

Doktori (PhD) Értekezés

A lép immunológiai szerepe rheumatoid arthritisben

Esam Khanfar

Témavezető: Dr. Boldizsár Ferenc, PhD

Immunológia és Biotechnológiai Intézet

Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ



Pécs, 2023

Doktori (PhD) Értekezés

A lép immunológiai szerepe rheumatoid arthritisben

Khanfar Esam

Témavezető: Dr. Boldizsár Ferenc, PhD

Programvezető:

Prof. Dr. Berki Tímea, PhD, DSc

Doktori iskola vezetője:

Prof. Dr. Reglődi Dóra, PhD, DSc

Immunológiai és Biotechnológiai Intézet

Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ



Pécs, 2023

Összefoglalás

Az immunrendszer limfatikus és extralimfatikus szövetek összetett hálózata, ahol a veleszületett- és adaptív immunsejtek különféle típusai működnek közre, hogy egyrészt részt vegyenek a szervezet idegen antigének elleni védelmében, másrészt a saját antigénekkal szemben a tolerancia kialakításában; így meggátolva az autoimmun betegségek kialakulását. A lép egy fontos másodlagos limfoid szerv, amelynek speciális és változatos funkciói között kiemelkedő a peritoneális üreg homeosztázisának fenntartása, az idegen antigének elleni veleszületett immunválaszban és az adaptív immunitásban való részvétele. A lép kulcsfontosságú a B-sejtek érésében, és a memória B-sejtek egyik fő előfordulási helyének tekintik. Az autoimmun betegségek, különösen reumatoid arthritisben (RA) gyakran megfigyelhető a lép megnagyobbodása, ami az RA patogenezisében való közvetlen érintettséget jelzi.

Jelen munkában a célunk az volt, hogy a lép immunológiai szerepét vizsgáljuk az RA kialakulásában és patogenezisében egy egér arthritis modell felhasználásával. Először Nkx 2-3 transzkripciós faktor knock-out (KO) egérben, amelyben a lép fejlődése súlyosan zavart szenved, vizsgáltuk az autoimmun arthritis kialakulását. Az Nkx2-3 KO egerekben fennálló lép szöveti szerkezeti zavar a B sejtek csökkent aktivációjához vezetett, ami kevésbé súlyos arthritis kialakulását eredményezte. Munkánk második részében vad-típusú BALB/c egerekben vizsgáltuk a lép hiányának hatását autoimmun arthritis modellben. Itt azt tapasztaltuk, hogy ha a sebészi lépeltávolítás (splenectomia) az arthritis kiváltása előtt történik, akkor nincs hatással a betegség kialakulására. Végül megvizsgáltuk, hogy a splenectomia milyen hatással van az arthritis kialakulására amennyiben a betegség kiváltása közben történik. Az autoimmun arthritis korai szakaszában végzett splenectomia jelentősen csökkentette a porc- és csontdestrukció mértékét.

Az eredményeinkből arra következtetésre jutottunk, hogy a lép nagyban befolyásolja a gyulladáscsökkentő citokin és autoantitest szinteket a szérumban. Emelett láttuk azt is, hogy a lép anatómiai defektusa Nkx2-3 deficiencia vagy sebészi eltávolítása miatt a Thelper sejtek polarizációját Th₂ irányba tolja. Ezzel szemben a lép jelenléte pont ellentétesen hat, Th₁ irányba polarizálja azokat. Adataink alátámasztják, hogy a lép valóban szerepet játszik az autoimmun arthritis kialakulásában.

1. Bevezetés

A rheumatoid arthritis (RA) egy gyakori szisztémás autoimmun betegség, amely a lakosság körülbelül 1%-át érinti [1]. Az RA prevalenciája körülbelül háromszor magasabb a nőkben, mint a férfiakban [2], [3]. Az RA-s betegekben szimmetrikus ízületi duzzanat, súlyos ízületi fájdalom és -merevség, végül csonterózió és ízületi károsodás alakul ki a betegség előrehaladtával [4]. Bár az RA-t elsősorban a szinoviális ízületek betegségének tekintik, a szisztémás gyulladás a betegek hozzávetőleg 40%-ban növeli az extraartikuláris elváltozások kialakulásának kockázatát is, mint például vasculitis, szív-, vese- és légúti megbetegedések, valamint Felty-szindróma. Az RA növeli a morbiditási és mortalitási rátát [5] és jelentősen befolyásolhatja a betegek életminőségét, beleértve a fizikai aktivitást és a társadalmi életet, valamint gazdasági terhet jelent az egyének és a társadalom számára egyaránt [6].

Az autoimmun arthritis állatmodelljei, mint például a kollagén indukált arthritis (CIA) és a rekombináns humán G1 domén által indukált arthritis (GIA), nagyon hasznos eszközöknek bizonyultak az RA patofiziológiájának és immunológiai folyamatainak tanulmányozásában [7], [8]. A GIA arthritis modell jelentősége az, hogy nagymértékben képes utánozni a humán RA számos klinikai és immunológiai vonatkozását [9]. A GIA egérmódelben az ízületi gyulladás indukciója során a Th1 és Th17 polarizáció dominál, amihez jelentős autoantitest termelés társul, beleértve az anti-rhG1- és anti-ciklikus citrullinált peptid antitesteket (anti-CCP) [7].

A lép a legnagyobb másodlagos limfoid szerv, amely két különálló szövettani részből áll: a fehér- és a vörös pulpából [10]. A lép részt vesz a peritoneális üreg homeosztázisának fenntartásában a peritoneum és a vérkeringés közötti B-sejtek migrációján keresztül [11]. Emellett részt vesz a T-sejt homeosztázis és az immuntolerancia elősegítésében normál körülmények között, mivel indukálja az autoimmun szabályozó gén (AIRE) expresszióját [12]. Ezenkívül a lép kulcsfontosságú a B-sejtek fejlődésében és érésében, beleértve a B1-, a marginális zóna (MZ) és a folliculáris (Fo) B-sejteket [13].

A lépnek a fent leírt fiziológiás szerepei mellett az autoimmun betegségek kialakulásában is részt vehet. Ezt támasztja alá, hogy a splenomegalia gyakori lelet szisztémás autoimmun

betegségekben például szisztémás szklerózisban, SLE-ben és RA-ban [14],[15]. Hasonlóan a CIA és a GIA egérmodellekben a lép részt vesz az ízületi gyulladás kialakulásában és patogenezisében, mivel mérete megnő, és nagy mennyiségű aktivált sejt található benne [16]. Ennek megfelelően a lép fejlődési rendellenességei vagy szerkezetének deformitása az immunválasz megváltozásához vezethet [17].

A homeodomain transzkripciós faktor Nkx2-3 kulcsfontosságú a lép, a Peyer-plakkok és a vékonybél fejlődésében [17],[18]. Az Nkx2-3 szükséges a nyálkahártya addresszin sejtadhéziós molekula-1 (MADCAM-1) expressziójához és szabályozásához az mesenterialis nyirokcsomók magas endoteliális venuláin, a Peyer-plakkokban, és a lép sinusokban [17], [18]. Az Nkx2-3 nélkülözhetetlen a normál immunológiai funkciókhoz, mivel szerepet játszik a lép fejlődésében és szerveződésében, ami szükséges a B-sejtek éréséhez és differenciálódásához, valamint a T-sejt függő immunreakcióhoz szükséges megfelelő mikrokörnyezet kialakítása révén [17].

Az Nkx2-3-hiányos egerek (Nkx2-3^{-/-}) vagy lép hiányosak, vagy jelentősen csökkent a lépük mérete a vörös pulpa- és az marginális zóna hiánya miatt [17], [18]. Az Nkx2-3^{-/-} egerek lépének kóros fejlődése nem biztosítja a megfelelő mikrokörnyezetet, amely a B- és T-sejtek normális eloszlásához szükséges [17],[18]. Ez hibás csíráközpontok kialakulásához vezet, ami abnormális B-sejtek fejlődéséhez és csökkent antitestválaszhoz vezet sikertelen affinitás-érés mellett [17].

2. Célkitűzések

A disszertáció célja a lép immunológiai szerepének vizsgálata volt az RA kialakulásában és progressziójában. Ebből a célból három különböző, de egymással összefüggő tanulmányt végeztünk:

1. Megvizsgáltuk a GIA-t Nkx2-3^{-/-} egerekben:
 - Megvizsgáltuk az Nkx2-3 hiány (a lép genetikai malformációja) hatását az autoimmun ízületi gyulladás kialakulására (a betegség progressziója és súlyossága szempontjából).
 - Vizsgáltuk az Nkx2-3 hiány hatását az autoimmun válaszra és a szérum paraméterekre.
 - Tanulmányoztuk az Nkx2-3 hiányának a B-sejtek jelátvitelére és aktivációjára gyakorolt hatását.
2. Megvizsgáltuk a splenectomia hatását GIA-ban:
 - Vizsgáltuk az autoimmun arthritis indukcióját megelőző lépeltávolítás hatását a betegség kialakulására és progressziójára.
 - Megvizsgáltuk a lép jelentőségét az autoimmun ízületi gyulladás kialakulásában.
 - Jellemeztük a celluláris- és humorális immunválaszt ízületi gyulladásos lépeltávolított egerekben.
 - Vizsgáltuk a splenectomia hatását a keringő T- és B-sejtek összetételére.
 - Azonosítottuk azokat az immunológiai mechanizmusokat, amelyek révén lépeltávolított egerekben a kontrollhoz hasonlóan autoimmun ízületi gyulladás alakult ki.
3. Megvizsgáltuk, hogy a GIA indukciója során végzett splenectomia befolyásolja-e az autoimmun ízületi gyulladást:
 - Összehasonlítottuk az első vagy a második immunizálás után végzett lépeltávolítás hatását a GIA kialakulására és súlyosságára.
 - Értékeltek az ízületi gyulladás korai szakaszában lépeltávolított egerek érintett ízületeinek radiológiai és szövettani elváltozásait.

- Összefüggést kerestük a klinikai kép, a szérumban lévő paraméterek valamint a celluláris- és humorális immunválasz között az arthritises splenectomizált és kontrol (lég megtartott) egerekben.
- Megvizsgáltuk, hogy a lég sebészi eltávolítása az RA indukció korai szakaszában megváltoztatja-e a helper T sejtek polarizációját.
- Meghatároztuk a keringő Treg-ek gyakoriságát az ízületi gyulladás kifejlődésének különböző szakaszaiban.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Egerek

2-6 hónapos nőstény vad típusú BALB/c és 4-5 hónapos nőstény Nkx2-3^{-/-} egereket használtunk BALB/c genetikai háttérrel. Az egereket hagyományos körülmények között, 24 ± 2 °C-on, szabályozott 12/12 órás fény/sötét ciklus mellett tartottuk az Immunológiai és Biotechnológiai Intézet Transzgenikus Egérházában. Az egereket ötösével helyeztük el, és ad libitum kaptak vizet és táplálékot. Valamennyi állatkísérlet a Pécsi Tudományegyetem Állatjóléti Bizottságának előírásai szerint (BA02/2000-23/2020 és BA02/2000-13/2022 engedélyszámokkal) történt.

3.2. Sebészi eljárások

Az egerek lépeltávolítása a következőképpen történt: az egerek narkózis céljából 100 mg/kg ketaminnal (Calypsol, Richter Gedeon, Budapest, Magyarország) és 10 mg/kg xilazinnal (Sedaxylan, Eurovet Animal Health, Bladel, Hollandia) kaptak ip. a műtét előtt. Ezután a hasat leborotváztuk és fertőtlenítettük, majd az egerek bal oldalán oldalirányban bőrmetszést végeztünk, majd a hasüreget megnyitottuk. Először 6-0-s selyemvarrat segítségével a lép érnnyelét lekötöttük, majd a lépét felszabadítottuk a környező szövetektől és eltávolítottuk. A bőrt és a hasi bemetszéseket 6-0 selyemvarrással zártuk le. A műtéteket szabályozott hőmérsékleten (37°C) végeztük, hogy elkerüljük a hipotermiát. A műtétek után fájdalomcsillapítás céljából minden egeret paracetamollal (bene-Arzneimittel GmbH München, Németország) láttunk el vízzel keverve 7 napig. A splenectomia nem befolyásolta az egerek általános egészségi állapotát, viselkedését vagy testtömegét.

3.3. Rekombináns humán G1-indukált ízületi gyulladás kiváltása és értékelése

A GIA-t 4-5 hónapos Nkx2-3^{-/-} vagy vad típusú BALB/c egerekben indukáltuk. Az egerek háromszor, 3-4 hetes időközönként intraperitoneálisan 40 µg rhG1 antigént dimetil-dioktadecilammónium (DDA) adjuváns PBS-ben oldott keverékét kapták a korábban leírtak szerint [7]. Az ízületi gyulladás súlyosságát és klinikai tüneteit a korábban leírt klinikai pontozási rendszerrel vizsgáltuk [7]. Röviden, minden egér végtag 0 és 4 közötti pontszámot kapott a mancs ízületeinek duzzanata, vörössége és ankilózisa alapján (0 = nincs duzzanat, 1 = bőrpír és enyhe duzzanat, 2 = bőrpír és mérsékelt duzzanat, 3 = súlyos duzzanat ízületi ankilózis nélkül

és 4= a mancs ízületeinek ankilózisa), így a legmagasabb súlyossági pontszám egerenként 16 lehet. A gyulladt végtagok átmérőjét digitális tolómérővel is rendszeresen megmértük a kísérlet során. Az egereket három héttel a harmadik immunizálás után feláldoztuk, és vérszérumot, a mesenterialis- (mLN-eket) és inguinális nyirokcsomókat (iLN-eket) és lépeket eltávolítottuk, és később *in vitro* vizsgálatokhoz használtuk fel.

3.4. Micro-computer tomográfia

Az egereket ip. 120 mg/kg ketaminnal (Calypsol, Richter Gedeon, Budapest, Magyarország) és 6 mg/kg xilazinnal (Sedaxylan, Euro vet Animal Health, Bladel, Hollandia) altattuk. SkyScan 1176 *in vivo* mikro-CT rendszert (Bruker, Kontich, Belgium) használtunk az egerek jobb hátsó mancsának szkennelésére. 0,5 mm-es Al szűrőt használtunk 17,5 µm voxelmérettel és 50 Kv csőfeszültséggel, a csőáramot 500 µA-re rögzítettük. A 3D szkennelések rekonstruálásához CT Analyzer szoftvert használtunk. Továbbá az osteophyták és a csonteróziók kiemelésére pseudocolor képek is készültek.

3.5. Szövettan, immunhisztokémia és immunfluoreszcencia

Az arthritises egerek hátsó lábait leölés után eltávolítottuk, és 10%-os formalinban fixáltuk. Ezután a mintákat EDTA-oldatban 37 °C-on egy napig dekalcifikáltuk. A paraffinba ágyazást követően 4 µm vastag metszeteket készítettünk, amelyeket Mayer hematoxilín és eozin (HE) oldatával Leica ST 4040 lineáris automata festővel (Leica Biosystems, Németország) festettük. Végül a diákat Panoramic MIDI Scanner (3DHitech, Magyarország) segítségével beszkeneltük, a képeket pedig a Panoramic View Software (3DHitech, Magyarország) segítségével elemeztük.

A kontroll egerek lépét, valamint mind a kontroll-, mind a splenectomizált egerek mesenterialis- és inguinális nyirokcsomóit eltávolítottuk, és kriosztát beágyazó közegbe helyeztük, majd -80 °C-on tartottuk. Három különböző metszési síkban (150 µm távolságban) 8 µm vastag kriosztátmetszeteket vágunk. A metszeteket egy éjszakán át szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd 5 percig hideg acetonnal rögzítettük.

Az immunfluoreszcenciához a metszeteket 20 percig blokkoltuk. Ezt követően anti-B220-Alexa fluor 647 és anti-CD3-FITC antitestek keverékét adtuk a metszetekhez, és 45 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd háromszor mostuk PBS-sel.

Immunhisztokémiához a metszeteket fenilhidrazin-hidrokloriddal PBS-ben 20 percig inkubáltuk, majd PBS-sel mostuk, majd 20 percig blokkoltuk. Ezután a metszeteket anti-IgD-

vel és biotinizált PNA-val inkubáltuk 45 percig, majd háromszor mostuk PBS-sel. Ezt követően a metszeteket extravidin alkalikus foszfatázzal és kecske anti-patkány IgG-HRP-vel inkubáltuk 45 percig, majd háromszor mostuk PBS-sel. A színreakcióhoz DAB-ot használtunk a HRP-hez, illetve NBT-t BCIP-el és levamizollal (1 mg/ml) az AP kimutatására. A metszeteket Olympus BX61 fluoreszcens mikroszkóppal elemeztük. A digitális képeket CCD kamerával, a ZEN szoftverrel készítettük. A képeket ImageJ szoftverrel elemeztük, hogy meghatározzuk az átlagos tüsszóméretet, valamint a csíráközpontok méretét és számát.

3.6. *In vitro* sejtenyésztés rhG1 antigén-specifikus proliferációs vizsgálathoz és citokin termeléshez

A lépeltávolított és a kontroll egerek mesenterialis nyirokcsomójából, valamint az Nkx2-3^{-/-} és a kontroll egerek lépéből sejteket izoláltunk, és 10% FCS-el kiegészített DMEM-ben tenyésztettük. A proliferációs vizsgálathoz 3x10⁵ sejtet/lyuk tenyésztettünk rhG1 antigénnel vagy anélkül, három párhuzamos mintával 96-lyukú-lemezekben 5 napig. A proliferációt a Promega CellTiter96® Nonradioactive Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI, USA) segítségével mértük a gyártó utasításait követve. A citokin termeléshez lyukanként 1,8x10⁶ sejtet tenyésztettünk 48-lyukú-lemezen az rhG1 antigén jelenlétében vagy hiányában. 5 nap elteltével a felülúszókat összegyűjtöttük és -20 °C-on tartottuk, majd később citokin ELISA mérésekhez használtuk.

3.7. Citokin- és antitest ELISA mérések

A vérszérumok és az *in vitro* tenyésztett lép- és mesenterialis nyirokcsomó sejtek felülúszóból az IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-17, IL-23, IFN γ és TNF α citokinek szintjét szendvics ELISA (R and D Systems, Minneapolis, MN, USA) segítségével mértük, a gyártó utasításai szerint.

Az rhG1 antigén-specifikus antitestek (anti-rhG1) és anti-egér proteoglikán (anti-mPG) szérumszintjét indirekt ELISA-val mértük a korábban leírtak szerint [7]. A szérum anti-CCP IgG1 és -IgG2a antitestek szintjét az Immunoscan CCP Plus ELISA kit (SVAR, Malmö, Svédország) segítségével mértük a gyártó utasításai szerint, kis módosítással. A reakciót peroxidázzal konjugált anti-egér-IgG1 vagy -IgG2 (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) másodlagos antitestek felhasználásával hívtuk elő. A RF-szinteket (IgG és IgM) a FineTest Mouse RF-IgG vagy -IgM ELISA Kit (FineTest, Wuhan, Kína) segítségével mértük a gyártó utasításai szerint.

3.8. Áramlási citometria

Vér-, lép- és inguinális nyirokcsomó sejteket izoláltunk, majd mintánként 1×10^6 sejtet kétszer mostuk áramlási citometriás mosópufferrel, majd fluorokrómmal konjugált monoklonális antitestek különböző koktéjjaival inkubáltuk 30 percig szobahőmérsékleten sötétben. Végül a mintákat kétszer mostuk, és áramlási citometriás fixáló pufferben vettük fel. A méréseket egy FACS Canto II áramlási citométerrel végeztük, az adatok elemzéséhez pedig a FACS DIVA szoftvert (BD Biosciences) és a FlowJo v10 szoftvert használtuk. Sejtfelszíni- és intracelluláris markerek alapján a következő sejtcsoportokat határoztuk meg: $CD3^+$, T-sejtek; $CD3^+CD4^+$, $CD4^+$ T-sejtek; $CD3^+CD8^+$, $CD8^+$ T-sejtek; $CD3^+CD4^+CD25^+$, aktivált $CD4^+$ T-sejtek; $IgD^{hi}IgM^{low}CD23^+$, folliculáris B-sejtek; $IgD^{low}IgM^{hi}CD23^-$, B1- és MZ B-sejtek; $Ig^+CD73^+CD38^+$, memória B-sejtek; $B220^-CD138^+$, plazmasejtek; $CD4^+FoxP3^+CD25^+$, természetes regulátoros T-sejtek; $CD4^+FoxP3^+CD25^-$, indukált regulátoros T-sejtek; $CD4^+Tbet^+$, T-helper-1 sejtek; $CD4^+GATA-3^+$, T-helper-2 sejtek; $CD4^+ROR\gamma^+$, T-helper-17 sejtek.

3.9. Ca^{2+} jelátviteli mérések

Az intracelluláris kalciumszint mérésére az inguinális- ill mesenterialis nyirokcsomókból egysejt szuszpenziót készítettünk és 5% FCS-vel és 4 mM $CaCl_2$ -dal (1×10^6 sejt/ml) kiegészített RPMI-ben vettük fel. Ezt követően a sejteket Fluo-3-AM intracelluláris Ca^{2+} indikátor fluoreszcens festékkel töltöttük fel $37^\circ C$ -on 5% CO_2 -t tartalmazó párasított levegőben 30 percig. BD FACS Calibur áramlási citométerrel mértük az intracelluláris Ca^{2+} szint változását az FL-1 csatornában. Az alapszintet egy percig mértük, majd a B-sejteket anti-IgM- vagy anti-IgG-antitesttel, míg a T-sejteket anti-CD3 keresztkötéssel aktiváltuk. Az adatok elemzéséhez Cell Quest szoftvert (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) használtunk.

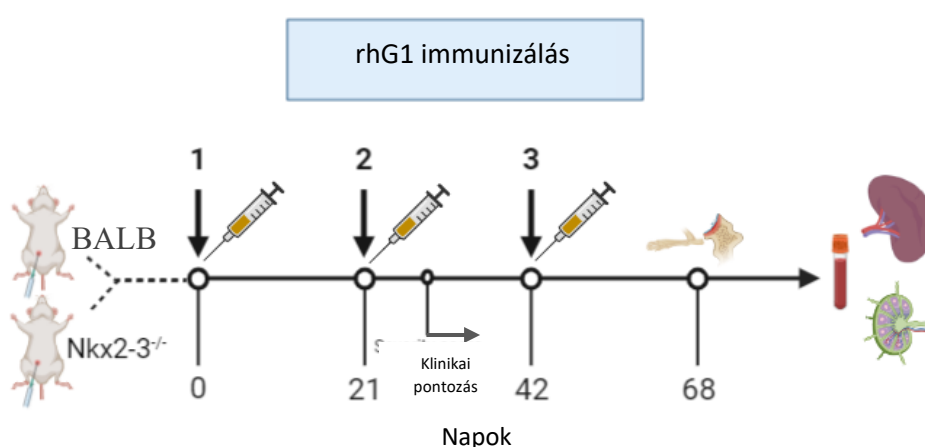
3.10. Statisztikai értékelés

Az adatok elemzése MS Excel programmal történt. A diagramokon az adatokat vagy oszlopdigramként (átlag \pm standard hiba (SEM)) vagy boxplotként ábrázoltuk (a "box" a 25-75%-os interkvartilis tartományt jelenti; ahol a medián és az átlagértékeket vízszintes vonallal és "x"-szel jelöljük, a bajusz a minimális/maximális értékeket mutatják). A kísérleti csoportok összehasonlítására Student-féle t-próbát használtunk, a $p \leq 0,05$ értékeket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

4. Eredmények

4.1. GIA tanulmányozása Nkx2-3^{-/-} egereken

Vizsgálataink első részében az Nkx2-3 hiány RA patogenezisére gyakorolt hatásának vizsgálatát tűztük ki célul. Ennek érdekében a vad típusú BALB/c-vel párhuzamosan autoimmun ízületi gyulladást indukáltunk Nkx2-3^{-/-} egerekben a GIA egérmodell segítségével (4.1. ábra). Tudomásunk szerint ez a tanulmány volt az első, amely az Nkx2-3 hiány hatását vizsgálta autoimmun ízületi gyulladással összefüggésben.



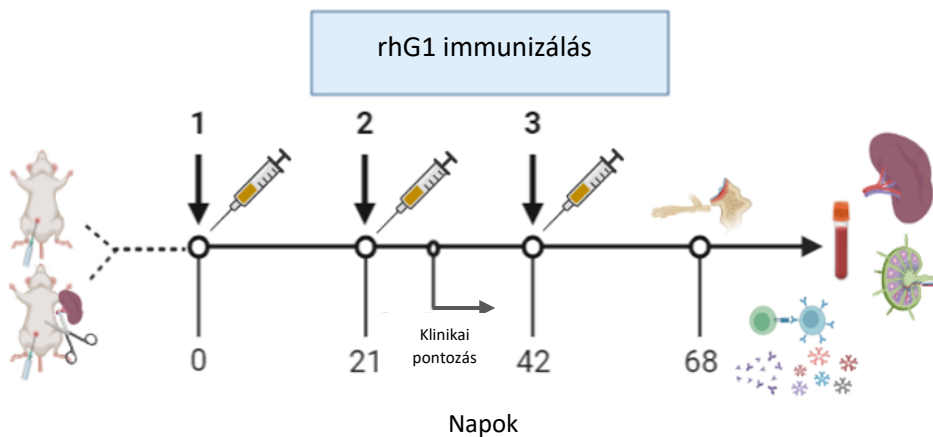
4.1. ábra Nkx2-3^{-/-} és kontroll BALB/c egereket immunizáltunk rhG1 antigénnel háromszor 3 hetes időközönként GIA kiváltására.

Fő eredmények:

- Autoimmun ízületi gyulladás alakult ki Nkx2-3^{-/-} egerekben a súlyosan károsodott légszerkezet ellenére.
- Az autoimmun ízületi gyulladás súlyossága és incidenciája alacsonyabb volt az Nkx2-3^{-/-} csoportban, mint a BALB/c kontroll egerekben.
- Az rhG1 antigén által kiváltott T-sejt proliferáció és citokin termelés csökkent az Nkx2-3^{-/-} egerekben.
- Az Nkx2-3^{-/-} egerekben enyhébb volt a csontkárosodás.
- Kevesebb anti-CCP-IgG2a-t, IL-17-t és IFN γ -t, és több IL-4-t mértünk az Nkx2-3^{-/-} egerek szérumában.
- Az Nkx2-3^{-/-} egerek nyirokcsomóiból izolált B-sejtek csökkent intracelluláris Ca²⁺ jelátvitelt mutattak.

4.2. A splenectomia hatásainak tanulmányozása a GIA indukciója előtt

A kutatás következő részében arra voltunk kíváncsiak, hogy az Nkx2-3^{-/-} egereknél tapasztalt enyhébb autoimmun ízületi gyulladás a lép anatómiai hibáira vezethető vissza, vagy más mechanizmusok is szerepet játszottak-e. A disszertáció ezen részében más megközelítést követve vizsgáltuk a lép szerepét az autoimmun ízületi gyulladás indukciójában és patogenezisében: azt vizsgáltuk, hogy a lép teljes hiánya műtéti eltávolítás (splenectomia) után vad típusú BALB/c egerekben befolyásolhatja-e az arthritis kialakulását és súlyosságát. Ebből a célból normál BALB/c egerek lépét eltávolítottuk 4 héttel az autoimmun ízületi gyulladás kiváltása előtt, majd a lépeltávolított egerekben, kontrol (léppel rendelkező) BALB/c egerekkel párhuzamosan autoimmun ízületi gyulladást indukáltunk (4.2. ábra).



4.2. ábra Lépelleltávolított és kontroll BALB/c egereket immunizáltunk rhG1 antigénnel háromszor 3 hetes időközönként GIA kiváltására.

Fő eredmények:

- Az autoimmun arthritis lépeltávolított BALB/c egerekben kialakult a lép hiánya ellenére.
- Az autoimmun arthritis súlyossága és előfordulási gyakorisága hasonló volt a lépeltávolított és a kontroll (léppel rendelkező) BALB/c egerekben.
- A lépeltávolított egerekből izolált mesenterialis nyirokcsomó sejtek rhG1 antigén által kiváltott proliferációja és citokin termelése alacsonyabb volt, mint a kontrollé.
- Az anti-rhG1-IgG1- és anti-CCP- (IgG2a és IgG1) autoantitestek szintje magasabb volt a lépeltávolított-, mint a kontroll csoportban.

- A splenectomizált egerek inguinális nyirokcsomóiban jelentősen nagyobb nyiroktüszők és csíráközpontok voltak, mint a kontrolban.
- A lépeltávolított egerek mesenterialis nyirokcsomóiból izolált B sejtek csökkent Ca^{2+} jelátvitelt mutattak, mint a kontroll egerek B sejtjei anti-IgM- vagy -IgG antitest stimulációt követően.

1. táblázat A 4.1. és 4.2. szakasz főbb megállapításainak összehasonlító összefoglalása

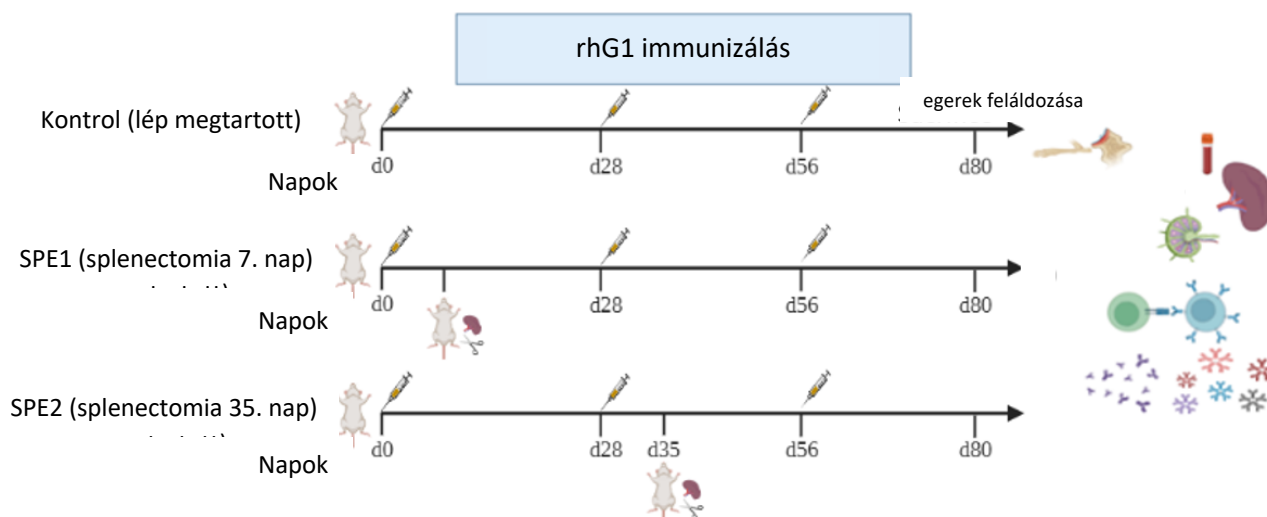
	CTRL	Nkx2-3 ^{-/-}	SPE
Klinikai Paraméterek			
Átlagos súlyossági pontszám*	~13.0	9.2±1.0	12.5±0.7
Incidencia (%)**	>90%	~70%	100%
Ízületi károsodás†	Súlyos	Enyhe	Súlyos
Szérum Paraméterek			
Citokinek††	↑↑IFN γ	↑↓IFN γ	↓↓IFN γ
	↑↑IL-17, ↑↑IL-23	↓↓IL-17, ↑↓IL-23	↑↓IL-17, ↓↓IL-23
	↓↓IL-4	↑↑IL-4	↑↓IL-4
Autoantitestek††	↑↓ rhG1 IgG1	↓↓rhG1 IgG1	↑↑rhG1 IgG1
	↑↑ rhG1 IgM	----	↓↓rhG1 IgM
	↑↓ACPA & RF	↓↓ACPA	↑↑ACPA & RF
Ca²⁺ jelátvitel			
B sejtek‡	erős	<< CTRL	< CTRL
T sejtek‡	erős	erős	< CTRL

* A kísérleti egércsoportok átlagos súlyossági pontszámai a kísérletek végén. ** Azon egerek százalékos előfordulási aránya, akik a kísérletek végére GIA-t fejlesztett ki. †Az ízületek CT-vizsgálatából és H&E-festéséből nyert eredmények a kísérletek végén vagy az egerek leölése után. ††Az egerek feláldozása után végzett mérések. ‡A inguinális és a mesenterialis nyirokcsomókból nyert kalcium jelátviteli mérések a kísérletek végén. ↑↓A mért érték a másik két csoport között van. ↑↑A legmagasabb mért érték az összes csoport között. ↓↓A legalacsonyabb mért érték az összes csoport között.

4.3. A splenectomia hatásának tanulmányozása a GIA indukciója során

A disszertáció utolsó részében azt kívántuk megvizsgálni, hogy mi történik, ha a lépeltávolított egereket az arthritis indukciós periódusában (ami az RA korai fázisának felel meg) távolítjuk el a GIA modellben. Ezért az rhG1 antigénnel végzett immunizálás során a BALB/c egerekből különböző időpontokban eltávolítottuk a lépelt (4.3. ábra). Minden kísérleti csoportot háromszor

immunizáltunk a 0., 28. és 56. napon. Az egereket véletlenszerűen három csoportba soroltuk; i) az első csoport lépét nem távolítottuk el (kontrol csoport); ii) a második csoport lépeltávolítása a 7. napon történt (SPE1); iii) a harmadik csoport lépeltávolítása pedig a 35. napon történt (SPE2). Minden csoportban követtük a klinikai paramétereket, az ízületek szövettani és radiológiai változásait, valamint a szérumban lévő paramétereket (4.3. ábra).



4.3. ábra BALB/c egereket immunizáltunk rhG1 antigénnel (0. nap). Egy héttel később (7. nap) egy csoport egeret splenectomizáltunk (SPE1). A 28. napon minden egér megkapta a 2. immunizálást. Egy héttel később (35. nap) egy másik egércsoport lépét távolítottuk el (SPE2). Az 56. napon minden egércsoport megkapta a 3. immunizálást.

Fő eredmények:

- Az autoimmun ízületi gyulladás kialakulása késleltetett volt azokban az egerekben, amelyeknél az első vagy a második immunizálást követően lépeltávolításra került sor.
- Szignifikánsan kisebb volt a csont- és porcdestrukció azokban az egerekben, amelyeknél az RA preklinikai stádiumában lépeltávolításra került sor.
- A szérumban lévő pro-inflammatorikus citokinek és autoantitestek koncentrációja alacsonyabb volt a lépeltávolított egerekben, mint a kontrolban.
- A lépeltávolított egerekben eltolódás történt a Th₂ irányba.
- A lépeltávolított egerek késleltetett gyulladásos válasza a keringő nTreg frekvencia növekedésével járt együtt.

2. táblázat A kísérleti csoportok főbb eredményeinek összehasonlítása a 4.3. részben.

	CTRL	SPE1	SPE2
Klinikai paraméterek			
Átlagos súlyossági pontszám*	13.8±1.3	12.4±1	11.2±1.8
Incidencia (%)**	~90%	~90%	~70%
Ízületi károsodás†	Súlyos	Enyhe	Közepes-Súlyos
Szérum paraméterek			
Citokinek ††	↑↑IFN γ ↑↑IL-17, ↑↑IL-23 ↑↑IL-4	↑↓IFN γ ↓IL-17, ↓IL-23 ↓↓IL-4	↓↓IFN γ ↓IL-17, ↓IL-23 ↑↓IL-4
Autoantitestek ††	↓↓rhG1 IgG1 ↑↑rhG1 IgM ↑↑Anti-mPG ↑↑ACPA IgG1 ↓↓ACPA IgG2a ↑↑RF	↑↓rhG1 IgG1 ↓rhG1 IgM ↓↓Anti-mPG ↓↓ACPA IgG1 ↑↑ACPA IgG2a ↓↓RF	↑↑rhG1 IgG1 ↓rhG1 IgM ↑↓Anti-mPG ↑↓ACPA IgG1 ↑↓ACPA IgG2a ↑↓RF
T-helper sejtek			
Lép ††	↑↑Th ₁ , ↑↑Th ₁₇ ↓↓Th ₂	----	----
Inguinalis nyirokcsomó††	↓↓Th ₁ , ↑↑Th ₁₇ ↑↓Th ₂	↑↑Th ₁ , ↑↓Th ₁₇ ↑↑Th ₂	↑↓Th ₁ , ↓↓Th ₁₇ ↓↓Th ₂
Cirkuláló nTreg sejtek‡‡	↓↓nTregs	↑nTregs	↑nTregs

*A kísérleti egércsoportok átlagos súlyossági pontszámai a kísérletek végén. **Azon egerek százalékos előfordulási aránya, amelyek a kísérletek végére GIA-t fejlesztett ki. † Az ízületek CT-vizsgálatából és H&E-festéséből nyert eredmények a kísérletek végén vagy az egerek leölése után. †† Az egerek feláldozása után végzett mérések. ‡‡ A keringő nTregok gyakorisága az 53. napon. ↑↓ A mért érték a másik két csoport között van. ↑↑ A legmagasabb mért érték az összes csoport között. ↓↓ A legalacsonyabb mért érték az összes csoport között. ↑ A mért értékek két csoportban hasonlóan magasak voltak. ↓ Két csoportban hasonlóan alacsonyak voltak a mért értékek.

Hivatkozások

- [1] J. L. Bennett, A. G. Pratt, R. Dodds, A. A. Sayer, and J. D. Isaacs, “Rheumatoid sarcopenia : loss of skeletal muscle strength and mass in rheumatoid arthritis,” *Nat Rev Rheumatol*, 2023.
- [2] Z. Chen, A. Bozec, A. Ramming, and G. Schett, “Anti-inflammatory and immune-regulatory cytokines in rheumatoid arthritis,” *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2019.
- [3] I. B. McInnes and G. Schett, “Mechanism of Disease The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 365, no. 23, pp. 2205–2219, 2011.
- [4] J. van den Hoek *et al.*, “Mortality in patients with rheumatoid arthritis: a 15-year prospective cohort study,” *Rheumatol. Int.*, vol. 37, no. 4, pp. 487–493, 2017.
- [5] Y. V. Muravyev, “Extra-articular manifestations of rheumatoid arthritis,” *Nauchno-Prakticheskaya Revmatol.*, vol. 56, no. 3, pp. 356–362, 2018.
- [6] A. Kłak, F. Raciborski, and P. Samel-Kowalik, “Social implications of rheumatic diseases,” *Reumatologia*, vol. 54, no. 2, pp. 73–78, 2016.
- [7] T. T. Glant *et al.*, “Proteoglycan-Induced Arthritis and Recombinant Human Proteoglycan Aggrecan G1 Domain – Induced Arthritis in BALB / c Mice Resembling Two Subtypes of Rheumatoid Arthritis,” vol. 63, no. 5, pp. 1312–1321, 2011.
- [8] D. D. Brand, K. A. Latham, and E. F. Rosloniec, “Collagen-induced arthritis,” *Nat. Protoc.*, vol. 2, no. 5, pp. 1269–1275, 2007.
- [9] F. Boldizsar, O. Tarjanyi, P. Nemeth, K. Mikecz, and T. T. Glant, “Th1/Th17 polarization and acquisition of an arthritogenic phenotype in arthritis-susceptible BALB/c, but not in MHC-matched, arthritis-resistant DBA/2 mice,” *Int. Immunol.*, vol. 21, no. 5, pp. 511–522, 2009.
- [10] J. G. Cyster, “Lymphoid organ development and cell migration,” *Immunol. Rev.*, vol. 195, pp. 5–14, 2003.
- [11] G. M. Crane, Y. C. Liu, and A. Chadburn, “Spleen: Development, anatomy and reactive lymphoid proliferations,” *Semin. Diagn. Pathol.*, no. xxxx, pp. 0–1, 2020.
- [12] M. T. Kim and J. T. Harty, “Splenectomy alters distribution and turnover but not numbers or protective capacity of de novo generated memory CD8 T-cells,” *Front. Immunol.*, vol. 5, no. NOV, pp. 1–7, 2014.
- [13] A. K. Abbas, A. H. Lichtman, and S. Pillai, *Basic Immunology: Functions and of the Immune System*. 2016.
- [14] M. C. Hochberg, “Seminars in Arthritis and Rheumatism: An Update,” *Semin. Arthritis Rheum.*, vol. 40, no. 1, p. 1, 2010.
- [15] P. Savola *et al.*, “Somatic STAT3 mutations in Felty syndrome: An implication for a common pathogenesis with large granular lymphocyte leukemia,” *Haematologica*, vol. 103, no. 2, pp. 304–312, 2018.

- [16] F. Tsuji, M. Yoshimi, O. Katsuta, M. Takai, K. Ishihara, and H. Aono, "Point mutation of tyrosine 759 of the IL-6 family cytokine receptor, gp130, augments collagen-induced arthritis in DBA/1J mice.," *BMC Musculoskelet. Disord.*, vol. 10, p. 23, Feb. 2009.
- [17] D. Tarlinton, A. Light, D. Metcalf, R. P. Harvey, and L. Robb, "Architectural defects in the spleens of Nkx2-3-deficient mice are intrinsic and associated with defects in both B cell maturation and T cell-dependent immune responses.," *J. Immunol.*, vol. 170, no. 8, pp. 4002–4010, Apr. 2003.
- [18] T. Czömpöly, Á. Lábadi, Z. Kellermayer, K. Olasz, H.-H. Arnold, and P. Balogh, "Transcription Factor Nkx2-3 Controls the Vascular Identity and Lymphocyte Homing in the Spleen," *J. Immunol.*, vol. 186, no. 12, pp. 6981–6989, 2011.
- [19] W. Yu *et al.*, "NKX2-3 Transcriptional Regulation of Endothelin-1 and VEGF Signaling in Human Intestinal Microvascular Endothelial Cells," vol. 6, no. 5, pp. 1–10, 2011.
- [20] O. Pabst, "NKX2.3 is required for MAdCAM-1 expression and homing of lymphocytes in spleen and mucosa-associated lymphoid tissue," *EMBO J.*, vol. 19, no. 9, pp. 2015–2023, 2000.
- [21] Z. Kellermayer *et al.*, "IL-22 – Independent Protection from Colitis in the Absence of Nkx2.3 Transcription Factor in Mice," 2020.

Köszönetnyilvánítás

Először is szeretném kifejezni legmélyebb hálámat Dr. Boldizsár Ferencnek, aki ideális tanár és szakdolgozati témavezető volt, bátorítást és tanácsot nyújtott mind a projekt, mind az MSc kurzusok és szakdolgozatom készítése során. Igazi megtiszteltetés volt Dr. Olasz Katalin és a legjobb TDK hallgatók csapatában dolgozni.

Szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Berki Tímeának és Prof. Dr. Balogh Péternek mentorálásukért, hasznos beszélgetéseikért és tanácsaiért.

A disszertációban bemutatott eredmények nem jöhettek volna létre a Pécsi Tudományegyetem Immunológiai és Biotechnológiai Intézet Transzgenikus Állatházának munkatársai támogatása nélkül. Nagyra értékelem a technikai személyzet, különösen Orbán Dániel és Sándorné Mónika segítségét. Szeretnék köszönetet mondani munkatársaimnak és barátaimnak az Immunológiai és Biotechnológiai Intézetben, különösen Dr. Gajdócsi Erzsébetnek és Balázs Noéminek.

Köszönetet szeretnék mondani Kiss Tamás MSc-nek a PTE, ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézetéből a kitűnő mikro-CT-képekért, Dr. Kajtár Béla PhD-nek a PTE, ÁOK Patológiai Intézetből az ízületi szövettani felvételekért.

Rendkívül hálás vagyok a családomnak és a barátaimnak. Szavakkal nem lehet leírni, mennyire hálás vagyok szüleim, nővérem és testvéreim szeretetéért, támogatásáért és imáiért.

Szeretném kifejezni legmélyebb köszönetemet legjobb barátomnak, László Zoltánnak az MSc és PhD tanulmányaim során nyújtott folyamatos támogatásáért és tanácsaiért.

Mindenekelőtt gondoskodó és szerető feleségemnek, Alának szeretném megköszönni a végtelen támogatást és bátorítást kutatómunkám és szakdolgozatom megírása során. Köszönöm, hogy a műzsám, szerkesztőm és lektorom vagy.

Végezetül szeretném megköszönni a Tempus Közalapítvány/Stipendium Hungaricum Ösztöndíjprogramnak, hogy finanszírozta PhD tanulmányaimat.

A disszertációhoz kapcsolódó publikációk és közlemények listája

Közlemények

E. Khanfar, K. Olasz, E. Gajdócsi, X. Jia, T. Berki, P. Balogh, F. Boldizsár, Splenectomy modulates the immune response but does not prevent joint inflammation in a mouse model of RA, *Clinical and Experimental Immunology*, (2022). (IF: 5.732)

E. Khanfar, K. Olasz, F. Gábris, E. Gajdócsi, B. Botz, T. Kiss, R. Kugyelka, T. Berki, P. Balogh, F. Boldizsár, Ameliorated Autoimmune Arthritis and Impaired B Cell Receptor-Mediated Ca²⁺ Influx in Nkx2-3 Knock-out Mice, *International Journal of Molecular Sciences*, **21** (2020) 6162. (IF: 5.924)

E. Khanfar, K. Olasz, S. Gál, E. Gajdócsi, B. Kajtár, T. Kiss, P. Balogh, T. Berki, F. Boldizsár, Splenectomy at Early stage of Autoimmune Arthritis Delayed Inflammatory Response and Reduced Joint Deterioration in Mice. (Submitted)

Prezentációk

E. Khanfar, K. Olasz, F. Gábris, E. Gajdócsi, B. Botz, T. Kiss, R. Kugyelka, T. Berki, P. Balogh, F. Boldizsár, Nkx2-3 controls autoimmune arthritis through modifying B cell activation, 40th European Workshop for Rheumatology Research (EWRR), Leuven, Belgium, 13-15/02/2020.

Egyéb közlemények listája

Közlemények

K. Szabó, Á. Kemény, N. Balázs, **E. Khanfar**, Z. Sándor, F. Boldizsár, R. Gyulai, J. Najbauer, E. Pintér, T. Berki, Presence of TRPA1 Modifies CD4⁺/CD8⁺ T Lymphocyte Ratio and Activation, *Pharmaceuticals*, **15** (2022) 57. (IF: 5.863)

Salem A, **Khanfar E**, Nagy S, Széchenyi A, Cocrystals of tuberculosis antibiotics: Challenges and missed opportunities, *International Journal of Pharmaceutics*, **623** (2022) 121924. (IF:6.51)