kötőhelyeinek telítése után 4°C-on 1-1 órán keresztül a laborunkban előállított 2500 $\times$ hígított nyúl anti-Gal-1 ellenanyaggal (71), majd 3 $\times$ TBST mosás után 3000 $\times$ hígított HRP-konjugált anti-nyúl immunoglobulinnal (Dako) inkubáltuk a membránt. Felviteli kontrollként 10000 $\times$ hígított nyúl anti- β -aktin ellenanyagot használtunk (Abcam). Az immunreaktív fehérjéket kemilumineszcens Amersham™ ECL Prime reagenssel (GE Healthcare Life Sciences) hívtuk elő, és CCD Chemi 410 kamerával felszerelt EC3 Imaging System munkaállomás segítségével készítettünk róla felvételt (Ultra-Violet Products). A felvételen a sávok denzitását VisionWorks® LS Image Acquisition and Analysis szoftverrel (Ultra-Violet Products) analizáltuk.

3.2.1.8. A Gal-1 kimutatása Jurkat sejtekben indirekt immunfluoreszcens és áramlási citofluorimetria módszerrel

A Jurkat sejteket 1% FCS-t és 0,1% NaN_3 -t tartalmazó hideg PBS-ben (áramlási citofluorimetria /FACS/-puffer) szuszpendáltuk. A Gal-1 kimutatására laboratóriumunkban kifejlesztett egér anti-humán Gal-1 monoklonális antitestet (2C1/6) (71) alkalmaztunk. A szekretált (sejtfelszíni) Gal-1 kimutatásához nem-permeabilizált sejteket használtunk. Az intracelluláris Gal-1 kimutatása érdekében a sejtmembránt az antitest hozzáadása előtt 0,1% Triton-X 100-at tartalmazó FACS-puffer hozzáadásával permeabilizáltuk és 4% paraformaldehiddel fixáltuk. Mindkét esetben az elsődleges antitesttel 45 percig jégen inkubáltuk a sejteket, majd kétszeri mosást követően a mintákat másodlagos antitesttel (NorthernLights557 - R&D Systems - festékkel jelzett számár anti-egér IgG antitest) jelöltük. A mintákat ezután mikroszkópos tárgylemezre vittük fel Fluoromount-G (Southern Biotech) és egy üveg kör alakú fedőlemez segítségével, és konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal (Olympus FV 1000) vizsgáltuk. Az áramlási citofluorimetria mérésekhez a permeabilizálatlan és permeabilizált J^{Gal} sejteket egér monoklonális biotinilált anti-humán Gal-1 ellenanyaggal

(2C1/6) és kecske anti-egér Atto488-al (Sigma-Aldrich) konjugált IgG-vel jelöltük és FACSCalibur áramlási citométerrel mértük fluoreszcenciájukat, CellQuest (BectonDickinson) szoftver segítségével.

3.2.1.9. Az exogén Gal-1 hatása az Lck enzim lokalizációjára: immuncitokémia vizsgálatok

A PBMC-ből izolált humán T-sejteket és a Jurkat T-sejteket különböző ideig (15 perctől 3 óráig) tenyésztettük együtt a HeLa effektor tumorsejtekkel, majd a ko-kultúrát 4% paraformaldehiddel fixáltuk 4 percig szobahőn, ezután PBS-sel mostuk, és a fedőlemezeket FACS pufferrel telítettük 1 órán át. A fluoreszcein-izotiocianát (FITC)-konjugált egér anti-Lck monoklonális antitestet (melyet saját laboratóriumunkban állítottunk elő /173/) 75 µg/ml L-(α)-lysophosphatidylcholin (SigmaAldrich) permeabilizálót tartalmazó FACS pufferben oldva adtuk hozzá a sejtekhez. Egy órás, jégen történő inkubálást követően anti-egér IgG-NorthernLights-557 (R&D Systems) festékkel jelzett másodlagos antitesttel jelöltük a mintát. A sejt-sejt kontaktust Rhodamin-Phalloiddinnel (Invitrogen) konjugált F-aktinnal tettük láthatóvá. A Fluoromount-G-vel tárgylemezre rögzített mintákat végül a 3.2.1.8. alfejezetben jelölt módon vizsgáltuk fluoreszcens mikroszkóppal 40x nagyítású objektívvel, vagy lézer pásztázó konfokális mikroszkóppal (Olympus FV 1000), 60x nagyítású objektívvel és zoom funkcióval. Az értékeléshez szükséges fotókat a minták 10, random módon kiválasztott, egymással nem átfedő régiójáról készítettük, és meghatároztuk az Lck lokalizációját aszerint, hogy a sejt-sejt kontaktus helyszínén (F-aktinnal átfedésben) vagy a sejt ellenkező oldalán (szekvesztrálódva) helyezkedik-e el. Ezt a következő egyenlet alkalmazásával számszerűsítettük: szekvesztrálódott Lck-t tartalmazó sejtek százalékos aránya = $\frac{\text{szekvesztrálódott Lck-t mutató T-sejtek száma}}{\text{a kiválasztott látóterekben / az összes, tumorsejttel kontaktusban levő T-sejtek száma ugyanezen területen}} \times 100$. A Gal-1 hatását úgy vizsgáltuk, hogy a HeLa^{Gal-1} tumorsejttel kapott százalékos értékből kivontuk a HeLa^{mock} ko-kultúrában kapott százalékos értékeket.

3.2.1.10. Statisztikai módszerek

A vizsgált összes paraméter normál eloszlásúnak bizonyult. A betegcsoportok (aktív és inaktív SLE) és a kontrollcsoport RAR és mRNS expresszió értékeit varianciaanalízissel hasonlítottuk össze, az egyes csoportok közötti különbségeket pedig Bonferroni post hoc analízissel. Az említett laboratóriumi kísérleti eredmények és a betegek klinikai adatai, valamint betegség-aktivitási paraméterei közötti korrelációt Pearson-féle korrelációs teszttel, illetve, többszörös összehasonlítások esetén, lineáris regresszióval vizsgáltuk.

3.2.2. Sejtfelszíni glikozilációs mintázat és a lektinkötődés következményes eltérései T-sejteken SLE-ben

A Gal-1 hatásainak vizsgálatánál figyelembe kell venni ligandjainak, a T-sejtek felszínén elhelyezkedő glikoproteinek szénhidrát oldalláncainak összetételét is. A sejtfelszíni glikozilációs mintázatnak jelentős diagnosztikai és prognosztikai szerepe van tumorsejtek esetében, de immunsejteken nagyon kevés ilyen vizsgálat történt, SLE-ben pedig egyáltalán

nincsenek adatok. Ezért célul tűztük ki a sejtfelszíni glikozilációs mintázat, és ezen belül a Gal-1 kötésének vizsgálatát SLE-s aktivált T-sejteken.

3.2.2.1. Betegek

A sejtfelszíni glikozilációs vizsgálatokhoz egyszer történt vérvétel. A beválogatási kritériumok megegyeztek az előző alfejezetben említett, aktív betegség idején alkalmazott kritériumokkal. A bevont betegek számát, demográfiai és betegség-aktivitási adatait a 2. Táblázat mutatja be. Megjegyzem, hogy nem minden beteg mintáit használtuk fel minden egyes kísérletnél, így az aktuális esetszámot minden kísérlet kapcsán az eredmények fejezetben külön feltüntetjük. Az egészséges kontrollokban semmilyen gyulladásos tünet vagy laboratóriumi eltérés nem volt.

Csoport és esetszám	Életkor	Nő/férfi	Betegség-aktivitási paraméter
SLE (n=18) SLEDAI-2K anti-dsDNS (IU/mL)	42 /23-54/	17/1	14 /6-30/ 88 /2-220/
Kontroll (n=19)	54 /31-75/	17/2	

2. Táblázat. A sejtfelszíni glikozilációs vizsgálatokban részt vevő betegek és kontrollok demográfiai adatai és betegség-aktivitási jellemzői

A számok átlagértékeket jelölnek, zárójelben a minimum és maximum található. SLEDAI-2K: SLE Disease Activity-Index-2000, anti-dsDNS: kettős szálú DNS elleni antitest

3.2.2.2. Lektinkötési assay

A nyugvó vagy aktivált T-sejteket 30 percen át 4°C-on eFluor 660 fixálható viabilitási festékkel festettük (eBioscience), majd 4% paraformaldahiddal fixáltuk szobahőmérsékleten 4 percen keresztül. Ezt követően fluoreszcenciával jelölt növényi eredetű lektinokkal (Vector Laboratories) inkubáltuk a sejteket 4°C-on 20 percig. A 3. Táblázat mutatja be az egyes lektinokat és azok szénhidrát-specifitását, amit korábban már az 1. Ábrán is bemutattunk. A Gal-1 kötés vizsgálatához a sejtek felszínére jelöletlen Gal-1-et (5 µg/mL) kötöttünk 4°C-on 20 percig, a kötődést biotinilált egér anti-Gal-1 monoklonális antitesttel (2C1/6) (71) történő reakcióval mutattuk ki. Ennek során az antitesttel 4°C-on 45 percen át inkubáltuk a mintákat, majd FITC-jelölt Streptavidint adtunk a sejtekhez, szintén 4°C-on 20 percig inkubálva. A jelölt sejteket FACSCalibur (BD Biosciences) áramlási citométerrel analizáltuk. A teljes PBMC-én és az aktivált T-sejteken belül a CD3⁺ sejteket vizsgáltuk, melyeket anti-CD3 ellenanyaggal jelöltünk ki (PE/Cy5-konjugált anti-humán CD3 antitest – BioLegend).

Lektinek	Rövidítés	Specifititás	Hivat- kozás
Concanavalin A	ConA	Mannóz, glükóz (alacsony affinitás)	(127)
<i>Lens culinaris</i> Agglutinin	LCA	core-fukozilált bi-antennáris N-glikán	(174)
Wheat Germ Agglutinin	WGA	GlcNAc, szíalsav	(175)
<i>Phaseolus vulgaris</i> Leucoagglutinin	PHA-L	β -1,6-elágazó tri- és tetra-antennáris N-glikánok	(176)
<i>Sambucus nigra</i> Agglutinin	SNA	α -2,6-kapcsolt szíalsav	(177)
Galektin-1	Gal-1	LAcNAc	(51, 178)
Enzim-családok	Gének rövidítése	Teljes gén-név	
Mannozidáz	<i>MAN1A1</i>	Mannozidáz Alfa 1A Osztály 1. tag	
	<i>MAN1A2</i>	Mannozidáz Alfa 1A Osztály 2. tag	
	<i>MAN2A1</i>	Mannozidáz Alfa 2A Osztály 1. tag	
	<i>MAN2A2</i>	Mannozidáz Alfa 2A Osztály 2. tag	
Acetylglükózaminil-transzferáz	<i>MGAT1</i>	Mannozil (Alfa-1,3-)-Glikoprotein Béta-1,2- N-Acetylglükózaminil-transzferáz	
	<i>MGAT4A</i>	Mannozil (Alfa-1,3-)-Glikoprotein Béta-1,4- N-Acetylglükózaminil-transzferáz Isozyme A	
	<i>MGAT4B</i>	Mannozil (Alfa-1,3-)-Glikoprotein Béta-1,4- N-Acetylglükózaminil-transzferáz Isozyme B	
	<i>MGAT5</i>	Mannozil (Alfa-1,6-)-Glikoprotein Béta-1,6- N-Acetyl-Glükózaminyl-transzferáz	
Szialil-transzferáz	<i>ST3GAL3</i>	ST3 Béta-Galaktozid	Alfa-2,3-Szialil- transzferáz 3
	<i>ST3GAL4</i>	ST3 Béta-Galaktozid	Alfa-2,3-Szialil- transzferáz 4
	<i>ST3GAL6</i>	ST3 Béta-Galaktozid	Alfa-2,3-Szialil- transzferáz 6
	<i>ST6GAL1</i>	ST6 Béta-Galaktóزامid	Alfa-2,6-Szialil- transzferáz 1
Neuraminidáz	<i>NEU1</i>	Neuraminidáz 1	

3. Táblázat. A részleteket lásd a következő oldalon

3. Táblázat. A lektinkötési assay során használt lektinek, rövidítésük és szénhidrátkötési specificitásuk (felső panel), valamint az összetett szénhidrát-struktúrák kialakításában részt vevő glikozilációs enzimek és azok génjeinek rövidítése (alsó panel)

GlcNAC: N-acetyl-glükózamin, LAcNAc: N-acetyl-laktózamin

3.2.2.3. Neuraminidáz kezelés

Annak eldöntésére, hogy a Gal-1 sejtfelszíni kötődését befolyásolja-e a sejtek szíálsav-tartalma (szializáltsága), a szíálsavat lehasító neuraminidázzal kezeltük az aktivált T-sejteket, majd megismételtük az előző pontban említett Gal-1 kötődési méréseket. A neuraminidáz kezelést 2×10^6 aktivált T-sejtet tartalmazó mintákon végeztük, melyeket $\alpha 2$ -3,6,8 neuraminidázzal ($\alpha 2$ -3,6,8 Neu) (New England BioLabs) inkubáltunk 15 percen át 37°C-on.

3.2.2.4. Kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (RT-q-PCR)

A gének nevei a 3. Táblázatban szerepelnek. A vizsgálat fő lépései hasonlóak a 3-2. alfejezetben írtakhoz, az eltérések a következők: az aktivált T-sejtekből PerfectPure RNA Cultured Cell kit (5 PRIME) segítségével izoláltuk a teljes RNS-t. A komplementer DNS szintéziséhez 1.66 μ M oligo(dT18)-t és 10 U RiboLock RNase Inhibitor-t használtunk. Az RPL27-re normalizált log2-transzformált relatív mRNS expressziós értékeket a $\Delta Ct = Ct_{RPL27} - Ct_{GOI}$ képlet alkalmazásával kaptuk meg. Az mRNS expressziós arányt a $\Delta Ct_{\text{X gén}} - \Delta Ct_{\text{y gén}}$ képlet segítségével számoltuk ki. A primer szekvenciákat vagy korábbi publikációkból (179-182) vettük át, vagy a Universal Probe Library Assay Design program (Roche) segítségével terveztük meg (4. Táblázat).

RPL27:	5'-CGCAAAGCTGTCATCGTG-3' 5'-GTCACCTTTGCGGGGGTAG-3'
Galektin-1 (LGALS1):	5'-CGCCAGCAACCTGAATCT-3' 5'-CAGGTTTCAGCACGAAGCTCT-3'.
Mannozidáz Alfa 1A Osztály 1. tag (MAN1A1):	5'-TTGGGCATTGCTGAATATGA-3' 5'-CAGAATACTGCTGCCTCCAGA-3'
Mannozidáz Alfa 1A Osztály 2. tag (MAN1A2):	5'-GGAGGCCTACTTGCAGCATA-3' 5'-GAGTTTCTCAGCCAATTGCAC-3'
Mannozidáz Alfa 2A Osztály 1. tag (MAN2A1):	5'-CCTGGAAATGTCCAAAGCA-3' 5'-GCGGAAATCATCTCCTAGTGG-3'
Mannozidáz Alfa 2A Osztály 2. tag (MAN2A2):	5'-TCCACCTGCTCAACCTACG-3' 5'-TGTAAGATGAGTGCGGTCTCC-3'
Mannozil (α -1,3-)-Glikoprotein β -1,2-N-Acetylglükózaminil-transzferáz (MGAT1):	5'-CGGAGCAGGCCAAGTTC-3' 5'-CCTTGCCCGCAGTCCTA-3'
Mannozil (α -1,3-)-Glikoprotein β -1,4-N-Acetylglükózaminil-transzferáz A (MGAT4A):	5'-CATAGCGGCAACCAAGAAC-3' 5'-TGCTTATTTCCAAACCTTCACTC-3'
Mannozil (α -1,3-)-Glikoprotein β -1,4-N-Acetylglükózaminil-transzferáz B (MGAT4B):	5'-CACTCTGCACTCGCTCATCT-3' 5'-CACTGCCGAAGTGACTGTGA-3'
Mannozil (α -1,6-)-Glikoprotein β -1,6-N-Acetylglükózaminil-transzferáz (MGAT5):	5' GCTCATCTGCGAGCCTTCT-3' 5'-TTGGCAGGTCACCTTGTACTT-3'
Béta-1,4-Galaktoziltranszferáz 1 (B4GALT1):	5'-CTAGCAACTTGACCTCGGT-3' 5'-CATTTGGGTTCTGCTTTGCC-3'
Béta-1,4-Galaktoziltranszferáz 3 (B4GALT3):	5'-GAGGATGACGACATTGCTACC-3' 5'-TCGGTGCTTCACCATCTTATAG-3'
ST3 Béta-Galaktozid Alfa-2,3-Szialil-transzferáz 3 (ST3GAL3):	5'-TATGCTTCAGCCTTGATG -3' 5'-TTGGTGA CTGACAAGATGG -3'
ST3 Béta-Galaktozid Alfa-2,3-Szialil-transzferáz 4 (ST3GAL4):	5'-ATGTTGGCTCTGGTCCTG-3' 5'-AGGAAGATGGGCTGATCC-3'
ST3 Béta-Galaktozid Alfa-2,3-Szialil-transzferáz 6 (ST3GAL6):	5'-TCTATTGGGTGGCACCTGTGGAAA-3' 5'-TGATGAAACCTCAGCAGAGAGGCA-3'
ST6 Béta-Galaktozamid Alfa-2,6-Szialil-transzferáz 1 (ST6GAL1):	5'-TGGGACCATCTGTATACCACT-3' 5'-ATTGGGGTGCAGCTTACGAT-3'
Neuraminidáz 1 (NEU1):	5'- CCTGGATATTGGCACTGAA -3' 5'- CATCGCTGAGGAGACAGAAG -3'

4. Táblázat. A részleteket lásd a következő oldalon

4. Táblázat. A glikozilációs enzimek expresszióját vizsgáló RT-qPCR kísérleteknél alkalmazott primer szekvenciák.

Mindegyik enzimnél az első a forward, a második a reverz szekvencia

3.2.2.5. Statisztikai analízis

A betegek és a kontrollok adatait kétmintás, párosítatlan t-próbával hasonlítottuk össze, kivéve a neuraminidáz-gátlásos kísérletet, ahol ugyanazon minta mérési eredményeit párosított t-próbával analizáltuk.

3.2.3. A TMEM203 szerepének vizsgálata SLE-ben

Az SLE-ben észlelt T-sejt diszfunkciót vizsgáló kutatásainkban egy másik szabályozó folyamat, a TMEM203 proinflammatorikus molekula expressziójának vizsgálatát is célul tűztük ki, abból kiindulva, hogy felmerült a molekula kapcsolata a TLR4-STING-I. típusú IFN reakcióúttal.

3.2.3.1. Betegek

Ebbe a vizsgálatba is aktív, felnőtt (18-80 éves kor) SLE-s betegek kerültek bevonásra. A betegség legalább egy szervrendszerben aktivitási jeleket mutatott, beválasztási és kizárási kritériumok egyebekben megegyeztek a 3.2.1.1. alfejezetben ismertetett feltételekkel. Egy alkalommal, aktív betegség időszakában történt a vérvétel.

3.2.3.2. Kvantitatív real-time PCR vizsgálat

A korábban leírtak szerint a betegek perifériás véréből izolált PBMC-t aktiváltuk, majd teljes RNS-t vontunk ki a sejtekből, és RT-qPCR módszerrel vizsgáltuk a TMEM203, a STING, valamint egy jól ismert, IRF-3-t indukáló antivirális adapter protein, a Mitochondrial antiviral signaling protein (MAVS) mRNS mennyiségét. A felhasznált primerek a következők voltak: STING: Hs01060665_g1; TMEM203: Hs01057884_s1; MAVS: Hs00736955_g1. A laboratóriumi eljárások egyebekben megegyeztek a 3.2.1.2. és 3.2.1.4. pontokban írtakkal. A relatív génexpressziót a béta-aktin mRNS expressziós szintjéhez viszonyítva adtuk meg. A TMEM203 relatív mRNS-expressziós értékek és a betegség-aktivitási paraméterek közötti korrelációt Spearman-féle rangkorrelációs teszt segítségével analizáltuk.

3.2.4. Antifoszfolipid antitestek szerepe az SLE nem-thromboemboliás mechanizmusú szervi manifesztációinak kialakulásában

Fenti, alap- ill. transzlációs kísérletes munkáink mellett egy klinikai felmérést is bemutatok, melynek során arra voltunk kíváncsiak, hogy az APA-k a jól ismert thrombogén mechanizmusaikon kívül prediktív értékkel bírnak-e az SLE további manifesztációinak megjelenésére.

Ez a munka egy retrospektív kohorszvizsgálat volt, melybe a Klinikánkon gondozott felnőtt SLE-s betegeket vontuk be válogatás nélkül, konszekutív módon. A betegek megfeleltek az Amerikai Reumatológiai Kollégium átdolgozott osztályozási kritériumrendszerének (167). A betegek 91%-a (n= 204) nő volt, átlagéletkoruk a vizsgálat időpontjában 49 /20-92/ év volt, a diagnózis óta eltelt idő pedig 13 /0-49/ év.

Az APS diagnózisát a Sydney kritériumok alapján állítottuk fel (138). Antifoszfolipid antitest (APA)-pozitivitást akkor regisztráltunk, ha legalább 12 hét különbséggel, két alkalommal a lupus anticoaguláns (LA), az anti-cardiolipin (anti-CL) vagy az (anti- β 2GPI) IgG és/vagy IgM pozitív volt.

A felmérés során három csoportot hoztunk létre: SLE APA nélkül, SLE+APA, SLE+APS. Összesen 31 SLE, illetve APS manifesztációt (klinikai tünet, szervi érintettség, laboratóriumi eltérés) mértünk fel a betegekben, melyeket az SLE klinikai vizsgálataiban szokásos nevezéktanok, mint pl. a British Isles Lupus Activity Group (BILAG) vagy a SLEDAI-2K aktivitási indexek meghatározásánál használatos definíciók szerint állapítottunk meg. Külön kiemeltük az ún. major manifesztációkat, vagyis vese, központi idegrendszer, tüdő és a szív (myocardium ill. billentyűk) érintettségét. A haematológiai érintettség során a következő határértékeket alkalmaztuk: SLE által okozott haemolyticus vagy nem-haemolyticus anaemia (haematocrit <35%), leukopenia (fehérvérsejtszám < 4.0 G/l), lymphopenia (lymphocytaszám <1.5 G/l) és thrombocytopenia (thrombocytaszám < 100 G/l). Természetesen minden manifesztáció esetén csak a valóban SLE által okozott eltéréseket vettük figyelembe. Rögzítettük a betegek immunszerológiai profilját is, mint antinuclearis antitest (ANA), anti-dsDNS, anti-SSA, anti-SSB, anti-Sm, anti-U1RNP, aCL, anti- β 2GPI antitestek és az LA pozitivitását, valamint a C3 vagy C4 hypocomplementaemiát. Ezen eltéréseket standard immunszerológiai mérésekkel (ELISA, LA-érzékeny koagulációs tesztek, nefelometria /C3, C4/végezték el Egyetemünk Laboratóriumi Medicina Intézetében. Végül feljegyeztük a beteg által valaha kapott immunszuppresszív kezelés (corticosteroid, azathioprin, methotrexát, cyclophosphamid, cyclosporin, chloroquin, B-sejt gátló biológikum) adatait. Az összes paraméter gyakoriságát χ^2 próbával hasonlítottuk össze a három említett csoport között.

3.3. A biológiai terápia leépítésének lehetőségei krónikus arthritisekben

A biológiai terápiák hosszú távú alkalmazásának indokoltsága, a kezelések leállítása vagy dózisuk csökkentése egy jelenleg is zajló prospektív vizsgálatunk tárgya. Ennek megalapozására, a biológiai kezelés elhagyása kockázatának megítélésére először egy hazai multicentrikus vizsgálatot szerveztünk, melyben „real-life” adatokat kívántunk gyűjteni a biológiai terápiák elhagyását követő betegség-lefolyásról.

Ez a felmérés egy retrospektív, többközpontos kohorszvizsgálat volt. Három arthritis centrum (Debreceni Egyetem Reumatológiai Tanszék, Békés Megyei Pándy Kálmán Kórház Reumatológiai Osztály, Gyula, valamint Klinikánk) azon RA-s, AS-s és AP-s betegekeinek adatait gyűjtöttük össze, akiknél a biológiai terápia valamilyen okból tartósan leállításra került, és feldolgoztuk az ezt követő betegség-lefolyás adatait. A betegeket a hatályos szakmai irányelvek és finanszírozási protokollok alapján kezeltük előzetesen anti-TNF vagy – RA esetén – más biológikummal, majd a kezelést különböző okok miatt leállítottuk. A tartós leállítást úgy definiáltuk, hogy az alkalmazott biológiai terápiát a beteg legalább a felmérés előtt egy 1 hónapja (rituximab esetén legalább 7 hónapja) már nem kapta, és különböző okok miatt az elindítására jelenleg sem került sor. A vizsgálatba válogatás nélkül, konsekutívan vontuk be valamennyi, a kritériumokat teljesítő beteget.

A három Arthritis centrum teljes beteganyagát feldolgozva összesen 175 ilyen beteget azonosítottunk. Közülük 126-an RA (27 beteg szegedi, 51 beteg debreceni és 48 beteg a gyulai centrumból), 38-an AS (11 szegedi, 3 debreceni és 24 gyulai), és 11-en AP (1 szegedi, 1 debreceni és 9 gyulai) betegségben szenvedtek. Rögzítettük a betegek legfontosabb demográfiai adatait és betegség-paramétereit, a megelőző biológiai és nem-biológiai kezelések fajtáit és hosszát, a diagnózistól a biológiai kezelés elindításáig eltelt időtartamot, valamint feljegyeztük a biológiai terápia tartós leállításának okát.

Az utánkövetési vizsgálatokat a biológiai terápia tartós leállítását követően továbbra is gondozásra járó betegek között végeztük. Az RA-s betegek 64,2 %-ban (81 beteg), az AS-s betegek 44,7 %-ban (17 beteg), míg AP esetében 18,1 %-ban (2 beteg) állt rendelkezésre utánkövetési adat. Mivel az AP-s betegek száma nagyon alacsony volt, az utánkövetési adatokat csak RA és AS esetében értékeltük ki. A betegség-aktivitást RA esetén a DAS28, AS esetén a BASDAI index segítségével határoztuk meg. Az EULAR ajánlások szerint az alacsony betegség-aktivitást 3,2 alatti DAS28 esetén, míg magas betegségaktivitást 5,1 feletti DAS28 esetében definiáltuk, illetve BASDAI esetében alacsony betegségaktivitásról 2,1 alatt beszélünk, míg magas betegségaktivitásról 4,0 felett. Relapsust akkor állapítottunk meg, ha a betegségaktivitás a korábbi alacsony vagy közepes értékről magasra változott. Remisszióról pedig akkor beszéltünk, ha a betegségaktivitás alacsony maradt két egymást követő vizit alkalmával. Meghatároztuk a leállítás utáni remisszió hosszát, valamint a relapsusig eltelt időtartamot. Az egyes beteg-alcsoportok közötti statisztikai különbséget kétmintás t-próbával vagy χ^2 próbával vizsgáltuk, míg az egyes paraméterek és a folyamatos változók (demográfiai adatok, időtartamok) közötti összefüggést Pearson-féle korreláció analízissel vizsgáltuk.

4. Eredmények

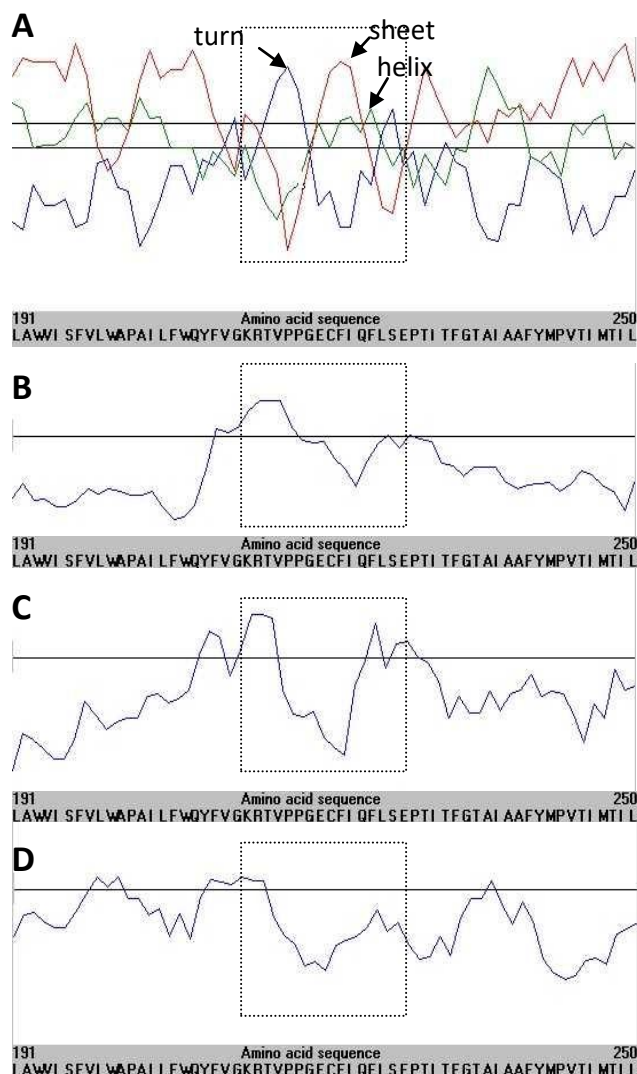
4.1. *Sicca tünetek pathogenesise SS-ben– acetylcholin receptor elleni antitestek potenciális szerepe*

4.1.1. Anti-humán m3AChR antitestek kimutatására szolgáló eljárás kidolgozása és klinikai jelentőségének felmérése primer SS-ben

4.1.1.1 Antigén kiválasztás és ELISA

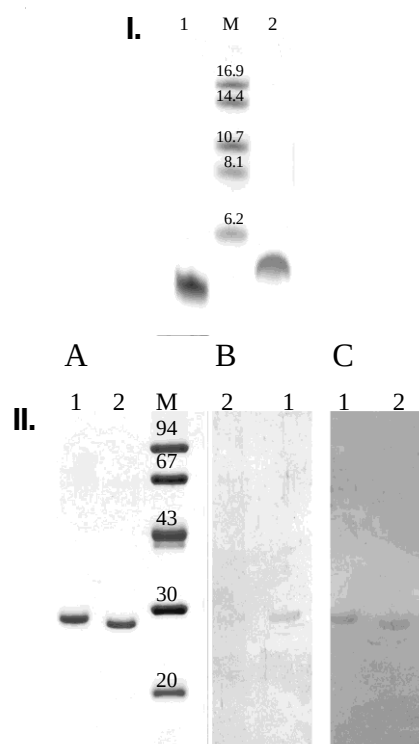
A számítógépes predikciós program az m3AChR teljes fehérjéből a 213-228 aminosavnak megfelelő szakaszcsoportról állapította meg, hogy komplex térbeli struktúrája, hozzáférhetősége, hidrofilitása, és további jellegzetességei, valamint antigenitási tulajdonságai alapján legnagyobb valószínűséggel a fehérje első számú, immundomináns antigenikus epitópját hordozhatja. A 2. Ábra mutatja be az m3AChR₂₁₃₋₂₂₈ peptidet, melyet az első és utolsó két-két aminosav rövidítése alapján KRSE peptidként jelöltünk.

A KRSE peptid elleni antitestek vizsgálatához, mint említettük, az antigént egyrészt peptid-kémiai úton előállítva, önmagában, szintetikus peptidként, másrészt pedig biotechnológiai úton, GST-vel fuzionálva (GST-KRSE) is előállítottuk (3. Ábra). Amikor a szintetikus peptidet használtuk fel antigénként az ELISA rendszerben, akkor kaptunk csak jól reprodukálható mérési eredményeket, amikor aerob körülmények között, azaz oxidált formában alkalmaztuk a KRSE peptidet, aminek az lehetett az oka, hogy ilyenkor a több cisztein aminosavat tartalmazó KRSE peptid dimerizálódik, míg redukáló körülmények között a monomer peptid nem mutatott megfelelő immunreakciót. A kétféle forma elektroforetikus mobilitását a 3/I. Ábrán mutatjuk be. Az oxidált forma ellen a számított határérték OD érték feletti (pozitív) reakciót a 40 SS-s betegből 30 széruma adott, míg az egészséges szérumok egyike sem mutatott pozitivitást (0/40). Így a teszt szenzitivitása 80%-nak adódott. Az eredményeket bemutató scatter plot diagram a 4A Ábrán látható.



2. Ábra. Az m3AChR fehérje számítógépes antigén-predikciós analízisének eredményei.

(A) Hélix, redőzött lemez és kanyar képzésének potenciálja a Chou-Fasman algoritmus alapján, (B) a Hopp és Woods-féle hidrofilitási skála, (C) a Janin-féle hozzáférhetőségi skála, és (D) a Welling és munkatársai által kifejlesztett antigenitási skála. Az eredmények alapján meghatározott, és a képen bekeretezett 213-228 (KRSE) szakaszt használtuk a vizsgálataink során.

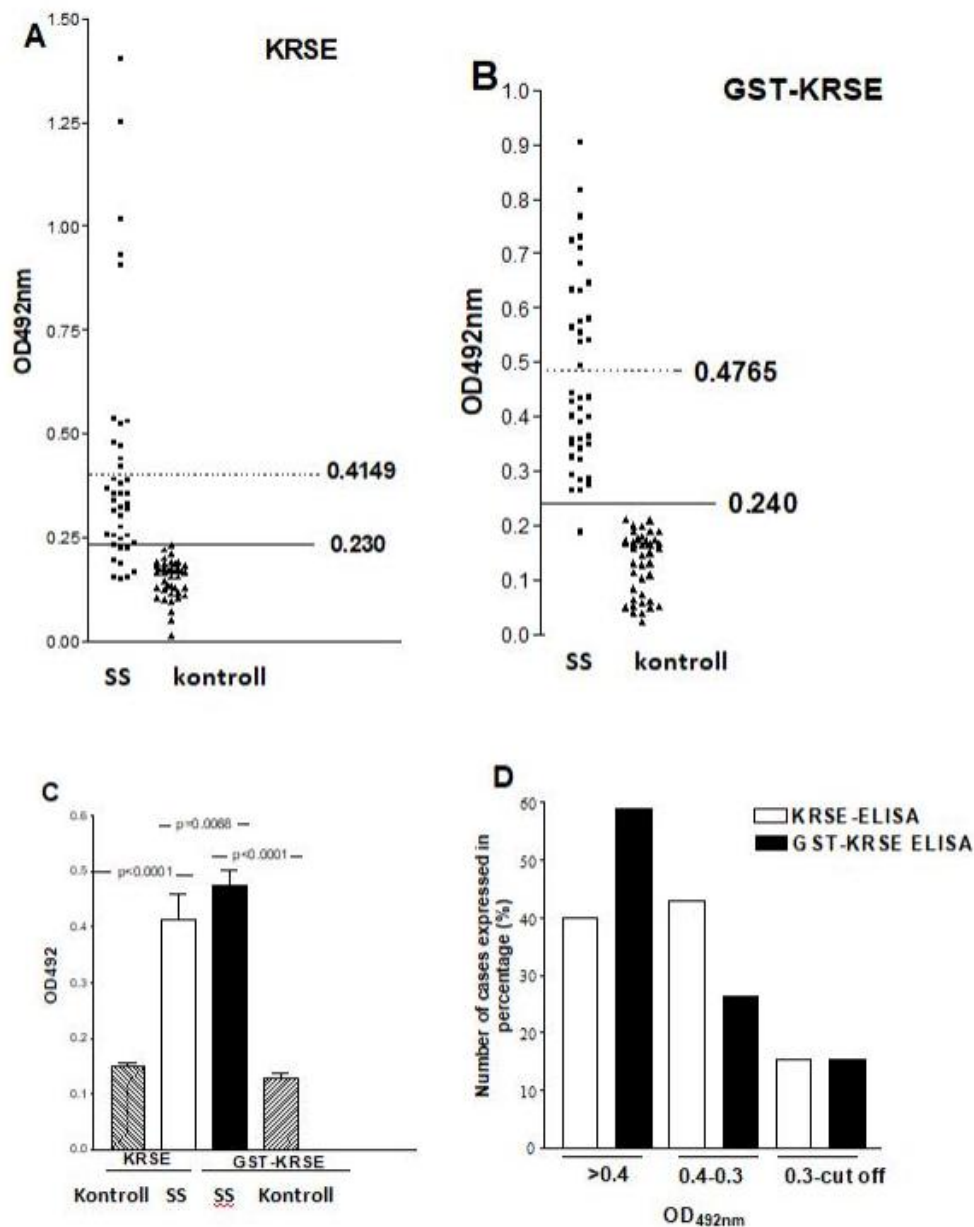


3. Ábra. A KRSE peptid, valamint a GST és a GST-KRSE fehérjék gél-elektroforézissel és Western blotting-gal történő szeparálása és azonosítása

Nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gél elektroforézis (SDS-PAGE) és Western blotting minták. (I.): A KRSE peptid redukált (1) és oxidált (2) formában. Látható az oxidált (dimerizált) forma nagyobb molekulatömege.

II:(A): a GST-KRSE (1. sáv) és a GST (2. sáv) azonosítása gélen, Coomassie brilliant blue festéssel. (B) és (C): Ugyanezen két antigén immunreakcióval történő jelölése Western blotting módszerrel kétféle primer szérum használatával: (B): anti-KRSE monospecifikus antitesttel, és (C): az affinitás-kromatográfiás oszlopon átfolyó polyspecifikus szérummal (1:200).

A GST-KRSE antigénnel végzett antitest-meghatározás a peptid antigénnél jelentősen nagyobb diszkriminatív képességet mutatott az egészséges és a SS-es szérumok között. Amint a 4/B Ábrán látszik, csaknem az összes beteg (39/40) anti-m3AChR-pozitívnak bizonyult ennél az antigénnél, és az egészségesek körében továbbra sem adódott pozitív reakció (97%-os szenzitivitás). A pozitivitás aránya szignifikánsan magasabb volt a GST-KRSE peptiddel szemben, mint a KRSE-vel ($p=0,0068$, 4/C Ábra). Hasonlóképpen, szignifikáns volt az eltérés abban az összehasonlításban is, amikor az enyhén, közepes mértékben vagy erősen pozitív tartományra osztottuk a pSS-s betegek anti-m3AChR autoantitest-eredményeit (4/D Ábra). A



4. Ábra. A humán m3AChR fehérje KRSE epitópjá elleni autoantitestek ELISA-vizsgálatainak eredményei.

(A) A szintetikus KRSE peptid, (B) a rekombináns fúziós GST-KRSE peptid elleni autoantitest vizsgálatok során 492 nm-en mért optikai denzitás (OD₄₉₂) értékek scatter plot ábrázolása. Folyamatos vonal: az egészséges kontrollok mintáinak átlag + 2SD számítása alapján kapott határérték; szaggatott vonal: a pSS betegek OD értékeinek mediánja.

(C) Az oszlopdiagramok az egyes csoportok immunreakcióinak (OD) átlag ± SEM értékeit mutatják.

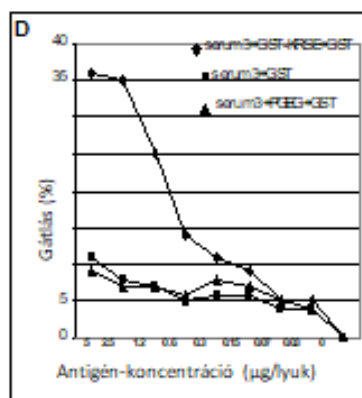
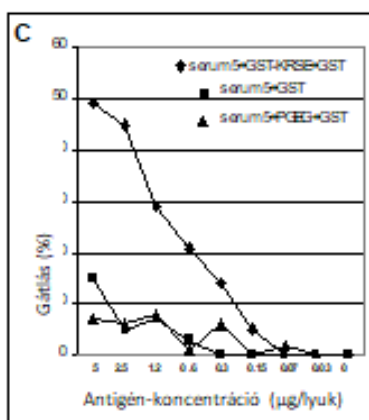
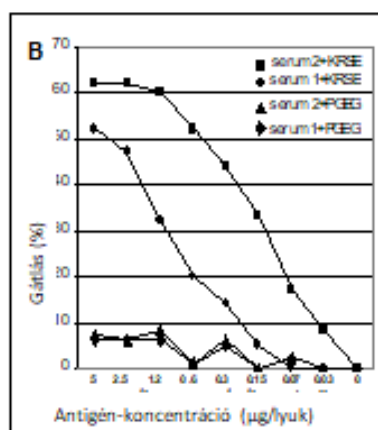
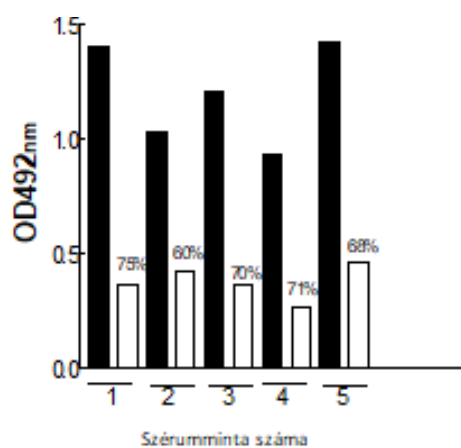
(D) A pozitív reakciót adó szérumok megoszlása a kétféle antigén esetében, három nagyságrendi csoportra osztva. Az oszlopok magassága az adott tartományba eső esetek százalékos arányát mutatja. SS: n=40, egészséges kontroll: n=40

KRSE-peptid ELISA mérésekkel az alacsony pozitív tartományban csoportosult az eredmények többsége, míg a GST-KRSE alkalmazásával a magasan pozitív tartományban; a 0,4 feletti OD értéket mutató erősen pozitív eredményt mutató betegek aránya szignifikánsan magasabb a GST-KRSE (23/40) ELISA mérésekkel, mint a KRSE ELISA-val (12/40; $p=0,021$).

4.1.1.2. Inhibíciós és immunoblot kísérletek

Az ELISA-val kapott immunreakciók specificitásának ellenőrzésére végzett kísérleteink során egyrészt magas anti-m3AChR-pozitivitást mutató szérumok poolozott keverékével előinkubáltuk a KRSE-peptidet, és, amint az az *5A Ábrán* látszik, ennek hatására a peptid ELISA-val mért immunreakció sorban 75%, 60% 70% 71% 68%-kal csökkent. Összességében átlag 70%-os gátlást (OD-csökkenést) eredményezett az előinkubáció. Egészséges kontrollok mintáiban hasonló különbség nem volt megfigyelhető. Egy következő kísérletben, a gátlás koncentráció-függőségét mértük fel két reprezentatív betegszérum használatával. A KRSE peptid 0-50 $\mu\text{g/ml}$ tartományba eső különböző koncentrációival előinkubálva a szérumokat, maximum 62%-os, illetve 54%-os gátlást tudtunk elérni (*5B Ábra*). Amikor a GST-KRSE peptidet használtuk inhibitorként, két másik szérum esetén, maximum 49%-os, illetve 44%-os gátlást tapasztaltunk (*5C,D Ábra*). Ezek a gátlási értékek szignifikánsan magasabbak voltak, mint egy irreleváns peptiddel (PGEG) mért értékek (KRSE: 49% és 36% vs PGEG: 7% és 9%, $p<0.0001$, ill. $p=0.0002$).

Western blotting módszerrel végzett méréseink is támogatják az SS szérumok KRSE-specikus kötődését az immundetektálás során. Az affinitás kromatográfiával tisztított monospecifikus ellenanyag csak a GST-KRSE-vel reagált, a GST-vel nem (*3/II. Ábra B panel*).



5. Ábra. A részleteket lásd a következő oldalon

5. Ábra. Az immunreakció specifitásának ellenőrzése KRSE- és a GST-KRSE inhibíciós kísérletekkel.

A: 5 reprezentatív SS-es szérum (1:50 hígítás) reakciója ELISA során 500 ug/ml KRSE szintetikus peptiddel történő elő-inkubáció nélkül (fekete oszlopok) vagy azt követően (fehér oszlopok). A gátlás százalékos mértéke is látható az oszlopok felett.

B: A gátlás koncentrációfüggését bemutató grafikon. Az 1. és 2. számú szérumminta 1:200 hígítását KRSE-vel, valamint egy irreleváns PGEG peptiddel elő-inkubáltuk, majd hígítási sort készítve (50-0 ug/ml, kétszeres sorozathígításokkal) a szérumok reakcióját vizsgáltuk ELISA-val a KRSE peptid antigénnel szemben.

C és D: Inhibíciós kísérlet a GST-KRSE peptiddel, a 3. és 5. számú szérumminta felhasználásával, egyebekben az előző pontban leírt inhibíciós kísérlettel megegyező eljárással.

4.1.1.3. Az anti-m3AChR antitestek klinikai jelentőségének felmérése

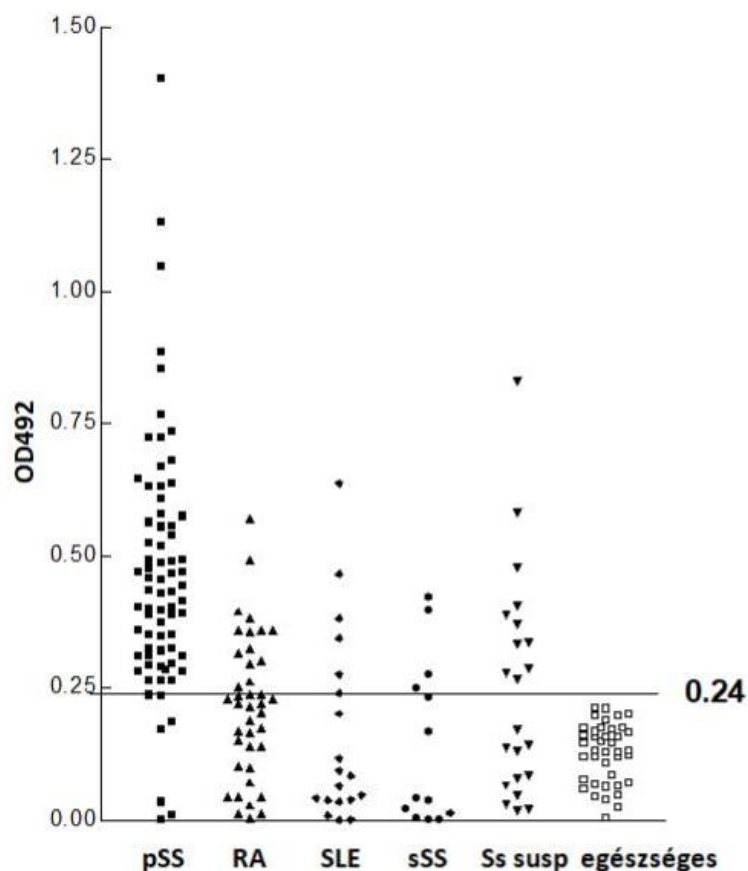
Az m3AChR₂₁₃₋₂₂₈ peptid segítségével igazoltuk, hogy az m3AChR fehérje autoantigénként vált ki immuválaszt SS-s betegekben, a következő mérőszorozatban nagyobb esetszámon, több betegcsoport bevonásával mértük fel az autoantitest-pozitivitás klinikai összefüggéseit, potenciális differenciál-diagnosztikai jelentőségét.

Ennek során a 73 vizsgált pSS-s betegből 66-an (90%) bizonyultak anti-m3AChR²¹³⁻²²⁸ antitest- pozitívnak. Vizsgálataink fontos eleme, hogy meghatározzuk, specifikus pSS markernek tekinthető-e az anti-m3AChR₂₁₃₋₂₂₈ antitest-pozitivitás. Ezért a pSS mellett 5 más (RA, SLE, sSS, SSsusp és egészséges kontroll) betegcsoport szérumait is alkalmaztuk az ELISA tesztekben. Az összehasonlító csoportokat tekintve elmondható, hogy mindegyikben szignifikánsan alacsonyabb volt mind az anti-m3AChR₂₁₃₋₂₂₈ antitest-pozitivitás gyakorisága, mind az antitestek mennyiségét jellemző átlagos OD érték. Az értékeket az 5. Táblázatban mutatjuk be, míg az egyedi mérések eredményeit a 6. Ábra részletezi. Ezek alapján az anti-m3AChR-pozitivitás 90%-os szenzitivitással támasztja alá pSS diagnózisát. Az egyes csoportoktól pedig az 5. Táblázatban felsorolt specificitással különíti el vizsgálatunk a pSS-s betegeket. Látható, hogy az egyéb szisztémás autoimmun betegséggel vagy a pSS lehetőségét felvető klinikai képpel rendelkező betegektől 50-71%-os specificitással tudtuk méréseinkkel elkülöníteni a pSS-s betegeket, míg az egészséges kontrollokkal szemben a specificitás 100 %-nak adódott. További számítások azt jelzik, hogy amennyiben az anti-m3AChR₂₁₃₋₂₂₈ antitest-meghatározásunk a határérték alatti, negatív eredményt ad, akkor a pSS lehetősége 0,13-0,19-szeresre csökken, attól függően, hogy milyen betegcsoporttól szeretnénk megkülönböztetni, míg ha az eredmény pozitív, a pSS fennállásának valószínűsége 1,81—3,16-szorosra emelkedik (5. Táblázat).

	pSS (n=73)	RA (n=40)	SLE (n=19)	sSS (n=14)	SSsusp (n=22)	egészséges (n=40)
Anti-m3AChR ₂₁₃₋₂₂₈ átlagos OD ₄₉₂ érték	0.461	0.217*	0.164*	0.143*	0.250*	0.121 [¶]
Anti-m3AChR ₂₁₃₋₂₂₈ pozitivitás (%)	66(90)	14(35) [¶]	6(32) [¶]	4(29) [¶]	11(50)*	0 [¶]
Specifícitás vs pSS		65%	68%	71%	50%	100%
Pozitív valószínűségi arány vs pSS		2.58	2.86	3.16	1.81	n.a.
Negatív valószínűségi arány vs pSS		0.15	0.14	0.13	0.19	0.096

5. Táblázat. Anti-m3AChR₂₁₃₋₂₂₈ – pozitivitás pSS-ben és az öt összehasonlító csoportban, valamint az antitest-meghatározások elkülönítő értéke az egyes csoportok között.

*n.a.: nem alkalmazható, * $p < 0.01$, [¶] $p < 0.0001$*



6. Ábra. Az anti-m3AChR²¹³⁻²²⁸ antitestmérések eredményei az egyes vizsgált csoportokban.

A pontok az ELISA vizsgálat során kapott optikai denzitás (OD492) értékeket jelzik. A határértéket vízszintes vonal mutatja. A számszerű értékeket és a statisztikai analízis eredményeit az 5. Táblázat ábrázolja.

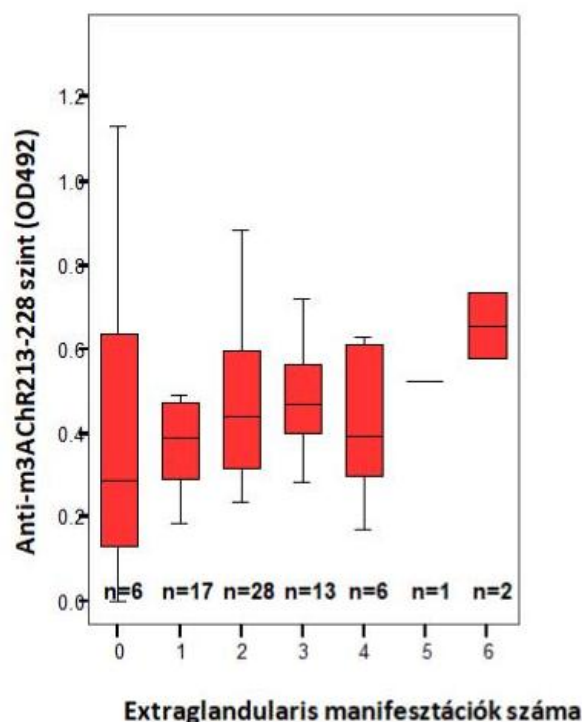
Ha azt vizsgáljuk, hogy az igazolt pSS-s betegek csoportján belül utalhat-e az anti-m3AChR-pozitivitás valamilyen alcsoporthoz tartozásra, akkor számításaink, melyek eredményeit a 6. Táblázatban összegezzük, azt jelzik, hogy az autoantitest-koncentrációk nem mutatnak korrelációt a betegek életkorával, a betegség fennállási idejével, és a mirigyfunkció csökkenésének mértékével sem. Utóbbit a stimulált nyáltermeléssel való korreláció-analízissel vizsgáltunk. Ugyanakkor kimutattuk azt, hogy magasabb számú extraglandularis szervi manifesztáció pozitív korrelációt mutat az anti-m3AChR₂₁₃₋₂₂₈ antitest pozitivitás mértékével ($p < 0,05$; 7. Ábra). Valójában számszerűen mindegyik extraglandularis érintettség gyakoribb volt az anti-m3AChR₂₁₃₋₂₂₈ pozitív betegekben, de statisztikai szignifikanciát csak a leukopenia esetében ért el a különbség (6. Táblázat). Az anti-SSA és az anti-SSB antitest-pozitivitással nem mutatott szignifikáns összefüggést az anti-m3AChR₂₁₃₋₂₂₈ antitest jelenléte. Mivel rendelkezésre álltak azon korábbi vizsgálataink eredményei, melynek során a

gastrointestinalis és az urogenitalis rendszerben mértük fel a paraszimpatikus autonóm idegrendszeri érintettség jelenlétét a gyomorürülés, illetve a hólyagműködés vizsgálata révén (13), érdemesnek tartottuk összevetni ezen értékeket a betegekben jelen vizsgálatunk során mért autoantitest-szintekkel, mivel e két szervrendszerben is az m3AChR a domináns acetylcholinreceptor altípus [11,12]. Ezen összehasonlítás azonban nem hozott semmilyen szignifikáns összefüggést (nem bemutatott adat).

Klinikai ill. laboratóriumi változók	Anti-m3AChR₂₁₃₋₂₂₈ pozitív (n=66)	Anti-m3AChR₂₁₃₋₂₂₈ negatív (n=7)	Összes (n=73)
Életkor	55	60	55
Betegség-fennállás (év)	14	11	14
Stimulált nyáltermelés	1,11	1,97	1,20
Ízületi érintettség	52(79)	5(71)	57(78)
Raynaud jelenség	26(39)	2(29)	28(38)
Vasculitis	15(23)	0	15(21)
Renalis érintettség	10(15)	1(14)	11(15)
Lymphoma	5(8)	0	5(7)
Anaemia	15(23)	1(14)	16(22)
Leukopenia	35(53)*	1(14)	36(49)
ANA	49(74)	5(71)	54(74)
Anti-SSA	50(76)	4(57)	54(74)
Anti-SSB	33(50)	3(43)	36(49)

6. Táblázat. Az anti-m3AChR₂₁₃₋₂₂₈-pozitív, illetve -negatív SS-s betegek összehasonlítása demográfiai jellemzők, extraglandularis szervi manifesztációk és immunszerológiai eltérések alapján.

A számok az első három változó esetében átlagértéket, a későbbiekben az érintett betegek számát, zárójelben százalékos arányát jelzik. Renalis érintettség: renalis tubularis acidosis biopsziával igazolt chronicus tubulointerstitial nephritis-szel vagy anélkül. Vasculitis: tapintható purpura vagy más, biopsziával igazolt vasculitises bőrelváltozás* $p < 0,05$ az anti-m3AChR₂₁₃₋₂₂₈-pozitív vs -negatív betegek között.



7. Ábra. Box and whisker plot (“doboz és bajusz”) diagram, mely az anti-m3AChR₂₁₃₋₂₂₈ antitestek mennyiségét (optikai denzitás) mutatja az egy betegben előfordult extraglandularis szervi manifestációk számának függvényében.

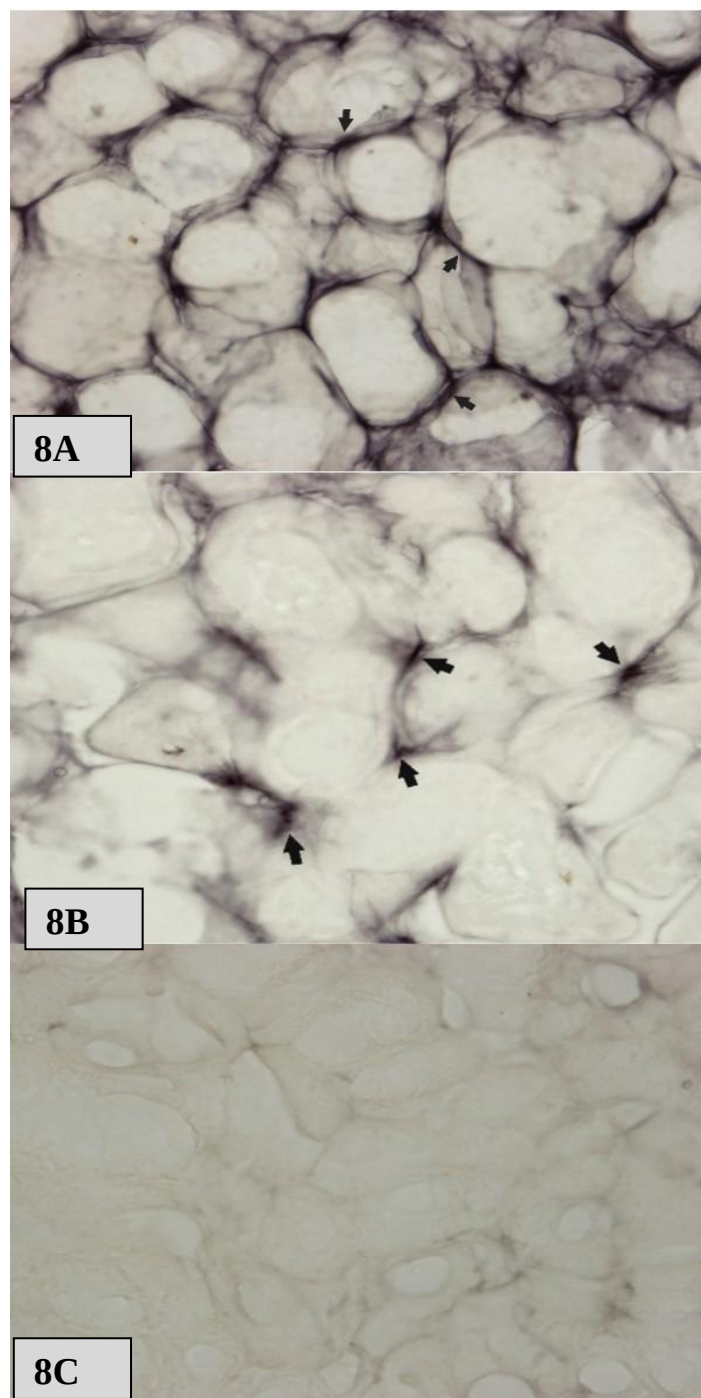
A szervi manifestációk száma pozitív korrelációt mutatott az érintett betegek átlagos anti-m3AChR₂₁₃₋₂₂₈ antitest-szintjével ($p < 0.05$). A dobozokon belül a vízszintes vonalak az átlagos OD₄₉₂ értéket, a téglalapok alsó és felső oldalai a 25. és a 75. percentilist, míg a bajuszok végpontjai a minimum és maximum értékeket jelölik. Az n értékek az egyes alcsoportokba tartozó betegek számát jelzik.

4.1.2. Az anti-m3AChR antitestek nyálmirigybéli kötődésének vizsgálata

4.1.2.1. A fénymikroszkópos vizsgálatok eredményei

4.1.2.1.1. Indirekt immunohisztokémia

Ebben a vizsgálatrészben egészséges egyénekből nyert kisnyálmirigy-szövetet inkubáltunk SS-s betegek szérumával. A teljes, tisztítatlan szérum, ahogy várható is, számos lokalizációban mutatott kötődést a nyálmirigyekhez, különösen az acinaris és ductalis sejtek basolateralis membránja mentén, de intracelluláris festődési reakciót is kiterjedten észleltünk (8A Ábra). Amikor azonban az anti-m3AChR₂₁₃₋₂₂₈ tisztított, monospecifikus antitestet használtuk elsődleges antitestként, az előbb említett multiplex, részben nem-specifikusnak



8. Ábra. Egészséges nyálmirigyek fénymikroszkópos immunhisztokémiai vizsgálata.

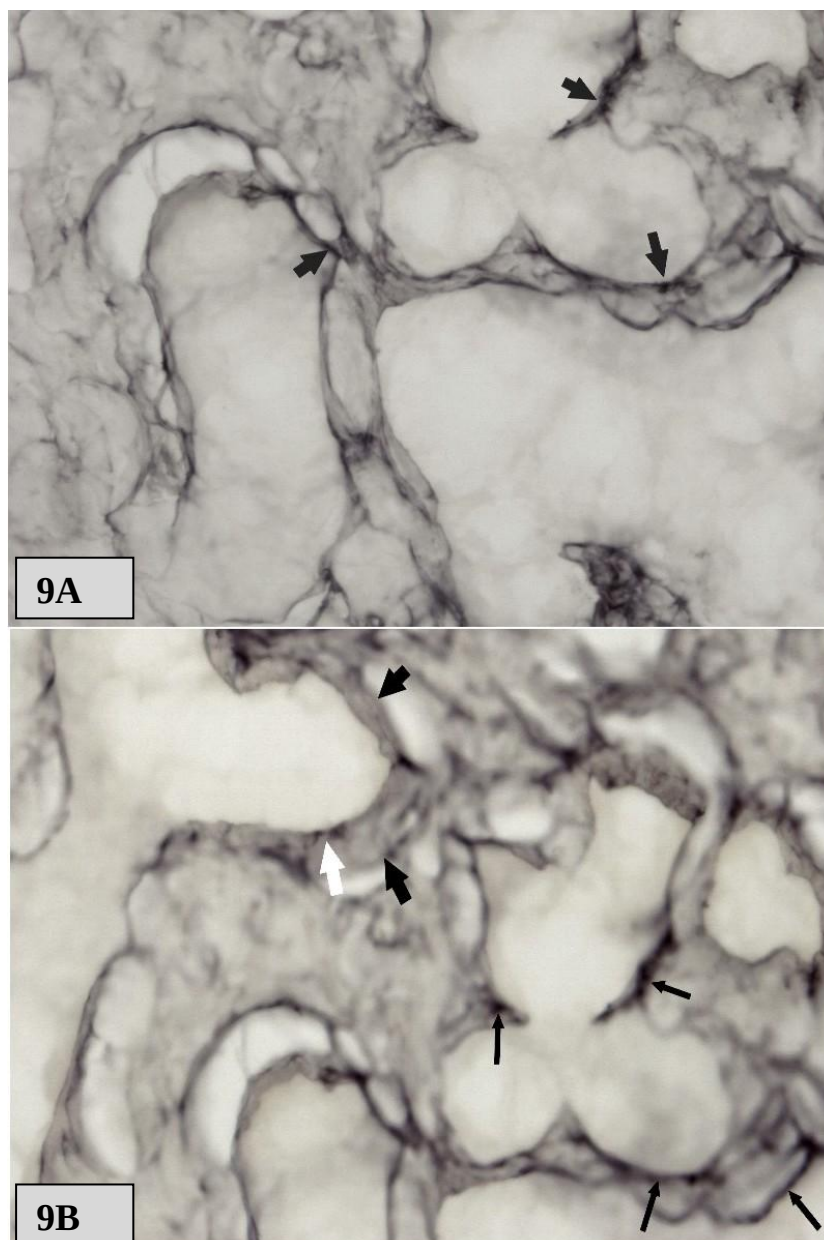
A. A szövetmintát SS-s betegek teljes szérumával, B. anti-m3AChR₂₁₃₋₂₂₈ monospecifikus, affinitás kromatográfiával tisztított antitesttel, vagy C. egészséges kontroll személyek teljes szérumával inkubáltuk. A nyilak az acinaris sejtek membránján létrejövő, pontszerű vagy rövid vonalas specifikus immunreakciót mutatják. Az A Ábrán ezen kívül citoplazmatikus immunreakció, valamint a kötőszöveti struktúrák területén nem-specifikus festődés is látható. A B Ábrán a háttérfestődés szembetűnően enyhébb, és a specifikus immunreakció mint elszórt, szakaszos membrán-pozitivitás mutatkozik (nyilak). A C Ábrán nem látható specifikus immunreakció. Nagyítás: 40x.

tartható kötődés helyett sokkal tisztább képet kaptunk, a háttérfestődés gyakorlatilag megszűnt. Ugyanakkor igen specifikus, jól azonosítható, pontszerű vagy rövid vonalszerű intenzív kötődési reakció látszott, ami kizárólag az epithelsejtek basolateralis membránja mentén volt megfigyelhető (8B *Ábra*). Ez a lokalizáció anatómiailag megfelel a vegetatív idegvégződés elhelyezkedésének. A kontroll mintákon, melyeket egyrészt egészséges egyének szérumával (8C *Ábra*) inkubáltunk, vagy pedig kihagytuk az elsődleges antitestet és csak a jelölt, másodlagos antitestet adtuk a szövetmintához (nem bemutatott adat), nem kaptunk kötődési reakciót.

4.1.3.1.2. Direkt immunohisztokémia

Ezzel az eljárással a nyálmirigyekbe a mintavétel előtt, *in vivo* bekötődött antitestek jelenléte vizsgálható. Az SS-s betegektől vett kisnyálmirigy-biopsziás mintákban számos helyen lehetett erre utaló immundepozíciót találni, ami a betegség természetét, valamint korábbi irodalmi adatokat (26) ismerve nem meglepő. Jelen vizsgálatainkkal elsősorban az acinaris és ductalis hámsejtek felszínén láttunk az előző pontban leírtaknak megfelelő specifikus immunreakciót (9A *Ábra*), de kisebb intenzitással a mirigyhámsejteken belül, intracitoplasmaticusan, valamint az artériák és venulák endotheljének mentén is (9B *Ábra*) látszott immunglobulin-kötődés.

A fénymikroszkópos eredményeket összefoglalva megállapíthatjuk, hogy egyrészt az SS-s betegekből tisztított, anti-m3AChR-monospecifikus ellenanyag kötődik az egészséges nyálmirigyek acinussejtjeihez, méghozzá egy, a basolateralis membránban lokalizált antigénhez, másrészt az SS-s betegek nyálmirigyeiben *in vivo* IgG osztályú antitestek kötődnek a nyálmirigyekhez, diffúzan, számos potenciális antigénhez kapcsolódva. Különösen az első megfigyelés veti fel annak erős gyanúját, hogy az SS-s betegekben kimutatható, m3AChR-hez kötődő antitestek kapcsolódhatnak valóban a nyálmirigyekben elhelyezkedő acetylcholin-receptorhoz, azonban ennek egyértelmű igazolásához pontosabb, még részletesebb felbontású szövettani vizsgálatok szükségesek, ezért folytattuk kísérleteinket immun-elektronmikroszkópos vizsgálatokkal.



9. Ábra. SS-s betegekből származó kisnyálmirigyek fénymikroszkópos direkt immunfluoreszcens vizsgálata.

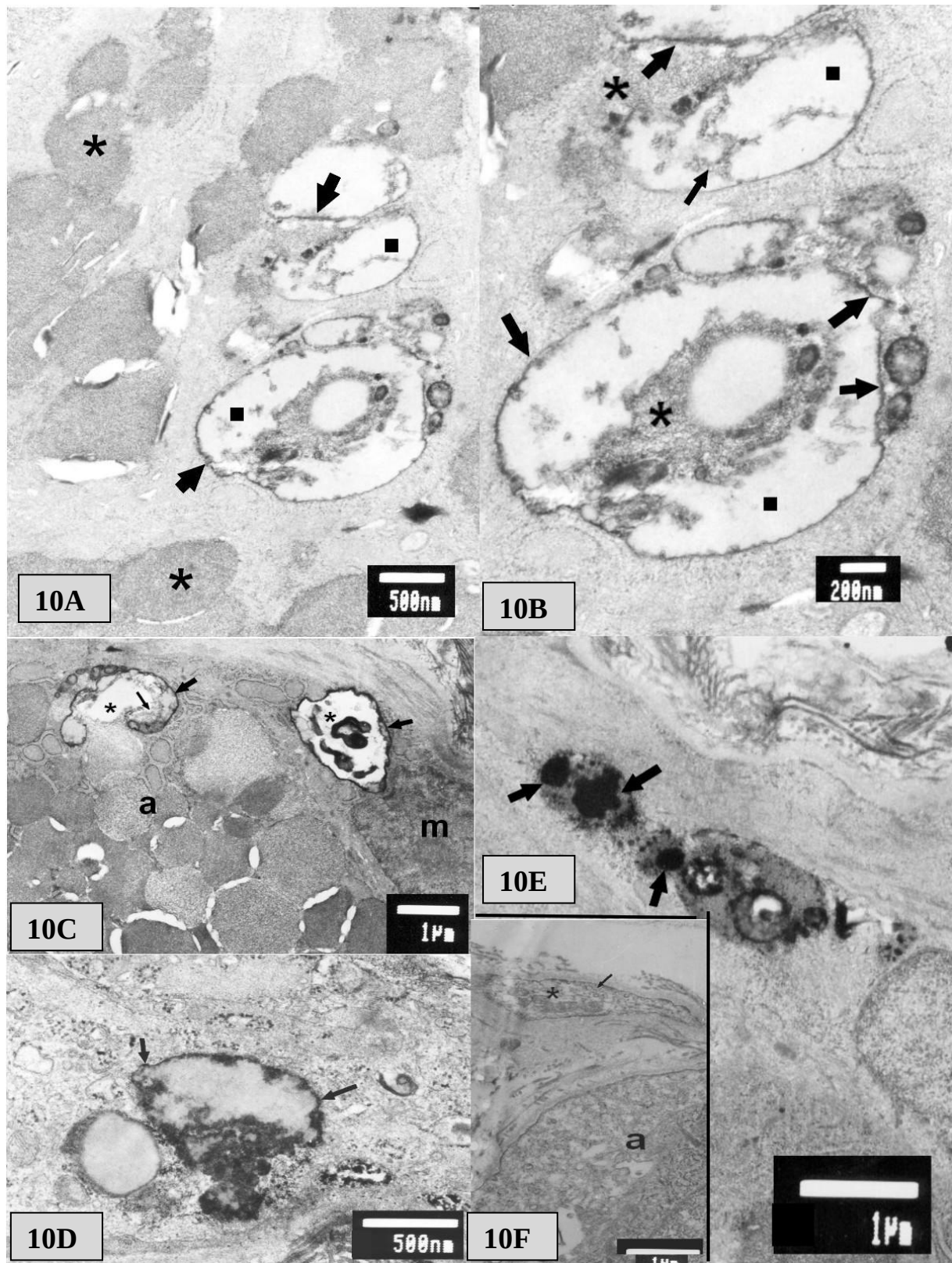
A. Számos helyen látszik immunreakció, melyek sötét, gyöngyszerű, 200-400 nm átmérőjű granuláris immundepozitumokként ábrázolódnak, elsősorban az acinussejtek membránja mentén (nyilak).

*B. Az A ábrarészen látható, sejtmembránhoz kapcsolódó immundepozitumokon (vékony fekete nyilak) túl, igen kifejezett citoplasmaticus festődés is megfigyelhető (vastag fekete nyilak) az acinussejtekben, melyek láthatóan atrophiasak az egészséges sejtekhez képest. Ezen összefolyó, nem-specifikusnak tekinthető festődésen túl, helyenként specifikus, pontszerű, közepes intenzitású specifikus immunfestődésnek megfelelő reakció is látható (fehér nyilak).
Nagyítás: 40x.*

4.1.3.2. Az immun-elektronmikroszkópos vizsgálatok eredményei

4.1.3.2.1. Indirekt immun-elektronmikroszkópos immunhisztokémia

Ezen vizsgálatok során ismét egészséges nyálmirigyeket használtunk, amiket SS-s betegek szérumaival reagáltattunk. A mintákat elektronmikroszkóppal vizsgálva az immunreakció pontosabb lokalizálását tudtuk biztosítani, és annak szubcelluláris szintű elhelyezkedését azonosítani. A metszetek megtekintése során jól azonosítható volt, hogy specifikus immunreakció mutatható ki az acinussejtek és a hozzájuk kapcsolódó idegvégződések találkozási helyén, az epithelsejt-membránnak megfelelően (*10. Ábra, A-C panel*). A festődő képletek egyértelműen specifikus immunreakciónak feleltek meg, amelyek finom, granuláris, gyöngyszerű végtermékként jelölték meg az ideg-varicositasok és az epithelsejtek találkozási felszínét. Hasonló képleteket ezen kívül még a myoepithelialis sejtek membránján (*10C Ábra*), valamint az epithelsejtek szekréciós granulumaiban is megfigyelhettünk. Amikor anti-m3AChR₂₁₃₋₂₂₈ tisztított ellenanyagot használtunk, amint várható volt, a kötődési reakció intenzitása csökkent, és jóval kevesebb helyen volt észlelhető, de az előbbiekkal azonos specifikus immunoreakciókat továbbra is láthattuk a nyálmirigysejt-idegvégződés kapcsolódási területeknek megfelelő membránszakaszokon (*10D Ábra*). Hasonló megoszlásban figyelhettünk meg immunreakciót akkor is, amikor anti-VIP szérummal inkubáltuk a nyálmirigymintákat, ami a paraszimpatikus idegvégződéseknek megfelelő lokallizációt erősíti meg (*10E Ábra*). Ezzel szemben a kontroll, egészséges egyedekből származó szérum csak elszórt, halvány immunreaktivitást mutatott, mely nem csoportosult egyetlen specifikus kötőhelynek megfelelően sem. Az anti-m3AChR (SS) ellenanyag specifikitását egyértelműen igazolta az inhibíciós kísérlet, mivel az antigénként használt m3AChR₂₁₃₋₂₂₈ peptid teljes mértékben gátolta a *10C Ábrán* látható specifikus ellenanyag kötődést (*10F Ábra*).



10. Ábra. A részleteket lásd a következő oldalon

10. Ábra. Egészséges emberi nyálmirigyszövet indirekt elektron-mikroszkópos immunhisztokémiai festődése SS szérummal és tisztított m3AChR₂₁₃₋₂₂₈ ellenanyaggal

10A: Elsődleges antitest: SS-s betegek széruma. A kép egy epithelsejt és egy idegvégződés kapcsolódását ábrázolja. A kép jobb oldalán két axonvégződés látható, fekete négyzettel jelölve, bennük a szinaptikus vesiculák. Bal oldalon helyezkedik el az epithelsejt, benne a cytoplasmaticus szekréción vesiculákkal (csillaggal jelölve). A két sejt találkozási felszíne mentén, a neuro-epithelialis junctióban, kis, pontszerű, pettyekhez hasonló, specifikus immunreakciónak megfelelő képletek mutatkoznak (nyilakkal jelölve). Lépték: 500 nm.

10B: Az A panel erősebb nagyítással. Vastag nyilak jelzik az említett specifikus immunreaktivitást, vagyis a SS-s betegszérum bekötődését a synapticus membránhoz. Mivel az epithelsejt és az idegvégződés hullámos felszínnel, interdigitáló módon kapcsolódik egymáshoz, a metszeten több, egymástól függetlennek látszó módon jelenik meg ugyanazon a junctio körüli cytoplasma több szakasza, melyet csillaggal jelöltünk. Az axonvégzódések (négyzettel jelölve) belsejében levő synapticus vesiculumokra vékony nyilak mutatnak. Lépték: 200 nm.

10C: Két idegvégződés látható, csillaggal jelölve, bennük a vékony nyilakkal jelzett synapticus vesiculák. A bal oldali axon egy acinaris epithelsejt (a) membránjához kapcsolódik, a sejtben láthatók a secretiós granulumok; a jobb oldali idegvégződés egy myoepithelialis sejthez kapcsolódik (m). Mindkét nyálmirigy-sejttípus postsynapticus membránján megfigyelhetők az előbbieken ismertetett specifikus immunreaktív képletek, melyeket vastag nyilak mutatnak. Lépték: 1 μ m.

10D: Elsődleges antitest: tisztított, anti-m3AChR₂₁₃₋₂₂₈-monospecifikus ellenanyag. Az epithelsejt és a hozzá kapcsolódó idegvégződés találkozási felszínén nyilakkal jelöljük a specifikus immunreaktivitást mutató képleteket. Lépték: 500 nm.

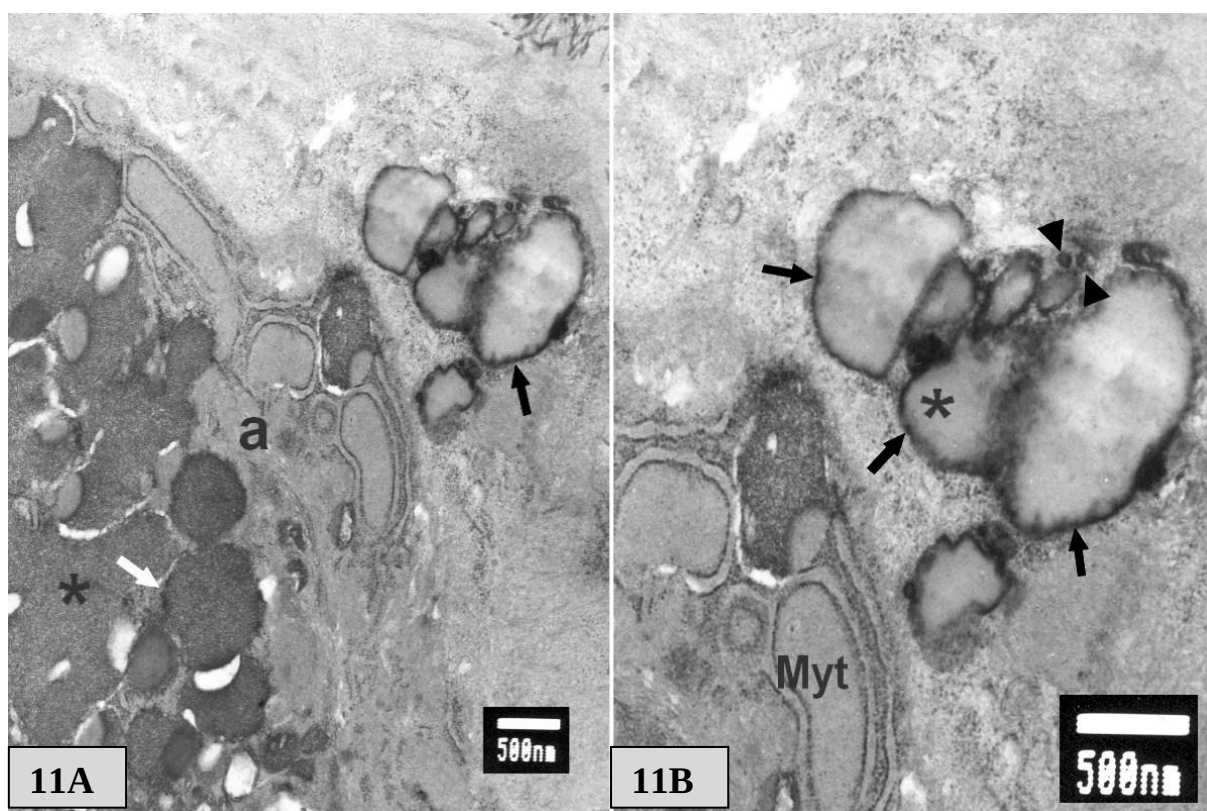
10E: Vasoactiv intestinalis polypeptiddel (VIP) reagáló primer antitesttel végzett vizsgálat képe. A kép felső részén látható idegvégződésben levő, VIP-et tartalmazó synapticus vesiculumokra nyilak mutatnak. Lépték: 1 μ m.

10F: Inhibíciós kísérlet során kapott kép. Ennek során a tisztított, anti- m3AChR₂₁₃₋₂₂₈-ellenanyag alkalmazása során blokkoltuk az antigénkötő helyet m3AChR₂₁₃₋₂₂₈ peptiddel történő előinkubációval. Acinaris sejt (a) és idegvégződés (csillag), benne synapticus vesiculumok (nyilak). Az előző paneleken megfigyelhető specifikus immureaktív képletek ezen a képen nem láthatók. Lépték: 1 μ m.

4.1.3.2.2. Direkt immun-elektron-mikroszkópos immunhisztokémia

Ezen vizsgálatok során SS-s betegekből nyert kisnyálmirigy szövetmintákon vizsgáltuk anti-humán IgG hozzáadásával, hogy *in vivo* bekötődött immunglobulin-G antitestek kimutathatók-e, és ha igen, milyen ultrastrukturális lokalizációban. Amint már a fénymikroszkópos immunhisztokémia során is láttuk, és várható is volt, kiterjedten láthattunk

nyálmirigyszövetrel reagáló immunglobulin-G lerakódást a mintákban, különösen az acinussejtek sejtmembránja mentén, valamint halványabban és ritkábban cytoplasmaticusan is, elsősorban a secretiós granulumoknak megfelelően. (11A Ábra). Kiemelendő, hogy egyértelmű specifikus immunreakciót jelző festődést tapasztaltunk a neuro-epithelialis junctionnak megfelelően, jelezvén, hogy a postsynapticus membránhoz specifikusan kötődnek autoantitestek SS-s betegekben *in vivo* (11B ábra).



11. Ábra. Direkt elektron-mikroszkópos immunhisztokémiai képek SS-es betegek kisnyálmirigy biopsziás szövetmintái és anti-humán IgG közvetlen reakciója eredményeképpen

11A. Nyálmirigy acinussejt (a), benne számos, összefolyó secretiós granulum (csillag), valamint a kép jobb felső részén pedig egy kapcsolódó idegvégződés metszete. A kapcsolódási felszínükön számos immunreaktív pontszerű képlet, fekete nyíllal jelölve. Néhány secretiós granulumon is látható enyhébb immunreaktivitás (fehér nyíl). Lépték: 500 nm.

11B. Egy acinussejt és a hozzá kapcsolódó idegvégződés (csillag) látható erősebb nagyítással. Az acinussejt cytoplasmájában mytochondrium (Myt) helyezkedik el. A nyilak az immunreaktív, specifikusan festődő képletekre mutatnak a synapticus részen. Két további specifikus festődést láthatunk a synapticus vesiculumnak valamint az axolemma egy szegmensének megfelelően (nyílheggyel jelölve). Lépték: 500 nm.

4.1.3. Anti-m3AChR antitestek valamint pszicho-szociális tényezők szerepe a sicca tünetek pathogenesisében primer és secunder SS-ben

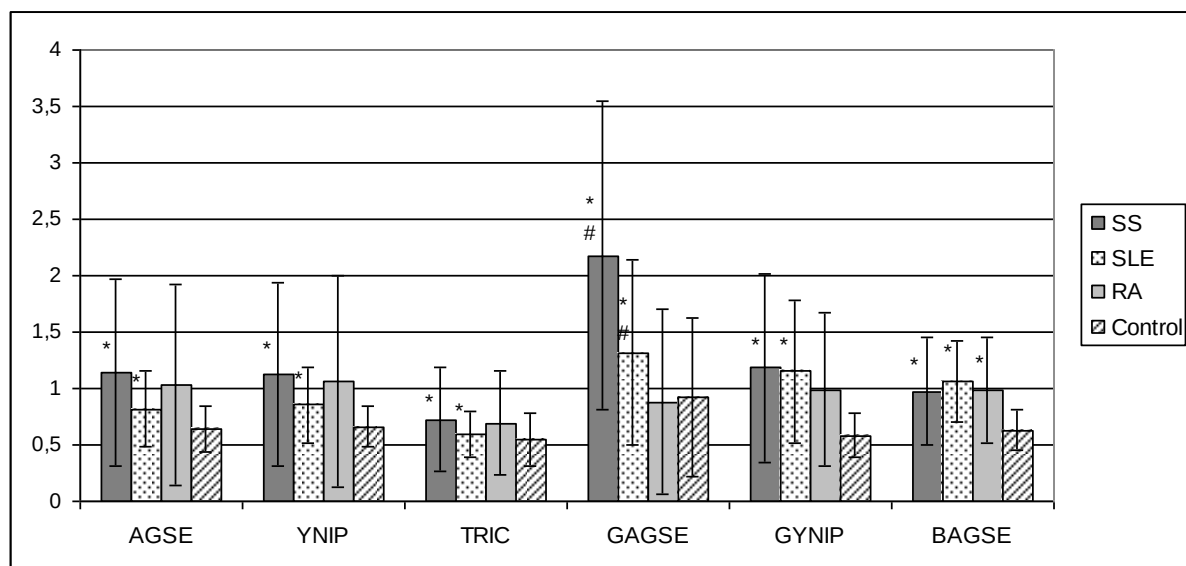
4.1.3.1. Anti-m3AChR ELISA vizsgálatok

Amint a 3.1.3. alfejezetben részleteztem, háromféle formában készítettük el a vizsgálandó antigén-determináns szekvenciákat. A különböző antigénekkal végzett ELISA vizsgálatok eredményeit a 12. és 13. Ábrán mutatjuk be. Előbbin az átlagos OD értékek, az utóbbin az adott antigénnel szemben a határértéket meghaladó antitest-titerrel rendelkező (antitest-pozitív) betegek arányát tüntettük fel. A szintetikus peptid formában elkészített három antigén közül az AGSE (második extracelluláris hurok) és az YNIP (harmadik extracelluláris hurok) peptid elleni átlagos OD érték is szignifikánsan magasabb volt a pSS-es és az SLE-s betegcsoportban, mint az egészséges kontrollokban, de az RA-s betegek nem mutattak szignifikáns eltérést. A három betegcsoport között ugyanakkor a peptid-antigénnel végzett vizsgálatok nem tudtak különbséget tenni.

A GST-fúziós formák közül mindkét antigén elleni antitestek átlagos OD értéke szignifikánsan magasabb volt pSS-ben és SLE-ben, mint egészségesekben, hasonlóan a szintetikus peptidekhez, azonban az anti-GST-AGSE antitestek az RA-s betegekhez képest is nagyobb mennyiségben voltak kimutathatók pSS-ben és SLE-ben. Így a jelen vizsgálatok is megerősítették régebbi eredményeinket, hogy a GST-fúziós fehérje előnyösebb antigén az ELISA vizsgálatokhoz, mint az önmagában használt szintetikus peptid. A BSA-konjugált peptidek a szintetikus peptidekhez hasonló diszkriminatív potenciált mutattak, ahogy ez a 12. és 13. Ábrán látható. Ugyanakkor az intracelluláris TRIC szakasz csak a betegek viszonylag kis hányadában bizonyult antigenikusnak, így az ellene kimutatott antitestek nem tarthatók egyik betegségben sem a pathogenesis tényezőinek.

Ha nem az átlagos OD-k, hanem a pozitivitást mutató betegek aránya alapján hasonlítottuk össze az egyes csoportokat (13. Ábra), akkor az előzőekben említett különbségek megerősítésén túl azt tapasztalhattuk, hogy az anti-GST-YNIP antitestek prevalenciája nemcsak – az anti-GST-AGSE-hez hasonlóan – RA-hoz képest emelkedett a másik két betegcsoportban, hanem a pSS-s és SLE-s betegeket is el tudta különíteni, mivel pSS-ben az SLE-sekhez képest is nagyobb gyakorisággal lehetett kimutatni őket. Így összefoglalásképpen azt mondhatjuk, hogy a rövid szintetikus peptidekkel végzett ELISA kísérletek viszonylag nagy specificitással, de alacsony szenzitivitással tudtak m3AChR elleni antitesteket kimutatni, míg akkor, ha GST-vel fuzionáltuk az antigenikus epitópot, akkor ez jelentősen megnövelte a GST-YNIP szakasz elleni antitestek kimutatásának szenzitivitását, a specificitás megőrzése mellett. A BSA-val történő többszörös konjugáció ugyanakkor nem növelte az ELISA vizsgálat szenzitivitását a szintetikus peptidhez képest (7. Táblázat). Emellett ezen a kohorszon is kiszámoltuk az egyes antigének specificitását a SS valamint SLE és RA elkülönítésére. A 7. Táblázatban látható, hogy az értékek jellemzően alacsonyabbak, mint korábban a GST-KRSE fehérjénél kapott számadatok: a szenzitivitás és specificitás legkedvezőbb kombinációját a GST-YNIP fehérjénél kaptuk, míg a GST-AGSE mérsékelten magas szenzitivitás mellett igen kevésbé specifikusnak bizonyult minden egyéb csoporttal

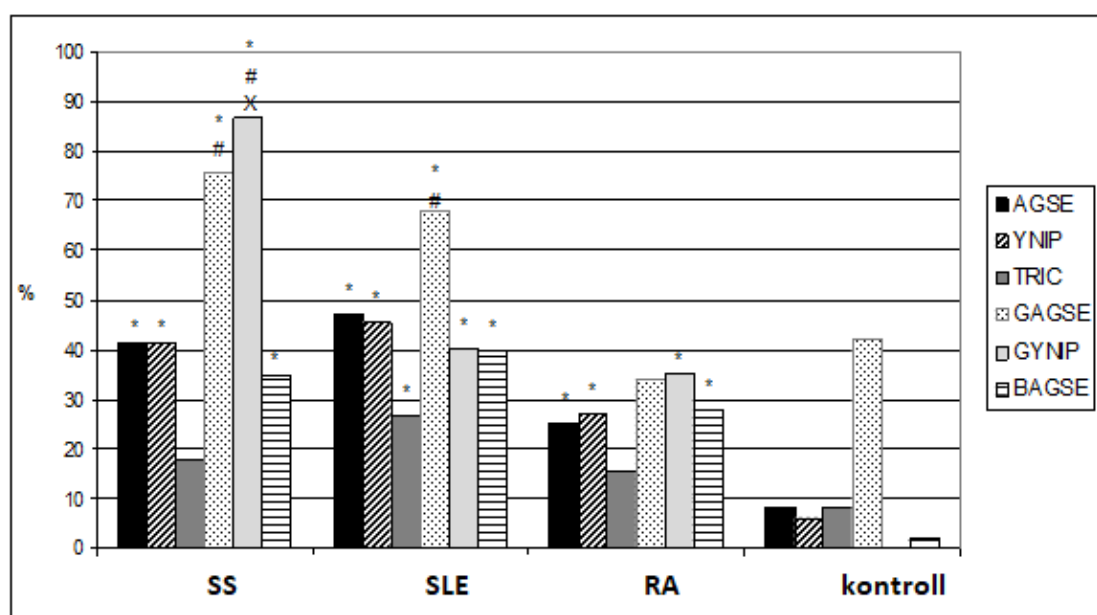
történt összehasonlításban. Specifitás vonatkozásában a szintetikus peptidek is jobban teljesítettek, de alacsony szenzitivitás mellett.



12. Ábra. Primer SS-s, SLE-s és RA-s betegekből és egészséges kontrollokból származó szérumok immunreakciója különböző m3AChR peptidekkel, GST-fúziós fehérjékkel és BSA-konjugált peptiddel.

Az oszlopok magassága az egyes csoportok átlagos OD értékét mutatja, a „bajusz” vonalak a standard deviációt jelzik.

GAGSE: GST-AGSE fúziós fehérje; GYNIP: GST-YNIP fúziós fehérje; BAGSE: BSA-AGSE többszörösen konjugált peptid. SS: Sjögren szindróma, SLE: Szisztémás lupus erythematosus, RA: Rheumatoid arthritis. * $p < 0.05$ vs kontroll; # $p < 0.05$ vs RA



13. Ábra. Az anti-m3AChR antitest-pozitivitás gyakorisága az egyes betegcsoportokban és a kontrollokban a különböző szintetikus m3AChR peptidekkel, valamint GST-fúziós fehérjékkel és BSA-konjugált peptiddel végzett ELISA vizsgálatokban.

A rövidítések megegyeznek a 12. Ábrán írtakkal. * $p < 0.05$ vs kontroll; # $p < 0.05$ vs RA; x $p < 0.05$ vs SLE

	Szenzitivitás (vs kontroll)	Specifititás pSS vs kontroll	Specifititás pSS vs SLE	Specifititás pSS vs RA
AGSE	41,2	92,0	51,3	74,9
YNIP	41,2	94,0	54,4	73,8
TRIC	17,6	92,0	71,5	85,3
GST-AGSE	75,6	58,1	32,8	68,5
GST-YNIP	86,5	100,0	59,1	65,5
BSA-AGSE	34,7	98,2	59,1	72,3

7. Táblázat. Az egyes antigénekkal végzett ELISA vizsgálatok szenzitivitása és specifititása a pSS-s betegek és a többi vizsgálati csoport elkülönítésére.

pSS: Primer Sjögren szindróma. Egyebekben a rövidítések megegyeznek a 12. Ábránál írtakkal.

4.1.4.2. A sicca tünetek korrelációja egyéb klinikai valamint mentális paraméterekkel

A vizsgálat másik részében az SLE-hez ill. RA-hoz társuló sicca tünetcsoport háttérének komplex vizsgálatát végeztük a klinikai tünetek, immunszerológiai eltérések, ezen belül az anti-m3AChR antitestek, valamint különböző mentális paraméterek analízisével. A 3.1.3.1. pontban leírtak szerint definiált sicca tünetcsoport viszonylag gyakori volt mindkét szisztémás autoimmun betegségben: RA-ban 14 (21.5%), SLE-ben 27 (26.2%) betegben igazoltuk fennállását. Számos paraméter tekintetében hasonlítottuk össze a sicca és nem-sicca betegeket. A főbb eltéréseket a 8. Táblázatban emeltük ki: SLE+sicca betegek körében gyakoribb volt az organikus agyi pszichoszindróma (organic brain syndrome), a stroke és az anti-SSA-pozitivitás, míg a nephritis és a lymphopenia ritkább volt, mint a sicca tünetcsoportot nem mutató SLE-s betegek körében, de a szignifikancia értékek minden esetben 0,05 és 0,1 között voltak (8. Táblázat). Az SF-36 teszt segítségével mért életminőségi paraméterek közül több is szignifikánsan rosszabb (magasabb) értéket adott az SLE+sicca betegek között, ami arra utalt, hogy kapcsolat van a fizikai teljesítőképesség szubjektív megélése, a beteg által tapasztalt vitalitás, a társadalmi funkcionálás és a mentális egészség, valamint a sicca tünetek előfordulása között SLE-ben. A FACIT fáradékonysági skála értékei ugyanakkor hasonlóak voltak a két SLE-s alcsoport között.

SLE-vel szemben RA-ban – a magasabb életkort kivéve – nem találtunk olyan demográfiai, klinikai vagy mentális (SF-36-tal ill. FACIT skálával mért) egészségi paramétert, ami a sicca tünetcsoport kialakulásával korrelált volna. Végül, bár az anti-m3AChR antitestek – elsősorban a második és a harmadik extracelluláris hurokra specifikusak – kimutathatók voltak az SLE-s és RA-s betegek egy részében is, ezen antitestek pozitivitása nem függött össze a sicca tünetek előfordulásával, így ezek pathogenetikai szerepét nem tudtuk megerősíteni jelen vizsgálataink alapján.

SLE	Nem-sicca (n=76)	Sicca (n=27)	p
Klinikai jellemzők	%	%	
organikus agyi szindróma	1.3	11.1	0.056
stroke	0	7.4	0.068
anti-SSA-pozitivitás	45.9	62.9	0.098
nephritis	34.6	18.5	0.091
lymphopenia	57.3	37	0.056
SF-36	átlag		p
fizikai szerep	39.33	35.05	0.081
vitalitás	46.71	41.70	0.005
társadalmi funkcionálás	42.68	38.04	0.041
mentális egészség	42.12	36.82	0.048
mentális kompozit score	44.01	38.52	0.035

8. Táblázat. A sicca tünetcsoporttal rendelkező ill. nem rendelkező SLE-s betegek egyes paramétereinek összehasonlítása.

A táblázatban a szignifikáns (vastag betűvel) ill. közel szignifikáns különbségeket mutató paramétereket emeltük ki.

4.2. A klinikai képet alakító pathogenetikai eltérések vizsgálata SLE-ben

4.2.1. A galektin-1 szerepe az SLE-ben észlelhető T-sejt dysfunctio kialakításában

4.2.1.1. Az endogén Gal-1 expressziója és az exogén Gal-1 iránti apoptotikus érzékenység SLE-s betegek aktivált T-sejtjeiben

Ahogy említettem, célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk SLE-ben a Gal-1, mint egy fontos immunregulátor fehérje hatásait. A Gal-1 az aktivált T-sejtek apoptosist okozza, és

SLE-ben ismert, hogy az apoptózis-reguláció jelentős zavarokat szenved, ezért indokoltnak tartottuk megvizsgálni SLE-s betegekből származó aktivált T-sejtek exogén Gal-1 hatására bekövetkező apoptózisát. Mivel a Gal-1 intracellulárisan, *de novo* is expresszálódik, egyúttal a Gal-1 mRNS szintjét is mértük SLE-s T-sejtekben, aktiváció után.

A méréseket 14 SLE-s beteg mintáin végeztük el, akiknek aktív betegsége zajlott, és közülük 9-nél a méréseket megismételtük inaktív betegség állapotában, miután kezelésünk hatására a betegség remisszióba került. Az adatokat 16 egészséges kontrolléval hasonlítottuk össze. A Gal-1 mRNS qRT-PCR módszerrel mért expresszióját a *14A ábra* mutatja be. Aktív betegség idején vett mintákban a Gal-1 mRNS mennyisége szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a kontrollokban, míg nyugalomban levő betegség idején levett mintákban a Gal-1 mennyisége szignifikánsan megnövekedett, és a kontrollokéhoz hasonló szintre emelkedett. Az aktivitás szerint bontott két betegcsoport között a különbség egyértelműen szignifikáns volt, és ez a Gal-1 expresszió betegségaktivitás-függőségére utal, még akkor is, ha a SLEDAI-2K-val vagy az anti-dsDNA titerrel történő korreláció-analízis nem hozott ki szignifikáns összefüggést (nem bemutatott adat).

Az exogén Gal-1-gyel szemben mutatott apoptotikus reakciót ko-kultúra kísérletekkel vizsgáltuk. 20 aktív és 10 remisszióba hozott beteg és 20 egészséges kontroll személy mintáin végeztük el a méréseket. A *14B ábrán* látható, hogy aktív betegség idején az SLE-s aktivált T-sejtek igen kevésbé reagálnak a Gal-1 apoptotikus hatására, míg az apoptózis-érzékenység a betegség megnyugvása után helyreáll, vagyis hasonlóvá válik az egészséges kontrollokhoz. Összefoglalva, aktív SLE idején az aktivált T-lymphocyták kevés Gal-1-et termelnek és kevésbé is reagálnak az exogén Gal-1 apoptotikus (vagyis immunregulátor) hatásaira, míg inaktív betegség idején ezen eltérések megszűnnek.

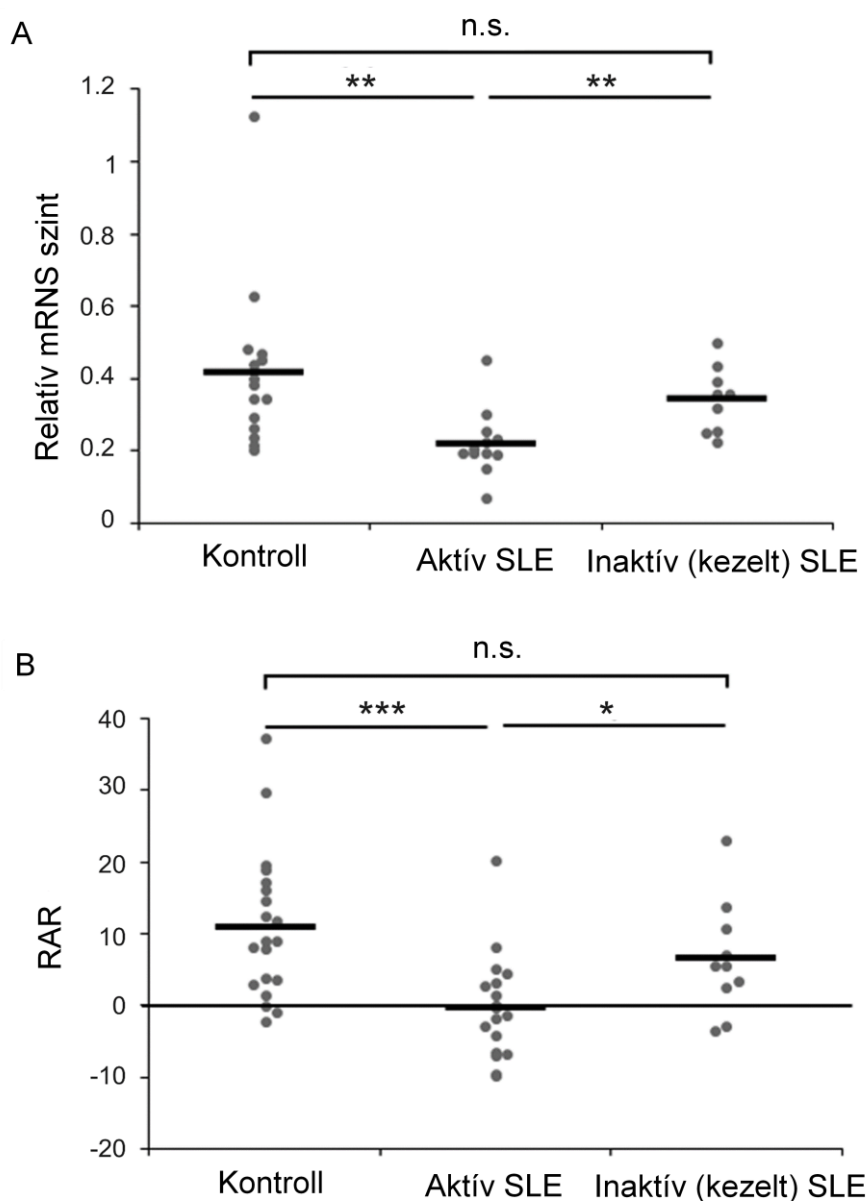
4.2.1.2. A galektin-1 *de novo* szintézise és lokalizációja Jurkat-sejtekben, valamint humán és egér T-sejtekben

Az előző alfejezetben láthattuk, hogy az exogén Gal-1-re adott csökkent apoptotikus válasz és az endogén Gal-1 expresszió azonos módon változik SLE-ben. E megfigyelés hátterének további vizsgálatára modellkísérleteket terveztünk Jurkat T-sejt vonalon, illetve humán és egér perifériás T-sejteken. Mivel ellentmondások vannak a közleményekben a tekintetben, hogy az endogén Gal-1 szekretálódik-e az aktivált T-sejtekből, először ezt a kérdést vizsgáltuk meg.

A Gal-1 *de novo*, intracelluláris expresszióját Gal-1 transzgénikus Jurkat sejteken vizsgáltuk. Először Western blotting-gal ellenőriztük a transzfekciót, mely szerint a Gal-1 cDNA-sel transzfektált Jurkat sejtek (J^{Gal}) expresszálták, míg a nem-transzfektált és a mock-transzfektált (J^{mock}) sejtek nem expresszálták a Gal-1-t (*15A ábra*). Majd konfokális mikroszkóppal megvizsgáltuk, hogy az újonnan szintetizált Gal-1 szekretálódik-e a sejtből, és azt találtuk, hogy az kizárólag intracellulárisan figyelhető meg a plazmamembrán közelében összegyűlve, és nem jelenik meg a (permeabilizálatlan) sejtek felszínén (*15B ábra*).

Ezt követően humán és egér perifériás vér T-sejteken vizsgáltuk a Gal-1 expresszióját (*16. ábra*). Mind a humán, mind az egér T-sejteken megfigyelhettük, hogy nyugalmi állapotban nem, stimulálás után viszont expresszálták a Gal-1-t (*16A ábra*). Konfokális mikroszkópiával

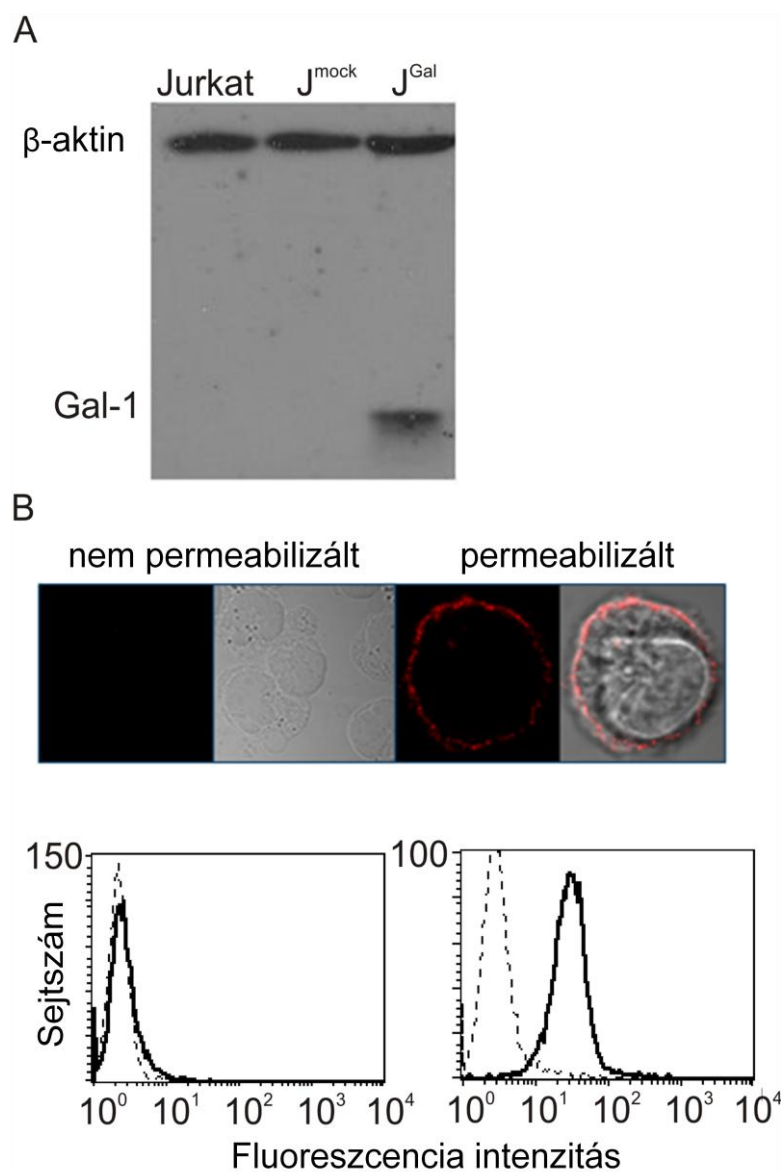
igazoltuk, hogy az aktivált T-sejtekben a Jurkat sejtekhez hasonlóan a Gal-1csak intracelluláris lokalizációt mutatott (16B ábra).



14. ábra. SLE-s betegekből és egészséges kontrollokból származó aktivált T-sejtek endogén Gal-1 termelése és exogén Gal-1-gyel szembeni apoptotikus érzékenysége.

A) Az aktivált T-sejtekben expresszálandó Gal-1 relatív mRNS expressziója (meghatározását lásd a 3.2.1.4. alfejezetben). Aktív SLE, $n=14$, inaktív (kezelt) SLE: $n=9$, egészséges kontroll: $n=16$, $p<0,01$

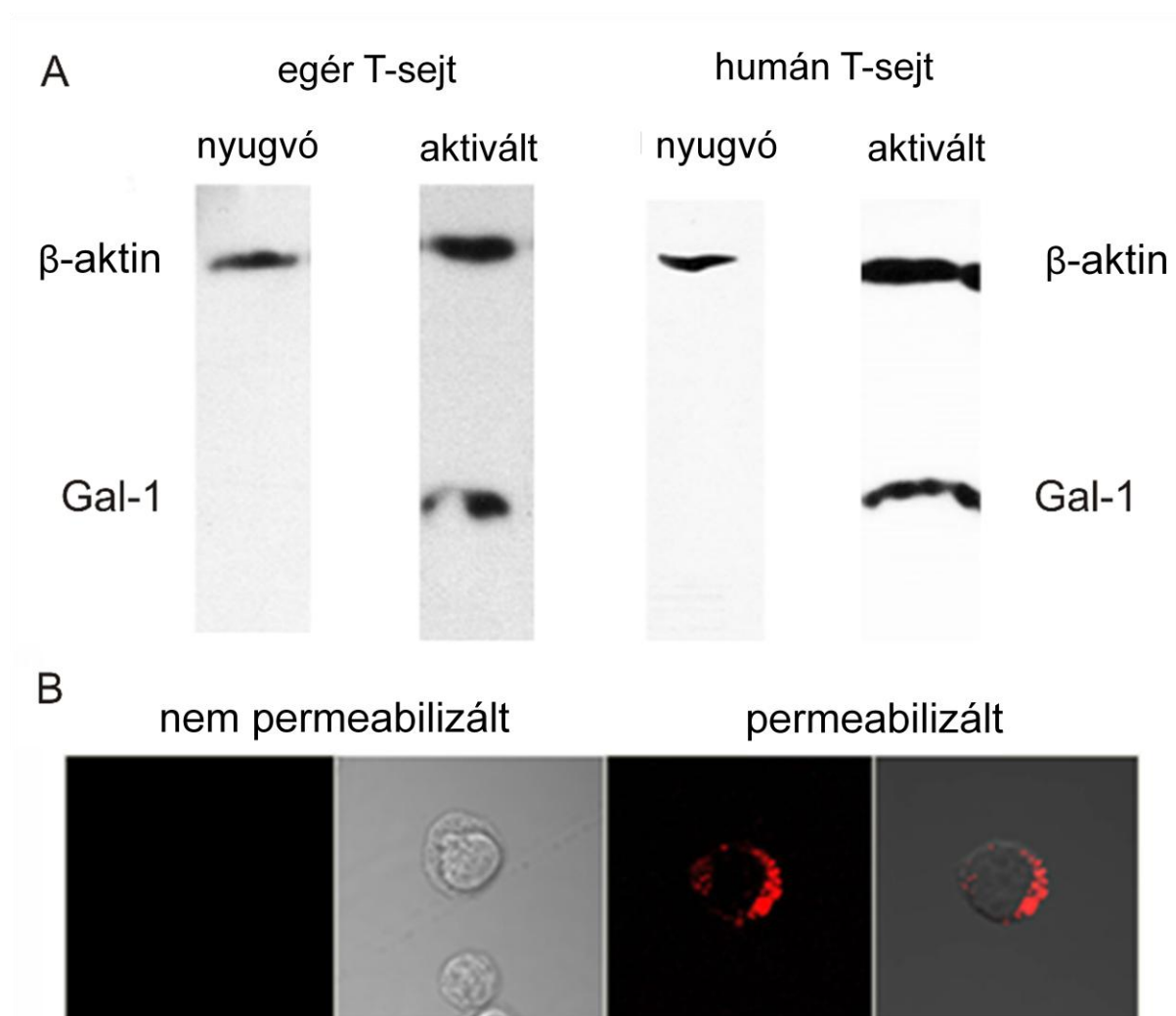
B) Az aktivált T-sejtek relatív apoptózis rátája (RAR – számítását lásd a 3.2.1.3. alfejezetben). Aktív SLE: $n=20$, inaktív SLE: $n=10$, egészséges kontroll: $n=20$. $p^{***}<0,001$, $p^{*}<0,05$



15. ábra. A Gal-1 transzgénikus Jurkat sejtek expresszálnak, de nem szekretálnak Gal-1-t

A) Western blotting vizsgálat: csak a Gal-1 transzgenikus sejtek (J^{Gal}) lizátumában mutatható ki a Gal-1 protein, nem-transzfectált és a mock-transzfectált (J^{mock}) sejtekben nem.

B) J^{Gal} sejtek konfokális mikroszkópos vizsgálata permeabilizálatlan és Triton X100-zal végzett permeabilizálás után. Piros fluoreszcencia: NorthernLights557-vel jelölt másodlagos antitest (szamár anti-egér IgG). Alul reprezentatív hisztogramok mutatják be a permeabilizálatlan (bal oldal) és permeabilizált (jobb oldal) sejtek áramlási citometriával mért fluoreszcens intenzitását. Szaggatott vonal: elsődleges antitest nélküli, csak másodlagos antitesttel jelölt kontroll; folyamatos vonal: anti-Gal-1 + másodlagos antitesttel jelölt minta



16. ábra. A Gal-1 expressziója és lokalizációja humán és egér perifériás T-sejtekben nyugalomban és aktiváció után.

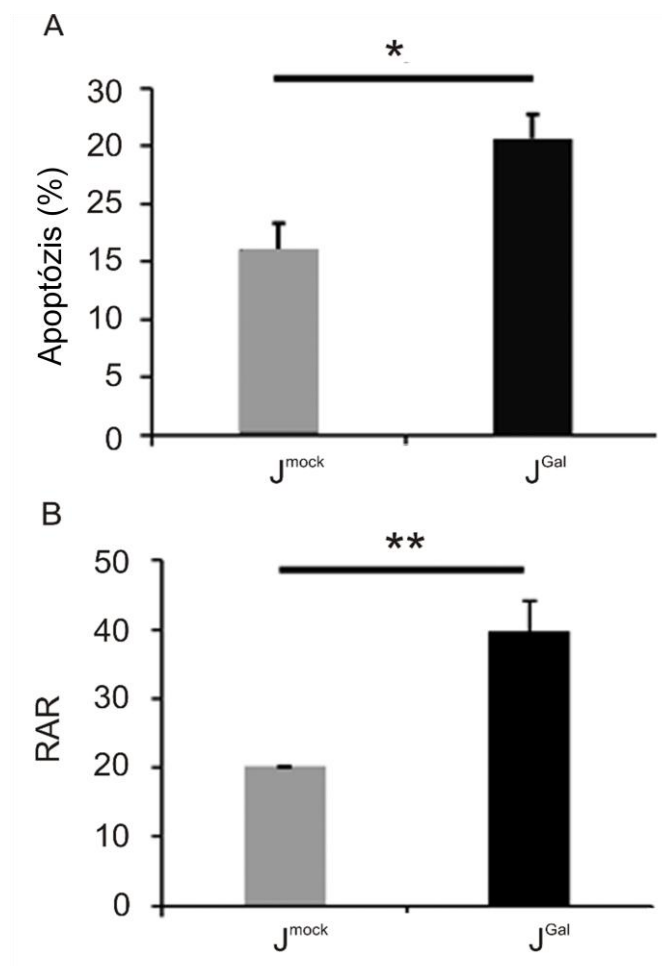
A) Nyugvó (bal csík) és aktivált (jobb csík) T-sejtek Gal-1 expressziója Western blotting-gal vizsgálva egér eredetű (bal panel) ill. humán (jobb panel) sejteken.

B) De novo szintetizált Gal-1 celluláris lokalizációjának vizsgálata aktivált humán T-sejteken nem-permeabilizált állapotban és Triton X100-zal végzett permeabilizálás után konfokális mikroszkóppal. A monoklonális antitest csak permeabilizálás után reagál a Gal-1-gyel, jelezve annak intracelluláris lokalizációját. Piros fluoreszcencia: NorthernLights557-vel jelölt másodlagos antitest (számár anti-egér IgG).

4.2.1.3 Az exogén Gal-1-re adott apoptotikus válasz és az intracelluláris Gal-1 közötti kapcsolat vizsgálata

SLE-s T-sejteken végzett vizsgálataink alapján felvetődik a kérdés, hogy az egyidejűleg tapasztalt csökkent endogén Gal-1 expresszió és exogén Gal-1-gyel szembeni apoptózis érzékenység csak párhuzamos jelenségek, vagy felmerül-e ok-okozati kapcsolat közöttük. Annak vizsgálatára, hogy vajon az aktivált T-sejtek által termelt endogén Gal-1 szerepet játszik-e az exogén Gal-1 által indukált apoptózisban, Jurkat sejteken és Gal-1 génkiütött egerek fehérvérsejtjein végeztünk kísérleteket.

Gal-1-t expresszáló HeLa sejteket tenyésztettünk ko-kultúrában J^{mock} vagy J^{Gal} Jurkat sejtekkel, illetve a Jurkat sejtvonalhoz szolubilis, rekombináns Gal-1-t adtunk. Eredményeinket a 17. ábra mutatja be. Mind a szolubilis (17A ábra), mind a sejthez kötött Gal-1 (17B ábra) sokkal kifejezettebb apoptózis választ indukált azon Jurkat sejtekben, melyek maguk is expresszálták a Gal-1-t.



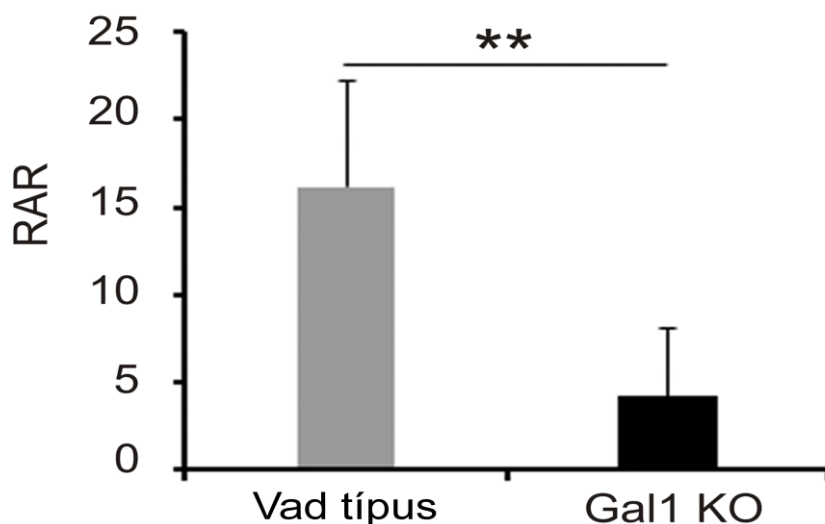
17. ábra. A Gal-1-et expresszáló Jurkat sejtek érzékenyebbek az exogén Gal-1 apoptotikus hatására, mint az endogén Gal-1 Jurkat sejtek.

(A) Rekombináns Gal-1 apoptotikus hatása J^{mock} vagy J^{Gal} Jurkat sejtekre 24 órás inkubáció után. $n=3$, $p^*<0.05$.

(B) A J^{mock} és J^{Gal} sejteket ko-kultúrában tenyésztettük üres vektorral ($\text{HeLa}^{\text{mock}}$), vagy Gal-1-gyel transzfektált (HeLa^{Gal}) sejtekkel 16 órán át. Az apoptotizált Jurkat sejtek arányát (relatív apoptózis arány: RAR) Annexin V festéssel határoztuk meg (lásd 3.2.1.3. alfejezet). $n=3$, $p^*<0.05$

Egy másik módon is igyekeztünk alátámasztani a kapcsolatra vonatkozó hipotézisünket: Gal-1 génkiütött (Gal-1 KO) ill. vad típusú egerek véréből izolált aktivált T-

sejtek apoptosist vizsgáltuk exogén Gal-1 hatására. Az aktivált T-sejtek apoptózist Gal-1-et termelő és szekretáló vad típusú mesenchymalis őssejtekkel (BMMSC^{wt}) indukáltuk ko-kultúrában. Kontrollként Gal-1 géniüti MSC-eket (BMMSC^{gal-1/-}) alkalmaztunk, mint effektor sejtek. Amint a 18. ábrán látható, a Gal-1 KO egerek T-sejtjei szignifikánsan csökkent apoptosissal reagáltak az MSC-kötött Gal-1 hatására.



18. ábra. Gal-1 hiányában az exogén Gal-1 hatására bekövetkező T-sejt apoptosist jelentősen csökken egér aktivált T-sejtben.

Az apoptotizált Jurkat sejtek arányát Annexin V festéssel határoztuk meg. Az apoptózis mértékét a relatív apoptosist aránnyal (RAR) értékeltük (lásd 3.2.1.3. alfejezet). $n=3$, $p^{***}<0.01$

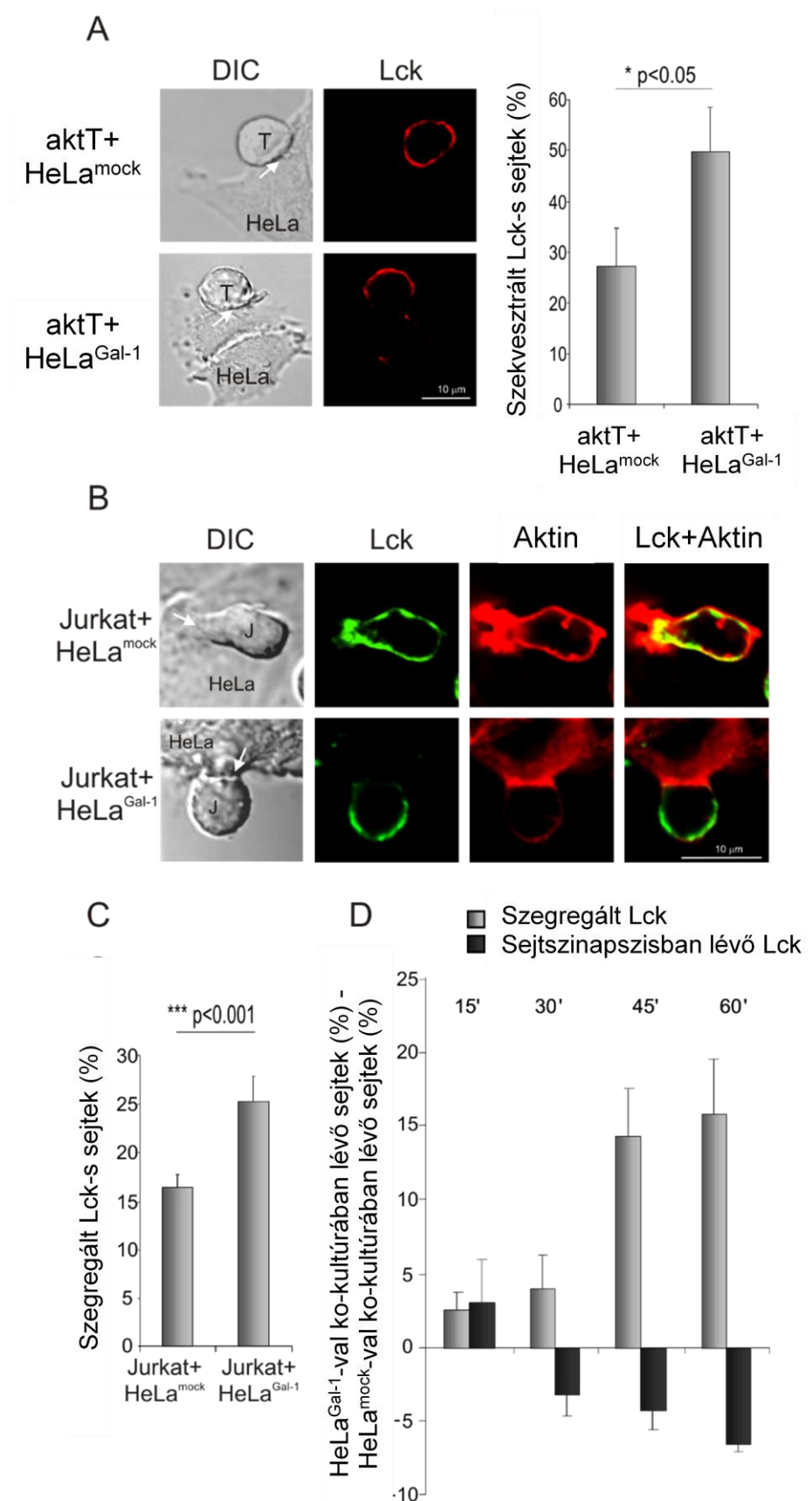
4.2.1.4. Az exogén Gal-1 kizárja az Lck-t az immunológiai szinapszishoz

Mint említettem, és ahogy saját kísérleteink is mutatták, az exogén, sejtfelületen expresszált Gal-1 gátolja az aktivált T-sejtek apoptosist. Az immunregulátor hatás mechanizmusának további vizsgálata érdekében kíváncsiak voltunk arra, hogy a T-sejt receptor jelátvitelében, valamint a Gal-1 indukált T-sejt apoptosistban fontos szerepet játszó tirozin-kináz enzim, az Lck működését hogyan befolyásolhatja a Gal-1, figyelembe véve azt is, hogy SLE-ben a T-sejt receptor jelátvitelének korai lépéseiben, és az immunológiai szinapszis felépülésében számos ponton mutathatók ki eltérések. Ezért megvizsgáltuk, hogyan befolyásolja az exogén Gal-1 az Lck fiziológiai kötődését az immunológiai szinapszishoz friss human mintákból származó ill. Jurkat sejtvonalból származó T-sejtben.

Kezeletlen Jurkat T-sejtben az Lck egyenletesen helyezkedik el a sejt teljes felületén a sejtmembránhoz kapcsolódva (ezen adatok a dolgozatban nincsenek bemutatva), valamint a Gal-1-t nem expresszálo HeLa^{mock} sejtekkel történt ko-kultúra során is az aktivált T-sejt nagy részében ilyen lokalizációt tapasztaltunk (19A Ábra). Amikor azonban HeLa^{Gal1}

sejtekkel végeztük a ko-kultúrát, azt tapasztaltuk, hogy az Lck az aktivált T-sejteknek az immunológiai szinapszistól távoli, ellentétes oldalán szekvesztrálódik, és eltűnik az immunológiai szinapsziszból. Szignifikánsan nagyobb arányban figyeltük meg a szekvesztráció jelenségét a HeLa^{Gal-1} ko-kultúrákban, mint a HeLa^{mock} kísérletekben (*19A ábra* diagramja).

Hasonló jelenséget figyeltünk meg Jurkat sejteket tartalmazó ko-kultúrákban is: az F-aktin akkumulációja jól jelölte a HeLa sejtek (mindkét típusú) és a Jurkat sejtek közötti szinapszisokat, de Gal-1-et expreszáló HeLa sejtek alkalmazása mellett szignifikánsan nagyobb arányban szekvesztrálódott az Lck a sejt szinapszistól távoli oldalára, mint a HeLa^{mock} ko-kultúrákban (*19B-C Ábra*). A szekvesztráció időbeli kinetikáját, melyet a *19D Ábrán* mutatunk be, az jellemzi, hogy a 15. percben még nem kezdődik el a folyamat, azaz nincs érdemi különbség a HeLa^{Gal-1} és a HeLa^{mock} sejtekkel végzett mérések között, majd ezután egyre nagyobb különbség alakul ki a Gal-1-expozíciónak kitett T-sejtek javára a szekvesztrálódott Lck-t mutató sejtek arányában. Különösen 30 és 45 perc között figyelhető meg egy nagy ugrás ebben a vonatkozásban, majd 60 perc után áll be a végleges állapot. Ezzel egyidőben a szinapszisban elhelyezkedő Lck-t mutató T-sejtek aránya egy kezdeti minimális emelkedés után folyamatos csökkenést mutat a HeLa^{Gal-1} –gyel végzett vizsgálatokban a HeLa^{mock} ko-kultúrához képest.



19. Ábra. A részleteket lásd a következő oldalon..

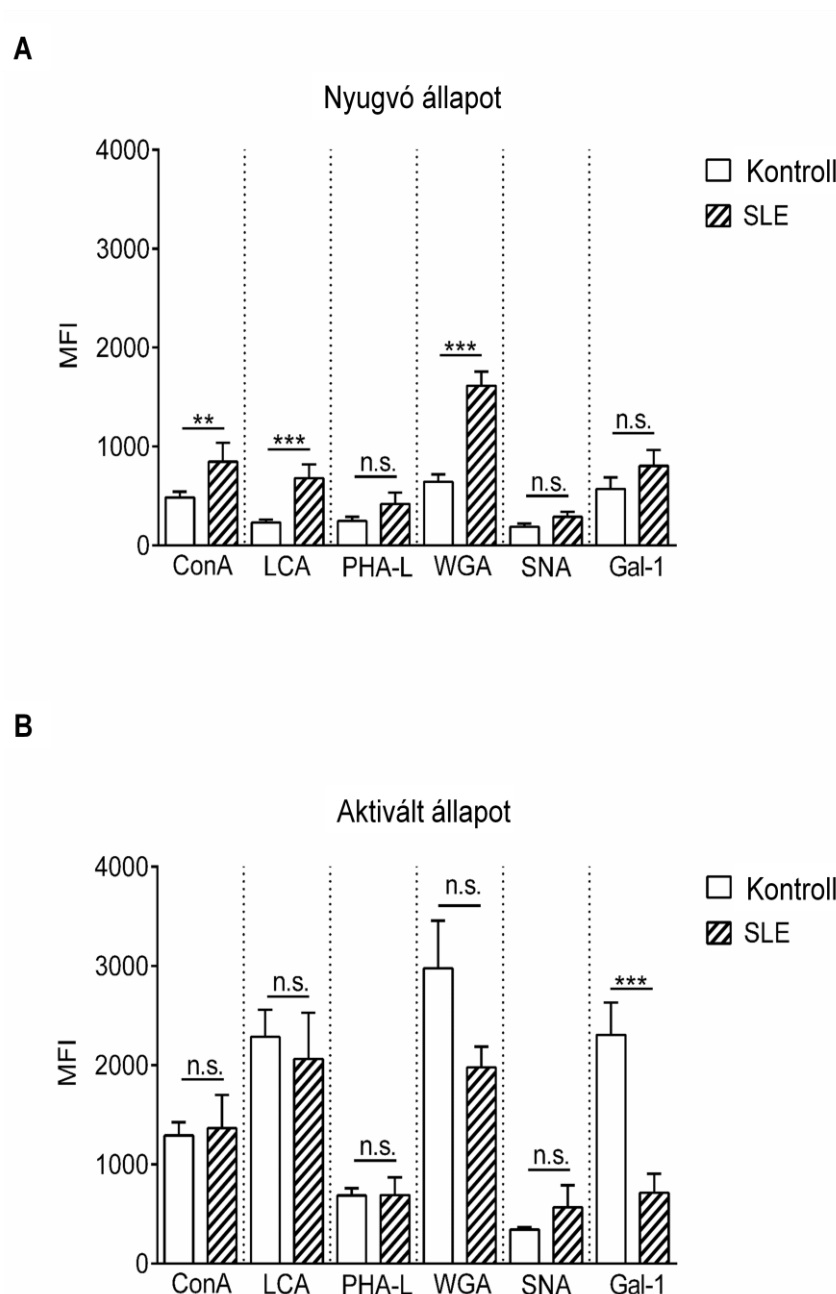
19. Ábra. HeLa sejt felszínén kifejeződő Gal-1 eltávolítja az Lck enzimet az immunológiai szinapsziszból

(A) Aktivált humán T-sejtek ill. (B) Jurkat T-sejtek ko-kultúrája Gal-1-t expresszáló ($HeLa^{Gal-1}$) és Gal-1 negatív ($HeLa^{mock}$) tumorsejtekkel. Az Lck-t az A panelen vörös, a B panelen zöld, míg a B panelen az F-actint vörös fluoreszcens festék jelzi. A confocalis mikroszkópos képeken az immunológiai szinapszist fehér nyíl jelzi (A,B panelek). Az A és C oszlopdiagramokon az Lck-szekvesztrációt mutató sejtek arányát mutatjuk be (átlag $\pm$ SD) Gal-1-termelő, illetve Gal-1-t nem termelő tumorsejtek jelenlétében. A folyamat időbeli lefolyását a ko-kultúra során a D panel mutatja. A részletek a 3.2.1.9. pontban olvashatók.

4.2.2. Sejtfelszíni glikozilációs mintázat és a lektinkötődés következményes eltérései T-sejteken SLE-ben

A sejtfelszíni glycoproteinek komplexitását, más szóval az N-glikom diverzitását, lektinkötési assay segítségével vizsgáltuk; ennek során növényi (ConA, LCA, WGA, PHA-L, SNA) vagy humán (Gal-1) lektinek sejtfelszíni kötődésének mennyiségét mértük áramlási citometriával. A lektinek specificitását az egyes szénhidrát komponensek iránt az 1. Ábrán és a 3. Táblázatban mutattuk be korábban.

Ami a nyugalmi állapotban levő T-sejtek felszíni lektinkötését illeti, az SLE-s betegekben származó T-sejtek szignifikánsan több ConA-t, LCA-t és WGA-t kötöttek, mint az egészséges kontrollok (20A Ábra). Ez arra utal, hogy SLE-s T-sejtek már nyugalmi állapotban nagyobb mennyiségben expresszálnak korai, mannózban gazdag szénhidrát oldalláncokat (ConA) (127, 183), biantennáris komplex N-glikánokon elhelyezkedő fukozilált mannóz szénhidrátokat (LCA) (184), valamint mind korai, mind komplex szénhidrátoknak megfelelő ún. hibrid típusú láncokban előforduló N-acetyl glükózaminokat, illetve szíálsavat (WGA) (185, 186), vagyis sejtfelszíni N-glikomjuk már nyugalmi állapotban változatosabb, komplexebb, mint az egészséges személyeké.



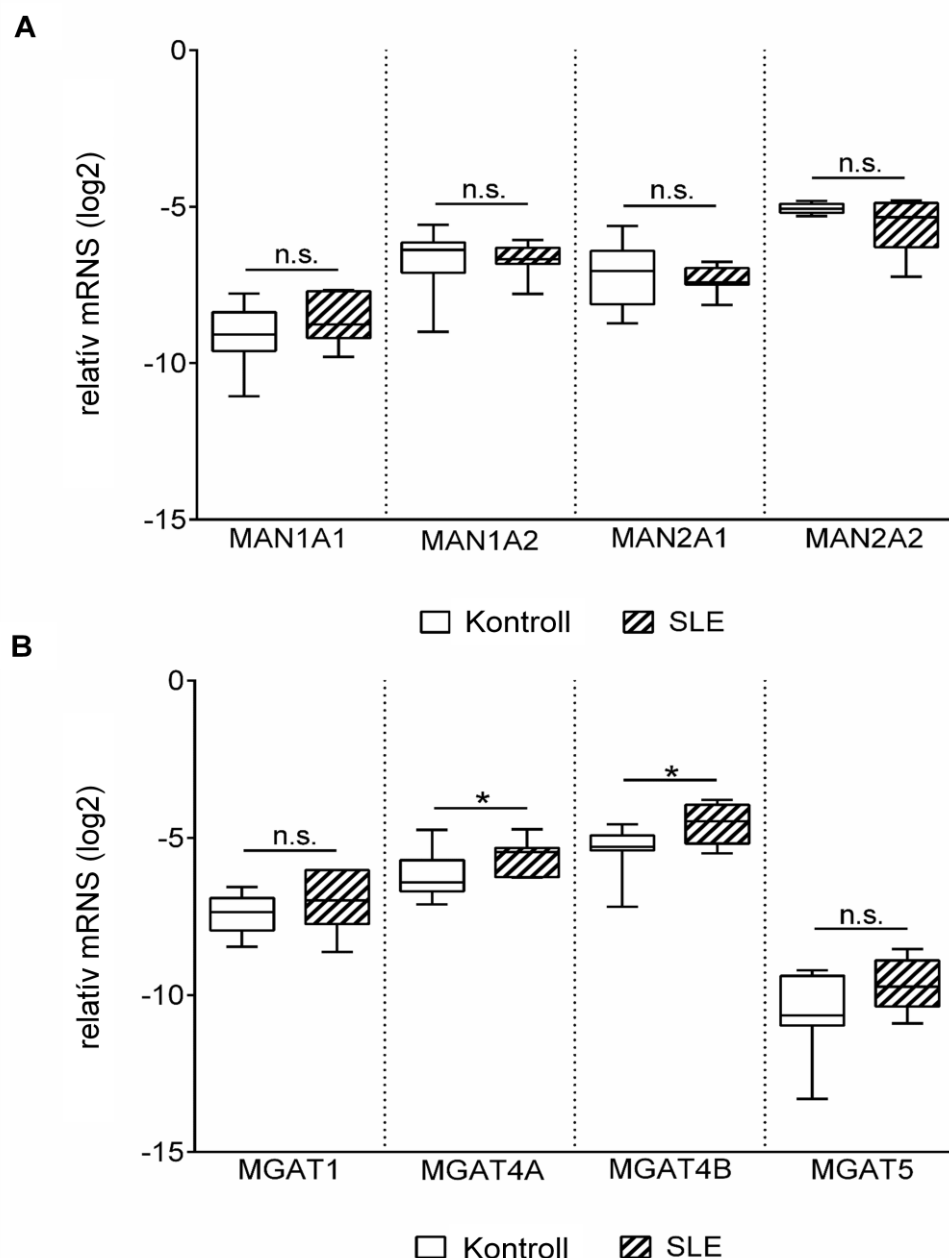
20. Ábra Lektinek kötődése SLE-s betegek és egészséges kontrollok T-sejtfelszínén nyugalmi állapotban, illetve aktiválás után.

A: Nyugalmi állapot, B: 1 $\mu\text{g/mL}$ phytohaemagglutinin L (PHA L) stimulálást követő aktivált állapot. Az oszlopok a fluoreszcein-izothiocianáttal jelölt CD3-pozitív T-sejtek áramlási citometriával mért medián fluoreszcens intenzitását (MFI) mutatják (átlag $\pm$ SEM). A lektinek teljes nevét és kötési specificitását az 1. Ábra és a 3. Táblázat mutatja. ns – nem-szignifikáns; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. SLE: $n=18$, egészséges kontroll: $n=19$

Általánosságban jellemző volt, hogy aktiváció után az egészséges kontrollok sejtfelszíni lektinkötő aktivitása megnőtt a nyugalmi állapothoz képest, vagyis fokozódott a sejtfelszíni

N-glikóm diverzitása. Ez a folyamat SLE-ben sokkal kisebb, egyes lektinek vonatkozásában elhanyagolható mértékű volt, így a Gal-1 esetén is. Így a nyugvó állapotban tapasztalt magasabb lektinkötési aktivitás aktivált állapotban úgy módosult, hogy az SLE-s betegek T-sejtjeinek lektinkötése már nem különbözött az egészségesektől, kivéve a Gal-1-t, melynek kötése aktivált állapotban szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult SLE-s betegekben az egészséges kontrollokhoz képest (*20B Ábra*). Ez arra utal, hogy a terminális N-acetyl-laktózin csoportok, melyek a Gal-1 kötőhelyei, kevésbé hozzáférhetőek az SLE-s betegek aktivált T-sejtjeinek felszínén.

A sejtfelszíni fehérjék glikozilációs mintázatát számos tényező határozza meg, többek között. a rendelkezésre álló szénhidrát szubsztrát mennyisége, endoplazmás retikulum stressz, a Golgi apparátuson belüli pH, a szállítófehérjék mennyisége, valamint a glikozilációs folyamatban részt vevő enzimek mennyisége, expressziójának mértéke (187). Számos adat szerint ez utóbbi a legfontosabb (188, 189), emiatt úgy döntöttünk, megvizsgáljuk a glikozilációs folyamat kulcsenzimeinek mRNS expressziós szintjét aktivált T-sejtekben (*1. Ábra és 3. Táblázat*), mivel ezen enzimek mennyisége döntő mértékben transzkripció szinten szabályozott (190). RT-qPCR méréseink azt mutatták, hogy az alfa-mannozidázok (MAN1A1, MAN1A2, MAN2A1 és MAN2A2) expressziójában nincs különbség SLE-s betegek és egészségesek között (*21A Ábra*), míg a béta-N-acetylglükózaminil-transzferázok (MGAT1-5) közül az MGAT4A és az MGAT4B kis mértékben, de szignifikánsan magasabb expressziót mutatott SLE-ben (*21B Ábra*).



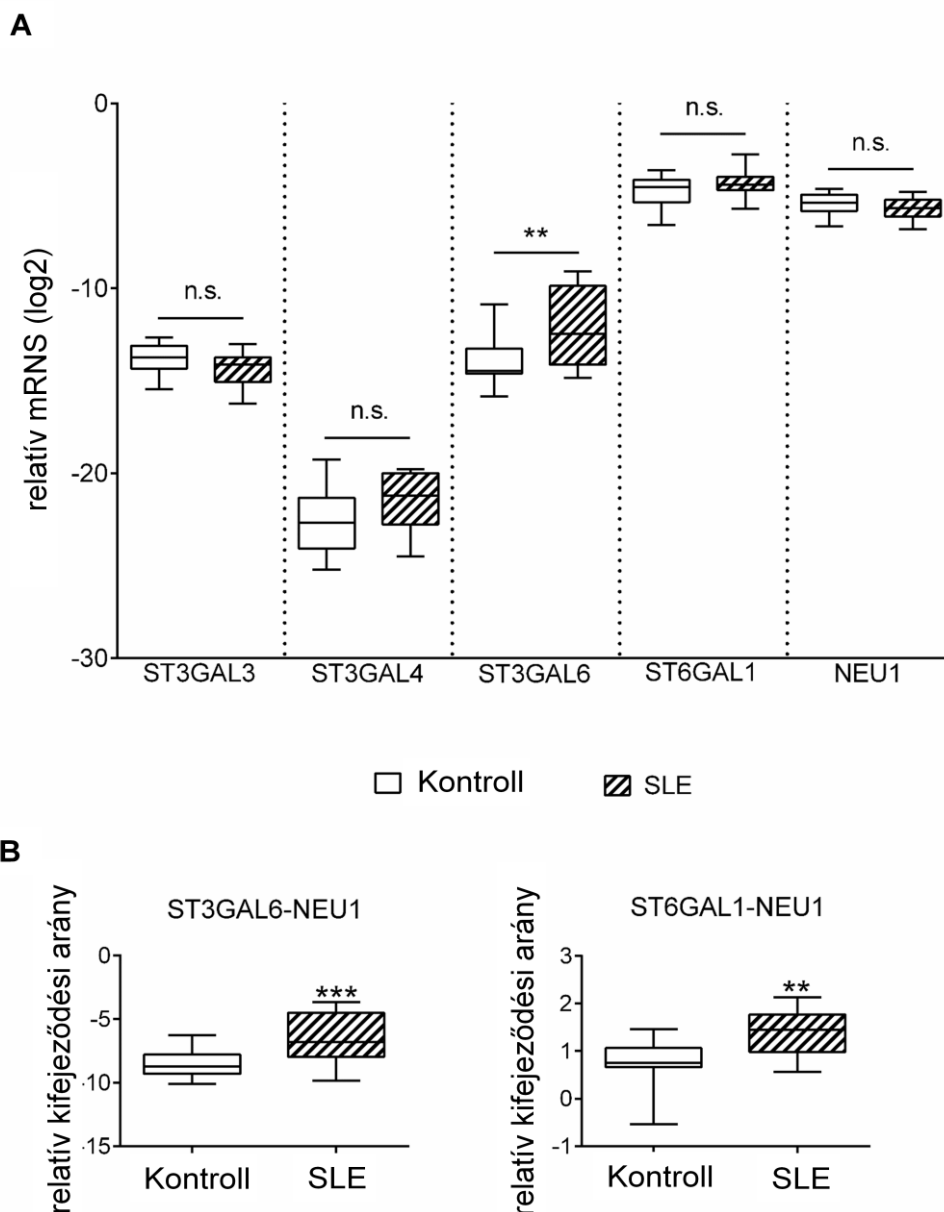
21. Ábra. Mannozidáz és N-acetyl-glükózaminil-transzferáz enzimek expressziója SLE-s betegek és egészséges kontrollok aktivált T-sejtjeiben.

Mannozidázok (A) és N-acetyl-glükózaminil-transzferázok (MGAT) (B) mRNS-ének expressziója aktivált T-sejtekben, RT-qPCR-rel mérve. A függőleges tengely a relatív expressziót mutatja az RPL27 housekeeping génre normalizálva (log2 transzformáció, ΔCt). A gének teljes nevét a 3. Táblázat mutatja be. A dobozokban levő vonal a mediánt, a dobozok alsó és felső éle a 25-ös és 75-ös percentilist, a bajuszok a minimum és maximum értéket mutatják. n.s.: nem szignifikáns, * $p < 0,05$. SLE: $n=18$, egészséges kontroll: $n=19$

A sejtfelszíni N-glikánok interakciói szempontjából kiemelt jelentősége van a terminális szíalsav komponens mennyiségének. A poli-N-acetylglükózamin láncok végén levő α -2,6

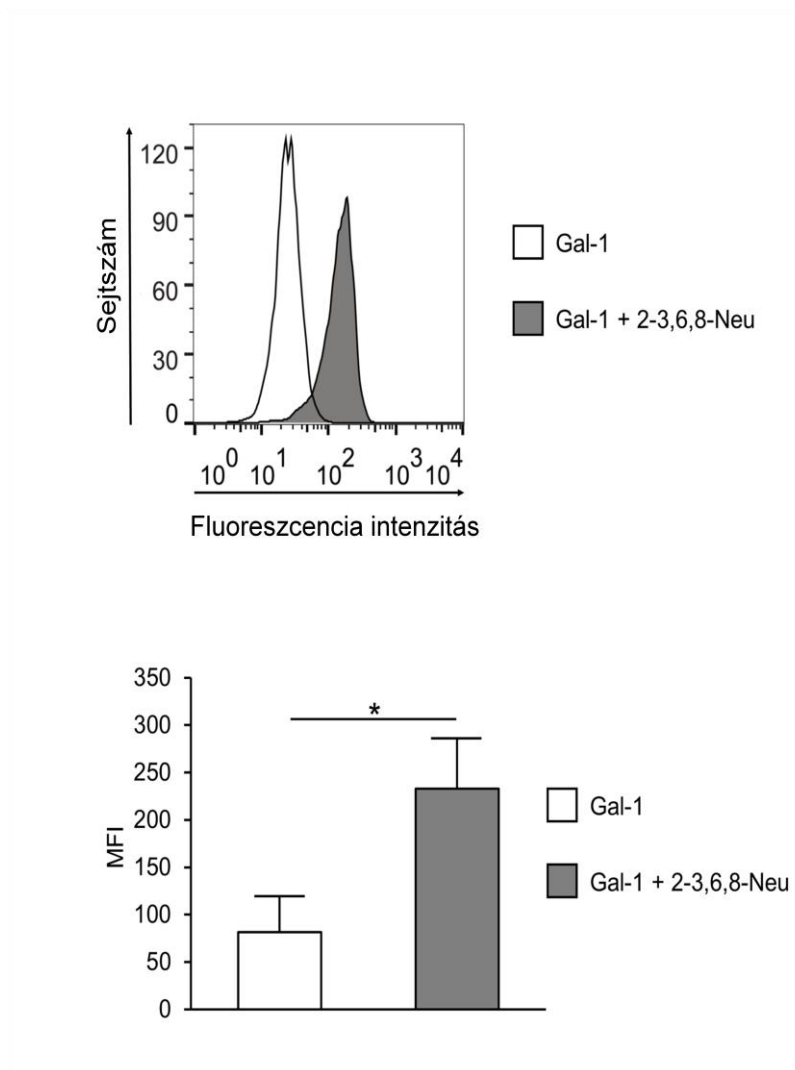
sziálsav „sapka” kialakításában az ST6GAL1, míg az α -2,3 sziálsav komponensében az ST3GAL3, ST3GAL4 és az ST3GAL6 (107) vesz részt, míg a szilásav „sapka” eltávolítását a neuraminidáz enzimek végzik. Ezen gének expresszióját összehasonlítva azt találtuk, hogy az ST6GAL1, ST3GAL3, ST3GAL4 és a NEU1 mRNS mennyisége hasonló volt az SLE-s páciensekben és az egészségesekben, míg az ST3GAL6-é SLE-s T-sejtekben szignifikánsan magasabb volt (22A *Ábra*). Munkánk során csak a NEU1 enzim expresszióját vizsgáltuk, mivel ennek a fehérjének a szintje jelentősen megemelkedik a T-sejt aktiváció során, míg a NEU3 állandó marad (193).

A sejtfelszíni glikánok szializációjának mértékét a szialil-transzferázok és a neuraminidázok összehangolt működésének nettó eredménye határozza meg. Emiatt a szializáltság mértékének szabályozását e két enzimcsoport tagjainak arányával érdemes felmérni. A különböző ST/NEU1 arányok vizsgálata azt mutatta, hogy SLE-ben szignifikánsan magasabb volt az *ST3GAL6 / NEU1* és az *ST6GAL1 / NEU1* mRNS arány, mint a kontrollokban (22B *Ábra*). A többi aránypár (*ST3GAL3 / NEU1* és *ST3GAL4 / NEU1*) egyforma volt a két csoportban. Az eredmények arra utalnak, hogy SLE-s aktivált T-sejtek fokozott szializációra hajlamosak, és a sűrűbben szializált felszíni glikánokon ezáltal hozzáférhetetlenné válhatnak a Gal-1-kötő helyek. Ennek a hipotézisnek az alátámasztására olyan kísérletet terveztünk, melynek során az SLE-s T-sejteket olyan rekombináns neuraminidáz (2-3,6,8Neu) enzimmel kezeltük, ami specifikusan eltávolítja az α 2-3,6,8-kötött sziálsavat a glikánokról. A kezelés után az SLE-s aktivált T-sejtek Gal-1-kötése növekedett (23. *Ábra*), és a kontroll T-sejtekéhez vált hasonlóvá (nem bemutatott adat).



22. Ábra. Szialil-transzferáz (ST) és neuraminidáz-1 (NEU-1) enzimek génexpressziójának mértéke aktivált T-sejtekben.

(A) Az enzimek mRNS-ének expressziója aktivált T-sejtekben, RT-qPCR-rel mérve. A gének teljes nevét a 3. Táblázat mutatja be. (B) A szializációt végző ST és a deszalizációt végző NEU1 expressziók arányai. Az mRNS expressziós hányadosokat a következőképpen számoltuk ki minden egyes betegnél: $\Delta Ct \text{ ST} / \Delta Ct \text{ NEU1}$. A függőleges tengely a relatív expressziót mutatja az RPL27 housekeeping génre normalizálva (log2 transzformáció, ΔCt). A dobozokban levő vonal a mediánt, a dobozok alsó és felső éle a 25-ös és 75-ös percentilist, a bajuszok a minimum és maximum értéket mutatják. n.s.: nem szignifikáns, $**p < 0,01$; $***p < 0,001$. SLE: $n=18$, egészséges kontroll: $n=19$.



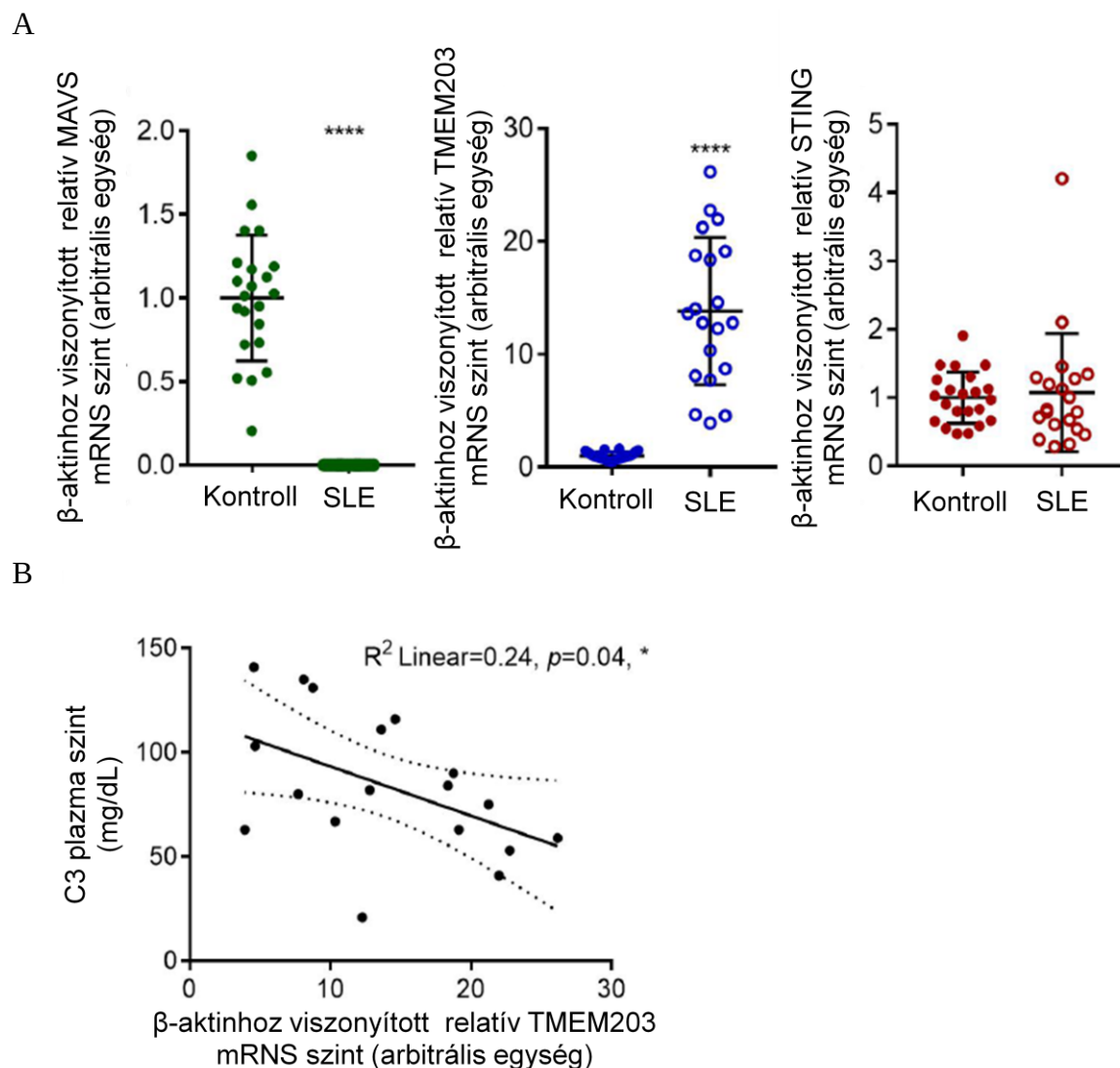
23. Ábra. Neuraminidáz kezelés hatása SLE-s aktivált T-sejtek Gal-1 kötésére.

Az aktivált T-sejteket α 2-3,6,8 neuraminidázzal kezeltük (Gal-1+ α 2-3,6,8 Neu; pontozott vonal ill. szürke oszlop) vagy kezeletlenül hagytuk (Gal-1; folyamatos vonal ill. üres oszlop). A sejtfelszíni Gal-1 kötést citofluorimetriával vizsgáltuk. A felső panelen egy reprezentatív minta eredményeit mutatjuk be, az alsó panelen pedig a vizsgált minták átlagos fluoreszcens intenzitásának (MFI) eredményeit (átlag $\pm$ SEM; n=3). $p < 0,05$;

4.2.3. A TMEM203 szerepének vizsgálata SLE-ben

A betegek között 18 nő és két férfi volt, átlagos SLEDAI-2K értékük 15,53 (2-30), anti-dsDNS antitestszintjük 122,72 (10-200) IU/ml, C3 complement szintjük 84,17 (21-141) g/l, C4 complement szintjük 13,89 (3-29) volt. Vizsgálataink során két, már jól jellemzett és SLE-vel is kapcsolatba hozott jelátvivő molekula, a STING és a MAVS, valamint a TMEM203 génexpresszióját vizsgáltuk. Az egészséges kontrollokhoz képest SLE-ben a MAVS szintje igen nagy mértékben csökkent volt, nagyrészt csak minimális MAVS mRNS

expressziót találtunk SLE-s T-sejtekben. A *TMEM203* molekula ezzel szemben jelentősen fokozott expressziót mutatott, 13,83-szoros upregulációt észleltünk a kontrollokhöz képest (SD 6,52, interquartilis határok: 8,6 és 18,8). Méréseinkkel ugyanakkor nem találtunk különbséget a *STING* mRNS mennyiségében SLE-s és kontroll személyek aktivált T-lymphocytaiban. A *TMEM203* szerepét támasztja alá az is, hogy a betegség-aktivitási markerek közül a C3 complementtel fordított arányosságot mutatott (24. Ábra).



24. Ábra. A *MAVS*, *TMEM203* és *STING* mRNS expresszió mértéke aktív SLE-s betegek és egészséges kontrollok aktivált T-lymphocytaiban, valamint a *TMEM203* mRNS összefüggése a C3-complementszinttel.

(A) A vizsgált személyek PHA-L-aktivált T-lymphocytaiban RT-qPCR-rel mért mRNS szintek (relatív értékek a β -actin mRNS-hez képest). (B) A *TMEM203* relatív mRNS expressziós értékek fordítottan arányosak a C3 complementszinttel. **** $p < 0,0001$, * $p < 0,05$.

4.2.4. Antifoszfolipid antitestek szerepe az SLE nem-thromboemboliás mechanizmusú szervi manifesztációinak kialakulásában

4.2.4.1. A teljes beteganyag bemutatása

A betegek közül 105-nél (47%) találtunk a Sydney-i kritériumoknak megfelelő APA-pozitivitást, közülük 52-ben (23%) ez a kritériumoknak megfelelő tünettől is társult, teljesítve így az APS osztályozási feltételeit (138). Ezen tünetek 39 esetben vénás thromboembolia, 8 esetben stroke, 9 esetben pedig ismétlődő spontán vetélés vagy késői intrauterin elhalás voltak (egy betegben többféle kritérium-tünet is előfordulhatott).

A teljes SLE-s beteganyag klinikai jellemzőit (legfontosabb ill. leggyakoribb szervi manifesztációk, immunszuppresszív terápiák) és az immunszerológiai profil adatait a 9. Táblázatban mutatjuk be.

Klinikai jellemző	%	Immunszerológiai jellemző ill. gyógyszeres terápia	%
Arthritis	89,3	ANA	87,1
Photosensitív rash	65,2	anti-dsDNA	76,3
Nem-haemolytikus anaemia	56,3	anti-SSA	46,0
Raynaud jelenség	54,9	anti-SSB	33,9
Leukopenia	54,0	anti-Sm	21,4
Lymphopenia	46,0	anti-RNP	16,1
Egyéb bőrmifesztációk	32,1	anti-cardiolipin	35,3
Lymphadenomegalia	31,3	anti-β2GPI	23,2
Pleuritis	30,4	lupus anticoaguláns	24,6
Pericarditis	24,1	csökkent C3 complement	62,9
Pillangó erythema	20,5	csökkent C4 complement	46,4
Vénás thromboembolia	19,1	oralis corticosteroid	90,2
Bőrvasculitis	18,8	i.v. corticosteroid	37,5
Thrombocytopenia	17,9	chloroquin	62,9
Sjögren szindróma overlap	17,9	azathioprin	34,4
Haemolytikus anaemia	14,7	i.v. cyclophosphamid	25,9
Oralis ulceratio	10,3	methotrexát	21,0
Ismétlődő spontán abortus	5,2*	cyclosporin A	9,8
Nephritis	35,3		
Interstitialis pneumonia	8,9		
Organikus agyi szindróma	7,1		
Stroke	4,5		
Myocarditis	3,6		
Convulsio	3,6		
Psychosis	2,7		
Endocarditis	1,3		

9. Táblázat. A leggyakoribb, illetve legfontosabb szervi manifesztációk, valamint az immunszerológiai eltérések és az alkalmazott immunszuppresszív kezelések előfordulása a teljes SLE-s beteganyagban.

*anti-β2GPI: anti-beta2-glycoprotein I, ANA: anti-nuclearis antitest, anti-dsDNA: kettősszájú DNS elleni antitest - anti-double stranded DNA. * előfordulási gyakoriság csak a nőbetegek számából számolva; a major szervi manifesztációk vastag betűvel szedve*

4.2.4.2. A klinikai kép különbözőségei antifoszfolipid antitest-pozitív és –negatív betegek között.

A klinikai és laboratóriumi eltérések gyakoriságát összehasonlítva az APA-pozitív (n=105) és APA-negatív (n=119) betegek között azt tapasztaltuk, hogy nemcsak a vénás thromboemboliás események várt – és definícióból következő – prevalenciájában volt szignifikáns különbség a két alcsoport között, hanem az endocarditis, a haemolytikus anaemia és a thrombocytopenia is gyakrabban volt megfigyelhető APA-pozitivitás esetén. Ezek közül ugyan az endocarditisnél nem volt szignifikáns statisztikailag a különbség, de ez minden bizonnyal az alacsony elemszámnak tudható be, hiszem mindhárom non-bacterialis (Libman-Saks) endocarditises betegünk APA-pozitív is volt. Az egy betegben előfordult szervi manifesztációk száma, ami a betegség súlyosságát és terhet jelzi az adott beteg vonatkozásában, szintén szignifikánsan magasabb volt akkor, ha APA volt konzekvensen kimutatható a betegben (10. Táblázat)

	A (valaha előfordult) szervi manifesztációk száma (átlag)	Endocarditis n (%)	Vénás thrombo-embolia n (%)	Haemolytikus anaemia n (%)	Thrombo-cytopenia n (%)
APA+	7,6	3 (2,8)	39 (37,1)	23 (21,9)	27 (25,7)
APA-	6,8	0	4 (3,36)	10 (8,4)	13 (10,9)
p	<0,05	0,101	<0,0001	0,007	0,005

10. Táblázat. Az APA-pozitív és –negatív SLE-s betegek összehasonlítása során kapott fontosabb eltérések

APA: antifoszfolipid antitest

4.2.4.3. A klinikai kép összevetése APS-sel társuló illetve APS nélküli SLE-s betegek között

Az összes megvizsgált paraméter gyakoriságát összevetettük aszerinti felbontásban is, hogy az SLE-hez társult-e APS vagy sem. A 11. Táblázatban látható, hogy jelentősen különbözik a betegség lefolyása a két alcsoportban. Amennyiben az APA-pozitivitáshoz a kritériumokban megadott artériás vagy vénás thromboemboliás ill. szülészeti komplikáció is társult, akkor nagyobb eséllyel tapasztaljuk nemcsak e kritériumtünetek jelenlétét a vizsgált betegcsoportban, hanem szignifikánsan gyakoribb a nephritis, a myocarditis, az interstitialis pneumonia, az organikus agyi szindróma vagy a thrombocytopenia előfordulása is. Ennek megfelelően a szervi manifesztációk száma is magasabb, ezen belül a major manifesztációké is, sőt ez utóbbiak vonatkozásában még nagyobb, több mint kétszeres gyakoriság-növekedést tapasztaltunk APS esetén, pedig utóbbi összehasonlításban a stroke-ot, mint APS kritériumtünetet, ki is vettük a major manifesztációk közül. Látható, hogy a szív-, illetve

tüdőérintettség kb. háromszor, a nephritis közel kétszer gyakrabban fordul elő APS-sel járó SLE-s betegekben. Nem meglepő, hogy az intenzív immunszuppressziót jelző iv. corticosteroid és iv. cyclophosphamid kezelést is gyakrabban alkalmaztuk ezen betegcsoportban, hasonlóan a – gyakran, de természetesen nem mindig, az előbbieket folytatásaként fenntartó immunszuppresszió céljára alkalmazott – azahtioprinhez.

	SLE + APS	SLE APS nélkül
	n=52	n=172
Stroke	15.4%	1.2%
Vénás thromboembolia	75.0%	2.3%
Ismétlődő spontánvetélés	17.3%	1.25%
Pleuritis	40.4%	24.3 %
Nephritis	53.9%	29.4%
Myocarditis	7.7%	2.3%
Interstitialis pneumonia	17.3%	6.4%
Organikus agyi szindróma	13.5%	5.2%
Thrombocytopenia	26.9%	17.8%
A (valaha előfordult) szervi manifesztációk száma (átlag)	8.1	6.9
A (valaha előfordult) major szervi manifesztációk száma (átlag)	1.2	0.5
iv. corticosteroid	56%	32%
azathioprin	52%	29%
cyclophosphamid	39%	22%

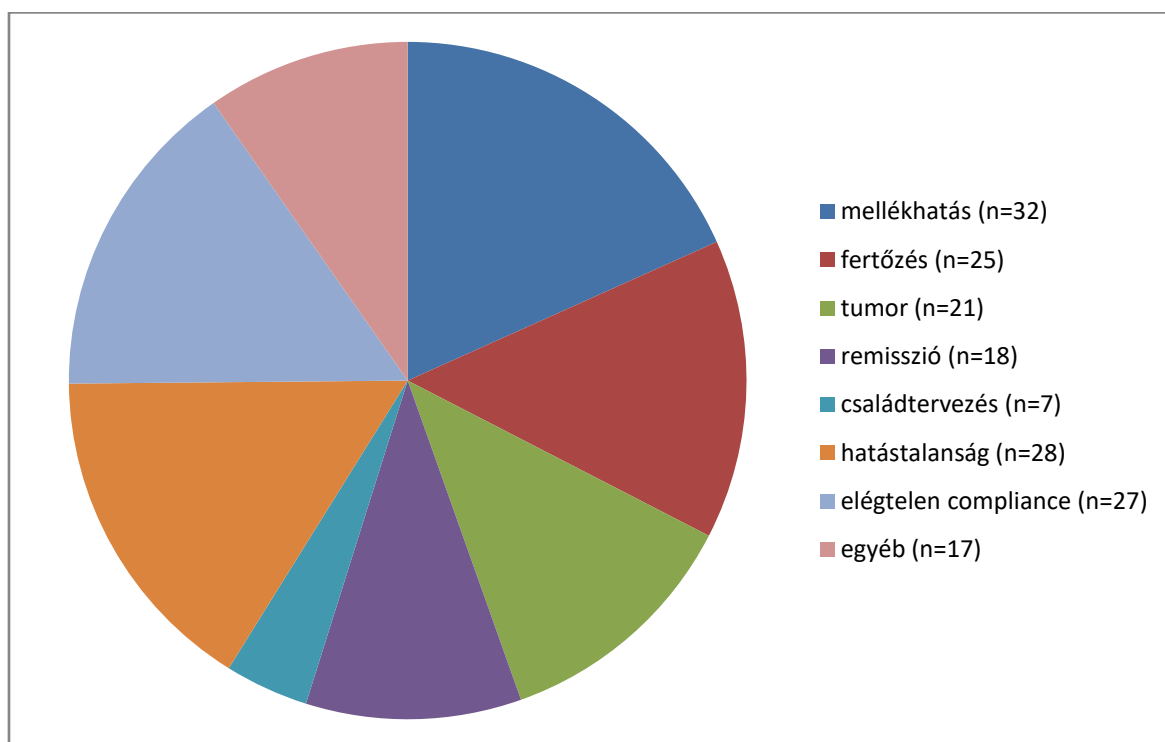
11. Táblázat. A klinikai kép különbsége APS-sel társuló illetve anélkül jelentkező SLE-s betegek között.

A táblázat a szignifikáns eltérést mutató szervi manifesztációk, a betegek kezelésében alkalmazott terápiák arányát, illetve a valaha előfordult szervi manifesztációk, és azon belül major szervi manifesztációk számát (átlag) mutatja be. Minden összehasonlításban: $p < 0,05$.

4.3. A biológiai terápia leállításának lehetőségei krónikus arthritisekben

A betegek átlag életkora RA esetében 60 év volt /21-84 év/ , AS esetében 46 év /20-67 év/, AP esetében 57 /24-74 év/ volt. A 126 RA-s beteg közül 97 betegnél történt anti-citrullinált peptid (ACPA) antitestmeghatározás, mely ezen betegek 68 %-ában (66 beteg) volt pozitív, míg a reumatoid faktorról (RF) 121 beteg esetében volt adatunk, ezen betegek 66,9 %-ban (81 beteg) volt RF pozitivitás. A 112, ezirányban vizsgált beteg közül 58 %-ban (65 beteg) látszottak erosiv eltérések a kéz röntgen felvételen.

A biológiai terápia tartós leállításának okait a 25. Ábrán mutatjuk be, összevonva a három betegcsoportot. Leggyakrabban abszolút vagy relatív ellenjavallat megjelenése volt a leállítás oka, úgy mint mellékhatás (ezen belül 20 esetben /11,4 %/ allergiás reakció), gyakori vagy krónikus infekciók, ill. tumor megjelenése, vagy annak gyanúja és tumorkutatás. De gyakran fordult el az is, hogy tartós remisszió miatt döntött úgy a kezelőorvos illetve a beteg, hogy a továbbiakban megpróbálják biologikum nélkül kezelni a betegséget, ugyanakkor sok esetben hatástalanság, máskor a nem megfelelőnek ítélt beteg-compliance és az abból eredő esetleges kockázatok képezték a leállítás okát. Voltak arra példák, hogy családtervezés miatt állt le a kezelés, illetve néhány ritkább ok, mint pl. külföldi munkavállalás is szerepelt.



25. Ábra. A biológiai terápia tartós leállításának okai a vizsgált RA-s, AS-s és AP-s betegek körében

Esetszámok: RA: 126, AS: 38, AP: 11.

A biológiai terápia tartós leállítása utáni kórlefolyásról 81 RA-s és 17 AS-s, valamint 2 AP-s betegről állt rendelkezésre kellő mennyiségű utánkövetési adat, így a továbbiakban csak az

RA-s és az AS-s betegek adatait analizáltuk. A fontosabb adatokat a 12. Táblázatban foglaltuk össze.

Az átlagos betegség-fennállási idő (a diagnózis felállításától számítva a vizsgálat időpontjáig eltelt időtartam) RA esetében 180 hónap volt (32-612 hónap), míg AS esetében 186 hónap (9-396 hónap), vagyis, az akkori trendeknek megfelelően nagy többségében már régóta fennálló betegségben szenvedtek. A biológiai terápiát a leállításkor RA esetében átlagosan 20 (1-60 hónap), míg AS esetében átlagosan 13 hónapig (0,5-39 hónap) kapták. Az RA-s betegek esetében 44,4 %-ban, AS-s betegek esetében 41,1 %-ban fordult elő biológiai terápia váltás ezen időszak során.

RA esetében a betegek 40,7 %-ában (n=33) volt alacsony betegségaktivitás a terápia leállításkor, míg 17,2 %-ban (n=14) magas aktivitás mellett történt a terápia befejezése. Az utánkövetési időszak végén, átlagosan 22 hónap utánkövetés után, a betegek 33,3 %-ban (n=27) alacsony, 45,7%-ban közepes (n=37), 20,9 %-ban (n=17) pedig magas volt az aktivitás. Azon RA-es betegek, akiknél alacsony betegségaktivitás mellett történt a biológiai terápia leállítása (n=33) 60,6 %-ban (n=20) remisszióban maradtak, és csak 15,1 %-ban (n=5) fordult elő relapsus, ami átlagosan 15 hónappal a biológiai terápia felfüggesztése után következett be. A leállítás után is remisszióban maradó betegeknél a remisszió hossza átlagosan 16 hónap (3-48 hónap). Azon RA-s betegeknél, akiknél a biológiai terápia leállításkor alacsony volt a betegségaktivitás, és jelenleg is alacsony maradt (n=20), 50 %-ban csak a hagyományos DMARD terápiát kapták, 20 %-ban glucocorticosteriod terápiát, 20 %-ban DMARD és glucocorticosteroid terápiát együtt, míg 10 %-ban semmilyen terápiát sem kaptak.

Ami a leállítás utáni kórlefolyás prediktorait illeti, a remisszió hossza fordított arányosságot mutatott a leállításkor tapasztalt betegség-aktivitással, valamint szintén fordítottan arányos volt a biológiai terápia hosszával ($p < 0,05$). Hasonlóképpen, a relapsus bekövetkezése összefüggést mutatott a leállításkor mért betegség-aktivitással (átlagos DAS28 $3,3 \pm 1,33$ azon betegek között, akinél nem lett relapsus vs $4,2 \pm 1,15$ akinél lett, $p < 0,05$), és közel szignifikáns eltérés volt a biológiai kezelés tartamában a két alcsoport között (relapsus lett: $26,3 \pm 19,3$ hónap, relapsus nem lett: $18,5 \pm 16,1$ hónap, $p = 0,08$). Ezzel szemben nem volt összefüggés a relapsus megjelenése, illetve a remisszióban maradás tartama és az ACPA vagy a rheumatoid faktor jelenléte között. Nem függött a relapsus megjelenése, valamint a remisszióban maradás attól sem, hogy milyen okból történt a biológiai terápia leállítása, hogy a biológiai terápia tartós leállítását követően kaptak-e DMARD vagy corticosteroid kezelést a betegek. Illetve attól sem, hogy a diagnózis felállítását követően hány hónappal indult el a biológiai terápia.

	RA (n=81)	AS (n=17)
Fennállási idő a diagnosis óta (hónap)	180 /32-612/	186 /9-396/
A biológiai terápia hossza (hónap)	20 /1-60/	13 /0.5-39/
Betegek %-os aránya, akiknél legalább egy biológikum-váltás történt	44.4	41.1
Betegség-aktivitás a leállításkor (RA: DAS28, AS: BASDAI)	3.76 /1.5-6.8/	4.05 /1.0-8.7/
A leállítás idején alacsony betegség-aktivitással rendelkező betegek aránya	40.7	17.6
A leállítás idején közepes betegség-aktivitással rendelkező betegek aránya	52.1	29.4
A leállítás idején magas betegség-aktivitással rendelkező betegek aránya	17.2	52.9

12. Táblázat. Az utánkövetett RA-s és AS-es betegek egyes klinikai adatai

Az utánkövetett RA-s betegeknek 6 beteg esetében került sor a biológiai terápia tartós leállítására régóta fennálló remisszió miatt. Mind a hatan változatlanul remisszióban voltak a felmérés idején is, három esetben hagyományos DMARD kezelés mellett maradt inaktív a betegség 17 hónappal, 37 hónappal illetve 55 hónappal a leállítás után. Két beteg corticosteroid és DMARD kezelés mellett maradt remisszióban 19 és 7 hónapja, egy beteg pedig minden specifikus terápia nélkül 3 hónapja.

AS esetében a terápia leállításakor a betegek 17,6 %-ában (n=3) volt alacsony az aktivitás, 29,4 %-ában (n=5) közepes aktivitás (BASDAI 2,1 és 4 között), 52,9 %-ában (n=9) pedig magas volt. Átlagosan 20 hónap utánkövetés után 11,7 %-ban (n=2) tapasztaltunk alacsony aktivitást, 35,2 %-ban (n=6) közepes, és 52,9 %-ban (n=9) volt magas az aktivitás. A betegek 35 %-ában (n=6) fordult elő relapsus. Még azon 8 beteg közül is, akiknél BASDAI < 4, azaz alacsony vagy közepes betegség-aktivitás idején állt le az anti-TNF kezelés, 4-nek relapsusa lett átlagosan 6 hónappal /3-9/ a leállítás után. Az AS-s betegek közül két esetben sulfasalazine terápiát alkalmaztunk a biológikum elhagyását követően is, ezen két beteg közül az egyik esetben alacsony betegség aktivitás mellett állt le a biológiai terápia, és nála alacsony is maradt az aktivitás, míg a másik esetben magas aktivitásnál állítottuk le, és ez az utánkövetés során sem csökkent. Az alacsony betegségaktivitást mutató beteg a sulfasalazine terápia mellett kis dózisú corticosteroid terápiát is kap. Az AS-s beteganyag vizsgálata során az alacsony betegszám miatt nem kaptunk statisztikailag értékelhető eredményeket arra vonatkozóan, hogy mi befolyásolja a relapsus megjelenését illetve a remisszióban maradási.

5. Megbeszélés

5.1. Sicca tünetek pathogenesise SS-ben– acetylcholin receptor elleni antitestek potenciális szerepe

Munkánk során azon hipotézisekből indultunk ki, hogy SS-ben a klinikai képet gyakran domináló sicca tünetek háttérében nem(csak) az exokrin mirigyállomány irreverzibilis pusztulása áll, hanem potenciálisan befolyásolható immunológiai folyamatoknak is szerepük van. A paraszimpatikus idegrendszer működészavarával kapcsolatos saját és szakirodalmi megfigyelések azt sugallták, hogy a cholinerg neurotranszmisszió zavara egy ilyen potenciális tényező lehet, és ennek lokalizációját eredményeink alapján az m3AChR-ben feltételeztük. Ezért, a betegségre jellemző polyclonalis immunglobulin túltermelődést is figyelembe véve, anti-m3AChR antitestek keresését kezdtük el.

Munkánk kezdetén két, egymástól független munkacsoportnak voltak egy-egy publikációt eredményező, friss adatai, melyek állatkísérletes modellekben acetylcholin-receptorral reagáló antitestek jelenlétére utaltak SS-ben (45,46). Pathogenesis, diagnosztika és terápiás vonatkozások alapján is fontosnak tartottuk, hogy a humán m3AChR-t, mint antigént befolyásoló autoantitestek jelenlétét és szerepét kutassuk, és hogy a gyakorlatban is jól alkalmazható immundiagnosztikai tesztet dolgozzunk ki. Főbb eredményeink a következőkben foglalhatók össze. A humán m3AChR második extracelluláris hurokszakaszán keresendő az immundomináns antigén-determináns, de a harmadik extracelluláris hurok is releváns antigén-lokalizáció lehet, és ezek alapján a receptor ellen oligo- vagy polyclonalis autoimmun válasz feltételezhető SS-ben. Szintetikus peptid formában nem, de GST-vel fúziós fehérje formában elkészített antigént használva ELISA-val m3AChR ellenes antitestek mutathatók ki magas szenzitivitással és specificitással SS-ben. Az antitestek kóroki szerepét támogatja, hogy ki tudtuk mutatni kötődésüket a nyálmirigyek acetylcholin-receptoraihoz.

Saját kísérleti eredményeink publikálása után még számos munkacsoport is közölt eredményeket az m3AChR különböző régióin elhelyezkedő epitópok elleni antitest-vizsgálatokról. Ezek között szerepelnek negatív konklúziók is, vagyis az, hogy nem találtak anti-m3AChR antitesteket SS-ben (48, 191, 192), de többségében az antitestek változó gyakoriságú jelenlétéről számoltak be; epitópként mind a második (193-195), mind a harmadik extracelluláris hurok felmerült (196, 197), az előfordulási gyakoriság pedig 11/122 és 9/11 között mozgott (194, 195). Az immundetektálás módszere is igen változatos volt, és az látszik, hogy a hagyományos peptid ELISA módszert használó kísérletek, saját munkánkhoz hasonlóan, nem voltak eredményesek az anti-m3AChR kimutatására (48, 191, 192). Ezzel szemben az antigén sokszor igen bonyolult módosítása (pl. kínai hörcsög ovárium sejt kultúrában történő expressziója (195), felszíni plasmon-rezonancia technikával történő mérése (196), in-cell Western blotting m3AChR-ral transzfektált sejtekben (198) vagy az epitóp ciklikus formába történő átalakítása (199) szerepelt még az antigén-prezentációs eljárások között, változó eredménnyel.

Saját munkánk is azt igazolta, hogy a feltehetően konformációs epitóppal szembeni immunválasz detektálására a lineáris peptidek nem alkalmasak. Két független vizsgálatunk, melyeket független betegkohorszokon és eltérő antigénekkal végeztünk, azt mutatta, hogy a második extracelluláris hurkon elhelyezkedő KRSE és AGSE szekvenciák és a harmadik hurkon lokalizált YNIP peptid ilyen módszerű prezentálása magas szenzitivitású, de mérsékelt specificitású. Az előző bekezdésben említett, az m3AChR térbeli struktúráját megőrizni szándékozó módszerek valóban lehetővé tették az antitestek kimutatását, azonban munkaigényességük, költségük miatt nem válhattak a rutin diagnosztika részévé. Emiatt, bár velünk egyidőben ill. nem sokkal utánunk számos munkacsoport foglalkozott az anti-m3AChR antitestek kimutatásával SS-ben, és a kérdést több review is igen fontosnak, mind pathogenesis, mind diagnosztika szempontjából sarkalatosnak értékelte (200-204), 2010. után jelentősen visszaesett a témával foglalkozó eredeti közlemények száma. Úgy gondoljuk azonban, hogy eljárásunk, melyben GST-vel fúzióban, és dimer formában prezentáljuk az ELISA vizsgálatkor az m3AChR-specifikus epitópot, alkalmas a megfelelő antigenitást biztosító térbeli konformáció felvételére. Így az eljárás tapasztalataink alapján kellő specificitású és szenzitivitású lehet a primer SS és nemcsak az egészséges személyek, hanem más szisztémás autoimmun betegek, illetve SS-t utánzó kórképek differenciáldiagnosztikájára is. A GST-fúziós eljárást egyéb antigének, elsősorban nagy fehérjéken elhelyezkedő, nem-lineáris epitópok azonosítására is ajánlani tudjuk, ahogy azt munkacsoportunk tagjai korábban már sikeresen is alkalmazták a bullosus pemphigoid diagnosztikájában (49). Kiemelem azt is, hogy amikor a KRSE szakasz helyett második programunkban az ezt a szekvenciát tartalmazó, de hosszabb AGSE peptidet használtuk, a kimutatás specificitása jelentősen csökkent (bár az eredmények közvetlenül nem összehasonlíthatók), sőt a szintetikus peptidekénél is alacsonyabbá vált. Feltételezhető, hogy a rövidebb YNIP szakasz jobb diagnosztikai hatékonysága is ezzel magyarázható. Ezért a – standard epitóp-mapping eljárásokhoz hasonlóan – az MHC-kapcsolt antigén-prezentálás élettani folyamatához közel álló rövidebb, 7-12 aminosavas szekvenciák GST-fuzionált formáját valószínűsítjük a sikeres diagnosztikai módszer kifejlesztéséhez szükséges további kutatások választandó módszerének. Az így kiválasztott antigén(ek) tesztelésére nagy esetszámú, több központ akár nemzetközi együttműködésével megvalósuló vizsgálat lenne alkalmas. Az említett nehézségek és a kutatási érdeklődés más irányba fordulása miatt azonban e munka elvégzésére már munkacsoportunk sem vállalkozott.

Az immundetektáláson és diagnosztikai értéken kívül érdekes kérdés az acetylcholin hatását receptorális szinten gátló autoimmun folyamat igazolása is, vagyis hogy van-e pathogenetikai szerepe, így esetlegesen érdemes-e terápiásan is figyelembe venni a feltételezett anti-m3AChR antitesteket. Microfluorimetriás, patch-clamp és immunofluorescens konfokális mikroszkópos vizsgálatok egybehangzóan azt igazolták, hogy az SS-s betegekből származó IgG gátolja a cholinerg agonista által kiváltott intracelluláris calciumszint-emelkedést, a K⁺ és a Cl⁻ ionszűrő aktiválódását mind kísérleti állatokból, mind emberből származó nyálmirigysejtekben (205-207). Más kísérletekben azt mutatták ki, hogy az SS-s IgG gátolja a nyálszekrécióban kulcsszerepet játszó aquaporin-5 normális transzportját a sejtfelszínre (208), vagy prosztaglandin E2, illetve matrix metalloproteináz-3 termelődését serkenti a nyálmirigy sejtenyészetekben (210). Az SS-s betegekből származó IgG m3AChR-specifikus módon

gátolta kísérleti állatok húgyhólyag-simaizomsejtjeinek vagy colonjának cholinerg-agonista által kiváltott összehúzódását is (210, 211). Mindezek meggyőzően támogatják, hogy SS-s betegekben az m3AChR-en keresztüli normális neurotranszmissziót gátló immunglobulinok vannak jelen, azonban úgy gondoltuk, fontos azt is igazolni, hogy e jelenség nemcsak *in vitro* kísérleti elrendezésekben történik meg. Ennek feltétele az, hogy az anti-m3AChR antitestek emberi nyálmirigy-beli kötődését tudjuk igazolni, melyet munkacsoportunk elsőként tudott bizonyítani.

A fénymikroszkópos immunfluoreszcencia önmagában annyit képes bizonyítani, hogy SS-s betegek széruma normális human nyálmirigyekhez képes kötődni, illetve SS-s betegek nyálmirigyeiben már *in vivo* bekötődött antitestek mutathatók ki. Az m3AChR₂₁₃₋₂₂₈ ellenes tisztított, monospecifikus ellenanyag egyértelmű kötődése a sejtek basolateralis membránján, kihagyva más, a tisztítatlan szérummal reagáló területet, már erősebben támogatja annak lehetőségét, hogy az m3AChR-rel reagáló antitestek vannak a SS-s betegek szérumában. A még pontosabb bizonyítékot az immun-elektronmikroszkópos vizsgálatok adták, melyek már egyértelmű lokalizációban, a cholinerg idegvégződésekben mutatták ki a szérum kapcsolódását az antigénjéhez. A lokalizáció mellett az m3AChR-specifikus tisztított Ig-frakció kötődése, ennek az m3AChR₂₁₃₋₂₂₈ antigénnel történt előzetes inkubációt követő gátlása, valamint a VIP-pel, mint a cholinerg végkészülékek markerével történő együttes lokalizációja igazolja, hogy valóban a feltételezett antigénnel szembeni autoantitesteket mutattuk ki. Mindez nemcsak az anti-m3AChR antitestek kórélettani szerepét támasztja alá SS-ben, hanem a m3AChR₂₁₃₋₂₂₈ mint a második extracelluláris hurkon elhelyezkedő immundomináns epitóp kiválasztásának helyességét is támogatja.

Eredményeink természetesen távol vannak attól, hogy közvetlen terápiás következtetést lehetne levonni belőlük. Mindenesetre azt tudjuk a cholinerg agonistákkal végzett terápiás vizsgálatok alapján, hogy hatékonyságuk igen kérdéses és korlátozott, valamint számos mellékhatással járhatnak, akár pilocarpint, akár a m3AChR-re specifikus cevimelint használták a vizsgálatok során (212-215). A fentiek alapján ez annak is betudható lehet, hogy az autoantitestek által elfoglalt receptoron át nem tud elégséges ingert kelteni a cholinerg agonista, illetve, ahogy az említett funkcionális kísérletek is mutatták *in vitro*, egyéb mechanizmussal, akár nem-kompetitív módon is, de gátolja az m3AChR-en keresztül megvalósuló neurotranszmissziót a receptor-ellenes antitest. Ezzel szemben vannak adatok a B-sejteket gátló célzott terápia, a rituximab hatékonyságáról SS-ben (215-218). Ugyan ezen eredmények sem mutatnak sajnos átütő hatékonyságot, illetve csak a betegek egy részében tűntek hatékonynak a szerek, de reményt adnak arra, hogy az autoantitest-gátló terápiás megközelítések, akár monoclonalis antitest, akár más specifikus immunterápia formájában, a jövőben jobban tudják majd befolyásolni a betegek számára sokszor nagyon rossz életminőséget okozó sicca tüneteket.

5. 2. A klinikai képet alakító pathogenetikai eltérések vizsgálata SLE-ben

Amint a Bevezetésben említettem, SLE-ben a T-sejtek számos funkciójuk során kórosan működnek, ezért az SLE pathogenesisének vizsgálatát célzó kutatásaink során is a T-sejtekre

koncentráltunk. Két olyan folyamatot vizsgáltunk, melyekkel kapcsolatban egy-egy állatkísérletes eredményen vagy általános immunológiai sejtélettani vizsgálatokon túl még nem történtek humán mintákat felhasználó kutatások SLE-ben. A Gal-1 SLE-ben játszott szerepének kutatását összekapcsoltuk a Gal-1-indukált immunfolyamatok, konkrétan az apoptózis indukció mechanizmusainak alapkísérletes vizsgálatával is, mivel laboratóriumi partnerünknek, a Szegedi Biológiai Kutatóközpont Lymphocyta Jelátviteli Laboratóriumának ebben sok éves tapasztalata és sikeres tevékenysége volt.

Kísérleteink eredményeként leírtunk egy új immunológiai mechanizmust, ami SLE-ben is szerepet játszhat a T-sejt diszfunkció kialakításában. Normális esetben a jellemzően antigén-prezentáló sejtek vagy a különböző kötőszöveti sejtek által expresszált Gal-1 kapcsolódik a T-sejtek felszínén található glikoprotein természetű partnereihez, és a T-sejt működést gátló szabályozó funkciókat fejt ki. Ennek mechanizmusa lehet apoptózis indukció, különösen a Th1 és a Th17 alcsoportokban, vagy Treg irányú differenciálódás indukálása. Ezen funkciók fontos szerepet töltenek be az immunválasz lecsengésében, a normális immunhomeosztázis és T-sejt aktivációs küszöb fenntartásában. Amennyiben azonban a T-sejtek aktivációjuk során nem expresszálnak kellő mennyiségű intracelluláris, *de novo* szintetizált endogén Gal-1-t, akkor az exogén Gal-1 hatásával szemben is rezisztensek lesznek. Ennek következménye csökkent Th1 és Th17 apoptózis és kórosan fokozott T-sejt működés lesz, ami elősegítheti autoimmun folyamatok indukcióját vagy fenntartását. Egér T-lymphocytákon és Jurkat sejteken szerzett megfigyeléseink teljes mértékben visszaköszöntek SLE-s lymphocytákon végzett méréseink során, ahol aktív betegség idején csökkent endogén Gal-1 mRNS expressziót és exogén Gal-1-gyel szembeni csökkent apoptózis választ találtunk. Ha ugyanezen betegek sejtjein megismételtük a méréseket egy későbbi időpontban, amikor betegségük inaktívvá vált, a leírt eltérések megszűntek. Természetesen utóbbi eredményeink csak leíró jellegűek, egy konzekvens asszociációt tárnak fel az endogén és exogén Gal-1 szintek között, de – ellentétben az egér és Jurkat sejteken végzett kísérleteinkkel – közvetlen ok-okozati összefüggést nem lehet megállapítani.

A leírtak mechanizmusának pontos tisztázása tehát még várat magára. Először is, mivel a Gal-1 számos sejt felszíni ligandhoz képes kötődni, pl. CD45 (79), CD43 (219), CD6 (220), stb. valamint indirekt módon is képes a lipid raftok aggregációját befolyásolni, így igen sokféle intracelluláris jelátviteli folyamatot képes a kötődése befolyásolni. Egyik legjobban jellemzett folyamat a Gal-1 apoptosist indukáló hatása, ennek mechanizmusának a leírásában munkacsoportunk tagjainak kulcsszerepe volt (71,78,80). A befolyás természete és mértéke a sejt aktiváltsági állapotától, a sejt felszíni glikoproteinek aktuális összetételétől is függ. Még kevesebbet lehet tudni az endogén Gal-1 szerepéről és expressziójának szabályozásáról: az egyik, hogy a sejtmembránhoz kapcsolja a H-Ras onkogént (221), a másik, hogy a Gemin4-en keresztül befolyásolja a spliceosomák működését (93). Egyik funkció sem játszik szerepet az immunrendszer működésében, és nem igényel szénhidrát-kapcsolódást (222-223). A Gal-1 génjének promotere metiláció-érzékeny (224), bár nem világos ennek kapcsolata jelen eredményeinkkel, mivel aktív SLE-re a gének általános alulmetiláltsága és így fokozott transzkripció a jellemző.

A Gal-1-et sok autoimmun betegség állatmodelljében vizsgálták, és kapcsolatba hozták rheumatoid arthritis, colitis, hepatitis, nephritis, encephalomyelitis, myasthenia gravis és SLE kialakulásával is (77, 95, 97, 161, 225, 226). Munkánk az első, mely igazolta, hogy a Gal-1 az SLE-s betegekben is kóros szerepet játszik, és úgy tűnik, hiánya egy lehet az SLE-s T-sejtek komplex működészavarát kiváltó sok tényező közül. A normálisan immunregulátor funkciókat ellátó Gal-1 hiánya, illetve a vele szemben fennálló rezisztencia a T-sejtek kóros aktivációját, különösen a Th1 és Th17 vonal fokozott működését, valamint csökkent Treg irányú differenciálódást illetve Treg funkciót okozhat. Mivel a Gal-1 a tumorok elleni védekezésben is fontos szerepet játszik, közvetlen terápiás felhasználhatósága SLE-ben már csak ezért sem reális opció, ezért is tartottuk fontosnak az általunk leírt jelenség pontosabb megismerését, hogy ezáltal esetleg szelektív és biztonságos terápiás célpont azonosításához tudjunk hozzájárulni.

Az endogén Gal-1 expresszió regulációjának fenti problémái miatt figyelmünk az exogén Gal-1 által kiváltott apoptózis szabályozásának irányába fordult. Erre azért is szükség volt, mert az első kérdés, ami nyitva maradt, hogy az exogén Gal-1-gyel szembeni rezisztencia hátterében nem állhat-e az, hogy a Gal-1 nem, vagy kevésbé kötődik a T-sejtek felszínéhez. Ehhez a sejtfelszíni glikoproteinek összességének (a glikom-nak) az összetételét, a potenciális Gal-1-kötő helyek mennyiségét kellett feltérképezni, amit összekötöttünk a sejtfelszíni glikom kialakításában szerepet játszó glikozilációs enzimek expressziójának összehasonlításával SLE-s és egészséges személyek között. Eredményeink azt mutatták, hogy az előzőekben ismertetett mechanizmuson túl egy másik folyamat is szerepet játszik az SLE-s T-sejtek Gal-1 iránti rezisztenciájában, az, hogy kevésbé kötik az extracelluláris Gal-1-t. Megfigyeltük azt is, hogy míg egészségesekben a T-sejtek lektinkötése nyugalmi állapotban viszonylag alacsony, majd hátsó napos aktiváció után jelentősen megemelkedik – vagyis a sejtfelszíni glikoproteinek száma és a szénhidrát oldalláncok mennyisége és komplexitása jelentősen nő, hozzájárulva ezzel a sejtek közötti adhézió és jelátvitel fokozódásához – addig SLE-s T-sejtekben már nyugalmi állapotban is emelkedett volt a lektinkötési aktivitás, ami viszont aktiváció során már alig emelkedett, így végül a kontrollokkal egyező lett – kivéve éppen a Gal-1-t, melynek kötődése aktivált állapotban szignifikánsan elmaradt a kontrolloktól. Ez a jelenség megfelel annak a sokszor megállapított ténynek, hogy SLE-ben a T-sejtek már az antigénnel történő találkozás előtt előaktivált, „primed” állapotban vannak, aminek következtében kisebb (auto)antigén koncentráció ill. kevesebb ko-stimuláció is elindíthatja az autoimmun folyamatot (17, 227). A T-sejtek glikozilációs mintázatának ezen eltérését is először mi írtuk le, ahogy a Gal-1 csökkent sejtfelszíni kötődését is.

A glikozidációs enzimek expressziós mintázatának vizsgálata egy potenciális magyarázatot is szolgáltatott a Gal-1 csökkent kötődésére. Az enzimek közül az *ST3GAL6* expressziója magasabb volt SLE-ben, mint egészségesekben, míg a többi enzim mRNS szintje önmagában nem tért el a kontrolloktól. Ismert azonban, hogy a terminális szíalsav komponens, amely mintegy „sapkaként” döntő mértékben befolyásolja az egész szénhidrátlánc hozzáférhetőségét a különböző szénhidrátkötő fehérjékhez, kialakításában a szializációt végző szialil-transzferázok és a szíalsav lehasítását végző neuraminidázok koordinált működésének eredőjétől függ. Ebben is különbségeket láttunk SLE-s és kontroll személyek között,

még hozzá a szializációt végző enzimek expressziójának túlsúlyát jelezve. Ugyan az enzimfehérjék szintjét nem mértük, mégis a talált eltérés funkcionális relevanciáját támogatja az, hogy a glikoziltranszferáz fehérjék mennyisége dominálónan transzkripció szinten szabályozott (189), bár meg kell jegyezni, hogy a plazmában levő szialil-transzferázok is hozzájárulnak a sejtfelszíni fehérjék glikozilációjához (228). Az enzimexpresszió eltérése logikusan a szializációs folyamatok túlsúlyát okozza, és ezt a hipotézist támogatja az a kísérleti eredményünk, miszerint a szialsav eltávolítása neuraminidáz hozzáadásával korrigálta a Gal-1 kötés defektusát. Így valószínűsíthetjük, hogy a T-sejtek fokozott szializáltsága áll fenn SLE-ben, mely elfedi a Gal-1 természetes ligandjainak tekinthető elágazó, N-acetyl-galaktozamin tartalmú szénhidrát komponenseket. Megjegyezzük, hogy ezt a mechanizmust találták annak hátterében is, hogy a Gal-1 sokkal kifejezettebb apoptózis-indukáló hatást gyakorol a Th1 és Th17 sejtekre, mint a Th2 vagy Treg alcsoportra, mivel utóbbiak sejtfelszíne erősebben szializált (73). Továbbá a már hivatkozott közleményben, mely a NZB/NZW lupusos egérmodellben írta le a Gal-1 gátló hatását a T-sejtekre, azt is megállapították, hogy a T-sejtek felszíni szializáltságának mértéke szoros korrelációt mutatott a lupus nephritis következtében kialakult proteinuria mértékével (96). Liou és Huang mérései során emelkedett ST6Gal1 és ST3Gal-1/Neu3 arányt talált SLE-ben, de csak (nyugvó) B-sejtek felszínén, a T-sejteken nem tapasztaltak eltérést a kontrollokhöz képest az enzimek expressziójában, viszont a sejtfelszíni szialsav tartalom fordított korrelációt mutatott a szérumban C3 komplementszinttel, vagyis magasabb szialsav tartalom a betegség magasabb aktivitásával járt együtt (229). Az eredményeinktől való eltérésnek több magyarázata is lehet, az egyik legfontosabb, hogy Liou és Huang nem aktivált T-sejteket használt, ami pedig az SLE-ben zajló immunfolyamatok jellemzésére relevánsabb és elfogadottabb eljárás, valamint fehérje szinten határozták meg az enzimek mennyiségét, ellentétben a mi mRNS expressziós méréseinkkel. Ugyanakkor fontos információ a mi munkánk szempontjából is, hogy összefüggést tudtak kimutatni a magasabb szialsav tartalom és a betegség-aktivitás egyik paramétere között.

Hasonlóan a Gal-1 SLE-ben betöltött szerepéhez, a T-sejtek felszíni glikozilációjával kapcsolatosan is egyetlen állatkísérletes közlemény található a szakirodalomban, melyben MRLlpr/lpr egértörzsben a szializációt végző enzimek fokozott expresszióját találták, valamint a vizsgált, jelen esetben mucin típusú glikoproteinekkel reagáló lektinek kötődése is intenzívebb volt a T-sejt felszínéhez (230). Humán mintákkal kapcsolatos kísérletekről adatot pedig a korábban említettek szerint egyedül Liou és Huang közleményében találtunk, ahol nyugvó sejtek vizsgálatával főleg B-sejtekre vonatkozó megfigyelésekről számoltak be (229). Így vizsgálataink új információkat szolgáltatnak az aktivált T-sejtek felszíni szénhidrát-összetételéről és az azt kialakító gének működéséről, aminek egyik közvetlen következménye a Gal-1 csökkent kötődése, és ezáltal feltehetően gátolt immunregulátor működése SLE-ben.

A Gal-1 hatásmechanizmusának megértéséhez járulhatnak hozzá azok a kísérleteink, amelyek azt mutatták, hogy ha az aktivált T-sejteket Gal-1 hatás éri a környezetből, pl. antigén-prezentáló sejtek vagy szöveti mesenchymalis vagy más eredetű sejtek részéről, akkor az immunológiai szinapszis szerkezete megváltozik, szekvesztrálódik belőle az Lck enzim. Az Lck a T-sejt receptoron keresztül létrejövő jelátvitel egyik nagy fontosságú korai résztvevője. A T-sejt receptor antigénkötésekor az immunológiai szinapszissá összeálló lipid raftokban fokozódik az Lck aktivitása azáltal, hogy az MHC-antigén komplex és a T-sejt receptor

kapcsolódása következtében aktiválódó CD45 foszfatáz eltávolítja az Lck 505-ös pozícióban levő tirozinjának gátló foszfátcsoportját (231). Az így aktiválódó Lck foszforilálja a CD3 és a zéta lánc ITAM aktiváló motívumaiban levő tirozint, hozzájárulva így a T-sejt receptor jelátviteli kaszkádjának elindulásához (231). Azzal, hogy eredményeink szerint a Gal-1 hatására az Lck eltávolodik a T-sejt receptoroktól, potenciális magyarázatot tudunk szolgáltatni a Gal-1-nek a T-lymphocyták aktiválódását gátló immunregulátor funkciójára. Több kapcsolódási pont lehet a leírt mechanizmus és az SLE-ben észlelhető T-sejt diszfunkció között is. Sok adat szól ugyanis amellett, hogy utóbbi részeként az Lck enzim expressziója és működése sem marad normális: az Lck mennyisége alacsonyabb SLE-s betegek T-lymphocytáiban, akár a lipid-raft frakciót, akár a sejtmembrán egyéb területeit vizsgáljuk (232). Ugyan az mRNS expresszió is csökken, de az Lck fehérje csökkent mennyiségéért az ubikvitináció-protaszóma úton történő eltávolítás tűnt elsősorban felelősnek. Az SLE-s lipid raftokban ezzel párhuzamosan a GM1 gangliozid és a CD45 fokozott expresszióját lehetett kimutatni, és mint említettük, mindkét komponens a Gal-1 fontos kötődési partnere. Azt is kimutatták, hogy az említett elváltozásokat SLE-s betegek széruma nem tudta kiváltani, hanem közvetlen sejt-sejt kontaktus indukálta azokat, hasonlóan a Gal-1 hatásmechanizmusához (232). A lipidraftok korai és fokozott aggregációjának és a megváltozott proximális tirozin-kináz aktiválódásnak a T-sejt apoptosisban, IL2-termelődésben és ezáltal a perifériás tolerancia indukciójában mind fontos szerepe van (233). Egyelőre nem lehet megválaszolni, hogy a Gal-1-nek, illetve a vele szemben kialakuló rezisztenciának lehet-e köze az említett T-sejt diszfunkciós jelenségek kialakításában SLE-ben.

A T-sejtek működészavarának hátterében végül felmerült kutatásunk alapján a TMEM203 molekulának is a potenciális szerepe. Ennek az endoplazmatikus transzmembrán fehérjének partner kutatócsoportunk vizsgálatai előtt nem volt ismert immunregulátor szerepe. A TMEM203 funkciójának részletes vizsgálata egyértelműen igazolta, hogy a molekula fontos szerepet játszik a STING indukciójában, mivel génkiütés vagy –csendesítés után a STING termelődés jelentősen csökkent, és az ezt követő lépések, úgy mint az IRF3 upregulációja és az I. típusú IFN-ok következményes túltermelődése is gátlódott (234). A TMEM203 fehérje szoros kontaktusban volt a STING-gel, ahogy a kolokalizációs és ko-immunoprecipitációs vizsgálatok ezt kimutatták. SLE-ben nem vizsgálták rajtunk kívül e molekula jelentőségét, így sem állatkísérletes, sem humán funkcionális vizsgálatok nem történtek annak megvilágítására, hogy a fokozott TMEM203 expresszió mennyire jelentős szerepet játszhat az IFN szignatúra upregulációjának kialakításában a számos többi, jól ismert induktorhoz képest. A TMEM203 jelentőségét növelheti ugyanakkor az a kulcsszerep, ami a STING expresszióra és IFN termelődés szabályozására kifejtett hatásában látszott. Ugyan a STING elsősorban a citoszolikus nukleinsavak által indukált IFN-termelődés kiváltásának fontos mediátora, aminek SLE-ben kisebb szerepe van az endosomal DNS-hez és RNS-hez képest, de fontosságát jelzi egyrészt, hogy funkcionyerő mutációja két autoinflammatorikus betegségnek (familialis chilblain lupus (235) és a STING-associated vasculopathy of infancy (236)) is a közvetlen oka, másrészt az, hogy SLE-ben is számos közleményben számoltak be kóroki szerepéről (237, 238). A harmadik, általunk vizsgált fehérje a MAVS szintén felmerült már SLE-vel kapcsolatosan, igazolták, hogy a reaktív oxigén-gyökök által módosított citoszolikus DNS többek között a MAVS közvetítésével hozza létre SLE-t indukáló hatásait, továbbá hogy

vírusfertőzésekben aktiválódása ill. a fehérje mitochondrialis aggregációja is IRF3 túltermelődést indukál, TLR-függő és attól független módon is (239-241).

A másik, SLE-hez kapcsolódó témánkra, az antiphospholipid antitest-pozitivitás és az SLE klinikai megjelenésének alakulására vonatkozóan legfontosabb tanulságunk az, hogy nemcsak a thromboemboliás betegségek megelőzésében kell gondolkodnunk, ha betegünkben konzekvensen APA-pozitivitást igazolunk, hanem fokozott figyelemmel kell lennünk pl. a nephritis, interstitialis tüdőbetegség vagy cytopeniák irányában is. Erre vonatkozó tanulmányunkban az APA-pozitivitás és a társuló APS az irodalmi adatokkal megegyező tartományban, a betegek szignifikáns hányadában fordult elő (131, 242, 243). Az eddig is ismert volt, hogy a vénás vagy artériás akut thrombotikus szövődmények (mély vénés thrombosis, tüdőembolia, stroke, myocardialis infarctus) mellett sok egyéb, microthromboticus vagy endothel aktivációs tünet (pl. migrén, livedo reticularis, ujjvasculitis, Libman-Saks endocarditis) is gyakoribb APA jelenléte vagy APS társulása esetén (131-133,244-246). Arra is voltak adatok, hogy a haematológiai cytopeniák, elsősorban a thrombocytopenia, de a haemolyticus anaemia is kapcsolatba hozható APA-k jelenlétével (247-251). Mindezek megerősítése mellett adataink szerint további szervi manifesztációk kialakulására is kockázatot jelent az APS társulása, úgy mint nephritis, interstitialis pneumonia, pleuritis vagy myocarditis. Emellett a szervi manifesztációk száma is magasabb, már APA-pozitivitás esetén is, és ez a különbség APS-társulás esetén még markánsabb lesz. Utóbbi összehasonlításban kiemelendő, hogy a major szervi manifesztációk, az életfontos szervek érintettsége is gyakoribb lesz, és ez nem annak tudható be, hogy az APS-hez közvetlenül társuló szervi érintettségek száma hozzáadódik a többi szervi manifesztáció számához, hanem a „tisztán” SLE-hez kapcsolható manifesztációk száma is növekszik.

Az elmúlt években az SLE-s betegek jobb morbiditási és mortalitási adatainak hátterében elsősorban nem új gyógyszerek megjelenése állt, hanem a kórlefolyás prediktorainak jobb azonosítása, az egyes szervi manifesztációk hatékonyabb korai diagnózisa, és a prediktív, az irreverzibilis károsodást és a relapsusok kialakulását megelőző hatékony immunszuppresszív kezelés alkalmazásának elterjedése (252). E prediktorok közé tudjuk eredményeink alapján az APA- ill. APS-pozitivitást is sorolni, és úgy gondoljuk, bár erre vonatkozó prospektív vizsgálatok nem történtek, hogy akár interstitialis tüdőbetegség irányában (rendszeres légzésfunkciós vizsgálat, szükség esetén tüdő nagy felbontású CT /HRCT/), akár nephritis irányában (proteinuria, haematuria, anti-C1q antitest, esetleg a jövőben még pontosabb szérum vagy vizelet-biomarker (253, 254)) szorosabb követést igényelnek ezek a betegek.

5.3. A biológiai terápia leépítésének lehetőségei krónikus arthritisekben

Vizsgálatunk értékének azt tekinthetjük, hogy elsőként vetettük fel Magyarországon, de nemzetközi összehasonlításban is újnak számított az a kérdés, hogy van-e lehetőség a biológiai terápiák leépítésére, ha a betegség már hosszabb ideje remisszióban van. Néhány évvel azután, hogy a világ fejlettebb részein és Magyarországon is elterjedtek a biológiai terápiák az RA, AS és az AP kezelésére, leginkább az volt világos, hogy kinél indokolt a biológiai terápiák elindítása, és mely tényezők jelezhetik előre a kedvező terápiás válasz

kialakulását. Kellő tapasztalat alakult már ki a biologikumok várható hatékonyságáról, biztonságosságáról, az egyes hatástani csoportok, ill. csoporton belüli szerek közötti váltásról, a hagyományos DMARD kezeléssel szembeni előnyökről, és a törzskönyvezés küszöbén álló célzott szintetikus DMARD-okhoz képest tapasztalt, vagy inkább feltételezett előnyökről és hátrányokról. Azonban egyre több beteg kapta már hosszabb ideje, több éve a biológiai kezelést, akiknél mind klinikailag, mind laboratóriumiilag teljes remisszió állt fenn, és mind a betegben, mind az orvosban felmerült a kérdés, hogy mennyire hosszú távon van szükség e terápiák folytatására, mi lenne, ha megpróbálnák leállítani a terápiát. Az erre vonatkozó prospektív, randomizált vizsgálatok tervezéséhez, és a „real life” tapasztalatok gyűjtéséhez tartottuk hasznosnak a többközpontos felmérést, melybe viszonylag nagyszámú beteget tudtunk bevonni.

Fontos kiemelni, hogy e betegek nem az addigi és későbbi prospektív vizsgálatok szelekciós kritériumait teljesítő, tartós remisszióban levő betegek voltak, hanem a biológiai terápia leállítására az élet adta okok, így leggyakrabban ellenjavallat megjelenése miatt (mellékhatás, fertőzés, tumor gyanúja), vagy a beteg kérése, ill. elégtelen compliance, hatástalanság vagy családtervezés miatt került sor. A miénkéhez hasonló arányban fordultak elő a leállítás okai között fertőzés, egyéb mellékhatás vagy hatástalanság több hasonló felmérésben RA-ban (255, 256), valamint egy brit felmérésben AS-ben is (257). Egy kérdőíves felmérésben 581 beteg (RA, AS és AP diagnózisokkal) válaszolt arra, hogy saját döntéséből miért hagyta el a biológiai kezelést, és 5 fő ok rajzolódott ki statisztikailag szignifikánsan: fájdalommentesség, több mint egy biologikum használata, subcutan (saját maga által adagolt) szer alkalmazása, negatív meggyőződések a biologikummal kapcsolatban és orvosi vagy társadalmi támogatás hiánya (258). Ezen okok számos alkalommal megjelentek a mi beteganyagunkban is a tartós remisszió, hatástalanság vagy rossz compliance kategóriákon belül.

18 esetben azonban a tartós remisszió volt a leállítás közvetlen oka, ami már némi következtetésekre lehetőséget adott az említett kérdés vonatkozásában is. Eredményeink megerősítették azt az egyébként várható összefüggést, hogy minél alacsonyabb betegség-aktivitás idején történik a leállítás, annál nagyobb hányadban fordul elő tartós remisszió. Az, hogy alacsony betegség-aktivitás esetén történő leállítás után az RA-s betegek 60,6%-a remisszióban is maradt, az ismert adatokhoz hasonló, sőt még jobb is, különösen, ha figyelembe vesszük, hogy a beteganyag többségében régi betegség-fennállású betegekből tevődött össze, ellentétben az akkoriban már ismert BeSt vagy OPTIMA vizsgálatokkal (143,148). Azon betegek, akiknél tartós remisszió miatt történt a leállítás, mindannyian remisszióban is maradtak az utánkövetési időszak során, ami magasabb, mint amit randomizált vizsgálatok alapján várhatunk, ennek oka valószínűleg szelekciós elfogultság, azaz a leállítás engedélyezésének igen szigorú mérlegelése is lehetett. Ezen betegek akár évek óta remisszióban voltak, egyes esetekben esetleg betegség, fogászati beavatkozás vagy más okból korábban már rövidebb időre ki is maradhatott a biológiai terápia anélkül, hogy ez tüneteket okozott volna, így az átlagosnál is nagyobb biztonsággal történhetett a leállításról szóló döntés meghozatala.

A biologikum teljes elhagyását a témafelvetésben ismertetett közleményeken (143-148) kívül az utóbbi években is több tanulmány vizsgálta. Mind a PRESERVE (259), mind a DOSERA (260) vizsgálat arra a következtetésre jutott, hogy a teljes elhagyás esetén a relapsusráta szignifikánsan magasabb (57% ill. 87% egy év után), mint azoknál, akik folytatják a kezelést. Ugyanakkor a fokozatos dóziscsökkentés (akár az egyszeri adag csökkentésével, akár az adagolási intervallum növelésével) a betegek nagy többségében hasonló kórlefolyást hoz, mint azoknál, akik változatlanul a teljes dózist kapják (255, 259-264), azaz jellemzően numerikusan enyhén, de nem szignifikánsan csökkent arányban, de megőrzik a remissziót.

Látható volt már ekkor is, hogy sok esetben akár a teljes leállítás is járható út lehet RA-ban, de a relapsus esélye nagy. Fontos ezért prediktív faktorok keresése arra, hogy melyik az a betegcsoport, akinél a leállítás utáni tartós remisszió esélye kellően magas. Tanulmányunkban a leállítás előtti alacsony betegség-aktivitású időszak hossza egyenes, a biológiai terápia hossza és a leállításkor mért betegség-aktivitás fordított arányosságot mutatott a leállítás utáni alacsony betegség-aktivitás idejével. A szakirodalmi adatok szerint is a leállításkori alacsony betegség-aktivitás, a diagnózis és az anti-TNF indítása közötti rövidebb időtartam, valamint a jobb funkcionális státusz, fiatalabb kor, kisebb radiológiai károsodás, férfi nem és az ACPA-szeronegativitás jelzi előre a leállítás utáni tartós remissziót (255, 265, 266). Mint látható, az első két tényező kapcsán tanulmányunk egybecseng a nemzetközi tapasztalatokkal. Azt, hogy rövidebb anti-TNF kezelés miért társul mégis hosszabb alacsony betegség-aktivitással a leállítás után, jelen adatainkból nem tudjuk egyértelműen megmagyarázni, és a nemzetközi adatok sem utalnak ilyen összefüggésre, de valószínű, hogy kohorszunkban ezen viszonylag rövid biológiai kezelést kapó betegeknek enyhébb lehetett a betegsége, ami gyorsabban és nagyobb mértékben reagált a biológiai terápiára, így annak leállítása után is nagyobb eséllyel maradhatott fenn a remisszió. A randomizált, prospektív vizsgálatok közül is több esetben 6 hónapos remisszió után már dóziscsökkentést vagy leállítást tartalmazott a protokoll, jelezve, hogy ezen időtartam is elég lehet egy tartós biologikum-mentes remisszió megalapozására, bár az elfogadott gyakorlat legalább 12 hónapos remissziót irányoz elő a gyógyszer-leépítés előtt.

A prediktorok listáját bővíthetnék olyan biomarkerek, amik a leállítás vagy dóziscsökkentés elkezdésének pillanatában meghatározva kellő prediktív értékkel bírnának – együttesen értékelve az említett klinikai tényezőkkel – a remisszió hosszára, így segíthetnének a döntés meghozatalában. Ezideig nem találtak ilyen validált biomarkert, ezért is kezdtük el felmérésünk után, szintén több hazai centrum bevonásával, egy prospektív vizsgálat tervezését, melyben szolubilis mikroRNS-ek és más biomarkerek prediktív értékét szeretnénk felmérni. E munka jelenleg a mintagyűjtés befejezésének időszakában tart, méréseinket ezt követően végezzük el.

AS-ben eredményeink szintén az addigi kevés, és a későbbi több tapasztalatot tükrözik vissza: sokkal kisebb az esély a biologikum-mentes remisszióra a spondylarthritisekben, mint RA-ban (149, 150). Újabb randomizált, kontrollált tanulmányok szerint az anti-TNF kezelés teljes elhagyása után legalább a betegek felében relapsus lesz, általában röviddel az elhagyás után (267, 268), sőt gyakran az anti-TNF újraindítása sem lesz már annyira hatékony, mint előzőleg (267). A dóziscsökkentés azonban itt is járható útnak tűnik (267), hiszen közel

azonos arányban, szignifikáns különbség nélkül maradt fenn a remisszió a biológikum 50%-os dóziscsökkentése után, mint teljes dózis folytatása esetén.

6. Új tudományos eredmények összefoglalása

1. Primer SS-s betegek szérumában a humán m3AChR-rel reagáló autoantitestek mutathatók ki a betegek jelentős hányadában
2. Az anti-m3AChR autoantitest-pozitivitás magas szenzitivitással és specificitással képes elkülöníteni a primer SS-t egészséges kontrolloktól, valamint alkalmas differenciálásra RA-s és SLE-s betegektől és olyan páciensektől, akik a primer SS differenciál-diagnosztikájában a napi gyakorlatban szóba jönnek
3. A primer SS-s betegek anti-m3AChR antitestjei kötődnek a humán nyálmirigyek epithelsejtjeihez az acetilcholin receptornak megfelelő lokalizációban
4. Primer SS-s betegek kisnyálmirigyeiben antitest-kötődés mutatható ki az m3AChR-nek megfelelően
5. Az anti-m3AChR antitestek SLE-s és RA-s betegek egy részének szérumában is kimutathatók. Az SLE-ben és RA-ban kialakuló száraz tünetcsoporthoz jelenlétével az anti-m3AChR-pozitivitás nem mutat asszociációt, de több, a pszicho-szociális jóllétet mérő mentális paraméter kapcsolatot mutat a száraz tünetcsoporthoz megjelenésével
6. A Gal-1 csökkent mRNS expressziót mutat SLE-s betegek aktivált T-lymphocytaiban aktív betegség idején, ami inaktív betegség idején normalizálódik.
7. SLE-s betegek aktivált T-lymphocytaiban csökkent apoptotikus reakciót mutatnak az exogén Gal-1-gyel szemben, szintén betegségaktivitás-függő módon
8. Kapcsolat mutatható ki az aktivált T-lymphocytaiban endogén Gal-1 termelése és az exogén Gal-1-re adott apoptotikus reakciója között. A de novo expresszálandó intracelluláris Gal-1 hiánya rezisztenssé teszi a sejteket az extracelluláris Gal-1-gyel szemben.
9. A Gal-1 nem szekretálódik a T-sejtekből aktiváció során, hanem a plazmamembrán belső oldalához közel lokalizálódik
10. SLE-s betegek T-lymphocytaiban nyugalmi állapotban magasabb kötési aktivitást mutatnak több lektinnel szemben, mint egészséges kontrollok. Az aktiváció során az egészségesekben nagyobb mértékű lektinkötési aktivitás-fokozódás alakul ki, mint SLE-ben, így a fenti különbség eltűnik, kivéve a Gal-1 esetében, melynek kötődése az aktivált T-sejtek felszínéhez alacsonyabb SLE-s betegekben, mint egészségesekben
11. SLE-ben az ST3GAL6 / NEU1 és az ST6GAL1 / NEU1 mRNS arány szignifikánsan magasabb, mint kontrollokban, ami arra utal, hogy a sejtfelszíni glikánok terminális szialsav

komponensének mennyiségét szabályozó enzimek között a szializáló enzimek túlsúlyban vannak

12. Neuraminidáz kezelés hatására az SLE-s aktivált T-sejtek Gal-1 kötő képessége fokozódik, ami támogatja azt a hipotézist, hogy a T-lymphocyták fokozott sejtfelszíni szializációja gátolja a Gal-1 kötődését e betegségben

13. Az exogén Gal-1 hatására az Lck enzim eltávolodik az immunológiai szinapszis területéről aktivált T-lymphocytákban

14. A TMEM203 enzim, mely részt vesz az I. típusú interferonok indukciójában, magasabb mRNS expressziót mutat SLE-s aktivált T-sejtekben, mint kontrollokban, és mennyisége pozitív korrelációt mutat a betegség aktivitását jelző C3-hypocomplementaemiával

15. Az antifoszfolipid szindróma társulása SLE-hez nemcsak a thrombotikus rizikót fokozza, hanem több nem-thromboemboliás mechanizmusú szervi manifesztáció előfordulásával is együtt jár. A társulás esetén az adott betegben a kórlefolyás során megjelenő összes és azon belül a major szervi manifesztációk száma is magasabb

16. Magyarországi RA-s és AS-s betegek körében a biológiai terápia leállítása után RA-ban a betegek viszonylag jelentős hányadában, AS-ben viszont csak ritkán marad remisszióban a betegség. Több klinikai paraméter összefüggést mutat a leállítás utáni relapsus-mentes kórlefolyással

7. Köszönetnyilvánítás

A lista nem lehet teljes. A dolgozatban ismertetett tudományos eredmények eléréséért és a tudományos kutatói pályám támogatásáért elsőként azon kutatók jutnak nagy hálával eszembe, akik, amikor jóformán vagy teljesen ismeretlenül egy kutatási ötlettel bekopogtattam hozzájuk, felkarolták, támogatták a terv megvalósulását, és laborjukba, munkacsoportjukba fogadtak. Ők Dr. Berczi István professzor a kanadai Winnipegben, Dr. Marczinovits Ilona az Élettani Intézetben, Dr. Fehér Erzsébet professzornő a budapesti Semmelweis Egyetem Anatómiai Intézetében és Dr. Monostori Éva professzornő az SZBK-ban.

Egész orvosi pályámat, különösen ami a klinikusi tevékenységet illeti, nagyban meghatározta Dr. Pokorny Gyula professzor hatása, akinek köszönöm, hogy belgyógyászati, klinikai immunológusi gondolkodást tudtam elsajátítani tőle, és aki mindig támogatta és lehetővé tette, hogy kutatómunkát végezzek.

Jelen munkámat munkatársaimnak ajánlom, a Reumatológiai és Immunológiai Klinika orvosainak és dolgozóinak, köszönettel és elismeréssel mindenki szorgalmas, értékes munkájáért, ami lehetőséget, háttérrel és inspirációt egyaránt nyújtott a betegségek jobb megismerését és gyógyítását célzó kutatásokhoz. Remélem, hogy minél többen közülük

nálam jóval gazdagabb, eredményesebb tudományos pályát tudnak befutni. Nagy köszönettel tartozom Pördi Szilviának, akinek elkötelezett, megbízható munkájára immár több évtizede támaszkodhatok a laboratóriumi munkákban. Két PhD doktoranduszom, Dr. Deák Magdolna és Dr. Hornung Ákos szorgalmas munkája nélkül az utóbbi sok év tudományos eredményei nem születhettek volna meg. Rajtuk kívül is köszönöm a Klinikánk minden munkatársának részvételét a betegek kiválasztásában, a minták gyűjtésében, a számtalan adatgyűjtéssel járó klinikai adatbázis építésében.

Boldog vagyok, hogy az SZBK-ban annak a kutatócsoportnak lehettem és lehetek a tagja, ahol Dr. Czibula Ágnessel, Dr. Szabó Enikővel, Dr. Fajka-Boja Robertával, Dr. Kriston-Pál Évával, Novák Juliannával és Gercsó András Tibornéval dolgozhattam együtt. Vidám, mindig segítő, elkötelezett, szakszerű hozzáállásuk kutatói munkám egyik legnagyobb élménye.

Kutatói pályám során sok támogatást kaptam Dr. Kemény Lajos professzortól és Dr. Bata Zsuzsanna professzornőtől, többek között a PhD doktori képzésbe történő bekapcsolódásomban, kutatási terveim támogatásában, a szinte mindennapi közös munkákban, és abban, hogy a Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika laboratóriumában Dr. Kiss Mária irányítása alatt nagyon fontos kísérleteket végezhattunk. Tanárnőnek nagyon hálás vagyok az együtt végzett sok munkáért.

A tudományos kutatás világába, módszertanába elsőként Dr. Szabó Gyula professzor vezetett be tudományos diákköri témavezetőként. Nagyon sokat tanultam még laboratóriumi módszerek, a kutatói gondolkodás terén Dr. Szekeres-Barthó Júlia professzornőtől és munkatársaitól a pécsi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézetben, Dr. Carolyn Coulam és Dr. Roumen Rousseu intézetében Washingtonban, és Dr. Nagy Évától Winnipegben.

Sokat köszönhetek Dr. Lonovics János, Dr. Wittmann Tibor és Dr. Ábrahám György professzoroknak és Dr. Madácsy Lászlónak, azért, mert megteremtették a lehetőséget belgyógyászati és kutatói munkám végzéséhez.

Hálás szívvel emlékszem vissza első önálló kísérleteink megtervezésére és végrehajtására Dr. Szili-Török Tamással, Dr. Rakonczay Zoltán professzor segítségével a nyálmirigyminták preparálásában, Dr. Tóth Gábor professzor munkájára az antigének elkészítésében, Dr. Rudas László professzor, Dr. Paprika Dóra, Dr. Rosztóczy András, Dr. Papos Miklós, Dr. Dorgai László, Dr. Szvetnik Attila, Dr. Szekanecz Zoltán professzor és munkatársai, Dr. Keszthelyi Péter és munkatársai, Dr. Nagy György professzor (Simmelweis Egyetem Anatómiai Intézet), és Dr. Molnár János professzor támogatására a munkák során. Mindig jó szívvel emlékszem Koroknay Józsefné Jolika, az I. Belklinikai Immunlabor vezető asszisztense személyére és minden segítségére. Nagyon sokat tanultam és sok segítséget kaptam Dr. Marczinovits Ilona tanárnő két asszisztensnőjétől, Gál Ferencnétől és Szelepcsényi Zoltánnétól.

Életem és munkám minden aspektusára meghatározó hatással vannak szüleim, tudományos szempontból különösen édesapám példája. Köszönöm nekik, hogy életemet mindig egyengették, útmutatással szolgáltak. Boldogságomat, motivációimat családom, feleségem és gyermekeim körében találtam meg, és mindig nagy szeretettel gondolok rájuk.

8. Irodalomjegyzék

1. Kroese FGM, Haacke EA, Bombardieri M. The role of salivary gland histopathology in primary Sjögren's syndrome: promises and pitfalls. *Clin. Exp. Rheumatol.* 36.Suppl: 112: 222-233, 2018.
2. Kassan SS, Moutsopoulos HM. Clinical Manifestations and Early Diagnosis of Sjögren Syndrome. *Arch. Intern. Med.* 164: 1275-1284, 2004.
3. Moutsopoulos HM. Sjögren's syndrome: autoimmune epitheliitis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 72:162-165, 1994.
4. Fox RI, Adamson TC, Fong S, Young C, Howell FW. Characterization of the phenotype and function of lymphocytes infiltrating the salivary gland in patients with primary Sjogren syndrome. *Diagn. Immunol.* 1: 233–239, 1983.
5. Bombardieri M, Barone F, Humby F, Kelly S, McGurk M, et al. Activation-induced cytidine deaminase expression in follicular dendritic cell networks and interfollicular large B cells supports functionality of ectopic lymphoid neogenesis in autoimmune sialoadenitis and MALT lymphoma in Sjögren's syndrome. *J Immunol.* 179: 4929-4938, 2007.
6. Grönhagen CM, Fored CM, Granath F, Nyberg F. Cutaneous lupus erythematosus and the association with systemic lupus erythematosus: a population-based cohort of 1088 patients in Sweden: Incidence of cutaneous lupus erythematosus in Sweden. *Br. J. Dermatol.* 164: 1335–1341, 2011.
7. Yung S, Chan TM. Anti-DNA antibodies in the pathogenesis of lupus nephritis - The emerging mechanisms. *Autoimmun. Rev.* 7: 317–321, 2008.
8. Greenberg BM. The Neurologic Manifestations of Systemic Lupus Erythematosus. *The Neurologist.* 15: 115–121, 2009.
9. DhalaA. Pulmonary Arterial Hypertension in Systemic Lupus Erythematosus: Current Status and Future Direction. *Clin. Dev. Immunol* 2012:854941, 2002.
10. Zeller C, Appenzeller S, Cardiovascular Disease in Systemic Lupus Erythematosus: The Role of Traditional and Lupus Related Risk Factors. *Curr. Cardiol. Rev.* 4: 116–122, 2008.
11. Moulton VR, Tsokos GC. Abnormalities of T cell signaling in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther.* 13:207, 2011.
12. De S, Barnes BJ. B cell transcription factors: Potential new therapeutic targets for SLE. *Clin. Immunol.* 152: 140–151, 2014.
13. Colonna L, Lood C, Elkon KB. Beyond apoptosis in lupus. *Curr. Opin. Rheumatol.* 26: 459–466, 2014.

14. Shlomchik MJ, Craft JE, Mamula MJ. From T to B and back again: positive feedback in systemic autoimmune disease. *Nat. Rev. Immunol.* 1: 147–153, 2001.
15. Hong KM, Kim HK, Park SY, Poojan S, Kim MK, et al. CD3Z hypermethylation is associated with severe clinical manifestations in systemic lupus erythematosus and reduces CD3ζ-chain expression in T cells. *Rheumatology (Oxford)* 56:467-476, 2017.
16. Nagy G, Barcza M, Gonchoroff N, Phillips PE, Perl A. Nitric oxide-dependent mitochondrial biogenesis generates Ca²⁺ signaling profile of lupus T cells. *J Immunol.* 173:3676-3683, 2004.
17. Mak A, Kow NY. The Pathology of T Cells in Systemic Lupus Erythematosus. *J. Immunol. Res.* 2014:419029, 2014.
18. Dolff S, Bijl M, Huitema MG, Limburg PC, Kallenberg CGM et al. Disturbed Th1, Th2, Th17 and Treg balance in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin. Immunol.* 141: 197–204, 2011.
19. Kerekes G, Soltész P, Nurmohamed MT, Gonzalez-Gay MA, Turiel M, et al. Validated methods for assessment of subclinical atherosclerosis in rheumatology. *Nat Rev Rheumatol.* 8:224-234, 2012.
20. Klareskog L, Stolt P, Lundberg K, Källberg H, Bengtsson C, Grunewald J, et al. A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum.* 54:38-46, 2006.
21. Reynisdottir G, Olsen H, Joshua V, Engström M, Forsslund H, et al. Signs of immune activation and local inflammation are present in the bronchial tissue of patients with untreated early rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 75:1722-1727, 2016.
22. Toes R, Pisetsky DS. Pathogenic effector functions of ACPA: Where do we stand? *Ann. Rheum. Dis.* 78:716-721, 2019.
23. Ai R, Laragione T, Hammaker D, Boyle DL, Wildberg A, et al. Comprehensive epigenetic landscape of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Nat. Commun.* 9:1921, 2018.
24. Christodoulou MI, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM Characteristics of the minor salivary gland infiltrates in Sjögren's syndrome. *J. Autoimmun.* 34:400-407, 2010.
25. Kruize AA, van Bijsterveld OP, Hené RJ, de Wilde PCM, Feltkamp TEW, et al. Long term course of tear gland function in patients with keratoconjunctivitis sicca and Sjögren's syndrome. *Br. J. Ophthalmol* 81:435-438, 1997.
26. Andoh Y, Shimura S, Sawai T, Sasaki H Takishima T, et al. Morphometric analysis of airways in Sjögren's syndrome. *Am. Rev. Respir. Dis.* 148:1358-1362, 1993.

27. Gemignani F, Manganelli P, Pavesi G, Marbini A. Polyneuropathy in Sjögren's syndrome. A case of prevalently autonomic neuropathy with tonic pupil and hypohydrosis. *Funct. Neurol.*3:337-348, 1988.
28. Waterschoot MP, Guerit JM, Lambert M, de Barse T. Bilateral tonic pupils and polyneuropathy in Sjögren's syndrome: a common pathophysiological mechanism? *Eur Neurol* 31:114-116, 1991.
29. Sorajja P, Poirier MK, Bundrick JB, Matteson EL. Autonomic failure and proximal skeletal myopathy in a patient with primary Sjögren's syndrome. *Mayo Clin Proc* 74:695-697, 1999.
30. Katz JS, Houroupian D, Ross MA. Multisystem neuronal involvement and sicca complex: broadening the spectrum of complications. *Muscle Nerve* 22:404-407, 1999.
31. Mandl T, Jacobsson L, Lilja B, Sundkvist G, Manthorpe R. Disturbances of autonomic nervous function in primary Sjögren's syndrome. *Scand. J. Rheumatol.* 26:401-406, 1997.
32. Andonopoulos AP, Christodoulou J, Ballas C, Bounas A, Alexopoulos D. Autonomic cardiovascular neuropathy in Sjögren's syndrome. A controlled study. *J. Rheumatol.*25:2385-2388, 1998.
33. Barendregt PJ, van den Meiracker AH, Markusse HM, Tulen JHM, Boomsma F, et al. Parasympathetic failure does not contribute to ocular dryness in primary Sjögren's syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* 58:746-750, 1999.
34. Tumati B, Perazzoli F, Negro A, Pantaleoni M, Regolisti G. Heart rate variability in patients with Sjögren's syndrome. *Clin. Rheumatol.* 19:477-480, 2000.
35. Niemela RK, Pikkujamsa SM, Hakala M, Huikuri HV, Airaksinen KEJ. No signs of autonomic nervous system dysfunction in primary Sjögren's syndrome evaluated by 24 hour heart rate variability. *J. Rheumatol.*27:2605-2610, 2000.
36. Mandl T, Bornmyr SV, Castenfors J, Jacobsson LTH, Manthorpe R, et al. Sympathetic dysfunction in patients with primary Sjögren's syndrome. *J. Rheumatol.*28:296-301, 2001.
37. Barendregt PJ, Tulen JHM, van den Meiracker AH, Markusse HM. Spectral analysis of heart rate and blood pressure variability in primary Sjögren's syndrome. *Ann. Rheum. Dis.*61:232-236, 2002.
38. Meurman JH, Collin HL, Niskanen L, Toyry J, Alakuijala P, et al. Saliva in non-insulin dependent diabetes mellitus patients and control subjects. The role of the autonomic nervous system. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*86:69-76, 1998.
39. Ramos-Rems L, Suarez C, Almazan M, Russell AS. Low tear production in patients with diabetes mellitus is not due to Sjögren's syndrome. *Clin. Exp. Rheumatol.*12:375-380, 1999.
40. Jonsson R, Haga HJ, Gordon TP. Current concepts on diagnosis, autoantibodies and therapy in Sjögren's syndrome. *Scand. J. Rheumatol.* 29:341-348, 2000.

41. Humphreys-Beher M, Brayer J, Yamachika S, Peck AB, Jonsson R. An alternative perspective to the immune response in autoimmune exocrinopathy: induction of functional quiescence rather than destructive autoaggression. *Scand. J. Immunol.* 49:7-10, 1999.
42. Nagaraju K, Cox A, Casciola-Rosen L, Rosen A. Novel fragments of the Sjögren's syndrome autoantigens α -fodrin and type 3 muscarinic acetylcholine receptor generated during cytotoxic lymphocyte granule-induced cell death. *Arthritis Rheum.* 44:2376-2386, 2001.
43. Dawson LJ, Christmas SE, Smith PM. An investigation of interactions between the immune system and stimulus-secretion coupling in mouse submandibular acinar cells. A possible mechanism to account for reduced salivary flow rates associated with the onset of Sjögren's syndrome. *Rheumatology* 39:1226-1233, 2000.
44. Kovács L, Török T, Bari F, Kéri Z, Makula É, et al. Impaired microvascular response to cholinergic stimuli in primary Sjögren's syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* 59:48-53, 2000.
45. Bacman S, Sterin-Borda L, José Camusso J, Arana R, Hubscher O, et. al. Circulating antibodies against rat parotid gland M3 muscarinic receptors in primary Sjögren's syndrome. *Clin. Exp. Immunol.* 104:454-459, 1996.
46. Robinson CP, Brayer J, Yamachika S, Esch TR, Peck AB, et al. Transfer of human serum IgG to nonobese diabetic Ignull mice reveals a role for autoantibodies in the loss of secretory function of exocrine tissues in Sjögren's syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:7538-7543, 1998.
47. Bacman S, Berra A, Sterin-Borda L, Borda E. Muscarinic acetylcholine receptor antibodies as a new marker of dry eye Sjögren's syndrome. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42:321-327, 2001.
48. Cavill D, Waterman SA, Gordon TP. Failure to detect antibodies to extracellular loop peptides of the muscarinic M3 receptor in primary Sjögren's syndrome. *J. Rheumatol.* 29:1342-1344, 2002.
49. Laczkó I., Vass E., Tóth G.K., Marczinovits I., Kiss M., et al. Conformational consequences of coupling bullous pemphigoid antigenic peptides to glutathione-S transferase and their diagnostic significance. *J. Peptide Sci.* 6: 378-386, 2000.
50. Kovács L, Marczinovits I, Tóth GK, György A, Molnár J, et al. The structural organisation of a human muscarinic receptor-specific peptide is important in the serological detection of anti-acetylcholine receptor autoantibodies in primary Sjögren's syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* 62. Suppl 1:233, 2003.
51. Camby I, Le Mercier M, Lefranc F, Kiss R., Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology* 16: 137R–157R, 2006.

52. Rabinovich GA, Ariel A, HersHKoviz R, Hirabayashi J, Kasai KI et al. Specific inhibition of T-cell adhesion to extracellular matrix and proinflammatory cytokine secretion by human recombinant galectin-1. *Immunology* 97: 100–106, 1999.
53. Moiseeva EP, Spring EL, Baron JH, de Bono DP. Galectin 1 modulates attachment, spreading and migration of cultured vascular smooth muscle cells via interactions with cellular receptors and components of extracellular matrix. *J. Vasc. Res.* 36: 47–58, 1999.
54. Chung CD, Patel VP, Moran M, Lewis LA, Miceli MC. Galectin-1 Induces Partial TCR - Chain Phosphorylation and Antagonizes Processive TCR Signal Transduction. *J. Immunol.* 165: 3722–3729, 2000.
55. Leppänen A, Stowell S, Blixt O, Cummings RD. Dimeric galectin-1 binds with high affinity to alpha2,3-sialylated and non-sialylated terminal N-acetylglucosamine units on surface-bound extended glycans. *J. Biol. Chem.* 280:5549–5562, 2005.
56. Hirabayashi J. Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1572: 232–254, 2002.
57. Stowell SR, Arthur CM, Mehta P, Slanina KA, Blixt O, et al. Galectin-1, -2, and -3 exhibit differential recognition of sialylated glycans and blood group antigens. *J. Biol. Chem.* 283: 10109–10123, 2008.
58. Novak R, Dabelic S, Dumić J. Galectin-1 and galectin-3 expression profiles in classically and alternatively activated human macrophages. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1820: 1383–1390, 2012.
59. Zuñiga E, Rabinovich GA, Iglesias MM, Gruppi A. Regulated expression of galectin-1 during B-cell activation and implications for T-cell apoptosis. *J. Leukoc. Biol.* 70: 73–79, 2001.
60. Blaser C, Kaufmann M, Müller C, Zimmermann C, Wells V, et al. Beta-galactoside-binding protein secreted by activated T cells inhibits antigen-induced proliferation of T cells. *Eur. J. Immunol.* 28: 2311–2319, 1998.
61. Deák M, Hornung Á, Novák J, Demydenko D, Szabó E, et al. Novel role for galectin-1 in T-cells under physiological and pathological conditions. *Immunobiology* 220: 483–489, 2015.
62. Hegyi B, Sagi B, Kovács J, Kiss J, Urban VS, et al. Identical, similar or different? Learning about immunomodulatory function of mesenchymal stem cells isolated from various mouse tissues: bone marrow, spleen, thymus and aorta wall. *Int. Immunol.* 22: 551–559, 2010.
63. De Miguel MP, Fuentes-Julián S, Blázquez-Martínez A, Pascual CY, Aller MA, et al. Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: advances and applications. *Curr. Mol. Med.* 12: 574–591, 2012.
64. Amorin B, Alegretti AP, Valim V, Pezzi A, Laureano AM, et al. Mesenchymal stem cell therapy and acute graft-versus-host disease: a review. *Hum. Cell.* 27: 137–150, 2014.

65. Seelenmeyer C, Stegmayer C, Nickel W. Unconventional secretion of fibroblast growth factor 2 and galectin-1 does not require shedding of plasma membrane-derived vesicles. *FEBS Lett.* 582: 1362–1368, 2008.
66. Fajka-Boja R, BlaskóA, Kovács-Sólyom F, Szebeni GJ, Tóth GK, et al. Co-localization of galectin-1 with GM1 ganglioside in the course of its clathrin- and raft-dependent endocytosis. *Cell. Mol. Life Sci.* 65: 2586–2593, 2008.
67. He J, Baum LG. Galectin Interactions with Extracellular Matrix and Effects on Cellular Function. *Methods Enzymol.* 417:247-256, 2006.
68. Fajka-Boja R, Urbán VS, Szebeni GJ, Czibula Á, BlaskóA, et al. Galectin-1 is a local but not systemic immunomodulatory factor in mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 18: 360-370, 2016.
69. He J. Presentation of Galectin-1 by Extracellular Matrix Triggers T Cell Death. *J. Biol. Chem.* 279: 4705–4712, 2003.
70. Saussez S, Glinoe D, Chantrain G, Pattou F, Carnaille B, et al. Serum Galectin-1 and Galectin-3 Levels in Benign and Malignant Nodular Thyroid Disease. *Thyroid* 18: 705–712, 2008.
71. Kovács-Sólyom F, BlaskóA, Fajka-Boja R, Katona RL, Végh L. et al. Mechanism of tumor cell-induced T-cell apoptosis mediated by galectin-1. *Immunol. Lett.* 127: 108–118, 2010.
72. Toscano MA, Ilarregui JM, Bianco GA, Campagna L, Croci DO, et al. Dissecting the pathophysiologic role of endogenous lectins: Glycan-binding proteins with cytokine-like activity? *Cytokine Growth Factor Rev.* 18: 57–71, 2007.
73. Toscano MA, Bianco GA, Ilarregui JM, Croci DO, Correale J, et al. Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death, *Nat. Immunol.* 8: 825–834, 2007.
74. Fajka-Boja R, Szemes M, Ion G, LégrádiA, Caron M, et al. Receptor tyrosine phosphatase, CD45 binds galectin-1 but does not mediate its apoptotic signal in T cell lines. *Immunol. Lett.* 82: 149–154, 2002.
75. Pace KE, Hahn HP, Pang M, Nguyen JT, Baum LG. CD7 delivers a pro-apoptotic signal during galectin-1-induced T cell death. *J. Immunol.* 165:2331-2334, 2000.
76. Ledeen RW, Wu G, Bleich D, Lu, ZH, Gabius HJ. Galectin-1 Cross-Linking of GM1 Ganglioside in Autoimmune Suppression, *In: Galectins and Disease Implications for Targeted Therapeutics.* Eds. Klyosov AA, Traber PG, ASC Publications, pp.107–121, 2012.
77. Santucci L, Fiorucci S, Cammilleri F, Servillo G, Federici B, et al. Galectin-1 exerts immunomodulatory and protective effects on concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology* 31:399-406, 2000.

78. Ion G, Fajka-Boja R, Tóth GK, Caron M, Monostori É. Role of p56lck and ZAP70-mediated tyrosine phosphorylation in galectin-1-induced cell death. *Cell Death Differ.* 12: 1145–1147, 2005.
79. Novák J, Kriston-Pál É, Czibula Á, Deák M, Kovács L. et al. GM1 controlled lateral segregation of tyrosine kinase Lck predispose T-cells to cell-derived galectin-1-induced apoptosis. *Mol. Immunol.* 57: 302–309, 2014.
80. Ion G, Fajka-Boja R, Kovács F, Szebeni G, Gombos I, et al. Acid sphingomyelinase mediated release of ceramide is essential to trigger the mitochondrial pathway of apoptosis by galectin-1. *Cell. Signal.* 18:1887–1896, 2006..
81. BlaskóA, Fajka-Boja R, Ion G, Monostori É. How does it act when soluble? Critical evaluation of mechanism of galectin-1 induced T-cell apoptosis. *Acta Biol. Hung.* 62: 106–111, 2011.
82. Garin MI, Chu CC, Golshayan D, Cernuda-Morollon E, Wait R, et al. Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood* 109: 2058–2065, 2007.
83. LouveauA, Harris TH, Kipnis J, Revisiting the Mechanisms of CNS Immune Privilege. *Trends Immunol.* 36: 569–577, 2015.
84. Zhao S, Zhu W, Xue S, Han D, Testicular defense systems: immune privilege and innate immunity. *Cell. Mol. Immunol.* 11: 428–437, 2014.
85. Forrester JV, Xu H. Good news–bad news: the Yin and Yang of immune privilege in the eye. *Front. Immunol.* 3:338, 2012.
86. Guleria I, Sayegh MH, Maternal Acceptance of the Fetus: True Human Tolerance. *J. Immunol.* 178: 3345–3351, 2007.
87. Joyce JA, Fearon DT. T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. *Science* 348: 74–80, 2015.
88. Unverdorben L, Haufe T, Santoso L, Hofmann S, Jeschke U, et al. Prototype and Chimera-Type Galectins in Placentas with Spontaneous and Recurrent Miscarriages. *Int. J. Mol. Sci.* 17: 644, 2016.
89. Ramhorst RE, Giribaldi L, Fraccaroli L, Toscano MA, Stupirski JC, et al. Galectin-1 confers immune privilege to human trophoblast: implications in recurrent fetal loss. *Glycobiology* 22: 1374–1386, 2012.
90. Barrow H, Rhodes JM, Yu LG. The role of galectins in colorectal cancer progression. *Int. J. Cancer.* 129: 1–8, 2011.
91. Dalotto-Moreno T, Croci DO, Cerliani JP, Martinez-Allo VC, Dergan-Dylon S, et al. Targeting Galectin-1 Overcomes Breast Cancer-Associated Immunosuppression and Prevents Metastatic Disease. *Cancer Res.* 73: 1107–1117, 2013.

92. Szöke T, Kayser K, Baumhäkel JD, Trojan I, Furak J, et al. Prognostic Significance of Endogenous Adhesion/Growth-Regulatory Lectins in Lung Cancer. *Oncology* 69: 167–174, 2005.
93. Park JW, Voss PG, Grabski S, Wang JL, Patterson RJ. Association of galectin-1 and galectin-3 with Gemin4 in complexes containing the SMN protein. *Nucleic Acids Res.* 29: 3595–3602, 2001.
94. Belanis L, Plowman SJ, Rotblat B, Hancock JF, Kloog Y. Galectin-1 Is a Novel Structural Component and a Major Regulator of H-Ras Nanoclusters. *Mol. Biol. Cell.* 19: 1404–1414, 2008.
95. Santucci L, Fiorucci S, Rubinstein N, Mencarelli A, Palazzetti B, et al. Galectin-1 suppresses experimental colitis in mice. *Gastroenterology* 124: 1381–1394, 2003.
96. Liu S, Lee S, Cava AL, Motran C, Hahn B, et al. Galectin-1-induced down-regulation of T lymphocyte activation protects (NZB x NZW) F1 mice from lupus-like disease. *Lupus* 20: 473–484, 2011.
97. Rabinovich GA, Daly G, Dreja H, Tailor H, Riera CM, et al. Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis. *J. Exp. Med.* 190: 385–398, 1999.
98. Neiss WF. Ultracytochemistry of intracellular membrane glycoconjugates. Springer-Verlag, p92, 1986.
99. Tao SC, Li Y, Zhou J, Qian J, Schnaar RL, et al. Lectin microarrays identify cell-specific and functionally significant cell surface glycan markers. *Glycobiology* 18: 761–769, 2008.
100. Tian Y, Zhang H. Characterization of disease-associated N-linked glycoproteins. *Proteomics* 13: 504–511, 2013.
101. Marth JD, Grewal PK. Mammalian glycosylation in immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 8: 874–887, 2008.
102. Ohtsubo K, Marth JD. Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease. *Cell* 126: 855–867, 2006.
103. Akama TO, Fukuda MN. N-Glycan Structure Analysis Using Lectins and an α -Mannosidase Activity Assay. *Methods Enzymol.* 416: 304–314, 2006.
104. Akama TO, Nakagawa H, Wong NK, Sutton-Smith M, Dell A, et al. Essential and mutually compensatory roles of α -mannosidase II and β -mannosidase IIx in N-glycan processing in vivo in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103: 8983–8988, 2006.
105. Taniguchi N, Korekane H. Branched N-glycans and their implications for cell adhesion, signaling and clinical applications for cancer biomarkers and in therapeutics. *BMB Rep.* 44: 772–781, 2011.

106. Patnaik SK. Complex N-glycans are the major ligands for galectin-1, -3, and -8 on Chinese hamster ovary cells. *Glycobiology* 16: 305–317, 2005.
107. Altheide TK, Hayakawa T, Mikkelsen TS, Diaz S, Varki N, et al. System-wide Genomic and Biochemical Comparisons of Sialic Acid Biology Among Primates and Rodents: Evidence for two modes of rapid evolution. *J. Biol. Chem.* 281: 25689–25702, 2006.
108. Zhuo Y, Bellis SL. Emerging role of α 2,6 sialic acid as a negative regulator of Galectin binding and function. *J. Biol. Chem.* 286:5935-5941, 2011.
109. Smutova V, AlbohyA, Pan X, Korchagina E, Miyagi T, et al. Structural Basis for Substrate Specificity of Mammalian Neuraminidases. *PLoS ONE* 9: e106320, 2014.
110. Gu J, Taniguchi N. Potential of N-glycan in cell adhesion and migration as either a positive or negative regulator. *Cell Adhes. Migr.* 2: 243–245, 2008.
111. von Elstermann M. Lectin-glycan interactions: A meeting's harvest. Interlec-23. 23rd International Lectin Meeting, 11th – 16th July 2008. University of Stirling and University of Edinburgh *Funct. Glycomics* 14 August 2008.
112. Orntoft TF, Vestergaard EM. Clinical aspects of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. *Electrophoresis* 20: 362–371, 1999.
113. Durand G, Seta N. Protein glycosylation and diseases: blood and urinary oligosaccharides as markers for diagnosis and therapeutic monitoring. *Clin. Chem.* 46: 795-805, 2000.
114. MackiewiczA, Mackiewicz K. Glycoforms of serum alpha 1-acid glycoprotein as markers of inflammation and cancer. *Glycoconj. J.* 12: 241–247, 1995.
115. Axford JS. Glycosylation and rheumatic disease. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1455: 219–229, 1999.
116. Sell S. Cancer-associated carbohydrates identified by monoclonal antibodies. *Hum. Pathol.* 21: 1003–1019, 1990.
117. Parekh RB, Dwek RA, Sutton BJ, Fernandes DL, LeungA, et al. Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG. *Nature* 316: 452–457, 1985.
118. Arnold JN, Wormald MR, Sim RB, Rudd PM, Dwek RA. The Impact of Glycosylation on the Biological Function and Structure of Human Immunoglobulins. *Ann. Rev. Immunol.* 25: 21–50, 2007.
119. Jefferis R. Glycosylation as a strategy to improve antibody-based therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 8:226–234, 2009.
120. Demetriou M, Granovsky M, Quaggin S, Dennis JW. Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation. *Nature* 409: 733–739, 2001.

121. Ryan SO, Bonomo JA, Zhao F, Cobb BA. MHCII glycosylation modulates *Bacteroides fragilis* carbohydrate antigen presentation. *J. Exp. Med.* 208:1041-1053, 2011.
122. Fujii H, Shinzaki S, Iijima H, Wakamatsu K, Iwamoto C, et al. Core fucosylation on T cells, required for activation of T-Cell receptor signaling and induction of colitis in mice. Is increased in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 150:1620-1632, 2016.
123. Dias AM, Dourado J, Lago P, Cabral J, Marcos-Pinto R, et al. Dysregulation of T cell receptor N-glycosylation: a molecular mechanism involved in ulcerative colitis. *Hum. Mol. Genet.* 23:2416-2427, 2014.
124. Lee SU, Grigorian A, Pawling J, Chen IJ, Gao G, et al. N-glycan processing deficiency promotes spontaneous inflammatory demyelination and neurodegeneration. *J. Biol. Chem.* 282:33725-33734, 2007.
125. Brynedal B, Wojcik J, Esposito F, Debailleul V, Yaouanq J, et al. MGAT5 alters the severity of multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 220:120-124, 2010.
126. Green RS, Stone EL, Tenno M, Lehtonen E, Farquhar MG, et al. Mammalian N-glycan branching protects against innate immune self-recognition and inflammation in autoimmune disease pathogenesis. *Immunity* 27:308-320, 2007.
127. Cummings RD, Etzler ME. Antibodies and lectins in glycan analysis. *In:Essentials of Glycobiology*, Eds: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, et al. 2nd editions Cold Spring Harbor Laboratory Press, p784, 2008.
128. Bennett L, Palucka AK, Arce E, Cantrell V, Borvak J, et al. Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J Exp Med.* 197:711-723, 2003.
129. Crow MK, Kirou KA, Wohlgemuth J. Microarray analysis of interferon-regulated genes in SLE. *Autoimmunity* 36:481-90, 2003.
130. Theofilopoulos AN, Kono DH, Beutler B, Baccala R. Intracellular nucleic acid sensors and autoimmunity. *J. Interferon Cytokine Res.* 31:867-886, 2011.
131. Colonna M. TLR pathways and IFN-regulatory factors: to each its own. *Eur. J. Immunol.* 37:306-309, 2007.
132. Ishikawa H, Ma Z, Barber GN. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature* 461:788-792, 2009.
133. Abe T, Harashima A, Xia T, Konno H, Konno K, et al. STING recognition of cytoplasmic DNA instigates cellular defense. *Mol. Cell* 50:5-15, 2013.
134. Burdette DL, Vance RE. STING and the innate immune response to nucleic acids in the cytosol. *Nat. Immunol.* 14:19-26, 2013

135. Kato Y, Park J, Takamatsu H, Konaka H, Aoki W, et al. Apoptosis-derived membrane vesicles drive the cGAS-STING pathway and enhance type I IFN production in systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* 77:1507-1515, 2018.
136. Wyllie DH, Søgaard KC, Holland K, Yaobo X, Bregu M, et al. Identification of 34 novel proinflammatory proteins in a genomewide macrophage functional screen. *PLoS One* 7:e42388, 2012.
137. Shambharkar PB, Bittinger M, Latario B, Xiong Z, Bandyopadhyay S, et al. TMEM203 is a Novel Regulator of Intracellular Calcium Homeostasis and Is Required for Spermatogenesis. *PLoS One* 10:e0127480, 2015.
138. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J. Thromb. Haemost.* 4:295-306, 2006.
139. Wiener MH, Burke M, Fried M, Yust I. Thromboagglutination by anticardiolipin antibody complex in the antiphospholipid syndrome: a possible mechanism of immune-mediated thrombosis. *Thromb. Res.* 103: 193–199, 2001.
140. Grosso G, Vikerfors A, Woodhams B, Adam M, Bremme K, et al. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) - A possible link between coagulation and complement activation in the antiphospholipid syndrome (APS). *Thromb. Res.* 158:168-173, 2017.
141. Alarcon-Segovia D, Delezé M, Oria CV, Sánchez-Guerrero J, Gómez-Pacheco L, et al. Antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid syndrome in systemic lupus erythematosus: a prospective analysis of 500 consecutive patients. *Medicine (Baltimore)* 68: 353–365, 1989.
142. Sciascia S, Amigo MC, Roccatello D, Khamashta M. Diagnosing antiphospholipid syndrome: 'extra-criteria' manifestations and technical advances. *Nat. Rev. Rheumatol.* 13:548-560, 2017.
143. Islam MA, Alam F, Kamal MA, Gan SH, Sasongko TH, et al. Presence of anticardiolipin antibodies in patients with dementia: A systematic review and meta-analysis. *Front. Aging. Neurosci.* 9:250, 2017.
144. Kravvariti E, Konstantonis G, Tentolouris N, Sfrikakis PP, Tektonidou MG. Carotid and femoral atherosclerosis in antiphospholipid syndrome: Equivalent risk with diabetes mellitus in a case-control study. *Semin Arthritis Rheum.* 47:883-889, 2018.
145. Ruiz-Irastorza G. High impact of antiphospholipid syndrome on irreversible organ damage and survival of patients with systemic lupus erythematosus. *Arch. Intern. Med.* 164:77-82, 2004.
146. Alarcón GS, Calvo-Alén J, McGwin G Jr, Uribe AG, Toloza SM, et al. LUMINA Study Group. Systemic lupus erythematosus in a multiethnic cohort: LUMINA XXXV. Predictive factors of high disease activity over time. *Ann. Rheum. Dis.* 65:1168-1174, 2006.

147. Yin Y, Wu X, Shan G, Zhang X. Diagnostic value of serum anti-C1q antibodies in patients with lupus nephritis: a meta-analysis. *Lupus* 21:1088-1097, 2012.
148. Ho RC, Thiaghu C, Ong H, Lu Y, Ho CS, et al. A meta-analysis of serum and cerebrospinal fluid autoantibodies in neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev.* 15:124-38, 2016.
149. Levite M. Glutamate receptor antibodies in neurological diseases: anti-AMPA-GluR3 antibodies, anti-NMDA-NR1 antibodies, anti-NMDA-NR2A/B antibodies, anti-mGluR1 antibodies or anti-mGluR5 antibodies are present in subpopulations of patients with either: epilepsy, encephalitis, cerebellar ataxia, systemic lupus erythematosus (SLE) and neuropsychiatric SLE, Sjogren's syndrome, schizophrenia, mania or stroke. These autoimmune anti-glutamate receptor antibodies can bind neurons in few brain regions, activate glutamate receptors, decrease glutamate receptor's expression, impair glutamate-induced signaling and function, activate blood brain barrier endothelial cells, kill neurons, damage the brain, induce behavioral/psychiatric/cognitive abnormalities and ataxia in animal models, and can be removed or silenced in some patients by immunotherapy. *J. Neural. Transm. (Vienna)* 121:1029-1075, 2014.
150. Smolen JS, Aletaha D, Bijlsma JW, Breedveld FC, Boumpas D, et al. T2T Expert Committee. Treating rheumatoid arthritis to target: recommendations of an international task force. *Ann. Rheum. Dis.* 69:631-637, 2010.
151. Smolen JS, Braun J, Dougados M, Emery P, Fitzgerald O, et al. Treating spondyloarthritis, including ankylosing spondylitis and psoriatic arthritis, to target: recommendations of an international task force. *Ann. Rheum. Dis.* 73:6-16, 2014.
152. Saleem B, Keen H, Goeb V, Parmar R, Nizam S, et al. Patients with RA in remission on TNF blockers: when and in whom can TNF blocker therapy be stopped? *Ann. Rheum. Dis.* 69: 1636-1642, 2010.
153. Goekoop-Ruiterman YP, de Vries-Bouwstra JK, Allaart CF, van Zeben D, Kerstens PJ, et al. Clinical and radiographic outcomes of four different treatment strategies in patients with early rheumatoid arthritis (the BeSt study): A randomized, controlled trial. *Arthritis Rheum.* 58 Suppl. 2: S126-135, 2008.
154. van der Kooij SM, Goekoop-Ruiterman YP, de Vries-Bouwstra JK, Güler-Yüksel M, Zwinderman AH, et al. Drug-free remission, functioning and radiographic damage after 4 years of response-driven treatment in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 68: 914-921, 2009.
155. van den Broek M, Klarenbeek NB, Dirven L, van Schaardenburg D, Hulsmans HM, et al. Discontinuation of infliximab and potential predictors of persistent low disease activity in patients with early rheumatoid arthritis and disease activity score-steered therapy: subanalysis of the BeSt study. *Ann. Rheum. Dis.* 70:1389-1394, 2011.

- 156.. Tanaka Y1, Takeuchi T, Mimori T, Saito K, Nawata M, et al. RRR study investigators. Discontinuation of infliximab after attaining low disease activity in patients with rheumatoid arthritis: RRR (remission induction by Remicade in RA) study. *Ann. Rheum. Dis.* 69: 1286-1291, 2010.
157. Tanaka Y, Hirata S, Fukuyo S, Nawata M, Kubo K, Yamaoka K, et al. Discontinuation of adalimumab without functional and structural progress after attaining remission in patients with rheumatoid arthritis (an interim report of HONOR study). *Arthritis Rheum.* 63 Suppl.10: S962, 2011.
158. Kavanaugh A, Emery P, Fleischmann R, van Vollenhoven RF, Pavelka K, et al. Withdrawal of adalimumab in early rheumatoid arthritis patients who attained stable low disease activity with adalimumab plus methotrexate: results of a phase 4, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum.* 63 Suppl.10: S665, 2011.
159. Baraliakos X, Listing J, Brandt J, Zink A, Alten R, et al. Clinical response to discontinuation of anti-TNF therapy in patients with ankylosing spondylitis after 3 years of continuous treatment with infliximab. *Arthritis Res. Ther.* 7: R439-444, 2005.
160. Brandt J, Khariouzov A, Listing J, Haibel H, Sörensen H, et al. Six-month results of a double-blind, placebo-controlled trial of etanercept treatment in patients with active ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 44: 342-348, 2003.
161. Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, et al. Classification criteria for Sjögren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann. Rheum. Dis.* 61:554-558, 2002.
162. Merrifield RB. The synthesis of a tetrapeptide. Solid Phase Peptide Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2154, 1963.
163. Molnár J., Marczinovits I., Kiss M., Husz S., Tóth G.K., et al. Recombinant antigens by fusion of antigenic epitopes to a GST partner. In: Stability and stabilization of biocatalysts. Progress in biotechnology Stability and Stabilization of Biocatalysts. Eds: Ballesteros A, Plou FL, Iborra JL, Halling PJ. Elsevier Science. Volume 15, pp.691-696, 1998.
164. Marczinovits I., Somogyi Cs., Patthy A., Németh P., Molnár J. An alternative purification protocol for producing hepatitis B virus X antigen on a preparative scale in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 56: 81-88, 1997.
165. Schagger H, von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166: 368-379, 1987.
166. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 31:315-324, 1988.

167. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.*40:1725, 1997
168. Lundberg JM, Anggård A, Fahrenkrug J, Hökfelt T, Mutt V. Vasoactive intestinal polypeptide in cholinergic neurons of exocrine glands: functional significance of coexisting transmitters for vasodilatation and secretion, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 1651-1655, 1980.
169. McHorney CA, Ware JE Jr, Raczek AE. The MOS 36-item short form health survey (SF-36): II. Psychometric and clinical tests of validity in measuring physical and mental health constructs. *Med. Care*31:247-263, 1993.
170. Webster K, Odom L, Peterman A, Lent L, Cella D. The Functional Assessment of Chronic Illness Therapy (FACIT) measurement system: Validation of version 4 of the core questionnaire. *Quality Life Res.* 8: 604,1999.
171. Hafer-Macko C, Pang M, Seilhamer JJ, Baum LG. Galectin-1 is expressed by thymic epithelial cells in myasthenia gravis. *Glycoconj J.* 13:591-597, 1996.
172. Bustin SA, Benes V, GarsonJA, Hellemans J, Huggett J, et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin. Chem.* 55: 611–622, 2009.
173. Ion, G., Fajka-Boja, R., Tóth, G.K., Caron, M., Monostori, E. Role of p56lckand ZAP70-mediated tyrosine phosphorylation in galectin-1-induced cell death.*Cell. Death Differ.* 12: 1145–1147, 2005.
174. Matsumura K, Higashida K, Ishida H, Hata Y, Yamamoto K, et al. Carbohydrate Binding Specificity of a Fucose-specific Lectin from *Aspergillus oryzae*: A novel probe for core fucose. *J. Biol. Chem.* 282: 15700–15708, 2007.
175. Schwefel D, Maierhofer C, Beck JG, Seeberger S, Diederichs K, et al. Structural Basis of Multivalent Binding to Wheat Germ Agglutinin, *J. Am. Chem. Soc.* 132: 8704–8719, 2010.
176. Schwarz RE, Wojciechowicz DC, Park PY, Paty PB. Phytohemagglutinin-L (PHA-L) lectin surface binding of N-linked beta 1-6 carbohydrate and its relationship to activated mutant ras in human pancreatic cancer cell lines. *Cancer Lett.* 107: 285-291, 1996.
177. Fischer E, Brossmer R, Sialic acid-binding lectins: submolecular specificity and interaction with sialoglycoproteins and tumour cells.*Glycoconj. J.* 12: 707–713, 1995.
178. Yang R-Y, Rabinovich GA, Liu F-T. Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert Rev. Mol. Med.* 10: e17, 2008.
179. Ma H, Zhou H, Song X, Shi S, Zhang J, et al. Modification of sialylation is associated with multidrug resistance in human acute myeloid leukemia.*Oncogene* 34: 726–740, 2015.
180. Zhou H, Ma H, Wei W, Ji D, Song X, et al. B4GALT family mediates the multidrug resistance of human leukemia cells by regulating the hedgehog pathway and the expression of p-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein 1.*Cell Death Dis.* 4: e654, 2013.

181. Tringali C, Lupo B, Cirillo F, Papini N, Anastasia L. et al. Venerando, Silencing of membrane-associated sialidase Neu3 diminishes apoptosis resistance and triggers megakaryocytic differentiation of chronic myeloid leukemic cells K562 through the increase of ganglioside GM3. *Cell Death Differ.* 16: 164–174, 2009.
182. Chachadi VB, Cheng H, Klinkebiel D, Christman JK, Cheng PW. 5-Aza-2'-deoxycytidine increases sialyl Lewis X on MUC1 by stimulating β -galactoside: α 2,3-sialyltransferase 6 gene. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43: 586–593, 2011.
183. Maupin, KA, Liden D, Haab BB. The fine specificity of mannose-binding and galactose-binding lectins revealed using outlier motif analysis of glycan array data. *Glycobiology* 22: 160–169, 2012.
184. Tateno H, Nakamura-Tsuruta S, Hirabayashi J. Comparative analysis of core-fucose-binding lectins from *Lensculinaris* and *Pisumsativum* using frontal affinity chromatography. *Glycobiology* 19: 527–536, 2009.
185. Peters BP, Goldstein IJ, Flashner M, Ebisu S. Interaction of wheat germ agglutinin with sialic acid. *Biochemistry* 18: 5505–5511, 1979.
186. Itakura Y, Nakamura-Tsuruta S, Kominami J, Tateno H, Hirabayashi J. Sugar-binding profiles of chitin-binding lectins from the hevein family: A comprehensive study. *Int. J. Mol. Sci.* 18: 1160, 2017.
187. Pothukuchi P, Agliarulo I, Russo D, Rizzo R, Russo F, et al. Translation of genome to glycome: Role of the Golgi apparatus. *FEBS Lett.* 593:2390-2411, 2019.
188. Comelli EM, Head SR, Gilmartin T, Whisenant T, Haslam SM, et al. A focused microarray approach to functional glycomics: Transcriptional regulation of the glycome. *Glycobiology* 16: 117–131, 2006.
189. Nairn AV, York WS, Harris K, Hall EM, Pierce JM, et al. Regulation of glycan structures in animal tissues. *J. Biol. Chem.* 283: 17298–17313, 2008.
190. Nan X, Carubelli I, Stamatou NM. Sialidase expression in activated human T lymphocytes influences production of IFN- γ . *J. Leukoc. Biol.* 81: 284–296, 2007.
191. Dawson LJ, Allison HE, Stanbury J, Fitzgerald D, Smith PM. Putative anti-muscarinic antibodies cannot be detected in patients with primary Sjögren's syndrome using conventional immunological approaches. *Rheumatology* 43:1488-1495, 2004.
192. Roescher N, Kingman A, Shirota Y, Chiorini JA, Illei GG. Peptide-based ELISAs are not sensitive and specific enough to detect muscarinic receptor type 3 autoantibodies in serum from patients with Sjögren's syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* 70: 235-236, 2011.
193. Zigon P, Hocevar A, Cucnik S, Bozic B, Rozman B, et al. Antibodies against 25-mer synthetic peptide of M3 muscarinic acetylcholine receptor. *Arthritis Res. Ther.* 6 Suppl. 1:5, 2004.

194. Naito Y, Matsumoto I, Wakamatsu E, Goto D, Sugiyama T, et al. Muscarinic acetylcholine receptor autoantibodies in patients with Sjögren's syndrome. *Ann. Rheum. Dis.*64: 510-511, 2005.
195. Staudt Y, Mobini R, Fu M, Felix SB, Kuhn JP, et al. Beta1-adrenoceptor antibodies induce apoptosis in adult isolated cardiomyocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 466: 1-6, 2003.
196. Koo NY, Li J, Hwang SM, Choi SY, Lee SJ, et al. Functional epitope of muscarinic type 3 receptor which interacts with autoantibodies from Sjögren's syndrome patients. *Rheumatology* 47: 828-833, 2008.
197. Tsuboi H, Matsumoto I, Wakamatsu E, Nakamura Y, Izuka M, et al. New epitopes and function of anti-M3 muscarinic acetylcholine receptor antibodies in patients with Sjögren's syndrome. *Clin. Exp. Immunol.* 162: 53-61, 2010.
198. Zuo J, Williams AE, Park YJ, Choi K, Chan AL, et al. Muscarinic type 3 receptor autoantibodies are associated with anti-SSA/Ro autoantibodies in Sjögren's syndrome. *J. Immunol. Methods* 437:28-36, 2016.
199. He J, Guo JP, Ding Y, Li YN, Pan SS, et al. Diagnostic significance of measuring antibodies to cyclic type 3 muscarinic acetylcholine receptor peptides in primary Sjögren syndrome. *Rheumatology* 50: 879-884, 2011.
200. Yu X, Riemekasten G, Petersen F. Autoantibodies against muscarinic acetylcholine receptor M3 in Sjögren's syndrome and corresponding mouse models. *Front. Biosci. (Landmark Ed)* 23:2053-2064, 2018.
201. Cabral-Marques O, Riemekasten G. Functional autoantibodies targeting G protein-coupled receptors in rheumatic diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* 13:648-656, 2017.
202. Sumida T, Tsuboi H, Izuka M, Hirota T, Asashima H, et al. The role of M3 muscarinic acetylcholine receptor reactive T cells in Sjögren's syndrome: a critical review. *J. Autoimmun.* 51:44-50, 2014.
203. Jonsson R, Vogelsang P, Volchenkov R, Espinosa A, Wahren-Herlenius M, et al. The complexity of Sjögren's syndrome: novel aspects on pathogenesis. *Immunol. Letters* 141:1-9, 2011.
204. Mariette X, Criswell LA. Primary Sjögren's Syndrome. *New Engl. J. Med.* 378:931-939, 2018.
205. Jin M, Hwang SM, Koo NY, Kim B, Kho HS, et al. Autoantibodies in Sjögren's syndrome patients acutely inhibit muscarinic receptor function. *Oral Dis.* 18: 132-139, 2011.
206. Dawson LJ, Stanbury J, Venn N, Hasdimir B, Rogers SN, et al. Antimuscarinic antibodies in primary Sjögren's syndrome reversibly inhibit the mechanism of fluid secretion by human submandibular salivary acinar cells. *Arthritis Rheum.* 54: 1165-1173, 2006.

207. Li J, Ha YM, Ku NY, Choi SY, Lee SJ, et al. Inhibitory effects of autoantibodies on the muscarinic receptors in Sjögren's syndrome. *Lab. Invest.* 84: 1430-1438, 2004.
208. Tsubota K, Hirai S, King LS, Agre P, Ishida N. Defective cellular trafficking of lacrimal gland aquaporin-5 in Sjögren's syndrome. *Lancet* 357: 686-689, 2001.
209. Reina S, Sterin-Borda L, Passafaro D, Borda E. Anti-M3 muscarinic cholinergic autoantibodies from patients with primary Sjögren's syndrome trigger production of matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) and prostaglandin E2 (PGE2) from the submandibular glands. *Arch. Oral. Biol.* 56:415-420, 2011.
210. Waterman SA, Gordon TP, Rischmueller M. Inhibitory effects of muscarinic receptor autoantibodies on parasympathetic neurotransmission in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 43: 1647-1654, 2000.
211. Park K, Haberberger RV, Gordon TP, Jackson MW. Antibodies interfering with the type 3 muscarinic receptor pathway inhibit gastrointestinal motility and cholinergic neurotransmission in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 63:1426-1434, 2011.
212. Aragona P, Di Pietro R, Spinella R, Mobarici M. Conjunctival epithelium improvement after systemic pilocarpine in patients with Sjögren's syndrome. *Br. J. Ophthalmol.* 90:166–170, 2006.
213. Yamada H, Nakagawa Y, Wakamatsu E, Sumida T, Yamachika S et al. Efficacy prediction of cevimeline in patients with Sjögren's syndrome. *Clin. Rheumatol.* 26:1320–1327, 2007.
214. Noaiseh G, Baker JF, Vivino FB. Comparison of the discontinuation rates and side-effect profiles of pilocarpine and cevimeline for xerostomia in primary Sjögren's syndrome. *Clin. Exp. Rheumatol.* 32:575–577, 2014.
215. Ramos-Casals M, Brito-Zerón P, Bombardieri S, Bootsma H, De Vita S, et al. EULAR recommendations for the management of Sjögren's syndrome with topical and systemic therapies. *Ann. Rheum. Dis.* 79:3-18, 2020.
216. Carubbi F, Cipriani P, Marrelli A, Benedetto P, Ruscitti P, et al. Efficacy and safety of rituximab treatment in early primary Sjögren's syndrome: a prospective, multi-center, follow-up study. *Arthritis Res. Ther.* 15: R172, 2013.
217. Bowman SJ, Everett CC, O'Dwyer JL, Emery P, Pitzalis C et al. Randomized controlled trial of rituximab and cost-effectiveness analysis in treating fatigue and oral dryness in primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheumatol.* 69:1440-1450, 2017.
218. Grigoriadou S, Chowdhury F, Pontarini E, Tappuni A, Bowman SJ, et al. B cell depletion with rituximab in the treatment of primary Sjögren's syndrome: what have we learnt? *Clin. Exp. Rheumatol.* 118. Suppl:217-224, 2019.

219. Fulcher JA, Chang MH, Wang S, Almazan T, Hashimi ST, et al. Galectin-1 co-clusters CD43/CD45 on dendritic cells and induces cell activation and migration through Syk and protein kinase C signaling. *J. Biol. Chem.* 284:26860-26870, 2009.
220. Escoda-Ferran C, Carrasco E, Caballero-Banos M, Miró-Juliá C, Martinez-Floreansa M, et al. Modulation of CD6 function through interaction with Galectin-1 and -3. *Immunology Letters* 588:2805-2813, 2014.
221. Paz A, Haklai R, Elad-Sfadia G, Ballan E, Kloog Y. Galectin-1 binds oncogenic H-Ras to mediate Ras membrane anchorage and cell transformation. *Oncogene* 20:7486–7493, 2001.
222. Rotblat B. Galectin-1 (L11A) Predicted from a Computed Galectin-1 Farnesyl-Binding Pocket Selectively Inhibits Ras-GTP. *Cancer Res.* 64:3112–3118, 2004.
223. Wang W, Park JW, Wang JL, Patterson RJ. Immunoprecipitation of spliceosomal RNAs by antisera to galectin-1 and galectin-3. *Nucleic Acids Res.* 34:5166–5174, 2006.
224. Salvatore P, Benvenuto G, Caporaso M, Bruni CB, Chiariotti L. High resolution methylation analysis of the galectin-1 gene promoter region in expressing and nonexpressing tissues. *FEBS Lett.* 421:152-158, 1998.
225. Tsuchiyama Y, Wada J, Zhang H, Morita Y, Hiragushi K, et al. Efficacy of galectins in the amelioration of nephrotoxic serum nephritis in Wistar Kyoto rats. *Kidney Int.* 58:1941–1952, 2000.
226. Offner H, Celnik B, Bringman TS, Casentini-Borocz D, Nedwin GE, et al. Recombinant human beta-galactoside binding lectin suppresses clinical and histological signs of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 28:177–84, 1990.
227. Krishnan S, Nambiar MP, Warke VG, Fisher CU, Mitchell J, et al. Alterations in lipid raft composition and dynamics contribute to abnormal T cell responses in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 172:7821-7831, 2004.
228. Lee MM, Nasirikenari M, Manhardt CT, Ashline DJ, Hanneman AJ, et al. Platelets support extracellular sialylation by supplying the sugar donor substrate. *J. Biol. Chem.* 289:8742–8748, 2014.
229. Liou LB, Huang CC. Sialyltransferase and neuraminidase levels/ratios and sialic acid levels in peripheral blood B cells correlate with measures of disease activity in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis: A Pilot Study. *PLoS One* 11:e0151669, 2016.
230. Imai Y, Yamashita Y, Osawa T. Enhancement of the activities of glycosyltransferases involved in the biosynthesis of mucin-type sugar chains in autoimmune MRL lpr/lpr mouse T cells. *Mol. Immunol.* 25:419-428, 1988.

231. Salmond RJ, Filby A, Qureshi I, Caserta S, Zamoyska R. T-cell receptorproximal signaling via the Src-family kinases, Lck and Fyn, influences T-cellactivation, differentiation, and tolerance. *Immunol. Rev.* 228: 9–22, 2009.
232. Jury EC, Kabouridis PS, Flores-Borja F, Mageed RA, Isenberg DA. Altered lipid raft-associated signaling and ganglioside expression in T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest.* 113:1176-1187, 2004.
233. Barrera-Vargas A, Gómez-Martín D, Alcocer-Varela J. T cell receptor-associated protein tyrosine kinases: the dynamics of tolerance regulation by phosphorylation and its role in systemic lupus erythematosus. *Hum Immunol.* 75:945-952, 2014.
234. Shambharkar PB, Bittinger M, Latario B, Xiong Z, Bandyopadhyay S, et al. TMEM203 is a novel regulator of intracellular calcium homeostasis and is required for spermatogenesis. *PLoS One* 10: e0127480, 2015.
235. König N, Fiehn C, Wolf C, Schuster M, Cura Costa E, et al. Familial chilblain lupus due to a gain-of-function mutation in STING. *Ann. Rheum. Dis.* 76:468-472, 2017.
236. Melki I, Rose Y, Uggenti C, Van Eyck L, Frémond ML, et al. Disease-associated mutations identify a novel region in human STING necessary for the control of type I interferon signaling. *J Allergy Clin Immunol.* 140:543-552, 2017.
237. Pawaria S, Sharma S, Baum R, Nündel K, Busto P, et al. Taking the STING out of TLR-driven autoimmune diseases: good, bad, or indifferent? *J. Leukoc. Biol.* 101:121-126, 2017.
238. Sharma S, Campbell AM, Chan J, Schattgen SA, Orłowski GM, et al. Suppression of systemic autoimmunity by the innate immune adaptor STING. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112:E710-E107, 2015.
239. Buskiewicz IA, Montgomery T, Yasewicz EC, Huber SA, Murphy MP, et al. Reactive oxygen species induce virus-independent MAVS oligomerization in systemic lupus erythematosus. *Sci Signal.* 9:ra115, 2016.
240. Gonzalez-Quintial R, Nguyen A, Kono DH, Oldstone MBA, Theofilopoulos AN, et al. Lupus acceleration by a MAVS-activating RNA virus requires endosomal TLR signaling and host genetic predisposition. *PLoS One.* 10;13:e0203118, 2018
241. Sun W, Wang H, Qi CF, Wu J, Scott B, et al. Antiviral adaptor MAVS promotes murine lupus with a B cell autonomous role. *Front. Immunol.* 10:2452, 2019.
242. Amigo MC, Khamashta MA. Antiphospholipid (Hughes) syndrome in systemic lupus erythematosus. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 26:331-348, 2000.
243. Sebastiani GD, Galeazzi M, Tincani A, Piette JC, Font J, et al. Anticardiolipin and anti-beta2GPI antibodies in a large series of European patients with systemic lupus erythematosus. *Scand. J. Rheumatol.* 28: 344-351, 1999.

244. Kopytek M, Natorska J, Undas A. Antiphosphatidylserine/prothrombin (aPS/PT) antibodies are associated with Raynaud phenomenon and migraine in primary thrombotic antiphospholipid syndrome. *Lupus* 27:812-819, 2018.
245. Cervera R, Khamashta MA, Shoenfeld Y, Camps MT, Jacobsen S, et al. Morbidity and mortality in the antiphospholipid syndrome during a 5-year period: a multicentre prospective study of 1000 patients. *Ann. Rheum. Dis.* 68:1428-1432, 2009.
246. Soltész P, Kerekes G, Dér H, Szücs G, Szántó S, et al. Comparative assessment of vascular function in autoimmune rheumatic diseases: considerations of prevention and treatment. *Autoimmun Rev.* 10:416-425, 2011.
247. Abu-Shakra M, Gladman DD, Urowitz MB, Farewell V. Anticardiolipin antibodies in systemic lupus erythematosus: clinical and laboratory correlations. *Am. J. Med.* 99:624-628, 1995.
248. Drenkard C, Villa AR, Alarcón-Segovia D, Pérez-Vázquez ME. Influence of the antiphospholipid syndrome in the survival of patients with systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* 21:1067–1072, 1994.
249. Sturfelt G, Nived O, Norberg R, Thorstensson R, Krook K. Anticardiolipin antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 30:382–388, 1987.
250. Lang B, Straub RH, Weber S, Röther E, Fleck M, et al. Elevated anticardiolipin antibodies in autoimmune haemolytic anaemia irrespective of underlying systemic lupus erythematosus. *Lupus* 6:652–655, 1997.
251. Fayyaz A, Igoe A, Kurien BT, Danda D, James JA, et al. Haematological manifestations of lupus. *Lupus Sci. Med.* 2:e000078, 2015.
252. van Vollenhoven RF, Mosca M, Bertsias G, Isenberg D, Kuhn A, et al. Treat-to-target in systemic lupus erythematosus: recommendations from an international task force. *Ann. Rheum. Dis.* 73:958-967, 2014.
253. Gasparin AA, Pamplona Bueno de Andrade N, Hax V, Tres GL, Veronese FV, et al. Urinary biomarkers for lupus nephritis: the role of the vascular cell adhesion molecule-1. *Lupus* 28:265-272, 2019.
254. Li Y, Xu X, Tang X, Bian X, Shen B, et al. MicroRNA expression profile of urinary exosomes in Type IV lupus nephritis complicated by cellular crescent. *J. Biol. Res.* 25:16, 2018.
255. Brahe CH, Krabbe S, Østergaard M, Ørnbjerg L, Glinatsi D, et al. Dose tapering and discontinuation of biological therapy in rheumatoid arthritis patients in routine care - 2-year outcomes and predictors. *Rheumatology (Oxford)* 58:110-119, 2019.

256. Ebina K, Hashimoto M, Yamamoto W, Ohnishi A, Kabata D, et al. Drug retention and discontinuation reasons between seven biologics in patients with rheumatoid arthritis -The ANSWER cohort study. *PLoS One* 13:e0194130, 2018.
257. Zhao SS, Yoshida K, Jones GT, Hughes DM, Duffield SJ, et al. Smoking status and cause-specific discontinuation of tumour necrosis factor inhibitors in axial spondyloarthritis. *Arthritis Res. Ther.* 21:177, 2019.
258. Betegnie AL, Gauchet A, Lehmann A, Grange L, Roustit M, et al. Why do patients with chronic inflammatory rheumatic diseases discontinue their biologics? An assessment of patients' adherence using a self-report questionnaire. *J. Rheumatol.* 43:724-730, 2016.
259. Smolen JS, Nash P, Durez P, Hall S, Ilivanova E, et al. Maintenance, reduction, or withdrawal of etanercept after treatment with etanercept and methotrexate in patients with moderate rheumatoid arthritis (PRESERVE): a randomised controlled trial. *Lancet* 381:918-929, 2013.
260. van Vollenhoven RF, Østergaard M, Leirisalo-Repo M, Uhlig T, Jansson M, et al. Full dose, reduced dose or discontinuation of etanercept in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 75:52-58, 2016.
261. van Herwaarden N, van der Maas A, Minten MJ, van den Hoogen FH, Kievit W, et al. Disease activity guided dose reduction and withdrawal of adalimumab or etanercept compared with usual care in rheumatoid arthritis: open label, randomised controlled, non-inferiority trial. *BMJ* 350:h1389, 2015.
262. Fautrel B, Pham T, Alfaiate T, Gandjbakhch F, Foltz V, et al. Step-down strategy of spacing TNF-blocker injections for established rheumatoid arthritis in remission: results of the multicentre non-inferiority randomised open-label controlled trial (STRASS: Spacing of TNF-blocker injections in Rheumatoid Arthritis Study). *Ann. Rheum. Dis.* 75:59-67, 2016.
263. Haschka J, Englbrecht M, Hueber AJ, Manger B, Kleyer A, et al. Relapse rates in patients with rheumatoid arthritis in stable remission tapering or stopping antirheumatic therapy: interim results from the prospective randomised controlled RETRO study. *Ann. Rheum. Dis.* 75:45-51, 2016.
264. Bouman CA, van Herwaarden N, van den Hoogen FH, Fransen J, van Vollenhoven RF, et al. Long-term outcomes after disease activity-guided dose reduction of TNF inhibition in rheumatoid arthritis: 3-year data of the DRESS study - a randomised controlled pragmatic non-inferiority strategy trial. *Ann. Rheum. Dis.* 76:1716-1722, 2017.
265. Ghiti Moghadam M, Vonkeman HE, ten Klooster PM, Tekstra J, van Schaardenburg D, et al. Stopping tumor necrosis factor inhibitor treatment in patients with established rheumatoid arthritis in remission or with stable low disease activity. A pragmatic multicenter. Open-label randomized controlled trial. *Arthritis Rheum.* 68: 1810–1817, 2016.

266. Hashimoto M, Furu M, Yamamoto W, Fujimura T, Hara R, et al. Factors associated with the achievement of biological disease-modifying antirheumatic drug-free remission in rheumatoid arthritis: the ANSWER cohort study. *Arthritis Res. Ther.* 20:165, 2018.

267. Chen X, Zhang T, Wang W, Xue J. Analysis of relapse rates and risk factors of tapering or stopping pharmacologic therapies in axial spondyloarthritis patients with sustained remission. *Clin. Rheumatol.* 37:1625-1632, 2018.

268. Moreno M, Gratacós J, Torrente-Segarra V, Sanmarti R, Morlà R, et al. Withdrawal of infliximab therapy in ankylosing spondylitis in persistent clinical remission, results from the REMINEA study. *Arthritis Res. Ther.* 21:88, 2019.

9. Tudományos közlemények listája

9.1 A disszertációban ismertetett eredményeket megalapozó közlemények:

Teljes közlemény:

Szabó E, Hornung Á, Monostori É, Bocskai M, Czibula Á, Kovács L. Altered Cell Surface N-Glycosylation of Resting and Activated T Cells in Systemic Lupus Erythematosus. *Int. J. Mol. Sci.* 20: 4455, 2019.

Li Y, James SJ, Wyllie DH, Wynne C, Czibula A, Bukhari A, Pye K, Bte Mustafah SM, Fajka-Boja R, Szabó E, Angyal A, Hegedus Z, Kovács L, Hill AVS, Jefferies CA, Wilson HL, Yongliang Z, Kiss-Tóth E. TMEM203 is a binding partner and regulator of STING-mediated inflammatory signaling in macrophages. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 116: 16479-16488, 2019.

Hornung Á, Monostori É, Kovács L. Systemic lupus erythematosus in the light of the regulatory effects of galectin-1 on T-cell function. *Lupus* 26: 339-347, 2017.

Deák M, Hornung Á, Novák J, Demydenko D, Szabó E, Czibula A, Fajka-Boja R, Kriston-Pál É, Monostori É, Kovács L. Novel role for galectin-1 in T-cells under physiological and pathological conditions. *Immunobiology* 220: 483-489, 2015.

Deák M, Bocskai M, Burcsár S, Dányi O, Fekete Z, Kovács L. Non-thromboembolic risk in systemic lupus erythematosus associated with antiphospholipid syndrome. *Lupus* 23: 913-918, 2014.

Kádár G, Balázs E, Soós B, Laduver A, Keszthelyi P, Szekanecz Z, Kovács L. Disease activity after the discontinuation of biological therapy in inflammatory rheumatic diseases *Clin. Rheumatol.* 33: 329-333, 2014.

Mócsai A, Kovács L, Gergely P. What is the future of targeted therapy in rheumatology: biologics or small molecules? *BMC Medicine* 12: 43, 2014.

Novák J, Kriston-Pál E, Czibula A, Deák M, Kovács L, Monostori É, Fajka-Boja R. GM1 controlled lateral segregation of tyrosine kinase Lck predispose T-cells to cell-derived galectin-1-induced apoptosis. *Mol. Immunol.* 57: 302-309, 2014.

Szekanecz Z, Szamosi T, Soós B, Kovács L, Kádár G, Keszthelyi P, Laduver A, Rojkovich B, Gáti T, Winkler V. et al. A gyógyszeres terápia leépítésének bizonyítékai, kérdései és stratégiája reumatoid arthritisben. *Magyar Reumatológia* 54: 206-215, 2013.

Deák M, Szvetnik A, Balog A, Sohár N, Varga R, Pokorny G, Tóth G, Kiss M, Kovács L. Neuroimmune Interactions in Sjogren's Syndrome: Relationship of Exocrine Gland Dysfunction with Autoantibodies to Muscarinic Acetylcholine Receptor-3 and Mental Health Status Parameters. *Neuroimmunomodulation* 20: 79-86, 2013.

Kovács L. Autoantibodies to autonomic neurotransmitter receptors-A unique pathway of neuro-immune interactions. *Adv. Neuroimmun. Biol.* 3: 209-215, 2012.

Kovács L, Fehér E, Bodnár I, Marczinovits I, Nagy GM, Somos J, Boda, V. Demonstration of autoantibody binding to muscarinic acetylcholine receptors in the salivary gland in primary Sjögren's syndrome. *Clin. Immunol.* 128: 269-276, 2008.

Kovács L. Antimuscarinic receptor antibodies in Sjögren's syndrome - A novel pathogenetic link between autoimmunity and glandular dysfunction? *Curr. Trends Immunol.* 8: 43-51, 2007.

Kovács L, Marczinovits I, György A, Tóth GK, Dorgai L, Pál J, Molnár J, Pokorny, G. Clinical associations of autoantibodies to human muscarinic acetylcholine receptor 3(213-228) in primary Sjogren's syndrome. *Rheumatology (UK)* 44: 1021-1025, 2005.

Marczinovits I, Kovács L, György A, Tóth GK, Dorgai L, Molnár J, Pokorny G. A peptide of human muscarinic acetylcholine receptor 3 is antigenic in primary Sjogren's syndrome. *J. Autoimmunity* 4: 47-54, 2005.

Absztrakt:

Kádár G, Czibula Á, Szalay B, Nagy K, Pusztai A, Balog A, Monostori E, Vásárhelyi B, Szekanecz Z, Kovács L. Predictors of disease course after the discontinuation of biologic therapy in Rheumatoid Arthritis patients with long-term. *Ann. Rheumat. Dis.* 75. Suppl. 2: 1007, Paper: AB0312, 2016.

Hornung Á, Deák M, Novák J, Szabó E, Czibula A, Fajka-Boja R, Kriston-Pál É, Monostori É, Kovács L. Novel role for galectin-1 in T-cell apoptosis regulation and its relevance to systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheumat. Dis.* 74. Suppl. 1: A19, 2015.

Kádár G, Pusztai A, Nagy K, Nagy Gy, Szekanecz Z, Géher P, Kovács L. A biológiai terápia tartós leállítását követő betegséglefolyás prediktorai rheumatoid artritisben. *Magyar Reumatológia* 56: 145-146, 2015.

Deák M, Novák J, Czibula Á, Fajka-Boja R, Monostori É, Kovács L. Galectin-1 and immunoregulatory dysfunction in systemic lupus erythematosus. *Eur. J. Clin. Invest.* 43. Suppl. 1: 86, Paper 7.17, 2013.

Deák M, Bocskai M, Burcsár S, Dányi O, Fekete Z, Kovács L. Non-thromboembolic risk in SLE-associated antiphospholipid syndrome. *Ann. Rheumat. Dis.* 72. Suppl. 3: A913, 2013.

Hornung Á, Deák M, Novák J, Szabó E, Czibula Á, Fajka-Boja R, Monostori É, Kovács L. A galectin-1 T-sejtekre gyakorolt apoptotikus hatásának vizsgálata szisztémás lupus erythematosusban. *Magyar Reumatológia* 54: 157, 2013.

Kádár G, Soós B, Laduvar A, Keszthelyi P, Szekanecz Z, Kovács L. Disease Course after the Permanent Cessation of Biological Therapy in Inflammatory Rheumatic Diseases. *Ann. Rheumat. Dis.* 72. Suppl. 3: A230, 2013.

Deák M, Szvetnik A, Kiss M, Tóth G, Kovács L. Anti-muscarinic-receptor3 autoantibodies in primary and secondary Sjögren's syndrome. *Eur. J. Clin. Invest.* 42. Suppl. 1: 61, Paper: 315, 2012.

Deák M, Árgyelán N, Hulló D, Balog A, Sohár N, Pokorny G, Szvetnik A, Kiss M, Tóth G, Kovács L. Detection of anti-muscarinic receptor-3 autoantibodies in secondary Sjögren's syndrome. *Ann. Rheumat. Dis.* 70. Suppl. 3: 676, 2011.

Kovács L, Fehér E, Bodnár I, Marczinovits I, Nagy GM, Somos J, Boda V. Immuno-electron microscopic localization of muscarinic acetylcholine-receptors as an autoantigen in the salivary gland in primary Sjögren's syndrome. *Ann. Rheumat. Dis.* 66. Suppl. 2: 589, 2007.

9.2. További teljes közlemények:

Besenyi Zs, Ágoston G, Hemelein, R, Bakos A, Nagy FT, Varga A, Kovács L, Pávics L. Detection of myocardial inflammation by 18F-FDG-PET/CT in patients with systemic sclerosis without cardiac symptoms: a pilot study. *Clin. Exp. Rheumatol.* 119:88-96, 2019.

Sejben A, Tiszlavicz L, Polyák K, Kovács L, Maráz A, Török D, Leprán Á, Ottlakán A, Furák J. Li–Fraumeni-szindróma. *Orvosi Hetilap* 160: 228-234, 2019.

Tóth DM, Ocskó T, Balog A, Markovics A, Mikecz, K, Kovács L, Meenakshi J, Bukiej AA, Ruthberg AD, Vida A. et al. Amelioration of Autoimmune Arthritis in Mice Treated With the DNA Methyltransferase Inhibitor 5'-Azacytidine. *Arthritis & Rheumatology* 71: 1265-1275, 2019.

Antal M, Battancs E, Bocskai M, Braunitzer G, Kovács L. An observation on the severity of periodontal disease in past cigarette smokers suffering from rheumatoid arthritis-evidence for a long-term effect of cigarette smoke exposure? *BMC Oral Health* 18: Paper 82, 2018.

Dulic S, Vasarhelyi Z, Bajnok A, Szalay B, Toldi G, Kovács L, Balog A. The Impact of Anti-TNF Therapy on CD4+ and CD8+Cell Subsets in Ankylosing Spondylitis. *Pathobiology*85: 201-210, 2018.

Kovács P, Kovács L. Habitualis vetélés kivizsgálása, kezelése: ESHRE, ASRM ajánlások. *Magyar Nőorvosok Lapja* 81: 319-329, 2018.

Ocskó T, Balog A, Kovács L, Bánfai Zs, Hoffmann Gy, Glant T, Rauch T. A Novel MTHFR Isoform-based Biomarker for RA and SLE. *J. Mol. Biomarkers and Diagnosis* 9: Paper: 396, 2018.

Clowse ME, Wallace DJ, Furie RA, Petri MA, Pike MC, Leszczynski P, Neuwelt CM, Hobbs K, Keiserman M, Duca L, Kovács L. et al.Efficacy and Safety of Epratuzumab in Moderately to Severely Active Systemic Lupus Erythematosus: Results From Two Phase III Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trials. *Arthritis & Rheumatology* 69: 362-375, 2017.

Dulic S, Vasarhelyi Z, Sava F, Berta L, Szalay B, Toldi G, Kovács, L, Balog, A, T-Cell Subsets in Rheumatoid Arthritis Patients on Long-Term Anti-TNF or IL-6 Receptor Blocker Therapy. *Mediators Inflammation* 2017: Paper: 6894374, 2017.

Gál B, Dulic S, Kiss M, Groma G, Kovács L, Kemény L, Bata-Csörgő Z. Increased circulating anti- α 6-integrin autoantibodies in psoriasis and psoriatic arthritis but not in rheumatoid arthritis. *J. Dermatol.* 44: 370-374, 2017.

Illés B, Ágoston G, Morvay Z, Séllei Á, Janáky, M, Kovács L, Varga A, Perikardiális folyadék és egy ritka betegség: csapatmunkában az erő. *Cardiol. Hung.* 47: 46-50, 2017.

Legány N, Berta L, Kovács L, Balog A, Toldi G. The role of B7 family costimulatory molecules and indoleamine 2,3-dioxygenase in primary Sjögren's syndrome and systemic sclerosis. *Immunol. Res.* 65: 622-629, 2017.

Piukovics K, Bertalan V, Terhes G, Bathori A, Hajdu E, Pokorny G, Kovács L, Urban E. Fatal cases of disseminated nocardiosis: challenges to physicians and clinical microbiologists: Case report. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 63: 405-410, 2016.

Rydén-Aulin M, Boumpas D, Bultink I, Callejas Rubio JL, Caminal-Montero L, Castro A, Colodro Ruiz A, Doria A, Dörner T, Gonzalez-Echavarri C, Gremese E, Houssiau FA, Huizinga T, Inanç M1, Isenberg D, Iuliano A, Jacobsen S, Jimenez-Alonso J, Kovács L, Mariette X, Mosca M, Nived O, Oristrell J, Ramos-Casals M, Rascón J, Ruiz-Irastorza G, Sáez-Comet L, Salvador Cervelló G, Sebastiani GD, Squatrito D, Szücs G, Voskuyl A, van Vollenhoven R.

Off-label use of rituximab for systemic lupus erythematosus in Europe. *Lupus Sci. Med.* 3: e000163, 2016.

Szel E, Szolnok G, Korom I, Bata-Csorgo, Z, Adamkovich N, Annus JK, Kovács L, Krenacs L, Meszes A, Modok S et al. What can vasculitic leg ulcers implicate? *Int. Wound J.* 13: 1027-1028, 2016.

Vanya M, Füvesi J, Kovács ZA, Gorgoraptis N, Salek-Haddadi A; Kovács L, Bártfai Gy. NMDA-receptor associated encephalitis in a woman with mature cystic ovarian teratoma = N-metil-D-aszpartát-receptor (NMDA-R) -ellenes antitest közvetítette encephalitis érett ovarialis teratomával. *Ideggyógyászati Szemle/ Clin. Neurosci.* 69: 427-432, 2016.

Zhao, J, Giles BM, Taylor RL, Yette GA, Lough KM, Ng HL, Abraham LJ, Wu H, Kelly JA, Glenn SB, Kovács L et al. Preferential association of a functional variant in complement receptor 2 with antibodies to double-stranded DNA. *Ann. Rheumat. Dis.* 75: 242-252, 2016.

Hodinka L, Bálint P, Bender T, Czirják L, Géher P, Héjj G, Hittner Gy, Kiss E, Kovács L, Nagy Gy et al. Az arthritisek kezelése szintetikus és biológiai betegségmódosító gyógyszerekkel. *Magyar Reumatologia* 6: 4-24, 2015.

Legány N, Toldi G, Distler JH, Beyer C, Szalay B, Kovács L, Vásárhelyi B, Balog A. Increased plasma soluble urokinase plasminogen activator receptor levels in systemic sclerosis: possible association with microvascular abnormalities and extent of fibrosis. *Clin. Chem. Lab. Med.* 53: 1799-1805, 2015.

Oparina NY, Delgado-Vega AM, Martinez-Bueno M, Magro-Checa C, Fernandez C, Castro RO, Pons-Estel BA, D'Alfonso S, Sebastiani GD, Witte T, Kovács L. et al. PXX locus in systemic lupus erythematosus: fine mapping and functional analysis reveals novel susceptibility gene ABHD6. *Ann. Rheumat. Dis.* 74: Paper: e14, 2015.

Resch MD, Marsovszky L, Nemeth J, Bocskai M, Kovács L, Balog, A. Dry eye and corneal langerhans cells in systemic lupus erythematosus. *J. Ophthalmol.* 2015: Paper: 543835, 2015.

Zhao J, Wu H, Langefeld CD, Kaufman KM, Kelly JA, Bae S-C, Alarcón-Riquelme ME, Alarcón GS, Anaya J-M, Criswell LA, BIOLUPUS Network: Kovács L. et al. Genetic associations of leptin-related polymorphisms with systemic lupus erythematosus. *Clin. Immunol.* 161: 157-162, 2015.

Ágoston G, Gargani L, Hulló D, Kovács L, Forster T, Varga, A. Bal pitvari diszfunkció vizsgálata speckle tracking technikával szisztémás szklerózisban. *Cardiol. Hung.* 44: 2-9, 2014.

Kepiro L, Szell M, Kovács L, Keszthelyi P, Kemeny 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 Immunol.* 75: 159-162, 2014.

Marsovszky L, Nemeth J, Resch MD, Toldi G, Legany N, Kovács L, Balog A. Corneal Langerhans cell and dry eye examinations in ankylosing spondylitis. *Innate Immunity* 20: 471-477, 2014.

Pentek M, Rojkovich B, Czirjak L, Geher P, Keszthelyi P, Kovács A, Kovács L, Szabó Z, Szekanecz Z, Tamasi L. et al. Acceptability of less than perfect health states in rheumatoid arthritis: the patients' perspective. *Eur. J. Health Economics* 15 Suppl 1: 73-82, 2014.

Poór Gy, Géher P, Drescher E, Juhász P, Keszthelyi P, Kovács L, Nagy O, Rojkovich B, Ruzicska É, Schnaider T. et al. Evaluation of clinical outcome, treatment compliance and tolerability of adalimumab in patients with active rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis and ankylosing spondylitis in Hungary: results from EviraEast, a multi-country, multi-center post marketing observational study. *Magyar Reumatológia* 55: 12-24, 2014.

Szalay B, Vasarhelyi B, Cseh A, Tulassay T, Deak M, Kovács L, Balog A. The impact of conventional DMARD and biological therapies on CD4+ cell subsets in rheumatoid arthritis: a follow-up study. *Clin. Rheumatol.* 33: 175-185, 2014.

Szalay B, Cseh Á, Mészáros G, Kovács L, Balog A, Vásárhelyi B. The impact of DMARD and anti-TNF therapy on functional characterization of short-term T-cell activation in patients with rheumatoid arthritis - A follow-up study. *Plos One* 9: Paper e104298, 2014.

Bajnok A, Kaposi A, Kovács L, Vasarhelyi B, Balog A, Toldi, G. Analysis by flow cytometry of calcium influx kinetics in peripheral lymphocytes of patients with rheumatoid arthritis. *Cytometry Part A* 83A: 287-293, 2013.

Csoma Z, Kovács L, Varga E, Bata-Csorgo Z, Kemeny L. Antisynthetase Syndrome: A Different Diagnosis to Dermatomyositis. *Acta Dermato-Venereol.* 93: 477-478, 2013.

Dalmady S, Kiss M, Kepiro L, Kovács L, Sonkodi G, Kemeny L, Gyulai R. Higher levels of autoantibodies targeting mutated citrullinated vimentin in patients with psoriatic arthritis than in patients with psoriasis vulgaris. *Clin. Develop. Immunol.* 2013: Paper 474028, 2013.

Farkas K, Nagy F, Kovács L, Wittmann T, Molnár T. Anti-tumor necrosis factor- α induced systemic lupus erythematosus in a patient with metastatic Crohn's disease—what is the role of anti-TNF antibody? *J. Crohns Colitis* 7: e143-e145, 2013.

Marsovszky L, Resch MD, Nemeth J, Toldi G, Medgyesi E, Kovács L, Balog A. In vivo confocal microscopic evaluation of corneal Langerhans cell density, and distribution and evaluation of dry eye in rheumatoid arthritis. *Innate Immunity* 19: 348-354, 2013.

Namjou B, Kim-Howard X, Sun C, Adler A, Chung SA, Kaufman KM, Kelly JA, Glenn SB, Guthridge JM, Scofield RH, Kovács L. et al. PTPN22 association in systemic lupus erythematosus (SLE) with respect to individual ancestry and clinical sub-phenotypes. *Plos One* 8 : e69404, 2013.

Toldi G, Szalay B, Beko G, Kovács L, Vásárhelyi B, Balog, A. Plasma soluble urokinase plasminogen activator receptor (suPAR) levels in ankylosing spondylitis. *Joint Bone Spine* 80: 96-98, 2013.

Toldi G, Beko G, Kadar G, Macsai E, Kovács L, Vasarhelyi B, Balog, A. Soluble urokinase plasminogen activator receptor (suPAR) in the assessment of inflammatory activity of rheumatoid arthritis patients in remission. *Clin. Chem. Lab. Med.* 51: 327-332, 2013.

Toldi G, Bajnok A, Dobi D, Kaposi A, Kovács L, Vásárhelyi B, Balog A. The effects of Kv1.3 and IKCa1 potassium channel inhibition on calcium influx of human peripheral T lymphocytes in rheumatoid arthritis. *Immunobiol.* 218: 311-316, 2013.

Bocskai M, Kádár G, Kovács L. Az Amerikai Reumatológiai Kollégium 2012-es ajánlásai a lupus nephritis kezelésére. *Immunológiai Szemle* 4: 45-47, 2012.

Delgado-Vega AM, Dozmorov MG, Quiros MB, Wu YY, Martinez-Garcia B, Kozyrev SV, Frostegard J, Truedsson L, de Ramon E, Gonzalez-Escribano MF, Kovács L. et al. Fine mapping and conditional analysis identify a new mutation in the autoimmunity susceptibility gene BLK that leads to reduced half-life of the BLK protein. *Ann. Rheumat. Dis.* 71: 1219-1226, 2012.

Hughes T, Adler A, Merrill JT, Kelly JA, Kaufman KM, Williams A, Langefeld CD, Gilkeson GS, Sanchez E, Martin J, Kovács L. et al. Analysis of autosomal genes reveals gene-sex interactions and higher total genetic risk in men with systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheumat. Dis.* 71: 694-699, 2012.

Löfgren SE, Frostegård J, Truedsson L, Pons-Estel BA, D'Alfonso S, Witte T, Lauwerys BR, Endreffy E, Kovács L, Vasconcelos C. et al. Genetic association of miRNA-146a with systemic lupus erythematosus in Europeans through decreased expression of the gene. *Genes Immunity* 13: 268-274, 2012.

Szalay B, Meszaros G, Cseh A, Acs L, Deak M, Kovács L, Vasarhelyi B, Balog A. Adaptive Immunity in Ankylosing Spondylitis: Phenotype and Functional Alterations of T-Cells before and during Infliximab Therapy. *Clin. Develop. Immunol.* 2012: Paper 808724, 2012.

Terzin V, Földesi I, Kovács L, Pokornyi Gy, Wittmann T, Czakó L. Association between autoimmune pancreatitis and systemic autoimmune diseases. *World J. Gastroenterol.* 18: 2649-2653, 2012.

Toldi G, Szalay B, Beko G, Bocskai M, Deák M, Kovács L, Vásárhelyi B, Balog A. Plasma soluble urokinase plasminogen activator receptor (suPAR) levels in systemic lupus erythematosus. *Biomarkers* 17: 758-763, 2012.

Kovács L. A szisztémás vasculitisek célzott terápiája. *Immunológiai Szemle* 3 Különszám: 66-71, 2011.

Péntek M, Rojkovich B, Czirják L, Géher P, Keszthelyi P, Kovács A, Kovács L, Náfrádi L, Szanyó F, Szekanecz Z. et al. Biologikumok Alkalmazása Rheumatoid Arthritisben – Terápiafelmérés (BARAT vizsgálat) : biológiai terápiát kezdő betegek klinikai jellemzői és egészségügyi szolgáltatások igénybevételének jellemzői. *Immunológiai Szemle* 3:36-48. 2011.

Szalay B, Acs L, Vasarhelyi B, Kovács L, Balog A. Successful use of tocilizumab in a patient with rheumatoid arthritis following severe pancytopenia during etanercept therapy. *JCR: J. Clin. Rheumatol.* 17: 377-379, 2011.

Farkas, K, Nagy F, Kovács L, Csajbok E, Kovács G, Wittmann T, Molnar T. Ulcerative colitis and primary sclerosing cholangitis as part of autoimmune polyglandular syndrome type III. *Inflammatory Bowel Dis.* 16: 10-11, 2010.

Kiss E, Kovács L, Szodoray P. Malignancies in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity Rev.* 9: 195-199, 2010.

Kovács L, Szodoray P, Kiss E. Secondary tumours in Sjogren's syndrome. *Autoimmunity Rev.* 9: 203-206, 2010.

Lofgren SE, Delgado-Vega AM, Gallant CJ, Sanchez E, Frostegard J, Truedsson L, Garrido ED, Sabio JM, Gonzalez-Escribano MF, Pons-Estel BA, Kovács L. et al. A 3'-Untranslated Region Variant Is Associated With Impaired Expression of CD226 in T and Natural Killer T Cells and Is Associated With Susceptibility to Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatism* 62: 3404-3414, 2010.

Balog A, Hulló D, Farkas K, Csajbók É, Nagy F, Molnár T, Wittmann T, Kovács L. Autoimmun polyglandularis-szindróma részeként kialakult rheumatoid arthritis sikeres TNF- α -gátló kezelése : [esetismertetés] *Magyar Reumatológia* 50: 221-222, 2009.

Kovács L. Vesebetegség talaján kialakult, magas vérnyomással szövődött terhesség. *Magyar Nőorvosok Lapja* 72: 11-18, 2009.

Kovács A, Endreffy E, Petri I, Kovács L, Pokorny, G. HLA class II allele polymorphism in Hungarian patients with primary Sjogren's syndrome. *Scand. J. Rheumatol.* 35: 75-76, 2006.

PhD fokozat megszerzése előtt publikált teljes közlemények:

Kovács, L; Paprika D, Takacs R, Kardos A, Varkonyi T, Lengyel Cs, Kovács A, Rudas L, Pokorny G. Cardiovascular autonomic dysfunction in primary Sjogren's syndrome. *Rheumatology (UK)* 43: 95-99, 2004.

Kovács L, Pokorny G. Sjörgen-szindróma. *Háziorvos Továbbképző Szemle* 9: 17-21, 2004.

Endreffy E, Kovács A, Kovács L, Pokorny G. HLA class II allele polymorphism in Hungarian patients with systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheumat. Dis.* 62: 1017-1018, 2003.

Kovács L, Papos M, Takacs R, Roka R, Csenke Z, Kovács A, Varkonyi T, Pajor L, Pavics L, Pokorny G. Autonomic nervous system dysfunction involving the gastrointestinal and the urinary tracts in primary Sjogren's syndrome. *Clin. Exp. Rheumatol.* 21: 697-703, 2003.

Pokorny G; Iványi B, Sonkodi, S, Kovács L, Kovács A, Csáti S, Lázár M, Makula É. A veseérintettség kimenetele primer Sjögren szindrómában. *Magyar Immunológia* 2: 33-39, 2003.

Gyulai R, Kiss M, Mehravaran M, Kovács K, Pokorny G, Husz S, Dobozy A. Atypical autoimmune blistering dermatosis associated with Sjogren's syndrome. *Acta Derato-Venerol.* 82: 462-464, 2002.

Molnar K, Kovács L, Kiss M, Husz S, Dobozy A, Pokorny G. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Dermatol.* 27: 59-61, 2002.

Rosztoczy A, Kovács L, Wittmann T, Lonovics J, Pokorny G. Manometric assessment of impaired esophageal motor function in primary Sjogren's syndrome. *Clin. Exp. Rheumatol.* 19: 147-152, 2001.

Schwaak AJG. van de Brink H. Smeenk RJT, Manger K, Kalden JR, Tosi S, Domljan Z, Rozman B, Logar D, Pokorny G, Kovács L. et al. Systemic lupus erythematosus. Disease outcome in patients with a disease duration of at least 10 years: second evaluation. *Lupus* 10: 51-58, 2001.

Swaak AJ, van de Brink H, Smeenk RJ, Manger K, Kalden JR, Tosi S, Marchesoni A, Domljan Z, Rozman B, Logar D, Kovács L. et al. Incomplete lupus erythematosus: results of a multicentre study under the supervision of the EULAR Standing Committee on International Clinical Studies Including Therapeutic Trials (ESCISIT). *Rheumatology (UK)* 40:89-94, 2001.

Gyulai R, Kiss M, Mehrawaran M, Kovács L, Pokorny G, Husz S, Dobozy A. Sjögren szindrómához társuló atipusos bullosus dermatosis. *Bőrgyógyászati és Venerológiai Szemle* 76: 155-160, 2000.

Kovács A, Szekeres E, Berek L, Endreffy E, Kovács L, Makula E, Eller J, Pokorny G, Petri I B. Relationship between the occurrence of anti-SSA, anti-SSB autoantibodies and HLA class II alleles from the aspect of in vitro inhibitory effect of glucocorticosteroid on the antibody-dependent cellular cytotoxicity in patients with primary Sjögren's syndrome. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 47: 421-431, 2000.

Kovács L, Szili-Török T, Bari F, Kéri Zs, Kovács A, Makula É, Pokorny G. Csökkent reakciókészség cholinerg ingerekre primaer Sjögren szindrómában. *Magyar Reumatológia* 41: 12-17, 2000.

Kovács L, Simon J, Kovács A, Pocsik A, Boros I, Ivanyi B, Pokorny, G. Diffúz alveolaris haemorrhagia szisztémás lupus erythematosusban [Diffuse alveolar hemorrhage in systemic lupus erythematosus] *Orvosi Hetilap* 141: 179-183, 2000.

Kovács L, Török T, Bari F, Kéri Z, Kovács A, Makula E, Pokorny G. Impaired microvascular response to cholinergic stimuli in primary Sjogren's syndrome. *Ann. Rheumat. Dis.* 59: 48-53, 2000.

Makula E, Pokorny G, Kiss M, Vörös E, Kovács L, Kovács A, Csernay L, Palko A. The place of magnetic resonance and ultrasonographic examinations of the parotid gland in the diagnosis and follow-up of primary Sjogren's syndrome. *Rheumatology (UK)*39: 97-104, 2000.

Kovács A, Endreffy E, Petri I, Varga É, Kovács L, Pokorny G. Primer Sjögren szindrómás betegek HLA II. osztályú allél polimorfizmusa. *Transzfúzió* 32: 33-38, 1999.

Kovács L, Szabó J, Molnar K, Kovács A, Pokorny G. Antineutrophil cytoplasmic antibodies and other immunologic abnormalities in patients with habitual abortion. *Am. J. Reprod. Immunol.* 41: 264-270, 1999.

Swaak AJ, van Den Brink HG, Smeenk RJ, Manger K, Kalden JR, Tos S, Marchesoni A, Domljan Z, Rozman B, Logar D, Kovács L. et al. Systemic lupus erythematosus: clinical features in patients with a disease duration of over 10 years, first evaluation. *Rheumatology (UK)*38: 953-958, 1999.

Gyöngyösi M, Pokorny G, Jambrik Z, Kovács L, Kovács A, Makula E, Csanady M. Cardiac manifestations in primary Sjogren's syndrome. *Ann. Rheumat. Dis.* 55: 450-454, 1996.

Makula E, Pokorny G, Rajtar M, Kiss I, Kovács A, Kovács L. Parotid gland ultrasonography as a diagnostic tool in primary Sjogren's syndrome. *Br. J. Rheumatol.* 35: 972-977, 1996.

Makula É, Pokorny G, Kiss I, Kovács A, Kovács L, Csernay L. Parotis ultrahang vizsgálat, mint a sialographia alternatív lehetősége primaer Sjögren szindrómában. *Magyar Radiológia* 70: 71-75, 1996.

Kovács László tudományos és oktatási közleményeinek összefoglalása
MTA V. Orvostudományi Osztály (2020.03.13)

Tudományos és oktatási közlemények	Szám		Hivatkozások ¹	
	Összesen	Részletezve	Független	Összes
I. Folyóiratcikk²	81	—	—	—
szakcikk nemzetközi folyóiratban, idegen nyelvű	—	46	977	1085
szakcikk, hazai idegen nyelvű	—	3	1	1
szakcikk, magyar nyelvű	—	12	4	4
szakcikk, sokszerzős, érdemi szerzőként ³	—	4	137	161
összefoglaló közlemény	—	7	75	78
rövid közlemény	—	9	55	56
II. Könyv	0	—	—	—
a) Szakkönyv, kézikönyv, tankönyv szerzőként	0	—	—	—
idegen nyelvű	—	0	0	0
magyar nyelvű	—	0	0	0
aa) Felsőoktatási tankönyv	—	0	0	0
b) Szakkönyv, kézikönyv, konferenciakötet, tankönyv szerkesztőként	0	—	—	—
idegen nyelvű	—	0	—	—
magyar nyelvű	—	0	—	—
bb) Felsőoktatási tankönyv	—	0	—	—
III. Könyvrészlet	1	—	—	—
idegen nyelvű	—	0	0	0
magyar nyelvű	—	1	0	0
cc) Felsőoktatási tankönyvfejezet	—	0	0	0
IV. Konferenciaközlemény⁴	0	—	0	0
Oktatási közlemények összesen (II.aa,bb-III.cc)	—	0	0	0
Tudományos közlemények összesen (I-IV.)	—	82	1249	1385
Tudományos és oktatási közlemények összesen (I-IV.)	82	—	1249	1385

V. További tudományos művek	8	—	—	—
További tudományos művek, ide értve a nem teljes folyóiratcikkeket és a nem ismert lektoráltságú folyóiratokban megjelent teljes folyóiratcikkeket is	—	5	0	0
Szerkesztőségi levelezés, hozzászólások, válaszok	—	3	11	11
Ötalmak, szabadalmak	—	0	0	0

VI. Hivatkozott absztraktok⁵	0	—	0	0
Összes hivatkozás¹	—	—	1260	1396
Hirsch index⁶	22	—	—	—
g index⁶	35	—	—	—

Speciális tudásmetriai adatok	Szám	Összes hivatkozás
Első szerzős teljes folyóiratcikkek száma ²	14	228
Utolsó szerzős teljes folyóiratcikkek száma ²	10	98
A tudományos fokozat (PhD) elnyerése utáni (2004) teljes tudományos folyóiratcikkek száma	59	761
Az utolsó 10 év (2010 - 2020) tudományos, teljes, lektorált tudományos folyóiratcikkeinek száma	53	645
A legmagasabb hivatkozottságú közlemény hivatkozásainak száma (az összes hivatkozás százalékában)	91	6,52%
Hivatkozások száma, amelyek nem szerepelnek a WoS/Scopus rendszerben	—	10
Jelentés, guideline	2	0
Csoportos (multicentrikus) közleményben kollaborációs közreműködő ⁷	6	153