

# IMMUNOLÓGIAI SZEMLE

NEGYEDÉVENTE MEGJELENŐ  
ORVOSTUDOMÁNYI FOLYÓIRAT

IMMUNOLOGY QUARTERLY

ALAPÍTVÁ 2009-BEN

MEDICINA KÖNYVKIADÓ

WWW.MEDICINA-KIADO.HU

Köszöntő

A Magyar Immunológiai Társaság 43. Vándorgyűlésének összefoglalói

Nem genomikus glukokortikoid-hatások

A Marfan-szindróma klinikai jellemzői

Epesavak, immunrendszer

Spondyloarthritis: célértékre törekvő kezelés

Methotrexat rheumatoid arthritisben

Methotrexatezelés finomhangolása

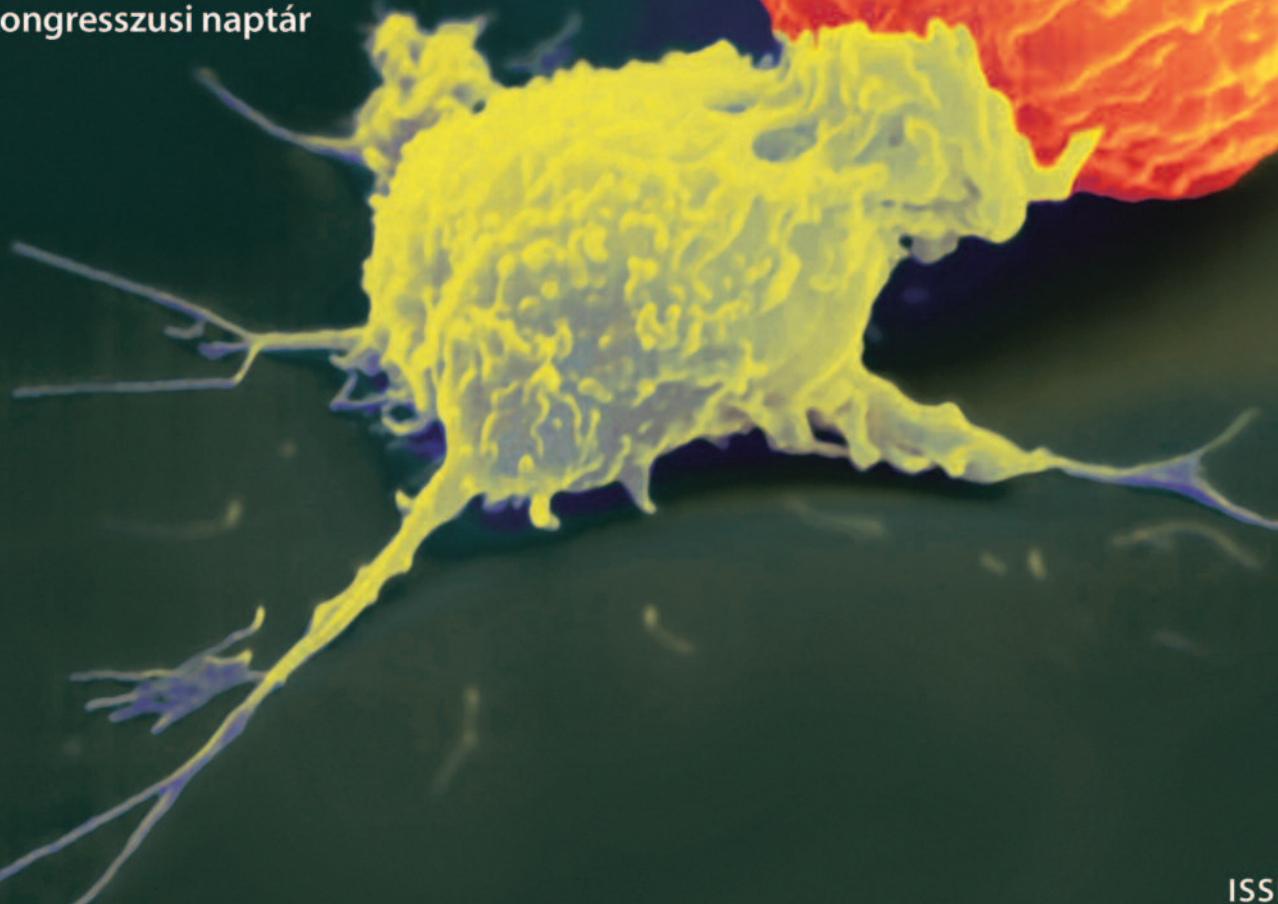
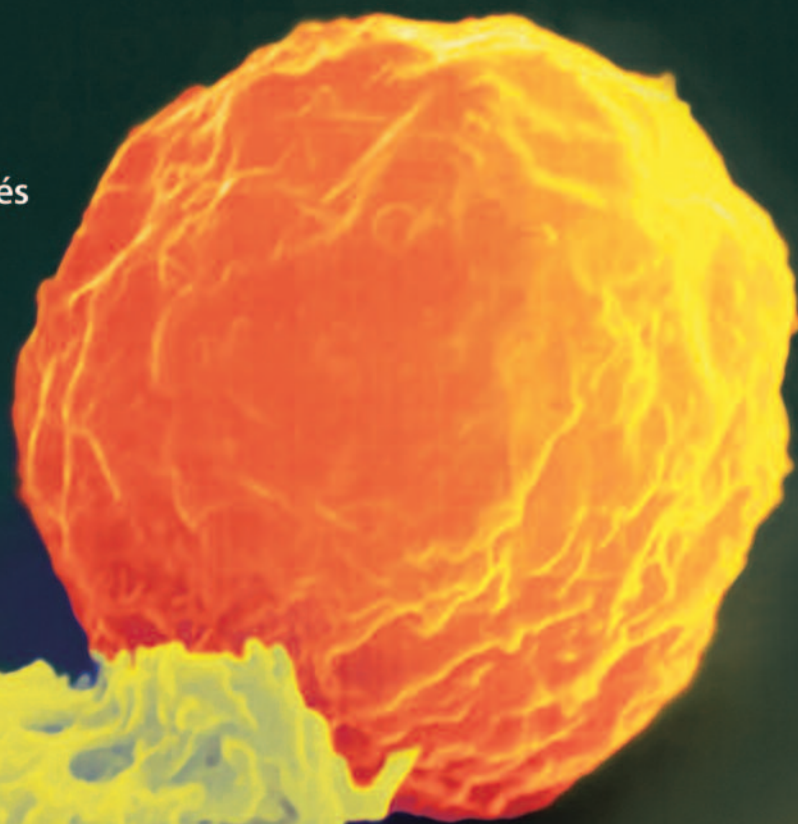
V. Károly császár utolsó hónapjai

In memoriam Gomez Roberto

Tudta-e Ön ...?

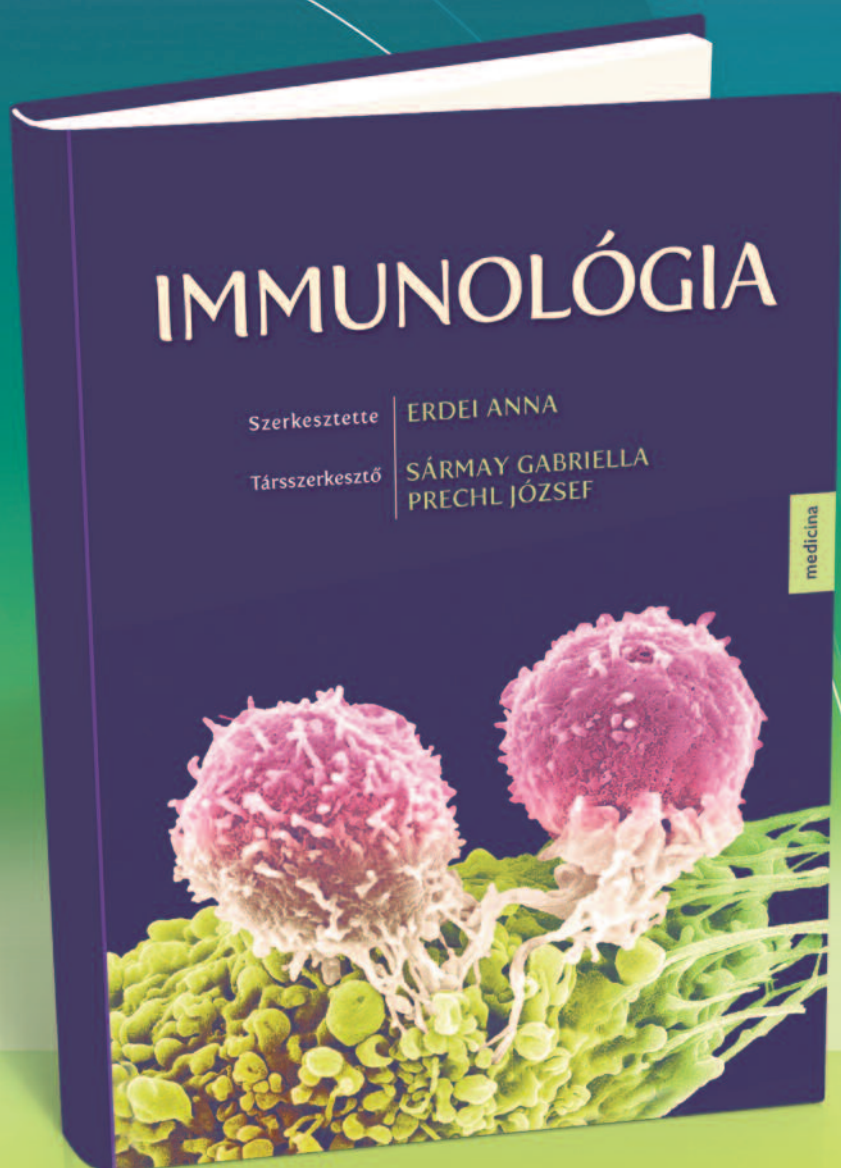
Kongresszusi beszámoló: EULAR

Kongresszusi naptár



# A MEDICINA KÖNYVKIADÓ

# ajánlata



„Nem túlzás úgy jellemezni ezt a könyvet, hogy mind nemzetközi, mind hazai vonatkozásban »kimagasló és egyedülálló« alkotás. Az immunológia ismeretanyagán keresztül olyan szemléletet tanít, melyből kiérződik, hogy az immunitás törvényszerűségei, funkciói, molekuláris jelenségei az élőlények szinte minden működésében jelen vannak, sokszor meghatározó vagy alapvető módon.”

Dr. Petrányi Győző  
akadémikus

Ára: 11900 Ft



Keresse könyveinket a honlapunkon [www.medicina-kiado.hu](http://www.medicina-kiado.hu) valamint **márkaboljtjainkban**

1091 **Budapest**, Üllői út 91/A. tel.: 36(1)215 3786, 36(1)215 9618

1091 **Budapest**, Üllői út 89/C. tel.: 36(1)216 0596

1088 **Budapest**, Baross u. 21. tel.: 36(1)317 0931

4032 **Debrecen**, Nagyerdei krt. 98. tel.: 36(52)423 855

7624 **Pécs**, Szigeti u. 12. tel.: 36(72)536 001/31720

6720 **Szeged**, Tisza L. krt. 48. tel.: 36(62)420 418

# IMMUNOLÓGIAI SZEMLE

NEGYEDÉVENTE MEGJELENŐ  
ORVOSTUDOMÁNYI FOLYÓIRAT

IMMUNOLOGY QUARTERLY

ALAPÍTVÁ 2009-BEN • KIADJA A MEDICINA KÖNYVKIADÓ ZRT. • WWW.MEDICINAKIADO.HU

Főszerkesztő

**SZEKANECZ ZOLTÁN**

Főszerkesztő-helyettesek

**BERKI TÍMEA • CZIRJÁK LÁSZLÓ • KACSKOVICS IMRE • PROHÁSZKA ZOLTÁN • ZEHER MARGIT**

Kiadói szerkesztő

**CORNIDES ÁGNES**

Szerkesztőbizottság

**SZEGEDI GYULA** (elnök)

**BÁLINT GÉZA • BODOLAY EDIT • BUZÁS EDIT • CONSTANTIN TAMÁS • CSABA BÉLA • CSIKI ZOLTÁN • DOBOZY ATTILA • ERDEI ANNA  
FALUS ANDRÁS • GÉHER PÁL • GERGELY PÉTER • GÖMÖR BÉLA • HODINKA LÁSZLÓ • HUDECZ FERENC • HUNYADI JÁNOS • JÁNOSSY TAMÁS  
KEMÉNY LAJOS • KISS EMESE • KOTLÁN BEATRIX • KOVÁCS ATTILA • KOVÁCS LÁSZLÓ • MÓCSAI ATTILA • NAGY GYÖRGY • NAGY LÁSZLÓ  
NÉKÁM KRISTÓF • NÉMETH PÉTER • PÉNTÉK MÁRTA • POÓR GYULA • RAJNAVÖLGYI ÉVA • REMENYIK ÉVA • SÁRMAY GABRIELLA • SIPKA SÁNDOR  
SURÁNYI PÉTER • SZÁNTÓ SÁNDOR • SZEGEDI ANDREA • SZEKERES JÚLIA • SZÉLL MÁRTA • SZÜCS GABRIELLA • TAMÁSI LÁSZLÓ • UHER FERENC**

International editors / Nemzetközi szerkesztőbizottság

**YEHUDA SHOENFELD** (Tel-Hashomer, president)

**ANN AGER** (Cardiff) • **GERGELY PÉTER JR** (Basel) • **GLANT TIBOR** (Chicago) • **ALISA E. KOCH** (Ann Arbor) • **LAKOS GABRIELLA** (Chicago)  
**MIKECZ KATALIN** (Chicago) • **THOMAS PAP** (Münster) • **PERL ANDRÁS** (Syracuse) • **SZODORAY PÉTER** (Oslo)  
**PAUL-PETER TAK** (Amsterdam) • **JOHN VARGA** (Chicago)

A Magyar Immunológiai Társaság hivatalos lapja

Szerkesztőség/kiadó: Medicina Könyvkiadó Zrt.

1072 Budapest, Rákóczi út 16.

Postacím: 1245 Budapest 5, Pf. 1012

Telefon: (1) 331 0781, (1) 312 2650; fax: (1) 312 2450;

e-mail: medkiad@euroweb.hu

ISSN 2061-0203

Egyéni előfizetési díj egy évre bruttó 2800 Ft.

Előfizetéssel kapcsolatos információt kereskedelmi

osztályunk munkatársai adnak: **DURÁN ÁGNES, EKKER GYÖRGY**

e-mail: kerosztaly@medicinazrt.hu

A kiadásért felel: **FARKASVÖLGYI FRIGYESNÉ** vezérigazgató

Borítótér, tipográfia: **BEDE TAMÁSNÉ**

Nyomdai előkészítés: **GAR-WIND Bt.**

Minden jog fenntartva. A folyóiratban megjelent valamennyi eredeti írásos és képi anyag közlési joga a szerkesztőséget illeti. A megjelent anyagnak – vagy egy részének – bármely formában való másolásához, felhasználásához, ismételt megjelentetéséhez a szerkesztőség írásbeli hozzájárulása szükséges.

Nyomdai munkálatok: **Pauker Nyomdaipari Kft., Budapest**

Felelős vezető: **VÉRTESS GÁBOR** ügyvezető igazgató

# Tartalom

## **KÖSZÖNTŐ / INTRODUCTION 3**

Szekanecz Zoltán  
Kacs Kovics Imre, Berki Tímea

## **KONGRESSZUSI ÖSSZEFOGLALÓK / CONGRESS ABSTRACTS**

**A Magyar Immunológiai Társaság 43. Vándorgyűlésének összefoglalói / Abstracts of the 43rd Annual Meeting of the Hungarian Society for Immunology 4**

## **ÖSSZEFOGLALÓ REFERÁTUMOK / REVIEW ARTICLES**

**A glukokortikoid hormon nem genomikus hatásai a T-sejtek jelátvitelére és apoptózisára / Non-genomic effects of glucocorticoid hormones on signal transduction and apoptosis of T lymphocytes 54**

Prenek Lilla, Ugor Emese, Papp Ramóna, Boldizsár Ferenc, Berki Tímea

**Öröklött kötőszöveti betegségek I. A Marfan-szindróma patomechanizmusa és klinikai jellemzői / Heritable disorders of connective tissue I. Pathogenesis and clinical features of Marfan's syndrome 59**

Brúgós Boglárka, Sebestyén Lilla, Pfliegler György

**Az epesavak és az immunrendszer kapcsolata / Linkage between bile acids and immune system 66**

Sipka Sándor

## **GYÓGYSZERES TERÁPIA / PHARMACOTHERAPY**

**A célértékre törekvő kezelés („treat-to-target”): kezelési elvek és azok hazai alkalmazásának lehetőségei spondyloarthritisekben 73**

Szántó Sándor, Hodinka László, Gaál János, Poór Gyula, Újfalussy Ilona, Géher Pál

**Methotrexatkezelés rheumatoid arthritisben: még mindig van új a Nap alatt ... / Methotrexate treatment in rheumatoid arthritis: what is new under the sun? 78**

Szekanecz Zoltán

**A methotrexatkezelés finomhangolása: nagyobb adagok, parenterális bevitel – EULAR 2014 / Methotrexate treatment fine tuning: higher doses, parenteral administration – EULAR 2014 82**

Hodinka László

## **KULTÚRKÖR / CULTURAL CORNER**

**V. Károly császár utolsó hónapjai / Charles V. emperor's last few months 87**

Krutsay Miklós

**Tudta-e Ön ...? Have you ever known ...? 90**

Gömör Béla, Szekanecz Zoltán

## **IN MEMORIAM**

**Gomez Roberto (1948–2014) 91**

## **KONGRESSZUSI BESZÁMOLÓK / CONGRESS REPORTS**

**EULAR, Párizs, 2014. június 11–14. 92**

Bodnár Nóra, Horváth Ágnes, Nagy György, Szabó Zoltán, Szamosi Szilvia, Szántó Sándor, Szekanecz Zoltán, Szűcs Gabriella, Vánca Andrea

**KONGRESSZUSI NAPTAR / CONGRESS CALENDAR 96**



## Kedves Kollégák!

Nagy szeretettel várjuk Önöket a Magyar Immunológiai Társaság 43. Vándorgyűlésére, amit Velencén (Hotel Velence Resort & Spa) rendezünk 2014. október 15–17. között.

Az idei konferencia fő témája, korunk kiemelkedő immunológiai sikere, a „Terápiás ellenanyagok fejlesztése és alkalmazása”, így az első nap nemzetközi szekcióit e téma köré szervezzük, angol nyelvű előadásokkal. A következő két napon a hazai immunológiai műhelyek mutatják be legfrissebb eredményeiket; idén elsősorban a fiatal kollégák előadásaira számítunk.

Bízunk benne, hogy idei Vándorgyűlésünk – a hagyományokhoz híven – a tartalmas szakmai programokon túl kellemes kikapcsolódást is kínál, amelynek keretében kötetlen formában is lehetőség lesz az ismeretek kicserélésére, személyes kapcsolatok fejlesztésére.

Mindenkit szeretettel várunk Velencén!

Baráti üdvözléssel:

Kacs Kovics Imre  
a MIT elnöke

Berki Tímea  
a MIT főtitkára

## Tisztelt Kolléganők és Kollégák, kedves Olvasóink!



Lapunk a Magyar Immunológiai Társaság 43. kongresszusához kapcsolódóan jelenik meg. A fentiekben olvashatták a társaság elnökének és főtitkárának kedves üdvözlő szavait. Ebben a lapszámban, hagyományainkhoz híven, közöljük a kongresszus előadásainak és posztereinek összefoglalóit.

Lapszámunk azonban nem lenne teljes, ha a kivonatok mel-

lett nem közölnénk összefoglaló és eredeti közleményeket is. Éppen főtitkár asszony, Berki Tímea professzornő és munkatársai, Prenek Lilla első szerzőségével (Pécs) a glukokortikoidok T-sejtekre gyakorolt hatásait foglalják össze. Hasábjainkon keveset szóltunk a ritka, örökletes kötőszöveti megbetegedésekről. Ezért tekinthető hiánypótlónak Brúgós Boglárka és a debreceni Ritka Betegségek Tanszék munkatársainak Marfan-szindrómáról szóló összefoglalója. Ki gondolta volna, hogy az epesavak bármilyen immunológiai folyamatba beavatkoznak? Nos, gondoljuk újra, hiszen Sipka Sándor professzor (Debrecen) ezzel az új területtel ismertet meg bennünket.

Lapunk mindig teret ad az új gyógyszeres terápiás próbálkozásoknak. Szántó Sándor és egy kollaboratív hazai munkacsoport (Debrecen, Budapest) a rheumatoid arthritisben korábban már elterjedt célértékre törekvő kezelési stratégiát mutatja be, amit ezúttal a közelmúltban spondylarthritisben is definiáltak. És bár a methotrexat klasszikus, régen alkalmazott gyógyszernek tekinthető, mégis újabb és újabb adatok jelennek meg az alkalmazás módjairól, a szedés monitorozásáról, más szerekkel való kombinálhatóságról. Ezzel a témával két, egymáshoz kapcsolódó közleményünk is foglalkozik (Szekanecz Zoltán, Debrecen és Hodinka László, Budapest).

Az Immunológiai Szemle közkedvelt és mindig színes, tartalmas fejezete a Kultúrkör rovat, amelyben ezúttal Krutsay Miklós (Ajka) nyújt történelmi betekintést V. Károly császár „hétköznapijaiba”. Végül, munkatársaimmal megpróbáltuk összegezni a legutóbbi párizsi EULAR kongresszus főbb üzeneteit.

Mindenkinek tartalmas kongresszust és a szünetekben jó olvasást kívánok!

Dr. Szekanecz Zoltán  
főszerkesztő

# A Magyar Immunológiai Társaság 43. Vándorgyűlésének összefoglalói

## INVITED LECTURES

### HISTORY OF THE CONCEPT, THE DISCOVERY, THE INVENTION AND THE TRANSLATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES

FRITZ MELCHERS (EFIS Lecture Award)

### THE USE OF TRANSGENIC ANIMALS THAT OVEREXPRESS THE NEONATAL Fc RECEPTOR (FcRn) IN THE GENERATION OF THERAPEUTIC, DIAGNOSTIC AND RESEARCH ANTIBODIES

IMRE KACSKOVICS

Department of Immunology, Eötvös Loránd University, Budapest, Hungary and ImmunoGenes Kft., Budakeszi, Hungary

We previously reported that FcRn overexpression as a result of transgenic (Tg) modification in mice and rabbits results in quantitative and qualitative augmentation of the humoral immune response. More specifically, FcRn overexpression increases the number of antigen (Ag)-specific B cells, the diversity of the humoral immune response and results in effective antibody production even against weakly immunogenic epitopes. Among the mechanisms that contribute to the boosted immune response, the most important appears to be the enhanced Ag presentation in professional Ag presenting cells such as dendritic cells that overexpress FcRn. To demonstrate the value of this technology, we have recently developed unique monoclonal antibodies against G-protein coupled receptors (GPCR), ion channels and bacterial toxins. We also showed that our FcRn Tg rabbits produce much more (4x) anti-thymocyte globulin (rATG) as compared to their wild-type controls, and we believe that the many more Ag-specific B cells we found in these Tg rabbits, similarly to our Tg mice, is exciting from the point of generating rabbit monoclonal antibodies. The use of these animals in the generation of therapeutic, diagnostic and research antibodies will be presented.

Supported by grant K101364 from the Hungarian Scientific Research Fund.

### MONOCLONAL ANTIBODY PROTEOMICS: DEVELOPMENT OF CANCER AND METABOLIC DISEASE DIAGNOSTICS VIA PROFILING THE EPITOME OF MAJOR PLASMA PROTEINS

LÁSZLÓ TAKÁCS

Biosystems International Kft. and the University of Debrecen

Recent1 and past2 publications comparing gene expression QTL-s (eQTL) with different forms of protein QTL-s (pQTL) in systems approach concluded that expression profiles of single genes do not correlate with that of the gene product, moreover a significant number of pQTL-s did not have corresponding eQTLs1. This latter observation was suggested to be the result of protein variation due to PTMs. It was also suggested that complex traits may result in complex phenotypes detectable at the proteome level exclusively.

Epitope complexity is the result of genetic code dependent and independent proteome variability, both of which change in disease. To address this yet unexplored space for diagnostics R&D we present an epitope specific non-redundant mAb library (QuantiPlasma™) running on suitable antibody biochip platform, such as the Randox Evidence Investigator. Monoclonal antibodies in the QuantiPlasma™ library recognize 1–15 natural epitopes per major and medium abundant protein species of the human plasma proteome (total ≈ 350 independent epitopes). We present results of human plasma proteome profiling experiments from observational and in some cases independent validation studies which indicate an unprecedented >95% accuracy (AUC in ROC analysis) for the detection of cancers (lung, breast, colon, prostate and ovary) and specific forms of diabetes. The results outperform current single or multiplexed biomarkers. Application of the technology for therapeutic mAb development will be discussed.

[1] Nature. 2014 Feb 27;506(7489):494-7. [2] Science. 2001 May 4;292(5518):929-34.

## A LABORATORY TECHNIQUE WHICH OVERRODE THE BIOLOGICAL AND MEDICAL SCIENCES AND PRACTICE: STORY OF THE MONOCLONAL ANTIBODY DEVELOPMENT

PÉTER NÉMETH

University of Pécs, Clinical Centre, Department of Immunology and Biotechnology

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1984 was awarded jointly to Niels K. Jerne, Georges J.F. Köhler and César Milstein "for theories concerning the specificity in development and control of the immune system and the discovery of the principle for production of monoclonal antibodies". The discovery of monoclonal antibodies revolutionized both theoretical biology and the practical medical applications during the last decades; however, the historical roots are much longer in time.

Fusion of somatic cells described first by Johannes Müller biologist in the middle of the XIXth century. Virchow and Langerhans published cell fusions in pathologic tissue samples, and Ringertz (1876) described the giant cell formations caused by somatic cell fusions under different pathologic conditions (inflammation, virus infections, and malignant tumours). Lewis (1927) discovered spontaneous cell fusions in in vitro cultured tumour cell lines. Barski, Sorieul and Confert (1960, 1961) produced the first in vitro induced somatic cell fusions. Okada (1972) developed the technique of UV inactivated Sendai virus induction for somatic cell hybridisation. Method for selection of cell hybrids by the use of enzyme deficient mutant cell lines as fusion partners originated from Littlefield (1964, 1966). Two research groups as Harris and Watkins (1965, 1969) and Okada and Murayama produced the first interspecies hybrids. Harris and Klein (1969) studied the hybrids originated from fusion of normal and tumour cells. Köhler and Milstein (1975) used the method of somatic cell fusion during the studying of mouse light chains. Classical technique of monoclonal antibody production by somatic cell hybridisation is the result of these preliminary discoveries.

Hungarian researchers joined in time to the monoclonal antibody developments: four groups – by the support of the National Committee for Technical Development – started the work in early 80's. The lecture introduces the domestic results.

## TREATMENT OF SYSTEMIC AUTOIMMUNE DISORDERS WITH MONOCLONAL ANTIBODIES

MARGIT ZEHER

Department of Clinical Immunology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Debrecen

Systemic autoimmune diseases (SAD) such as rheumatoid arthritis (RA), systemic lupus erythematosus (SLE), Sjögren's syndrome (Ss) etc. are severe and chronic diseases that affect a significant proportion of the population, and lead to deterioration in quality of life and sometimes even death. Until the end of 20th century, the therapy of SAD relied on the use of drugs that had been developed through empirical approaches only, without detailed understanding of the molecular mechanisms involved in the pathogenesis. The first targeted therapeutics in autoimmune diseases were antibodies and related molecules interfering with the function of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), a major cytokine involved in various aspects of the autoimmune processes.

TNF inhibitors (TNFi) including adalimumab, infliximab, golimumab, certolizumab pegol and etanercept as well as the humanized anti-human IL-6 receptor antibody, tocilizumab have demonstrated outstanding clinical efficacy and tolerable safety profile in the treatment of moderate and severe RA.

Each TNFi can induce lupus or lupus-like syndrome, but it is a rare adverse drug reaction with an estimated incidence of <0.2%. Neurological adverse events have been also reported, and data suggest a potential role of TNFi in the induction of neurological diseases, especially demyelination of central nervous system, as well as the peripheral nervous system involvement.

BAFF and APRIL are TNF-like cytokines that support survival and differentiation of B-cells.

The early appreciation that over-expression of BAFF leads to B-cell expansion and a lupus like syndrome in mice, and the demonstration that BAFF inhibition delays lupus onset in spontaneous mouse models of SLE and other autoimmune diseases has rapidly led to the development of strategies for inhibiting both BAFF and APRIL. The commercialisation of this new class of drugs has proceeded in parallel with the continuing elucidation of the biology of the cytokines and their receptors. Clinical studies of an anti-BAFF antibody have yielded positive results in SLE and alternate inhibitors are being tested in a variety of autoimmune diseases in which BAFF may play a pathogenic role. The initial advance with TNFi biologic therapeutics opened new avenues for targeting other proinflammatory targets. Rituximab is a chimeric antibody targeting the CD20 receptor and leading to B-cell depletion, abatacept is a T-cell-blocking Fc-fusion protein of the extracellular domain of CTLA-4, and anakinra is an IL-1

receptor blocking antagonist blocking the IL-1 receptor pathway. Biologic therapies target molecules involved in the mechanism of the immune system, such as cytokines (TNF-alpha, IL-6), immune cells (B cells) or co-stimulatory molecules (CTLA-4), and are currently used in several autoimmune diseases. These drugs provide an alternative to the existing treatment methods of disease modifying anti-rheumatic drugs and other immunosuppressive medications.

#### IMMUNOGENICITY OF MONOCLONAL ANTIBODIES IN RHEUMATOLOGY

EMESE KISS<sup>1,2</sup>

National Institute of Rheumatology and Physiotherapy<sup>1</sup>,  
Rheumatology Division of 3rd Dept. of Medicine,  
Semmelweis University<sup>2</sup>, Budapest, HUNGARY

Biotechnological products – monoclonal antibodies and fusion proteins – have revolutionized the outcome in inflammatory rheumatic diseases. Immunogenicity can be described as the ability of a particular substance to induce a specific immune response. Any foreign protein, including therapeutic ones, introduced into the body has the potential to trigger the production of antibodies. Such anti-drug antibodies (ADABs) can alter the safety of the drug e.g. by acute hypersensitivity reactions. Furthermore, ADABs may induce loss of efficacy (secondary response failure) due to blocking the active ligand-binding site of the drug (neutralizing antibodies) or modifying bioavailability, pharmacokinetics, pharmacodynamics by preventing the drug entry to the bloodstream or enhancing its clearance by immune complex formation. Immunogenicity of biological therapies depends on many factors, including a) product specific ones – their structure or purification – , b) disease (Rheumatoid factor positivity, drug in the blood) and patient specific ones, and c) treatment specific factors – such as route of administration (i.v., s.c.) and concomitant medication (especially combination a biological therapy with conventional immune suppressives, e.g. methotrexate may prevent the formation of ADABs). ADAB production is a major problem, raising the need of validated methods (e.g. RIA, various ELISA methods) for the determination of drug concentration and anti-drug antibody level. All of such methods have pre-analytical and methodologic limitations. Adequate detection of anti-drug antibodies and measures of drug concentrations may help to differentiate primary and secondary treatment failure, therefore it has therapeutic consequences. There are useful algorithms for therapeutic decisions whether dose escalation, switch to another TNF alpha inhibitor or treatment change to another drug with different mechanism of action is required to reach therapeutic target.

#### IMMUNE CHECKPOINT BLOCKADE IN CANCER: INHIBITING CTLA-4 AND PD-1/PD-L1 WITH MONOCLONAL ANTIBODIES

LAJOS KEMÉNY

Department of Dermatology and Allergology,  
University of Szeged, Hungary

Escape from immune surveillance is a recognized feature of cancer; therefore, the development of therapies to enhance tumor immunity is a rational treatment strategy. Recently, immune checkpoint blockade with monoclonal antibodies directed against the inhibitory immune receptors CTLA-4, PD-1, and PD-L1 has proven a successful treatment approach for patients with advanced melanoma but also in other types of cancer. Ipilimumab, a human monoclonal antibody blocking CTLA-4 was the first drug ever to show improved overall survival of patients with advanced melanoma in clinical trials. Blocking PD-1 receptor by Nivolumab or Pembrolizumab produced durable objective responses in patients with melanoma, renal-cell cancer and non-small-cell lung cancer. CTLA-4 and PD-1 appear to play complementary roles in regulating adaptive immunity. Whereas CTLA-4 inhibits at earlier points in T-cell activation, PD-1 contributes to T-cell exhaustion in peripheral tissues. Many tumor responses achieved with PD-1 and PD-L1 inhibition were durable in clinical trials. Because of the successes with immune checkpoint inhibitors in cancer immunotherapy, many new agents and strategies are now in the development with the hope of a possible cure for some patients.

#### IMMUNOTHERAPY OF CANCER USING ANTIBODIES: RECONFIGURATION OF OUR UNDERSTANDING

JÓZSEF TÍMÁR

2nd Department of Pathology, Semmelweis University,  
Budapest

Understanding of the interaction of cancer with the host and its immune defense significantly improved in the past decade. It is clear that various cancer types may respond to immune challenges with three prototypes: sensitivity, tolerance and resistance. We are able to describe relatively precisely the actual state of the interaction by identification of the host immune cells in the cancer microenvironment which lead to various immunoscores in different cancer types which are powerful prognosticators of the potential outcome of the disease. It became more and more clear that cancer(s) is actively manipulating the developing immune responses at immune checkpoint resulting in attenuated or even suspended effector attacks. Probably that is why immune stimu-

latory approaches (potentiating the positive arm of the immune response) or cell therapies proved to be inactive in most clinical settings. In the past few years, however, alternative approaches became surprisingly successful in clinical settings especially in melanoma, but also in lung cancer. These strategies are targeting the CTL4-costimulatory molecule interactions by using antibodies targeting either the receptor or the ligand. First generation immunotherapies are characterised by severe side effects due to the unoptimal selection of the IgG subtype which problem seems to be less problematic in case of the second generation antibodies. However, the major problem still is to more precisely target these therapies, to find appropriate biomarkers and to develop helpful companion diagnostics to these therapies.

#### CHALLENGES OF THE BIOSIMILAR MONOCLONAL ANTIBODY DEVELOPMENT

ZOLTÁN URBÁNYI

G. Richter Plc.

Since 1997, when Rituxan (Rituximab) was approved by the FDA, the role of therapeutic monoclonal antibodies is highly increasing. In 2012, 7 of the 10 best selling drugs are proteins and 6 of them are monoclonal antibodies. The global sales of the leading drug Humira was over 9 billion USD in 2012.

In the present decade, patents of the first therapeutic monoclonal antibodies expire (Infliximab: US 2013, EU 2014; Rituximab US, 2015). This initiated the development of biosimilar monoclonal antibodies by different pharmaceutical

companies in Europe, in the US and also in Asia. The first biosimilar monoclonal antibody was approved by the European Medicine Agency for Hospira and Egis in collaboration with Celltrion (Korea) in 2013.

Due to the complexity biotechnology-derived drug substances the identical structure with the originator product cannot be achieved or verified. For this reason these products termed as 'biosimilar' instead of 'generic' which is used in the small molecular field.

The most important aspects of biosimilar development are product yield and quality. However, the final criteria for biosimilarity are comparable efficacy and safety to that of the original product. Similarity should also be verified by a battery of in vitro biological assays and physico-chemical analysis before clinical studies and for the approval, as well.

To fulfil the criteria of similarity, challenges start at the beginning of the development and finish only at marketing authorization. The cloning and clone selection is the first step toward the production of the protein with good quality and the required quantity. This first step highly determines the final outcome of the whole process development, all of the process parameters of upstream and downstream should be optimized keeping these quality properties of the protein in view.

Lots of structural parameters influence the biological activity of monoclonal antibodies, including primary amino acid sequence, higher order structures, aggregation and post-translational modifications. Glycosylation has particular importance since the glycostructure highly influences efficacy, terminal galactosylation has impact on the complement-dependent cytotoxicity, core fucosylation affect the antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity.

## ORAL PRESENTATIONS AND POSTERS

#### IDENTIFICATION OF NOVEL CANCER BIOMARKERS BY THE BIOSYSTEMS-RANDOX-QUANTIPLASMA-300 MONOCLONAL ANTIBODY CHIP

ANTAL-SZALMÁS PÉTER<sup>1</sup>, JÓZSEF LÁZÁR<sup>2</sup>, ZOLTÁN STEIBER<sup>1</sup>, RÓZA FÖLDESI<sup>1</sup>, STUART MCGREGOR<sup>3</sup>, MÁRIA SZILASI<sup>4</sup>, TIBOR FLASKÓ<sup>5</sup>, LÁSZLÓ DAMJANOVICH<sup>6</sup>, RÓBERT PÓKA<sup>7</sup>, ZOLTÁN HERNÁDI<sup>7</sup>, JÁNOS SZÁNTÓ<sup>8</sup>, MÓNIKA MÜLLER<sup>9</sup>, JOHN LAMONT<sup>3</sup>, ISTVÁN KURUCZ<sup>2</sup>, JÁNOS KAPPELMAYER<sup>1</sup>, LÁSZLÓ TAKÁCS<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Laboratory Medicine, University of Debrecen, Hungary

<sup>2</sup>Biosystems International Ltd., Debrecen, Hungary

<sup>3</sup>Radox Laboratories Ltd., Crumlin, United Kingdom, <sup>9</sup>Adware Research Ltd., Balatonfüred, Hungary

<sup>4</sup>Dept. of Pulmonology, University of Debrecen, Hungary

<sup>5</sup>Dept. of Urology, University of Debrecen, Hungary

<sup>6</sup>Dept. of Surgery, University of Debrecen, Hungary

<sup>7</sup>Dept. of Obstetrics and Gynecology, University of Debrecen, Hungary

<sup>8</sup>Dept. of Oncology, University of Debrecen, Hungary

**Background:** Recently a novel monoclonal antibody based protein chip – QuantiPlasma300 (QP300) – has been introduced by Radox Laboratories. This system uses 290 monoclonal antibodies (mAbs), the QP300 mAb library – developed by BioSystems International – that are immobilized onto 9x9 mm ceramic chips. The QP300 assay recognizes representational changes of several human plasma protein epitopes simultaneously and in this way can identify potential novel plasma markers in a wide variety of diseases.

**Materials and methods:** Plasma samples and detailed clinical data of 150 patients with prostate, 100 patients with colon, 100 patients with breast and 150 patients with lung cancer and 300 healthy controls were collected. Individual (lung cancer) and pooled samples (other tumors) of patients and controls were evaluated by the QP300 system. The plasma pools were created from the individual samples based on clinical, histopathological and laboratory data. Other biochemical parameters and the classical tumormarkers were also measured. To find the most valuable predictive parameters random forest, binary logistic regression and ROC analyses were performed beside the classical statistics.

**Results:** In case of lung cancer results of 4 mAbs could be incorporated into the final model providing a new parameter with ROC-AUC>0.940, while adding Cyfra 21-1 further increased its power. Measuring pooled samples of other cancer patients 8 to 10 mAbs could effectively discriminate the patients from controls.

**Conclusions:** The QP300 kit can be an effective tool in biomarkers' search and discovery.

This work was supported by the National Office for Research and Technology of Hungary (TECH-09-A1-2009-0113; mAB-CHIC).

#### SILENCING PROGESTERONE-INDUCED BLOCKING FACTOR (PIBF) IN PRIMARY MOUSE EMBRYO CELLS

BALASSA TÍMEA<sup>1, 2, 3</sup>, SZEKERES-BARTHÓ JÚLIA<sup>1, 2, 3</sup>

<sup>1</sup>Department of Medical Microbiology and Immunology, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary

<sup>2</sup>János Szentágothai Research Center, Pécs, Hungary

<sup>3</sup>Hungarian Academy of Sciences – University of Pécs, Human Reproductive Research Group, Pécs, Hungary

**Introduction:** The immunomodulatory effects of progesterone are mediated by a protein named Progesterone-Induced Blocking Factor (PIBF). During pregnancy a 34 kDa PIBF isoform is secreted by the placenta, decidua and activated maternal lymphocytes and supports local immune-tolerance by inhibiting the activity of natural killer cells, inducing Th1 to Th2 type cytokine shift as well as asymmetric antibody production and thereby exerting an anti-abortive effect in mice. The full-length (90 kDa) PIBF isoform is associated with the centrosome and regulates spindle pole integrity in mitotic cells. PIBF1 gene in mice map on chromosome14, it contains 23 different introns and transcription produces 16 different messenger RNAs. Previously we established that PIBF is expressed by the oocyte as well as by pre-implantation embryo and we plan to examine the role of embryonic PIBF in implantation by implanting PIBF-deficient embryos. The present study aims to identify PIBF in embryonic cells

and to select the siRNA and determine the concentration that most efficiently depletes PIBF from embryonic cells.

**Methods:** Since mouse embryos are available in limited amount and their protein contents is very low we created primary cell culture from 13 days old whole CD-1 mouse embryos for setting the most effective gene silencing protocol. We examined the expression of PIBF in the cultured cells by immunohistochemistry, using polyclonal anti-PIBF antibody. The embryonic cells were treated by small interfering RNAs targeted to different regions of PIBF. The efficiency of silencing was investigated by densitometric analysis following western blot technique.

**Results:** PIBF was detectable in primary mouse embryo cell culture and we were able to reduce its expression with siRNA technology. Four different siRNAs were tested with diverse sequence targets on PIBF mRNA. Treatments were performed in several concentrations using one siRNA at a time and combined them to select the most efficiently functioning siRNA which will be used to silence successfully the PIBF expression in pre-implantation embryo.

**Conclusion:** Our results indicate that – in addition to pregnancy associated tissues and maternal lymphocytes – the embryo can also produce PIBF, which might regulate local maternal anti-fetal immune response during implantation. After selecting the siRNA which reduces the expression of PIBF protein most efficiently we will examine its significance in implantation and early embryo development.

**Funding:** This work was supported by Social Renewal Operational Programme (TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0053 and TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001) and Hungarian Academy of Sciences.

#### ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A MURINE SPONTANEOUS DLBCL LYMPHOMA WITH RESTRICTED IN VIVO SPREADING – A MODEL FOR VISCERAL LYMPHATIC METASTASIS?

BALOGH PÉTER

Department of Immunology and Biotechnology, University of Pécs

**Introduction:** Spontaneous or induced malignant lymphomas in mice are valuable tools for studying both physiological lymphoid development and the microenvironmental factors influencing the survival and spreading of tumor cells, including migration between peripheral lymphoid organs and subsequent positioning in distinct tissue compartments. In this presentation the isolation, phenotypic and genetic characterization and *in vivo* propagation of a novel BALB/c-derived B-cell lymphoma with the cytological characteristics of high-grade diffuse large B-cell lymphoma (Bc-DLBCL.1)



showing restricted tissue distribution and metastasis formation will be reported.

**Results:** The original tumor was identified in an aged BALB/c mouse as an incidental finding presenting as a soft tissue mass engulfing the mesenterium and the mesenteric lymph nodes (mLN). Subsequent intraperitoneal injection into both syngeneic BALB/c and allogeneic RAG-1-deficient hosts led to the successful propagation of tumor, with extensive splenomegaly and enlarged mLN in tumor-bearing recipients. Bc-DLBCL.1 cells express CD19, B220, MHC II, surface IgG2a/kappa chain as well as dual rearrangement of VhQ52 and Vh7183 regions of the IgH gene consistent with the B-cell origin of lymphoma, possibly of post-germinal center (GC) stage. Despite its aggressive high-grade features, Bc-DLBCL.1 lymphoma cells did not expand into extraabdominal locations upon intraperitoneal passage, and only exceptionally produced hepatic metastasis. In addition, attempts to establish *in vitro* adopted sublines were unsuccessful, indicating dependence for *in vivo* tissue microenvironment. In mLN the high endothelial venules (HEVs) contained only few tumor cells (corresponding to low-level expression of L-selectin), while the LYVE-1-positive lymphatic vessels were almost completely filled with lymphoma cells. Preferential association of Bc-DLBCL.1 cells with lymphatics was further indicated by the mesenteric tumor expansion where in the peritoneal sheath the tumor cells in perivascular cuffs were intermingled with LYVE-1-positive cysts containing lymphoma cells.

**Conclusion:** Based upon these findings, Bc-DLBCL.1 lymphoma cells likely propagate in mLN primarily via the lymphatic circulation, therefore this tumor may serve as a model to investigate the physiological as well as pathological aspects of cell migration via the lymphatic circulation from the peritoneal cavity.

Supported by OTKA K108429

#### REGULATORY B CELLS IN HEALTHY VOLUNTEERS AND IN RHEUMATOID ARTHRITIS PATIENTS

BANKÓ ZSUZSANNA<sup>1</sup>, JUDIT POZSGAY<sup>1</sup>, GYÖRGY NAGY<sup>2</sup>, TAMÁS GÁTI<sup>2</sup>, BERNADETTE ROJKOVICH<sup>2</sup> AND GABRIELLA SÁRMAY<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Immunology, Eötvös Loránd University, Budapest

<sup>2</sup>Buda Hospital of Hospitaller Brothers of St. John, Budapest

**Background:** In the past few years a novel subset of B cells was discovered that downregulate the immune response. The pleiotropic cytokine, IL-10 seemed to be responsible for this function. B cells with the immunosuppressive capacity were named regulatory B cells (Breg). Breg cells suppress CD4<sup>+</sup> T cell proliferation as well as inflammatory cytokine

synthesis (INF $\gamma$  and TNF) by T cells, inhibit antigen presentation and pro-inflammatory cytokine production of dendritic cells and macrophages, furthermore, enhances regulatory T cell proliferation. Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic autoimmune disease that can cause joint inflammation and tissue destruction. Both B and T cells play an important role in the development of the disease. In the absence of Breg cells disease symptoms exacerbates in collagen-induced arthritis, the animal model of rheumatoid arthritis.

Therefore, this study was undertaken to investigate differences between IL-10 producing capacity of B cells from RA patients and healthy controls without and with stimulation. Our aim was to identify the optimal stimuli (BCR, CpG, CD40L) to induce Breg cells' IL-10 production. We also aimed to examine, which other inflammatory cytokines (IL-6, TNF) are produced by B cells beside IL-10.

**Materials and methods:** Samples were collected from healthy donors and RA patients in heparinized blood collection tube. Intracellular IL-6, IL-10 and TNF were measured in purified B cells and in PBMC. Cytokines were detected in B cells prior or after stimulation by intracellular fluorescent staining using specific antibodies.

**Results:** In our experimental conditions, CpG and CD40L dual stimulation for 48h was found to be optimal for IL-10 induction in B cells. The main source of IL-10 was a subset of the memory B cell population (CD19<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup>) in the unstimulated samples, but also some naive B cells produced IL-10 after stimulation. Besides IL-10, other inflammatory cytokines (IL-6, TNF) were also detected. We have shown that less B cells from RA patients produced IL-10 compared with the healthy controls after stimulation.

**Conclusion:** We detected differences in the suppressive cytokine, IL-10 producing Breg cells of RA patients and healthy controls. The lower capability of activation-induced IL-10 production by Breg cells in RA patients may promote disease exacerbation.

Support: OTKA NK 104846

#### THE DISTINCT REGULATION OF INTERLEUKIN-17 AND INTERLEUKIN-22 PRODUCTION DURING HUMAN TH17 CELL DIFFERENTIATION

BARICZA ESZTER<sup>1</sup>, BARBARA MOLNÁR-ÉRSEK<sup>1</sup>, ESZTER LAJKÓ<sup>1</sup>, LÁSZLÓ KÓHIDAI<sup>1</sup>, EDIT BUZÁS<sup>1</sup>, GYÖRGY NAGY<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Genetics-, Cell- and Immunobiology Semmelweis University, Budapest

<sup>2</sup>Department of Rheumatology, Semmelweis University, Budapest

**Introduction:** The Th17 cells are a subpopulation of T helper

lymphocytes which produce several inflammatory cytokines, such as interleukin (IL)-17A, -17F, -21, -22, and tumor necrosis factor- $\alpha$ . The Th17 cells play an important role in the development of inflammation via their cytokine production as it was described in many autoimmune diseases. We studied the human in vitro Th17 cell differentiation during our work.

**Methods:** CD4 positive T cells were negatively separated by magnetic method from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of healthy volunteers. The cells were treated for 5-10 days with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies and with TGF $\beta$  (2.5ng/ml), IL-6 (25ng/ml) and IL-1 (10ng/ml) cytokines, furthermore with anti-IL-4 (10 $\mu$ g/ml) and anti-IFN $\gamma$  (10 $\mu$ g/ml) blocking antibodies. The IL-17 and IL-22 production were measured by ELISPOT and ELISA, the ROR $\gamma$ t expression was measured by real-time PCR and by Western blot methods. Viability of the cells was monitored by the impedance based CASY TT system and by the flow cytometric measurement of Annexin V binding.

**Results:** Anti-CD3/CD28 treatment increased the IL-17 production, but did not alter the ROR $\gamma$ t expression. The anti-IL-4 and anti-IFN $\gamma$  antibody treatment significantly increased the anti-CD3/CD28, TGF $\beta$ , IL-6, and IL-1 induced ROR $\gamma$ t expression. The IL-17 production was similar in the fifth and tenth day of the treatments by contrast the IL-22 production was greatly reduced by TGF $\beta$ , IL-6, IL-1, cytokines, anti-IL-4 and anti-IFN $\gamma$  blocking antibodies. The applied treatments did not change the viability of the cells.

**Implications:** Our results suggest that IL-17 and IL-22 production are regulated in different ways during CD4 T cell activation and Th17 differentiation.

#### TLR3 ACTIVATION OF KERATINOCYTES INDUCES SKIN BARRIER REPAIRMENT IN ATOPIC DERMATITIS PATIENTS

BÉKE GABRIELLA<sup>1,2</sup>, MÓCSAI GÁBOR<sup>1,2</sup>, GÁSPÁR KRISZTIÁN<sup>1,2</sup>, LISZTES ERIKA<sup>3</sup>, BÍRÓ TAMÁS<sup>3</sup>, SZEGEDI ANDREA<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Division of Dermatological Allergology

<sup>2</sup>Department of Dermatology,

<sup>3</sup>DE-MTA „Lendület” Cellular Physiology Research Group, Department of Physiology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Hungary

**Introduction:** Atopic dermatitis (AD) is a common immune-mediated chronic skin disease. Alteration of the lipid composition (abnormal ceramide profiles and lamellar lipid organization), as well as the decreased expression of the tight junction and cell structure proteins (claudin-1, filaggrin) are well-known. Since previous studies suggested that the stimulation of keratinocytes via the TLR3 pathway may improve the skin barrier repair, our aim was to investigate the impact

of TLR3 activation of keratinocytes from AD patients regarding the expression of genes involved in lipid and in tight junction composition.

**Methods:** Outer root sheath keratinocytes from healthy controls and AD patients were cultured in our study, and 1 $\mu$ g/ml Poly(I:C) was used to activate the TLR3 pathway in the keratinocytes. After the first passage we used qPCR to measure the gene expression levels.

**Results:** In our results, the basic expression of genes involved in lipid composition (SMPD1, ABCA12 and GBA) and in the formation of skin barrier (CLDN1, IL-22R) was significantly altered in AD patients compared to healthy controls. However, 24 hours long exposition of Poly(I:C) significantly elevated the expression of the above mentioned genes.

**Conclusion:** Summarizing our results, patients suffering from AD have mRNA-level alterations in lipid composition as well as in tight junction formation, although this downregulation of the genes can be normalized with the activation of TLR3 pathway. Our data are the first findings, which may indicate a beneficial role of TLR3-based treatments in AD patients to repair the skin barrier.

#### FUNCTIONAL DIFFERENCES IN NLRP3 INFLAMMASOME ACTIVATION IN LPS-ACTIVATED HUMAN MONOCYTE-DERIVED MACROPHAGE POPULATIONS

BUDAI MARIETTA MARGIT<sup>1</sup>, BECSEI ÁGNES<sup>1</sup>, JÁMBOR ILONA<sup>1</sup>, GERGŐ KOVÁCS<sup>1</sup>, VARGA ALIZ<sup>1</sup>, TÖZSÉR JÓZSEF<sup>2</sup>, BENKŐ SZILVIA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Physiology

<sup>2</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Debrecen

**Introduction:** IL-1 $\beta$  pro-inflammatory cytokine has indispensable role in orchestrating innate and adaptive immune responses via regulating processes like T cell polarization, cell death, tissue repair and inflammation. One of the main sources of IL-1 $\beta$  production is the activated macrophages (MFs). Depending on the tissue environment MFs differentiate to morphologically and functionally different populations. We aimed to investigate the molecular mechanisms of Nlrp3 inflammasome activation and subsequent IL-1 $\beta$  secretion of different human macrophages in response to LPS and ATP stimulation.

**Methods:** Macrophages were generated from human peripheral blood in the presence of granulocyte-macrophage colony stimulating factor or macrophage colony stimulating factor which mimic immuno-stimulatory (GM-MF) or tissue repair (M-MF) functions, respectively. M-MFs and GM-MFs were stimulated with ultrapure LPS in the presence or absence of ATP. Cytokine production was measured by ELISA, expression of inflammasome components and induction of

signaling pathways were measured by Western blot, enzyme activity was measured using fluorescent substrates, ATP production was measured with luminescent method.

**Results:** Our results show that though both types of LPS-activated MFs secrete IL-1 $\beta$ , in the case of M-MFs IL-1 $\beta$  is released rapidly and only for a short time period, while IL-1 $\beta$  secretion by GM-MFs is sustained. We found striking differences in Nlrp3 and caspase-1 expression, also in caspase-1 activation. We measured substantial differences in the activation of signaling pathways, as well as in the effect of IL-10 neutralizing antibody, and in the expression of IL-1Ra and that of the ecto-ATPases on Nlrp3 inflammasome activation.

**Conclusion:** Due to intensive studies, the general mechanism of Nlrp3 inflammasome activation is well characterized, nevertheless our results demonstrate that the actual inflammasome activation and IL-1 $\beta$  secretion is substantially determined by the molecular characteristics of a given cell.

Financial support: OTKA K-109429, TÁMOP-4.2.2.A-1/1/KONV-2012-0023. Sz.B. is a receiver of Lajos Szodoray Post.Doc. Fellowship and János Bolyai Post.Doc. Fellowship.

#### STUDIES ON THE EFFECT OF PROPIONIBACTERIUM ACNES ON THE BARRIER PROPERTIES OF HUMAN IN VITRO CULTURED KERATINOCYTES

BOLLA BEÁTA SZILVIA<sup>1</sup>, GÁBOR TAX<sup>1</sup>, LILLA ERDEI<sup>1</sup>, EDIT URBÁN<sup>2</sup>, LAJOS KEMÉNY<sup>1,3</sup>, KORNÉLIA SZABÓ<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Dermatology and Allergology, University of Szeged, Hungary

<sup>2</sup>Institute of Clinical Microbiology, University of Szeged, Hungary

<sup>3</sup>MTA-SZTE Dermatological Research Group, Szeged, Hungary

The human skin is heavily colonized by a specialized microbial community called the microbiome, which plays a complex role in the protection from the attack of external pathogens. This microbial flora can interact with the cells in the healthy skin and play a role in the maintenance of skin homeostasis, but also known to contribute to the pathogenesis of different diseases.

Our aim was to analyze whether the *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) bacterium, a member of the skin microbiome, or the bacterium induced pro-inflammatory mediator, TNF $\alpha$  has any effect on the barrier properties of our epidermis.

For that, a confluent monolayer of in vitro cultured human immortalized keratinocytes (HPV-KER cells) were treated with different *P. acnes* strains and external TNF $\alpha$  in different doses, and changes in the barrier properties were analyzed in real time using the xCELLigence system. We also analyzed the effect of the bacterium on the mRNA expression changes of tight junction proteins claudin 1, 2, 4 (CLDN1,

2, 4), occludin1 (OCL1) and ZO1 in these cultures using real-time RT-PCR.

Our results suggest that the bacterium induced an elevation, followed by a drop of the measured impedance values in the keratinocyte monolayers, possibly due to dynamic alterations of the barrier properties. The extent of these changes depended on the used *P. acnes* strain and the applied doses. Addition of TNF $\alpha$  (1, 5, 10 ng/ml), a cytokine that is a known mediator of the *P. acnes*-induced innate immune and inflammatory events in keratinocytes also lead to a marked decrease of the measured impedance of the HPV-KER monolayers.

Real-time RT-PCR analysis of tight junction genes suggested that CLDN2 and 4 mRNAs were not present in these cells. However, the expression of CLDN1 decreased, whereas ZO1 and OCL1 mRNA levels increased in response to the bacterial treatment.

Our results suggest that our microbiome can modulate the barrier properties of the epidermis. It is possibly achieved, in one hand, through the direct regulation of genes playing a key role in the formation of cell-to-cell contacts. On the other hand, secreted factors, such as the TNF $\alpha$  pro-inflammatory mediator, may also have a direct effect and can loosen the epidermal barrier, possibly leading to the easier penetration of keratinocyte- as well as bacterial-derived factors to deeper tissue compartments. These findings strengthen the importance of a balanced interaction among the epidermal cells and our microbiome for the maintenance of healthy skin functions.

#### BACTERIAL SEPSIS INCREASES SURVIVAL IN METASTATIC MELANOMA: CLAMIDOPHYLA PNEUMONIAE INDUCES MACROPHAGE POLARIZATION AND TUMOR REGRESSION IN VIVO

BUZÁS KRISZTINA<sup>1,2</sup>, ANNAMÁRIA MARTON<sup>2</sup>, CSABA VIZLER<sup>2</sup>, EDINA GYUKITY-SEBESTYÉN<sup>2</sup>, MÁRIA HARMATI<sup>2</sup>, KATALIN NAGY<sup>1</sup>, ÁGNES ZVARA<sup>2</sup>, LÁSZLÓ PUSKÁS<sup>2</sup>, RÓBERT L. KATONA<sup>2</sup>, VILMOS TUBAK<sup>3</sup>, VALÉRIA ENDRÉSZ<sup>5</sup>, ISTVÁN B. NÉMETH<sup>5</sup>, JUDIT OLÁH<sup>5</sup>, LÁSZLÓ VÍGH<sup>2</sup>, TAMÁS BIRÓ<sup>5</sup>, LAJOS KEMÉNY<sup>5,7</sup>

<sup>1</sup>University of Szeged, Faculty of Dentistry

<sup>2</sup>Hungarian Academy of Sciences, Biological Research Centre

<sup>3</sup>Creative Laboratory Ltd

<sup>4</sup>Department of Medical Microbiology and Immunobiology, University of Szeged

<sup>5</sup>Department of Dermatology and Allergology, University of Szeged

<sup>6</sup>DE-MTA „Lendület” Cellular Physiology Research Group, University of Debrecen

<sup>7</sup>Dermatological Research Group of the Hungarian Academy of Sciences, University of Szeged

**Background:** It has been recognized for over 100 years that

cancer patients might recover following bacterial infections. Notoriously, William B. Coley induced erysipelas by local injection of streptococcal cultures in a patient bearing lymphoma. Surprisingly, decreased tumor volume and prompt improvement of patient's general condition were observed.

Our studies were initiated by a case of unexpected complete metastatic melanoma remission observed at our clinic in a patient who suffered sepsis syndrome during BOLD chemotherapy. After targeted antibiotic treatment and chemotherapy, the patient has become and remained completely asymptomatic and PET/CT-verified metastasis-free from 2009 to this date. The overall survival of stage IV melanoma is very poor even today. Since our patient has had 56 months disease-free survival, it seems unlikely that short-term BOLD therapy alone accounted for the complete recovery.

**Methods:** To reproduce the infection-induced tumor regression, the B16 melanoma model was employed which is characterized by reproducible lung metastasis development after i.v. tumor injection. Mice bearing B16F1 melanoma metastases were treated with heat-inactivated *Chlamydo-phila pneumoniae* (*C. pneumoniae*), an intracellular pathogen detected retrospectively in tissue sections of the patient. *C. pneumoniae* inhalation resulted in a significant immune cell infiltration involving even the lung metastases.

**Results:** The bacterial treatment significantly improved the general condition and survival of the animals. In accordance, based on histology, chemokine and cytokine profiling, we demonstrated an anti-cancer macrophage polarization. Additionally, heat inactivated *C. pneumoniae* depleted the melanoma growth factor CXCL1 both *in vivo* and *in vitro*.

**Conclusions:** We present the first evidence that *C. pneumoniae* treatment induces regression of mouse melanoma metastasis via macrophage polarization and depletion of melanoma growth factor CXCL1. Similar mechanisms may contribute to the unexpected recovery of our melanoma patient suffering from sepsis, and may play a role in analogous cases described in the literature.

#### NEONATAL FC RECEPTOR (FCRN) TRANSGENIC RABBITS SHOW IMPROVED ANTIBODY PRODUCTION AGAINST CHALLENGING ANTIGENS

CERVENAK JUDIT<sup>1</sup>, M. BARANYI<sup>1</sup>, B. BENDER<sup>1</sup>, A. ILIÁS<sup>2</sup>, Gy. BALLA<sup>3</sup>, CH. HENSTRIDGE<sup>3</sup>, E. SZABADITS<sup>3</sup>, B. DUDOK<sup>3</sup>, L. BARNA<sup>3</sup>, I. KATONA<sup>3</sup>, K. KURUCZ<sup>1</sup>, I. KACSKOVICS<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ImmunoGenes Kft., Budakeszi, Hungary

<sup>2</sup>Dep. of Immunology, Eötvös Loránd Univ. Budapest, Hungary

<sup>3</sup>Institute of Experimental Medicine, Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary

We previously reported that the genetically modified mice

that overexpress the bovine (b)FcRn have augmented humoral immune response. FcRn is known to be involved in protecting and transporting IgG within and across the cells of diverse origin, and in doing so, it regulates IgG concentration. Higher than normal expression levels of FcRn reduce exogenous IgG catabolism in these transgenic (Tg) mice. We demonstrated that beyond these effects bFcRn overexpression enhances the expansion and diversity of antigen (Ag)-specific B cells and plasma cells in Tg mice which is due to augmented antigen presentation. Furthermore, we found that our Tg mice were able to mount robust humoral immune response against weakly immunogenic antigens and to improve hybridoma production efficiency.

Since rabbit is one of the most important sources of polyclonal, and recently also monoclonal antibodies for wide range of applications, we created Tg rabbits that overexpress this receptor, and analyzed their humoral immune response. Our data showed that FcRn overexpression enhances the rabbit humoral immune response (higher Ag-specific IgG titer and more Ag-specific antibody-producer B cells) similarly to what we observed in the immunized bFcRn Tg mice. The enhanced immune response in FcRn Tg rabbits was proven by demonstrating 4-fold higher level anti-thymocyte globulin (rATG) production, a well-established therapeutic tool for preventing host rejection of transplanted organs and by several, unique rabbit antibodies against highly challenging G-protein coupled receptors (GPCRs) such as CB1, GPR12 and GPR35.

All these data demonstrate the FcRn Tg rabbits are ideal tools to generate highly sensitive and specific antibodies even in case of challenging targets.

Supported by grant KMOP-1.1.4-11/B-2011-0226 from the Hungarian National Development Agency.

#### FUNCTIONAL ANALYSIS OF THE PROTEINS ENCODED BY THE NIMROD GENE CLUSTER IN DROSOPHILA MELANOGASTER

CINEGE GYÖNGYI, JÁNOS ZSÁMBOKI, GÁBOR CSORDÁS, VIKTOR HONTI, ISTVÁN ANDÓ, ÉVA KURUCZ

Immunology Unit, Institute of Genetics, Biological Research Centre of the Hungarian Academy of Sciences, Szeged, Hungary

**Introduction:** We have previously shown that the NimC1 receptor, a member of the Nimrod protein family, is involved in the phagocytosis of bacteria. We also found, that the *Drosophila melanogaster* genome encodes eleven additional proteins which show the characteristic domain structure of NimC1, and some of them, NimA, NimB1, NimB2 and NimC1, bind bacteria. Nine of these genes are located in the close genomic proximity of the nimC1, forming a gene cluster. Its

orthologs, in the mouse Jedi/PEAR1 protein and in human the MEGF10 receptor also have closely related structural and functional features to NimC1. The arrangement of several other genes, near the *nim* genes has been conserved throughout 350 million years of the evolution. As it is suggestive that these genes have a concerted action in the homeostasis of the organism, we continued the analysis of the *nim*-cluster by analysis of the *vajk* family.

**Methods:** The proteins were expressed in a baculovirus system and antibodies were produced and used. Transgenic lines of *Drosophila* were constructed and used, in combination with biochemical and immunological analysis of the gene products.

**Results:** We found that the *vajk*-1, -2, and -3 genes are located in the large intron of the *Ance-3* gene and *vajk*-4 is situated outside of the region. The *in silico* analysis revealed that the *vajk* genes encode proteins which share similar structural properties; they contain N-terminal signal peptide, low complexity regions and at least 20% valine amino acids. Expression of *vajk*-1 is confined to cuticle-associated structures both in the embryo and the pharate adult. Expression of *vajk*-2 gene is increased after bacterial infection. The *Vajk3* protein is expressed in embryonic and larval crystal cells, which are involved in melanization reactions. The *Vajk4* protein showed an expression similar to *Vajk1*. Furthermore, silencing of the *vajk*-1 and *vajk*-2 genes resulted in wing-developmental abnormalities, possibly as a consequence of the abnormal cuticle development.

**Conclusion:** It is suggestive therefore that genes of the Nimrod cluster are involved in different facets of defense and may have a concerted action in maintaining the immune-homeostasis of the organism.

**Acknowledgement:** We thank Olga Kovalcsik, Anita Balázs, Szilvia Tápai and Anikó Képiró for technical assistance. The research was financed by the Hungarian Science Foundation, OTKA grant NK-101730, and TÁMOP 4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0035 (IA).

#### APPEARANCE OF IMPLANTATION-RELATED MAKERS IN PRE-IMPLANTATION MOUSE EMBRYOS

CSABAI TÍMEA JUDITH<sup>1,3</sup>, ZOLTÁN BOGNÁR<sup>1,3,4</sup>, BEÁTA POLGÁR<sup>1,3</sup>, ZSUZSANNA CSIZMADIA<sup>2,3</sup>, TÍMEA BALASSA<sup>1,3</sup>, JÚLIA SZEKERES-BARTHÓ<sup>1,3,4</sup>

<sup>1</sup>Department of Medical Microbiology and Immunology, University of Pécs, Clinical Centre, Hungary

<sup>2</sup>Department of Laboratory Medicine, University of Pécs, Clinical Centre, Hungary

<sup>3</sup>Janos Szentágothai Research Centre, Pécs, Hungary

<sup>4</sup>Human Reproduction Research Group, University of Pécs, Hungarian Academy of Sciences, Hungary

**Introduction:** According to previous data Insulin-like Growth

Factor 2 (IGF2), Macrophage migration Inhibitory Factor (MIF), Progesterone Induced Blocking Factor (PIBF) Tumor Necrosis Factor alpha (TNF $\alpha$ ), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Plasminogen Activator Inhibitor 1 (PAI1), Placental Growth Factor (PLGF) and Leukaemia Inhibitory Factor (LIF) play major roles in preparing the endometrium for implantation. The purpose of our study was to examine the expression of these molecules in pre-implantation mouse embryos at different stages of development.

**Methods:** 8–12 weeks old CD1 females were caged with 3–6 months old CD1 males. Sighting the vaginal plug was considered day 0.5 of pregnancy. On day 1.5 the embryos were flushed from the Fallopian tube and cultured until the blastula stage. Samples were taken at different stages of development and reacted in a droplet with antibodies specific for the molecules listed in the “Introduction”.

**Results:** All of the indicated markers are present in pre-implantation stages. VEGF staining was highly positive in the inner cell mass of the blastocyst. IGF2 and PIBF were especially positive in the trophoctoderm.

**Funding:** This work was supported by Social Renewal Operational Programme (TÁMOP- 4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0053. and TÁMOP 4.2.4. A/2-11-1-2012-0001)

#### THE ROLE OF SYK EXPRESSION IN MYELOID CELLS IN CONTACT HYPERSENSITIVITY

CSEPREGI JANKA ZSÓFIA<sup>1</sup>, TAMÁS NÉMETH<sup>1</sup>, FELIX CHRITOPH WEBER<sup>2</sup>, STEFAN MARTIN<sup>2</sup>, ATTILA MÓCSAI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Physiology, Semmelweis University School of Medicine and SE-MTA „Lendület” Inflammation Physiology Research Group, Budapest, Hungary

<sup>2</sup>Allergy Research Group, Department of Dermatology, University Medical Center Freiburg, Freiburg, Germany

**Background:** Allergic contact dermatitis (ACD) is one of the most common inflammatory skin disease, triggered by repeated exposure of the skin to contact allergens. ACD and its animal model, contact hypersensitivity (CHS) is a T-cell mediated delayed-type hypersensitivity reaction. It is well known that in many cell types which are essential in the CHS (dendritic cells, macrophages and neutrophils) the spleen tyrosine kinase (Syk) is important in several signaling pathways. Therefore, we tested whether Syk plays a role in CHS development, with particular emphasis on the importance of Syk in myeloid cells.

**Materials and methods:** To investigate the role of Syk, we generated bone marrow chimeras with Syk<sup>-/-</sup> hematopoietic system, by fetal liver transplantation. Myeloid- and neutrophil-specific Syk deletion was achieved by crossing LysM and MRP8 promoter-driven Cre recombinase transgenic

(LysM-Cre and MRP8-Cre) mice with Syk<sup>flox/flox</sup> animals (LysM-Cre Syk<sup>f/f</sup> and MRP8-Cre Syk<sup>f/f</sup>). CHS was triggered by sensitization with the contact allergen 2,4,6-trinitrochlorobenzene (TNCB) in acetone or acetone alone as a vehicle control, followed by elicitation with application of TNCB on the ears 5 days later. We detected the level of inflammation by measuring the ear thickness 24 hours after the elicitation.

**Results:** While there was a robust increase in ear thickness in TNCB-sensitized wild type mice, no significant increase could be observed in Syk<sup>-/-</sup> mice compared to the control group, indicating that Syk-deficient mice are resistant to CHS. In contrast to wild type mice, there was a significant reduction in the ear thickness in the myeloid cell-specific Syk deficient LysM-Cre Syk<sup>f/f</sup> mice. There was also a partial but statistically significant decrease in the ear thickness in the MRP8-Cre Syk<sup>f/f</sup> mice, showing that Syk expression in neutrophils is important in CHS development.

**Conclusions:** Our results show that the presence of Syk is indispensable in the CHS. This effect is at least partially due to the expression of Syk in neutrophils.

#### THE EFFECTS OF SRC-FAMILY KINASE INHIBITORS ON OSTEOCLASTS

CSETE DÁNIEL<sup>1</sup>, DÁVID GYÓRI<sup>1</sup>, BÁLINT TÉL<sup>1</sup>, TIBOR VÁNTUS<sup>2</sup>, GYÖRGY KÉRI<sup>2</sup>, CSABA SZÁNTAL-KIS<sup>2</sup>, ATTILA MÓCSAI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Physiology, Semmelweis University School of Medicine & MTA-SE,

<sup>2</sup>Vichem Chemie Research Ltd., Budapest, Hungary

**Introduction:** Osteoclasts are the unique bone-resorbing cells of hematopoietic origin; their development is regulated primarily by M-CSF, RANKL and integrin-mediated interactions. Our workgroup has previously tested thousands of Src-family kinase inhibitors from the Vichem Ltd on neutrophil granulocytes, which cells show many similarities with osteoclasts regarding signaling pathways. One of the most effective inhibitors was the PD166326, an anti-leukemia drug candidate. Here we tested the effect of PD166326 on osteoclast development.

**Methods:** Bone marrow cells were isolated from the femurs and tibiae of C57Bl/6 mice on the 0. day and differentiated into osteoclasts in vitro in the presence of recombinant M-CSF and RANKL. Cultures were treated with PD166326 during different stages of osteoclastogenesis. Vehicle control samples received dimethyl sulfoxide (DMSO). Osteoclast differentiation was examined after 4 or 6 days by osteoclast-specific tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)-staining. Survival assay was performed at the 4th day using AnnexinV-PE and 7-AAD apoptosis and necrosis kit. Actin ring formation was observed with Lifeact EGFP transgenic mice.

**Results:** The number and the size of developing osteoclasts were strongly reduced in case of the early administration of the inhibitor. The IC50 value of the inhibitor was around 5 nM. The treatment of the cultures by 10 nM PD166326 practically blocked osteoclast development. When we administered the inhibitor later, from the 4th day – when the last main point of osteoclast development happens – only minor reduction was observed. The tendency to apoptosis did not increase in the PD166326 treated cultures. The administration of PD166326 did not cause the degradation of actin rings.

**Implications:** The anti-cancer drug PD166326 inhibited osteoclastogenesis in a very small concentration. We suppose that it has an effect on the early stage of osteoclastogenesis. These results may be considered in the therapy of different cancers especially in metastatic bone diseases.

#### HUMAN FACTOR H-RELATED PROTEIN 5 BINDS TO PENTRAXIN 3 AND THE EXTRACELLULAR MATRIX AND MODULATES COMPLEMENT ACTIVATION

CSINCSI ÁDÁM ISTVÁN<sup>1</sup>, ANNE KOPP<sup>2</sup>, MIKLÓS ZÖLDI<sup>1</sup>, ZSÓFIA BÁNLAKI<sup>1</sup>, BARBARA UZONYI<sup>3</sup>, JOSEPH CAESAR<sup>4</sup>, MATTHEW C. PICKERING<sup>5</sup>, SUSAN M. LEA<sup>4</sup>, ELENA GOICOECHEA DE JORGE<sup>5</sup>, MIHÁLY JÓZSI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>MTA-ELTE „Lendület” Complement Research Group, Department of Immunology, Eötvös Loránd University, Budapest, Hungary

<sup>2</sup>Junior Research Group for Cellular Immunobiology, Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology, Jena, Germany

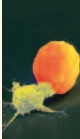
<sup>3</sup>MTA-ELTE Immunology Research Group, Department of Immunology, Eötvös Loránd University, Budapest, Hungary

<sup>4</sup>Sir William Dunn School of Pathology, University of Oxford, Oxford, United Kingdom

<sup>5</sup>Centre for Complement & Inflammation Research (CCIR), Department of Medicine, Imperial College, London, United Kingdom

**Introduction:** Factor H (FH) is known as a main regulator of complement activation. By contrast, the physiological roles of the FH-related proteins are poorly understood. Genetic studies implicated human factor H-related protein 5 (CFHR5) in the glomerular diseases atypical hemolytic uremic syndrome, dense deposit disease and CFHR5 nephropathy. Furthermore, the CFHR5 protein was identified in glomerular immune deposits in diseased kidneys. Weak complement regulatory activity of CFHR5 and competition for C3b binding with the complement inhibitor FH were reported, but its physiological function remains unclear. The aim of the current study was the further functional characterization of CFHR5.

**Methods:** Interaction of CFHR5 with pentraxin 3 (PTX3),



C-reactive protein and extracellular matrix was analyzed by ELISA and Western blot. FH cofactor activity was measured by analyzing C3b cleavage by Western blot. Assembly and activity of alternative pathway C3 convertase and complement activation in serum were analyzed by ELISA.

**Results:** Binding of native CFHR5 to PTX3 was detected from human plasma and the interaction was characterized using recombinant proteins. The binding of PTX3 to CFHR5 is of approximately twofold higher affinity compared to that of FH. PTX3 binding was not mediated via the C-terminal CFHR5 domains. PTX3 binding to CFHR5 was significantly reduced in buffer lacking calcium ions and at lower pH. A disease-associated mutant CFHR5 bound less PTX3. Binding of PTX3 to CFHR5 resulted in increased C1q binding. On the other hand, CFHR5 dose-dependently inhibited FH binding and its cofactor activity on PTX3, the short pentraxin C-reactive protein and the extracellular matrix *in vitro*. In addition, CFHR5 supported alternative pathway C3 convertase (C3bBb) formation via C3b binding and triggered alternative pathway complement activation.

**Conclusions:** CFHR5 may locally enhance complement activation via interference with the complement inhibiting function of FH, by enhancement of C1q binding and by direct activation of the alternative pathway, thereby contributing to glomerular disease.

#### IN VIVO IMMUNOSTAINING OF HEMOCYTE COMPARTMENTS IN DROSOPHILA FOR LIVE IMAGING

CSORDÁS GÁBOR<sup>1</sup>, GERGELY ISTVÁN VARGA<sup>1</sup>, VIKTOR HONTI<sup>1</sup>, FERENC JANKOVICS<sup>2</sup>, ÉVA KURUCZ<sup>1</sup> AND ISTVÁN ANDÓ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>HAS BRC, Institute of Genetics, Immunology Unit  
<sup>2</sup>HAS BRC, Institute of Genetics, Developmental Genetics Unit

**Introduction:** The immune cells (hemocytes) of the *Drosophila melanogaster* larva show surprising similarities to the blood cells of mammals. The different types of effector hemocytes form hematopoietic compartments, in which their division and differentiation take place. Although previous studies exist about the structure of these anatomical sites, only recently did it become possible to characterize them *in vivo*, with the combined use of fluorescent microscopy and transgenic reporter constructs. However, detailed investigation of these hematopoietic tissues required the dissection of the larvae, which compromised structural definition. Therefore, we sought to establish a method by which the composition of these tissues can be studied *in vivo*.

**Methods:** We immobilized *Drosophila* larvae, which expressed hemocyte-specific *in vivo* reporter (Hml>GFP), using an acetylcholinesterase inhibitor (Dichlorvos). By mounting these larvae on prepared Petri dishes, we could investigate the hemocyte compartments and perform time-

lapse videomicroscopy using a confocal microscope on live larvae. To complement the *in vivo* reporters with our existing molecular markers, we created mixtures of hemocyte-specific primary antibodies and fluorescently labeled secondary antibodies, and injected these mixtures into live animals. The injected larvae were immobilized and microscopic analysis was carried out.

**Results:** Microscopic analysis of the immobilized Hml>GFP larvae showed that the use of Dichlorvos does not affect the structure of the hematopoietic compartments, and that immobilized larvae can be studied in time lapse experiments for over 45 minutes. By injecting live Hml>GFP larvae with the mixture of hemocytes-specific primary and fluorescently labeled secondary antibodies, we identified the phagocytes within the sessile compartment. We also characterized the sessile compartment of tumorous larvae, and found that it is vastly expanded when compared to that of the wild type larvae.

**Conclusions:** We developed a method that can be used to study the structure and composition of hematopoietic tissues in the *Drosophila* larva, and possibly, in other insect species (Csordás et al., 2014).

**Acknowledgement:** We thank Olga Kovalcsik, Anita Balázs, Szilvia Tápai and Anikó Képiró for technical assistance. The research was financed by the Hungarian Science Foundation, OTKA grant NK-101730, and TÁMOP 4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0035 (IA). This research was supported by the European Union and the State of Hungary, co-financed by the European Social Fund in the framework of TÁMOP 4.2.4. A/2-11-1-2012-0001 'National Excellence Program' (for GIV and VH).

#### FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF NOVEL NON-SYNONYMOUS ALTERATIONS IN CD46 AND FACTOR H FOUND IN ATYPICAL HEMOLYTIC UREMIC SYNDROME PATIENTS

CSUKA DOROTTYA<sup>1</sup>, FRIDA C. MOHLIN<sup>2</sup>, SARA C. NILSSON<sup>2</sup>, ANNA M. BLOM<sup>2</sup>, TANJA KERSNIK LEVART<sup>3</sup>, EMA GOLUBOVIC<sup>4</sup>, KRISZTINA RUSAI-HEINDL<sup>5</sup>, THOMAS MÜLLER-SACHERER<sup>5</sup>, KLAUS ARBEITER<sup>5</sup>, ÉVA PÁLLINGER<sup>6</sup>, NÓRA SZARVAS<sup>1</sup>, ÁGNES SZILÁGYI<sup>1</sup>, ZOLTÁN PROHÁSZKA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>3rd Department of Medicine, Semmelweis University, Budapest

<sup>2</sup>Department of Laboratory Medicine, Lund University, Malmö

<sup>3</sup>Department of Pediatric Nephrology, University Medical Centre, Ljubljana

<sup>4</sup>Clinic of Pediatrics, Clinical Center, Medical Faculty, University of Nis, Nis

<sup>5</sup>Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, Medical University of Vienna, Vienna

<sup>6</sup>Department of Genetics, Cell- and Immunobiology Semmelweis University, Budapest

**Introduction:** Atypical hemolytic uremic syndrome (aHUS) is

a disease of complement dysregulation and is characterized by hemolytic anemia, thrombocytopenia and acute renal failure. Mutations in the complement inhibitors (factors H and I, CD46), are major risk factors of aHUS, although environmental trigger factors also contribute to the development of aHUS in genetically predisposed subjects.

The **aim** of this study was to investigate whether two novel alterations found in CD46 (E142Q, G259V), together with a previously reported factor H alteration (Q950H), would change the protein expression and/or function and thereby contribute to the disease.

**Methods:** To determine if the alterations affect the function of the proteins, both the factor H and CD46 mutants, as well as the wild type proteins were expressed recombinantly. Degradation assays were performed to determine if the alterations found in factor H or CD46 affect their cofactor activity to factor I. The ability of factor H to inhibit complement activation on the cell surface was also determined.

**Results:** We identified two novel heterozygous non-synonymous CD46 alterations (E142Q and G259V). These mutants were expressed recombinantly and the results demonstrated that G259V had decreased protein expression on the cell surface and in the cell lysate compared to wild type (wt). Functional analysis revealed that G259V had a substantially impaired ability to act as a cofactor to factor I, in the degradation of C3b and C4b. The E142Q mutant showed neither decreased expression nor impaired function. In two of our patients a rare heterozygous non-synonymous alteration in factor H (Q950H) was identified, which has been reported previously in aHUS patients but not functionally tested. This mutant had a somewhat decreased expression and complement inhibitory function on cell surface compared to wt.

**Conclusions:** Taken together, we report a novel CD46 alteration (G259V) showing both decreased protein expression and substantially impaired cofactor function. A factor H variant (Q950H) with moderate functional effects was also observed.

This work was supported by the K100687 grant of the Hungarian Research Fund.

#### INVESTIGATION OF SKIN IMMUNE SYSTEM IN ROSACEA

DAJNOKI ZSOLT<sup>1,2</sup>, BÉKE GABRIELLA<sup>1,2</sup>, MÓCSAI GÁBOR<sup>1,2</sup>,  
KAPITÁNY ANIKÓ<sup>1,2</sup>, GÁSPÁR KRISZTIÁN<sup>1,2</sup>, BÍRÓ TAMÁS<sup>3</sup>, VERES IMRE<sup>2</sup>,  
SZEGEDI ANDREA<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Division of Dermatological Allergology

<sup>2</sup>Department of Dermatology

<sup>3</sup>DE-MTA „Lendület” Cellular Physiology Research Group,  
Department of Physiology, Faculty of Medicine,  
University of Debrecen, Hungary

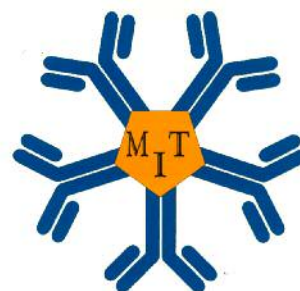
**Introduction:** Much evidence proved that low concentration

of IL-7-like cytokine Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP) has tolerogenic effect in gut epithelium, hence it has key role in maintaining gut homeostasis. On the contrary, TSLP protein expression in skin is described only in the pathologic condition of atopic dermatitis in extremely high levels. Until now the presence of TSLP in healthy skin has not been described and no data can be found about its possible tolerogenic effect in the skin. We sought to investigate and compare TSLP protein and gene expression in KCs, and also T and dendritic cell (DC) counts in healthy skin sites [sebaceous gland rich (SGR) and sebaceous gland poor (SGP)] and Rosacea.

**Methods:** 8 rosacea, 8 healthy sebaceous gland rich (SGR) and sebaceous gland poor (SGP) skin biopsies were gained. Half of the biopsies were paraffin-embedded and used for TSLP immunohistochemistry. CD3+ T cells and CD11c+ DCs were also immunostained. Then slides were digitalized. Quantification of TSLP levels and cell counts was performed by Panoramic Viewer software. The other half of skin biopsies were used to mRNA isolation to quantify TSLP gene expression by qPCR. To measure TSLP levels of stratum corneum by immunocytochemistry tape stripping technique was used.

**Results:** The expression of TSLP protein was described first time in SGR healthy skin sites by our workgroup. TSLP levels were significantly higher in SGR skin compared to SGP skin sites. TSLP contents of Rosacea samples were lower compared to SGR skin and were significantly higher than in SGP skin. Results of stratum corneum TSLP level measurements were parallel to our IHC study. No significant differences were found between the gene expression of SGR, SGP and rosacea skin samples, but the highest expression was found in SGR skin. T cell and DC counts were significantly higher in SGR and Rosacea skin compared to SGP and the difference was also significant between SGR and rosacea skin with a higher number of immune cells in rosacea samples.

**Conclusion:** In comparison to SGP skin the presence of TSLP and elevated numbers of T cells and DCs in SGR skin without inflammation may point to the fact that low levels of TSLP have tolerogenic effect in healthy skin. Our hypothesis may be strengthened by the fact that decreased TSLP levels were detected parallel to elevated T cell and DC counts in inflamed rosacea skin.





## THE NON-CODING RNA, PRINS AFFECTS AIM2 INFLAMMASOME ACTIVATION IN KERATINOCYTES

DANIS JUDIT<sup>1</sup>, GÖBLÖS ANIKÓ<sup>1</sup>, SZABÓ KORNÉLIA<sup>2</sup>,  
BATA-CSÖRGŐ ZSUZSANNA<sup>1, 2</sup>, KEMÉNY LAJOS<sup>1, 2</sup>, SZÉLL MÁRTA<sup>2, 3</sup>

<sup>1</sup>Department of Dermatology and Allergology,  
University of Szeged, Szeged

<sup>2</sup>MTA-SZTE Dermatological Research Group, Szeged

<sup>3</sup>Department of Medical Genetics, University of Szeged,  
Szeged

The non-coding RNA, PRINS was previously described by our research group as a differentially expressed transcript in psoriatic uninvolved and healthy skin. The expression level of PRINS in cultured keratinocytes is altered after exposure to various stress factors and silencing of it decreases the viability of keratinocytes during stress stimulations suggesting its role in stress response of the cells. A potential stress signal in psoriatic skin may be the extracellular DNA, which activates the AIM2 inflammasome. The activated inflammasome cleaves the precursor proIL-1 $\beta$  form into mature, functioning IL-1 $\beta$ . The role of the AIM2 inflammasome and the IL-1 $\beta$  cytokine in psoriasis has been described recently.

The aim of our study was to investigate if the PRINS non coding RNA affects the expression and activation of the inflammasome members and IL-1 $\beta$  in normal human epidermal keratinocytes (NHEK) after exposure to extracellular DNA.

The expression of PRINS was transiently silenced by a vector based RNA interference method in cultured NHEK cells. Silenced and non-silenced NHEK cells were primed with the cytokines TNF- $\alpha$  and IFN $\gamma$  and transfected with the synthetic DNA analogue poly(dA:dT). The expression of PRINS and inflammasome members was detected by real-time RT-PCR and the secreted IL-1 $\beta$  was measured by ELISA.

Poly(dA:dT) treatment caused a moderate increase in PRINS expression and IL-1 $\beta$  secretion as well, whereas priming with a combination of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  before poly(dA:dT) transfection resulted in a highly elevated PRINS expression and higher secreted IL-1 $\beta$  levels. The silencing of PRINS decreased the amount of secreted IL-1 $\beta$ , but did not affect the expression of the proIL-1 $\beta$  or AIM2.

Our results suggest that the PRINS non-coding RNA regulates the IL-1 $\beta$  production of NHEK cells, but not through the regulation of proIL-1 $\beta$  expression, rather contributing to inflammasome-activation.

## DEVELOPMENT OF A NEW METHOD FOR PERMEABILITY MEASUREMENTS

DEBRECZENI MÁRTA LÍDIA, PÉTER KÁROLY JANI, ERIKA KAJDÁCSI,  
ENDRE SCHWANER, LÁSZLÓ CERVENAK

Semmelweis University, 3rd Department of Medicine,  
Research Laboratory, Budapest

**Background:** Increased endothelial cell permeability plays an important role in the pathomechanism of several immunologically relevant diseases, for example in hereditary angioedema, allergy, or sepsis. Numerous methods are known for measuring the permeability changes, such as the protein transport through transwell inserts, impedance measurement, or immunostaining of adhesion molecules, just to mention a few. These methods are widely accepted and used, but expensive, unreliable or labor-intensive. To overcome these problems, we aimed to develop a cheap, simple and highly reliable technique, which allows to test several samples simultaneously.

**Methods:** In our experiments, we used confluent human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) culture as a model. HUVECs were prepared from fresh umbilical cords, and were kept in AIM-V medium, completed with FCS, EGF and bFGF. VE-cadherin, PECAM-1 and ZO-1 adhesion molecules were stained with the corresponding primary antibodies, followed by fluorescently labeled secondary antibodies. Samples were observed and images were recorded using an Olympus IX-81 inverted fluorescence microscope mounted with an Olympus XM10 digital camera.

**Results:** HUVECs were grown on 96 well plates precoated with biotinylated gelatin. After treating with a given agonist, we added a streptavidin-Alexa 488 (a streptavidin conjugated fluorescent dye) to each well, which tightly binds to the biotinylated gelatin in the gaps between endothelial cells. After paraformaldehyde fixation, paracellular gaps were visualized using fluorescent microscopy. To evaluate these images, we performed quantitative image analysis to define the size of the stained area on each photograph. The new method was validated by known permeability-increasing factors; thrombin and bradykinin, which increased the size of the stained area as expected. To confirm our permeability test results, we stained key adhesion molecules (VE-cadherin, PECAM-1, ZO-1) after thrombin and bradykinin treatment, which showed that endothelial cells became separated from each other.

**Conclusion:** Consistent with the literature data, thrombin and bradykinin increased endothelial permeability in our novel permeability test. We could also confirm our results by immunostaining of adhesion molecules, therefore we found the new method suitable for permeability measurements. Based on our results, we can conclude that we successfully

developed a new, simple, cheap and high throughput method, which can be used in a wide variety of experiments assessing permeability.

#### METAGENOME SEQUENCING OF LICHEN PLANUS INDICATES PERTURBATIONS IN THE HEALTHY ORAL MICROBIOME

DECSI GÁBOR<sup>1</sup>, GERGELY MARÓTI<sup>2</sup>, ZSÓFIA TARNAI<sup>1</sup>, JÁNOS MINÁROVITS<sup>1</sup>, KRISZTINA BUZÁS<sup>1, 2</sup>, KATALIN NAGY<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Univ. of Szeged, Faculty of Dentistry

<sup>2</sup>Hungarian Academy of Sciences, Biological Research Center, Szeged

**Introduction:** Lichen planus is a chronic, inflammatory idiopathic disease of mucosal tissue or skin. The inducers are unknown, but it is thought to be the result of a severe auto-immune process with an unknown initial trigger. However, the pathomechanism is not really understood yet, the unknown trigger of immun response and the lichen as the precancerous disease could indicate the role of microbial flora in the oral cavity.

**Materials and methods:** Lichenoid and healthy tissue samples were collected from patients of our clinic. Total DNA was extracted from the samples and metagenomic DNA was quantified using Qubit<sup>®</sup> 2.0 Fluorometer and Ion Torrent PGM Fragment libraries of 200 nt were generated. Sequencing was performed on Ion Torrent Personal Genome Machine™ using Ion 318 chip. The MG-RAST software performs a QC (quality control) and an automatic normalization of the FASTQ sequence data with maximum e-value cut-off of 10<sup>-5</sup>, minimum percent identity cut-off 90% and minimum alignment length cut-off 25 bp. For the functional and taxonomical analyses MG-RAST utilized the M5nr protein database (GO, IMG, KEGG, NCBI (RefSeq & GenBank), SEED, UniProt, eggNOG and PATRIC) and various ribosomal RNA databases (RDP, Silva and Greengenes), respectively.

**Results:** High-throughput, sequencing-based metagenome analysis identified 20 versus 47 bacteria species in contralateral healthy and lichenoid tissues, respectively. Although the most frequent species are the *Streptococcus mitis* and *Streptococcus pneumoniae*, the diversity of bacterial flora is markedly higher in the precancerous tissue samples. In lichen planus, the relative abundance of *S. mitis* and *S. pneumoniae* was 31% of the total bacterial community compared to that of 55% in normal samples.

**Discussion:** It is well known, that the microbiome of the cancerous tissue shows strong differences compared to the normal, healthy microbial flora of the oral cavity. One of the main points in the pathogenesis of oral cancer, that the alteration of bacterial flora is the cause or causative of the malignant disease. We have found clear changes in the com-

position of microbiome in lichenoid tissue and these alterations involved a decreased ratio of the healthy, normal bacterial flora. These microbial changes in the precancerous lichenoid tissue might induce malignant transformation of mucosal membrane in the oral cavity.

#### EFFECT OF TLR9 LIGANDS IN K7M2 OSTEOSARCOMA CELL LINE AS IN VITRO BONE MODEL

DOBRA GABRIELLA<sup>1</sup>, KÖRMÖNDI SÁNDOR<sup>2</sup>, GYUKITY-SEBESTYÉN EDINA<sup>1</sup>, HARMATI MÁRIA<sup>1</sup>, FARAGÓ ANNA<sup>1</sup>, BUZÁS KRISZTINA<sup>1, 3</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biochemistry, Biological Research Center of the Hungarian Academy of Sciences, Szeged, Hungary

<sup>2</sup>Department of Traumatology, Faculty of Medicine, University of Szeged, Hungary

<sup>3</sup>Faculty of Dentistry, University of Szeged, Hungary

**Introduction:** Bone metastases is one of the most common and painful consequences of tumor progression. The role of a potential microbial infection in bone metastasis formation or malignant disease in general has not been understood yet.

TLR9 agonists induce Th1 type, pro-inflammatory cytokine and chemokine production of immune cells. Since growing evidence suggests that many types of non-immune cells may also express TLR9, we hypothesized that osteosarcoma cells used as an in vitro bone model also express TLR9, and stimuli induced by CpG oligonucleotides can induce their phenotypic and functional alterations.

**Methods:** K7M2 osteosarcoma cell line were cultured in DMEM based culture media and proliferation of K7M2 cell lines was studied following stimulation with the TLR9 agonists CpG-ODN 1826 and CpG-ODN H154, and CpG-ODN 1612 as control. We used MTT assay for assessing cell viability. The effect of these interventions on the cell morphology was also evaluated by microscopy.

**Results:** ODN 1826 significantly inhibited the mitochondrial activity of K7M2 osteosarcoma cells ( $p < 0.0001$ , unpaired, two-tailed t test) and induced the phenotypical alteration of K7M2 compared with negative control ODN 1612. ODN H154 also decreased the metabolic activity of K7M2 ( $p < 0.01$ ) and monolayer forming ability. Morphological changes of the activated cell cultures suggested decreased cell adherence to the solid surface.

**Conclusions:** Taken together, the TLR9 agonists, ODN 1826 and H154, inhibited cell proliferation and altered cell morphology of K7M2 cells. Based on these results we assume that potential bacterial infection during malignancies may affect the cells' adherence, potentially leading to phenotypical alteration and metastasis formation in bones.



## EARTHWORM COELOMOCYTE DERIVED CYTOTOXICITY IS NOT RESCUED BY ANTI-LYSENIN PRETREATMENT

ENGELMANN PÉTER<sup>1</sup>, SOMOGYI ILDIK<sup>2</sup>, MÁCSIK LEVENTE LÁSZLÓ<sup>1</sup>, POLLÁK EDIT<sup>2</sup>, MOLNÁR LÁSZLÓ<sup>2</sup>, NÉMETH PÉTER<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Immunology and Biotechnology, Clinical Center, University of Pécs, Pécs, Hungary  
<sup>2</sup>Department of Comparative Anatomy and Developmental Biology, Faculty of Sciences, University of Pécs, Pécs, Hungary

**Objectives:** Coelomocyte subpopulations have essential role in earthworm cellular immunity. In addition to secreted antimicrobial factors of earthworms, there is a firm evidence for certain cytotoxic components. Previously, we observed rapid cell lysis of multiple tumor cell lines caused by coelomocyte lysate or supernatant of *in vitro* cultured coelomocytes. Moreover, we demonstrated that coelomocyte lysate induced a caspase independent apoptotic-like cell death in tumor (Sp2 and HeLa) cell targets using different technical approaches (transmission electron microscopy, TUNEL assay, Annexin V staining, assessment of mitochondrial membrane potential changes, and measurement of Ca<sup>2+</sup> influx).

**Methods:** Our recent aim was to study whether a lytic protein named as lysenin participates in the observed cytotoxic mechanisms. For this attempt we applied our in-house developed anti-lysenin monoclonal antibody (α-EFCC5) to inhibit the coelomocyte lysate evoked toxicity in various assays (TUNEL, Annexin V, MMP, Ca<sup>2+</sup> influx).

**Results:** Indeed, anti-EFCC5 pre-treated coelomocyte lysate caused less TUNEL positivity in HeLa target cells; however there was detectable DNA fragmentation compared to negative controls. Similarly, pretreatment with α-EFCC5 mAb rescued Sp2 target cells from the loss of mitochondrial membrane potential, but it was still significantly different from the control cells. α-EFCC5 pretreated coelomocyte lysate induced an attenuated phosphatidyl-serine translocation of target cells revealed by Annexin V/propidium iodide staining. In the case of Ca<sup>2+</sup> kinetics, mAb pretreatment caused a fall in lysate-evoked Ca<sup>2+</sup> influx compared to the untreated lysates, but it was clearly noticeable in contrast to the negative controls.

**Conclusion:** Anti-lysenin specific mAb pretreatment rescued the majority but not all target cells from coelomocyte-induced death. These data suggest that factors other than lysenin may also participate in the cytotoxic activity of coelomocytes. Our observations underscore the complexity of cytotoxicity-related immune response in the earthworm.

## STUDYING THE NEGATIVE REGULATORY FACTORS OF THE PROPIONIBACTERIUM ACNES-INDUCED SIGNALING PATHWAYS IN *IN VITRO* CULTURED IMMORTALIZED KERATINOCYTES

ERDEI LILLA<sup>1</sup>, GÁBOR TAX<sup>1</sup>, SZILVIA BEÁTA BOLLA<sup>1</sup>, EDIT URBÁN<sup>3</sup>, LAJOS KEMÉNY<sup>1, 2</sup>, KORNÉLIA SZABÓ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Dermatology and Allergology, University of Szeged, Hungary  
<sup>2</sup>MTA-SZTE Dermatological Research Group, Szeged, Hungary  
<sup>3</sup>Institute of Clinical Microbiology, University of Szeged, Hungary

*Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) is a resident microbe of the healthy human skin microbiome, but also know to simulate immune and inflammatory events via the activation of Toll-like receptors (TLRs). These molecular pathways are well characterized, but little is known about the endogenous negative regulatory mechanisms in the keratinocytes that counteract the bacterium-induced signaling events and thus may protect the host from the prolonged, uncontrolled and often destructive inflammation.

In our studies we aimed to characterize the keratinocyte expression of endogenous negative regulators of TLR signaling pathways previously identified in other cell types, and to analyze their possible role in the attenuation of the *P. acnes*-induced molecular events. For that, we studied the basal mRNA and protein expression of selected genes (SIGIRR, TOLLIP, TNFAIP3, TNIP1) in a human, *in vitro* cultured immortalized keratinocyte cell line (HPV-KER) by real time RT-PCR and western blot analysis.

Our results suggest that all the investigated negative regulators are expressed in HPV-KER cells and the TNFAIP3 and TNIP1 mRNA expressions significantly and dose dependently increase in response to the bacterium. At the protein level, we found increased TNFAIP3 and decreased SIGIRR expressions following the bacterial treatment, and these events also appeared to be dose dependent. Next, we compared the effect of two *P. acnes* strains (889, 6609) belonging to different phylogenetic groups within the species (IA and IB, respectively), but no major differences have been observed in the induced expression changes.

Our study suggests that in our *in vitro* model system *P. acnes* causes a dose-dependent activation of downstream TLR signaling processes. However, parallel to that specialized, endogenous negative regulators are also expressed in these cells, which may control the bacterial-induced molecular events, and thus can be important for the maintenance of epidermal homeostasis.

WNT4 PREVENTS BUT PPAR $\gamma$  PROMOTES BEIGE THYMIC ADIPOSE INVOLUTIONERNSZT DÁVID<sup>1</sup>, ZSÓFIA KELLER<sup>2</sup>, PONGRÁCZ E. JUDIT<sup>1</sup>, KVELL KRISZTIÁN<sup>1</sup><sup>1</sup>Department of Pharmaceutical Biotechnology, University of Pécs, Hungary<sup>2</sup>Master's Programme in Biomedicine and Biotechnology, University of Veterinary Medicine, Vienna Austria

**Introduction:** The thymus undergoes a rapid involution process due to which the production of naive T-cells drops by 99% by the age of 50 years in human. As a consequence infections, cancers and autoimmune diseases become frequent in the elderly. It is therefore desirable to map molecular methods responsible for thymic adipose involution. To date an accelerated, cell-line based model was lacking.

**Methods:** The mouse primary-derived TEP1 (thymic epithelial) cell line was forced to undergo adipose differentiation (by steroid/DX treatment) or was reinforced in its thymic epithelial cell identity (by Wnt4-expression). The established two novel entities were thoroughly characterized and compared to the original cell line by methods including Taqman-array, immunofluorescent staining, miRNA-analysis, transmission electron microscopy.

**Results:** DX-treatment rapidly induces beige adipose differentiation of TEP1 cells as proved by the appearance of PPAR $\gamma$ , beige-specific genes (UCP1, CD137, EAR2), multilocular lipid droplets and loss of inhibitory miRNA transcripts (miR27b). On the other hand, Wnt4-expression reinforces thymic epithelial identity as shown by the appearance of FoxN1, AIRE, MHCII, IL-7 and increased inhibitory miRNA transcripts (miR27b). Also, Wnt4 renders the TEP1 cells to become insensitive to DX-triggered adipose differentiation.

**Conclusion:** Our data further support the existence of an intermediate cell type in the process of epithelial to adipocyte trans-differentiation accounting for macroscopic thymic adipose involution seen during aging. Moreover, the mouse primary-derived TEP1 cell line appears to be such an intermediate cell type. Since steroid-treatment mimics an accelerated aging process, DX-treatment of TEP1 cells provides a unique, rapid platform to study thymic adipose involution at the molecular level.

## EFFECT OF FACTOR H ON THE FUNCTION OF HUMAN NEUTROPHIL GRANULOCYTES

E. SCHNEIDER ANDREA<sup>1</sup>, NOÉMI SÁNDOR<sup>2</sup>, MIHÁLY JÓZSI<sup>1</sup><sup>1</sup>MTA-ELTE „Lendület” Complement Research Group and<sup>2</sup>MTA-ELTE Immunology Research Group, Department of Immunology, Budapest

**Background:** Factor H (FH) is a major inhibitor of the alter-

native pathway of complement activation in plasma and on host surfaces. In addition, FH has been shown to bind to neutrophil granulocytes presumably via complement receptor type 3 (CR3; CD11b/CD18) and mediate adhesion. The cellular roles of FH are, however, poorly understood. Because neutrophils are important innate immune cells in inflammatory processes and the host defence against pathogens, we aimed at studying the effects of FH on various neutrophil functions.

**Methods:** Human neutrophil granulocytes were isolated from peripheral blood of healthy individuals. Neutrophil spreading was monitored by laser-scanning confocal microscopy using fluorescent F-actin probe to measure the contact zone area. Co-localization between FH and CD11b was quantified by calculating Pearson's correlation coefficients from at least 100 cells. Cell migration assays were performed in serum-free RPMI-1640 medium using transwell plates with 3- $\mu$ m pore polycarbonate membranes. After induction of neutrophil extracellular traps (NETs), DNA was stained with Sytox Orange. The relative fluorescence intensity of adhered neutrophils (Cell Tracker Green labelled), the extracellular DNA (NET formation) and ROS production (dihydrorhodamine 1,2,3 oxidation) were measured in 96-well black transparent-bottom plates using a fluorescence reader. IL-8 was measured from cell culture supernatants by ELISA. The cell activating capacity of FH was monitored by Ca<sup>2+</sup> measurement on flow cytometry and by anti-phospho tyrosine Western blot techniques.

**Results:** FH showed co-localization with CD11b. Cell surface-bound FH retained its cofactor activity and enhanced C3b degradation. FH did not induce Ca<sup>2+</sup> signal in the cells, but altered the tyrosine phosphorylation pattern. FH supported neutrophil migration and spreading. In addition, immobilized FH enhanced IL-8 release from neutrophils. FH alone did not trigger the cells to produce NETs. In contrast, NET formation induced by PMA and by fibronectin plus beta-glucan were inhibited by FH. This inhibition was specific since the major CR3 ligand iC3b did not elicit such an inhibitory effect. Since we measured similar cell numbers in each sample, it can be excluded that the differences were due to altered adhesion properties. Moreover, in parallel with NET formation, FH also inhibited ROS production.

**Conclusions:** These data show that FH has multiple regulatory roles on neutrophil functions. While it might support the recruitment of neutrophils, FH -depending on the stimulus context - could also exert anti-inflammatory effects and influence local inflammatory and antimicrobial reactions as well as tissue damage by modulating NET formation.



## IMMUNOLOGICAL METHODS TO INVESTIGATE ALLOIMMUNE HABITUAL ABORTION

FEKETE D.<sup>1</sup>, UJHELYI E.<sup>1</sup>, PETRÁNYI Gy.<sup>1</sup>, GALAMB Á.<sup>2</sup>, SZÉLL A.<sup>3</sup>, PAJOR A.<sup>2</sup>, SIKLÓS P.<sup>1</sup>, VÁLYI-NAGY, I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>United St. István and St. László Hospital and Outpatient Clinic, Budapest

<sup>2</sup>Semmelweis University, 2nd Department of Obstetrics and Gynaecology, Budapest

<sup>3</sup>G1 Laboratory, Budapest

Recurrent spontaneous abortion (RSA) is the occurrence of pregnancy loss at 6–12th week of gestation despite normal implantation and normal embryonic development. In several cases where no anatomical, genetic, hematologic or endocrinologic cause or no infection can be found for RSA we speak about RSA of unknown cause. In these cases autoimmune/alloimmune conditions or immune regulation disorders can be the background. Clinical observations underline that immunotherapies used to treat RSA are effective only in those cases, where the immunological cause of RSA is accurately assessed. For this reason a national RSA committee was founded in 2013 at the 2nd Department of Obstetrics and Gynaecology. In cooperation with this committee we introduced a complex protocol for the investigation of immunological RSA that consists of the following measurements:

**Flowcytometry crossmatch:** Detection of IgG molecules in the patient serum that react with the T or B lymphocytes of the partner showing HLA sensitization or immunoregulation.

**Mixed Leukocyte Culture (MLC) and blocking antibody analysis:** By this method we can determine the cellular reactivity of the patient against the partner and we can measure also whether the patients' serum contains any factor that modifies this reactivity.

**Determination of Th1-Th2 ratio:** The determination of Th1 vs. Th2 cell ratio is based on measuring their characteristic cytokines. Th1 dominance points to elevated cellular immune response while Th2 dominance represents humoral immune response and suppressive immunoregulation.

**Analysis of natural killer (NK) cells:** If elevated NK cell numbers are detected in the blood and/or their reactivity is elevated means a general upregulated immunoreactivity of the patient.

In the present work we summarize our experience with the 225 RSA patients and 9 healthy first trimester pregnant women investigated so far in our laboratory. We analyse the efficiency of the different measurements and emphasize the importance of the integrated evaluation of the results. Most informative results were concluded from the MLC measurement. Interestingly all healthy pregnant women had elevated reactivity against partner cells compared to RSA patients, where only 73%. Moreover 63% of RSA patients' serum con-

tained factors that enhanced the reactivity, while only 33% of healthy pregnant women showed this reaction. In contrast, only 37% of RSA patients had components in their serum that blocked the reaction against the partner cells, while 67% of healthy pregnant women showed this blocking reaction.

## THE INVESTIGATION AND MODIFICATION OF TNF REVERSE SIGNALING ON PROFESSIONAL IMMUNE CELLS

FILKOR KATA<sup>1</sup>, TÖRÖK ANNAMÁRIA<sup>1</sup>, SÍPOS ORSOLYA<sup>1</sup>, MARTON ANNAMÁRIA<sup>2</sup>, DUDA ERNŐ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Medical Biology, University of Szeged, Szeged

<sup>2</sup>Department of Biochemistry, Biological Research Centre of the Hungarian Academy of Sciences, Szeged

**Objectives:** Professional (i.e. monocytes, macrophages) and semi-professional immune cells (i.e. endothelial cells) are both able to produce the soluble and the membrane-bound form of TNF. It is well known that receptor-ligand interactions results in physiological alterations on receptor expressing cells (forward signaling). Interestingly, receptor-ligand interactions are also able to alter the behavior of ligand expressing cells (reverse signaling). It is known that the N-terminal domain of TNF contains a putative nuclear localization signal. The treatment of TNF producing cells with TNF receptors or agonistic anti-TNF antibody (i.e. infliximab; IFX) results in the liberation of a 10kDa fragment, which is translocated in the nucleus. This fragment may has transcription factor activity and it may be involved in the fine tuning of the innate and adaptive immune response.

**Methods:** To analyze this phenomenon more accurately, human and mouse macrophages were pretreated with Escherichia coli-derived lipopolysaccharide (LPS) to mimic inflammatory conditions. Then, reverse signaling was induced by TNF neutralizing antibodies (namely IFX and certolizumab pegol; CZP, respectively). In case of T lymphocytes, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) treatment was carried out to induce activation, and OKT-3 was added to mimic MHC-TCR interactions. In accordance with macrophages CZP was added for the induction of reverse signaling. Investigations were performed at relative gene expression and secreted protein level by quantitative real-time PCR (QRT-PCR) and proteome profiler, respectively.

**Results:** Simultaneous induction of reverse signaling by IFX or CZP stimulation resulted in marked relative gene expression decline in inflammation-related cytokines (i.e. IL-1 $\beta$ , IL-8, etc.) in human and mouse macrophage cell lines as compared with LPS treated cells. Furthermore, the regulatory effect of TNF reverse signaling seems to be independent from the presence of the Fc fragment, as IgG stimulation has

no dramatic impact on the expression pattern of the previously mentioned effector molecules as compared with naïve controls. In case of T lymphocytes, antibody treatment resulted in relative gene expression down regulation of the previously mentioned effector molecules versus activated and OKT-3 treated cells. The analysis of cell culture supernatants by proteome profiler indicates that the induction of reverse signaling results in notable alterations of secreted cytokine levels.

**Conclusions:** In some pathologic conditions the strict regulation of the TNF is disturbed which results in the pathogenesis of autoimmune diseases. In our days, the application of monoclonal anti-TNF antibodies became the mainstream of biologic therapies, however little is known about their exact mechanism of action. Our results suggest that TNF blocking antibodies induce reverse signaling under inflammatory conditions in the most prominent cell types of the innate and adaptive immune system. The induction of reverse signaling has role in the beneficial effects of TNF neutralizing antibodies by interfering with cytokine production.

#### SPRING, SUMMER, AUTUMN, WINTER SEASONAL CHANGES IN HEMOCYTE-NUMBER AND TYPES IN THE HONEY BEE

GÁBOR ERIKA<sup>1</sup>, TIBOR TÖRÖK<sup>2</sup>, JÁNOS ZSÁMBOKI<sup>1</sup>, GYÖNGYI CINEGE<sup>1</sup>,  
GÁBOR CSORDÁS<sup>1</sup>, VIKTOR HONTI<sup>1</sup>, ÉVA KURUCZ<sup>1</sup> AND ISTVÁN ANDÓ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Immunology Unit, Institute of Genetics, BRC HAS, Szeged

<sup>2</sup>Department of Genetics, University of Szeged, Szeged

**Introduction:** Honeybee (*Apis mellifera*) is an ecologically and economically important domesticated social insect that goes through complete metamorphosis. A bee colony can be divided in three castes: the queen, the drones and the workers. In temperate zones, the life time of the summer workers is about 3 weeks, while winter workers may live even for 6 months. Like other insects, honeybees have an immune system which has cellular- and humoral elements, furthermore, they also apply alternative communal defense strategies, such as hygienic behavior or social fever therefore, their immune response can contain unique elements. The effector cells responsible for the cell mediated immune response are the blood cells. In previous studies, hemocytes were recognized and characterized on the basis of their morphological properties. Although different cell types were determined, their functions and lineage relationships is still neither unknown, as molecular markers for them were not exist nor was a hematopoietic tissue found. The aim of our research is to study the cellular components of the immune system of the honey bee by identification of molecular markers for hemocyte subsets and relate their expression to morpho-

logical features and function in different developmental and seasonal stages.

**Methods:** immunofluorescence-, immunohistochemical methods, phagocytosis assays.

**Results:** We defined and clustered several markers for hemocytes and used them in combination with phagocytosis assays. We recorded seasonal changes in the expression pattern of the markers and in the phagocytic function. Using the markers we showed that the phagocytic hemocyte pool was reduced, and accordingly, the cell population, having the markers, expanded during the winter.

**Conclusion:** Our results show that there is a dramatic seasonal change in the function and the phenotype of the hemocyte populations in the honey bee, which may be related to the lifespan, or reflects the seasonal variation of the microflora which the honeybee is exposed to throughout the year. The use of the blood cell specific markers will help to follow the seasonal changes in the composition of hemocyte populations and to understand the principles of blood cell homeostasis, and may help to identify hematopoietic compartments in this species.

**Acknowledgments:** We thank Olga Kovalcsik, Anita Balázs, Szilvia Tápai and Anikó Képiró for technical assistance. The research was financed by the Hungarian Science Foundation, OTKA grant NK-101730, and TÁMOP 4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0035 (IA).

#### INFLIXIMAB INFLUENCED CHANGES OF SERUM TNF-ALFA LEVELS

GELLEY ANDRÁS<sup>1</sup>, ERZSÉBET NAGY<sup>1</sup>, LÁSZLÓ POTO<sup>2</sup>, CSABA BALÁZS<sup>3</sup>,  
ÁGOTA KOVÁCS<sup>4</sup>, GÁBOR HEGEDE<sup>4</sup>, LÁSZLÓ BENE<sup>4</sup>, PÁL MIHELLER<sup>5</sup>,  
ZSOLT TULASSAY<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Internal Medicine and Gastroenterology Department, and Laboratory of Polyclinic of

<sup>2</sup>Hospitaller Brothers of St. John of God Budapest, University of Pécs Medical school

<sup>3</sup>Institute of Bioanalysis Buda Allergy Centre

<sup>4</sup>Péterfy Sándor Hospital Budapest

<sup>5</sup>SE 2<sup>nd</sup> Department of Internal Medicine

**Introduction:** Towards a more successful follow up of anti TNF-alfa treatment we investigate the changes of serum TNF-alfa levels during infliximab (IFX) infusions.

**Method:** During the scheduled IFX treatment the serum TNF-alfa levels were measured before and after every infusions by ELISA assay Quantikine<sup>®</sup> HS, R&D SYSTEMS, Minneapolis USA). Presently in this clinical study 8 immunomodulant+IFX treated subjects (7 Crohn- 4 Luminal and 3 fistulising- and 1 Colitis ulcerosa), and 9 control subjects treated only with immunomodulant were involved.

**Results:** The average of serum TNF-alfa levels of inactive

subjects treated only with immunomodulant are  $<1,0$ . The average of serum TNF- $\alpha$  levels of active subjects treated only with immunomodulant are 13,3. The average of serum TNF- $\alpha$  levels of active subjects pretreated with immunomodulant and steroid are 1,7. The serum TNF- $\alpha$  levels markedly increase by the influence of IFX infusions. The increasing interval between the IFX infusions decrease the trend of this increasing. The increasing of serum TNF- $\alpha$  levels in comparison either before the first IFX infusion (pretreated data) and its levels before the sequential IFX infusions during the treatment are significant:  $P<0,0001$  (Mann-Whitney test). The serum TNF- $\alpha$  levels decrease significantly after each infusion, ( $P<0,0001$  Wilcoxon signed-ranks test), however the serum TNF- $\alpha$  levels increase in the interval between two sequential infusions. ( $P<0,0001$  Wilcoxon signed-ranks test).

**Conclusion:** The cause of this surprising phenomena will take some explaining. The IFX increase the shedding of tumornecrosis factor receptor 2 (TNFR2) from the surface of immunocompetent cells. The soluble TNFR2 binds and inactivates the TNF- $\alpha$  molecules, and plays natural anti TNF effect. This inactive complex stays longer in circulation, and it is traceable by the used TNF- $\alpha$  ELISA kit.

#### CHARACTERIZATION OF CARD18, A NOVEL NEGATIVE REGULATOR OF IL-1 $\beta$ IN HUMAN KERATINOCYTES AND IN PSORIASIS

GÖBLÖS ANIKÓ<sup>1</sup>, JUDIT DANIS<sup>1</sup>, ATTILA BEBES<sup>1</sup>, ZSUZSANNA BATA-CsÖRGŐ<sup>1, 2</sup>, LAJOS KEMÉNY<sup>1, 2</sup>, MÁRTA SZÉLL<sup>2, 3</sup>

<sup>1</sup>Department of Dermatology and Allergology, University of Szeged, Hungary

<sup>2</sup>Dermatological Research Group of the Hungarian Academy of Sciences, University of Szeged, Hungary

<sup>3</sup>Department of Medical Genetics, University of Szeged, Hungary

Psoriasis is an immune-mediated inflammatory skin disease affecting 2-3% of the population. The infiltrating immune cells and the keratinocytes both contribute to the pathogenesis of psoriasis. The IL-1 $\beta$  cytokine has a key role in the pathogenesis of psoriasis by mediating and initiating the infiltration of immune cells and the hyperproliferation of keratinocytes. In the psoriatic involved epidermis a higher IL-1 $\beta$  level can be realized which is mostly produced by the keratinocytes. Our recent large scale gene expression study has detected CARD18 (ICEBERG) as a differentially expressed transcript in psoriatic uninvolved epidermis compared to healthy epidermis. CARD18 belongs to the „CARD only protein” (COP) family and it is a negative regulator of IL-1 $\beta$  maturation by inhibiting inflammasome activation due direct interaction with pro-caspase1. The aims were to further

characterize the CARD18 molecule in keratinocyte function and psoriasis.

Our histological staining confirmed the results of the previous microarray examination: an elevated CARD18 expression was detected in the psoriatic uninvolved epidermis compared to the healthy epidermis. The *in vitro* gene expression studies revealed low-level CARD18 mRNA expression in the proliferative state of keratinocytes that increased continuously during differentiation.

We studied the expression of some inflammasome signaling molecules (CARD18, AIM2 and caspase1 mRNA) and IL-1 $\beta$  secretion in keratinocytes in response to various psoriasis-related stress factors such as T-cell lymphokines, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  and the synthetic DNA analogue poly(dA:dT).

*In vitro* keratinocytes secreted very low levels of IL-1 $\beta$ , whereas a significant increase was observed following inflammatory stimuli (TNF- $\alpha$  and INF- $\gamma$  pretreatment, poly(dA:dT) transfection). In AIM2, CARD18 and caspase1 mRNA expression after the same treatment changes were also detected. The effects of CARD18 gene specific silencing were studied and we observed a decreased AIM2 and caspase1 mRNA expression 24 hours after silencing.

CARD18, AIM2 and caspase1 expression and IL-1 $\beta$  secretion can be induced by various psoriasis-related stress factors in human keratinocytes. CARD18 silencing caused a reduced inflammasome activation which we detected by a decreased IL-1 $\beta$  secretion, but the process remains unclear. We hypothesize that the elevated CARD18 mRNA and protein expression in the uninvolved psoriatic epidermis could contribute to the susceptibility to the disease.

#### PHOSPHOLIPASE C $\gamma$ 2 IS REQUIRED FOR THE DEVELOPMENT OF CALCIUM-OSCILLATIONS IN OSTEOCLASTS

GYÖRI DÁVID<sup>1, 2</sup>, JÁNOS FARKAS<sup>1</sup>, DÁNIEL CSETE<sup>1, 2</sup>, ZSUZSANNA KERTÉSZ<sup>1</sup>, TAMARA CHessa<sup>3</sup>, LEN R. STEPHENS<sup>3</sup>, PHILLIP T. HAWKINS<sup>3</sup>, ATTILA MÓCSAI<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Department of Physiology, Semmelweis University School of Medicine, Budapest, Hungary

<sup>2</sup>MTA-SE „Lendület” Inflammation Physiology Research Group of the Hungarian Academy of Sciences and the Semmelweis University, Budapest, Hungary

<sup>3</sup>The Babraham Institute, Cambridge, United Kingdom

**Background:** Osteoclasts are the unique bone-resorbing cells of hematopoietic origin, which are critically involved in diseases characterized by pathological bone loss, such as rheumatoid arthritis. Phospholipase C $\gamma$ 2 (PLC $\gamma$ 2) is an important signaling molecule in hematopoietic lineages and it was shown to be required for inflammatory arthritis in mice. Here we aimed to test the role of PLC $\gamma$ 2 in *in vivo* bone me-

tabolism, as well as in *in vitro* osteoclast cultures using PLC $\gamma$ 2-deficient (PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup>) mice.

**Materials and methods:** The trabecular architecture of the distal femoral metaphysis of wild-type (WT) and PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> mice was tested by micro-CT analysis. Bone marrow cells were isolated from long bones of WT and PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> mice, and then differentiated into osteoclasts *in vitro* in the presence of recombinant M-CSF and RANKL. For retroviral reconstitution of osteoclast precursors, Platinum-E cells were transfected with a bicistronic MSCV-based retroviral vector expressing PLC $\gamma$ 2 along with GFP from an internal ribosome entry site. Viral supernatants were collected and incubated with fetal liver cells obtained from WT and PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> embryos, and the cells were then differentiated into osteoclasts *in vitro*. Osteoclast development, function and gene expression was tested using *in vitro* osteoclast and macrophage cultures. For intracellular calcium measurements, the cells were loaded with 5  $\mu$ M Fura-2-AM, 0.05% pluronic F127 and imaged with a fluorescent microscope.

**Results:** PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> mice had significantly higher trabecular bone mass under basal conditions than WT mice. PLC $\gamma$ 2 was required for *in vitro* development and resorptive function of osteoclasts, but not for the upregulation of osteoclast-specific genes. Bone marrow derived WT osteoclasts showed long lasting oscillations in the intracellular calcium concentrations, while the genetic deficiency of PLC $\gamma$ 2 completely blocked calcium-oscillations in the PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> osteoclast cultures. Retroviral reconstitution of PLC $\gamma$ 2 into PLC $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> fetal liver derived osteoclast cultures – but not mock infection – restored the ability of the cells to show oscillations in the intracellular calcium levels.

**Conclusion:** Our results indicate that PLC $\gamma$ 2 participates in bone resorption under basal conditions, likely because of its role in the development of calcium-oscillations in osteoclasts.

#### MELANOMA CELL DERIVED EXOSOMES ALTER THE MICROENVIRONMENT OF MALIGNANT TUMORS VIA RE-EDUCATION OF MESENCHYMAL STEM CELLS BY miRNAs

GYUKITY-SEBESTYÉN EDINA<sup>1</sup>, HARMATI MÁRIA<sup>1</sup>, DOBRA GABRIELLA<sup>1</sup>, MARTON ANNAMÁRIA<sup>1</sup>, KATONA L. RÓBERT<sup>1</sup>, HORVÁTH PÉTER<sup>1</sup>, NAGY ISTVÁN<sup>1</sup>, VIZLER CSABA<sup>1</sup>, BUZÁS KRISZTINA<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Hungarian Academy of Sciences, Biological Research Centre, Szeged, Hungary

<sup>2</sup>University of Szeged, Faculty of Dentistry, Szeged, Hungary

**Introduction:** Malignant melanoma is the most aggressive skin cancer. The mechanism of its rapid metastasis formation, high genetic variability and effective immune escape mechanisms are not explained yet. Exosomes are among the potential mediators of communication between melanoma cells

and their environment. To explore the interaction of melanoma cell derived exosomes (mcde) and their microenvironment, we investigated their effect on mesenchymal stem cells (MSC).

**Material and methods:** Murine primary MSCs from adipose tissue were pretreated with B16F1 melanoma cell derived exosomes. Exosomes were stained by lipophilic dyes and their uptake into recipient cells was visualised. Then the rate of spontaneous apoptosis and expression of multipotent stromal cell markers were analyzed by flow cytometry.

To explore the potential *in vivo* tumor-promoting effect of exosomes, B16F1 tumor bearing mice were injected with mcde-conditioned MSCs *i.v.*; the control mice received untreated MSC.

Because we hypothesized that the significant component of exosomal information packages are the carried miRNA content, we sequenced the whole miRNA spectra by SOLiD 5500xl technology, and then the sequences were annotated in CLC Genomics Workbench version 5.5.1.

**Results:** After 1 hour incubation we have observed that the labeled exosomes internalized into MSCs. The exosome internalization was the highest after 4 hours treatment.

We have found marked differences in the expression CD44,  $\alpha$ 4 integrin, CD29, CD106, CD73 and Sca-1 after induction. The ratio of late apoptotic or necrotic/early apoptotic cells decreased after mcde treatment (0.43/1 versus 0.98/1).

In animal experiments, the survival rate at day 42th was 38% after mcde-conditioned MSC treatment versus 85% non conditioned MSCs.

We have found highest expression levels of mir205, mir31, mir21a, mir15b, respectively.

**Conclusion:** Our data suggest that melanoma cell derived exosomes could re-educate mesenchymal stem cells, giving rise to a cell population that supports metastasis formation. The potential inducer of MSC re-education might be the miRNA content of exosomes.

#### CAN STANDARDIZED PLANT EXTRACTS CONTAINING PAMP LIKE STRUCTURES INDUCE COMPLETE REMISSION IN PATIENTS WITH METASTATIC TUMOURS?

HAJTÓ TIBOR<sup>1</sup>, KIRSCH ANGELIKA<sup>2</sup> AND PERJESI PÁL<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Pharmaceutical Chemistry, Medical University Pécs, Hungary

<sup>2</sup>Private practice, Binningen, Switzerland

**Background:** The prognostic significance of malignant tumour-induced imbalance in the innate immune system is well known. The innate system uses a limited number of Pattern Recognition Receptors (PRR) to recognize conserved Pathogenic Associated Molecular Pattern (PAMP) structures

expressed by microbes but not by the host. PRR engagement often leads to activation of natural immune cells which are important in the tumour defence. Growing evidence supports the hypothesis that similar to microbes various plant extracts can also contain PAMP-like structures which can activate cellular immune functions. Since the chemical production of PAMP structures can be hardly accomplished, standardized plant preparations may be promising for the future tumour therapy.

**Objectives:** The aim of this lecture is to present and discuss several favourable clinical responses of tumour patients treated with immunologically effective Enzymatic Lectin Linked Assay (ELLA)-standardized plant extracts (containing PAMP-like structures) as a co-treatment of conventional oncologic therapies.

**Results:** Patients were given two (commercially available) plant preparations standardized on the base of their lectin-sugar interactions. The immunologically optimal doses were given in an interval to which the regulation was the most appropriately adapted. Case reports gave an account of complete or nearly complete remissions in patients with hepatic metastases treated with these standardized plant immunomodulators combined with or without conventional oncologic therapy. These clinical responses are therefore surprising since as it is well known that hepatic tumours rarely disappear completely after conventional oncotherapy and the duration of responses is short.

**Conclusion:** Standardized plant extracts with immunomodulatory effects based on PAMP – PCR interactions seem to be potent candidates for a supportive therapy of metastatic tumours.

#### EPSTEIN-BARR VIRUS INFECTION INDUCE MELANOMA CELL MIGRATION

HARMATI MÁRIA<sup>1</sup>, GABRIELLA DOBRA<sup>1</sup>, EDINA GYUKITY-SEBESTYÉN<sup>1</sup>, ANNA FARAGÓ<sup>1</sup>, FERENC BÁNÁTI<sup>2</sup>, KRISZTINA BUZÁS<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Hungarian Academy of Sciences, Biological Research Centre, Szeged

<sup>2</sup>RT-Europe Nonprofit Research Ltd., Mosonmagyaróvár

<sup>3</sup>University of Szeged, Faculty of Dentistry, Szeged

**Introduction:** Epstein-Barr virus (EBV) and cytomegalovirus (CMV) are human herpes viruses with oncogenic potential. They are associated with several malignancies (Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas, HIV/AIDS lymphomas, lymphoepithelioma-like carcinomas, colon carcinoma, Kaposi's sarcoma, cervical carcinoma etc.), however the relationship between these viruses and melanoma is scarcely investigated. Only scattered clinical studies demonstrate that some nevi and malignant melanomas are also related with EBV infection.

Exosomes are nanometer-size extracellular vesicles. These small information packages are generated via endosomal way and carry wide spectra of molecules, e.g. miRNA, mRNA, signal molecules, proteins, viral elements, receptor components.

Our aim was to show whether these herpes viruses can play a role in the invasiveness of melanoma through induction of melanoma cell migration.

**Methods:** Migration of NHME melanocyte cells toward the supernatant of EBV transformed B lymphocyte cell culture as chemoattractant was observed with ibidi 2D chemotaxis assays using  $\mu$ -Slide Chemotaxis<sup>2D</sup> and  $\mu$ -Slide Chemotaxis<sup>3D</sup>. The potential role of EBV infection in the malignant transformation of melanocytes was also investigated by searching viral miRNA, analyzing the miRNA content of melanoma cell derived exosomes with GeneChip miRNA Array (Affimetrix).

**Results:** We have found significant migration of NHME melanocytes induced by EBV transformed B lymphocyte supernatant in the real time 2D chemotaxis assays.

MicroRNA analysis showed that B16F1 melanoma cell derived exosomes carry EBV and CMV microRNAs, however, the genome or proteins of these viruses were not detected in the cells.

**Conclusions:** Our results support our working hypothesis that the EBV infection not only facilitate malignant transformation of melanocytes, but, during the malignant course, could increase of tumor invasiveness, number of metastasis and the progression of disease.

#### REGULATION OF BLOOD CELL FATE AND SESSILE TISSUE FUNCTION IN DROSOPHILA MELANOGASTER

HONTI VIKTOR<sup>1</sup>, GÁBOR CSORDÁS<sup>1</sup>, GERGELY ISTVÁN VARGA<sup>1</sup>, RÓBERT MÁRKUS<sup>1</sup>, FERENC JANKOVICS<sup>2</sup>, ÉVA KURUCZ<sup>1</sup> AND ISTVÁN AND<sup>1</sup>

<sup>1</sup>HAS BRC, Institute of Genetics, Immunology Unit

<sup>2</sup>HAS BRC, Institute of Genetics, Developmental Genetics Unit

**Introduction:** The differentiation of hemocytes, the blood cells of *Drosophila melanogaster*, is regulated by conserved epigenetic and transcription factors. The compartmentalization of hemocytes shows several analogies to their mammalian counterparts. In the larva, hemocytes are located in three hematopoietic compartments: the lymph gland, the sessile hematopoietic tissue and the circulation. The lymph gland was described as a hematopoietic niche that contains precursor hemocytes. Although genetic experiments led to the comprehension of a complex regulatory network within the lymph gland, less is known about factors that maintain the integrity and ensure the function of the sessile tissue. To understand regulatory mechanisms and to identify differentiation factors in the sessile tissue, we use a special trans-

genic system that enables tracing and cell fate transformation of entire hemocyte lineages.

**Methods:** We developed a transgenic system via which we analyzed the effect of silencing and ectopic expression of several factors on hemocyte differentiation. Hemocytes were characterized by the expression patterns of our specific immunological markers and transgenic reporters. Larvae were analyzed with our newly established *in vivo* confocal video-microscopy and immunofluorescence method (Csordás et al. 2014).

**Results:** We identified two factors – Eater and Headcase – that play a role in the maintenance of integrity and in the regulation of hemocyte differentiation in the sessile tissue. Silencing of eater resulted in the disintegration of the sessile tissue without the differentiation of lamellocytes. Silencing of headcase led to the loss of plasmatocyte marker expression and to the differentiation of lamellocytes. We found that the sessile hemocytes are interconnected with cytonemes that appear upon immune induction and in late larval stage.

**Conclusions:** Eater is responsible for hemocyte attachment in the sessile tissue. Headcase is a repressor of lamellocyte cell fate and may play a role in the communication of hemocyte compartments. Cytonemes may serve as universal tools in the communication of hemocytes for non-cell-autonomous differentiation events.

**Acknowledgement:** This research was supported by grants from the Hungarian Science Foundation, OTKA grant NK 101730 (IA), TÁMOP 4.2.2.A-11/1KONV-2012-0035 (IA). This research was supported by the European Union and the State of Hungary, co-financed by the European Social Fund in the framework of TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 'National Excellence Program' (for VH and GIV).

#### FINDING THE MOST RESPONSIVE B CELL POPULATION WITH INDUCIBLE REGULATORY PHENOTYPE IN MICE

HUBER KRISZTINA, GABRIELLA SÁRMAJ, DOROTTYA KÖVESDI

Department of Immunology, Eötvös Loránd University, Budapest, Hungary

A specific and functionally important subset of B cells – known as regulatory B (Breg) cells – are specialized to suppress immune responses and control various immunological diseases, like autoimmunity. Regulatory B cells are characterized by cell surface markers and by the inducible IL-10 production.

Different activation signals, including Toll-like receptors (TLRs), B cell antigen receptor (BCR) or CD40-stimulation can trigger the regulatory transformation of certain B cells but it is not clear which of these signals are the most effective and which B cells have the most susceptible phenotype. In our work we studied three different subpopulations of B cells

found in murine spleen (Transitional-2-Marginal Zone Precursors (T2-MZP), Marginal Zone (MZ) and Follicular (FO) B cells), which are all natural sources of regulatory B cells. We aimed to find the most responsive B cell pool and generate Breg cells through the stimulation of the BCR and TLR9 and to further characterize the signalling cascades leading to their suppressive function.

We set up different *in vitro* cultures using sorted B cells from T2-MZP, MZ or FO B cell pools from the spleen of DBA/1 mice and stimulated them via their BCR and/or TLR9 for different times. The tendency of regulatory transformation was checked by IL-10 production using IL-10-specific ELISA or fluorescent intracellular IL-10 staining. The number of IL-10 producing B cells were detected by FACS analysis.

Based on our experimental set up, we found that B cells from the marginal zone compartment transformed most efficiently into regulatory cells and showed the highest tendency to produce the suppressive IL-10 cytokine. The *in vitro* generation of Breg cells will help us to study their signalling characteristics and their role in the remission of different autoimmune diseases.

This project was supported by OTKA NK 104846 and by the János Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences.

#### ANALYSIS OF DRUG LYMPHOCYTE TRANSFORMATION TEST

JAKOBICZ ESZTER<sup>1</sup>, PALOTÁS ZSUZSANNA<sup>1</sup>, BEBES ATTILA<sup>1</sup>, GROMA GERGELY<sup>1</sup>, LÁSZLÓNÉ GORDOS EDIT<sup>1</sup>, ÓNODI KATINKA<sup>1</sup>, KEMÉNY LAJOS<sup>1,2</sup>, BATA-CSÖRGŐ ZSUZSANNA<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>University of Szeged, Department of Dermatology and Allergology, Szeged, Hungary

<sup>2</sup>University of Szeged, Dermatological Research Group of the Hungarian Academy of Sciences, Szeged, Hungary

**Introduction:** Drug hypersensitivity is a considerable problem in medical practice due to its occasionally life threatening manifestations and its limiting impact on the choice of medication. Among the *in vitro* methods, lymphocyte transformation test (LTT) is considered to be one of the best methods for the detection of drug hypersensitivity. In the present study we aimed to determine the cell populations that respond to drugs in the test.

**Materials and methods:** Patients with previous positive LTT results were enrolled in the study. Lymphocyte transformation tests were repeated as described previously [1]. Using flow cytometry we analyzed the composition of the cell cultures that gave positive LTT results. For labeling the different subsets of cells the following markers were used: CD2, CD3, CD4, CD8, CD19 and CD56.

**Results:** Out of the 25 previously positive tests done in 17



patients with 25 different drugs only 4 remained positive at the repeated test. In all other cases the previous LTT positivity disappeared. The time frame, in which LTTs remained positive, was between 3 to 9 months. Flow cytometric analysis of 3 positive lymphocyte transformation tests revealed no uniform pattern in the composition of the investigated cell populations following drug activation. Our analysis of the lymphocyte transformation tests suggests that various drugs are likely to target different populations of cells in the test. It is also possible, that the observed differences parallel the different clinical forms of drug hypersensitivity reactions, since these 3 patients had different clinical reactions.

**Conclusions:** Our data indicate that LTT positivity is not long lasting. To detect uniform patterns in the proliferation of the investigated cell types, additional LTT positive patients need to be investigated.

[1] Bata-Csörgő Zs, Altmayer A, Garaczi E et al. *Bőrgyógy Vener Szle.* 85:34-36, 2009.

#### FACTOR H INHIBITS LIPOSOMAL AND MICELLAR DRUG-INDUCED COMPLEMENT ACTIVATION

JÓZSI MIHÁLY<sup>1</sup>, TAMÁS MÉSZÁROS<sup>2</sup>, ÁDÁM I. CSINCSI<sup>1</sup>, TAMÁS FÜLÖP<sup>2</sup>, BARBARA UZONYI<sup>3</sup>, JÁNOS SZEBENI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>MTA-ELTE „Lendület” Complement Research Group, Department of Immunology, Eötvös Loránd University, Budapest, Hungary

<sup>2</sup>Nanomedicine Research and Education Center, Semmelweis University, Budapest, Hungary

<sup>3</sup>MTA-ELTE Immunology Research Group, Department of Immunology, Eötvös Loránd University, Budapest, Hungary

**Introduction:** Complement activation-related pseudoallergy (CARPA), which includes non-IgE-mediated allergic (infusion) reactions to particulate drugs, can occasionally be severe, or even lethal. This phenomenon represents a major immune barrier to the therapeutic use of many state-of-the-art “nanomedicines”, including the antifungal drug, liposomal Amphotericin-B (AmBisome) and paclitaxel (Taxol), the most widely used anticancer drug that is solubilized by Cremophor EL (CrEL) micelles. Both AmBisome and CrEL were shown earlier to activate complement partly via the alternative pathway (AP), and to induce CARPA in model animals, with symptoms mimicking the human anaphylactic reaction to these drugs. Therefore, it was hypothesized that inhibiting complement might interfere with the CARPagenic activity of these drugs. The main natural inhibitor of the AP is factor H. The aim of the present study was to assess the capacity of factor H to inhibit Ambisome- and CrEL-induced complement activation *in vitro*.

**Methods:** Recombinant factor H fragments, the artificial

construct “mini-factor H” that combines the complement regulatory and surface-recognition domains of factor H, and the factor H-related protein CFHR1 were produced in Sf9 insect cells. Complement activation was measured in normal human sera by measuring the formation of SC5b-9 with Quidel’s TCC ELISA. As positive control we used zymosan A.

**Results:** Both Ambisome and CrEL caused significant, 4-8-fold increase of SC5b-9 over baseline, although the rise of SC5b-9 was less than that caused by zymosan A. Purified factor H exhibited a dose-dependent inhibiting effect on drug-induced complement activation. Exogenous factor H, added at 200 µg/mL concentration, led to >50% and >80% reduction of liposome- and CrEL-induced complement activation, respectively. Addition of recombinant factor H N-terminal fragment in equimolar amount had similar, but weaker, inhibitory effect on SC5b-9 generation, whereas a factor H C-terminal fragment and the factor H-related protein CFHR1 had no inhibitory effect under the assay conditions. Mini-factor H was a more potent inhibitor of both Ambisome- and CrEL-induced complement activation compared with factor H.

**Conclusion:** Our data suggest that factor H might play a key role in reducing CARPA and that the use of factor H or factor H-derived inhibitors could be a potentially useful approach to prevent this adverse immune effect of the studied and probably many other nanomedicines as well.

#### SYSTEMATIC COMPARISON OF DIFFERENT METHODS FOR THE MEASUREMENT OF C1 INHIBITOR ANTIGENIC CONCENTRATION

KAJDÁCSI ERIKA, VESZELI NÓRA, MADARASI IRÉN, FARKAS HENRIETTE, VARGA LILIAN, CERVENAK LÁSZLÓ

Semmelweis Egyetem III. Sz. Belgyógyászati Klinika, Kutatólabor, Budapest

**Introduction:** Hereditary angioedema (HAE) due to C1-inhibitor (C1-INH) deficiency is a potentially life-threatening rare disease caused by the decreased activity of C1-INH. In HAE type I decreased C1-INH activity is caused by the decreased production of C1-INH. In HAE type II patients the antigenic level of C1-INH is normal or increased with depressed inhibitory activity. The diagnosis can be established based on the measurement of the C1-INH antigenic concentration (C1-INHa) and the C1-INH functional activity (C1-INHf). Several methods are available to measure both C1-INHa and C1-INHf. In our study we aimed to compare measuring C1-INHa with radial immuno-diffusion (RID) and with ELISA.

**Methods:** RID have made with polyclonal anti-C1-INH antibody from Quidel (San Diego). To the in-house ELISA we used the same antibody from Quidel (San Diego), and the biotinylated Quidel’s antibody as secondary antibody. Different dilutions of plasma derived human C1-INH (CSL Behring)

was used as standards and to determine the measurable range. We compared C1-INHa tests in different sample types (serum, EDTA-, citrated-, hirudin plasma) taken from healthy volunteers.

**Results:** The measurable concentration in RID is 10000 fold higher than in ELISA. The linear range is longer in ELISA than in RID (2.1 Log vs. 1.5 Log). Interestingly, despite the superior sensitivity and linearity of ELISA, C1-INHa measure by ELISA was systematically 0.5 fold lower than measured by RID. There is a difference by the two methods according to the type of the sample (serum, EDTA-, citrated- or hirudin plasma) used in the measurements. In the RID method the C1-INHa levels detected from citrated plasma are lower than from the other sample types (average 0.86 fold), whereas in the case of ELISA this difference is more pronounced (average 0.68 fold). Matrix effect did not alter significantly the measurable C1-INHa levels tested by either methods, i.e. the same values were calculated when the samples were serially diluted.

**Discussion:** Despite the longer linear range and large sensitivity of ELISA method we can measure 2 fold higher C1-INHa levels with the RID assay. We can conclude that despite the differences we found both RID assay and ELISA method is feasible for measuring C1-INHa, however, it is important that the results given by the two methods cannot compare directly. All sample types is usable in both RID assay and ELISA method, while C1-INHa levels measured from citrated plasma are lower than C1-INHa levels measured from the other sample type in both assays, the usage of citrated plasma is less proposed.

#### CHARACTERIZATION OF PERIPHERAL BLOOD DENDRITIC CELLS IN ATOPIC DERMATITIS

KAPITÁNY ANIKÓ<sup>1,2</sup>, BÉKE GABRIELLA<sup>1,2</sup>, NAGY GEORGINA<sup>1,2</sup>, DOAN-XUAN QM3, BACSÓ ZSOLT<sup>3</sup>, GÁSPÁR KRISZTIÁN<sup>1,2</sup>, BOROS GÁBOR<sup>2</sup>, MÓCSAI GÁBOR<sup>1,2</sup>, DAJNOKI ZSOLT<sup>1,2</sup>, BÍRÓ TAMÁS<sup>4</sup>, RAJNAVÖLGYI ÉVA<sup>5</sup>, SZEGEDI ANDREA<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Division of Dermatological Allergology

<sup>2</sup>Department of Dermatology

<sup>3</sup>Department of Biophysics and Cell Biology

<sup>4</sup>DE-MTA „Lendület” Cellular Physiology Research Group,

<sup>5</sup>Department of Immunology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

**Introduction:** Dendritic cells (DCs) as the main antigen presenting cell type play crucial role in the pathogenesis of atopic dermatitis (AD). Characteristics of the DCs located in the skin of AD patients are well defined but less is known about their peripheral blood DC precursors. Therefore we aimed to characterise the myeloid pre-DCs separated from

the blood of patients with AD, to examine their phenotypical features and chemokine production in order to determine if they differ from myeloid pre-DCs in the blood of healthy controls.

**Methods:** Peripheral blood myeloid pre-DCs were separated from the blood of 12 AD patients and 10 healthy controls using CD1c+/BDCA1+ magnetic separation kit. Cell surface markers were examined with Flow Cytometry while chemokine production was investigated with the help of Chemokine Antibody Array.

**Results:** Focusing on CD1c+ and CD11c + cells we found, that the cells separated from the blood of patients with AD expressed more FcεRI (56,23% vs. 27,48%) and less CD206-mannose receptors (45,8% vs. 66,2%) on their surface than the cells, that were originated from healthy controls. Moreover pre-DCs from AD patients exclusively produced not just the AD related CCL17 and CCL18, but also those chemokines, which are characteristic for maturing DCs (CCL3, CCL4, CCL5, CCL19).

**Conclusion:** Our results indicate that circulating pre-DCs deriving from AD patients are more matured and activated than the cells that derive from healthy persons and therefore may contribute to the pathogenesis of AD.

#### THE ANALYSIS OF THE RASPBERRY GENE IN THE IMMUNE RESPONSE OF DROSOPHILA

KARI BEÁTA, GÁBOR CSORDÁS, JÁNOS ZSÁMBOKI, VIKTOR HONTI, ISTVÁN ANDÓ, ÉVA KURUCZ

Biological Research Centre of the Hungarian Academy of Sciences, Institute of Genetics, Laboratory of Immunology, Szeged, Hungary

**Introduction:** *Drosophila melanogaster* has an effective immune system consisting of humoral and cellular arms, resembling the innate immune system of vertebrates. This feature makes *Drosophila* a suitable model organism to study general mechanisms of innate immunity. The effector elements of the immune response are the hemocytes. A subset of hemocytes, the plasmatocytes are capable of engulfing microorganisms, the crystal cells are involved in the melanization. The third hemocyte type in the larvae, the lamellocytes, mainly differentiate from plasmatocytes upon immune induction and participate in the encapsulation of large foreign particles, like the eggs of the parasitoid wasp *Leptopilina boulardi*.

**Methods:** We developed and validated a method, which imitates injury that often occurs in the natural habitat (Kari et al., *J. Immunol. Methods.*, 2013) and provides a tool to identify factors instrumental in the defense after septic injury.

**Results:** By using the above technique in a directed

screen, we have found that the raspberry gene is involved in the defense after septic injury. Raspberry encodes the *Drosophila* enzyme inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH), a key enzyme of the *de novo* synthesis of guanine nucleotides. The raspberry mutant flies have decreased survival rate after *B. cereus* infection. Furthermore, after exposure to the parasitic wasp *Leptopilina boulardi*, improper capsule formation and a decrease in the melanotic encapsulation rate is observed in the mutants. In addition, the eclosion rate of wasps is higher in the raspberry mutants compared to the control wild type flies.

**Conclusions:** Our results show that raspberry gene is involved in defense to bacterial and parasitic infection. The mammalian orthologues, the IMPDH proteins also have a role in immune-phenomena, therefore we may conclude that they could regulate phylogenetically conserved mechanisms in innate immunity.

**Acknowledgements:** We thank Olga Kovalcsik, Anita Balázs, Szilvia Tápai and Anikó Képiró for technical assistance. The research was financed by the Hungarian Science Foundation, OTKA grant NK-101730, and TÁMOP 4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0035 (IA).

#### DISTINCTION OF Fc $\gamma$ RECEPTOR ISOFORMS BY FLOW CYTOMETRY

KECSE-NAGY CSILLA<sup>1</sup>, ZOLTÁN SZITTNER<sup>2</sup>, JÓZSEF PRECHL<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Immunology, ELTE, Budapest, Hungary

<sup>2</sup>MTA-ELTE Immunology Research Group, Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary

The human leukocytes bind IgG isotype antibodies through their Fc $\gamma$  receptors, therefore these receptors have an important role to link the adaptive and the innate immune systems. Human Fc $\gamma$  receptors consist of three main groups: Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII and Fc $\gamma$ RIII. Fc $\gamma$ RII have three isoforms: Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIB and Fc $\gamma$ RIIC. Fc $\gamma$ RIII have two isoforms: Fc $\gamma$ RIIIA and Fc $\gamma$ RIIIB. Because of the high degree of homology these isoforms are often difficult to distinguish. We set out to characterize expression of Fc $\gamma$ R isoforms using affinity reagents and a biochemical method.

We examined the Fc $\gamma$ RII and the Fc $\gamma$ RIII isoform expression of cells in whole blood by flow cytometry, along with the U937 monocytoid cell line. We determined the Fc $\gamma$ RII isoform expression with receptor specific antibodies and Fc $\gamma$ RIII expression by digesting the GPI-anchored Fc $\gamma$ RIIIB with phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC). We used U937 cells as reference, as these cells express the Fc $\gamma$ RIIA and the Fc $\gamma$ RIIB receptors as well.

We confirmed that the Fc $\gamma$ RIIA isoform specific antibody (clone IV.3) bound only to the Fc $\gamma$ RIIA isoform, no binding to B cells carrying only Fc $\gamma$ RIIB was observed. On the other

hand, we found the Fc $\gamma$ RIIB specific antibody (clone 2e1) to bind Fc $\gamma$ RIIA, as well. Using U937 cells we quantitated differences in the ratio of Fc $\gamma$ RII isoforms on neutrophil granulocytes of various donors. We successfully distinguished the Fc $\gamma$ RIIIA and the Fc $\gamma$ RIIIB expressing cells with the PI-PLC enzyme. Following the removal of the GPI-anchored Fc $\gamma$ RIIIB, the Fc $\gamma$ RIII specific antibody (clone 3g8) showed lower binding compared to the undigested control in populations where Fc $\gamma$ RIIIB isoform is expressed.

These studies lay the grounds for a multiplex, protein microarray-based method for the characterization of cell adherence to arrayed human IgG subclasses. The U937 cells are suitable as a reference cells for examining Fc $\gamma$ RII isoforms' ratio of neutrophil granulocytes in human donors.

These studies are supported by OTKA 109683 grant of the National Science Fund.

#### APPEARANCE OF PNAD+ HEVS IN THE ABSENCE OF MADCAM-1 IN NKX2-3<sup>-/-</sup> MICE IS DEPENDENT ON LT $\beta$ R ACTIVATION

KELLERMAYER ZOLTÁN, PÉTER BALOGH

University of Pécs, Department of Immunology and Biotechnology

**Introduction:** In the absence of Nkx2-3 transcription factor mice lack endothelial mucosal addressin cell adhesion molecule (MAdCAM-1) expression, needed for lymphocyte homing to the mucosa. Previously we have shown that this leads to the compensatory upregulation of PNAd only in the mesenteric lymph nodes (mLN) and Peyer's patches (PP) of the intestine, but not the lamina propria vessels. We hypothesized that the appearance of PNAd+ high endothelial venules (HEVs) requires activation of the lymphotoxin beta receptor (LT $\beta$ R) by various ligands expressed on mature lymphocytes. We also examined how the altered addressin profile affects PP cellular composition and homing velocity.

**Materials and methods:** Double mutant Nkx2-3<sup>-/-</sup>-xRag1<sup>-/-</sup> mice were created by crossing single mutant mice and were identified by PCR with primers for Nkx2-3, Rag1 and Neomycin phosphotransferase genes. Nkx2-3 deficient neo-natal mice were injected intraperitoneally at P1, P3, and P5 with LT $\beta$ R-Ig fusion protein. Multicolor immunofluorescence was performed with anti-CD45, anti-MadCAM-1 and anti-PNAd mAbs. Adult PPs were analyzed with flow cytometry with anti-CD3, anti-B220, anti-FoxP3, anti-CD25, and anti-CD4 mAbs to compare lymphocyte subsets in Nkx2-3 deficient and wild type mice. Fluorescently labeled donor lymphocytes were injected intravenously. Distribution of homed cells was examined with immunofluorescence by costaining tissue sections with anti-endothelial mAbs.

**Results:** Primordial PPs in young adult Nkx2-3<sup>-/-</sup>-xRag1<sup>-/-</sup>

mice contained few PNAd<sup>+</sup> HEVs. Treatment of neonatal Nkx2-3 mice with LTβR-Ig fusion protein led to the complete absence of PNAd and the disappearance of residual MAdCAM-1. Cell extravasation through PNAd<sup>+</sup> vascular segments in mutant PPs was significantly slower compared to wild type samples. Adult PPs in Nkx2-3 mutant mice contained higher number of CD3<sup>+</sup> T cells and regulatory T cells and significantly less B cells.

**Conclusions:** Our results indicate that appearance of PNAd<sup>+</sup> HEVs requires activation of LTβR. However, this signal can be delivered by non-T/non-B cells as Nkx2-3<sup>-/-</sup>xRag1<sup>-/-</sup> mice lacking mature B and T cells expressed PNAd<sup>+</sup> vessels. The switch in addressin profile influences the lymphocyte composition and also the rate of cell homing to mutant PPs.

Supported by OTKA K108429

#### GLOBAL ANALYSIS OF RXR-REGULATED GENES IN MACROPHAGES REVEALS A GENE NETWORK POTENTIALLY INVOLVED IN PROMOTING ANGIOGENESIS AND METASTASIS

KISS MÁTÉ<sup>1</sup>, DÁNIEL BENCE<sup>1</sup>, CZIMMERER ZSOLT<sup>1</sup>, PAP ATTILA<sup>1</sup>, PÓLISKA SZILÁRD<sup>2</sup>, NAGY LÁSZLÓ<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, Research Center for Molecular Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

<sup>2</sup>Center for Clinical Genomics and Personalized Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

<sup>3</sup>MTA-DE „Lendület” Immunogenomics Research Group, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

**Introduction:** Retinoid X receptor (RXR), a member of the family of nuclear receptors, is activated by vitamin A metabolite 9-cis-retinoic acid and fatty acids and acts as the obligate heterodimeric partner of several nuclear receptors, like PPAR, LXR, or RAR. Thus, RXR can mediate diverse signaling pathways simultaneously as a component of various heterodimers. Nevertheless, the global pattern of RXR-regulated gene expression changes in macrophages has not yet been analyzed. Our aim was to examine the genome-wide effect of the absence of RXR (loss of function) as well as specific activation of the receptor (gain of function) in macrophages, and identify novel RXR-dependent gene networks potentially involved in the regulation of macrophage metabolism and immune function.

**Methods:** Bone-marrow-derived macrophages (BMDMs) from Lys-M-Cre RXRα<sup>+/+</sup>β<sup>-/-</sup> (control) and Lys-M-Cre RXRα<sup>fllox/fllox</sup>β<sup>-/-</sup> (macrophage RXR KO) animals were treated with pan-RXR agonist LG268. Changes in mRNA expression induced by specific RXR activation or the absence of RXR were detected by microarray analysis. The angiogenic

potential of RXR-activated BMDMs was assessed by human umbilical vein endothelial cell (HUVEC)-based tube formation assay. Primary and metastatic tumor development in animals transplanted with macrophage RXR KO bone marrow was studied in B16-F10 mouse melanoma xenograft model.

**Results:** The absence of RXR in BMDMs resulted in the altered expression of 141 genes (fold change ≥ 1.3; p ≤ 0.05), which comprised a gene network linked to macrophage adhesion and tissue accumulation. In addition, several of these genes (e.g. S100a8, S100a9, Camp, Sell) have been previously shown to regulate the pro-metastatic action of macrophages. We found 103 genes, which were regulated by specific RXR activation in BMDMs. Among the upregulated genes we found Vegfa, one of the crucial mediators of tumor angiogenesis. Using Ingenuity Pathway Analysis, we identified several additional RXR-induced genes (e.g. Hbegf, Nus1, Serpine1) also implicated in angiogenesis. Accordingly, RXR-activated macrophages showed enhanced angiogenic potential in HUVEC tube formation assay *in vitro*. However, primary B16-F10 melanoma tumor growth was unimpaired in macrophage RXR KO animals, suggesting that RXR expressed by tumor-infiltrating macrophages is dispensable for tumor vascularization. In contrast, mice lacking macrophage RXR had a significantly higher number of B16-F10 lung metastases.

**Conclusion:** Our results suggest that *in vitro* RXR activation generates a macrophage phenotype possessing pro-angiogenic capacity. Based on our *in vivo* observations we hypothesize that this signaling pathway is presumably either inactive or silenced in the primary tumor microenvironment, but has a potential role altering pro-metastatic activity of macrophages.

#### INVESTIGATION OF ZAP-70 EXPRESSION IN THE PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA USING FLOW CYTOMETRY

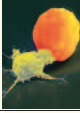
KOHL ZOLTÁN<sup>1</sup>, HAJNA LOSONCZY<sup>2</sup>, TIMEA BERKI<sup>1</sup>, FERENC BOLDIZSÁR<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UP, CC, Department of Immunology and Biotechnology

<sup>2</sup>UP, CC, 1st Department of Internal Medicine

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most common form of adult leukemia in the Western world. Two main subtypes of the disease had been previously defined, an indolent form and a more progressive variant.

ZAP-70 is a tyrosine kinase that plays a major role during the early phases of TCR signaling. Interestingly, ZAP-70 is expressed by the leukemic B-cells in a subgroup of CLL patients and has been shown to correlate with a worse clinical prognosis. Although the flow cytometric analysis of ZAP-70 expression in CLL was described more than a decade ago, it



is still not included in the diagnostic panel of CLL patients in Pécs due to technical difficulty.

Our main goal was to establish a reliable and reproducible flow cytometric method that could later be introduced into diagnostics. We also wanted to examine the correlation between ZAP-70 expression and the clinical parameters to see if the analysis has any prognostic value.

We performed our experiments on the peripheral blood of CLL patients and used the samples of healthy donors as controls. First we used fluorescently labeled anti-CD5 and anti-CD19 antibodies to distinguish the different lymphocyte subgroups, then performed hemolysis and fixation. We permeabilized the cell membranes with saponin and used ALEXA 647 conjugated anti-ZAP-70 antibodies for the intracellular labeling of ZAP-70 kinase. The samples were then analyzed using a FACS CANTO II flow cytometer. Cells which had higher fluorescence intensities than the autofluorescence of normal B-cells were considered ZAP-70 positive. The cut-off point of ZAP-70 positivity in the patients was defined as 20 percent of leukemic cells based on the literature.

Our experiments took place between Dec. 2013 and Sept. 2014. During this period 25 patients have been tested; five among them on more than one occasion with reproducible results. 40% (n=10) of the patients were found ZAP-70 positive which is similar to the results of previous studies. The median elapsed time between the diagnosis and the experiments was 7 years in the ZAP-70 positive and 8.3 years in the negative group. There was no significant difference regarding the ratio of treated patients (46% in the negative vs. 40% in the positive group, respectively), however, the median time to treatment in the negative group was longer (7.16 years) than in the positive (4.25 years). Positive patients close to the threshold seemed to belong to the indolent clinical subtype. Increasing the threshold of positivity to 30% of cells reflected better the progressivity, as in this case treatment was necessary in 57% of the positive and 39% of the negative patients. Yet, the final cut-off point of positivity still remains to be defined after further clinical evaluation.

Besides flow cytometric analysis, the confirmation of our results on ZAP-70 expression with Western-blot and PCR is in progress, together with the examination of the correlation with the clinical parameters in more detail.

#### HIGHER LEVEL OF KGF COULD INFLUENCE EDA+FN PRODUCTION IN FIBROBLASTS THROUGH THE MAPK CASCADE IN UNINVOLVED PSORIATIC SKIN

KONCZNÉ GUBÁN BARBARA<sup>1</sup>, KRISZTINA VAS<sup>1</sup>, ATTILA BEBES<sup>1</sup>,  
GERGELY GROMA<sup>1</sup>, MÁRTA SZÉLL<sup>2,3</sup>, LAJOS KEMÉNY<sup>1,2</sup>,  
ZSUZSANNA BATA-CSÖRGŐ<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>University of Szeged, Department of Dermatology and Allergology, Szeged, Hungary

<sup>2</sup>MTA-SZTE Dermatological Research Group, Szeged, Hungary

<sup>3</sup>University of Szeged, Department of Medical Genetics, Szeged, Hungary

**Introduction:** A growing body of evidence indicate that the healthy looking uninvolved psoriatic skin carries alterations. We have provided data that suggests that the EDA domain fibronectin (EDA+FN) and its receptor,  $\alpha 5$  integrin, are key molecules in the altered epidermal response in psoriasis. We also showed that keratinocyte growth factor (KGF, FGF7) and its receptor FGFR2 are overexpressed in the uninvolved psoriatic skin. Therefore, we investigated the putative regulatory link between KGF and EDA+FN and tried to determine signalling mechanisms in EDA+FN and FN1 production.

**Methods:** Fibroblasts were treated with human recombinant KGF. In blocking experiments, MEK1 (PD 098059), AKT1/2 (Akt inhibitor VIII), STAT1 (Epigallocatechin gallate) and STAT3 (Stattic) inhibitors were used. For FN1 gene silencing in fibroblasts a specific trilencer-27 siRNA was used. Real-time RT-PCR and flow cytometry analysis of EDA+FN and FGFR2 were carried out 24 hours after gene specific silencing of FN1. Secreted KGF protein levels were determined by ELISA.

**Results:** We carried out RTq-PCR and flow cytometric measurements to analyze EDA+FN and FN1 production 24 hours after applying exogenous KGF to cultured normal human fibroblasts. EDA+FN protein expression increased significantly following exogenous KGF treatment. To examine which major signaling pathways are affected by KGF inhibitory experiments were used. MEK1 inhibition abolished the changes in EDA+FN level triggered by KGF indicating the involvement of the MAPK cascade. Our data also suggest that EDA+FN and FN1 expressions are suppressed by STAT1 and STAT3. Knockdown experiments targeting the FN1 gene in normal human fibroblasts resulted in a significant increase in FGFR2 protein level, without affecting the mRNA expression. The amount of secreted KGF was not effected by the silencing of FN1.

**Conclusions:** Our data provide evidence for the existence of novel regulatory connections between the extracellular matrix fibronectin and KGF. Moreover, this autocrine loop is likely to be altered in the uninvolved skin of psoriatic patients, which may contribute to the pathomechanism of the disease.

## GENERATION AND CHARACTERIZATION OF AN ANALYTE LIBRARY REPRESENTING THE HUMAN PLASMA PROTEOME: APPLICATION FOR THE IDENTIFICATION OF COGNATE ANTIGENS CORRESPONDING TO MONOCLONAL ANTIBODIES

KOVÁCS ANDRÁS<sup>1, 2</sup>, ZOLTÁN PATAI<sup>2</sup>, EDIT SPERLING<sup>2</sup>, JÓZSEF LÁZÁR<sup>1, 3</sup>, ATTILA BALOGH<sup>3</sup>, ÁKOS SZEKRENYES<sup>2</sup>, JÁNOS KÁDÁS<sup>3</sup>, ANDRÁS GUTTMAN<sup>2, 5</sup>, ISTVÁN KURUCZ<sup>3</sup>, LÁSZLÓ TAKÁCS<sup>1, 3, 4</sup>

<sup>1</sup>BioDiagnostica Kft., Debrecen

<sup>2</sup>Horváth Laboratory of Bioseparation Sciences, Research Centre for Molecular Medicine, University of Debrecen, Debrecen

<sup>3</sup>BioSystems International Kft., Debrecen

<sup>4</sup>Monoclonal Antibody Proteomics Laboratory, Department of Human Genetics, University of Debrecen, Debrecen

<sup>5</sup>MTA-PE Translational Glycomics Group, MUKKI, University of Pannonia, Veszprém

**Introduction:** Human plasma contains a wide concentration range of proteins (12 orders of magnitude) with diverse biological functions. Due to its high complexity, the characterization and identification of medium or low abundant proteins often represent a difficult and time consuming task and require a large amount of sample. Monoclonal antibody proteomics uses a large number of monoclonal antibodies of unknown antigen specificity raised against complex biological samples. The antigen identification process includes the reaction of biological samples with antibodies, immunoprecipitation, SDS PAGE analysis, Western blot validation and mass spectrometric identification. The aim of this work was to generate and characterize an Analyte Library that contained hundreds of fractions of native plasma proteins, and to use the Library for antigen identification in conjunction with mAb proteomics.

**Methods:** First the albumin and immunoglobulins were depleted from 500 mL normal human plasma followed by pre fractionation by ammonium sulphate precipitation steps. Each precipitate was then further fractionated by size exclusion chromatography, followed by cation and anion exchange chromatography and hydrophobic interaction chromatography. The comprehensive screening of the Analyte Library with mAbs of known abundant antigens of biomarker potential was also part of the study to reveal the distribution of these proteins and to demonstrate the applicability of the Library for mAb proteomics. The identification of antigens corresponding to the mAbs was conducted by the workflow of monoclonal antibody proteomics.

**Results:** A 783 fraction containing Analyte Library comprising of native protein fractions was generated. The individual fractions contained some 10 or 100 proteins. As a result of the characterization, the Library was considered as applicable for monoclonal antibody proteomics-based antigen

identification; and the antigens corresponding to eight monoclonal antibodies have been successfully identified.

**Conclusion:** The Analyte Library and the developed method were applicable for monoclonal antibody proteomics-based antigen identification, and suggest the potential of the developed workflow in biomarker and protein identification research.

## EXPRESSION AND FUNCTION OF C3 AND C3AR IN HUMAN B CELLS – A NOVEL CROSS-TALK BETWEEN COMPLEMENT, TLRs AND ADAPTIVE IMMUNITY

KREMLITZKA MARIANN<sup>1</sup>, ZSÓFIA CSÁTI<sup>2</sup>, ANNA ERDEI<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>MTA-ELTE Immunological Research Group, Budapest, Hungary

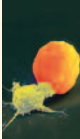
<sup>2</sup>Department of Immunology, Eötvös Loránd University, Hungary

**Introduction:** In addition to generating an immediate response against invading pathogens, the complement system is also involved in initiating and shaping the adaptive immune response via its activation products. One of the major cleavage fragments of the complement component C3, C3a, and its receptor (C3aR) have recently been shown to regulate T cell activation in both autocrine and paracrine manners. Since earlier studies regarding the expression and role of C3aR in human B cells are controversial, we decided to reinvestigate how C3/C3a might be involved in the regulation of certain B cell responses.

**Methods:** Expression of C3 and C3aR was investigated at the mRNA level by RT-PCR and at the protein level by flow cytometry, confocal microscopy and Western Blot. In functional experiments, resting tonsillar B cells were stimulated through the BCR and/or TLR9; and cytokine or Ig-secretion were assessed by ELISA. The phosphorylation level of intracellular molecules was investigated with Western Blot.

**Results:** We found that human B cells express C3 as well as C3aR both at the mRNA and at the protein level. While C3 appeared both intracellularly and at the cell surface, C3aR was expressed only inside the cell. C3a was chemotactically active on B cells even at nanomolar concentrations. Activation of the cells via the B cell receptor (BCR) or the Toll-like receptor 9 (TLR9) resulted in a twofold increase in the amount of intracellular C3 as well as C3aR, however the receptor could not be detected at the cell surface even after activation.

Incubation of B lymphocytes with C3a resulted in enhanced phosphorylation of AKT and mitogen-activated protein kinases, like p38, however IL-6 and IL-10 production and Ig-secretion was suppressed in a dose-dependent manner. Additionally, B-cell derived C3 and C3aR had a positive impact on allogeneic stimulation of T cells.



**Conclusion:** These results suggest that C3 and C3aR have a direct immunomodulatory effect on BCR- and TLR9-induced effector functions of B cells and reveal a novel interaction point between complement, TLRs and adaptive immunity.

#### STUDIES ON THE RECONSTITUTION OF T CELL PRODUCTION IN ZAP-70 DEFICIENT MICE

KUGYELKA RÉKA, ZOLTÁN KOHL, PÉTER NÉMETH, TÍMEA BERKI, FERENC BOLDIZSÁR

University of Pecs, Department of Immunology and Biotechnology

The ZAP-70 (70 kDa Zeta-Chain Associated Protein) kinase plays a crucial role in the signal transduction by the antigen receptor during T cell activation. It is essential in T cell differentiation as well, in its absence, T cell maturation is blocked in the double positive (CD4+CD8+) stage in the thymus, leading to the complete lack of mature  $\alpha\beta$  T cells in the periphery which results in severe immunodeficiency in both human and mice.

T cell maturation could be stably restored in ZAP-70 deficient mice by simple intraperitoneal (ip.) injection of thymocytes isolated from their wild type (ZAP-70 expressing) siblings. T cells appeared in the blood and lymphoid organs of the transferred mice and, importantly, the survival of the animals increased significantly, which clearly demonstrated the correction of the severe immunodeficiency.

In our present work investigated the characteristics and kinetics of the T cell reconstitution by monitoring the changes in the morphology and cellular composition of the thymus and peripheral lymphoid organs.

Following the thymocyte transfer of ZAP-70<sup>-/-</sup> mice the histology of the thymus and the appearance of T cells in the periphery were analyzed regularly. Flow cytometry revealed that 3 weeks after the ip. thymocyte transfer  $\alpha\beta$  T cells appeared in significant numbers in the blood, spleen and lymph nodes of the animals. This was preceded by the appearance of mature CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> cells in the thymus 2 weeks after the transfer. Using quantitative immunohistology we have found that the area of the medullary region increased after the transfer, which also indicated the normalisation of T cell maturation.

In future experiments, we plan to test the *in vivo* effects of ZAP-70 point mutations using ZAP-70 deficient mice. We will reconstitute the ZAP-70 molecule under the control of T cell specific promoter(s) into T cell precursors of ZAP-70 deficient mice. Using various mutant forms of ZAP-70 or the normal molecule we can investigate the effects on T cell development and function. As an important preliminary step, we have cloned the T cell specific proximal- and distal Lck

promoters and a CD4 minimal promoter construct. The T cell-specific activity of these promoter constructs was verified on cell lines using a lentiviral expression system.

We have managed to correct the severe T cell deficiency using adoptive thymocyte transfer. According to our results the transferred T cell progenitors with normal ZAP-70 expression level can induce long-term normalisation of T cell maturation. Combined with the T cell-specific expression of ZAP-70 variants we will possess an excellent tool to study T cell differentiation and function.

This work was funded by OTKA, K101493. and Bolyai Janos Research Scholarship to FB.

#### LUNG CANCER DIAGNOSTICS R&D: FAST TRANSLATION OF BIOMARKERS TO DIAGNOSTICS VIA MONOCLONAL ANTIBODY BIOCHIP TECHNOLOGY

LÁZÁR JÓZSEF<sup>1, 2</sup>, PÉTER ANTAL-SZALMÁS<sup>1, 3</sup>, MÓNICA MÜLLER<sup>4</sup>, STUART MCGREGOR<sup>5</sup>, ALEX CHACKO<sup>5</sup>, JOHN LAMMONT<sup>5</sup>, JÁNOS KÁDÁS<sup>2</sup>, ISTVÁN KURUCZ<sup>2</sup> AND LÁSZLÓ TAKÁCS<sup>1, 2, 5</sup>

<sup>1</sup>BioDiagnostica Kft., Debrecen, Hungary

<sup>2</sup>BioSystems International Kft., Debrecen, Hungary

<sup>3</sup>Department of Laboratory Medicine, Research Centre for Molecular Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

<sup>4</sup>Adware Research Ltd., Balatonfüred, Hungary

<sup>5</sup>Randox Laboratories Ltd., United Kingdom

**Introduction:** Mortality of lung cancer is 84%, the five-year survival only 16%. Diagnosis of the early stage lung cancer would increase five-year survival to 50–60% according to several publications, which would also have high individual and social impact. Due to the cost, irradiation dose and logistics, lung cancer screening via spiral CT scan is impractical. Thus, there is a high demand for a non-invasive, simple blood test, which could decrease the number of necessary CT scans. It is the goal of numerous research groups to develop such a test, however, today there is no sufficiently sensitive and specific product available on the market. Here, we report a paradigm for efficient translational R&D of a lung cancer test via monoclonal antibody proteomics mediated epitome profiling.

**Methods:** In order to obtain plasma epitome specific libraries (The QuantiPlasma series), mAb-s were produced to normalized human plasma in mouse using the patented technology of BSI. Selected BSI mAbs were printed on Randox platform: QuantiPlasma 69 (QP69) and QuantiPlasma 300 (QP300) biochip arrays. Plasma samples of healthy, COPD control and lung cancer bearing individuals were tested against biotinylated plasma tracers in an inhibition assay on the Randox Evidence Investigator Platform. Different statis-

tical methods such as hypothesis testing, random forest analysis, logistic regression modelling, and support vector machines were tested. ROC analysis was applied on the entire data set to determine the minimal number of mAbs/ epitopes for optimal power to distinguish between control and lung cancer patients' plasma.

**Results:** Plasma samples were screened on QP69 biochips (detects 69 epitopes) in three experimental set (128, 127 and 133 clinical samples). Hypothesis testing found 90, 37, 27 of significantly discriminating variables. The 12 common variables were used then in logistic regression model building and found 3-3-3 variables, which as an optimal panel able to distinguish between the two populations. Variable selection with random forest analysis was also done followed by logistic regression. In this case 2 out of 3 mAbs were the same, which included in this model. Quality of each models were evaluated in ROC analysis. Classical tumour markers along with BSI markers were also tested as input variables. On QP300 biochips (detect 300 epitopes) two different cohort were screened. Results confirmed high accuracy (> 0.95 AUC of ROC). Low complexity (<25 epitopes) Lung cancer chips were built and being tested.

**Conclusion:** QP69 and QP300 mAb biochips developed by BSI and Randox are useful screening tools for candidate variable selection for ultimate disease specific diagnostic tool development. The process presented here is more efficient, less costly and faster than translation that of hypothesis driven affinity reagent or MS proteomics based candidates.

#### DISSECTING THE HETEROGENEITY OF CD8+ RESIDENT MEMORY T CELLS: UNIQUE DIFFERENTIATION PROGRAMS AND LOCAL ENVIRONMENT SHAPE THE T<sub>RM</sub> PHENOTYPE

LUPSA NIKOLETT<sup>1,2</sup>, BARBARA MOLNAR-ERSEK<sup>1</sup>, PETER POCSA<sup>3</sup>,  
HARGITA HEGYESI<sup>4</sup>, ANETT TOTH<sup>1,2</sup>, ANDRAS FALUS<sup>2</sup>,  
GEZA SAFRANY<sup>4</sup>, EDIT BUZAS<sup>2</sup>, ZOLTAN POS<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>„Lendület” Experimental and Translational Immunomics Research Group, HAS – SU, Budapest

<sup>2</sup>Dept. of Genetics, Cell and Immunobiology, SU, Budapest

<sup>3</sup>1<sup>st</sup> Dept. of Pathology, SU, Budapest, 4<sup>th</sup>Frédéric Joliot-Curie” Inst. for Radiobiology and Radiohygiene, Budapest

We previously compared murine CD8+ T resident memory (CD8+ Trm) cell subsets of the small intestine, liver and lung by whole genome gene expression analysis. We showed that individual Trm subsets of distinct organs clearly differed from each other, involving differential expression of 42 genes related to critical aspects of CTL function.

In this study we sought to clarify whether these differences were exclusive to CD8+ Trm cells, or could be, at least in part, also evoked in other, nonresident CD8+ T cells ho-

ming to the same organs. A murine acute GVHD model was set up in that transplanted allogeneic cytotoxic effector T cells (CD8+ Teff) of the graft (OT-I mice) infiltrate and attack various organs of the host (CAG-OVA mice) expressing the chicken ovalbumin<sup>257-264</sup> peptide (SIINFEKL). By transplanting GFP- and CD45.1-tagged OT-I CD8+ T cells, in vivo tracking and recollection of activated CD8+ Teff cells was also made possible to study changes in their gene expression patterns upon organ entry.

The data provided by this model suggest that the 42 genes previously found as differentially expressed in CD8+ Trm cell subsets of given organs can be split into two distinct groups.

A large part of these 42 genes showed identical or very similar expression patterns in CD8+ Trm and Teff cells depending on their organ environment. Hence, their differential regulation in distinct organs could not be verified as a unique functional feature exclusive to CD8+ Trm cells. We also found that if differences arose between Trm and Teff cells in such genes, then they were generally less pronounced in Teff than Trm cells of given organs. As Teff cells become promptly exhausted upon organ entry, while their respective Trm counterparts are maintained for extended time, these data suggest that such differences develop locally, and are fully established over longer periods of time.

The remaining genes, however, including multiple members of the granzyme and KLRG families, were confirmed as a specific marker for CD8+ Trm cells of distinct organs, as in contrast to CD8+ Trm cells, they were expressed by Teff cells in a uniform fashion regardless of their organ-level localization. Taken together, our results suggest that differences observed between CD8+ Trm subsets of various organs may be attributed to both local, non-specific adaptation to the environment, and unique, Trm cell-restricted, organ-specific differentiation programs.

#### INHIBITION OF TLR-DEPENDENT FUNCTIONS OF HUMAN B CELLS BY COMPLEMENT RECEPTOR TYPE 1 (CD35)

MÁCSIK-VALENT BERNADETT<sup>1</sup>, MARIANN KREMLITZKA<sup>2</sup>, ANNA ERDEI<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Immunology, Eötvös Loránd University

<sup>2</sup>Research Group of the Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary

**Introduction/Background:** The complement system and Toll-like receptors (TLRs) are involved in two effector arms of innate immunity, which provide an immediate reaction against invading pathogens. Although it is well accepted that separate activation of these two systems functions to initiate and shape the adaptive immune response, much less is known about the modulation of various B cell functions by

the simultaneous activation of these two systems. Therefore we investigated how engagement of complement receptor type 1 (CR1, CD35) influences the TLR1/2-, TLR7- and TLR9-induced activation of human B cells in the absence and presence of the BCR-mediated stimulus.

**Methods:** For the stimulation of resting tonsillar B cells via BCR a suboptimal dose of F(ab')<sub>2</sub> anti-human IgG/M/A was used and activation via TLR1/2, TLR7 and TLR9 was carried out employing synthetic activators – such as Pam3CSK4, R-837 CpG ODN 2006, respectively. The stimuli were applied either separately or simultaneously in the presence or absence of the CR1 ligand. The complement receptor was crosslinked by isolated, heat aggregated complement component C3, a multimeric “C3b-like C3”. The effect of CR1 clustering on the investigated stimuli was measured by <sup>3</sup>H-thymidine incorporation (proliferation), ELISA (cytokine production) and by flow cytometry (activation marker expression and plasmablast differentiation).

**Results:** We demonstrate that CR1 clustering significantly and dose dependently reduces the TLR9-induced activation, proliferation and cytokine (IL-6) production of resting human tonsillar B cells, but has no effect on the TLR1/2- and TLR7-induced functions. Similarly to earlier results, we have experienced a synergistic, enhanced response to the simultaneous engagement of the different TLRs and the BCR, which was inhibited by CR1 in the case of all the three TLR-stimuli, namely TLR1/2, TLR7 and TLR9.

**Conclusions:** Our data demonstrate that in the absence of the BCR-mediated stimulus, engagement of CR1 downregulates only the TLR9-induced B cell functions but does not influence the TLR1/2 and TLR7 mediated processes. Interestingly however, when B cells are simultaneously triggered via BCR+TLR1/2, BCR+TLR7 and also via BCR+TLR9, CR1 clustering inhibits the B cell response. We assume that the complement receptor exerts its inhibitory effect by acting on the BCR-linked signaling molecules – a process which is currently under investigation. Our results give evidence that CR1 efficiently modulates the TLR-induced functions of B lymphocytes, which reveals a so far undescribed interaction between complement and TLRs in the regulation of B cell responses.

#### ANALYSIS OF PROGNOSTIC MARKERS IN MULTIPLE MYELOMA BY FLOW CYTOMETER

MÁRK ÁGNES, CSILLA KRISTON, NOÉMI NAGY,  
ANNA SEBESTYÉN, GÁBOR BARNA

I. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet,  
Semmelweis Egyetem, Budapest

**Introduction:** Multiple myeloma (MM) is characterized by a

clonal accumulation of malignant plasma cells in the bone marrow. During the neoplastic progression an initially stable clone becomes malignant via a multistep process. Our aims were to find and observe molecules (CD27, CD28, CD29) which can help the early determination of prognosis and therapeutical response. We wanted to compare the protein expression levels and the genetic aberration status of malignant plasma cells.

**Methods:** Bone marrow aspirate specimens were tested on a 2-laser FACS Navios (Beckman Coulter) using Navios and Kaluza softwares. 50 MM and 10 healthy patients were immunophenotyped using direct 5 and 8 color immunofluorescence stains with different combination of monoclonal antibodies (CD38, active CD29, CD27, CD28, CD29, CD81, CD20, CD19, CD56, CD138). Our samples were screened as part of the clinical workout by fluorescence in situ hybridization (FISH) for different translocations, deletions and mutations (probes: FGFR3/IGH DC, CEP17/LSI p53, 1q21/1p36). We determined CD27, CD28, CD29 expression or activity when more than 10% of abnormal plasma cells were positive, high expression were determined when more than 50% of abnormal plasma cells were positive.

**Results:** CD27 showed high expression in 36% of MM cases. CD28 expression was detected in 52% of MM samples, CD29 integrin appeared in active form in 69% of MM cases. CD28 high expression level and high bone marrow infiltration showed correlation in our MM cases. This expression data were independent from each other and did not show significant correlation with genetic status of patients. Normal plasma cells were CD27 positive, CD28 negative with CD29 activation in all cases.

**Conclusion:** We observed a tendency in high CD28 expression and high bone marrow infiltration. The examined molecules (CD27, CD28 and CD29) showed independent expression levels from each other.

#### NOVEL MECHANISM OF MSC MEDIATED IMMUNESUPPRESSION

MÁZLÓ ANETT<sup>1</sup>, SZILÁRD POLISKA<sup>2</sup>, ÁGOTA APÁTI<sup>3</sup>,  
BALÁZS SARKADI<sup>3</sup>, ÉVA RAJNAVÖLGYI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Immunology; University of Debrecen Faculty of Medicine, Hungary

<sup>2</sup>Center for Clinical GENOMICS and Personalized Medicine; University of Debrecen Faculty of Medicine, Hungary

<sup>3</sup>Research Group of Membrane Biology; Hungarian Academy of Sciences and Semmelweis University, Hungary

**Introduction:** The major function of dendritic cells (DCs) acting as regulators of immune responses is to maintain peripheral tolerance and in case it fails to respond to inflammatory challenges. Advances in our understanding of the phenotypic and

functional plasticity of DCs opened up new avenues for developing strategies appropriate for modulating inflammation. We recently have characterized a stem cell line (MSCI), which could provide a theoretical basis for the therapeutic utility of these cells for increasing inherent tolerogenicity. In this study we tested the direct and indirect immune modulatory effects of MSCI on monocyte-derived DCs (moDCs).

**Methods:** To approach this goal we co-cultured moDCs with MSCI cells for three days at a ratio of 5:1, and then activated the cells with bacterial lipopolysaccharide (LPS). After 24 hrs the moDCs were separated from the MSCI cells by the lectin receptor CD209 and mRNA was extracted from the moDCs. To identify the genes >2.0 fold change global gene expression profiling was performed by using the Illumina HiScanSQ platform. The separated moDCs were characterized by phenotypic and activation markers by flow cytometry and by their cytokine production measured by ELISA.

**Results:** In the presence of MSCI cells moDCs differentiated to a cell type with a unique regulatory phenotype characterized by up-regulated expression of the inhibitory molecules PD-L1 and CTLA-4, while the expression of CD86 and MHC-II was increased. Co-culturing moDCs with MSCI cells the secretion of TNF- $\alpha$ , IL-12 and IFN $\gamma$  was down regulated despite LPS activation, but under these conditions the secretion of IL-10 was increased. Our results also demonstrated that the expression of CXCR4 together with CCR5 is up-regulated on the surface of moDCs opposing the down regulation of CCR7 receptor. The expression of a wide variety of CXC chemokine genes were also modulated by MSCI cells resulting in the increased expression of GRO family chemokine genes. Simultaneously, the expression of CXCL9, CXCL10 and CXCL12 chemokine genes were upregulated in moDCs.

**Conclusions:** The changes induced by MSCI cells affected important moDC functional activities such as increased expression of the PD-L1 inhibitory molecule and the contribution of the CXCR4-CXCL12 axis, which in concert may favour the establishment of a tolerogenic environment. Thus the data outline a novel mechanism mediated by MSCI cells to promote moDC differentiation to a regulatory phenotype.

The work was supported by the TÁMOP VÉD-ELEM project.

#### TIM-3/GALECTIN-9 IN NORMAL PREGNANCY AND IN EARLY-ONSET PREECLAMPSIA

MEGGYES MATYAS<sup>1,2</sup>, EVA MIKÓ<sup>1,2</sup>, BEATA POLGAR<sup>1,2</sup>,  
ADRIENN LAJKÓ<sup>1</sup>, JULIA SZEKERES-BARTHO<sup>1,2</sup>, LASZLO SZEREDAY<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>University of Pecs, Clinical Centre, Department of Medical Microbiology and Immunology, Pecs, Hungary

<sup>2</sup>Janos Szentagothai Research Centre, Pecs, Hungary

**Introduction:** T cell immunoglobulin domain and mucin do-

main (TIM)-3, which was initially identified on terminally differentiated Th1 cells, negatively regulates the T cell response by inducing T cell apoptosis. Multiple immune cells expressing TIM-3 including Th1, Th17, NK cells, NKT cells, dendritic cells, monocytes therefore it has been implicated both in activation and inhibition of immune responses. A growing body of evidence supports the critical role of TIM-3 receptor as modulators of the immune response in transplant tolerance. Identification of Galectin-9 (Gal-9) as a ligand for TIM-3 has established the Gal-9/TIM-3 pathway as an important negative regulator of Th1 immunity and tolerance induction. Data about the role of TIM-3/Gal-9 pathway in the pathogenesis of human diseases is emerging, but data about their role during human pregnancy is still not clear. The aim of our study was to investigate the expression of Galectin-9 and TIM-3 molecules and the possible role of Gal-9/TIM-3 pathway in healthy human pregnancy and in early-onset preeclampsia.

**Methods of study:** We involved 30 healthy pregnant women [first trimester (n=10); second trimester (n=10); third trimester (n=10)], 27 pregnant woman with early-onset preeclampsia and 15 non-pregnant control women in our study. We determined the TIM-3 receptor surface expression by cytotoxic T cells, NK cells and NK cell subsets and Gal-9 expression by regulatory T cells by flow cytometry. We measured the cytokine production and cytotoxicity of TIM3+ and TIM3- CD8 T and NK cells by flow cytometry. Serum Gal-9 levels were measured by ELISA.

**Results:** Our results show that the numbers of NK and CD8 T cells and their TIM-3 expression do not change during healthy pregnancy. Compared to non pregnant individuals, regulatory T cells show higher level of Galectin-9 expression as pregnancy proceeds, which is in line with the data obtained analyzing sera for soluble Gal-9. TIM-3+ CD8 T cells and NK cells show different cytokine production and cytotoxicity during pregnancy compared to non pregnant group. Analyzing peripheral lymphocytes of women with early onset preeclampsia, we detected decreased TIM-3 expression by CD3 T cells, CD8 T cells and NK cells compared with healthy pregnant women. We further demonstrated increased cytotoxic activity by CD8 T- and CD56dim NK cells in women with early-onset preeclampsia.

**Conclusion:** Our results indicate that the Gal-9/TIM-3 pathway could play an important role in the maintenance of healthy pregnancy. Furthermore the altered Gal-9 and TIM-3 expression could result in an enhanced systemic inflammatory response including the activation of Th1 lymphocytes and type-1 bias in early onset preeclampsia.

This research was supported by the TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 'National Excellence Program', OTKA 104960 and Janos Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences to L. Szereday.



## ENDOTHEL INJURY IN ACUTE THROMBOTIC THROMBOCYTOPENIC PURPURA AND ITS CONNECTIONS WITH THE ACTIVATION OF THE COMPLEMENT SYSTEM

MIKES BÁLINT<sup>1</sup>, GYÖRGY SINKOVITS<sup>1</sup>, PÉTER FARKAS<sup>1</sup>, MARIENN RÉTI<sup>2</sup>, ZOLTÁN PROHÁSZKA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>3<sup>rd</sup> Department of Medicine, Semmelweis University, Budapest, Hungary

<sup>2</sup>Department of Hematology and Stem Cell Transplantation, St István and St László Hospital, Budapest

**Introduction:** Thrombotic microangiopathies (TMA) such as thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) are severe, episodic and rare diseases. In TTP, deficiency of the von Willenbrand cleaving protease (ADAMTS-13) as the main risk factor is well known, however, the mechanisms how the exact triggers exacerbate disease, are currently unknown. In previous studies our group showed the potential role of the neutrophil and complement activation in TTP. Although many studies described injury of the endothelium in TMA but there is no detailed information about its connections with innate immunity in TTP.

Our aim was to examine the role of the endothelial injury in TTP (acute, remission) in a clinical study. We also analyzed whether there is any connection between endothel injury and the activation of the neutrophil and complement activation.

**Methods:** In our study we enrolled 39 patients (33 female, mean age 43.7) and 57 healthy controls (30 female mean age 36.3). The diagnosis of the TTP was set up with low thrombocyte number (<150G/L), intravascular hemolysis and the presence of the fragmentocytes. We measured a precursor fragment of the ET-1 (Endothelin-1, CT-proET-1) as endothel injury marker with BRAHMS LIA, Kryptor system in plasma. We used non-parametric tests for statistical analysis (t-test, ANOVA and Spearman correlation coefficient).

**Results:** ET-1 levels were significantly higher in acute TTP (mean 63.4 pmol/L, SD 30.1) as compared to the control group (31.2, 14.8) and to the group of TTP patients in remission (45.9, 17.4;  $p < 0.0001$ , ANOVA). There was a positive correlation between the ET-1 levels and levels of terminal pathway activation marker (SC5b-9). No further correlations were observed with other activation markers (such as C3a and Bb).

**Discussion:** Our results indicate the presence of endothel injury in patients with acute TTP as compared to the TTP in remission and healthy controls and this activation is parallel to activation of the complement system. Complement and endothel activation could potentially contribute to the development of acute episodes in subjects with predisposition to TTP.

## IMMUNE MEDIATED SKIN INFLAMMATION IS THE SAME IN ATOPIC DERMATITIS PATIENTS WITH OR WITHOUT FILAGGRIN MUTATION

MÓCSAI GÁBOR<sup>1,2</sup>, DAJNOKI ZSOLT<sup>1,2</sup>, KAPITÁNY ANIKÓ<sup>1,2</sup>, BÉKE GABRIELLA<sup>1,2</sup>, GÁSPÁR KRISZTIÁN<sup>1,2</sup>, EMRI GABRIELLA<sup>2</sup>, NAGY BENCE<sup>3</sup>, DEZSÓ BALÁZS<sup>3</sup>, SZEGEDI ANDREA<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Division of Dermatological Allergology

<sup>2</sup>Department of Dermatology

<sup>3</sup>Department of Pathology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

**Introduction:** Recent investigations showed that T helper (Th) 2 inflammatory cytokines can impair skin barrier. The opposite question, whether skin barrier alterations may affect keratinocyte (KC) immune responses, remained less studied. Our aim was to investigate whether the immune mediated skin inflammation, KC function, T and dendritic cell (DC) count differ between severe atopic dermatitis (AD) patients with or without filaggrin (FLG) mutation.

**Methods:** Lesional skin biopsies of severe FLG mutant and wild type (Wt) AD patients and controls were analyzed by immunohistochemistry: FLG and inflammatory T(h)2 polarizing cytokines (TSLP, IL-33) and CCL27 chemokine, characteristically expressed by KCs in lesional AD skin, were immunostained. Histological severity markers (Ki67 positivity and epidermal thickness) as well as CD3<sup>+</sup> T cell and CD11c<sup>+</sup> DC count were also investigated. Whole slide imaging method allowed us to compare protein levels. Correlations between cytokines/chemokine and severity markers were calculated.

**Results:** Compared to controls, in both AD groups, FLG levels were found significantly lower, whilst the same level of FLG expression was measured in the AD groups. Concerning the levels of the investigated parameters no significant differences were found between the two AD groups. The expression of AD specific cytokines and chemokine showed significant correlation with histological severity markers.

**Conclusions:** Our findings suggest that the immune mediated skin inflammation in FLG mutant and Wt AD patients is mediated by the same amount of immune cells and KC derived cytokines and chemokines. Results of the correlations demonstrated that KC's immune activation is connected rather to the severity of the disease, then to the origin of barrier alterations.

## CHARACTERIZATION OF THE NOTCH AND MTOR PATHWAY IN CONTEXT OF THEIR CROSSTALK IN HODGKIN LYMPHOMAS

NAGY NOÉMI<sup>1</sup>, ÁGNES MÁRK<sup>1</sup>, MELINDA HAJDU<sup>1</sup>, MÓNIKA TÓTH<sup>1</sup>, TITANILLA DANKÓ<sup>1</sup>, PÉTER ATTILA KIRÁLY<sup>1</sup>, CSABA BÖDÖR<sup>1</sup>, PÉTER HOLLÓSI<sup>1</sup>, LÁSZLÓ KOPPER<sup>1</sup>, ANNA SEBESTYÉN<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>1st Department of Pathology and Experimental Cancer Research, Semmelweis University, Budapest, Hungary

<sup>2</sup>Tumor Progression Research Group of the Hungarian Academy of Sciences and Semmelweis University, Budapest, Hungary

**Introduction:** Notch is a highly conserved, transmembrane receptor that regulates cell differentiation and apoptosis, and plays a critical role in development. Another important element of the signalling network is the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway, which controls cellular proliferation and survival.

Growing evidence demonstrates that Notch1 regulates PI3K-AKT-mTOR1 signalling in T-ALL, but this aspect is poorly characterized in Hodgkin lymphomas (HL).

We characterized mTOR activity and Notch1 expression in HL cell lines and human tissues, and investigated the interaction of the two pathways by inhibitor and activator treatments and mutational analysis.

**Methods:** We examined the activity and expression of mTOR and Notch signals in human HL cell lines (KMH2, L1236, DEV) and in human HL biopsies by immunocytochemistry, immunohistochemistry (IHC) and Western-blotting (mTOR, p-mTOR, p-S6, p-4EBP1, Notch1, cleaved-Notch1). Cells were treated with rapamycin (mTORC1 inhibitor), DAPT ( $\gamma$ -secretase inhibitor) and Jagged1 (Notch1 ligand) *in vitro*. The biological effects (proliferation, apoptosis) were investigated by AlamarBlue<sup>®</sup> assay and flow cytometry analysis. Target gene expression (Hes1, c-myc) was examined by qPCR. Exons 5, 6, 9, 10 and 11 of FBXW7 ubiquitin ligase (one point of interaction between these signals) and exon 9 and 20 of PI3KCa were sequenced in cell lines.

**Results:** Increased mTOR and Notch1 activity was observed in HL cell lines and samples of patients. Notch1 receptor was present in all HL cell lines, but no biological effects and no changes in target gene expression were detected after DAPT and Jagged1 treatments. Apoptosis induction and the inhibition of cell proliferation was detected after long-term rapamycin treatment and combined inhibitor treatment *in vitro* and *in vivo*. Interestingly, cleaved, constitutively activated Notch1 was found in all samples, even after rapamycin and DAPT treatment. Sequencing of FBXW7 and PI3KCa revealed no mutations in our cases.

**Conclusion:** The constitutively activated form of Notch1 draws the attention to the importance of Notch1 signals in the context of mTOR activity in HL.

Due to the lack of mutations in the FBXW7 ubiquitin ligase and PI3KCa, the background of increased Notch1 and mTOR

activity remains unexplained in HL, and needs more exploring.

According to these results, targeted therapy of mTOR could be successful in cases with activated Notch signals as well, however, additional Notch inhibition could give more benefit during therapy.

Supported by OTKA81624 and OTKA84262

## A CONTINUOUS SPECTRUM OF VESICLE SIZES IS GENERATED THROUGHOUT THE COURSE OF APOPTOSIS

NÉMETH ANDREA<sup>1</sup>, BALÁZS SZÁNTÓ<sup>1</sup>, KRISZTINA PÁLÓCZI<sup>1</sup>, ÁGNES KITTEL<sup>2</sup>, KATALIN SZABÓ-TAYLOR<sup>1</sup>, BENCE GYÖRGY<sup>1</sup>, TAMÁS GÉZA SZABÓ<sup>1</sup>, SÁRA TÓTH<sup>1</sup>, ÉVA PÁLLINGER<sup>1</sup>, EDIT IRÉN BUZÁS<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Genetics, Cell- and Immunobiology, Semmelweis University, Budapest, Hungary

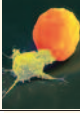
<sup>2</sup>Institute of Experimental Medicine, Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary

**Introduction:** Although numerous aspects of apoptosis have been studied extensively, extracellular vesicles released during apoptosis, have received much less attention over the past decades.

**Methods:** In the present study we induced apoptosis of CCRF-CEM and U937 cell lines by staurosporine and etoposide, and focused on the released apoptotic vesicles. Apoptosis as well as primary and secondary necrosis were assessed by flow cytometry using Annexin V and propidium iodide staining at 0, 2, 4, 8, and 24 hours. Caspase activation was monitored by binding of fluorescent FAM-VAD-FMK to cells. Apoptotic cell derived vesicles were assessed by flow cytometry, transmission electron microscopy and tunable resistive pulse sensing techniques. Endoplasmic reticulum labeling was carried out by ER-Tracker staining.

**Results:** Both 2.5  $\mu$ M of staurosporin and 50  $\mu$ M of etoposide induced a simultaneous release of apoptotic microvesicles (<1  $\mu$ m) and large apoptotic bodies (1  $\mu$ m). In contrast to other extracellular vesicles and platelets (both being sensitive to detergent lysis), in the case of apoptotic vesicles Triton X-100 ( $\geq 0.02\%$ ) only abolished plasma membrane Annexin V binding, while forward and light scattering signals and propidium iodide staining were not abrogated. A higher proportion of large apoptotic bodies showed increased staining with propidium iodide and was found positive for ER-Tracker compared to apoptotic microvesicles.

**Conclusion:** The published literature distinguishes microvesicles from apoptotic bodies based on the arbitrary 1  $\mu$ m size limit. Although vesicular structures below and above 1  $\mu$ m were characterized by differential properties (including concentration, endoplasmic reticulum content and propidium iodide staining), this work demonstrated a continuous spectrum of vesicle sizes released during apoptosis.



#### COORDINATION OF IL-6R $\alpha$ EXPRESSION OF CD4+ T CELLS BY TROPHOBLAST-DERIVED MVS. INDUCTION OF LOCAL IMMUNE TOLERANCE AT THE FETO-MATERNAL INTERFACE.

PÁLLINGER ÉVA<sup>1</sup>, KISS ATTILA ANDRÁS<sup>2</sup>, FALUS ANDRÁS<sup>1</sup>, PAP ERNA<sup>1</sup>, BUZÁS EDI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Genetics, Cell- and Immunobiology, Semmelweis University, Budapest, Hungary

<sup>2</sup>Dept. of Gynecology and Obstetrics of Military Hospital – Hungarian State Health Center, Budapest, Hungary

**Background:** Maternal immune tolerance requires the action of regulatory T cells at the feto-maternal interface, whose differentiation is influenced by the local cytokine milieu. Microvesicles (MVs) have been shown to mediate communication between the maternal immune system and the semi-allograft fetus. The “Janus-faced” IL-6 plays a central role in the orchestrated immune response during gestation. It has seemingly dual and contradictory effects on the outcome of pregnancy. On the one hand, it is needed to promote the physiological processes in pregnancy, while on the other hand, it inhibits the differentiation of CD4+ lymphocytes toward regulatory T cells. Goals: We assumed that trophoblast-derived MVs regulate both the local cytokine production and the cytokine sensitivity of the lymphocytes.

**Methods:** We used multicolour flow cytometry for the assessment of induction of IL-6R $\alpha$  expression in primary human T cells by BeWo choriocarcinoma cell-derived microvesicles, and for the characterization of their differentiation into Treg cells.

**Results:** In the present work we showed that 1. trophoblast-derived MVs induce IL-6 secretion of lymphocytes 2. we detected lower IL-6R $\alpha$  expression of CD4+ T lymphocytes and higher IL-10 secretion, meaning that the inhibitory effect of IL-6 on regulatory T cell differentiation is diminished by trophoblast derived MVs. Considering that trophoblast derived MVs target maternal T cells, we propose that the negative influence of IL-6 on regulatory T cell differentiation is compensated by trophoblast derived MVs via the down-regulation of IL-6R $\alpha$  expression of CD4+ T lymphocytes.

**Conclusion:** Therefore trophoblast derived MVs contribute to the establishment and maintenance of local maternal immune tolerance, which is a prerequisite for healthy pregnancy.

#### ALTERATION OF CYTOKINE PRODUCTION AND FOXP3 – GR COLOCALIZATION IN DEXAMETHASONE TREATED REGULATORY T CELLS

PAP RAMÓNA<sup>1</sup>, UGOR EMESE<sup>1</sup>, BERTA GERGELY<sup>2</sup>, ERNST DÁVID<sup>3</sup>, BERKI TÍMEA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Immunology and Biotechnology

<sup>2</sup>Department of Medical Biology

<sup>3</sup>Department of Pharmaceutical Biotechnology, Faculty of Medicine, University of Pécs

**Introduction:** Regulatory T cells (Tregs) play an indispensable role in maintaining immunological unresponsiveness to self-antigens and in suppressing excessive immune responses deleterious to the host. Tregs are produced in the thymus as a functionally mature subpopulation of T cells and can also be induced from naive T cells in the periphery. The fact that Tregs play a critical role in the immune system is evidenced by the severe autoimmune syndrome that results from a genetic deficiency in regulatory T cells (IPEX syndrome). Tregs are CD4+CD25<sup>high</sup>+, they express FoxP3 transcription factor (TF) while IL-2 and TGF $\beta$  cytokines are essential for their maturation. The goal of our work was to examine the typical cytokines of Tregs in the thymus and peripheral lymphoid organs and to determine the changes of the cytokine levels during glucocorticoid hormone (GC) treatment. We also investigated the changes of glucocorticoid receptor (GR) and FoxP3 localization in Tregs after GC analogue treatment.

**Materials and methods:** 4–6 week old Balb/c mice were treated for 2–4 days *in vivo* with high dose (20mg/kg) GC analogue Dexamethasone (DX, SIGMA). Cells from the thymus and spleen were isolated and stimulated with PMA/ ionomycin O/N at 37 °C. Cells were stained with cell surface (anti-CD4; anti-TGF $\beta$ ) and intracellular (anti-FoxP3; anti-IL-10) antibodies. We determined the ratio of CD4+ T cells and Tregs and the changes in their cytokine production by flow cytometry. To investigate the GR and FoxP3 localization in DX treated and control thymic Tregs we first sorted CD4+ / CD25<sup>high</sup>+ cells by FACS Aria and then stained them for intracellular GR and FoxP3.

**Results:** In the thymus *in vivo* GC treatment caused the elevation of Treg ratio from 0,5% to 8%, without changes of the absolute Treg cell number, which reflects the GC resistance of the these cells. In the spleen a slight decrease in Treg cell ratio (from 12% to 8%) was observed with a significantly diminished absolute cell number. We also measured the functional changes of the Treg cells after DX treatment. Both in the thymus and spleen of DX treated animals an elevation of TGF $\beta$ + and IL-10+ Treg cell ratio was measured which further increased upon PMA/Ionomycin stimulation. Investigating the GR and FoxP3 localization by confocal microscopy we found 33% colocalization already in the untreated samples, which significantly increased after *in vitro* 30 min. of DX treatment. There was no significant difference in the FoxP3-GR colocalization between the control and the *in vivo* DX treated thymic Treg cells.

**Discussion, conclusion:** In thymic Tregs we observed GC resistance and low cytokine production, while in peripheral Tregs a higher rate of cytokine producing cells was detected, which were sensible to GC treatment. These suggest different signaling pathways of the two Treg cell populations. The functional consequence of FoxP3 and GR colocalization in thymic Tregs must be further investigated.

Supported by OTKA K105962

## EXTRACORPOREAL PHOTOPHERESIS FOR SYSTEMIC SCLEROSIS – WHY, HOW AND WHEN?

PAPP GÁBOR, BARÁTH SÁNDOR, GYIMESI EDIT, SZÖLLŐSI IBOLYA,  
HORVÁTH ILDIKÓ FANNY, VÉGH JUDIT, ZEHER MARGIT

Division of Clinical Immunology, Clinical Center, University  
of Debrecen, Debrecen

**Introduction:** The therapeutic options in systemic sclerosis (SSc) are limited mainly to the management of complications, and halting fibrosis and preventing disease progression are still great challenges. Extracorporeal photopheresis (ECP) is one of the promising therapeutic strategies in SSc, nevertheless, there is no consensus on the ideal timing and frequency of treatment cycles. In the present study, we evaluated the long-term effects of consecutive ECP treatments, and the durability of clinical and laboratory improvements after the last cycle of ECP.

**Methods:** We enrolled 9 patients with diffuse cutaneous SSc and performed 12 ECP cycles (24 ECP treatments) per capita in total. ECP cycles were carried out once in every six weeks, each cycle consisted of 2 procedures. Skin involvement was assessed by modified Rodnan skin score (MRSS) and high-resolution ultrasonography. Visceral organ involvements were also determined. Laboratory tests were carried out prior to the beginning of the therapy and after each ECP cycle. Samples were also obtained from 16 healthy controls. By flow cytometry, we quantified peripheral NK, NKT, early- and late-activated T, Th1, Th2, Th17, Tr1 and CD4+ CD25+ Treg cells. Levels of complements were measured by nephelometry, certain cytokines (IL-10, TGF-beta), anti-nuclear antibodies and anti-endothelial cell antibodies were determined by ELISA technique.

**Results:** Following the 6<sup>th</sup> cycle of ECP, we continued the therapy and observed further significant improvement in MRSS, which was confirmed by the ultrasonography results as well. Organ involvements did not show amelioration or deterioration. After the 2<sup>nd</sup> ECP cycle, values of Tr1 and CD4+CD25+ Treg cells elevated significantly, however, Tr1 cell percentages remained under the healthy control values until the 10<sup>th</sup> cycle. Frequency and absolute number of peripheral Th17 cells decreased, while the other investigated lymphocyte subpopulations did not show measurable quantitative changes. During the follow-up, 12 months after the last treatment we did not observed significant deterioration in the clinical state, however, improvements in laboratory parameters diminished after 6 months.

**Conclusions:** If the first 6 ECP cycles are effective for an SSc patient, uninterrupted continuation of treatment should be considered, which may lead to the normalization of Tr1 cell values along with further clinical improvement. Based on our laboratory observations, reminder ECP cycles are recommended in every year for the best therapeutic outcomes.

This research was supported by the European Union and the State of Hungary, co-financed by the European Social

Fund in the framework of TÁMOP 4.2.4. A/2-11-1-2012-0001 'National Excellence Program'.

## BEAD ARRAYS FOR ANTIBODY AND COMPLEMENT PROFILING REVEAL JOINT CONTRIBUTION OF ANTIBODY ISOTYPES TO C3 DEPOSITION

PAPP KRISZTIÁN<sup>1,2</sup>, AYOGLU BURCU<sup>2</sup>, SZARKA ESZTER<sup>3</sup>, HUBER KRISZTINA<sup>3</sup>,  
OROSZ ANITA<sup>3</sup>, BABOS FRUZZINA<sup>4</sup>, MAGYAR ANNA<sup>4</sup>, HUDECZ FERENC<sup>4,5</sup>,  
ROJKOVICH BERNADETTE<sup>6</sup>, GÁTI TAMÁS<sup>6</sup>, NAGY GYÖRGY<sup>6,7</sup>,  
SCHWENK M. JOCHEN<sup>2</sup>, SÁRMAY GABRIELLA<sup>3</sup>, PRECHL JÓZSEF<sup>1,8</sup>,  
PETER NILSSON<sup>2</sup>

<sup>1</sup>MTA-ELTE Immunology Research Group, Budapest

<sup>2</sup>Affinity Proteomics, SciLifeLab, School of Biotechnology,  
KTH Royal Institute of Technology, Stockholm

<sup>3</sup>Department of Immunology, Eötvös Loránd University,  
Budapest

<sup>4</sup>MTA-ELTE Research Group of Peptide Chemistry, Budapest

<sup>5</sup>Department of Organic Chemistry, Eötvös Loránd University,  
Budapest

<sup>6</sup>Department of Rheumatology, Polyclinic of the Hospitaller  
Brothers of St. John of God, Budapest

<sup>7</sup>Department of Genetics, Cell and Immunobiology,  
Semmelweis University, Medical School, Budapest

<sup>8</sup>Diagnosticum Ltd., Budapest

The development of antigen arrays has provided researchers with great tools to identify reactivities against self or foreign antigens from body fluids. Yet, these approaches mostly do not address antibody isotypes and their effector functions even though these are key points for a more detailed understanding of disease processes. Here, we present a bead array-based assay for a multiplexed determination of antigen-specific antibody levels in parallel with their properties for complement activation.

We measured the deposition of C3 fragments from serum samples to reflect the degree of complement activation via all three complement activation pathways. We utilized the assay on a bead array containing native and citrullinated peptide antigens to investigate the levels of IgG, IgM and IgA autoantibodies along with their complement activating properties in serum samples of 41 rheumatoid arthritis patients and 40 controls.

Our analysis revealed significantly higher IgG reactivity against the citrullinated fibrinogen  $\beta$  and filaggrin peptides as well as an IgA reactivity that was exclusive for citrullinated fibrinogen  $\beta$  peptide and C3 deposition in rheumatoid arthritis patients. In addition, we characterized the humoral immune response against the viral EBNA-1 antigen to demonstrate the applicability of this assay beyond autoimmune conditions. We observed that particular buffer compositions were demanded for separate measurement of antibody reactivity and comple-

ment activation, as detection of antigen-antibody complexes appeared to be masked due to C3 deposition. We also found that rheumatoid factors of IgM isotype altered C3 deposition and introduced false-positive reactivities against EBNA-1 antigen.

In conclusion, the presented bead-based assay setup can be utilized to profile antibody reactivities and immune-complex induced complement activation in a high-throughput manner and could facilitate the understanding and diagnosis of several diseases where complement activation plays role in the pathomechanism.

Funding: OTKA-PD 104779, János Bolyai Research Scholarship, OTKA-NK 104846

#### COMPARISON OF THE IN VITRO AND IN VIVO EFFECTS OF NATIVE AND GAMMA-RAY-IRRADIATED BACTERIAL ENDOTOXINS

PÁZMÁNDI KITTILINDA<sup>1</sup>, ATTILA BÁCSI<sup>1</sup>, TÜNDE FEKETE<sup>1</sup>, ÉVA RAJNAVÖLGYI<sup>1</sup>, BÉLA KOCSIS<sup>2</sup>, GÉZA BRUCKNER<sup>3</sup>, LÓRÁND BERTÓK<sup>4</sup>, SÁNDOR SÍPKA<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Department of Immunology, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

<sup>2</sup>Department of Medical Microbiology and Immunology Faculty of Medicine, University of Pécs, Pécs, Hungary

<sup>3</sup>Division of Clinical Nutrition, University of Kentucky, Kentucky, USA

<sup>4</sup>"Fodor József" National Center of Public Health, "Frédéric Joliot-Curie" National Research Institute for Radiobiology and Radiohygiene, Budapest, Hungary

<sup>5</sup>Institute for Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

**Introduction:** Previous studies have reported that the level of environmental exposure to endotoxin and other bacterial wall components is an important protective determinant for the development of atopic diseases in childhood. In this study we compared the immunomodulatory potential of wild-type lipopolysaccharide (W-LPS) and radio (<sup>60</sup>Co)-detoxified LPS (R-LPS) in a murine model of allergic airway inflammation and on human monocyte-derived dendritic cells (DCs).

**Methods:** Cages (feed and bedding) of six-week old female BALB/c mice were treated daily with 5 microgram W-LPS or R-LPS (both originated from *E. coli*) in the form of aerosol spray. After a 10-week treatment period mice were sensitized intraperitoneally and challenged intranasally with ragweed pollen extract (RWE). Inflammatory cell infiltration into the airways was assessed by the analysis of the bronchoalveolar lavage fluid. In our *in vitro* experiments human DCs were exposed to W-LPS or R-LPS, and after that their phenotypic changes were monitored by flow cytometry and their cytokine and chemokine secretion was detected by ELISA. In separated experiments W-LPS- or R-LPS-treated DCs were co-cultured with allogeneic CD3<sup>+</sup> pan-T cells and IFN-gamma production by activated T cells was detected by ELISPOT.

**Results:** Significantly less severe allergic airway inflammation could be observed in mice kept in R-LPS-rich milieu than in those raised in W-LPS-rich or common environment. *In vitro* exposure of human DCs to R-LPS induced similar phenotypic changes and triggered similar release of IL-8, TNF-alpha, IL-6, IL-1beta, IL-10 and IL-12 as did the treatment with W-LPS. Neither W-LPS nor R-LPS induced endotoxin tolerance in our experimental conditions. However, in co-culture experiments DCs primed with R-LPS activated more IFN-gamma-producing T cells than those pretreated with W-LPS. This observation indicates a higher Th1-polarizing capacity of R-LPS-primed DCs compared to W-LPS-exposed ones.

**Conclusions:** Collectively, our data suggest that based on the lack of endotoxin tolerance development radio-detoxified LPS may be suitable for long-term treatments and prolonged exposure to it during the early period of life may provide a novel tool to prevent/decrease symptoms of pollen allergy.

#### COMPLEMENT FACTOR-H RELATED (CFHR) PROTEINS 1 AND 3 AND REGULATION OF THE ALTERNATIVE PATHWAY ACTIVATION

PROHÁSZKA ZOLTÁN, LILIAN VARGA AND ÁGNES SZILÁGYI

Semmelweis University, 3rd Department of Medicine, Research Laboratory and Füst György Komplement Diagnosztikai Laboratórium

**Background:** The five CFHR proteins (CFHR1 to -5), together with CFH, comprise a family of structurally related proteins. CFH is a well characterized negative regulator of complement alternative pathway but the biological roles of the CFHR proteins are poorly understood. CFHR proteins contain surface binding domains but lack complement regulatory domains, therefore, a de-regulator function can be suspected for these proteins. A common CFHR3-1 deletion copy number variation may affect protein expression and complement regulation in this family. Furthermore, homozygous deletion of CFHR3- and 1 confers increased risk to the development of autoimmune atypical hemolytic uremic syndrome.

The **aim** of this study was to describe copy number frequencies of CFHR3 and -1 genes in healthy Hungarian population and to link CFHR copy numbers to the activity of complement alternative pathway (AP).

**Subjects and Methods:** Healthy Hungarian blood donors (119 females, 88 males, mean age 37 years, SD 9.6) were enrolled during regular health-check-up visits in the Kútvolgyi Clinical Center. CFHR3-1 CNVs were determined by multiplex ligation dependent probe amplification (MRC Holland). Activity of the AP was determined by ELISA (LPS induced activation measured by the formation of C9 neo-epitope), whereas complement factor levels measured by immunoturbidimetry (C3), ELISA (C1q, CFH) or radial immune diffusion (C4, CFI, CFB). Anti-Factor H autoantibodies were measured by ELISA.

**Results:** Heterozygous (2 copies) or homozygous (0 copies) deficiency of CFHR3- and 1 was observed in 41.1 and 3.86% of healthy subjects, respectively. Activity of complement AP and levels of C4, C3, CFI, CFB and CFH were similar in the groups of patients with 0, 2 or 4 copies of CFHR3- and 1. Major determinants of AP activity (as identified by multiple regression analysis) were complement factors I, B and C4, and identical models were obtained in the groups of patients with 0, 2 or 4 copies of CFHR3- and 1. Two out of the 207 healthy blood donors were borderline-positive for anti-FH autoantibodies, but did not carry the homozygous deletion of CFHR3- and 1.

**Conclusion:** Based on these observational data we conclude that LPS-induced in vitro activation of complement AP is not affected by deletion of CFHR3- and 1. Further studies better reflecting the in vivo activation of AP are necessary to investigate the potential complement regulatory function of CFHRs.

This work was supported by the National Research Fund of Hungary (OTKA K100687).

#### CR3 DOMINATES THE PHAGOCYTOSIS OF iC3b OPSONIZED STAPHYLOCOCCUS AUREUS IN HUMAN PHAGOCYtic CELLS

SÁNDOR NOÉMI<sup>1</sup>, SZILVIA LUKÁCSI<sup>2</sup>, ANNA ERDEI<sup>1,2</sup>, ZSUZSA BAJTAY<sup>2</sup>

<sup>1</sup>MTA-ELTE Immunology Research Group

<sup>2</sup>ELTE TTK Institute of Biology, Department of Immunology

Complement receptors CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18) belong to the family of beta2 integrins, and are known to mediate opsonized phagocytosis via their common ligand, iC3b. Recently we showed, that in human monocyte derived dendritic cells CR3 (CD11b/CD18) is the dominant receptor in this process, while CR4 has a supporting role (Sándor, 2013, Immunobiology).

In our recent work, we compared the iC3b mediated phagocytosis of neutrophil granulocytes, CD14+CD16- monocytes, CD14+CD16+ monocytes, CD14-CD16+ monocytes, monocyte-derived dendritic cells (MDCs) and monocyte-derived macrophages (MDMs). Relative expression and absolute receptor numbers were determined for CD11b/CD18 and CD11c/CD18 in each cell type by flowcytometry. Phagocytosis of pHrodo dye labeled, iC3b opsonized Staphylococcus aureus bioparticles was also measured in the case of the five celltypes. This specific pHrodo labeling enables the detection of ingested particles only.

We found that relative and absolute receptor expression determination gives different results, although both were measured by flowcytometry. By relative measurement monocytes, MDCs and MDMs express comparable amount of CD11b and CD11c, while absolute receptor number determination by flowcytometry bead assay showed that MDCs and MDMs have approximately 10 times more CD11b and CD11c on their surface than monocytes. Moreover absolute receptor number determination had lower variance showing the robustness of

the method. In contrast to this, by comparing the capacity of the different celltypes to take up iC3b opsonized S. aureus particles, we got contradictory results: monocytes that had less CD11b and CD11c were far more active in iC3b mediated phagocytosis than MDCs and MDMs.

These results point out that relative receptor expression determination can be misleading. Our goal is to determine the individual role of CD11b and CD11c in the process of iC3b mediated phagocytosis in the light of our results.

This work was supported by OTKA K104838.

#### ACTIVATED MTORC1/2 COMPLEXES AND THEIR BIOLOGICAL IMPORTANCE IN LYMPHOID MALIGNANCIES

SEBESTYÉN ANNA<sup>1,3</sup>, NAGY NOÉMI<sup>1</sup>, MÁRK ÁGNES<sup>1</sup>, MOLNÁR ANNA<sup>1</sup>, HAJDU MELINDA<sup>1</sup>, TÓTH MÓNKA<sup>1</sup>, DANKÓ TITANILLA<sup>1</sup>, CSÓKA MÓNKA<sup>2</sup>, KOPPER LÁSZLÓ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>1st Department of Pathology and Experimental Cancer Research, Semmelweis University, Budapest, Hungary

<sup>2</sup>2nd Department of Pediatrics, Semmelweis University, Budapest, Hungary

<sup>3</sup>Tumor Progression Research Group of Joint Research Organization of the Hungarian Academy of Sciences and Semmelweis University, Budapest-Hungary

Elevated mammalian target of rapamycin (mTOR) activity is characteristic in several tumors and lymphoid malignancies. The mTOR kinase regulates cell growth, cell cycle progression, survival and cellular metabolism in response to cellular signals and different microenvironmental factors. However, mTOR activity related changes and their relation to protein expression of mTOR complexes in lymphoid malignancies are poorly understood.

We investigated mTOR activity related phospho-proteins and the elements of complexes using different methods (immunocyto- and immunohistochemistry, ELISA, Western-blot, flow cytometry), depending on sample type (fresh/fixed human tissues, isolated cells or cell lines). The results were compared to mTOR inhibitor sensitivity in vitro or correlated with clinical data. The effects of in vitro treatments were analyzed to study the mTOR inhibitor sensitivity of cell lines and in parallel Duolink technique was used to detect mTORC1/C2 complex availability, which was compared to inhibitors sensitivity.

We found high mTOR activity in all acute lymphoid leukemia (ALL) cases and in certain lymphomas (mantle cell, anaplastic large cell, Burkitt, diffuse large B cell [DLBCL], Hodgkin [HL] and cutaneous T cell lymphomas). Detailed characterization of DLBCLs, HLs and ALL cases showed that high mTOR activity – especially mTORC2 expression – is a sign of unfavorable prognosis. mTORC1 activity was significantly higher in ALL patients with poor prognosis. Moreover, high mTOR activity with Rictor overexpression correlated to worse

prognosis and shorter survival in DLBCL patients. HL patients usually have favorable prognosis. We detected elevated mTOR activity in 92% of HLs, however, Rictor (an element of mTORC2) was not found in these cases. The examined lymphoma cell lines were characterized by increased mTOR activity; however, the expression pattern of Raptor, Rictor, phospho-S6 and mTOR-Rictor complex was cell line dependent. Moreover, inhibitor sensitivity of these cell lines showed good correlation with the expression of proteins related to mTORC1 and C2.

These results confirm that mTOR activity is increased in certain human lymphomas and ALLs. Accordingly, the prognostic and predictive value of mTOR complexes should be taken into consideration for personalized therapy design with targeted mTOR inhibitors available soon, especially in cases with high expression of mTORC2 related proteins.

Supported by OTKA81624, OTKA 84262

#### CLINICAL USEFULNESS OF MEASURING PERIPHERAL BLOOD NAIVE AND MEMORY B CELL SUBSETS IN PATIENTS WITH SYSTEMIC SCLEROSIS

SIMON DIÁNA<sup>1</sup>, BALOGH PÉTER<sup>1</sup>, KELLERMAYER ZOLTÁN<sup>1</sup>, ENGELMANN PÉTER<sup>1</sup>, PAP RAMÓNA<sup>1</sup>, FARKAS NELLI<sup>2</sup>, KUMÁNOVICS GÁBOR<sup>3</sup>, MINIER TÜNDE<sup>3</sup>, BERKI TÍMEA<sup>1</sup>, CZIRJÁK LÁSZLÓ<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Immunology and Biotechnology,

<sup>2</sup>Institute of Bioanalysis,

<sup>3</sup>Department of Rheumatology and Immunology, University of Pécs, Pécs

**Introduction:** Systemic sclerosis (SSc) is an autoimmune disease characterized by vascular injury, autoimmune phenomena, inflammation, and fibrosis of the skin and various internal organs. Several lines of evidence indicate that abnormal B-cell function plays a key role in the development of SSc. The anti-CD20 monoclonal antibody therapy seems to show some clinical efficacy in SSc further emphasizing the importance of B cells in the pathomechanism of the disease. The B-cell compartment in peripheral blood of SSc patients contains an elevated number of naive and a decreased number of memory B cells. The aim of the present research was to set up an algorithm for the extended analysis of these B-cell subsets and to evaluate the clinical significance of the defined subpopulations.

**Methods:** Peripheral blood samples were obtained from SSc patients and healthy controls, PBMCs were isolated using ficoll gradient centrifugation, followed by magnetic bead separation of CD19+ B cells. Multiparametric flow cytometry was performed with antibodies specific for CD27, IgD, CD80, CD95 molecules. CD27 positivity was used to distinguish between naive (CD27-) and memory (CD27+) B cells. Detection of IgD was applied to separate non-switched (CD27+IgD-)

and switched (CD27+IgD-) memory subsets. In addition to expression of CD80, which provides a co-stimulatory signal necessary for T cell activation and survival, expression of CD95, the FAS receptor was also examined to investigate the activation state of the previously identified B cell subpopulations.

**Results:** The ratio of naive B cells was higher, the proportion of memory B cells, more markedly the non-switched memory B cells, was decreased in SSc patients compared to healthy controls. Among SSc patients the ratio of switched memory and CD95+ memory B cells was higher in dcSSc and in patients with pulmonary fibrosis. The proportion of switched memory B cells was also elevated in the anti-Scl-70 antibody positive group compared to ACA negative patients. In dcSSc patients the ratio of CD95+ B cells was also higher.

**Conclusions:** According to our results detailed flow cytometric analysis of naive and memory B-cell subsets could contribute to better distinction between the two SSc subtypes and to evaluation of disease severity, consequently may be a useful new tool in routine immunological diagnostics.

#### INVESTIGATION OF HLA ASSOCIATION AND EPITOPE SPECIFICITY OF ANTI-ADAMTS13 ANTIBODIES

SINKOVITS GYÖRGY<sup>1</sup>, URAY KATALIN<sup>2</sup>, RÉTI MARIENN<sup>3</sup>, TORDAI ATTILA<sup>4</sup>, SZILÁGYI ÁGNES<sup>1</sup>, PROHÁSZKA ZOLTÁN<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Research Laboratory, <sup>3</sup><sup>rd</sup> Dept. of Internal Medicine, Semmelweis University, Budapest

<sup>2</sup>Research Group of Peptide Chemistry, Dept. of Organic Chemistry, Eötvös Loránd Science University, Budapest

<sup>3</sup>Dept. of Haematology and Stem Cell Transplantation, United St. István and St. László Hospital, Budapest

<sup>4</sup>Hungarian National Blood Transfusion Service, Budapest

**Introduction:** TTP (thrombotic thrombocytopenic purpura) belongs to the group of thrombotic microangiopathies. The primary form of the disease is characterized by a severe deficiency of the von Willebrand factor-cleaving protease ADAMTS13. In most cases the deficiency is caused by inhibitory autoantibodies, evolution of which is associated with HLA alleles. These antibodies target conformational and linear epitopes of ADAMTS13.

Aims of our experiments were to confirm the HLA association of the development of anti-ADAMTS13 antibodies in the Hungarian population and to investigate the epitope specificity of anti-ADAMTS13 antibodies of acute TTP patients.

**Patients and methods:** HLA-DR typing was performed in 64 TTP patients (mean age 41 years, 49 females) and 204 healthy Caucasian controls (mean age 46 years, 117 females).

The binding of antibodies to linear epitopes of the ADAMTS13 enzyme was determined by the pin-ELISA method using 15-amino-acid-long overlapping peptide sequences of the protease. Serum- or citrate-anticoagulated plasma-sam-

ples of 15 acute TTP-patients (mean age 37 years, 12 females) were measured with this assay. Samples of 10 healthy individuals (mean age 36 years, 8 females) were used as controls.

**Results:** There was a significant increase in the frequency of the HLA-DR11 (54,7% vs. 28,9%) and HLA-DR15 (29,7% vs. 14,2%) phenotypes in TTP patients as compared with controls, while the HLA-DR4 (7,8% vs. 20,6%) and HLA-DR7 (12,5% vs. 27,0%) phenotypes were present at a lower frequency in the patient group.

The antibodies showed significant binding to 42 of the 94 ADAMTS13-peptides. We found significant differences in the binding to acute versus control samples in the case of 8 of these peptide epitopes. Antibodies of acute TTP patients bound to the 558Arg-Thr572 and 1163Gln-Arg1177 sequences with higher affinity, while the 568Arg-Ser582, the 573Phe-Asn587, the 578Pro-Phe592, the 583Val-Val597, the 618Pro-Leu632 and the 668Leu-Pro682 peptides showed stronger antibody-binding in the case of control samples.

**Discussion:** We confirmed the HLA association in the development of TTP with HLA-DR11 and HLA-DR15 increasing the susceptibility to the disease and HLA-DR4 and HLA-DR7 being protective. Our results are in accordance with those of previous studies, although in our investigation not only the associations with the phenotypes HLA-DR11 and HLA-4 proved to be significant, but also those with HLA-DR15 and HLA-DR7.

We have furthermore identified linear peptide-epitopes of the ADAMTS13 protease which are recognized with different affinities by autoantibodies of acute patients and of healthy controls. These epitopes may form the base of a new method facilitating the diagnosis of TTP.

This work was supported by the Hungarian Research Fund (OTKA K100687).

#### THE IMMUNOMODULATORY ROLE OF BILE ACIDS

SÍPKA SÁNDOR

Division of Clinical Immunology, University of Debrecen, Hungary

Enzymatic oxidation of cholesterol generates numerous distinct bile acids that function both as detergents that facilitate digestion and adsorption of dietary lipids, and as hormones that activate five distinct receptors. Activation of these receptors alters gene expression in multiple tissues, leading to changes not only in bile acid metabolism but also in glucose homeostasis, lipid and lipoprotein metabolism, energy expenditure, intestinal motility and bacterial growth, inflammation and in the functions of liver-gut axis. This review sums up and discusses the main results and facts of the present knowledge about the physiologic and pathologic role of bile acids. A special attention is paid to the connection between bacterial lipopolysaccharides („endotoxins”) and

bile acids with some types of immunological disorders because bile acids are natural and physiological inhibitors of the intestinal absorption of bacterial endotoxins.

Thus, bile acids can take part in the regulation of innate immunity, various systemic inflammations like septic shock, inflammatory bowel diseases, allergy, psoriasis, cholestasis, obesity and metabolic syndrome.

#### THE ROLE OF POSTTRANSLATIONAL MODIFICATIONS OF MICROVESICLES IN SYSTEMIC IMMUNE RESPONSES OF MICE

SZABÓ-TAYLOR KATALIN É., KRISZTINA PÁLÓCZI, TAMÁS GÉZA SZABÓ, ANDREA NÉMETH, XABIER OSTEIKOETXEA, BARBARA SÓDAR, MARIANNA CSILLA HOLUB, ERNA PAP, BENCE GYÖRGY, ÉVA PÁLLINGER, MÁRIA PÁSZTÓI, EDIT I. BUZÁS

Dept. Genetics, Cell- and Immunobiology, Semmelweis University, Budapest, Hungary

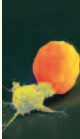
**Introduction:** Posttranslational protein modifications are considered to play an important role in orchestrating immune responses. However, there is very limited information on how posttranslational modifications of extracellular vesicles impact the immunogenicity of these structures.

The goal of our study was to assess immune responses of mice immunised with either native or posttranslationally modified microvesicles (MVs).

**Methods:** Murine Th1 T cell hybridoma (5/4E8) cells were used as a source of MVs. The secreted MVs were isolated by differential centrifugation and gravity driven filtration. Groups of mice (n=5/each group) were immunised subcutaneously with a stable emulsion of complete Freund's adjuvant and MVs (native, citrullinated (citMVs), deglycosylated (dgMVs) or oxidised MVs (oxMVs)). Total blood plasma IgM and IgG levels were measured by ELISA. Isolated MVs with/without post-synthetic modifications were used as recall antigens to stimulate draining lymph node cell cultures of mice immunised with the respective antigens.

**Results:** Total IgM and IgG antibodies of mice immunised with either native MVs or dgMVs, did not differ from those in the controls. In contrast, we found significantly elevated total IgM and IgG levels in sera of mice immunized with ox MVs ( $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively). Furthermore, total IgG but not IgM levels of mice immunised with citMVs was significantly elevated ( $p < 0.05$ ) as compared with adjuvant controls. In lymph node cells cultures, *in vitro* re-stimulation with dgMVs induced a more than two-fold elevation in IL-2 expression, while restimulation with autologous MVs, ox MVs and citMVs did not have an effect.

**Conclusions:** The elevated Ig levels induced by the immunisation with autologous oxMVs may reflect the reported immune anti-oxidant function of natural autoantibodies. Moreover, our data suggest that postsynthetic modifications of MVs (such as deglycosylation) may result in breaking T cell tolerance.



## SIGNIFICANCE OF HUMAN THYROGLOBULINE ANTIBODIES IN FEMALE INFERTILITY

SZABÓ ZSÓFIA, TÓTHNÉ FISCHER LILI, HARTVIG NÓRA, SIMON JUDIT, MIKLÓS KATA

HDF MC Military Hospital, Central Department of Laboratory Diagnostics, Budapest

Current guidelines for the laboratory and endocrine clinical practice attribute low relevance to measuring human thyroglobulin antibodies (Tg-Ab) in autoimmune thyroid diseases (AITD). This raises the question if preserving Tg-Ab as a routine investigation is necessary in patients with infertility or suspected AITD under present economic circumstances.

Several literature data support that thyroid specific auto-antibodies can be detected more frequently in infertile women than in healthy controls (30–35% and 5–10%, respectively). The pathogenic role of auto-antibodies has not clarified, yet. Nevertheless a number of studies suggest that infertile women with positive thyroid antibodies with proper medication can conceive and give life for healthy babies with good chance. Most work investigating the correlation between infertility and thyroid auto-antibodies do not identify the specific roles of the two relevant antibodies: thyroperoxidase antibody (TPO-Ab) and Tg-Ab.

Screening TPO-Ab is sufficient according to the generally accepted. Tg-Ab is considered to be less important.

Our aim was to investigate the specific roles of TPO-Ab and Tg-Ab in the background of female infertility when reviewing the data of the past 6.5 years.

Auto-antibodies were determined with commercial ELISA kits. We measured the thyroid antibodies of 11,034 patients with a mean age of 45.2 years. 800 patients out of them with a mean age of 36.2 years had a preliminary diagnosis of an infertility problem.

**Results:** we found an elevated Tg-Ab level with normal TPO-Ab value in 32 cases. In 7 out of the 32 cases the laboratory test was requested by the physician because of an infertility problem. 31 out of the 32 Tg-Ab positive but TPO-Ab negative patients were women. Among patients with infertility problem the rate of Tg-Ab positive but TPO-Ab negative result was 3 times higher than in patients with other problems. Our results indicate that isolated Tg-Ab positive cases occur more often in woman, especially in women with infertility. Therefore we consider the routine Tg-Ab measurement reasonable in female infertility. We suggest to take these results into account also in the laboratory and clinical practice.

## ANTI-CITRULLINATED PROTEIN ANTIBODIES (ACPA) MODULATE CYTOKINE GENE EXPRESSION IN LYMPHOCYTES DERIVED FROM PATIENTS WITH ACPA POSITIVE RHEUMATOID ARTHRITIS AND CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

SZARKA ESZTER<sup>1</sup>, SMADAR GERTEL<sup>2</sup>, MICHAEL SEGEL<sup>2</sup>, ADINA BORBÉLY<sup>3</sup>, FRUZZINA BABOS<sup>3</sup>, ANNA MAGYAR<sup>3</sup>, GABRIELLA SÁRMAY<sup>1</sup>, HOWARD AMITAL<sup>2</sup>, YEHUDA SHOENFELD<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Immunology, Eötvös Loránd University, Budapest, Hungary

<sup>2</sup>Zabludowicz Center for Autoimmune Diseases, Sheba Medical Center, Ramat Gan, Israel

<sup>3</sup>HAS-ELTE Research Group of Peptide Chemistry, Budapest, Hungary

**Background:** Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease characterized by production of pathogenic autoantibodies leading to chronic inflammation of the joint. RA patients' sera contain autoantibodies to citrullinated proteins (ACPA). Although ACPA have diagnostic value in RA, their biological role in disease development and their involvement in other organ damage is still unclear. ACPA have been shown to be able to initiate arthritis in murine models of RA. Pulmonary disease is a well-recognized and important extra-articular manifestation of RA. Smoking is a strong environmental risk factor linked to RA, and a large data-based study found that RA is associated with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). To study new pathways leading to ACPA pathogenicity in RA we first determined the modulatory effect of ACPA on immune cells.

**Methods:** ACPA were affinity purified from sera of RA patients. The ability of ACPA to modulate cytokine gene expression was studied in splenocytes derived from rats having adjuvant induced arthritis and in cells from ACPA positive COPD and RA patients. The presence of ACPA in the sera of COPD and RA patients was analysed by ELISA.

**Results:** ACPA significantly up-regulated mRNA of the inflammatory cytokines, TNF $\alpha$  and IL-6 in arthritic rats' lymphocytes compared to control cells. At the same time, we observed reduction of the anti-inflammatory cytokine TGF $\beta$  expression. Generally we observed similar tendencies in lymphocytes from ACPA positive COPD patients and RA controls.

**Conclusions:** Our *in vitro* study suggests that ACPA can modulate the immune response through enhancing the production of inflammatory cytokines.

**Fund:** This project was supported by an EFIS-IL fellowship.

## INTERACTION OF CELL MEMBRANE PERMEABLE PHOSPHOPEPTIDES OF GAB1 ADAPTOR PROTEIN WITH SHP2 PHOSPHATASE INHIBITS B CELL SIGNALING

SZARKA ESZTER<sup>1</sup>, DÁNIEL SZILI<sup>1</sup>, ÁKOS KERTÉSZ<sup>1</sup>, JÁNOS VARGA<sup>2</sup>,  
ÁGNES GARAI<sup>2</sup>, GERGŐ GÓGL<sup>2</sup>, ATTILA REMÉNYI<sup>2</sup>, VÁRADI GYÖRGYI<sup>3</sup>,  
GÁBOR TÓTH<sup>3</sup>, GABRIELLA SÁRMAY<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Immunology of Eötvös Loránd University, Budapest

<sup>2</sup>Dept. of Biochemistry of Eötvös Loránd University, Budapest, Hungary

<sup>3</sup>Department of Medical Chemistry, University of Szeged, Szeged, Hungary.

**Background:** The multisite docking protein Gab1 plays essential role in growth factor, cytokine- and antigen receptor signaling. Gab1 has several tyrosine motifs that get phosphorylated upon cell activation and serves as a platform for SH2 domain containing signaling molecules. One of the main binding partners of Gab1 is SHP-2 tyrosine phosphatase. The intimate interaction between phosphorylated Gab1 motifs and SHP-2 activates the phosphatase. SHP-2 by activating the Erk pathway may play a positive role in signaling, additionally, its role is crucial in many hematological malignancies and cancer.

**Methods:** For binding affinity measurements fluorescence polarization based method was used, Erk inhibition was investigated by western blotting. Phosphatase activity was measured by the RediPlate 96 EnzChek Tyrosine Phosphatase Assay Kit (Molecular Probes); protein-peptide structure was solved by crystallization and X-ray structure solution.

**Results:** First we identified the proteins that bind to Gab1 N terminal phosphopeptide, GDKQVEY(p)LDLDD from B cell lysate. This phosphopeptide of Gab1 binds PLCγ and SHP2. We have analyzed the interaction between the phosphopeptides and the SH2 domains of SHP-2 and found that the N terminal SH2 domain binds GDKQVEY(p)LDLDD with one order of magnitude higher affinity as compared to the C terminal domain. In the contrary, the C terminal peptide of Gab1, DERVDY(p)VVDQK peptide binds only to the C terminal but not to N terminal SH2 domain.

We elucidated the molecular interaction between SHP2 SH2 domains and corresponding tyrosyl phosphorylated motifs of the Gab1 adapter. Comparison of the phosphopeptide unbound and bound crystal structures of N terminal SH2 domain suggests that Tyr66 have a critical role in the allosteric activation of the phosphatase domain. Binding of GDKQVEY(p)LDLDD to the N terminal SH2 domain enhances SHP2 phosphatase activity in vitro, moreover, when administered as cell membrane permeable phosphopeptide into B cells, the phosphopeptide reduces Erk activity and cell proliferation.

**Conclusions:** We show that an externally delivered GAB1 phosphopeptide is capable to inhibit ERK signaling in activated B-cells suggesting that specific targeting of SHP2-Gab1

association could be an efficient strategy to combat disorders of Ras/MAPK signaling.

Supports: Hungarian National Science and Research Development Foundation (OTKA) K60760, Peter Pazmany programme of the National Office for Research and Technology (CellKom RET)

## SELF-DRIVEN MICROFLUIDIC CHAMBERS FOR A PROTEIN MICROARRAY CELL-BINDING ASSAY

SZITTNER ZOLTÁN<sup>1</sup>, PAPP KRISZTIÁN<sup>1</sup>, HOLCZER ESZTER<sup>2</sup>,  
HERBÁTH MELINDA<sup>1</sup>, KECSE-NAGY CSILLA<sup>3</sup>, FÜRJES PÉTER<sup>2</sup>, PRECHL JÓZSEF<sup>1</sup>

<sup>1</sup>MTA-ELTE Immunology Research Group, HAS, Budapest, Hungary

<sup>2</sup>Research Centre for Natural Sciences – HAS, Inst. of Technical Physics and Materials Science, MEMS Lab, Budapest, Hungary

<sup>3</sup>Department of Immunology, ELTE, Budapest, Hungary

Protein microarray technology has been developed for the parallel measurement of multiple interactions between protein binding partners. While these interactions are usually implemented between solid surface-bound and soluble molecules, the sample transport and characterisation technology has also been adapted for monitoring interactions between solid surface and cells in suspension. For such assays crucial steps are the controlled injection to, incubation on and washing of the cell suspension from the surface carrying the array features.

Since incubation and washing conditions were found to have significant effects on the outcome of the assay a microfluidic chamber system was developed to solve the effective filling and clearing the microarray surface by capillary forces. The microfluidic structure was fabricated by soft lithography technique in Polydimethylsiloxane (PDMS) using SU-8 epoxy based photoresist as moulding replica. Immunoglobulin subclasses were printed onto hydrogel-covered microarray slides, which were blocked afterwards. The sample chambers having height of 20 μm were precisely aligned to the positions of a standard 16-pad microarray slide. Experiments with whole blood or suspensions of the monocytoid cell line U937 showed that cells were efficiently captured by the relevant microarray features. Subsequently non-adherent cells were smoothly removed from the microarray surface by washing buffer injected through the inlet port of the chamber and collected on conventional filter paper. The readout of the assay is the quantitation of bound fluorescently labeled cells by a microarray scanner.

A special cellular assay has been developed for monitoring immune cell adhesion and activation on protein microarrays consisting of antigens, antibodies and complexes thereof. Immune cells, such as monocytes and neutrophil granulocytes recognize antigen-bound antibodies – immune

complexes – via immunoglobulin and complement protein receptors. These receptors trigger the binding of cells to the microarray surface.

We proved that the application of capillary driven microfluidic transport system for filling and exhaustion the sample chambers attached to microarrays can significantly improve the ease of handling and reproducibility of cellular binding assays.

This work was supported by OTKA K103683 grant to József Prechl, and by OTKA-PD104779 grant to Krisztián Papp. Krisztián Papp is supported by the János Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences.

#### ALLELE-SPECIFIC ANALYSIS OF COMPLEMENT FACTOR H PROTEIN IN ATYPICAL HAEMOLYTIC UREMIC SYNDROME

TAKÁCS BEÁTA, NÓRA SZARVAS, ÁGNES SZILÁGYI, ZOLTÁN PROHÁSZKA

Semmelweis University, 3rd Department of Medicine, Research Laboratory and Füst György Komplement Diagnosztikai Laboratórium

**Introduction:** Atypical haemolytic uremic syndrome (aHUS) is caused by abnormalities of the complement alternative pathway (AP) regulation. Factor H (FH) is an important regulatory protein of the AP, which plays a role in the inactivation of the active C3b molecule as the cofactor of factor I. FH (CFH). Mutations and polymorphisms in CFH may affect the functional characteristics or quantities of the protein. A new ELISA method specific for a single amino-acid difference of Factor H at position 402 (tyrosine or histidine) was recently described. Using this allele-specific method it becomes possible to determine the level of Y402 or H402 factor H proteins (and their ratio), which are produced from the different alleles in Y402H heterozygous subjects.

Based on the literature the CFH-H3 haplotype is associated with the development of aHUS, but the background of the connection is still unexplored. We hypothesize that the H3 haplotype acts through reduced factor H concentration as a risk factor for aHUS. Since the Y402H polymorphism is a constituent of the H3 haplotype, allele-specific protein measurement may help investigate the above hypothesis.

**Methods:** PCR-RFLP technique and allele-specific ELISA was used in the group of 79 healthy control subjects and 39 aHUS patients or their family members to determine the genotype of Y402H polymorphism and Y402 or H402 factor H antigen levels.

In addition to the Y402H, additional polymorphisms of factor H (-332:T (promoter region), V62I:G, Q672Q:G, E936D:T) were genotyped with PCR-RFLP and allelic discrimination real time PCR.

**Results:** In case of patients carrying a mutation with a known damaging effect (Arg1149X, Ser722X, Cys959Ser) reduced protein level was observed according to the mutation

carrier allele. Moreover, we detected decreased factor H concentrations in case of some mutation carrier patients (Val609Asp and Thr1216Del), who's variations have not been characterized functionally previously.

The ratio of Y402/H402 factor H protein levels allowed to determine that the protein according to the H3 haplotype (tyrosine at position 402) was produced in smaller quantities than the non-H3 protein (histidine at position 402).

**Conclusion:** We optimized an Y402H allele-specific ELISA method, which allows to measure the factor H concentrations produced from the two alleles of CFH. Currently the method is appropriate to detect the effect of the mutations or polymorphisms onto protein expression in Y402H heterozygous subjects. Based on our observations the H3 haplotype negatively affects the amount of the produced factor H protein novel, and using this ELISA mutations can be characterized functionally.

#### ANTI-CANCER THERAPIES ALTER THE EXOSOME PRODUCTION AND FUNCTION OF NASOPHARINGEAL CARCINOMA CELLS

Tarnai Zsófia<sup>1, 2</sup>, Gyukity-Sebestyén Edina<sup>1</sup>, Harmati Mária<sup>1</sup>, Dobra Gabriella<sup>1</sup>, Okay Saydam<sup>4</sup>, László Janovák<sup>3</sup>, Imre Dékány<sup>3</sup>, Nagy Katalin<sup>2</sup>, Buzás Krisztina<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Hungarian Academy of Sciences, Biological Research Center, Szeged

<sup>2</sup>Univ. of Szeged, Faculty of Dentistry

<sup>3</sup>Univ. of Szeged, Faculty of Science and Informatics

<sup>4</sup>Med. Univ. of Vienna, Molecular Neuro-Oncology Research Unit

**Introduction:** Head and neck cancer is the sixth most common cancer worldwide. One of the most remarkable malignancies of the head and neck region is nasopharyngeal carcinoma (NPC). NPC has a high metastatic activity. Beside the conventional metastasis formation pathways, RNA containing exosomes may play a key role in metastatic spread of NPC. Exosomes are nanometer-sized membrane vesicles secreted by cancer cells into the extracellular milieu. NPC-derived exosomes contain microRNAs, which are nowadays in the focus of intense research.

The purpose of this study was to investigate whereby and how the microRNAs packaged into exosomes assist the metastatic mechanism of NPC and how can cytostatic therapy change the characteristics of the tumor derived exosomes. In our model we compared the exosome producing capacity of a NPC cell line under conventional chemotherapy and alternative (AgTiO<sub>2</sub> photocatalyst particles generated reactive oxygen species) cytostatic treatment.

**Materials and Methods:** Cells of the 5-8F NPC cell line were treated with the commonly used chemotherapeutic agent doxorubicin and a new alternative method (photocatalytic activity of visible light active AgTiO<sub>2</sub> photocatalyst

nanoparticles) to compare the effects on the output of exosomes and microRNA profiles.

MicroRNA content of the nasopharyngeal cell derived exosomes analyzed with SOLiD 5500xl technology. The sequences were annotated in CLC Genomics Workbench version 5.5.1. Nanosight was performed with Nanosight NS500 device.

**Results:** The cytostatic activity of the AgTiO<sub>2</sub> photocatalyst particles generated reactive oxygen species is commensurable with the cytostatic activity of a classic chemotherapeutic substratum (doxorubicin). Both doxorubicin and AgTiO<sub>2</sub> catalysed treatment increased exosome production by the NPC cell line. Our data suggested, that the tumor cell devastation altered both the number and the quality of the exosomes.

We have found significant changes of the expression rate of following microRNAs: miR-205, miR-451a, miR-125a, miR-30d, miR-30c-1, miR-30c-2, miR-425, and miR-17.

**Conclusions:** We suggest that increased exosome production may potentiate the information-transfer from tumor cells to the surrounding stromal cells and influence metastasis formation during cytostatic treatment. The differences in microRNA profiles after cytostatic versus photocatalytic treatment may lead to the identification of novel therapeutic targets to treat NPC.

#### PROPIONIC ACID SECRETED BY PROPIONIBACTERIUM ACNES MAY MODIFY THE CELLULAR PROPERTIES OF KERATINOCYTES

TAX GÁBOR<sup>1</sup>, EDIT URBÁN<sup>2</sup>, RÓBERT PUSKÁS<sup>3</sup>, ZOLTÁN KÓNYA<sup>3, 4</sup>, LAJOS KEMÉNY<sup>1, 5</sup> AND KORNÉLIA SZABÓ<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Department of Dermatology and Allergology, University of Szeged, Hungary

<sup>2</sup>Institute of Clinical Microbiology, University of Szeged, Hungary

<sup>3</sup>Department of Applied and Environmental Chemistry, University of Szeged, Hungary

<sup>4</sup>Reaction Kinetics and Surface Chemistry Research Group of the Hungarian Academy of Sciences, Szeged, Hungary

<sup>5</sup>MTA-SZTE Dermatological Research Group, Szeged, Hungary

*Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) bacterium is a member of the skin microflora, but may also serve as an opportunistic pathogen contributing to the pathogenesis of acne vulgaris. Earlier we have shown that various *P. acnes* strains (889, 6609, ATCC 11828) belonging to different phylogroups differentially affect the cellular properties of cultured human keratinocytes in a strain-specific and dose-dependent manner. High doses of the pathogenic 889 and ATCC 11828 strains also resulted characteristic morphological changes and membrane damage, which lead to the cytotoxicity of human *in vitro* cultures keratinocytes (HPV-KER).

Our aim was to further analyze the interaction of human *in vitro* cultured keratinocytes and identify bacterially-derived factors that may mediate the previously observed effects.

In order to systematically quantify the *P. acnes*-induced cytotoxicity we performed spectrophotometric lactate dehydrogenase (LDH) and hemoglobin (Hgb) assays using supernatant samples of bacterial treated HPV-KER cells and erythrocytes. The amount of released free LDH and Hgb exhibited strain- and dose-dependent differences. We also noted the differential acidification of the pH in the culture supernatants. *P. acnes* is known to secrete propionic acid (PA), a characteristic, acidic end-product of bacterial fermentation in these species. In order to analyze whether *P. acnes*-derived PA has any role in the observed cellular changes we treated HPV KER cells with the acid and analyzed the cell morphology. Microscopic analysis of the PA treated cultures revealed cells with similar irregular membrane morphologies observed earlier upon high dose *P. acnes* 889 and ATCC 11828 treatments. Finally, we measured the amount of secreted short chain fatty acids (SCFA) in the *P. acnes* 889, 6609 and ATCC 11828-treated HPV-KER supernatant samples by mass spectrometry. These studies revealed marked differences in the amount of secreted PA; high dose treatment of the 889 and ATCC 11828 strains leading to higher levels.

*P. acnes*-induced cellular changes depend on the type and amount of the applied bacterial strains. The observed differences may be due to variations of the amount of a secreted metabolic end-product, PA. Together with other bacterially-derived molecules it may be an active contributor of the *P. acnes*-induced cellular changes.

#### CHARACTERIZATION OF INTERLEUKIN-1B PRODUCTION IN MYELOID CELLS IN RESPONSE TO THE FUNGAL PATHOGENS CANDIDA ALBICANS AND CANDIDA PARAPSILOSIS

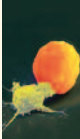
TÓTH ADÉL<sup>1</sup>, KATALIN CSONKA<sup>1</sup>, MIHAI G. NETEA<sup>2</sup>, ATTILA GÁCSE<sup>1</sup>

<sup>1</sup>University of Szeged, Department of Microbiology, Szeged, Hungary

<sup>2</sup>Department of Medicine, Nijmegen Institute for Infection, Inflammation, and Immunity, Radboud University Nijmegen Medical Center, Nijmegen, The Netherlands

**Introduction:** *Candida albicans* and *C. parapsilosis* are clinically significant opportunistic fungal pathogens. Interleukin-1β (IL-1β), which is released from myeloid cells upon inflammasome activation, plays a crucial role in antifungal immunity. We have previously shown that *C. parapsilosis* induces lower T helper 17 (Th17) differentiation in comparison to *C. albicans*. In this study, we characterized the production of IL-1β in response to *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*.

**Methods:** Freshly isolated human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs; 5x10<sup>5</sup>) were stimulated with *C. albicans* or *C. parapsilosis* at an MOI of 0.02 for 24 h. PMA-induced (10 nM, 24 h) THP-1 monocytes (5x10<sup>5</sup>) were stimulated with different amounts of *C. albicans* or *C. parapsilosis* for 24 h in the presence or absence of specific inhibitors. The con-



centration of cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF $\beta$ , IL-6) in cell culture supernatants was measured by ELISA. The amount of pro-IL-1 $\beta$  mRNA was determined by qRT-PCR. The concentration of pro-IL-1 $\beta$  protein was measured by ELISA following the lysis of THP-1 cells by repeated freeze-thaw cycles. Intracellular ROS was detected by DCFDA fluorescent assay.

**Results:** PBMCs stimulated with *C. parapsilosis* produced similar quantities of TNF $\alpha$  and IL-6, but much lower amounts of IL-1 $\beta$ , compared to *C. albicans*-stimulated cells. In PMA-induced THP-1 monocytes, *C. albicans* induced the release of IL-1 $\beta$  after 24 hours already at an MOI of 0.01, while a 100-times higher dose of *C. parapsilosis* cells (MOI of 1) was needed for the induction of IL-1 $\beta$  secretion. This marked difference in secreted IL-1 $\beta$  levels originated from the differential processing pro-IL-1 $\beta$ , as we found no difference in the level of IL-1 $\beta$  mRNA and pro-IL-1 $\beta$ . As it has been associated with inflammasome activation, we also measured the amount of intracellular ROS and found that *C. albicans* induced higher ROS production in THP-1 cells compared to *C. parapsilosis*. We also found that both *C. albicans* and *C. parapsilosis* induced pyroptosis in macrophages after 24 h, and the production of IL-1 $\beta$  in response to both species was dependent on Caspase-1, Caspase-8, Syk, NADPH oxidase and TLR4.

**Conclusions:** Our results strongly suggest that although *C. parapsilosis* is able to induce inflammasome activation when added in a high dose, it is very inefficient in inducing pro-IL-1 $\beta$  processing in comparison to *C. albicans*. These findings contribute to the better understanding of the pathogenesis of *Candida* infections, and highlight the importance of studies focusing on different *Candida* species rather than *C. albicans* alone when investigating the immunity against these pathogens.

#### EFFECTS OF GENETIC MODIFICATION OF LACTOBACILLUS CASEI BL23 CELL WALL ON HUMAN MONOCYTE-DERIVED DENDRITIC CELL FUNCTIONS

TÓTH MÁRTA<sup>1</sup>, PÉTER GOGOLÁK<sup>1</sup>, KRZYSZTOF REGULSKI<sup>2</sup>, DE FEKETE<sup>1</sup>, MARIE-PIERRE CHAPOT-CHARTIER<sup>2</sup>, ÉVA RAJNAVÖLGYI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Immunology, University of Debrecen Faculty of Medicine, Hungary

<sup>2</sup>Institut National de la Recherche Agronomique, UMR1319 Micalis, Jouy-en-Josas, France

**Introduction:** Lactobacilli are commensal bacteria, which can be found in the human gut. They are facultative anaerob, rod-shaped Gram-positive bacteria with pro-biotic potential. Several strains of Lactobacilli have attracted intense interest due to their immunomodulatory properties. One of the most extensively studied strain is Lactobacilli rhamnosus GG which mediates anti-apoptotic activity in intestinal epithelial cells (IEC). The secreted factors responsible for this effect were identified as proteins with peptidoglycan-hydrolase (PGH)

activity. The two identified proteins are able to stimulate Akt signaling in host IEC, prevent these cells from damage and cytokine-induced apoptosis. Genes encoding homologues enzymes are present in closely related strains of *L. rhamnosus* such as *L. casei* BL23 which was the target of our experimental model.

**Methods:** Monocytes were separated from human buffy coats and differentiated to dendritic cells (DCs) *in vitro* in the presence of GM-CSF and IL-4 for 5 days. *L. casei* BL23 wild type and two peptidoglycan-hydrolase mutant bacteria ( $\Delta$ 2770 and  $\Delta$ 2770/p45) were added to the monocyte-derived DCs (moDCs) for 24 hours. The phosphorylation status of the three major families of mitogen-activated protein kinases (MAPK) in moDCs was studied with MAPK array. Phagocytic activity of the stimulated moDCs was monitored by flow cytometry. Culture supernatants were collected on day 6 of moDC differentiation and the concentration of the secreted cytokines was measured by ELISA. The number of IFN- $\gamma$  and IL-17 producing T cells was detected by ELISPOT assays.

**Results:** Our experimental results showed that the phagocytic activity and the secretion of cytokines increased after bacterial stimulation and the genetic modification of the *L. casei* cell wall could modulate the phosphorylation status of selected MAP kinases. These experiments also revealed that the most efficient uptake by moDCs could be detected with the wild-type bacteria that also triggered the highest cytokine levels secreted by moDCs. *L. casei* BL23 wild-type and PGH negative mutants were able to induce the polarization of T lymphocytes by moDCs to Th1 or Th17 directions.

**Conclusions:** In our *in vitro* culture system we compared the functional activities of live wild-type *L. casei* BL23 bacteria as compared to their peptidoglycan-hydrolase mutants. Genetic modification of the bacterial cell wall modulated the activating potential and the cytokine secretion of moDCs and affected the outcome of T lymphocyte responses.

#### COMPLEMENT FACTOR H AUTOANTIBODIES B CELL EPIOTOPE ANALYSIS IN AUTOIMMUNE HAEMOLYTIC UREMIC SYNDROME

TROJNÁR ESZTER<sup>1</sup>, URAY KATALIN<sup>2</sup>, T. SAKARI JOKIRANTA<sup>3</sup>, PROHÁSZKA ZOLTÁN<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Füst György Komplement Diagnosztikai Laboratórium, III. Department of Internal Medicine, Semmelweis University Budapest

<sup>2</sup>MTA-ELTE Research Group of Peptide Chemistry

<sup>3</sup>University of Helsinki, Department of Bacteriology and Immunology, Haartman Institute

**Introduction:** One of the most common factors evoking acute renal failure in children is hemolytic uremic syndrome (HUS). A rare form of HUS is mediated by autoantibodies against complement factor H (CFH). In patients with anti-CFH autoantibodies mutation of CFH related proteins (CFHR), most

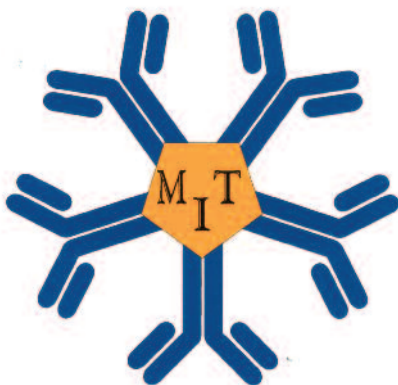
often CFHR3-1 is observed. CFH domains 19-20 and the homologous ones of CFHR1 differ only in two amino acids, but these slight differences could affect the binding sites for the autoantibodies. To understand the origin of anti-CFH autoantibodies the exploration of their B cell epitope specificities would provide essential data, therefore our aim was to carry out the B-cell epitope mapping of anti-CFH autoantibodies, and to investigate the inhibitory effect of CFHR1 domains 4-5 on antibody binding to CFH.

**Methods:** We analyzed 5, anti-CFH IgG positive HUS patients' sera taken in the first episode of the disease. As control sera of healthy children and patients' sera from remission was used. The binding of antibodies to overlapping synthetic peptides representing selected regions of CFH and CFHR1 was measured by altered ELISA method. We used competitive ELISA technique to investigate antibody binding to CFH in presence of CFH domains 19-20 and CFHR1 domains 4-5.

**Results:** In healthy controls enhanced reactivity was measured in three regions of CFH (AA1142-1156, AA1182-1196, AA1202-1216). Serum samples from HUS patients contained antibodies to these 3 regions and to two additional (AA1157-1171, AA1177-1191) regions as well. Increased antibody binding was detected in patients' sera to CFHR1, too. Although in competitive assays CFH showed significantly stronger inhibition than CFHR1, both were capable to maximally inhibit antibody binding to CFH.

**Conclusion:** Our results corroborate a recent publication, in which anti-CFH autoantibodies' binding was also reported to multiple regions of factor H in healthy controls and in HUS patients. However, we describe here for the first time specific B-cell epitopes localized on the 19th and 20th CCP domains of factor H in aHUS patients. Further analysis of these data might facilitate the exploration of the autoantibody productions' mechanism and may potentially lead to diagnostic improvements. Besides, we found that multiple linear epitopes of CFH and CFHR1 determine the inhibition of antibody binding to CFH.

This work was supported by the K100687 grant of the Hungarian Research Fund.



#### AUTOANTIBODIES AGAINST THE COMPLEMENT REGULATOR FACTOR H IN NEUROMYELITIS OPTICA PATIENTS

UZONYI BARBARA<sup>1</sup>, ZSÓKA WEISZHÁR<sup>2</sup>, HELLE H. NIELSEN<sup>3</sup>, ANNA ERDEI<sup>1</sup>, ZSOLT L. ILLÉS<sup>3, 4</sup>, MIHÁLY JÓZSI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>MTA-ELTE Immunology Research Group, Department of Immunology, Eötvös Loránd University, Budapest, Hungary

<sup>2</sup>MTA-ELTE „Lendület” Complement Research Group, Department of Immunology, Eötvös Loránd University, Budapest, Hungary

<sup>3</sup>Department of Neurology, Institute of Clinical Research, Odense University Hospital, University of Southern Denmark, Odense, Denmark

<sup>4</sup>Division of Clinical and Experimental Neuroimmunology, University of Pécs, Pécs, Hungary

**Introduction:** Neuromyelitis optica (NMO) is an autoimmune inflammatory disorder of the central nervous system (CNS), characterized by pathogenic, complement-activating autoantibodies against the main water channel in the CNS, aquaporin 4 (AQP4), and lesions in the CNS that contain complement activation products. NMO is frequently associated with other autoantibodies and antibody-mediated diseases. Because complement is implicated in the pathogenesis of NMO, the aim of this study was to evaluate the presence of autoantibodies against the complement regulator factor H and the alternative pathway C3 convertase components C3b and factor B in the serum of NMO patients.

**Methods:** Serum samples of 45 NMO patients, who were all seropositive for AQP4 autoantibodies, were screened by ELISA for autoantibodies against C3b, factor B, and factor H. Recombinant fragments of factor H and recombinant factor H-related proteon 1 (FHR1), expressed in insect cells, were used in ELISA to map the binding sites of the autoantibodies. Serum FHR1 was analyzed by Western blot. The presence of factor H-antibody complexes in the sera were analysed after IgG precipitation and Western blotting. The avidity of the antibodies were measured in ELISA using NaSCN as chaotropic salt.

**Results:** Four of 45 NMO patients (~9%) had factor H autoantibodies and none had antibodies to C3b and factor B. The factor H autoantibody titers were low in three and high in one of the patients' sera. The avidity indexes calculated for the four autoantibodies were low. We could also detect factor H-IgG complexes using a monoclonal antibody to factor H as a capture antibody in ELISA and in the IgG fractions by Western blot. The autoantibodies bound to factor H domains 19-20, and also recognized the homologous protein FHR1. This binding pattern was similar to pathogenic factor H autoantibodies associated with atypical hemolytic uremic syndrome (aHUS), used as positive controls in the assays. However, in contrast to the majority of autoantibody-positive aHUS patients, these NMO patients did not lack FHR1.

**Conclusions:** Our results demonstrate that factor H autoantibodies are not uncommon in NMO. Our data also suggest



that generation of antibodies against complement regulating factors among other autoantibodies may contribute to the complement-mediated damage in NMO.

#### CHARACTERIZATION OF A MULTIPLE TARGET KINASE INHIBITOR USING DIFFERENT INFLAMMATORY CELLULAR MODELS

VARGA ATTILA<sup>1</sup>, PÁL GYULAVÁRI<sup>1</sup>, ZOLTÁN GREFF<sup>2</sup>, TAMÁS NÉMETH<sup>3</sup>, KRISZTINA KERÉKES<sup>4</sup>, DIÁNA BRAUSWETTER<sup>5</sup>, MÁRTON KOKAS<sup>5</sup>, ANNA ERDEI<sup>4</sup>, ATTILA MÓCSAI<sup>3</sup>, GYÖRGY KÉRI<sup>1, 2, 5</sup>, TIBOR VÁNTUS<sup>5</sup>

<sup>1</sup>MTA-SE Pathobiochemistry Research Group, Budapest, Hungary

<sup>2</sup>Vichem Chemie Research Ltd., Budapest, Hungary

<sup>3</sup>Department of Physiology, Semmelweis University, Budapest, Hungary

<sup>4</sup>Department of Immunology, Eötvös Loránd University, Budapest, Hungary

<sup>5</sup>Department of Medical Chemistry, Molecular Biology and Pathobiochemistry, Semmelweis University, Budapest, Hungary

**Background:** Inflammatory diseases have very severe effects on healthcare worldwide, therefore development of novel inflammatory pathway specific inhibitors would be a great value. Amongst many kinases, vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) and protein kinase D1 (PKD1) are potential targets in inflammatory diseases. Since, in the last few years the paradigm of drug discovery changed from the single target drug to the multiple target drug approach, our aim was to identify and characterize a multiple target kinase inhibitor which can efficiently inhibit VEGFR2 and PKD1 related cell functions in inflammatory cell models.

**Methods:** We used the immobilized metal affinity for phosphocemicals (IMAP) method for the recombinant VEGFR2 and PKD1 kinase assays. In the endothelial EA.hy926 cell model we used western blot analysis to investigate the intracellular effect of the inhibitor, furthermore wound healing and Matrigel based tube formation assays to explore the anti-angiogenic effect of the compound. Immune-complex induced superoxide production of human neutrophils was determined by ferricytochrome c assay. Mediator secretion by RBL-2H3 mast cells in response to stimulation by FcεRI clustering was monitored by measuring activity of the secreted granular enzyme β-hexosaminidase.

**Results:** After the screening of a kinase specific molecule library, we selected the best VEGFR2 and PKD1 inhibitor and determined its biochemical IC<sub>50</sub> value. Then, we tested the effect of this inhibitor on different inflammatory cell based models. Our first model was the EA.hy926 endothelial cell line, where our inhibitor effectively diminished endogenous VEGFR2 and PKD1 activation, furthermore reduced VEGFR2 and PKD1 involved cellular functions, such as cell migration and *in vitro* angiogenesis. In human neutrophils PKD1 is

involved in immune-complex induced superoxide production, which was reduced by our inhibitor in a concentration dependent manner. Furthermore, in mast cells PKD1 is implicated in FcεRI triggered mediator release, which was also attenuated by our compound.

**Conclusion:** We have identified and characterized a multiple target kinase inhibitor, which could effectively block VEGFR2 and PKD1 related cellular functions in different inflammatory cell models.

#### THE ROLE OF HEADCASE IN THE HEMATOPOIESIS OF DROSOPHILA MELANOGASTER

VARGA GERGELY ISTVÁN<sup>1</sup>, VIKTOR HONTI<sup>1</sup>, GÁBOR CSORDÁS<sup>1</sup>, RÓBERT MÁRKUS<sup>1</sup>, FERENC JANKOVICS<sup>1</sup>, TAMÁS LUKÁCSOVICH<sup>2</sup>, ÉVA KURUCZ<sup>1</sup> AND ISTVÁN ANDÓ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Biological Research Centre of the Hungarian Academy of Sciences, Szeged

<sup>2</sup>Developmental Biology Center, University of California, Irvine

**Introduction:** Similarly to mammalian blood cells, the hemocytes of *Drosophila melanogaster* are located in separate compartments and differentiate in multiple waves. This process is under the control of phylogenetically conserved epigenetic and transcription factors. Previously, we observed that although the three larval hematopoietic compartments – the sessile tissue, the circulation and the lymph gland – arise from different mesoderm anlagen, they all contribute to the formation of the effector cells: the phagocytic plasmatocytes, the melanotic crystal cells and the capsule forming lamellocytes. Currently, we are investigating genes that may be instrumental in the control of the differentiation of hemocytes. One of these is headcase (*hdc*), the ortholog of the human tumor suppressor HECA, which is a repressor of numerous developmental processes in *Drosophila*. Previously, we observed that *hdc* is expressed in the lymph gland, however, the hemocytes leaving the organ upon immune induction and differentiating into effectors lose *hdc* activity, which suggests that *hdc* may be a regulator of hemocyte differentiation.

**Methods:** We applied our newly generated *hdc*-Gal4 driver and numerous hemocyte specific transgenic drivers to silence *hdc* by RNAi, and used immunological markers and *in vivo* transgenic reporters to study hemocyte differentiation. The prepared samples were analyzed with fluorescent and confocal microscopy. The hematopoietic compartments were also observed with *in vivo* confocal videomicroscopy.

**Results:** Silencing of *hdc* with general hemocyte specific drivers resulted in the spreading of circulating plasmatocytes, and in the loss of plasmatocyte specific marker expression in all hematopoietic compartments. Using the *hdc*-Gal4 driver, we found that *hdc* is expressed not only in the hemocytes of

the lymph gland, but also in the Posterior Signaling Center (PSC), the hematopoietic niche that blocks the differentiation of hematopoietic progenitors of the compartment. We found that lymph gland specific *hdc* silencing is sufficient for lamellocyte differentiation in every hematopoietic compartments. Moreover, we confined this regulatory function to the PSC.

**Conclusions:** Our results show that *Hdc* – expressed by the PSC cells – plays a regulatory role in the differentiation of lamellocytes.

**Acknowledgement:** Our work is supported by OTKA NK-101730 and TÁMOP 4.2.2.A-11/1KONV-2012-0035 grants. The research of V. Honti and G. I. Varga was supported by the European Union and the State of Hungary, co-financed by the European Social Fund in the framework of TÁMOP-4.2.4.A/ 2-11/1-2012-0001 'National Excellence Program'.

#### ELEVATED NEUTROPHIL ELASTASE LEVELS IN HEREDITARY ANGIOEDEMA

VESZELI NÓRA, DOROTTYA CSUKA, ZSUZSANNA ZOTTER, ÉVA IMREH, SZABOLCS BENEDEK, VARGA LILIAN, FARKAS HENRIETTE

3rd Department of Internal Medicine,  
Semmelweis University, Budapest

**Introduction:** Hereditary angioedema due to C1-inhibitor deficiency (C1-INH-HAE) is a rare autosomal dominant disorder. It is characterised by the episodic swelling of subcutaneous tissues, the intestinal wall, and the upper airway mucosa.

According to several case reports and to our recent studies, white blood cell count may increase (mostly of neutrophil granulocytes [NG]) during attacks of C1-INH-HAE. The production of neutrophil elastase (NE) – as a marker of NG activation- during oedematous attacks has not yet been investigated. As shown by earlier studies, NE can inactivate C1-INH. This might contribute to the activation of the plasma enzyme systems inhibited by C1-INH, and thereby also to oedema formation. Our questions were whether NE level is elevated in C1-INH-HAE patients in symptom-free periods and during attacks, as well as whether NE is correlated with NG count or functional C1-INH activity.

**Methods:** We determined the complete blood count and leukocyte differential in blood samples collected during and between oedematous episodes from 26 C1-INH-HAE patients, as well as from 26 healthy controls. We also measured the serum levels of NE and of functional C1-INH.

**Results:** Both WBC and NG were significantly elevated (after adjustment for haemoconcentration) in samples obtained during attacks compared with those collected in a symptom-free period ( $p=0.0184$  and  $p=0.0419$  respectively). In agreement with our earlier findings, these parameters were lower in healthy controls than in patients either during or between attacks ( $p<0.0001$ ,  $p=0.0261$  and  $p=0.0004$ ,  $p=0.0458$ ). In C1-INH-HAE patients, NE levels were higher in

samples obtained during an attack than in those collected from the same patients during a symptom-free period ( $p=0.0350$ ). In healthy controls, NE levels were lower than the concentration measured in patients either during or between attacks ( $p=0.0004$ ,  $p=0.0101$ ). We did not find a correlation between NE level and NG count or between the former and functional C1-INH activity.

**Conclusion:** Patients with C1-INH-HAE have elevated NG counts and NE levels; both increase further during attacks. Nevertheless, NE level does not correlate either with NG count or with functional C1-INH activity. This might suggest that systemic neutrophil activation and the attenuation of C1-INH function are both uncharacteristic. This, however, does not exclude the local activity of other pathophysiological processes at the site of oedema formation.

This research was supported by the grant OTKA-NKTH 100886, the European Union and the State of Hungary, and co-financed by the European Social Fund within the framework of TÁMOP 4.2.4. A/1-11-1-2012-0001 'National Excellence Program'.

#### TISSUE-SPECIFIC IMPAIRMENT OF STRESS HEMOPOIESIS AND MEGAKARYOCYTOPOIESIS IN THE ABSENCE OF THE HOMEODOMAIN TRANSCRIPTION FACTOR NKX2-3

VOJKOVICS DÓRA, DÓRA KOLLÁTH, PÉTER BALOGH

Department of Immunology and Biotechnology,  
Clinical Center, University of Pécs

**Introduction:** Beside its several immunological roles, the spleen functions as an accessory hemopoietic tissue. This activity is restricted to the splenic red pulp, which is under the developmental influence of homeodomain transcription factor *Nkx2-3*. In its absence the splenic vascular pattern of the red pulp and the distribution of various macrophage subsets are severely perturbed. It is not yet known how the absence of *Nkx2-3* affects the inducible splenic hemopoiesis.

The aim of our work was to investigate the role of the transcription factor *Nkx2-3* in the stromal regulation of splenic stress hemopoiesis after inducing acute anemia and forced megakaryocyte differentiation.

**Methods:** Acute anemia was triggered by a series of blood withdrawal in experimental animals. Megakaryocytopoiesis was induced by single TPO-agonist N-plate injection. The erythroid and lymphoid territories in the bone marrow and spleen of wild type BALB/c and *Nkx2-3* deficient mice were compared by using flow cytometry and quantitative morphometric analysis. The erythroid and lymphoid cells of the spleen and bone marrow were labelled with Ter-119 and FITC conjugated anti-CD45 antibodies. The megakaryocytes were labelled using IBL-17 mAb in tissue immunofluorescence. The serum erythropoietin levels were determined by

sandwich-ELISA and the hematocrit level of the animals were measured by a standard procedure.

**Results:** In untreated Nkx2-3 knockout (KO) group the erythroid cell frequency was higher in the bone marrow, but significantly lower in the spleen, compared to the wild type control group. Upon bleeding-induced anemia, the number of erythroid cells increased in the bone marrow and spleen of BALB/c mice. In Nkx2-3 KO mice erythroid expansion was only observed in the bone marrow, while in their spleen the Ter119 positive erythroid compartment further decreased. The serum erythropoietin level increased significantly in both groups and the highest level was measured in the anemic Nkx2-3 knockout group. Similarly, while in wild-type BALB/c mice both the bone marrow and spleen could be induced to increase their megakaryocyte content by N-plate treatment, in Nkx2-3 KO mice the spleen was resistant to N-plate exposure.

**Conclusions:** According to these results, homeodomain transcription factor Nkx2-3 in a tissue-specific manner plays a crucial role in the development of splenic stromal micro-environment necessary for supporting the extramedullary hematopoiesis.

Supported by OTKA grant No. K108429

#### REGENERATIVE MEDICINE: SUCCESSFUL CELL TRANSFER WITHOUT SIGNIFICANT IMMUNE REACTION VIA BIODEGRADABLE POLIMER FOR FURTHER APPLICATION

ZSEDÉNYI ÁDÁM<sup>1</sup>, EDINA GYUKITY-SEBESTYÉN<sup>2</sup>, SÁNDOR KÖRMÖNDI<sup>3</sup>, SZABOLCS BEKE<sup>4</sup>, ISTVÁN NÉMETH<sup>5</sup>, KATALIN NAGY<sup>1</sup>, KRISZTINA BUZÁS<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Univ. of Szeged, Faculty of Dentistry

<sup>2</sup>Hungarian Academy of Sciences, Biological Research Centre

<sup>3</sup>Univ. of Szeged, Faculty of Medicine, Dept. of Traumatology

<sup>4</sup>Istituto Italiano di Tecnologia, Dept. of Nanophysics,

<sup>5</sup>Univ. of Szeged, Dept. of Dermatology and Allergology

**Introduction:** With the extension of human lifespan there is a growing concern for age related illnesses, including the

cartilage and bone related illnesses. Thus, the investigation of biocompatible materials, replacements and implants is an important research area.

A large variety of photocurable and biodegradable materials have already been produced using Poly (propylene fumarate) (PPF). PPF is a versatile candidate for tissue engineering due to its (i) biodegradability, (ii) cytocompatibility, (iii) high Young's modulus and (iv) the unsaturated backbone of the polymer.

For biological applications, the biocompatibility, toxicology and immune reactivity of biomaterials are especially important characteristics. Thus, in our study we tested biocompatibility of our scaffolds with respect to the immune responses they might elicit *in vivo*.

**Materials and methods:** Biocompatibility and toxicity of our biodegradable scaffolds seeded by K7M2 osteosarcoma cells were investigated in an *in vivo* mouse model. After 14 days, the scaffolds and dorsal skin were removed and serum samples were harvested for further analysis. Cytokine and chemokine protein levels in sera were also investigated.

**Results:** We could not observe any sign of inflammation on dorsal skin, neither inflammatory cytokines nor other signs of rejection, based on chemokine and cytokine profiling. Cell transfer into the animals via biopolymers was successful, because anaplastic tumors were seen in histological sections of the group implanted with K7M2 seeded scaffolds. In contrast, there was only a mild fibrotic reaction around the presumable location of the control group. We presume, that the three dimensional (3D) scaffolds were degraded biologically *in vivo* without significant residual pieces.

**Conclusion:** Based on our data and observations in experimental animals, physical and chemical properties of 3D scaffolds are quite suitable for *in vivo* applications, because they did not induce significant immunological reactions and successfully transferred the seeded osteosarcoma cells. We suggest that this method could be useful for the transfer of primary self-cells or tissues and may have promising further applications in tissue and organ engineering.

We could not detect relevant immune reactions or rejection of implanted scaffolds. The 3D biodegradable polymer transferred, however, the seeded cells successfully.

# A glukokortikoid hormon nem genomikus hatásai a T-sejtek jelátvitelére és apoptózisára

PRENEK LILLA, UGOR EMESE, PAPP RAMÓNA, BOLDIZSÁR FERENC, BERKI TÍMEA

Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ, Immunológiai és Biotechnológiai Intézet

A klinikai gyakorlatban a glukokortikoid hormon analógok (GC) autoimmun betegségek, malignus hematológiai kórképek, allergiás folyamatok kezelésében széles körben alkalmazott szerek. Klasszikus, genomikus hatásai mellett, melyek a ligandkötött glukokortikoid-receptor (GR), mint transzkripció faktor által elindított génaktiváció és -gátlás következtében kialakuló folyamatok, az utóbbi évtizedben felismerésre kerültek a gyors GC-hatásokat eredményező ún. nem genomikus jelátviteli útvonalak. Ezek egyrészt direkt membránhatások, másrészt bizonyos sejteken membrán-GR jelenlétével, vagy más receptorok jelátviteli útvonalával történő interakciókkal, ill. a GR mitokondriális transzlokációjával magyarázhatók. Jelen közleményben intézetünkben az elmúlt években a nem genomikus GC jelátviteli folyamatok területén végzett kísérleteink eredményeit foglaljuk össze, különös tekintettel a T-sejt receptor (TcR) és glukokortikoid-receptor (GR) jelátvitel közötti kapcsolatra, illetve a GC-nek a thymocyták apoptózisában betöltött szerepére, a mitokondriális GR transzlokáció jelentőségét kiemelve.

**Kulcsszavak:** glukokortikoid-receptor, glukokortikoid hormon, T lymphocytá, thymus, nem genomikus GC-hatások, mitokondrium, apoptózis

## NON-GENOMIC EFFECTS OF GLUCOCORTICOID HORMONES ON SIGNAL TRANSDUCTION AND APOPTOSIS OF T LYMPHOCYTES

Glucocorticoids (GC) are widely used drugs in the treatment of autoimmune diseases, haematological malignancies and allergic reactions. Besides their classic genomic effects new GC signalling pathways were also observed in the last decade, referred to as non-genomic signalling pathways, which importantly, appear more rapidly than the genomic effects. In our present work we summarise our results in the field of non-genomic GC signalling mechanisms. We discuss the interplay between T cell receptor (TcR) and glucocorticoid receptor (GR) signalling pathways, and the role of GC in the apoptosis of thymocytes, paying special attention to the importance of mitochondrial translocation of the GR.

**Keywords:** glucocorticoid receptor, glucocorticoid hormone, T lymphocyte, thymus, non-genomic mechanism, mitochondria, apoptosis

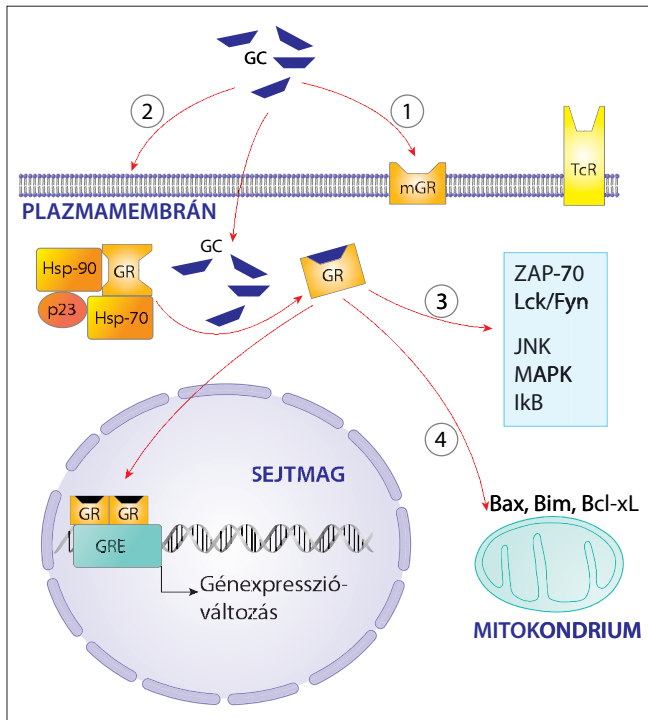
## Bevezetés

A glukokortikoid hormon (GC) hatására elinduló jelátviteli útvonalak legrégebb óta ismert formája a ligandkötött glukokortikoid-receptor (GR) sejtmagba való transzlokációja, ahol a DNS glukokortikoid válaszelemeihez (GRE) kötődve transzkripció faktoroként génexpressziós változásokat eredményez [1, 2]. A GR a szteroidreceptor szupercsalád tagja. Három fő doménja van: (1) a hormonkötő, (2) a DNS-kötő és (3) az N-terminális domén [3]. Nyugalmi állapotban a GR a citoplazmában hőszokkfehérjékhez kötődve található [4]. A ligandkötődést követően a GR felveszi aktív konformációját, és dimerizálódik. Ez a homodimer transzlokálódik a sejtmagba [1], ahol sejtípustól függően 10–100 gén működését sza-

bályozza [5]. Genomikus hatásaiból következik a glukokortikoid-analógok széles körű alkalmazása a mindennapi orvosi gyakorlatban, amely főleg gyulladáscsökkentő és immun-suppresszív folyamatokban nyilvánul meg [6].

A nem genomikus hatások (1. ábra) főleg nagy dózisú GC-kezelés során létrejövő gyors, génexpressziótól független mechanizmusok [7]. Négy ilyen, alternatív GC jelátviteli útvonalat írtak le eddig: (1) membránhoz kapcsolt GR által közvetített útvonal, (2) GC direkt membránra kifejtett hatása, (3) interakció más citoplazmatikus jelátviteli fehérjékkel [8] és (4) a GR mitokondriumba való transzlokációja [9–13].

A membránkötött GR-t többek között humán lymphoid sejtvonalakban figyelték meg [14–16], melynek fokozott expresszióját rheumatoid arthritisben, SLE-ben és spondylitis



1. ábra

A glukokortikoid hormon (GC) lehetséges hatásmechanizmusai T-lymphocytákon [7]. A lipofil GC bejut a citoplazmába, és kapcsolódik a glukokortikoid-receptorhoz (GR), amely konformációváltozást követően leválik a citoplazmatikus Hsp komplexről, dimerizálódik, és bevándorol a sejtmagba, ahol az ún. genomikus hatásmechanizmus révén génexpresszió-változásokat okoz. Nagy dózisú GC-kezelés hatására létrejövő gyors, nem genomikus hatások: a membránhoz kapcsolt GR (mGR) által közvetített útvonal (1), a GC direkt membránstabilizáló hatása (2), a GR kapcsolódása más citoplazmatikus jelátviteli fehérjékkel (3) és a GR mitokondriumba való transzlokációja, amely az intrinsek apoptotikus útvonal aktivációját váltja ki (4)

ankylopoeticában is megtalálták, ami felveti szerepét a betegségek kialakulásában [17–19]. Másrészt, a GC direkt (nem receptorfüggő) membránhatását mutatja, hogy nagy dózisú GC-kezelést követően emlős tumorsejtekben megváltozik a membránlipid-mobilitás [20].

A harmadik nem genomikus hatás a ligandkötött GR-nek más jelátviteli molekulákkal való kapcsolódása, melyet például a GR és T-sejt receptor (TcR) jelátviteli fehérjéi között figyeltek meg [21]. Az eddigi kutatási eredmények szerint a ligandkötött GR asszociálódik az Lck-, Fyn-molekulákkal a TcR-aktivációt követően, és gátolja a TcR-aktiváció által indukált Lck/Fyn foszforilációt [22, 23].

Végül, Sionov és munkatársai *in vitro* tenyésztett folytonos sejtvonalakon és thymocytákban írták le a GC-GR komplex mitokondriumba való transzlokációját, ami összefüggésbe hozható az adott sejttípus GC-indukált apoptózis készségével [9–13].

## A GC-k nem genomikus hatásainak támadáspontjai

### A T-lymphocytá-aktiváció gátlása

A GC-k T-sejt jelátvitelre gyakorolt hatását humán T-sejt-leukémia sejtvonalon (Jurkat) vizsgáltuk 2-5 perces, nagy dózisú dexamethason- (DX-) kezelést követően. Megfigyeltük, hogy a GC-kezelés önmagában is, a TcR jelátviteli út egyik kulcsmolekuláján, a ZAP-70-en tirozinfoszforilációt okoz (1. táblázat) [24]. Ez a változás a GR-antagonista RU486-tal gátolható volt [24]. Ezt követően megvizsgáltuk a kapcsolatot a ZAP-70, GR és Hsp-90 között DX-kezelt Jurkat-sejtek citoplazmájában. A nagy dózisú DX-kezelés hatására a GR koprecipitálódott, ill. kolokalizálódott a ZAP-70-molekulával [25], mely magyarázhatja a korábban tapasztalt gyors GC-indukált ZAP-70-foszforilációt (1. táblázat). Ugyanakkor a ZAP-70 Hsp-90-nel való kapcsolódása is megfigyelhető volt, függetlenül a GR-agonista jelenlététől, de a kapcsolódást meg lehetett gátolni Hsp-antagonista geldanamycinnel (GA) (1. táblázat) [25]. Eredményeinkkel az elsők között világítottunk rá a DX-nek a ZAP-70-molekulára kifejtett direkt hatására az aktivált GR-en keresztül [25]. A GC-indukált ZAP-70 tirozinfoszforiláció alapján feltételezhető, hogy a GC-k ezen a ponton lehetséges gátlói a T-sejt-funkcióknak. A ZAP-70-nek négy aktiváló (Y315, Y319, Y474, Y493) és négy gátló (Y292, 492, 597, 598) foszforilációs helyét írták le korábban [26]. Intézetünkben ZAP-70 pontmutáns Jurkat-sejtvonalakkal végzett kísérleteink során azt találtuk, hogy rövid idejű DX-kezelés hatására csökkent a ZAP-70 foszforilációja az F315- és F492-ZAP-70-molekulát expresszáló sejtekben [27]. Ezt követően ugyanezen mutáns ZAP-70-molekulák szubsztrátjait vizsgáltuk, és megfigyeltük, hogy DX hatására a mutáns sejtekben nem foszforilálódott az SLP-76 és a Cbl, de egyik mutáció

1. táblázat. Rövid idejű, nagy dózisú glukokortikoid hormon hatására létrejövő változások a T-sejt jelátviteli útvonal fehérjeiben ([23] és [26] alapján)

Célmolekula:	GC hatás
ZAP-70	Y-foszforiláció ↑, GR- és Hsp-90-asszociáció
LAT	Y-foszforiláció ↑
Cbl	Y-foszforiláció ↑*
SLP-76	Y-foszforiláció ↑*
	<b>TcR-aktiváció + GC hatás</b>
LAT	Y-foszforiláció ↑
Cbl	Y-foszforiláció –
SLP-76	Y-foszforiláció ↑
Ca <sup>2+</sup> -jel	↓

\* ZAP-70 Y315- és Y492-függő változás

sem befolyásolta a LAT foszforilációját (1. táblázat) [27]. Ez arra enged következtetni, hogy a ZAP-70-kinázon keresztül végbemenő nem genomiális GC-hatást inkább az SLP-76 és a Cbl közvetíti, és nem a LAT (1. táblázat) [26]. Megvizsgáltuk azt is, hogyan befolyásolja a DX a T-sejt-aktivációt, és fejt ki immunosuppresszív hatását. A LAT és SLP-76 megnövekedett, míg a Cbl csökkent foszforilációját sikerült detektálnunk, továbbá a DX csökkentette az anti-CD3 által indukált  $Ca^{2+}$ -jelet is (1. táblázat) [27]. Ez az eredmény korrelál azzal a korábbi megfigyelésünkkel, mely szerint a Jurkat-sejtekben a  $Ca^{2+}$ -jelet az SLP-76 szabályozza [28].

## Kettős pozitív thymocyták GC-indukált mitokondriális apoptózis útvonala

A GC-k nemcsak az érett, de a differenciálódó, éretlen T-sejtekre is hatnak. Régóta ismert, hogy a thymus elsorvad magas GC hormon szintek esetén, míg ezen hormonok hiánya a thymus megnagyobbodását okozza [29]. Intézetünkben végzett korábbi vizsgálatok szerint a kettős pozitív (DP) thymocyták a legérzékenyebbek a GC-indukált apoptózisra [30-32], ugyanakkor ezekben a sejtekben a legalacsonyabb a GR-expresszió mind fehérje, mind RNS szinten [30-33]. Ez a látszólagos ellentmondás felvetette a glukokortikoidoknak a thymocyták differenciálódásában betöltött, nem hagyományos jelátviteli útvonalon keresztül megvalósuló szerepét. Ezt a feltevést erősítette, hogy *in vivo* sem a DP sejt depletáló hatását, sem pedig a nagy dózisu szteroid korai proapoptotikus hatást nem tudtuk gátolni GC-antagonista RU486-tal [31, 33]. Az RU486 hatása ugyanis abban nyilvánul meg, hogy megakadályozza a GR ligandkötődést követő transzlokációját a sejtmagba [34]. Ezek alapján a GC-k proapoptotikus hatása a DP sejtekben függetlennek tűnik az aktivált GR nukleuszba való transzlokációjától, amely felveti a lehetőségét a nem genomikus jelátviteli folyamatoknak ezekben a sejtekben.

Ebből kiindulva sikerült igazolnunk, hogy a DP thymocy-

tákban rövid idejű GC-kezelést követően a GR inkább a mitokondriumba vándorol, mint a sejtmagba [13]. A mitokondriális transzlokáció ezen sejtekben arányban volt a sejtek GC által indukált apoptózis érzékenységgel [13]. A pontos folyamat, amely révén a transzlokálódott, aktivált GR apoptotikus kaszkádot indít el, még nem teljesen ismert. Ezért vizsgáltuk a GC-k hatását egér thymocytá apoptózis útvonalainak aktiválódására és a GR Bcl-2 fehérjecsald tagjaival való interakcióját (2. táblázat; eddig nem publikált eredmény). Azt találtuk, hogy rövid idejű DX-kezelés hatására a thymocytákban aktiválódott az intrinszik apoptotikus útvonal, amit a citokróm C, az aktivált kaspáz-3, -9 koncentrációjának emelkedése jelzett (2. táblázat). Megfigyeltük továbbá, hogy a GR asszociálódott a Bim- és a Bcl-xL-fehérjékkel, valamint ezen fehérjék mennyisége megnövekedett a mitokondriumban a DX-kezelést követően. A GR Bax-fehérjével nem kapcsolódott, azonban ez a fehérje is felhalmozódott a mitokondriumban DX hatására (2. táblázat). Így valószínűleg az aktivált GR a Bcl-2-fehérjékkel való asszociációja révén befolyásolhatja a thymocyták apoptózisát oly módon, hogy úgy változtatja meg ezen fehérjék között az egyensúlyt, hogy az proapoptotikus irányába tolódjon el.

## Megbeszélés

A nem genomiális GC jelátviteli útvonalak felismerése új, érdekes és izgalmas irányt nyitott a kutatásban. A lymphoid sejtek nagy dózisu GC hormon kezelésre adott gyors válaszreakciói nem magyarázhatók a viszonylag lassan bekövetkező géntranszkripció mechanizmusokkal. A T-lymphocytá-aktiváció gátlása a TcR jelátviteli útvonal fehérjéivel való közvetlen GR asszociáció útján, míg a DP thymocyták GC-indukált gyors apoptózisa a GR mitokondriális pro- és antiapoptotikus fehérjékkel való kapcsolódással, azok egyensúlyának módosítása révén zajlik. A thymusban található sejtek közel 80%-a DP thymocytá, melyek lokális GC-termelő sejtek környe-

2. táblázat. Rövid idejű glukokortikoid-kezelés hatására bekövetkező thymocytá apoptózis útvonal fehérjéinek aktivációja és lokalizációjának változása

Célmolekula	Citoplazma	Mitokondrium	GR-rel való asszociáció
Citokróm C	↑	nincs adat	nincs adat
aktivált kaspáz-3	↑	nincs adat	nincs adat
aktivált kaspáz-8	↑	nincs adat	nincs adat
aktivált kaspáz-9	↑	nincs adat	nincs adat
aktivált kaspáz-12	nem változott	nincs adat	nincs adat
Bak	nincs adat	nincs adat	+
Bax	↓	↑	-
Bim	↓	↑	+
Bcl-xL	↓	↑	+



zetében differenciálódnak. Feltételezhető, hogy ez az oka, hogy a többi thymocytá sejtcsoporthoz képest bennük a legalacsonyabb a GR-expresszió, mégis ebben a differenciálódási stádiumban érzékenyebbek a GC-indukált apoptózisra [31]. Ezt erősíti azon megfigyelésünk is, hogy ebben a sejtcsoportban magas a Dig2 (DX-indukált gén) és alacsony a Bcl-2 expressziója [33], valamint *in vivo* alkalmazott szintetikus GC hatására is a DP sejtek számának jelentős csökkenését és a mitokondriális membránpotenciál redukálódását figyeltük meg, a Bcl-2-expresszió párhuzamos mérséklődésével [32]. Irodalmi adatokkal összhangban, a GC-k fokozni tudták a thymocyták pozitív szelekcióját, amikor egyidejűleg TcR-aktiváció is történt [31, 35], amit a CD69-expresszió megnövekedése jelez a DP és CD4<sup>+</sup> egyszeresen pozitív sejteken (SP), amit nagyobb mértékű érett CD4<sup>+</sup> sejt kibocsátás kísért [31, 35].

Az ezen a területen végzett vizsgálatok eredményei tovább bővítik ismereteinket a GC-k hatásairól, hozzájárulnak új terápiás lehetőségek kifejlesztéséhez.

**Támogatások:** OTKA K101493, K105962

## IRODALOM

- [1] Drouin J, Sun YL, Tremblay S, et al: Homodimer formation is rate-limiting for high affinity DNA binding by glucocorticoid receptor. *Mol Endocrinol* 1992; 6: 1299-1309.
- [2] Berg JM: DNA binding specificity of steroid receptors. *Cell* 1989; 57: 1065-1068.
- [3] Evans RM: The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 1988; 240: 889-895.
- [4] Smith DF, Toft DO: Steroid receptors and their associated proteins. *Mol Endocrinol* 1993; 7: 4-11.
- [5] Hayashi R, Wada H, Ito K, Adcock IM: Effects of glucocorticoids on gene transcription. *European Journal of Pharmacology* 2004; 500: 51-62.
- [6] Buttgereit F, Burmester GR, Lipworth BJ: Optimised glucocorticoid therapy: The sharpening of an old spear. *Lancet* 2005; 365: 801-803.
- [7] Boldizsar F, Talaber G, Szabo M, et al.: Emerging pathways of non-genomic glucocorticoid (gc) signalling in t cells. *Immunobiology* 2010; 215: 521-526.
- [8] Buttgereit F, Scheffold A: Rapid glucocorticoid effects on immune cells. *Steroids* 2002; 67: 529-534.
- [9] Sionov RV, Cohen O, Kfir S, et al.: Role of mitochondrial glucocorticoid receptor in glucocorticoid-induced apoptosis. *J Exp Med* 2006; 203: 189-201.
- [10] Sionov RV, Kfir S, Zafir E, et al.: Glucocorticoid-induced apoptosis revisited: A novel role for glucocorticoid receptor translocation to the mitochondria. *Cell Cycle* 2006; 5: 1017-1026.
- [11] Du J, Wang Y, Hunter R, et al.: Dynamic regulation of mitochondrial function by glucocorticoids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 3543-3548.
- [12] Psarra AM, Solakidi S, Trougakos IP, et al.: Glucocorticoid receptor isoforms in human hepatocarcinoma hepg2 and saos-2 osteosarcoma cells: Presence of glucocorticoid receptor alpha in mitochondria and of glucocorticoid receptor beta in nucleoli. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37: 2544-2558.
- [13] Talaber G, Boldizsar F, Bartis D, et al.: Mitochondrial translocation of the glucocorticoid receptor in double-positive thymocytes correlates with their sensitivity to glucocorticoid-induced apoptosis. *Int Immunol* 2009; 21: 1269-1276.
- [14] Gametchu B: Glucocorticoid receptor-like antigen in lymphoma cell membranes: Correlation to cell lysis. *Science* 1987; 236: 456-461.
- [15] Gametchu B, Chen F, Sackey F, et al.: Plasma membrane-resident glucocorticoid receptors in rodent lymphoma and human leukemia models. *Steroids* 1999; 64: 107-119.
- [16] Evans SJ, Murray TF, Moore FL: Partial purification and biochemical characterization of a membrane glucocorticoid receptor from an amphibian brain. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2000; 72: 209-221.
- [17] Bartholome B, Spies CM, Gaber T, et al.: Membrane glucocorticoid receptors (mgcr) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after *in vitro* stimulation and in patients with rheumatoid arthritis. *FASEB Journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2004; 18: 70-80.
- [18] Spies CM, Schaumann DH, Berki T, et al.: Membrane glucocorticoid receptors are down regulated by glucocorticoids in patients with systemic lupus erythematosus and use a caveolin-1-independent expression pathway. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2006; 65: 1139-1146.
- [19] Tryc AB, Spies CM, Schneider U, et al.: Membrane glucocorticoid receptor expression on peripheral blood mononuclear cells in patients with ankylosing spondylitis. *The Journal of Rheumatology* 2006; 33: 2249-2253.
- [20] Van Bommel T, Marsen T, Bojar H: Effects of high-dose medroxyprogesterone acetate and various other steroid hormones on plasma membrane lipid mobility in cam-1 mammary cancer cells. *Anticancer Res* 1987; 7: 1217-1223.
- [21] Lowenberg M, Verhaar AP, van den Brink GR, Hommes DW: Glucocorticoid signaling: A nongenomic mechanism for t-cell immunosuppression. *Trends in Molecular Medicine* 2007; 13: 158-163.
- [22] Lowenberg M, Tuynman J, Bilderbeek J, et al.: Rapid immunosuppressive effects of glucocorticoids mediated through lck and fyn. *Blood* 2005; 106: 1703-1710.
- [23] Lowenberg M, Verhaar AP, Bilderbeek J, et al.: Glucocorticoids cause rapid dissociation of a t-cell-receptor-associated protein complex containing lck and fyn. *EMBO Rep* 2006; 7: 1023-1029.
- [24] Bartis D, Boldizsar F, Szabo M, et al.: Dexamethasone induces rapid tyrosine-phosphorylation of zap-70 in jurkat cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2006; 98: 147-154.
- [25] Bartis D, Boldizsar F, Kvell K, et al.: Intermolecular relations between the glucocorticoid receptor, zap-70 kinase, and hsp-90. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 354: 253-258.
- [26] Au-Yeung BB, Deindl S, Hsu LY, Palacios EH, Levin SE, Kuriyan J, Weiss A: The structure, regulation, and function of zap-70. *Immunol Rev*, 2009 vol. 228, no. 1, pp. 41-57.
- [27] Boldizsar F, Szabo M, Kvell K, et al.: Zap-70 tyrosines 315 and 492 transmit non-genomic glucocorticoid (gc) effects in t cells. *Molecular Immunology* 2013; 53: 111-117.
- [28] Szabo M, Czompoly T, Kvell K, et al.: Fine-tuning of proximal tcr signaling by zap-70 tyrosine residues in jurkat cells. *Int Immunol* 2012; 24: 79-87.
- [29] Selye H: Thymus and adrenals in the response of the organism to injuries and intoxications. *Br J Exp Pathol* 1936; 17: 234-248.
- [30] Wiegers GJ, Knoflach M, Bock G, et al.: Cd4(+)/cd8(+)/tcr(low)

thymocytes express low levels of glucocorticoid receptors while being sensitive to glucocorticoid-induced apoptosis. *European Journal of Immunology* 2001; 31: 2293-2301.

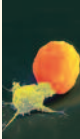
- [31] Berki T, Palinkas L, Boldizsar F, Nemeth P: Glucocorticoid (gc) sensitivity and gc receptor expression differ in thymocyte subpopulations. *Int Immunol* 2002; 14: 463-469.
- [32] Palinkas L, Talaber G, Boldizsar F, et al.: Developmental shift in tcr-mediated rescue of thymocytes from glucocorticoid-induced apoptosis. *Immunobiology*, 2008; 213: 39-50.
- [33] Boldizsar F, Palinkas L, Czompoly T, et al.: Low glucocorticoid receptor (gr), high dig2 and low bcl-2 expression in double positive thymocytes of balb/c mice indicates their endogenous glucocorticoid hormone exposure. *Immunobiology* 2006; 211: 785-796.

- [34] Distelhorst CW, Howard KJ: Evidence from pulse-chase labeling studies that the antiglucocorticoid hormone ru486 stabilizes the nonactivated form of the glucocorticoid receptor in mouse lymphoma cells. *Journal of Steroid Biochemistry* 1990; 36: 25-31.

- [35] Boldizsar F, Palinkas L, Bartis D, et al.: Antigen and glucocorticoid hormone (gc) induce positive selection of dp thymocytes in a tcr transgenic mouse model. *Immunology Letters* 2003; 90: 97-102.

(Dr. Berki Tímea, PTE, KK, Immunológiai és Biotechnológiai Intézet, 7624 Pécs, Szigeti út 12. Tel: 72-536-291, fax:72-536-289, e-mail: berki.timea@pte.hu)





# Öröklött kötőszöveti betegségek I.

## A Marfan-szindróma patomechanizmusa és klinikai jellemzői

BRÚGÓS BOGLÁRKA, SEBESTYÉN LILLA, PFLIEGLER GYÖRGY

Debreceni Egyetem Klinikai Központ, Belgyógyászati Intézet, Ritka Betegségek Tanszék

Az öröklött kötőszöveti betegségek heterogén betegségecsoportot alkotnak, amelyek hátterében az extracelluláris mátrixot alkotó proteinek kódoló gének mutációja áll. Legismertebb képviselője a Marfan-szindróma, amelynek oka a fibrillin-1 gén mutációja. A betegség több szervet érint, elsősorban a szemet (ectopia lentis), a vázrendszert (arachnodactylia, scoliosis, pectus excavatum), a kardiovaszkuláris rendszert (mitralis billentyű prolapsus, aortaaneurysma, -dissectio), ritkábban a bőrt, légzőrendszert, kemény agyhártyát (duralis ectasia). A betegségben szenvedők élettartamát döntően a kardiovaszkuláris érintettség, elsősorban az aortaaneurysma mértéke, a dissectio veszélye határozza meg. A korai diagnózis szerepe nélkülözhetetlen, a betegek életen át tartó ellenőrzése, követése szükséges, indokolt esetben preventív műtéti beavatkozások elvégzése indokolt, ha az aortaaneurysma rupturájának veszélye jelentős.

**Kulcsszavak:** Marfan-szindróma, fibrillin-1, aortaaneurysma, ectopia lentis

### HERITABLE DISORDERS OF CONNECTIVE TISSUE I. PATHOGENESIS AND CLINICAL FEATURES OF MARFAN'S SYNDROME

Marfan's syndrome is a systemic disorder of connective tissue caused by mutations in the extracellular matrix protein fibrillin-1. Manifestations of Marfan syndrome include dislocation of ocular lens, skeletal symptoms as arachnodactylia, long-bone overgrowth, scoliosis, pectus excavatum, cardiovascular manifestations as proximal aortic aneurysm, aortic dissection, mitral valve prolapse, other symptoms include involvement of the skin, respiratory system, lumbosacral dural ectasia. Life expectancy of patients is based on cardiovascular manifestations, especially the severity of aortic aneurysm. Early diagnosis is important to prevent life-threatening complications, regular cardiovascular, skeletal, ocular check-up is recommended, and prophylactic aortic root replacement is needed when dilated aortic root has a tendency to rupture.

**Keywords:** Marfan's syndrome, fibrillin-1, aortic aneurysm, ectopia lentis

## Bevezetés

Az öröklött kötőszöveti betegségek heterogén betegségecsoportot alkotnak; hátterükben az extracelluláris mátrixot alkotó proteinek kódoló gének mutációja áll. A leggyakoribb érintett kötőszöveti fehérje a kollagén, fibrillin és a fibronectin, illetve a szintézisükhöz szükséges enzimek [1], továbbá az extracelluláris mátrix (ECM) egyéb nem strukturális fehérjéi. Az ECM legjelentősebb komponense a kollagén, illetve az elasztin, részben az ECM, részben az erek falának és az inaknak legfontosabb alkotórésze [2]. A fibronectin jelentős szerepe, hogy összekötést létesít a sejtfelszíni receptorok, pl. integrinek, egyéb sejtfelszíni molekulák és a kollagén, a proteoglikánok között [2]. A lamininmolekulák az ECM strukturális alkotói, emellett jelentős egyéb funkciói is vannak, mint az adhézió, differenciáció, migráció, apoptózissal szembeni védelem [2]. A fibrillin domináns alkotórésze a

mikrofibrillumoknak, az elasztikus és nem elasztikus extracelluláris mátrix integritásáért felelős, továbbá fontos szerepet tölt be az elasztin elasztikus rostokká való szerveződésében.

Az ECM felépítése és funkciója sokkal szélesebb körű, mint korábban gondoltuk. Komplex hálózatnak tekinthető, részben támasza, váza a szöveteknek, de ezen túlmenően fontos raktára a sejtproliferációban, -differenciációban, -migrációban szerepet játszó citokineknek és növekedési faktoroknak [1].

A fibrillinmolekula glikoprotein, amelynek 3 típusa ismert (fibrillin-1, -2, -3). A fibrillin a mikrofibrillumok felépítésében vesz részt, a tropoelasztin vázát képezi, továbbá keresztkötéseket hoz létre az elasztikus rostok között [3]. A fibrillin különböző molekulákkal lép kapcsolatba: fibronectin, fibulin, úgynevezett latent TGF- $\beta$ -kötő fehérje (latent transforming growth factor  $\beta$ -binding protein, LTBP), a csont morfogene-

tikai protein (BMP) propeptid, szindekánok és integrinek. Az ECM metabolizmusában a TGF- $\beta$ -nak és a BMP-nek van fontos szerepe.

A fibrillin-1-molekulát kódoló gén (FBN1) mutációja a Marfan-szindróma kialakulásához vezet. Cikkünk célja, hogy összefoglaljuk ennek a ritka, veleszületett kötőszöveti betegségnek a patomechanizmusáról, tüneteiről és az aktuális kezeléséről rendelkezésre álló ismereteket.

## Epidemiológia

A Marfan-szindróma autoszomális domináns módon öröklődő veleszületett ritka kötőszöveti betegség, amelynek incidenciája 1-3/10 000-20 000 [4, 5], prevalenciája 1:3000-1:5000 [6]. Földrajzi, etnikai és nemi különbség nem ismert a betegség előfordulásában. Magyarországon 2000-3000 egyén érintett, illetve az országos regiszter 250 Marfan-szindrómás beteg adatait tartalmazza [7]. A betegséget Antoine-Bernard Marfan, francia gyermekgyógyász írta le egy 5,5 éves leánygyermek esete kapcsán [8]. A családi halmozódás gyakori, az érintett betegek 49%-ának esetében a családban korábban is előfordult a betegség [9]. A betegek 25-30%-ában viszont nem jellemző a családi halmozódás [4], a súlyosabb esetek hátterében új génmutáció valószínűsíthető, míg a családban halmozódó esetek körlefofolyása és a szövőd-mények száma kevesebb.

## Patomechanizmus

A klasszikus Marfan-szindróma oka a fibrillin-1 (FBN1) nevű 350 kDa-os glikoproteint kódoló gén mutációja, amely fontos komponense az elasztikus mikrofibrillumoknak. Az ECM-be 375 kDa-os formában szekretálódik. A fibrillin-1 az ECM-ben mikrofibrillumokká polimerizálódik, stabilizálja az LTBP-eket, amelyek szerepe, hogy inaktív formában tartják a TGF- $\beta$ -t (transforming growth factor- $\beta$ ) [10]. A TGF $\beta$  dimer formában választódik ki, és az ún. latency-associated fehérjéhez (LAP) kötődve létrehozza az ún. small latent komplexet (SLC) (a „latent” kifejezés arra utal, hogy a molekula inaktív formában tartja a TGF $\beta$ -t) [11]. A szekretált SLC az LTBP-hez kötődve létrehozza az ún. large latent komplexet (LLC) [12].

A TGF $\beta$  aktiválásához számos komplex regulatórikus mechanizmus aktiválódása szükséges. Marfan-szindrómában a fibrillin-1 mutációja ahhoz vezet, hogy az LLC nem tud kötődni a mikrofibrillumokhoz, az inaktív, „latent” forma nem generálódik, tehát a TGF $\beta$ -koncentráció magas lesz, fokozottabb mértékben kötődik receptorához, fokozott intracelluláris foszforilációhoz vezet.

A TGF $\beta$ -kötő receptor 2 (TGFBR2) gén mutációja szintén a jelátviteli utak zavarához, Marfan-szerű szindróma (Marfan-szindróma II. típus) kialakulásához vezet, hasonló klinikai

tünetekkel jár. A többi receptor mutációja is ismert (TGFBR1, -3) [13].

Egyértelműen igazolt, hogy a Marfan-szindróma kialakulása összefügg az emelkedett TGF $\beta$ -koncentrációval, de számos egyéb tényező is hozzájárul a szindróma fenotípusának kialakulásához. TGF- $\beta$ -aktivációhoz vezethetnek a pH megváltozása, az oxigén szabad gyökök, az integrinek, a proteázok. Az integrinektől függetlenül a mátrix metalloproteázok (MMP) is aktiválják a TGF- $\beta$ -t, amelyek a proteolízis révén fontos szerepet játszanak az extracelluláris mátrix remodelingjében [12]. Szintén TGF- $\beta$ -aktivátor az MMP-2- és az MMP-9-koncentráció emelkedése, azáltal, hogy az inaktív TGF- $\beta$  komplexet hasítják.

A közelmúltban tanulmányozták a fibrillin-1 gén és egy új molekulacsald kapcsolatot. Az ADAMTS- (a disintegrin and metalloproteinase thrombospondin motifs) 10 gén és a fibrillin-1 gén mutációja egyaránt oka a Weill-Marchesani-szindrómának, amelynek tünetei részben hasonlóak a Marfan-szindrómához (pl. a lencseectopia), ugyanakkor egyéb tünetei elterjedtesek a Marfan-szindróma tüneteivel (pl. brachydactylia, alacsony növés, merev ízületek). Kimutatták, hogy az ADAMTS4 mutációja is ectopia lentis okoz [12, 14]. Az ADAMTS-10 (a disintegrin) nagy affinitással kötődik a fibrillin-1-hez, és nélkülözhetetlen a mikrofibrillumok biogeneziséhez [12]. Az ADAMTSL6 $\beta$  elengedhetetlen a kötőszövet felépítéséhez és regenerációjához, egy Marfan-szindrómás egérmodellben igazolták, hogy ADAMTSL6 $\beta$  adása csökkenti a TGF- $\beta$ -koncentrációt a periodontalis kötőszövetben [15], így ezek a megfigyelések jövőbeli terápiás célpontok alapjait képezhetik.

## Klinikai manifesztáció

A kórkép legjellemzőbb tünetei az aránytalanul hosszú végtagok, az aorta fejlődési rendellenességei és a szemlencseectopia. 1955-ben Victor McKusick alkotta meg a kötőszöveti betegségek első klasszifikációját [16], majd Berlinben 1986-ban alkották meg a Berlin nozológiát a Marfan-szindróma diagnosztikához [17]. Később, amikor felfedezték a szindrómát okozó génhibát, a fibrillin-1 gén mutációját, akkor világossá vált, hogy a Berlin nozológia használatával túlbecsülhetjük a valós esetek számát a génmutációt nem hordozók számításba vételével. Ezt követően alkották meg a Ghent nozológiát 1996-ban [18], amely szigorúbb szabályrendszer, és segítségével az igazi Marfan-szindrómás esetek elkülöníthetőek a Marfan-szerű állapotoktól (pl. MASS fenotípus: myopia, mitralis prolapsus, borderline, illetve nem progresszív aorta-aneurysma, striák, skeletalis eltérések MVPS: mitralis prolapsus szindróma).

A Ghent nozológia major és minor kritériumokat különít el (1. táblázat) [5]. Az új klasszifikáció lehetővé tette a pontos diagnózis felállítását, a valós Marfan-szindrómás, magas kar-



1. táblázat. Ghent nozológia [19]

Major kritériumok		Minor kritériumok
Mozgásszervi	Legalább 4 jellemző: Pectus carinatum Műtétet igénylő pectus excavatum ULSR <0,86 vagy karfeszítávolság : magasság >1,05 Csukló- és hüvelykujj-jelek Scoliosis >20° vagy spondylolisthesis Csökkent könyökextenzió (<170°) Pes planus Protrusio acetabulae	2 major kritérium vagy 1 major kritérium és 2 a következőkből: Pectus excavatum Ízületi hipermobilitás Gótikus szájpad fogtorlódással Jellegzetes arc [dolicocephalia (hosszúkás koponya), malarhypoplasia, enophthalmus, retrognathia]
Szemészeti	Ectopia lentis	Lapos cornea A szemgolyó megnyúlt axiális tengelye (myopia) Hypoplasiás iris vagy ciliaris izomzat (csökkent míosis) Mitralis billentyű prolapsus Arteria pulmonalis aneurysma, 40 éves kor alatt Meszes mitralis annulus, 40 éves kor alatt Az aorta egyéb lokalizációjú aneurysmája vagy dissectiója
Kardiovaszkuláris	Aortaaneurysma A leszálló aorta dissectiója	Spontán pneumothorax Apicalis bullák Striae atrophicans (elhízás, terhesség nélkül) Hegsérvek
Pulmonalis	Nincs	Nincs
Bőr	Nincs	Nincs
Dura	Lumbosacralis duraectasia	Nincs
Genetikai eltérések	A családban egyik szülő, gyermek, vagy rokon teljesíti a fenti kritériumokat Fibrillin-1-mutáció A fibrillin-1 gén melletti haplotípus mutációja	Nincs

ULSR: felső testfél : alsó testfél arány (upper : lower segment ratio)

diovaszkuláris rizikóval rendelkező betegek elkülönítését a Marfan-szerű állapotoktól. 2010-ben Loeys és mtsai javaslatot tettek egy módosított Ghent nozológiára [19], mivel az eredeti klasszifikációt sok kritika érte, főként azért, mert a nem teljesen kifejlődő tünetek miatt gyermekkorban sokszor nehéz felismerni a betegséget. Azok a betegek, akiknél egyértelműen igazolható az ectopia lentis és az aortaaneurysma, de nincsenek minor skeletalis tünetek, nem felelnek meg a diagnózis kritériumainak, pedig követésük indokolt lenne. Az új klasszifikáció szerint hangsúlyosabb a két legfontosabb tünet szerepe. Tehát ha a betegnek igazolt ectopia lentise és aortafalgyengesége/aortaaneurysmája van, a Marfan-szindróma diagnózisa felállítható, a többi szisztémás tünet (skeletalis, tüdő-, bőrérzékenység) használata akkor indokolt, ha a két kardinális tünet egyike hiányzik (2. és 3. táblázat) [19]. A fenti klinikai tüneteken túl az új klasszifikáció hangsúlyozza a genetikai tesztek elvégzésének fontosságát, elsősorban az FBN1 gén mutációinak, esetleg a TGFB1 és -2 mutáció kimutatását.

## Mozgásszervi tünetek

A leggyakoribb és legszembetűnőbb eltérés Marfan-szindrómában a hosszú csöves csontok fokozott növekedése következtében létrejövő aránytalanul hosszú végtagok jelenléte. A bordák túlnövekedése miatt mellkasdeformitások jönnek létre, mint pectus carinatum (tyúkmell) és excavatum (tölcsérmellkas) (1. ábra). Szintén jellegzetes tünet az aránytalanság az alsó és felső testfél között, amely ahhoz vezet, hogy a karok fesztávolsága a magasság 1,05-szorososa. Az arachnodactylia (pókujúság), a láb- és kézközépcsontok, valamint az ujjpercek (metatarsusok, metacarpusok és a phalanxok) meghosszabbodása feltűnő tünet. A laza ízületek, az arachnodactylia vezet a jellegzetes csuklótünethez (Walker–Murdoch-jel [5]): ha a beteg a kisujjával és hüvelykujjával fogja át a csuklóját, a két ujj fedi egymást, továbbá ha a beteg a hüvelykujját a tenyéren keresztül behajlítja, az ujj a tenyér külső szélén túlért (Steinberg- vagy hüvelykujjtünet) [5]. A súlyos scoliosis (>20°) kritériumtünet. Pes planus, a könyökízület csökkent extenziója gyakori elté-

## 2. táblázat. Módosított Ghent kritériumok [19]

**Pozitív családi anamnézis hiányában**(1) Ao ( $Z \geq 2$ ) és EL = MFS\* (Marfan-szindróma)(2) Ao ( $Z \geq 2$ ) és FBN1 mutáció = MFS(3) Ao ( $Z \geq 2$ ) és Sziszt ( $\geq 7$  pont) = MFS\*

(4) EL és FBN1 ismert Ao = MFS

EL sziszt tünetekkel vagy nélkül ÉS FBN1 mutáció nem ismert Ao-dissectióval vagy

FBN1 mutáció nélkül = ELS (ectopia lentis szindróma)

Ao ( $Z \leq 2$ ) ÉS Sziszt ( $>5$  tünet legalább egy skeletalis) EL nélkül = MASSMPVS ÉS Ao ( $Z < 2$ ) ÉS Sziszt ( $< 5$ ) EL nélkül = MPS

\* Kivétel: SGS, LDS vagy EDS (ld. 4. táblázat) nem teljesül, TGFBR1/2, kollagén mutáció nem mutatható ki

**Pozitív családi anamnézis esetén**

(5) EL ÉS MFS a családban = MFS

(6) Sziszt ( $>7$  pont) ÉS MFS a családban = MFS\*(7) Ao ( $Z \geq 2$  20 év felett,  $\geq 3$  20 év alatt) + poz. családi anamnézis = MFSAo: az aorta átmérőjének eltérése a Valsalva-sinus szintjében (Z-score) vagy az aorta dissectiója; EL: ectopia lentis; ELS: ectopia lentis szindróma; FBN1: fibrillin-1 gén mutáció; MASS: myopia, mitralis billentyű prolapsus, kiskökű aortagyök-dilatáció (Z-score  $> 2$ ), striák, skeletalis eltérések; MFS: Marfan-szindróma; MPVS: mitralis billentyű prolapsus

## 3. táblázat. Szisztémás tünetek [19]

Csukló- és hüvelykujj-jel: 3 pont (csukló- vagy hüvelykujj-jel: 1 pont)

Pectus carinatum deformitás: 2 pont (pectus excavatum vagy mellkasdeformitás/-aszimmetria)

Lábfejdeformitás: 2 pont (pes planus: 1 pont)

Pneumothorax: 2 pont

Duraectasia: 2 pont

Protrusio acetabuli: 2 pont

Csökkent ULSR ÉS kar/magasság ÉS nincs súlyos scoliosis: 1 pont

Scoliosis vagy thoracolumbalis kyphosis: 1 pont

Csökkent könyökextenzió: 1 pont

Arckarakter-eltérések (3/5): 1 pont (dolichocephalia, enophthalmus, palpebralis fissurák, malarhypoplasia, retrognathia)

Bőrstriák: 1 pont

Myopia  $> 3$  dioptria: 1 pont

Mitralis billentyű prolapsus: 1 pont

Maximum pontok: 20;  $> 7$  pont jelez szisztémás érintettséget

ULSR (upper segment/lower segment ratio)

**1. ábra**

Mellkasdeformitás és arachnodactylyia Marfan-szindrómában (dr. Pfliegler György anyagából, DEKK Belgyógyászati Intézet, Ritka Betegségek Tanszék)

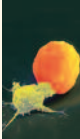
rés, gyermekkorban progresszív betegség esetén fordul elő a camptodactylyia, az ujjak kontraktúrája.

**Szemtünetek**

A legjellegzetesebb tünet, a diagnózis felállításának az alapja az ectopia lentis, vagyis a szemlencse diszlokációja, amely a betegek 60%-ában fordul elő, bár nem betegség-specifikus [5]. További szemészeti tünet a korai és súlyos myopia, a lapos cornea, az axiális szemtengely megnyúlása, hypoplasiás iris, a ciliaris izom hypoplasiája, korai szürke és zöld hályog kialakulása.

**Kardiovaszkuláris tünetek**

A kardiovaszkuláris tünetek egyaránt érintik a szívet, illetve az érrendszert. A leggyakoribb szívet érintő rendellenesség az atrioventricularis billentyű érintettsége, elvékonyodása,



amely gyakran vezet prolapsushoz. Gyermekkori súlyosabb esetekben a regurgitáció, billentyűzáródási elégtelenség szív-elégtelenséghez, pulmonalis hypertonia kialakulásához és hirtelen halálhoz is vezethet [20]. A gyermekkorban felismert esetek 25%-ában a mitralis prolapsus mitralis insufficiencia kialakulásához vezet felnőttkorban, a progresszió gyakoribb nőkben [21].

Az aortabillentyű-elégtelenség többnyire késői szövődmény, az aortaaneurysma, illetve -dissectio késői következménye. A billentyűelégtelenségek fokozzák az arrhythmiai kockázatát is (pl. supraventricularis arrhythmia, pitvarfibrilláció, megnyúlt QT-intervallum). Mindezek az eltérések gyakoribbá teszik a Marfan-szindrómás betegekben a dilatativ cardiomyopathia előfordulását, amely jelzi azt, hogy a fibrillin-1 mátrixproteinnek szerepe van a szívizom felépítésében is.

A legjelentősebb, egyben életet veszélyeztető szövődmény Marfan-szindrómában az aortaaneurysma és a következményes dissectio veszélye. Az ateroszklerotikus talajon kialakult aortaaneurysmákkal ellentétben az aortagyök érintett leggyakrabban. A dissectio kockázata a családi anamnézistól és az aorta maximális átmérőjétől függ. Műtét indokolt minden olyan esetben, amikor az aorta átmérője felnőttkorban eléri az 50 mm-t [22]. Szintén indokolt a sebészeti beavatkozás, ha évente 1 cm-t meghalad az aortaaneurysma

növekedése, vagy szignifikáns aortaregurgitatio alakul ki akut szívelégtelenséggel. Ha az aneurysma dissectiója az arteria carotisokra is ráterjed, a betegnek nemcsak típusos mellkasi fájdalma, hanem neurológiai tünetei is lehetnek. A koszorúereket érintő dissectio akut szívizominfarktust, illetve hirtelen halált is okozhat [5].

## Egyéb tünetek

A légzőrendszert érintő eltérések elsősorban a skeletalis tünetek, főként a pectus excavatum, illetve progresszív scoliosis szövődményei, rendszerint restriktív ventilációzavar kialakulását okozzák. Csúcsi bullák megjelenése spontán pneumothorax kialakulásához vezethet.

A Marfan-szindrómás betegek bőrének elaszticitása rendszerint normális, azonban gyakoriak a striák, amelyek nem az elhízás, terhesség vagy testedzés következményei. A recidív inguinalis sérvek gyermek- és fiatal felnőttkorban egyaránt előfordulnak [5].

Duraectasia a Marfan-szindrómás betegek 63–92%-ában alakul [23], gyakran tünetmentes vagy enyhe ágyéki gerincfájdalom jellemzi, sokszor csak képalkotó (CT-, MRI-) vizsgálat segítségével véletlenszerűen kerül felismerésre.

4. táblázat. Differenciáldiagnózis [19]

Differenciáldiagnózis	Génmutáció	Klinikai jellemzők
Loeys-Dietz-szindróma (LDS)	TGFBR1/2	Uvula bifida/szájpadhasadék, artériakanyargósság, hypertelorismus, diffúz aorta- és artériaaneurysmák, craniosynostosis, dongaláb, nyaki gerinc instabilitás, vékony, áttetsző és sérülékeny bőr
Shprintzen-Goldberg-szindróma (SGS)	FBN1	Craniosynostosis, mentális retardáció
Congenitalis kontrakturás arachnodactylia (CCA)	FBN2	Zsugorodott fülkagyló, kontraktúrák
Weill-Marchesani-szindróma (WMS)	FBN1 és ADAMTS10	Microspherophakia, brachydactylia, ízületi merevség
Ectopia lentis szindróma (ELS)	FBN1 LTBP2 ADAMTSL4	Aortagyök-dilatáció hiánya
Homocystinuria	CBS	Trombózis, mentális retardáció
Familiáris mellkasi aorta aneurysma szindróma (FTAA)	TGFBR1/2, ACTA2	Marfanoid skeletalis tünetek hiánya, livedo reticularis, irisflocculusok
FTAA bicuspidalis aortabillentyűvel (BAV)		
FTAA és nyitott ductus arteriosus (PDA)	MYH11	
Kanyargós artéria szindróma (ATS)	SLC2A10	Generalizált artériás kanyargósság, artériás stenosisok, arcdysmorphismus
Ehlers-Danlos-szindróma (vaszkuláris, valvularis, kyphoscolioticus típusok)	COL3A1, COL1A2, PLOD1	Közepes méretű artériák aneurysmája, súlyos billentyűelégtelenség, átlátszó bőr, dystrophiás hegek, jellegzetes arc

CBS: cisztationin-béta-szintetáz gén; ACTA2: simaizom alfa-2 aktin gén; MYH11: simaizom miozin nehéz lánc 11 gén; PLOD1: lizil-hidroxilázt kódoló gén; SLC2A10: facilitatív glükóztanszporter GLUT10 gén; COL1A2, COL3A1: kollagén I. és III. típust kódoló gén

## Differenciáldiagnózis és diagnózis

Differenciáldiagnosztikai szempontból számtalan betegség jön szóba (4. táblázat). A Marfan-szindróma-hoz hasonló állapot az ún. MASS fenotípus: myopia, mitralis prolapsus, borderline, illetve nem progresszív aortaaneurysma, striák, skeletalis eltérések jellemzik, de nem merítik ki a Marfan-szindróma kritériumtűneteit.

A diagnózis felállítása a típusos tünetek alapján az ismeretett kritériumrendszer segítségével történik. Az aortagyök eltéréseit a szív ultrahangvizsgálata, aortogram, CT vagy MRI segítségével diagnosztizálhatjuk. A mitralis billentyű prolapsusa, elégtelensége rendszeres követést igényel ultrahangvizsgálattal. Az ectopia lentis kimutatása réslámpás vizsgálattal történik. A mozgásszervi eltérések diagnosztizálására és követésére a hagyományos röntgenvizsgálatok alkalmasak. A duraectasia kimutatása a gerinc CT- vagy MRI-vizsgálata segítségével történik.

Praenatalis diagnosztika indokolt a 10–12. terhességi héten, ha a szülőknél Marfan-szindróma áll fenn. Genetikai vizsgálat, a fibrillin-1 gén mutációjának kimutatása is elérhető, bár költséges és időigényes vizsgálat, indokolt esetekben el kell végezni [4].

## Marfan-szindróma és terhesség

Az összes veleszületett kötőszöveti betegségben, így Marfan-szindróma esetén is fontos beszélni a terhességről, hiszen potenciális életveszélyt jelent. Az egyik leggyakoribb probléma az anyai akut aortadissectio lehetősége, illetve a magzati halálozás magas kockázata [4]. A magzat körülbelül 50%-os valószínűséggel örökli a betegséget. Az aortadissectio kockázata a 3. trimeszterben a legnagyobb, illetve valószínűsége akkor a legkisebb, ha az aortagyök átmérője 40 mm alatt van. A császármetszés a preferált szülési mód [4].

## Kezelés, gondozás

A Marfan-szindróma kezelése, követése multidiszciplináris feladat, kardiológus, reumatológus, ideggyógyász, klinikai genetikus bevonását igényli. Legfontosabb a diagnózis mielőbbi felállítása, lehetőség szerint már gyermekkorban, vagy legkésőbb fiatal felnőttkorban. Rendszeres ellenőrzés és követés az életkilátásokat jelentősen növeli, az időben elvégzett preventív beavatkozások a súlyos, halálos szövődmények kivédésében nélkülözhetetlenek.

A vérnyomás kontrollálása, a magas vérnyomás betegség kezelése elengedhetetlen, elsősorban profilaktikus béta-receptor-blokkoló adása szükséges, illetve a hipertonia mértékétől függően egyéb antihipertenzív gyógyszer indítása indokolt. A profilaktikus béta-receptor-blokkoló kezelés csökkenti

az aortaaneurysma progresszióját [4]. A betegség patomechanizmusában szerepet játszó TGF- $\beta$  szignálút rendellenességei, valamint az emelkedett TGF- $\beta$ -koncentráció miatt a TGF- $\beta$ -antagonista angiotenzinreceptor-blokkoló kezelés javasolt (pl. losartan), amely gyógyszer-család szintén igazolt módon mérsékli az aortadilatáció mértékét [4, 12]. Ahimastos és mtsai igazolták, hogy a perindopril csökkenti az artériák falának merevségét, a centrális és perifériás pulzushullám sebességét, az aortaátmérőt és a TGF- $\beta$ -koncentrációt [24].

Az MMP-2-koncentrációt csökkentő doxycyclinről szintén vannak publikációk, Marfan-szindrómás egérmódelben a kezelés csökkentette az aortaaneurysma progresszióját [12], különösen losartannal kombinálva. A pravastatin hatását is vizsgálták, amely jótékonyan csökkenti az aortafal izomsejtjeiben a proteinszintézist, ezáltal csökkenti a dilatáció mértékét [12].

A profilaktikus sebészi megoldás, vagyis az aortagyökgraft behelyezése akkor indokolt, ha az aortagyök átmérője meghaladja az 55 mm-t, vagy ha  $\geq 50$  mm, de a családban már előfordult aortadissectio, vagy ha az aortagyök átmérőjének növekedése a 2 mm/év mértéket meghaladja [4]. Súlyos aortaregurgitatio esetén aortabillentyű-plasztika indokolt. de Oliveira és mtsai 75%-os 10 éves reoperációmentességet értek el aortagyök-plasztikával és 100%-ost billentyűplasztikával, továbbá 87% és 96%-os 10 éves túlélést Marfan-szindrómás betegekben [25].

## Összefoglaló megjegyzések

A Marfan-szindróma ritka, veleszületett, örökölődő kötőszöveti betegség, amely számos szervet (szemet, vázrendszert, kardiovaszkuláris rendszert) érint. A betegségben szenvedők élettartamát döntően a kardiovaszkuláris eltérések szabják meg, főként az aortadissectio jelentkezése. A korai diagnózis a súlyos, életet veszélyeztető szövődmények jelentkezése előtt fontos, és ezt követően egy életen át tartó, multidiszciplináris követést, szükség esetén preventív sebészi beavatkozást tesz indokolttá.

## IRODALOM

- [1] Laer L, Proost D, Loeys BI: Educational paper: Connective tissue disorders with vascular involvement: from gene to therapy. *European Journal of Pediatrics* 2013; 172: 997-1005.
- [2] Halper J, Kjaer M: Basic components of connective tissues and extracellular matrix: elastin, fibrillin, fibulins, fibrinogen, fibronectin, laminin, tenascins and thrombospondins. *Adv Exp Med Biol* 2014; 802: 31-47.
- [3] Olivieri J, Smaldone S, Ramirez F: Fibrillin assemblies: extracellular determinants of tissue formation and fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2010; 3: 24.
- [4] Yuan S-H, Jing H: Marfan's syndrome: an overview. *Sao Paulo Med J* 2010; 128: 360-6.



- [5] Judge D, Dietz H: Marfan's syndrome. *Lancet* 2005; 366: 1965-1976.
- [6] Gao LG, Luo F, Hui RT, Zhou XL: Recent molecular biological progress in Marfan syndrome and Marfan-associated disorders. *Ageing Res Rev* 2010; 9: 363-368.
- [7] Ágota A, Ágg B, Benke K, et al: A Marfan-szindróma biobankjának létrehozása. *Orv Hetil* 2012; 153: 296-302.
- [8] Marfan A: Un cas de déformation congénitale des quatre membres, plus prononcée aux extrémités, caractérisée par l'allongement des os avec un certain degré d'amincissement. *Bulletins et memoires de la Société medicale des hôpitaux de Paris* 1896; 13: 220-7.
- [9] Yetman AT, Bornemeier RA, McCrindle BW: Long-term outcome in patients with Marfan syndrome: is aortic dissection the only cause of sudden death? *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 329-32.
- [10] Dean JC: Marfan syndrome: clinical diagnosis and management. *Eur J Hum Genet* 2007; 15: 724-733.
- [11] Dietz HC: Marfan syndrome: From molecules to medicines. *Am J Hum Genet* 2007; 81: 662-667.
- [12] Benke K, Ágg B, Szilveszter B, et al.: The role of transforming growth factor-beta in Marfan syndrome. *Cardiol J.* 2013; 20: 227-234.
- [13] Singh KK, Schmidtke J, Keyser B, Arslan-Kirchner M: TGFB3 variation is not a common cause of Marfan-like syndrome and Loeys-Dietz-like syndrome. *J Negat Results Biomed* 2012; 11: 9.
- [14] Gabriel LAR, Wang LW, Bader H, et al: ADAMTSL4, a secreted glycoprotein widely distributed in the eye, binds fibrillin-1 microfibrils and accelerates microfibril Biogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012; 53: 461-469.
- [15] Saito M, Kurokawa M, Oda M, et al: ADAMTSL6 $\beta$  protein rescues fibrillin-1 microfibril disorder in a Marfan syndrome mouse model through the promotion of fibrillin-1 assembly. *Journal of Biological Chemistry* 2011; 286: 38602-38613.
- [16] McKusick VA: The cardiovascular aspects of Marfan's syndrome: a heritable disorder of connective tissue. *Circulation* 1955; 11: 321-42.
- [17] Beighton P, de Paepe A, Danks D, et al. *International Nosology of Heritable Disorders of Connective Tissue*, Berlin 1986. *Am J Med Genet* 1988; 29: 581-94.
- [18] De Paepe A, Devereux RB, Dietz HC, et al: Revised diagnostic criteria for the Marfan syndrome. *American Journal of Medical Genetics* 1996; 62: 417-26.
- [19] Loeys BL, Dietz HC, Braverman AC, et al: The revised Ghent nosology for the Marfan syndrome. *J Med Genet* 2010; 47: 476-485.
- [20] Sisk H, Zahka K, Pyeritz R: The Marfan syndrome in early childhood: analysis of 15 patients diagnosed at less than 4 years of age. *Am J Cardiol* 1983; 52: 355-58.
- [21] Pyeritz R, Wappel M: Mitral valve dysfunction in the Marfan syndrome. *Clinical and echocardiographic study of prevalence and natural history.* *Am J Med* 1983; 74: 797-807.
- [22] Gott V, Cameron D, Alejo D et al: Aortic root replacement in 271 Marfan patients: a 24-year experience. *Ann Thorac Surg* 2002; 73: 438-43.
- [23] Fattori R, Nienaber C, Descovich B, et al: Importance of dural ectasia in phenotypic assessment of Marfan's syndrome. *Lancet* 1999; 354: 910-13.
- [24] Ahimastos AA, Aggarwal A, D'Orska K, et al: Effect of perindopril on large artery stiffness and aortic root diameter in patients with Marfan syndrome: a randomized controlled trial. *JAMA* 2007; 298: 1539-47.
- [25] deOliveira N, David T, Ivanov J, et al: Results of surgery for aortic root aneurysm in patients with Marfan syndrome. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003; 125: 789-96.

(Dr. Brúgós Boglárka, Debreceni Egyetem Klinikai Központ, Belgyógyászati Intézet, Ritka Betegségek Tanszék, 4012 Debrecen Nagyerdei krt. 98. Tel: 30/244-6226. brugosb@gmail.com)

# Az epesavak és az immunrendszer kapcsolata

SIPKA SÁNDOR

Debreceni Egyetem, Klinikai Központ

A koleszterin enzimes oxidációja során számos epesavforma képződik, melyek detergensként elősegítik a táplálékok lipidmolekuláinak emésztését és felszívódását, hormonként viszont öt különböző receptort aktiválnak, amelyek kihatnak az epesav-anyagcserén kívül a cukor-, a lipid- és a lipoprotein-anyagcserére, az energiefelhasználásra, a bélműködésre, a baktériumnövekedésre, a gyulladásokra és a máj-bél kapcsolatra. Ez az összefoglaló bemutatja a jelenlegi főbb eredményeket az epesavak élettani és kóros működésével kapcsolatban, továbbá kiemelt figyelemmel foglalkozik az epesavak és a bakteriális lipopoliszacharid- (endotoxin-) molekulák kapcsolatával különböző kóros állapotokban. Bemutatásra kerül az epesavak szerepe a veleszületett immunitásban, különböző szisztémás gyulladásokban, gyulladásos bélbetegségekben, allergiában, psoriasisban, cholestasisban, elhízásban, metabolikus szindrómában, alkoholeredetű májbetegségben és bél-daganatokban.

**Kulcsszavak:** epesav, endotoxin, immunrendszer, gyulladás

## LINKAGE BETWEEN BILE ACIDS AND IMMUNE SYSTEM

Enzymatic oxidation of cholesterol generates numerous distinct bile acids that function both as detergents that facilitate digestion and adsorption of dietary lipids, and as hormones that activate five distinct receptors, leading to changes not only in bile acid metabolism but also in glucose homeostasis, lipid and lipoprotein metabolism, energy expenditure, intestinal motility, bacterial growth, inflammation and in the liver-gut axis. This review focuses on the present knowledge regarding the physiologic and pathologic importance of bile acids and their immunomodulatory functions with particular attention to bacterial lipopolysaccharides („endotoxins”) and bile acid and immunological disorders. The specific role that bile acids play in the regulation of innate immunity, various systemic inflammations, inflammatory bowel diseases, allergy, psoriasis, cholestasis, obesity, metabolic syndrome, alcoholic liver disease and colon cancer will be reviewed.

**Keywords:** bile acid, endotoxin, immune system, inflammation

## Az epesavak sokoldalú szerepe az anyagcserében

Az epesavak elsődleges szerepe a lipidanyagcserében nyilvánul meg. 1. Az epesavak nélkülözhetetlenek a vékonybélben azoknak a táplálékhalózatoknak, „micelláknak” a formálódásában, amelyek elősegítik a táplálékokban található hosszú láncú trigliceridek „feldarabolódását” és a zsírban oldódó vitaminok felszívódását. 2. Az epehólyagban oldhatóvá teszik a koleszterint, hiányukban koleszterinkristályok és epekövek képződnek. 3. Az epesavak sói (epesók) irányítják az epefolyást a hepatocytákból az epecsatornáék és az epehólyag irányába. 4. A koleszterin epesavvá történő átalakulása, továbbá székletbe kerülése döntő jelentőségű az egész szervezet szterinegyensúlya szempontjából. Emellett az epesavak baktériumszaporodást gátló hatásúak, ami az epeúrendszer steril állapotát biztosítja. Az epeképzés zavara számos beteg-

séghez vezethet, mint pl. cholestasis, epekő, gyulladás, zsír- és vitaminfelszívódási zavar, baktériumszaporodás a vékonybélben, atherosclerosis, idegrendszeri zavarok vagy tumorok. Örökölhető zavar a „progresszív familiáris intrahepatikus cholestasis” I-III. típusa.

Az epesavak hormonszerű hatásukat öt receptoron keresztül fejtik ki a különböző szövetekben. A négy magreceptor: farnezoid-X-receptor (FXR), pregnán-X-receptor (PXR), androsztánreceptor és a D-vitamin-receptor (VDR), továbbá egy G-proteinhez kapcsolt receptor (TGR5) [1].

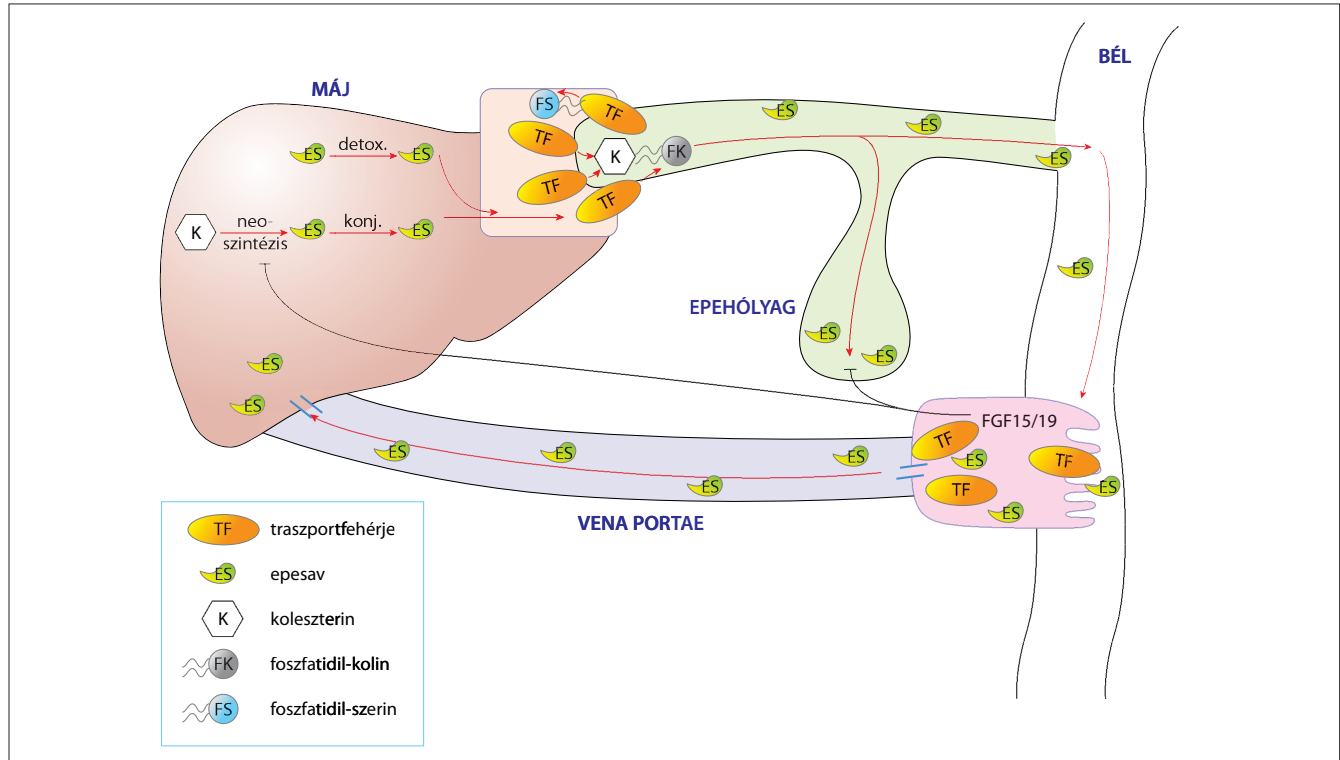
## Az epesavak szintézise és enterohepaticus körforgalma

Legalább 17 enzim vesz részt a koleszterin szterángyűrűjének oldallánc-módosításaiban, a „primer epesavak” létre-

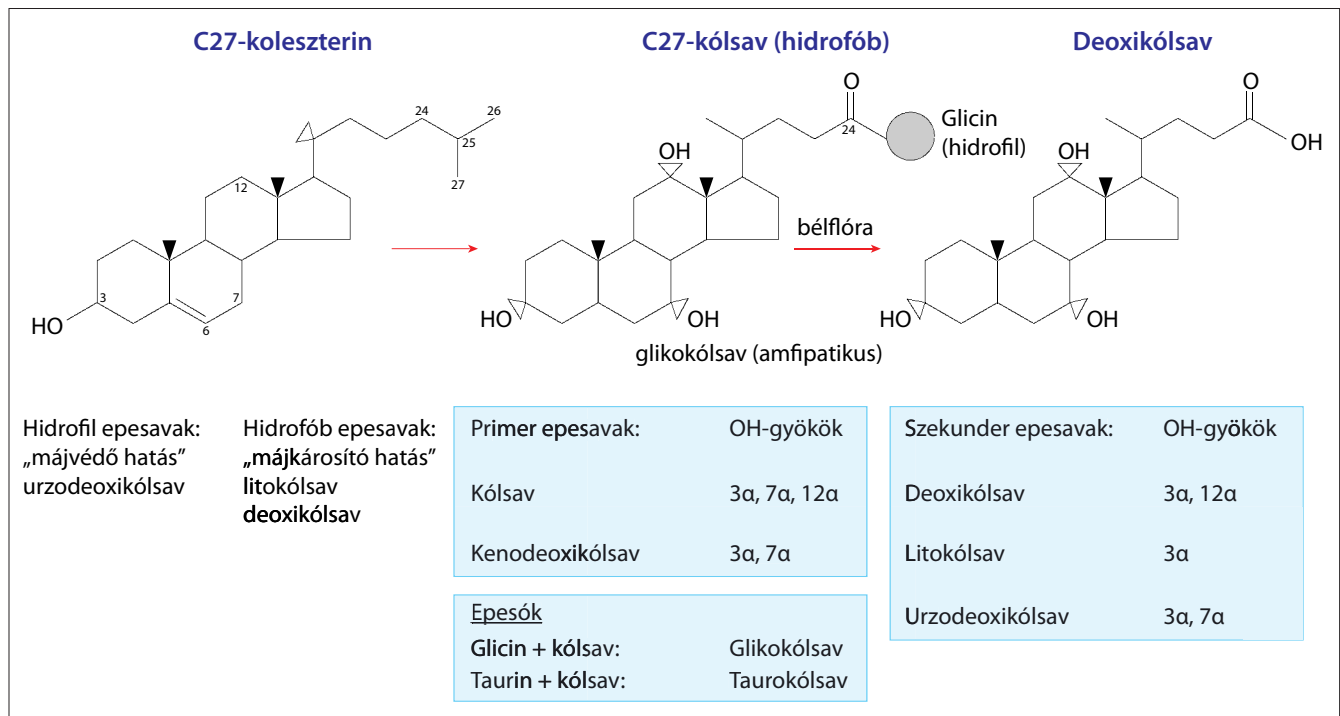


hozásában, amik glicinnel és taurinnal összekapcsolt formái az „epesók”. Az egyik legfontosabb enzim a 7 $\alpha$ -hidroxiláz, ami a P450 enzimcsalád tagja, és C27-koleszeterinből kólsavat készít. A „szekunder” epesavakat a bélbe kerülő primer formákból a bélbaktériumok hozzák létre. Mennyiségük 3–5%. Az epesavak a máj epeútjaiban különböző transzport-

fehérjék révén választódnak ki epesók formájában, miután glicinnel és taurinnal konjugálódnak (glikokólsav, taurokólsav keletkezik), melyek csökkentik pKa-értéküket, ezáltal jobban oldódnak a duodenum savas közegében, és így hozzák létre a foszfolipid-micellákat az emésztésre kerülő táplálékokban (1. és 2. ábra).



1. ábra  
Az epesavak képződése és enterohepaticus körforgalma (Gadaleta RM, BBA 2010; 1801: 684.)



2. ábra  
Az epesavak és epesók főbb típusai [1]

Az epesók a foszfolipidekkel és koleszterinnel együtt az epehólyagba kerülnek, és 87%-os víztartalmú epévé alakulnak. A vízben oldott anyagok aránya az epében: epesó 67%, foszfolipid 22%, koleszterin 4%, emellett ásványi sók és kevés fehérje. A sárgászöld vagy narancssárga-zöld színt a bilirubin és a biliverdin adja. A kis mennyiségű nyák és a szekretoros IgA segíti az epe bakteriosztatikus hatását. A koleszterinkristályok és -kövek kialakulását az epesók és a foszfolipid-micellák akadályozzák meg. A duodenumba kerülő táplálék zsírmolekulái szekretin- és kolecisztochin-szekréción indítanak el a bél nyálkahártyából. A szekretin megnöveli az epetermelést, míg a kolecisztochin hatására az epehólyag összehúzódik, a sphincter Oddi ellazul, és így a duodenumba epe kerül. A májban képződő FGF15/19 hormon negatív visszacsatolás útján gátolja a további epesavképzést, így állítja le az „emésztési” és indítja el az „éhezési” fázist. Az epesótartalmú micellák pancreaszimek által történő bontása, emésztése után a zsírból oldódó vitaminok, az A-, D- és E-vitamin felszívódnak. Az epehólyag nélkülözhető, hiányában az epe közvetlenül kerül a duodenumba. A Na<sup>+</sup>-függő transzportfehérjék segítségével az ileumból az epesók 95%-a visszakerül a vérbe. A bélben maradó epesókat a bélbaktériumok szekunder epesavakká alakítják, amelyek egy része visszazívódik a vérbe, míg a többi része a széklettel távozik a szervezetből. A vérbe került primer és szekunder epesavak visszakerülnek a májba [2, 3].

Emberben naponta 2–4 g epesav képződik, és 20–40 g epesav forog körbe hat-tíz alkalommal a máj és a belek között. A széklettel 0,2–0,6 g epesav ürül, aminek pótlása koleszterinből történik de novo szintézissel. A plazma epesav-koncentrációja 2–10 µM között mozog, étkezések utáni csúcserővel. Ez a mennyiség már képes aktiválni az epesav-receptorokat a különböző szövetekben. Az egyes epesavak vízben történő oldódási képességét a „hidrofób-hidofil index” (HHI) jelzi. A leginkább hidofil epesav, az urzodeoxikólsav májvédő hatású, míg a magas HHI-értékű, erősen hidrofób jellegű litokólsav és dezoxikólsav májkárosító. A primer epesavak hidofil karaktere erősebb, mint a szekunder formáké [4].

## Az epesavak által aktiválható receptorok hatása az immunrendszer működésére és a gyulladásokra

### Klinikai megfigyelések az epesavak immunmodulátor szerepéről

A hepatobiliaris betegségekben, pl. primer biliaris cirrhosisban vagy elzáródásos sárgaságban szenvedő betegek fogékonyabbak a fertőzésekre. A bakteriális lipopoliszacharid (LPS) (endotoxin) által kiváltott interleukin-1 (IL-1), IL-6 és tumornekrózis faktor-α (TNFα) felszabadulást a deoxikólsav és kenodeoxikólsav csökkenti a makrofágokban [5, 6].

### Az epesavreceptorok típusai és hatásuk az immunrendszerre

Az epesavak által indukált receptorok az monocyta/makrofág sejtekben, CD4+, CD8+, CD19+ lymphocytákban, továbbá a dendritikus sejteken elsődlegesen gyulladásgátló összehatást váltanak ki [7]. A receptorok típusait és az általuk kiváltott gyulladásgátlás mechanizmusát az 1. táblázat, továbbá az egyes receptorok jelenlétét a különböző immunsejtekben a 2. táblázat mutatja be.

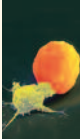
## Az epesavak hatása a bél mikrobiom rendszerére

A bél mikrobáinak fontos szerepe van az epesavak anyagcseréjében. Ezek hozzájárulnak létre különböző szerkezeti módosítások után a kis mennyiségben képződő szekunder epesavakat. A „germ-free” patkányokban jelentősen csökken az epesavtermelés, pl. a konjugált glikokólsav mennyisége, ezzel szemben a taurokólsav szintje és az FXR-receptor gén

1. táblázat. Az epesav-receptorok típusai és ligandjaik [7]

Receptor	Főligand	Egyéb ligand
Farnezoid-X-receptor (FXR)	CDCA > DCA > LCA	Farnezol
Pregnán-X-receptor (PXR)	LCA > 6-keto-LCA	Pregnonol
Konstitutív androsztánreceptor (KAR)	CA > 6-keto-LCA > 7-keto-LCA	Androstan
D-vitamin-receptor(VDR)	D-vitamin	LCA>GLCA>CDCA
Epesavaktivált G-protein-kapcsolt transzmembrán receptor (TGR5)	TLCA > LCA > DCA > CDCA > CA > UDCA	Linolénsav és oleánsav

CDCA: kenodeoxikólsav; DCA: deoxikólsav; UDCA: urzodeoxikólsav; CA: kólsav; LCA: litokólsav; GLCA: gliko-konjugált litokólsav; TLCA: taurin-konjugált litokólsav



2. táblázat. Az epesav-receptorok előfordulása és hatása az immunrendszer sejtjeiben [7]

Receptor	Monocyta/ Makrofág	Lymphocyta			Dendritikus sejt	Immunológiai hatás
		CD4+	CD8+	CD19+		
FXR	igen	igen	igen	igen	nem ismert	antiinflammatoricus hatás: ↓TLR-2, -4, -5, -6, CRP, AP-1, NFκB ↑TLR-3, -8, -9
PXR	igen	igen	igen	igen	nem ismert	antiinflammatoricus hatás: ↓NFκB, TNFα, ICAM1, COX2, kemokintermelés
KAR	igen	igen	igen	igen	nem ismert	detoxifikáló, májvédő hatás: ↑mikroszomális enzimek infukciója, génexpressziójának gátlása: IL-1β, GCS
VDR	igen	igen	igen	igen	igen	antiinflammatoricus hatás: ↓ proinflammatoricus citokinek
TGR5	igen	nem	nem	nem	nem ismert	antiinflammatoricus hatás: ↑cAMP-PKA-CREB: ↓TNFα, IL-1β, IL-6, IL-8 ↑IL-10

TLR: Toll-receptor; CRP: C-reaktív protein; AP-1: aktivált protein-1; NFκB: nukleáris faktor-κB; TNFα: tumornekrozis faktor-α; ICAM1: intercelluláris adhéziós molekula 1; cAMP: ciklikus adenzin-monofoszfát; PKA: proteinkináz A; CREB: cAMP-kötő elem; IL: interleukin; COX: ciklooxygenáz; GCS: glükokortikoszteroid

expressziója megnő a májban. A táplálékok összetevői, a zsír-, rost-, mukopoliszacharid- vagy oligoszacharid-molekulák jelentősen hatnak a bél mikrobáinak működésére, az epesavak képződésére és a bélgyulladásokra. Egerekben például a nagy telített zsírsav tartalmú tej itatása egerekben jelentősen megemeli a taurokólsavszintet, és serkenti a szulfidot redukáló *Bilophilai wadworthia* baktérium szaporodását [8].

## A bakteriális lipopoliszacharid (LPS) vagy „bakteriális endotoxin” (ET)

A Gram-negatív baktériumok külső membránja két rétegből és két makromolekula-típusból tevődik össze. Kívül lipopoliszacharid (LPS), belül glicerofosfolipid. Az LPS három részből áll: a) a hidrofób jellegű „lipid A”, b) egy oligoszacharid, c) O antigén, ami az egyes baktériumokra jellemző cukor-(szacharid-) rész. A „lipid A” az LPS „endotoxin” része. Az evolúció során az LPS-szerkezetek felismerésére minden gazdaszervezetben különböző „mikroorganizmust felismerő molekuláris mintázat” (MAMP) vagy „patogént felismerő molekuláris mintázat” (PAMP) alakult ki [9,10]. A bélben lévő Gram-negatív baktériumok szétesése során folyamatosan keletkező „endotoxin”-molekulák a bél epitheliumsejtjein átjutva a vena portae útján a vérbe kerülnek. A bakteriális LPS (endotoxin) referenciatartománya az emberi vérplazmában: 0,01–1,0 EU/ml (endotoxin unit/ml) [11].

## Az LPS- (endotoxin-) molekula hatása a makrofágokra

Az LPS-molekulát a plazmában egy lipidkötő fehérje, a „lipid binding protein” (LBP) köti meg, és kapcsolja a monocyták/makrofágok felszínén elhelyezkedő CD14-molekulához, majd az MD-2/TLR4 (Toll-receptor 4) komplexhez. Akut infekciókban és gyulladásokban megnő a plazmában és egyéb testnedvekben az LBP és a szolúbilis CD14 koncentrációja. A TLR4 megköti az LPS-molekulát, és az MD-2 (myeloid differentiation protein-2) és MyD88 (myeloid differentiation factor 88) útján gyulladásos citokinek (TNFα, IL-1β, IL-6, kemokinek), továbbá I. típusú interferon (IFN) termelését és kibocsátását indítja el a makrofágokból, monocytákból és egyéb CD14-et hordozó sejtekből [12]. A szeptikus sokkban kialakuló halálozásban a proinflammatoricus citokin gének katasztrofális mértékű aktiválódásában a döntő tényezőnek az endotoxinmolekula „lipid A” komponensét tartják [13, 14].

## Az endotoxin szerepe az emésztőrendszer betegségeiben

A plazmában krónikusan magas endotoxinszint figyelhető meg elhízásban, cukor- és szívbetegségben, inzulinrezisztenciában. Már egy nagy zsírtartalmú étel elfogyasztása után átmeneti endotoxinszint-emelkedés mérhető a vérben [15]. Az LPS patogén, betegséget kiváltó szerepe igazolt alkoholos májbetegségben, szepszishez vezető epeköves rohamban,

gyulladásos bélbetegségekben, primer biliaris cirrhosisban és metabolikus szindrómát kísérő endotoxinaemiában [16, 17, 18].

### Az endotoxin és az allergia kapcsolata

A „farm” környezet kisgyermekkorban érvényesülő védőhatásának egyik tényezője az allergia kialakulásával szemben a városi környezethez képest lényegesen magasabb endotoxintartalom [19]. A környezetből a táplálékok, a belégzés útján nagyobb mennyiségben vérbe kerülő LPS (lipid A) hatására itt erősebb Th1-dominancia alakul ki a kisgyermek immunrendszerében, aminek védőhatása jobban érvényesül a Th2-függő, allergiához vezető folyamatokkal szemben [20, 21].

### Az epesavak természetes gátlóanyagai a bakteriális endotoxin felszívódásának a bélből

Hazai kutatók, Kocsár, Bertók és Várterész 1969-ben írták le, hogy az epesavak meggátolják az endotoxin felszívódását a bélből [22], amit mások később megerősítettek [23, 24]. Bertók az epesavakat az endotoxinnal szemben működő „fizikokémiai védőrendszer” részének nevezte [25, 26]. Hiányukban a bélből nagyobb mennyiségű endotoxin szívódhat fel és juthat a keringésbe, felerősítve krónikus gyulladásokat (pl. psoriasis), fenntartva egy olyan kóros szabályzási kört, amiben a vér magas endotoxinszintje még tovább csökkenti az epesavképzést [27, 28, 29].

### Az epesavak szerepe a gyermekkori allergia megelőzésében

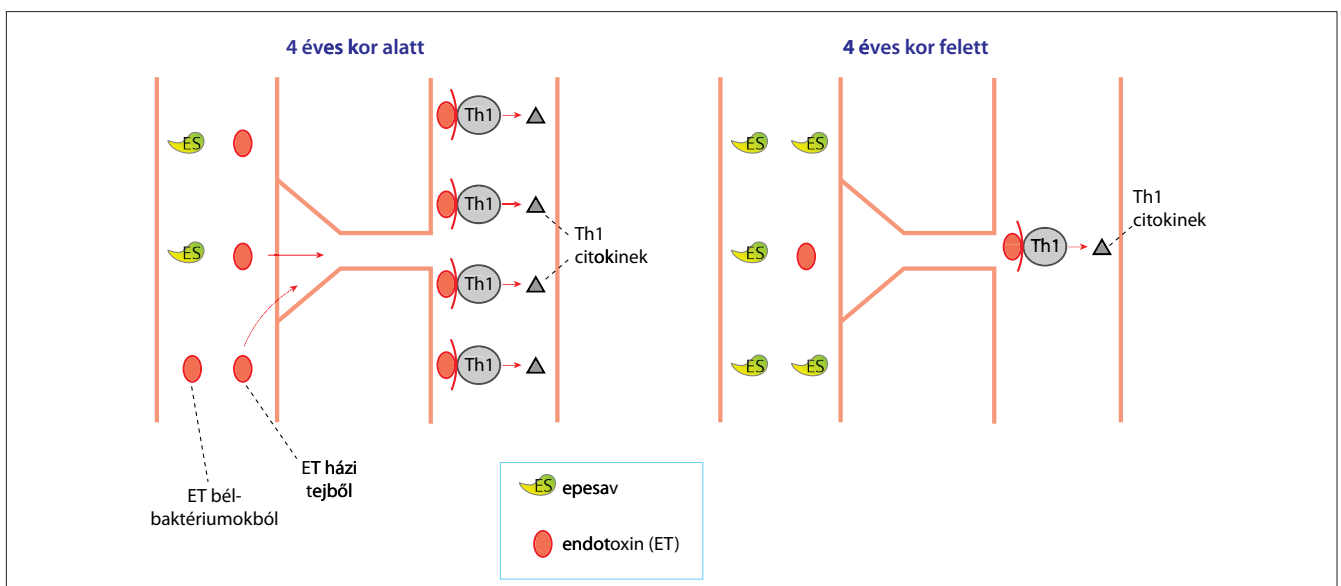
Az epesavak képzése négyéves kor alatt még nagyon alacsony [30]. Csak ebben a korai életszakaszban van természetes lehetőség az endotoxin nagyobb mértékű felszívódására a bélből a vérbe, miáltal érvényesülhet a lipid A Th1-aktiváló, az allergia kifejlődését megelőző hatása az immunrendszerben. Ez a folyamat „farm” közegben erősebben érvényesül, mint a „steril” nagyvárosban, ahol háziállatok hiánya miatt a lakókörnyezet bakteriális endotoxin tartalma sokkal kisebb (3. ábra) [19].

### Az epesavak és a béldaganatok kapcsolata

Az epesavak részt vesznek az egészséges bélepithelium kialakításában és fenntartásában [31]. Ugyanakkor a zsírban gazdag étrendek által indukált hidrofób jellegű epesavak, pl. deoxikólsav, gastrointestinalis tumorok kiváltói lehetnek [32]. A megelőzésben a hidrofíl urzodeoxikólsav eredményes alkalmazása ismert. A pregnán-X- és FXR-receptor expressziójának csökkentése pedig ígéretes új út lehet a béltumrok gyógyításában [33, 34].

### Következtetések és javaslatok

1. Az epesavaknak – emésztést segítő szerepük mellett – jelentős immunregulációs, főként gyulladásgátló hatásuk van.



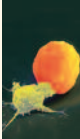
3. ábra

Az epesavak és a bakteriális endotoxin kapcsolódási formája 4 éves kor alatt és felett



2. A zsírban gazdag táplálkozás során keletkező hidrofób jellegű epesavak segíthetik a béldaganatok kialakulását.
  3. Az epesavak – a proinflammatoricus citokinek képződését indukáló bakteriális LPS (endotoxin) természetes abszorbenseként – gátolják az LPS-ek felszívódását a bélből. Ezáltal az immunrendszer vitális jelentőségű, folyamatos szabályozói.
  4. Az „epesav – bakteriális LPS homeosztázis” megbombálása számos betegséghez vezet.
  5. Ezért az epesav-diagnosztika fejlesztése mind a laboratóriumi medicina, mind a klinikai immunológia szükséges és ígéretes új iránya lehet.
  6. A jelenleg Magyarországon is forgalomban levő, automata analizátoron, kolorimetriás elven működő laboratóriumi reagens epesav-koncentrációt mér a szérumban.
  7. Emellett új, szelektív epesavmérési módszerek kifejlesztése és a napi rutinban történő alkalmazása javasolt: pl.
    - a) „kólsav/deoxikólsav, litokólsav ráta meghatározás”,
    - b) „taurokólsav/glikokólsav ráta meghatározás”.
- IRODALOM**
- [1] de Aguiar Vallim TQ, Tarling EJ, Edwards PA: Pleiotropic roles of bile acids in metabolism. *Cell Metabolism* 2013; 17: 657-669.
  - [2] Dawson, P.A: Bile secretion and the enterohepatic circulation. In Feldman M, Friedman LS, Brandt LJ, Sleisenger MH. (eds). *Gastrointestinal and Liver Disease*. Vol. 1. (Philadelphia, Saunders Elsevier) 2010; pp.1075-1088.
  - [3] Chiang JY: Bile acids: regulation of synthesis. *J Lipid Res* 2009; 50: 1965-1966.
  - [4] Lamcharfi E, Cohen-Solal C, Parquet M, et al: Determination of molecular associations of some hydrophobic and hydrophilic bile acids by infrared and Raman spectroscopy. *Eur Biophys J* 1997; 25: 285-291.
  - [5] Kimmings AN, van Deventer SJ, Obertop H, et al: Inflammatory and immunologic effects of obstructive jaundice: pathogenesis and treatment. *J Am Surg* 1995; 18: 567-581.
  - [6] Calmus Y, Guechot J, Podevin P, et al: Differential effects of chemo-deoxy cholic and ursodeoxycholic acids on interleukin 1, interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha production by monocytes. *Hepatology* 1992; 16:719-723.
  - [7] Fiorucci S, Cipriani S, Mencarelli A, et al: Counter-regulatory role of bile acid activated receptors in immunity and inflammation. *Current Molecular Medicine* 2010; 10: 579-595.
  - [8] Swann JR, Want EJ, Geier FM, et al: Systemic gut microbial modulation of bile acid modulation in host tissue compartments. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108 (Suppl 1): 4523-4530.
  - [9] Needham BD, Trent MS: Fortifying the barrier: the impact of lipid A remodelling on bacterial pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology* 2013; 11: 467-481.
  - [10] Szabo G, Bala S, Petrasek J, Gattu A: Gut-liver axis and sensing microbes. *Dig Dis* 2010; 28: 737-744.
  - [11] Nádházi Z, Takáts A, Offenmüller K, Bertók L: Plasma endo-toxin level of healthy donors. *Acta Microbiol Immunol Hung* 2002; 49: 151-157.
  - [12] Gyórfy Zs, Duda E, Vizler Cs: Interactions between LPS moie-ties and macrophage pattern recognition receptors. *Vet Immunol Immunopathol* 2013; 152: 28-36.
  - [13] Ulich TR, Guo K, del Castillo J: Endotoxin-induced cytokine gene expression in vivo. Expression of tumor necrosis factor mRNA in visceral organs under physiologic conditions and during endotoxemia. *Am J Pathol* 1989; 143: 11-14.
  - [14] Sipka S, Seres T, Dinya Z, et al: Tumour necrosis factor- $\alpha$  and adenosine in endotoxin shock-related cardiovascular symptoms. *Med Inflamm* 1995; 4: 454-455.
  - [15] Kelly CJ, Colgan SP, Frank DN: Of microbes and meals: the health consequences of dietary endotoxemia. *Nutr Clin Pract* 2012; 27: 215-225.
  - [16] Teixeira TF, Collado MC, Ferreira CL, et al: Potential mechanism for the emerging link between obesity and increased intestinal permeability. *Nutr Res* 2012; 32: 637-647.
  - [17] Caradonna L, Amati L, Magrone T, et al: Enteric bacteria, lipopolysaccharides and related cytokines in inflammatory bowel disease: biological and significance. *J Endotoxin Res* 2000; 6: 205-214.
  - [18] Piya MK, Harte AL, McTernan PG: Metabolic endotoxaemia: is it more than just a gut feeling. *Curr Opin Lipidol* 2013; 24: 78-85.
  - [19] von Mutius E, Braun-Fahrlander C, Schierl R, et al: Exposure to endotoxin or other bacterial components might protect against the development of atopy. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 1230-1234.
  - [20] Gereda JE, Leung DY, Thatayatikom A, et al: Relation between house-dust endotoxin exposure type 1 T cell development, and allergen sensitisation in infants at high risk of asthma. *Lancet* 2000; 355: 1680-1683.
  - [21] Illi S, Depner M, Genuneit J, et al: Protection from childhood asthma and allergy in Alpine farm environments- the GABRIEL Advanced Studies. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 129: 1470-1477.
  - [22] Kocsár LT, Bertók L, Várterész V: Effect of bile acids on the intestinal absorption of endotoxin in rats. *J. Bacteriology* 1969; 100: 220-223.
  - [23] Parlesak A, Schaeckeler S, Moser L, Bode C: Conjugated primary salts reduce permeability of endotoxin through intestinal epithelial cells and synergize with phosphatidylcholine in suppression of inflammatory cytokine production. *Crit Care Med* 2007; 35: 2367-2374.
  - [24] Fukuoka S, Richter W, Howe J, et al: Biophysical investigations into the interactions of endotoxins with bile acids. *Innate Immunity* 2011; 18: 307-317.
  - [25] Bertók L: Bile acids in physico-chemical host defence. *Pathophysiology* 2004; 11: 139-145.
  - [26] Bertók L: Role of endotoxins and bile acids in the pathogenesis of septic circulatory shock. *Acta Chir Hung* 1997; 36: 33-36.
  - [27] Gyucsovcics K, Bertók L: Pathophysiology of psoriasis: coping endotoxins with bile acid therapy. *Pathophysiology* 2003; 10: 57-61.
  - [28] Itoh S, Kono M, Akimoto T: Psoriasis treated with ursodeoxycholic acid: three case reports. *Clin Exp Dermatol* 2007; 32: 398-400.
  - [29] Hojo M, Sano N, Takikawa H: Effects of lipopolysaccharide on the biliary excretion of bile acids and organic anions in rats. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 815-821.
  - [30] Huang CT, Rodriguez JT, Woodward WE, Nichols BL: Comparison of pattern of fecal bile acid and neutral sterol between children and adults. *Am J Clin Nutr* 1976; 29: 1196-1203.
  - [31] Barrasa JJ, Olmo N, Lizarbe MA, Turnay J: Bile acids in the colon, from healthy to cytotoxic molecules. *Toxicol In Vitro* 2013; 27: 964-977.
  - [32] Bernstein H, Bernstein C, Payne CM, Dvorak K: Bile acids as endogenous etiologic agents in gastrointestinal cancer. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 3329-3340.
  - [33] Koutsounas I, Patsouris E, Theocharis S: Pregnane X receptor and human malignancy. *Histol Histopathol* 2013; 28: 405-420.
  - [34] Bailey AM, Zhan L, Maru D, et al: FXR silencing in human colon cancer by DNA methylation and KRAS signalling. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2014; 306: G48-58.
- (Dr. Sipka Sándor egyetemi tanár, Debreceni Egyetem, Klinikai Központ, 4032 Debrecen, Móricz Zsigmond krt. 22. Tel/fax: 52, 255-2018, mobil: 06, 20, 377-55-96)





# A célértékre törekvő kezelés („treat-to-target”): elvek és azok hazai alkalmazásának lehetőségei spondyloarthritisekben

SZÁNTÓ SÁNDOR<sup>1</sup>, HODINKA LÁSZLÓ<sup>2</sup>, GAÁL JÁNOS<sup>3</sup>, POÓR GYULA<sup>2</sup>, ÚJFALUSSY ILONA<sup>4</sup>, GÉHER PÁL<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Debreceni Egyetem, Klinikai Központ, Belgyógyászati Intézet, Reumatológiai Tanszék, Debrecen

<sup>2</sup>Országos Reumatológiai és Fizioterápiás Intézet, Budapest

<sup>3</sup>Kenézy Gyula Kórház és Rendelőintézet, Debrecen

<sup>4</sup>Állami Egészségügyi Központ – MÁV Kórház, Budapest

<sup>5</sup>Budai Irgalmasrendi Kórház, Budapest

A közlemény áttekintést nyújt a spondyloarthritis célértékre törekvő kezelésére vonatkozó nemzetközi ajánlások létrejöttének hátteréről, kidolgozásáról, és bemutatja magukat az ajánlásokat. Ezt követően a szerzők összefoglalják a „treat-to-target” alkalmazhatóságának lehetőségeit hazai viszonylatban, kitérve a spondyloarthritis korai diagnosztikájának kihívásaira és a beteg-orvos kapcsolat jelentőségére. Bemutatja továbbá a betegségmonitorozás során használatos betegségaktivitási paramétereket, valamint a szerzők által kidolgozott, az extraarticularis manifesztációk követésére javasolt szűrőkérdezőket és a betegek önmonitorozását segítő mobiltelefonos alkalmazást is. Az ajánlások gyakorlatba ültetésével a spondyloarthritis betegek terhei reményeink szerint jelentősen csökkenthetők lesznek a jövőben.

**Kulcsszavak:** axiális és perifériás spondyloarthritis, spondylitis ankylopoetica, arthritis psoriatica, célértékre törekvő kezelés

## OPPORTUNITIES FOR HUNGARIAN IMPLEMENTATION OF TREAT-TO-TARGET PRINCIPLES IN SPONDYLOARTHRITIS

**Abstract:** The article gives a general overview on the background, development and content of the international treat-to-target recommendations in the treatment of spondyloarthritis. Authors summarize the opportunities of local implementation, with special focus on the challenges in early diagnosis and importance of optimal patient-physician relationship. Then the disease activity monitoring scores are detailed together with a questionnaire for screening the extra-articular manifestations as well as a smartphone application for patient self-monitoring; both developed by the authors. Utilizing treat-to-target in daily clinical practice will result in a better outcome of spondyloarthritis patients.

**Keywords:** axial and peripheral spondyloarthritis, ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis, treat-to target

## Bevezetés

A spondylitis ankylopoetica (SPA), az arthritis psoriatica (APs), a gyulladós bélbetegségekhez társuló ízületi gyulladások, a reaktív arthritisek és ezek korai, nem differenciált formáinak diagnózisában és kezelésében jelentős paradigmaváltás következett be az elmúlt egy-két évtizedben. Ezen betegségek közös genetikai hátterének és klinikai jellegzetességeinek felismerése teremtett alapot arra, hogy egyetlen „ernyődiagnózis” alá vonják ezeket a kórképeket. Az így meghatározott spondyloarthritis (SpA-k) esetén a korábbi ún. klasszikus kórformák helyett axiális és perifériás formákat különböztetünk meg, melyekre az Európai Reumaellenes Liga (EULAR) az „Assessment of SpondyloArthritis international Society” (ASAS) közreműködésével klasszifikációs kritériumrendszereket hozott létre [1, 2, 3]. Ezek a reumatológusok

számára diagnosztikus céllal is használhatók, és lehetővé teszik a SpA-k korai felismerését, amely a hatásos kezelés alapját is jelenti.

A klasszifikációs kritériumrendszerek alkalmazhatók a perifériás és axiális SpA-s betegeket azonosító klinikai vizsgálatok során is. Nagyszámú beteget magukba foglaló tanulmányok igazolták, hogy az SpA-s egyének mindennapi életére is jelentős terhet ró betegségük, másrészt pedig ezekben az esetekben is sikerrel használhatók a SPA és az APs kezelésében forradalmi változást hozó TNF-gátlók [4, 5].

A nagy nemzetközi reumatológiai szervezetek nemcsak a korai diagnózis terén fejtettek ki jelentős aktivitást, hanem irányelveket dolgoztak ki az egyes kórképek kezelésére is. Az EULAR és az ASAS közösen hozta létre az SPA terápiás ajánlását [6], míg az EULAR és a GRAPPA (Group for Research and Assessment of Psoriasis and Psoriatic Arthritis) egymástól

függetlenül határozták meg az APs kezelési elveit [7, 8]. Ezek a guideline-ok részben klinikai vizsgálati eredmények, részben szakértői konszenzusok alapján határozzák meg az említett kórképben szenvedők gondozási stratégiáját és a nem gyógyszeres, valamint gyógyszeres kezelési eljárások hierarchiáját. Hátrányuk azonban, hogy nem, vagy csak részlegesen jelölnék meg terápiás célokat, amelyek elérése esetén biztosítható a kedvező betegségkimenetel az egyes betegek gondozása során.

## A célértékeket figyelembe vevő kezelésre vonatkozó ajánlások spondyloarthritisekben

A célértékeket figyelembe vevő kezelési stratégiákra számos példát találhatunk. Azokban a kórképekben, amelyekben az aktuális állapot egy klinikai paraméterrel jellemezhető, pl. diabetes mellitus, hypertonia, kézenfekvő ennek a módszernek az alkalmazása, de több tényezőt magába foglaló betegségindexek is jól használhatók terápiás célként, mint pl a DAS28-érték rheumatoid arthritisben. Mivel SpA-k esetén lehetőség van a korai diagnózisra és hatásos terápiás eljárások vannak a gondozó reumatológusok kezében, szükségessé vált a célértékre irányuló kezelés („treat-to-target”) irányelveinek kidolgozása ebben a betegcsoportban is. Az első megbeszéléstől a publikálásig eltelt közel 3 év során a kórképek kutatásában és kezelésében jártas szakértők a betegek véleményét is figyelembe véve alkották meg az SpA-k, ezen belül az SPA és az APs célértékeket figyelembe vevő kezelésének ajánlásait [9]. A következőkben ezen irányelvgyűjtemény elemeinek felsorolása mellett a hazai megvalósíthatóság lehetőségeit elemezzük.

Az SpA valamennyi formájával kapcsolatos ajánlások:

1. A legfontosabb terápiás cél a klinikai remisszió/a mozgásszervi károsodást okozó kórfolyamat (arthritis, dactylitis, enthesitis, axiális csontbetegség) aktivitásának megszüntetése, az extraarticularis tünetek figyelembevételével.
2. A terápiás célkitűzést egyénre kell szabni, a betegség aktuális tüneteinek megfelelően.
3. Meghatározás szerint a klinikai remisszió/inaktív betegség a gyulladós betegség számottevő aktivitását bizonyító klinikai és laboratóriumi eltérések hiánya.
4. Az alacsony betegségaktivitás elérése egy lehetséges, alternatív terápiás célkitűzés.
5. A betegség aktivitását a panaszok és a klinikai tünetek, továbbá az akut fázis fehérvék egyidejű értékelése alapján kell felmérni.
6. A betegségaktivitás mérőszámának és az elérendő célérték szintjének kiválasztását befolyásolhatja a kí-

sérőbetegségek, betegfüggő tényezők és gyógyszerfüggő kockázatok figyelembevétele.

7. A célérték elérése után azt – ideális esetben – mindig fenn kell tartani a betegség kórlefolása során.
8. A betegeket megfelelően tájékoztatni kell a terápiás célról, az elérésére tervezett stratégia kockázatairól és előnyeiről, és be kell őket vonni a céllal kapcsolatos döntésekbe.
9. A betegségaktivitás mutatóinak értékelésén felül, klinikai döntések meghozatalakor a szerkezeti változásokat, a funkcionális károsodást, a kísérőbetegséget és a kezelés kockázatait is szem előtt kell tartani.

Kifejezetten az axiális SpA-ra vonatkozó ajánlások

10. A terápiás döntések támogatása céljából a mindennapi klinikai gyakorlatban rendszeresen meg kell határozni és rögzíteni kell a mozgásszervi aktivitás hitelesített mutatóit (pl. BASDAI + akut fázis fehérvék vagy ASDAS, a funkcionalitásra vonatkozó mérésekkel – pl. BASFI – kiegészítve vagy anélkül). Az értékelés gyakorisága a betegség aktivitásától függ.
11. A döntések meghozatalakor további tényezők, pl. a gerinc gyulladásának MRI-vel meghatározott mértéke, a radiológiai progresszió, perifériás mozgásszervi vagy az extraarticularis tünetek, továbbá a kísérőbetegségek is figyelembe vehetők.

Kifejezetten a perifériás SpA-ra vonatkozó ajánlások

10. Az egyéni perifériás mozgásszervi manifesztációkat (arthritis, dactylitis, enthesitis) tükröző betegségaktivitás rendszeres számszerű mérése és dokumentálása szükséges a napi klinikai gyakorlatban a terápiás döntések irányítása céljából; az értékelés gyakorisága a betegségaktivitástól függ.
11. A döntések meghozatalakor további tényezők, pl. a gerincelváltozások vagy az extraarticularis tünetek, a képalkotó vizsgálatok eredményei, a funkcióképesség/életminőség változásai, továbbá a kísérőbetegségek is figyelembe vehetők.

Kifejezetten az APs-re vonatkozó ajánlások

10. A terápiás döntések támogatása céljából a mindennapi klinikai gyakorlatban rendszeresen meg kell határozni és rögzíteni kell a mozgásszervi aktivitás hitelesített mutatóit (arthritis, dactylitis, enthesitis, axiális csontbetegség). Az értékelés gyakorisága a betegség aktivitásától függ; a bőrtüneteket úgyszintén figyelembe kell venni.
11. A döntések meghozatalakor további tényezők, pl. a gerincelváltozások vagy az extraarticularis tünetek, a képalkotó vizsgálatok eredményei, a funkcióképesség/életminőség változásai, továbbá a kísérőbetegségek is figyelembe vehetők.



## A „treat-to-target” alkalmazhatóságának lehetőségei hazai viszonylatban

### A spondyloarthritis korai diagnosztikája

Az SpA-k célértéket figyelembe vevő kezelésének hazai megvalósulását jelenleg számos tényező hátráltatja, de ezek leküzdése végeredményben a betegek funkcionális állapotának, életminőségének, betegségkimenetelének javítását szolgálja. Az egyik legfontosabb tényező az ASAS/EULAR kritériumrendszerek napi gyakorlatban való alkalmazását lehetővé tevő ismeretek elterjedése a reumatológiai szakrendelésen dolgozók körében. Ugyancsak nélkülözhetetlen lenne az alapellátásban dolgozók és a reumatológusokkal együttműködő társszakmák képviselői esetén a kritériumrendszerek alapjainak ismerete, vagyis a fiatal korban jelentkező tartós deréktáji fájdalom, arthritis, enthesitis vagy dactylitis esetén az SpA lehetőségének felvetése, és az érintett egyének reumatológushoz irányítása.

Az axiális SpA-k kritériumrendszerének két ágán a képalotó vizsgálatok és a HLA-B27-meghatározás áll. A képalotó vizsgálatok közül a sacroiliacalis ízület röntgenvizsgálata széles körben elérhető, de a radiológiai értékelés során az esetleges eltérések osztályozása sajnos továbbra sem része a napi gyakorlatnak. A másik, a korai diagnózis szempontjából nélkülözhetetlen eljárás a sacroiliacalis ízület MRI-vizsgálata. Gyakran felmerülő probléma ezzel kapcsolatosan a hosszú várakozási idő. A sokszor feleslegesen végzett „gerincserv” kimutatását szolgáló MRI-vizsgálatok számának visszaszorításával jelentős kapacitás lenne felszabadítható a valóban terápiás következménnyel járó sacroiliacalis MRI-vizsgálatok részére. Az MRI lehetőséget teremt az axiális SpA-k korai diagnosztikájára, mivel néhány alapelv ismeretével a gyulladással elváltozások könnyen felismerhetők. A sacroileitis MRI-vel kimutatható jellegzetességeinek megismertetésében a szakmai továbbképzéseken túl a radiológus és a reumatológus napi kommunikációja is elengedhetetlen.

A HLA-B27-meghatározás széles körben való elérése szintén nélkülözhetetlen az axiális SpA-s betegek korai diagnosztikájához. Szakmai körökben gyakori tévhit, hogy a HLA-B27-meghatározás csak a transzplantációkor szokásos HLA-meghatározás részeként végezhető, igen drága eljárás. Ezzel szemben ez a vizsgálat jelzett monoklonális antitestek használatával, áramláscitóméteres eljárással is kivitelezhető, amire minden nagyobb laboratóriumban lehetőség nyílik, a meghatározást a társadalombiztosítás is támogatja.

### A beteg-orvos kapcsolat jelentősége

A korai diagnózis természetesen a hatékony kezelésnek csak a kiindulópontja. A célértékre törekvő kezelés szempontjából

nélkülözhetetlen a beteg és a gondozó orvos kölcsönös bizalmon alapuló, rendszeres, hatékony kommunikációja. A célértékre törekvő kezelés irányelveiben az „Ajánlások” nyolcadik pontja azt az alapvető követelményt mondja ki, hogy a kezelés célját a beteg és az orvos közös döntésével kell kijelölni. Ahhoz, hogy felelősen tudjon dönteni, a betegnek meg kell fogalmaznia, ki kell fejeznie elvárásait, és orvosainak tájékozottnak kell lenniük a betegek elvárásait illetően. Ezeknek magukba kell foglalniuk az ellátás minőségére vonatkozó igényeket és a kezelés eredményével kapcsolatos elvárásokat egyaránt.

A múlt évezred utolsó évtizedeiben a betegségek, ezen belül a mozgásszervi kórképek esetén is megjelent az a szemlélet, hogy a betegségek kimenetelének átfogó értékelésében a közvetlen, patológiai károsodásokon túlmenően a működőképesség, a pszichés állapot, a társadalmi részvétel és az általános jóllét hiányait, azaz a betegség teljes egyéni terhet kell figyelembe venni, és a kezelésnek valamennyi hátrány csökkentésére kell irányulnia. A leggyakoribb és legnagyobb terhet jelentő ízületi gyulladásban, a rheumatoid arthritisben (RA) vált először nyilvánvalóvá, hogy a felsorolt hiányok súlyát a betegek véleménye alapján kell meghatározni. Először az RA következtében az önellátásban és a helyváltoztatásban jelentkező hiányok mérésére fejlesztették ki tizenkét éves munkával a Health Assessment Questionnaire (HAQ) kérdőívet. A HAQ számos kiterjesztése jelent meg azóta, így a spondylitisre adaptált S-HAQ is.

Az évezred végére megnövekedett egészségügyi költségek hívták életre az egészséggazdaság tudományágát, amelynek egyik fő ága az egészségügyi döntések költségeinek és hasznosságának elemzése. Ezek számszerű vizsgálatára fejlesztették ki az egészségi állapot mérőmódszereit, az élet minőségének vizsgálatát. A legismertebb kérdőívek az amerikai Short Form-36 (SF-36) és az európai EuroQoL az egészséggel kapcsolatos elvárást 0-100, illetve 0 és 1 közötti „tarifával” jellemzik. Az RA és az SpA-k terheinek mérésére fejlesztették ki beteginterjúk módszerével a betegspecifikus életminőség-kérdőíveket (RAQoL, ASQoL, PsAQoL), amelyekben voltaképpen az aktivitás és a funkcionalitás kérdései szerepelnek. Magától értetődően, az életminőséget erősen befolyásoló bőrelváltozások (DLQI) és a gerincbetegség okozta speciális hátrányok ezek-ben a kérdőívekben kitüntetett szempontok. Joggal vetették fel a betegek által megélt hátrányok (patient reported outcomes, PRO) epidemiológus, szociológus és higiénikus kutatói [10], hogy az aktuálisan mért életminőséget a betegek tapasztalatai vagy elvárásai határozzák-e meg döntően. A minőség legegyszerűbb meghatározását követve, amely szerint a mért minőség mindig egy cél elérésének foka, az egészségi állapothoz kapcsolt életminőség (HRQoL) a betegek tapasztalatai és elvárásai közötti rés. Ez azonban egyénenként más és más, és ugyanazon személy esetében is dinamikusan változik. Ezért azonos állapotú betegek eltérő életminőséget jeleznek és viszont: az azonos

életminőséget jelzők objektív állapota is erősen különbözhet. Tehát a betegek különböző elvárásai megnehezítik a terápiás cél kijelölését.

Az SpA-s betegek megélt terheiről és kezelésük elvárt eredményeire vonatkozó elvárásairól Gossec és munkatársai az elmúlt tíz évben megjelent 20 közleményt elemeztek [11]. Megállapították, hogy a betegek a legkonkrétabb prioritásnak a zavartalan alvást, a társasági életben való teljesebb részvételt és az autózvezetés közben lehetséges hátránézést sorolták, majd körülbelül azonos súllyal igényelték a könnyebb járást, nagyobb súlyok cipelését, a könnyebb öltözködést, a székéből, ágyból való felkelést és a háztartási munka képességét [12]. A társas kapcsolatok egy intim, de lényeges eleme a szexuális élet, amelynek aktivitása a betegek jelentős százalékában csökkent. Ezt részben fizikális, részben pszichés tényezőkkel, a betegség aktivitásával, ön-bizalmuk csökkenésével, szorongásukkal, munkájuk elvesztésével hozták kapcsolatba [13].

## Betegségaktivitási paraméterek meghatározása

A betegek állapotának követése és a célértékre törekvő kezelés szempontjából ugyancsak fontos a betegségaktivitási paraméterek rendszeres meghatározása is. A napi gyakorlatban a BASDAI, perifériás arthritis esetén a DAS28 meghatározása rutinszerűen csak a biológiai terápiás kezelések mellett történik meg. Ráadásul a BASDAI meglehetősen szubjektív, nem mindig ad reális képet az axiális SpA vagy a klasszikus SPA aktivitásáról. Valamivel objektívebb az ASDAS (ankylosing spondylitis disease activity score), ennek meghatározásához a BASDAI két paraméterén túl a globális betegségaktivitást mérő vizuális analóg skála páciens általi kitöltése és a vérszejszüllyedés vagy CRP meghatározása szükséges. Az egyes paraméterek (a DAS28-hoz hasonlóan) súlyozottak az ASDAS-ban, kiszámolásához kalkulátorra van szükség, de ez interneten elérhető és könnyen használható. Szintén figyelembe kell venni a terápiás döntések meghozatalánál a betegség progressziójának mértékét, mely a képalakító eljárások mellett (elsősorban a gerinc vagy perifériás ízületek röntgenvizsgálata) magában foglalja az érintett ízületek mozgástartományának meghatározását is, melynek rendszeres felmérését legtöbbször a szakrendelők túlterheltsége korlátozza.

## Extraarticularis manifesztációk

Az SpA-k célértékre irányuló kezelésének irányelveiben továbbá visszatérő szempont a betegségcsoportra jellemző extraarticularis tünetek – a szem-, a bél- és a bőrtünetekkel való társulás – figyelembevétele. Az elülső uveitis a betegek szűk felében, manifeszt bélgyulladás a betegek 10%-ában, szub-

klínikus bélgyulladás csaknem a betegek felében, psoriasis a betegek 10–20%-ában fordul elő a betegség lefolyása során, bár nem feltétlenül egy időben. Ilyen módon a reumatológus számára diagnosztikai, prognosztikai és terápiás szempontból is fontos kérdés, hogy tisztában legyen a beteg ízületen kívüli tüneteivel is. Nem elhanyagolható az a szempont sem, hogy az SpA-k egy része szemészeti, gasztroenterológiai vagy bőrgyógyászati tünet formájában jelentkezik először, ezek kiderítése fontos lehet akkor, amikor a beteg mozgásszervi panaszokkal jelenik meg a reumatológusnál. Ebből a célból került kidolgozásra egy olyan ellenőrző lista („checklist”), melyet a beteggel való első találkozáskor, illetve aztán a betegkövetés során bizonyos időközönként kitöltve ellenőrizhető a betegség progressziója, a társszakmákkal való esetleges konzultáció szükségessége és az extraarticularis manifesztációk függvényében optimalizálható a terápia. Ez különösen annak fényében jelentős, hogy bár a SpA-k egyes tünetei a nem szteroid gyulladásgátlók, a helyileg vagy akár szisztémásan adott szteroidok, illetve a bázisterápiás készítmények alkalmazásával jó hatásokkal befolyásolhatók, az extraarticularis tünetek kezelésében ezek hatékonysága távolról sem tekinthető optimálisnak. Jelen tudásunk szerint a TNF-gátlók tekinthetők az egyedüli olyan terápiás lehetőségnek, amely a mozgásszervi és azon kívüli tünetek kezelésében egyaránt hatékony, emiatt ezen ellenőrző lista időközönkénti kitöltése valamilyen szinten szelektálni tudja azokat a betegeket, amelyek a biológiai terápia korai alkalmazásából a legtöbbet profitálhatnak. Az ezen szakértői csoport által ajánlott ellenőrző lista rövid, a három fő extraarticularis manifesztáció vizsgálatára alkalmas kérdéseket

### 1. táblázat. Az extraarticularis manifesztációkra vonatkozó szűrőkérdések

Tapasztalt-e az elmúlt egy évben vagy jelenleg is

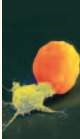
1. éjszaka is jelentkező hasmenést?
2. véres székletet?
3. perianális váladékozást/sipolyképződést?
4. a testsúly 10 százalékát elérő akaratlan fogyást?

Tapasztalt-e az elmúlt egy évben vagy jelenleg is

1. fénykerülést?
2. szemfájdalmat?
3. szempirosságot?
4. látásromlást?

Volt-e valaha vagy jelenleg is

1. bizonyított psoriasis neki vagy egyenes ági hozzátartozóinak (szülők, testvér)
2. hajás fejbőr/hajlati/feszítő felszíni pikkelyes hámlása?
3. körömbetegsége (morzsalékonyság, egyenetlenség, pöttyök, foltok bármelyike)?
4. tenyéren/talpon jelentkező hámlása?



tartalmaz. Témakörönként négy releváns kérdést javasolunk, amelyeket a társszakmákkal való konzultációk alapján választottunk ki (1. táblázat). Ezek a kérdések alkalmazhatók az ambuláns lap fixen kialakított rovataként vagy akár a rendelőben való várakozás ideje alatt rutinszerűen kitöltethetjük a beteggel, és eredményét későbbiekben rögzíthetjük a beteg dokumentációjában.

## A betegek aktív részvétele állapotuk nyomon követésében

Azon betegek számára, akik saját állapotuk folyamatos nyomon követésében szeretnének részt venni, ingyenes mobiltelefonos alkalmazás is rendelkezésükre áll SAPKA néven, mind android, mind iOS platformra. Az alkalmazással a betegek naponta rögzíthetik az SpA-val kapcsolatos panaszait és tüneteiket, azaz, hogy az adott napon milyen volt a nyaki, háti, csípőtáji fájdalom mértéke, az általános állapotuk, az ízületi panaszok testtájuk szerinti eloszlása, a reggeli gerincmerevség mértéke, hogyan alakult a munkavégző képességük, valamint szükségük volt-e kiegészítő fájdalomcsillapítóra, hogy előírászerűen alkalmazták-e az orvos által az SpA kezelésére rendelt gyógyszereket. A program segítségével ezek az adatok a kezelőorvosnak összesített formában – grafikonok és diagramok segítségével – megmutathatók. Ezáltal a kezelőorvos azonnal áttekinthető képet kap a betegség és a beteg állapotáról, betegségének aktivitásáról egy meghatározott időszakot tekintve, aki így hatékonyabban tudja a terápiát módosítani, amennyiben az szükséges.

## Összegzés

Bár az SpA-k célértékre törekvő kezelése éppen az aktivitási paraméterek mérsékeltbb objektivitása miatt korlátozottabb, mint pl. a reumatoid arthritis esetén, de az ajánlások figyelembevételével az SpA-k által okozott betegségterhek jelentősen csökkenthetők. Remélhetően a közeljövőben klinikai vizsgálatok is igazolják a „treat-to-target” elvek alkalmazásának létjogosultságát ebben a betegcsoportban is, különös tekintettel a módszer eredményességét a betegségkimenetel szempontjából.

## IRODALOM

[1] Rudwaleit M, Landewé R, van der Heijde D, et al: The development of Assessment of SpondyloArthritis international Society classification criteria for axial spondyloarthritis (part I): classification of paper patients by expert opinion including uncertainty appraisal. *Ann Rheum Dis* 2009; 68: 770-6.

[2] Rudwaleit M, van der Heijde D, Landewé R, et al: The development of Assessment of SpondyloArthritis international Society classification criteria for axial spondyloarthritis (part II): validation and final selection. *Ann Rheum Dis* 2009; 68: 777-83.

[3] Rudwaleit M, van der Heijde D, Landewé R, et al: The Assessment of SpondyloArthritis International Society classification criteria for peripheral spondyloarthritis and for spondyloarthritis in general. *Ann Rheum Dis* 2011; 70: 25-31.

[4] Kiltz U, Baraliakos X, Karakostas P, et al: Do patients with non-radiographic axial spondylarthritis differ from patients with ankylosing spondylitis? *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2012; 64: 1415-22.

[5] Sieper J, van der Heijde D, Dougados M, et al: Efficacy and safety of adalimumab in patients with non-radiographic axial spondyloarthritis: results of a randomised placebo-controlled trial (ABILITY-1). *Ann Rheum Dis* 2013; 72: 815-22.

[6] Zochling J, van der Heijde D, Burgos-Vargas R, et al: 'Assessment in AS' international working group; European League Against Rheumatism: ASAS/EULAR recommendations for the management of ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2006; 65: 442-52.

[7] Gossec L, Smolen JS, Gaujoux-Viala C, et al; European League Against Rheumatism: European League Against Rheumatism recommendations for the management of psoriatic arthritis with pharmacological therapies. *Ann Rheum Dis* 2012; 71: 4-12.

[8] Ritchlin CT, Kavanaugh A, Gladman DD, et al; Group for Research and Assessment of Psoriasis and Psoriatic Arthritis (GRAPPA): Treatment recommendations for psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis* 2009; 68: 1387-94.

[9] Smolen JS, Braun J, Dougados M, et al: Treating spondyloarthritis, including ankylosing spondylitis and psoriatic arthritis, to target: recommendations of an international task force. *Ann Rheum Dis* 2014; 73: 6-16.

[10] Carr AJ, Gibson B, Robinson PG: Measuring quality of life – is quality of life determined by expectations or experience? *Brit Med J* 2001; 322: 1240-43.

[11] Gossec L, Berenbaum F, Chauvin P, et al: Reporting patient-perceived impact of rheumatoid arthritis and axial spondylarthritis over 10 years: a systematic literature review. *Rheumatology online* March 6 2014; 10.1093/rheumatology/ket48.

[12] Dagfinrud H, Kjekshus I, Mowinckel P, et al: Impact of functional impairment in ankylosing spondylitis: impairment, activity limitation and participation restriction *J Rheumatol* 2005; 32: 516-23.

[13] Healey EL, Haywood KL, Jordan KP, et al: Ankylosing spondylitis and its impact on sexual relationships. *Rheumatology* 2009; 48: 1378-81.

[14] D Elewaut, Matucci-Cerinic M: Treatment of ankylosing spondylitis and extra-articular manifestations in everyday rheumatology practice. *Rheumatology (Oxford)*. 2009; 48: 1029-35.

[15] Wendling D, Prati C, Demattei C, et al: Impact of uveitis on the phenotype of patients with recent inflammatory back pain: data from a prospective multicenter French cohort. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2012; 64: 1089-93.

(Dr. Szántó Sándor, Debreceni Egyetem, Klinikai Központ, Belgyógyászati Intézet, Reumatológiai Tanszék, 4032 Debrecen, Nagyerdő krt 98., e-mail: szanto.sandor@med.unideb.hu)

# Methotrexatkezelés rheumatoid arthritiszben: még mindig van új a Nap alatt ...

SZEKANECZ ZOLTÁN

Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar, Reumatológiai Tanszék, Debrecen

Nem kétséges, hogy a methotrexat (MTX) a rheumatoid arthritis (RA) igen hatékony gyógyszere, a bázisterápia arany standardja. Nyilvánvaló azonban, hogy a gyógyszer csak akkor hatékony, ha az orvos felírja és a beteg beszedi. E tekintetben a biohasznosulás és az adherencia kérdése kiemelten fontos. Újabb adatok arra utalnak, hogy a parenteralis bevétel jelentősen javítja a biohasznosulást a tablettás formával szemben. Az MTX-adherencia a bázisterápiás kezelés mellett a biológiai terápia szempontjából is fontos. A legtöbb biologikum esetében ugyanis kötelező az MTX-szel való kombináció. Az MTX-szedés elmulasztásának nemcsak orvos szakmai, hanem komoly financiai következményei is lehetnek. A vörösvértest-térfogat meghatározásán túl a ma ismert legmegbízhatóbb módszer az MTX-poliglutamát (MTXPG) mérése. Az MTXPG mennyisége egyrészt a hatékonyságot jelzi, másrészt ezzel monitorozható az adherencia is. A subcutan MTX jobban növeli az MTX-poliglutamációt, mint a hagyományos orális adagolás.

**Kulcsszavak:** rheumatoid arthritis, bázisterápia, methotrexat, biohasznosulás, adherencia, orális, parenteralis, subcutan, poliglutamát

## METHOTREXATE TREATMENT IN RHEUMATOID ARTHRITIS: WHAT IS NEW UNDER THE SUN?

There is no doubt that methotrexate (MTX) is a very effective treatment in rheumatoid arthritis (RA), the gold standard of disease-modifying drugs. It is evident that the drug is only effective, if the doctor prescribes it and the patient regularly consumes it. Therefore bioavailability and adherence are very important issues. Recent data have confirmed that parenteral (subcutaneous, sc) administration of MTX yields better bioavailability. Adherence to MTX is also important during biological therapy. Most biologics should be administered in combination with MTX. Skipping MTX would hamper the efficacy of biologics leading to both medical and financial consequences. Beyond the determination of erythrocyte mean corpuscular volume (MCV), today the most trusted laboratory method is the assessment of methotrexate polyglutamates (MTXPG). MTXPG amounts have been related to MTX efficacy, moreover, one can determine adherence to MTX by measuring red blood cell MTXPG content. SC MTX may increase MTXPG levels in comparison to the traditional oral administration.

**Keywords:** rheumatoid arthritis, disease-modifying drugs, methotrexate, bioavailability, adherence, oral, parenteral, subcutaneous, polyglutamate

## Bevezetés

A methotrexat (MTX) még ma, a célzott (biológiai) terápia korában is a rheumatoid arthritis (RA) terápiajének sarokköve [1, 2]. Az egyértelmű hatékonyság mellett az utóbbi években előtérbe került az adherencia, illetve a hatékonyság fokozásának kérdése. Mindez felveti, hogy a napi gyakorlatban különbséget kell tennünk a hagyományos orális és a parenteralis (subcutan vagy intramuscularis) adagolás között [1–3]. Jelen közleményben kitérünk az MTX-biohasznosulás és -adherencia kérdéskörében megjelent újabb adatokra, amelyek az alkalmazás módjával is szorosan összefüggenek.

## Biohasznosulás

Orális MTX-adagolás esetén magasabb (>15 mg/hét) dózisok esetén a gastrointestinalis felszívódás limitálja a gyógyszer biohasznosulását [3]. Az orális MTX felszívódása és hasznosulása egyénenként változik, és magasabb dózisok esetén csökken [3–5]. Az orális MTX egyéb általános mellékhatásai, mint a nausea, hányás, szintén korlátozzák az optimális hasznosulást [5].

Mindezeket figyelembe véve a közelmúltban Schiff és mtsai egy 8 hetes, nyílt, fázis II vizsgálatban elemezték az orális és subcutan (sc) MTX biohasznosulását [3]. Felnőtt RA-s



betegeket kezeltek legalább 3 hónapig. Összesen 49 beteget vontak be, és végül 47 komplettálta a vizsgálatot. Az indukálaskor minden beteg orális MTX-kezelésben részesült (13 beteg 10 mg/hét, 12 beteg 15 mg/hét, 12 beteg 20 mg/hét és 12 beteg 25 mg/hét adagban). Ezt követően minden beteg ugyanilyen dózisban egy adag MTX tablettát, ezt követően egy adag sc. MTX-et a hasfalba, majd egy adag sc. MTX-et a combba kapott. A sc. adagolás egy, az FDA által befogadott autoinjektorral történt. A sc. dózisok megegyeztek azzal az orális adaggal, amit a beteg a vizsgálat kezdetén egyébként kapott. Az egy-egy adag beadása előtt és azt követően negyed, fél, háromnegyed, egy, egy és negyed, másfél, egy és háromnegyed, majd 2, 4, 6, 8, 10, 12 és 24 órával vért vettek farmakokinetikai (PK) vizsgálatra. Minden betegnél felvették a koncentrációs görbét és a görbe alatti területet (AUC, ng·h/ml) vették alapul.

Az autoinjektorral sc. adott MTX görbe AUC (0–24 h) értékei minden MTX-dózis esetében magasabbak voltak, mint orális adagolás esetén. Ráadásul az orális MTX görbe 15 mg/hét adag fölött platófázisba került, míg a sc. adagolás esetén plató nem alakult ki. Mindez azt jelzi, hogy lényegében nem sok értelme van orális MTX esetén a dózist 15 mg/hét fölé emelni, mert ezzel a biohasznosulás nem nő tovább. Ezzel szemben sc. MTX-adagolás esetén a biohasznosulás 15 mg/hét dózis fölött is lineárisan, dózisarányosan tovább növekszik, legalább 25 mg/hét dóziséig. A dózisemeléssel nem észleltek több mellékhatást sem. Ezek az adatok megerősítik, hogy nagyobb (>15 mg/hét) MTX-dózisoknál az orálisról parenteralis adagolásra váltással a biohasznosulás tovább növelhető, és az orális adagolás mellett jelentkező, a gastrointestinalis felszívódásból és mellékhatásokból adódó gátak áttörhetőek.

## Adherencia

A közelmúltban a hazai arthritiscentrumokban az OEP által több mint 900 RA-s betegen végzett reprezentatív felmérés az MTX-adherencia tekintetében lesújtó volt. Nemzetközi megfigyelésekkel összhangban a biológiai terápia mellett egyébként kötelező MTX-adagolás a betegek mindössze egyharmadában valósul meg [6]. Az esetek egy részében a kezelőorvos nem rendel MTX-et a biológiai terápia mellé, pedig tudjuk, hogy az MTX együtt adása a legtöbb biológikum esetében kötelező, és mindegyik biológikum esetében egyértelmű, hogy a kombinációs kezelés hatékonyabb a biológiai monoterápiánál [1, 6, 7]. Az is előfordul, hogy a kezelőorvos által felírt MTX-et a beteg nem szedi be.

Nagyon fontos ezért az MTX-adherencia monitorozása, hiszen több millió forintos kezelések válhatnak hatástalanná, ha a biológikumot monoterápiában adjuk. A receptfelírás megtörténte vagy elmaradása az OEP által jól monitorozható, ugyanis a felírt recept megjelenik az adatbázisban. Így követ-

hető és ellenőrizhető, hogy a biológiai terápia rendelése idején történt-e egyidejű MTX receptfelírás.

A felírt gyógyszer be nem szedését azonban nagyon nehéz felismerni, hiszen a betegek ezt az esetek jelentős részében nem vallják be. Ezért érdemes röviden áttekinteni az MTX-szedés monitorozására alkalmas laboratóriumi módszereket.

Egyszerűbb, de kevésbé fontos módszer a vörösvértestek térfogatának (mean corpuscular volume, MCV) követése. Az MCV-t a vérképlet általában tartalmazza, így olcsó eljárás. Ismeretes, hogy az MTX szedése folsavdeplécióval és következményes megaloblastos vérvépzéssel jár. Ennek egyik első jele az MCV-érték növekedése, kezdetben a normáltartományon belül. A mérsékelt macrocytosis az MTX hatását jelzi, a jelentősebb érték már MTX toxicitást jelez [8]. Tehát ha a betegnek van kiindulási, az MTX szedését megelőző MCV-értéke, akkor e paraméter növekedése azt jelzi, hogy a beteg valószínűleg szedi a gyógyszert. Az MCV használatát az is korlátozza, hogy az MTX-et kapó betegek többsége folsavszupplementációban részesül, ami természetesen normalizálhatja az MCV-t is [9].

A ma legtöbb helyen elfogadott módszer az MTX-poli-glutamátok (MTXPG) meghatározása. Az MTX-hez glutaminsavmaradékok kötődnek, és így az MTX MTXPG-vé alakul. A poliglutamáció növeli az MTX intracelluláris retencióját és hatékonyságát is. Mivel a vörösvértestek MTXPG-tartalma összefügg az MTX hatékonyságával, sokan javasolják az MTXPG rutinszerű meghatározását, amellyel a gyógyszer bevitelét és az adherenciát is monitorozni lehet [10–13]. A mérés nehézkessége, a sokféle módszer azonban nehezíti az MTXPG rutinszerű mérésének bevezetését. Korábban két alapvető módszer terjedt el, a szenzitív radiokémiai ligandkötési assay és egy enzimikus assay [14]. Mivel az előbbi időigényes, az utóbbi pedig alacsony specificitású módszer, ma inkább a HPLC-vel történő meghatározást ajánlják [10, 14]. Mások a tömegspektrometriát részesítik előnyben [12]. Az MTXPG-tartalmat számos tényező, így a kor, MTX-dózis, vesefunkció, dohányzás befolyásolhatják [10].

Speciális terület a biológikumok elleni antitestek (anti-drug antibodies, ADA) kérdése. Ismeretes, hogy az antitest típusú biológiai szerek ellen neutralizáló ADA termelődik, amely csökkenti a gyógyszer szintet és a biológikumok hatékonyságát. MTX együtt adásával az ADA-termelés csökkenthető, és a drága biológikum hatása elnyújtható. Újabb adatok arra utalnak, hogy az ADA-termelés is összefügghet az MTX-poli-glutamációval. Egy friss vizsgálatban az alacsonyabb infliximabszinteket és az ADA-termelést a vörösvértestek alacsonyabb MTXPG-tartalmával hozták összefüggésbe: a 25 nmol/l feletti MTXPG-szint esetében az ADA-termelés valószínűsége ötször alacsonyabb volt, és 50 nmol/l felett egyetlen betegben sem alakult ki ADA [15].

A közelmúltban vizsgálták az orális és parenteralis MTX-adagolás hatását az MTXPG-re. Orálisról sc. MTX-re váltást kö-

vetően szignifikánsan megnőtt a vörösvértestek hosszú láncú MTXPG-tartalma. Az optimálisan magas szint 6 hónapos kezelés után alakult ki. Az MTXPG-tartalom emelkedése korrelált a betegségaktivitás csökkenésével, tehát ez a vizsgálat is alátámasztotta, hogy az MTX-poliglutamáció az egyik folyamat, amelynek révén az MTX fokozott terápiás hatást vált ki [11]. Úgy tűnik, a sc. MTX-adagolás a poliglutamáció fokozása révén is fokozott hatékonysághoz vezet.

A jövőben tehát érdemes lenne hazánkban is megfontolni az MTXPG meghatározását HPLC-módszerrel, ugyanis a magasabb tartalom egyrészt fokozott hatékonyságot jelez, másrészt pedig annak emelkedése jelzi, hogy a beteg valóban szedi a gyógyszert [13].

Összegezve, a biohasznosulás és adherencia igen fontos kérdések, amelyek megszabják az MTX hatékonyságát, közvetve az igen drága biológikumok hatásosságát is. Bizonyos biomarkerek, mint pl. az MTXPG mérésével megbízhatóan követni lehet, hogy a beteg szedi-e a rendelt MTX-et. Ennek az orvos szakmai okok mellett financiai szempontjai is lehetnek (pl. a drága biológiai terápia mellett kötelezően rendelt MTX szedésének elmulasztása).

**Köszönetnyilvánítás.** A munka a TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 azonosító számú „Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése konvergencia program” című kiemelt projekt keretei között valósult meg.

## IRODALOM

- [1] Smolen JS, Landewe R, Breedveld FC, et al: EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2013 update. *Ann Rheum Dis* 2013; 73: 492-509.
- [2] Gaujoux-Viala C, Nam J, Ramiro S, et al: Efficacy of conventional synthetic disease-modifying antirheumatic drugs, glucocorticoids and tofacitinib: a systematic literature review informing the 2013 update of the EULAR recommendations for management of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2014; 73: 510-5.
- [3] Schiff MH, Jaffe JS, Freundlich B: Head-to-head, randomised, crossover study of oral versus subcutaneous methotrexate in patients with rheumatoid arthritis: drug-exposure limitations of oral methotrexate at doses  $\geq 15$  mg may be overcome with subcutaneous administration. *Ann Rheum Dis* 2014; 73: 1549-51.
- [4] Hamilton RA, Kremer JM: Why intramuscular methotrexate may be more efficacious than oral dosing in patients with rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1997; 36: 86-90.
- [5] Hoekstra M, Haagsma C, Neef C, et al: Bioavailability of higher dose methotrexate comparing oral and subcutaneous administration in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2004; 31: 645-8.
- [6] Laki J, Székelyné Monók, G: Biológiai terápia 2006-2010. Elemzés. Országos Egészségbiztosítási Pénztár. [http://www.oep.hu/pls/portal/docs/PAGE/SZAKMA/OEPHUSZAK\\_EUSZOLG/TIBI%20EGY%20C3%89B/SZAKMAI%20ELLEN%20C5%90RZ%20%89S/BIOL\\_TH\\_2006\\_2010\\_PUBLIKUS4.PDF](http://www.oep.hu/pls/portal/docs/PAGE/SZAKMA/OEPHUSZAK_EUSZOLG/TIBI%20EGY%20C3%89B/SZAKMAI%20ELLEN%20C5%90RZ%20%89S/BIOL_TH_2006_2010_PUBLIKUS4.PDF) 2012.
- [7] Reumatológiai és Fizioterápiás Szakmai Kollégium: Az arthritisek kezelése szintetikus és biológiai betegségmódosító gyógyszerekkel. *Immunol Szemle* 2011; III: 26-41.
- [8] Weinblatt ME, Fraser P: Elevated mean corpuscular volume as a predictor of hematologic toxicity due to methotrexate therapy. *Arthritis Rheum* 1989; 32: 1592-6.
- [9] Kirby B, Lyon CC, Griffiths CE, Chalmers RJ: The use of folic acid supplementation in psoriasis patients receiving methotrexate: a survey in the United Kingdom. *Clin Exp Dermatol* 2000; 25: 265-8.
- [10] Stamp LK, O'Donnell JL, Chapman PT, et al: Determinants of red blood cell methotrexate polyglutamate concentrations in rheumatoid arthritis patients receiving long-term methotrexate treatment. *Arthritis Rheum* 2009; 60: 2248-56.
- [11] Stamp LK, Barclay ML, O'Donnell JL, et al: Effects of changing from oral to subcutaneous methotrexate on red blood cell methotrexate polyglutamate concentrations and disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2011; 38: 2540-7.
- [12] de Rotte MC, den Boer E, de Jong PH, et al: Methotrexate polyglutamates in erythrocytes are associated with lower disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2013; Epub 2013 Dec 5.
- [13] Danila MI, Hughes LB, Brown EE, et al: Measurement of erythrocyte methotrexate polyglutamate levels: ready for clinical use in rheumatoid arthritis? *Curr Rheumatol Rep* 2010; 12: 342-7.
- [14] Dervieux T, Orentas Lein D, Marcelletti J, et al: HPLC determination of erythrocyte methotrexate polyglutamates after low-dose methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Chem* 2003; 49: 1632-41.
- [15] Dervieux T, Weinblatt ME, Kivitz A, Kremer JM: Methotrexate polyglutamation in relation to infliximab pharmacokinetics in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2013; 72: 908-10.

(Dr. Szekanecz Zoltán, Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar, Reumatológiai Tanszék, 4012 Debrecen, Nagyterdei körút 98. E-mail: szekanecz.zoltan@med.unideb.hu)

# 90%

TB-támogatás\*

- rheumatoid arthritis\*
- arthritis psoriatica\*
- psoriasis\*
- idiopathiás juvenilis arthritis
- Crohn-betegség indikációkban

# Metoject®

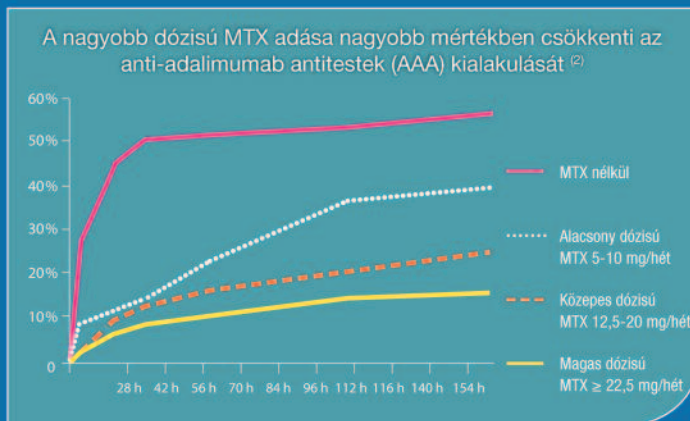
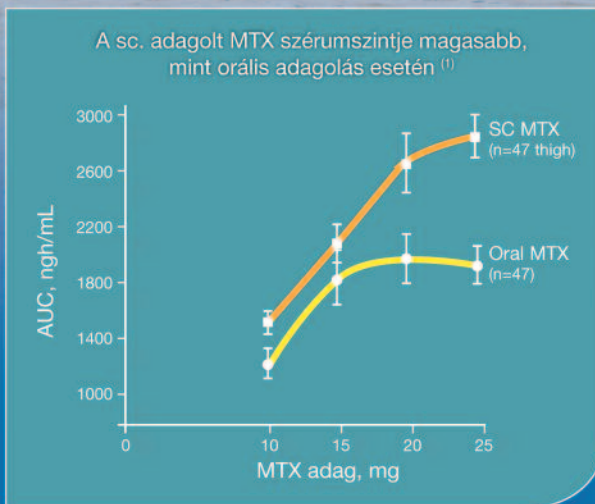
## 50 mg/ml metotrexát oldatos injekció előretöltött fecskendőben

## Innováció a rheumatoid arthritis kezelésében

### merev tűvédő kupakkal



### különleges tűhegy kialakítással



### Árak, támogatások

Metoject* 50 mg/ml oldatos injekció előretöltött fecskendőben	Nagykereskedelmi (kórházi) ár	Fogyasztói ár	Támogatás mértéke (Eu. 90% 14/a. pont)	Tértési díj
<b>1x0,3 ml (15 mg)</b>	<b>3915 Ft</b>	<b>4851 Ft</b>	<b>4366 Ft</b>	<b>485 Ft</b>
<b>1x0,4 ml (20 mg)</b>	<b>5220 Ft</b>	<b>6468 Ft</b>	<b>5821 Ft</b>	<b>647 Ft</b>
<b>1x0,5 ml (25 mg)</b>	<b>6525 Ft</b>	<b>7891 Ft</b>	<b>7102 Ft</b>	<b>789 Ft</b>

<sup>1</sup> M.H. Schiff et al. Head-head, randomised, crossover study of oral versus subcutaneous methotrexate in patients with rheumatoid arthritis: drug exposure limitations of oral methotrexate at doses ≥15mg may be overcome with subcutaneous administration Ann Rheum Dis 2014; doi:10.1136/annrheumdis-2014-205228

<sup>2</sup> Kriekart CLM Ann. Rheum. Dis. 2012.

### Metoject 50 mg/ml oldatos injekció előretöltött fecskendőben rövidített alkalmazási előírás

**Hatóanyag:** 15/20/25 mg metotrexát (metotrexát-dinátrium formájában) 0,3/0,4/0,5 ml oldatot tartalmazó előretöltött fecskendőnként. **Terápiás javallatok:** felnőtt betegek aktív rheumatoid arthritisre; idiopathiás juvenilis arthritis polyarthritis és elhúzódó oligoarthritis formái, ha a nem-szteroid gyulladásgátló gyógyszerekre (NSAID-okra) adott válasz elégtelen; súlyos, makacs, rokkantságot okozó psoriasis, amely nem reagál megfelelően más típusú gyógymódokra, például fényterápiára, PUVA kezelésre és retinoidokra, valamint súlyos arthritis psoriatica felnőtt betegek esetében, és enyhe-középsúlyos Crohn-betegség, monoterápiában vagy kortikoszteroidokkal kombinálva, thiopurinokra rezisztens vagy azoknak nem toleráló felnőtt betegek esetében. **Adagolás:** A javasolt kezdő adag 7,5 mg metotrexát hetente egyszer subcutan alkalmazva. A betegség egyénenként változó aktivitásától, illetve attól függően, hogy a beteg mennyire tolerálja, az adag fokozatosan, heti 2,5 mg-mal emelhető, azonban a heti adag nem haladhatja meg a 25 mg-ot. A 20 mg/hét dózist meghaladó adagolásban történő kezelés hatására azonban jelentősen nő a toxicitás, különösen a csontvelő szuppresszió mértéke. Terápiás válasz általában körülbelül 2-6 hét elteltével várható a kezelésre. A kívánt terápiás hatás elérése után az adagot fokozatosan kell a legalacsonyabb, még hatékony fenntartó adag szintjére csökkenteni. Crohn-betegségben indukciós kezelés: 25 mg hetente egyszer, fenntartó kezelés: 15 mg hetente egyszer. Terápiás válasz körülbelül 8-12 hét elteltével várható. Veseelégtelenségben, illetve májkárosodásban szenvedő, valamint idős betegeknél az adagolás eltérhet. **Az alkalmazással kapcsolatos tudnivalók:** A Metoject-et kizárólag a gyógyszerkészítmény különböző tulajdonságait és hatásmechanizmusait jól ismerő orvos írhatja fel, és szakosan egészségügyi szakemberek adhatják be. Ha a klinikai helyzet megengedi, a kezelőorvos bizonyos esetekben átruházhatja a subcutan alkalmazás feladatát magára a betegre, ilyen esetekben az orvos köteles ellátni a beteg részletes alkalmazási utasításokkal. Hetente egyszer alkalmazandó. A kezelés teljes időtartamát az orvos határozza meg. Az idioszinkráziás túlérzékenységi reakciók kizárása érdekében a metotrexát első adagjának beadását követően a beteg szigorú megfigyelés alatt kell tartani. **Ellenjavallatok:** A készítmény bármely összetevőjével szembeni ismert túlérzékenység, súlyos májelégtelenség, alkoholizmus, súlyos májelégtelenség, meglévő vér dyscrasiák, így például csontvelő hipoplázia, leukopenia, trombocitopenia vagy jelentős anémia, súlyos akut vagy krónikus fertőzések, például tuberkulózis és HIV-fertőzés, szájfekély, illetve ismert, aktív gasztritisztől függően, terhesség, szoptatás, élő vakcinákkal történő oltás, immunhiányos szindrómák. **Figyelmeztetés:** A kezelésben részesülő betegeket megfelelő megfigyelés alatt kell tartani, mivel így az esetleges toxikus hatások vagy mellékhatások észlelésére és értékelésére a lehető legrövidebb időn belül kerülhet sor. Ezért a metotrexát kizárólag az antimetabolitokkal történő kezelési technikában jártas és tapasztalt szakorvos, illetve szakápoló által vagy annak felügyelete mellett alkalmazható. A súlyos vagy akár halálos kimenetelű toxikus reakciók lehetsége miatt a betegek részére teljes körű tájékoztatást kell nyújtani a kezelés kockázataival és a javasolt óvintézkedésekkel kapcsolatban. 3 év alatti gyermekek esetében nem javasolt a készítmény alkalmazása. **Gyógyszerkölcsönhatások:** A metotrexát mellékhatásait fokozhatják a következők: alkohol, hepatotoxikus gyógyszerek, hematotoxikus gyógyszerek, egyes antibiotikumok, nagy plazmaférézis kötődésű gyógyszerkészítmények, probenecid, gyenge szerves savak, pirazolok és nem-szteroid gyulladáscsökkentők, csontvelő károsító gyógyszerkészítmények, folsavhiányt okozó gyógyszerkészítmények, protonpumpa-gátlók, koffeint vagy teocillint tartalmazó italok. A folsavat, folsavat vagy származékaikat tartalmazó vitaminok, vagy egyéb készítmények csökkenthetik a metotrexát hatékonyságát. **Mellékhatások:** A legfontosabb mellékhatás a vérképzőrendszer szuppressziója és a gasztritisztől függően a rendellenességek. Ezen kívül előfordulhatnak még a bőr és a bőr alatti szövet betegségei és tünetei, anyagcsere- és táplálkozási, idegrendszeri, szem- és szemészeti, máj- és epe-, szív- és ér-, légzőrendszeri, mellkasi és mediastinális, nyirokrendszeri, vese- és húgyúti, a nemi szervekkel és az emlőkkel kapcsolatos valamint a csont- és izomrendszer és a kötőszövet betegségei és tünetei, illetve jó-, rosszindulatú és nem meghatározott daganatok, valamint általános tünetek, és az alkalmazás helyén fellépő reakciók. **Csomagolás:** 0,3/0,4/0,5 ml oldatot tartalmazó 1 db előretöltött fecskendő, ráerősített s.c. injekciós tűvel, alkoholos törölték dobozban. OGYI-T-20087/08-10. **Megjegyzés:** A gyógyszer felírása előtt kérjük, hogy olvassa el a teljes alkalmazási előírást! (OGYI/43191/2012, 2014, 09.09.)

# A methotrexatkezelés finomhangolása: nagyobb adagok, parenteralis bevétel – EULAR 2014

HODINKA LÁSZLÓ

Országos Reumatológiai és Fizioterápiás Intézet

A rheumatoid arthritis (RA) amerikai (ACR) és európai (EULAR) kezelésének irányelvei egyértelműen kijelölik a methotrexat (MTX) helyét a terápiás stratégiákban: elsőként választandó betegségmódosító gyógyszer. Az irányelvek azonban a hatásosság és biztonságosság kontextusában nem említik a parenteralis MTX-kezelés lehetőségéből származó előnyöket. A közlemény az ez évi EULAR kongresszus gazdag anyagából azokat a prezentációkat emeli ki, amelyek az MTX bevételi módjával kapcsolatos kérdéseket vizsgálták. A bemutatott prezentációk szerint a kezdő heti MTX-adagot minél hamarabb 20 mg vagy 0,3 mg/tskg értékre vagy a fölé kell emelni (ha az alacsonyabb adag nem hoz remissziót). A parenteralis MTX-terápia hatásosabb és biztonságosabb, a nagyobb hatás éveken át fennmarad. Biztonságossági profilja általában nem rosszabb a per os adagolás során tapasztaltnál, gyomor-bél rendszeri mellékhatása kevesebb. A parenteralis MTX monoterápiát a betegek kevesebb, mint felénél kell megváltoztatni. A nagyobb adagú, illetve a parenteralisan adott MTX nagyobb biológiai hasznosulása magyarázza a kedvezőbb kimenetelt. Összegezve: az RA nagyobb adagú parenteralis MTX-szel végzett kezelése jobb kimenetelt biztosít a per os kezeléssel elérhetőnél.

**Kulcsszavak:** rheumatoid arthritis, parenteralis methotrexatkezelés, hatásosság, biztonságosság

METHOTREXATE TREATMENT FINE TUNING: HIGHER DOSES, PARENTERAL ADMINISTRATION – EULAR 2014

European and American (EULAR and ACR) guidelines for the treatment of rheumatoid arthritis (RA) clearly define the position of methotrexate (MTX) in the treatment strategies. However, advantages of parenteral MTX administration are not mentioned within the context of efficacy and safety and therefore presentations from the 2014 EULAR Congress focusing these aspects have been selected. According to these reports the recommended initial weekly MTX doses are at least 20 mg or 0,3 mg/kg body weight. Parenteral MTX therapy results in better and longer lasting efficacy and safety profile is not inferior to that of peroral administration, moreover gastrointestinal unwanted effects are less frequent. Parenteral MTX administration remain unchanged at more than half of the treated. Better outcomes are explained by the better bio-availability of parenterally administered MTX.

**Keywords:** rheumatoid arthritis, parenteral administration, efficacy, safety

A rheumatoid arthritis kezelésének (RA) amerikai (ACR) és európai (EULAR) irányelvei egyértelműen kijelölik a methotrexat (MTX) helyét a terápiás stratégiákban: elsőként választandó betegségmódosító gyógyszer. Hatásos adagban adandó (heti 25–30 mg adagban a megfelelő hatás kialakulásáig, illetve a tolerálhatóság határáig), heti 5 mg folsavval együtt. A beteg válaszképességét a kezdeti betegségaktivitástól függően (2-3 havonta) monitorozni kell, nem kielégítő hatás esetén más szintetikus vagy biológiai gyógyszerrel kell kombinálni, toxicitás esetén jön szóba más szintetikus vagy biológiai monoterápia vagy kombináció. Az MTX-kezelés elvei alkalmazhatók az arthritis psoriatica perifériás formáiban, azonban a tisztán axiális spondylarthropathiákban hatása marginális. Az irányelvek azonban a hatásosság és biztonsá-

gosság kontextusában nem említik a parenteralis MTX-kezelés lehetőségéből származó előnyöket. Ezért emeltük ki az ez évi EULAR kongresszus gazdag anyagából azokat a prezentációkat, amelyek a MTX adagolásának a bevétel módjával kapcsolatos kérdéseit vizsgálták. A MTX „anchor (horgony) drug” pozíciójából következik talán, hogy a 2014-es EULAR számtalan témaköre közül csupán egy foglalkozott a szintetikus betegségmódosító gyógyszerekkel, és az 522 előadás, 726 poszter és 1136 csak absztrakt közül alig néhány tárgyalta a MTX-kezelés finomabb árnyalatait. Ezek az adagolás megválasztása és a parenteralis adás előnyei tekintetében alátámasztják, illetve kiegészítik a megújított EULAR ajánlásokat.

## Ajánlott adagolás és a hatásosság

Gaujoux-Viala és négy francia egyetemi centrumot képviselő munkatársai az ESPOIR korai arthritis betegcsoport (DMARD-naiv, fél éven belül legalább két gyulladt ízület) azon betegeinél, akik teljesítették az RA 2010. évi ACR/EULAR kritériumait (600 beteg), MTX-kezelést indítottak [1]. Kétéves követés után visszatekintve, a betegeket két csoportban értékelték az MTX-kezelés feltételezett optimuma szerint. Optimálisan kezeltnek vették azokat, akiknél 4 hónapon belül legalább 10 mg/hét kezdő adaggal indították az MTX-et és ha fél éven belül nem érték el a DAS28 remissziós határt (2,6), az MTX adagját legalább heti 20 mg vagy 0,3 mg/tskg eléréséig emelték. A remissziók arányát, a funkcionális stabilitást (HAQ 0,5 pont alatt vagy legalább 0,25 pont csökkenés) és a radiológiai progresszió hiányát (Sharp-pont romlása kevesebb, mint 1) értékelték egy és két év megfigyelés után. Az MTX-kezelés indításának ideje (1, 3 vagy 4 hónappal az első vizsgálat után) nem befolyásolta a hatásosságot, az „optimális” csoport valamennyi értéke jobb volt azonban az alacsonyabb adagokat kapott betegekenél. *Ajánlásuk szerint a kezdő heti MTX-adagot minél hamarabb 20 mg vagy 0,3 mg/tskg értékre vagy a fölé kell emelni (ha az alacsonyabb adag nem hoz remissziót).*

Szintén korai RA-s betegeken (45 beteg) vizsgálta egy török munkacsoport a 12 mg/hét és 25 mg/hét kezdő MTX-adag hatásossága közötti különbséget [2]. Az első négy hétben parenteralisan kapták a gyógyszert, majd 12,5 mg/heti, napi 2 g sulfasalazinnal és 5 mg prednisonnal kiegészített dózist kaptak per os. *A DAS28 (CRP) komponenseket, a reggeli ízületi merevség időtartamát és a HAQ funkcionális pontszámot három hónapos kezelés után értékelték, és valamennyit a magas kezdő MTX-adagú betegeken találtak jobbnak. Ezenkívül ebben a csoportban ritkábban kellett más stratégiát választani.*

## A parenteralis MTX hatásosabb a per os adottnál

Egy másik török munkacsoport azt vizsgálta 80 RA-s betegen, hogy a gyomor-bél rendszeri mellékhatások kivédése vagy megelőzése miatt per os bevitel helyett subcutan injekcióban adott MTX csökkenti-e a gyulladási aktivitást [3]. A DAS28 komponenseket és a fájdalom vizuális analóg skálán jelölt értékét egy és három hónappal az átváltás után mérték újra. A kiinduló pontszámok szignifikánsan csökkentek, és a gyomor-bél rendszeri mellékhatások 76 beteg közül 49-nél megszűntek. *Következtetésük: a parenteralisan adott MTX hatásosabb és kevésbé okoz gyomorpanaszokat.*

Hammond és munkatársai reumatológiai centrumokban 2003 és 2011 között száz MTX-szel kezelt RA-s betegüket

értékelve vizsgálták ugyanezt a kérdést. Közöttük 49 olyan beteg volt, akiknél nem kielégítő válasz (29) vagy mellékhatás jelentkezése (20) miatt váltottak per os MTX-kezelésről subcutan methotrexatinjekciókra. Az átváltás után a két csoportban a DAS28 index átlagosan 1,26, illetve 1,05 pontot javult, a betegek 24, illetve 40%-a érte el az alacsony aktivitási szintet (3,2 DAS28 pont alatt) és 7, illetve 30%-uk került remisszióba (DAS28 2,6 pont alatt). A javulás tartósnak bizonyult, átlagosan 35, illetve 29 hónap után kellett a MTX monoterápiát kiegészíteni [4]. *Következtetésük: a parenteralis MTX-terápia hatásosabb és biztonságosabb, a nagyobb hatás éveken át fennmarad.*

## Nem kívánt hatások

Az MTX-kezelés és a lymphomaindukció esetleges összefüggése az utóbbi években több felmérés tárgya volt. Ezek konklúziója az lett, hogy a lymphomák RA-ban észlelt nagyobb gyakorisága független az alkalmazott betegségmódosító kezeléstől, a betegség nagyobb aktivitásával áll kapcsolatban. Dobashi és munkatársai egy japán prefektúrában tíz év alatt regisztrált 5783 betegségmódosító gyógyszerekkel, köztük MTX-szel kezelt RA-s beteg között 33 lymphomás beteget talált (THU0124 absztrakt). Adataikat illesztett nem lymphomás kontroll betegekével összevetve, a szteroid- és biológiai terápia, illetve Sjögren-szindróma jelenléte nem függött össze a lymphomák jelentkezésével. Kockázati tényezőnek bizonyultak ellenben a betegség fennállásának időtartama, a funkcionális állapot és az MTX igen magas adagjai. Conway és munkatársai 27 vizsgálat 11 485 betegét felölelő metaanalízist ismertettek, amelyekből az MTX hepatotoxicitására vonatkozó adatokat gyűjtötték ki (THU0139 absztrakt). Az MTX-kezelés mellett a mérsékelt, illetve nagyobb (a normálérték háromszorosánál alacsonyabb, illetve magasabb) májenzim-emelkedés kockázata 2,07, illetve 2,87, azonban májelégtelenséghez, cirrrosishoz, illetve elhalálozáshoz vezető hepatotoxicitás kockázata gyakorlatilag nulla (RR = 0,16). Az MTX folsav-antagonista hatásmódja miatt ismert a macrocytás anaemia nem kívánt fellépése. Sames és munkatársai azt vizsgálták, hogy a per os MTX-bevitel parenteralis formára váltva megnöveli-e a dihidrofolát-reduktáz-gátló nem kívánt hatást. Betegeik megfelelő folsavpótlásban részesültek. A macrocytosis jelenlétét öt egymást követő mérés során egyaránt 100 vagy három mérésben 105 femtoliter átlagos vörösvérsejtterfogat- (MCV-) értékkel határozták meg. Betegeik 17 százalékában észleltek ilyen értékeket a per os kezelési szakaszban, míg a parenteralis adagolás alatt 14 százalékuknál lépett fel macrocytosis (AB0458 absztrakt). *A parenteralis MTX-kezelés biztonsági profilja általában nem rosszabb a per os adagolásénál, gyomor-bél rendszeri mellékhatása kevesebb.*

## MTX-adherencia és -perzisztencia

A gyógyszereszedési fegyelem kutatói között kerengő vicc szerint, ha a beteget megkérdezik a vizsgálati viziten, mikor hagyta abba előírt gyógyszerét, azt válaszolja „tegnap”. Amikor kis idő után újra rákérdeznak, azt mondja: „a múlt héten”. A vizit végén újra feltett kérdésre a válasz: „egy hónapja”. A közkeletű magyarázat szerint a betegek nem szívesen keserítik el orvosukat azzal, hogy bevallják „fegyelmezetlenségüket”. Az MTX-kezelés előírásainak betartása viszont Krüger és munkatársai szerint kiemelkedően jó (THU0130 absztrakt). Huszonegy centrum 519 olyan RA-s beteget kérdezték, akik legalább fél éve kaptak betegségmódosító gyógyszert. Közülük 477 volt MTX-kezelt. A betegség átlagosan 12 éve állt fenn, és az MTX-kezelés átlag 7 éve folyt. A kérdőív az utolsó 20 adag bevitelének pontosságára kérdezett: a betegek nyilatkozata szerint 90,8 százaléuk szinte teljes (80%-os), 73 százaléuk teljes (100%-os) pontossággal adagolta gyógyszerét. Az injekciós adagolásra vonatkozó adatsort nem közölték, csupán azt, hogy annak fegyelme megegyezett a certolizumab és az abatacept alkalmazásával (amelyekkel a 80 százalékos pontosság 80 és 100% volt). Az előírástól eltérés leggyakoribb oka feledékenység volt. Blüett és munkatársai a per os MTX melletti kitartást vizsgálták a Norfolk Arthritis Register 431 korai arthritises betegének adatai alapján (OP0150 absztrakt). A megfigyelt betegek száma 2035 volt, tehát egy beteget átlagosan öt évig követtek. Az MTX elhagyásának aránya 34% volt (19% mellékhatás, 9% hatásvesztés, 3% remisszió, 3% egyéb ok). Kifejezetten a parenteralis beviteli mód melletti kitartást három munkacsoport vizsgálta. Avdeeva és munkatársai 45 DMARD-naiv korai RA-s beteget parenteralis MTX monoterápiával kezelték. Három hónap után 23 beteg (51%) érte el a DAS28 alacsony választ vagy remissziót, 22 betegnél MTX-adalimumab kombinációra váltottak át (THU0110 absztrakt). Müller és munkatársainak 70 DMARD-naiv korai RA-s beteget átlagosan 18,5 mg/hét adagban subcutan MTX-kezelést kapott. Átlagosan két éves követés alatt 37 (53%) maradt scMTX monoterápián és 34 (47%) kapott a nem DAS28 válasz miatt biológiai terápiás kiegészítést. A subcutan methotrexat monoterápiát átlagosan egy évvel tolta ki a biológiai terápia megkezdésének idejét (THU0140 absztrakt). Ng (THU0115 absztrakt) az USA Veterans Administration adatbázisában szereplő 7107 MTX-szel kezelt RA-s beteg öt éves követése során 3910 olyan beteget talált, akiknél az MTX-terápia megváltoztatása vagy kiegészítése vált szükségessé. Közülük 3808 szájon át, 102 injekcióban kapta az MTX-et. A per os kezelt csoport betegeinek kezelését átlagosan 627 nap után, míg az injekciós MTX monoterápiában részesülőkét átlagosan 962 nap után kellett módosítani. *A parenteralis MTX monoterápiát a betegek kevesebb, mint felénél kell megváltoztatni, és a betegek alacsonyabb gyulladási aktivitása hosszabb ideig tartható fenn, mint a per os bevitel mellett.*

## A parenteralis MTX hatásosabb, mint a per os: farmakokinetikai bizonyítékok

A bemutatott prezentációk legtöbbje a vizsgálatok indoklásában bizonyított tényként közli, hogy a parenteralis MTX biológiai hasznosulása felülmúlja a per os adott készítményekét. Az elmúlt években valóban több vizsgálat foglalkozott a MTX farmakokinetikájával, de ennek ellentmondó eredmények is születtek. Az EULAR kongresszust néhány héttel megelőzően jelent meg az a farmakokinetikai közlemény, amely igen körültekintő tervezéssel bizonyította ezt az állítást. Schiff és munkatársai ötven RA-s betegnek számítógépes programmal megtervezett cross-over elrendezésben szájon át, a hasfal, illetve a comb bőrébe nyolc héten át adott heti 10-15-20-25 mg MTX szérumszintjét mérték. A hasznosuló gyógyszer mennyiségét 24 óra alatt 15 időpontban vett vérminták koncentrációs görbéi alatti területtel (ng/h/ml) fejezték ki. A közölt adatok egyértelműen bizonyították, hogy a szájon át adott 10 és 15 mg 1300, illetve 1800 ng/h/ml értéket ad, a nagyobb heti adagok ezt már nem növelik tovább. A subcutan injekcióban adott MTX adagjai 1600, 2000, majd lineárisan növekvően 2200 és 2500 ng/h/ml értékeket érnek el [5]. Tudjuk, hogy az MTX a sejtekben kumulálódik, és hatását is intracellulárisan fejti ki, ezért a biológiailag hatásos mennyiséget a sejtekben mért mennyiség tükrözi igazán. Den Boer és munkatársai a vörösvérsejtek MTX-poliglutamát-tartalmát határozták meg per os vagy subcutan adott heti 15 és 25 mg MTX-kezelésben részesülő RA-s betegek vérmintáiban a kezelés 3., 6. és 9. hónapjában. A magasabb heti adag hamarabb megjelenő nagyobb intracelluláris MTX-koncentrációt eredményezett. Bár az adatok bemutatásában nem különítették el a per os és a parenteralis adagolás mellett mért értékeket, az előbbi közlemény fényében a subcutan adagolás által elérhető nagyobb szérumszintek feltehetően magasabb intracelluláris MTX-mennyiség felhalmozódását teszik lehetővé. *A nagyobb adagú, illetve a parenteralisan adott MTX nagyobb biológiai hasznosulása magyarázza a kedvezőbb kimenetelt.*

## Összegzés

Az RA nagyobb adagú MTX-szel végzett parenteralis kezelése jobb kimenetelt biztosít a per os kezeléssel elérhetőnél.

## IRODALOM

- [1] Gaujoux-Viala C, Paternotte S, Combe B, et al: Methotrexate (MTX) optimal regimen: dose escalation to least at 20 mg/w or 0,3 mg/w if remission is not reached is the key factor to get favorable RA outcomes at 1 and 2 years. Results from the ESPOIR cohort. EULAR 2014 THU0117 Ann Rheum Dis 2014; 73 (Suppl 2)



- [2] Aydin Tufan M, Ersozlu-Bozkirli ED, Kart-Koseoglu H, et al: A reserach evaluating the effectiveness and the side effects of high dose methotrexate use in combined therapy of rheumatoid arthritis. EULAR 2014 AB0470 Ann Rheum Dis 2014; 73 (Suppl 2)
- [3] Borman P, Demir G, Okumus M, et al: Is subcutaneous methotrexate better than oral methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis? EULAR 2014 AB0473 Ann Rheum Dis 2014; 73 (Suppl 2).
- [4] Hammond A, Batley M: RA patients with inadequate response to oral mtx maintain satisfactory disease control and durable long-term response when switched to sc mtx monotherapy. EULAR THU0111 Ann Rheum Dis 2014; 73 (Suppl 2)

- [5] Schiff MH, Jaffe JS, Freundlich B: Head-to-head, randomised, crossover study of oral versus subcutaneous methotrexate in patients with rheumatoid arthritis: drug-exposure limitations of oral methotrexate at doses >15 mg may be overcome with subcutaneous administration. Ann Rheum Dis 2014; 73: 1549-51.

(Dr. Hodinka László, Országos Reumatológiai és Fizioterápiás Intézet, 1023 Budapest, Frankel Leó utca 25-29. e-mail: hodinka.laszlo@orfi.hu)

## Immunológiai szótár

**C5** A **komplement**rendszer ötödik komponense. A **C5-konvertáz** – C4b2aC3b vagy C3bBbP(C3b) – való aktiválása egy kis fragmentum, az **alternatív út** konvertázának, a **C5a**-nak (molekulatömeg 7–12 kD) a létrejöttét eredményezi. Ez a fragmentum **anafilotoxikus** és **kemotaktikus** aktivitású a **leukocytákra** nézve. A C5-molekulából a hasítás után keletkező maradék, a C5b a C6-tal, a C7-tel, C8-cal és C9-cel képez komplexet, amely a membránokra affinis, és azokat károsítani képes, ún. **membránkárosító komplex**. Az **immuncytolysis** és a **haemolysis** közvetítője.

**C5-konvertáz** Enzimhatású fehérjekomplex, amely a **C5** C5a-vá és C5b-vé hasításával lehet vé teszi a **membránkárosító komplex** létrejöttét. Ez a **komplement**kaszkád utolsó lépése. A klasszikus és az **alternatív út** C5-konvertázai specificitásokat **C3**-ról C5-re változtatják, mindegyikhez egy extra C3b molekula kapcsolódásával (C4b2aC3b és C3bBbPC3b keletkezik).

**C5a** Kemotaktikus (lásd **kemotaxis**) és **anafilotoxin**aktivitással rendelkező peptid. A C5 komponensnek a **C5-konvertáz** általi triptikus hasításával jön létre. Emberben 74 aminosavból álló, glikozilált peptid. A humán **szérumban** természetesen előfordul egy **anafilotoxinaktivátor**, amely a C5a C-terminálisáról az arginin eltávolításával C5a<sub>desArg</sub>-ot hoz létre. A C5a<sub>desArg</sub> az anafilotoxinaktivitást teljesen, a kemotaktikus pedig részben veszi el. A C5a-receptort (CD88) **neutrofil granulocytákon** mutatták ki, **III. típusba tartozó transzmembrán-fehérje**, a **rodopszinszupercsalád** tagja, amelynek 7 transzmembrán doménje van.

**C6** A **komplement**rendszer hatodik komponense. Egyszerű polipeptidlánc, része a **membránkárosító komplex**nek.

**C7** A **komplement**rendszer hetedik komponense. Egyszerű polipeptidlánc, része a **membránkárosító komplex**nek.

**C8** A **komplement**rendszer nyolcadik komponense. Három polipeptidláncból ( $\alpha$ ,  $\beta$  és  $\gamma$ ) áll. A **membránkárosító komplex** része.

**C9** A **komplement**rendszer utolsó komponense. Amikor a haemolyticus láncban a **C3-C9** reakcióba lépett, a vörösvértestek membránján a hozzájuk kötött C5b-9, vagyis a **membránkárosító komplex** sérülést okoz és bekövetkezik a sejt lysis. Habár a komplementközvetített lysishez nem nélkülözhetetlenül fontos a C9, felerősíti a C5b-8 komplex gyenge lyticus aktivitását.

**C<sub>ω</sub>; C<sub>δ</sub>; C<sub>ε</sub>; C<sub>γ</sub>; C<sub>κ</sub>; C<sub>λ</sub>; C<sub>μ</sub>** Az **immunglobulin** láncok konstans régiói, mindegyiküket egy-egy görög betű jelöli.

**capping** Egyes fehérjék aggregált csomóinak csoportosulása a sejt felszín egy bizonyos területén. A sejtmembrán felszíni komponenseinek aggregációját követi, pl. a polivalens ligandumok működése miatt (lásd **patching**). Amikor az ilyen fehérjecsoportosulásokkal bíró sejtek elmozdulnak, a fehérjecsomók a sejt hátsó felszínére kerülnek, ott mintegy sapkát (cap) formálva. A folyamat energiagigényes.

**cardiolipin antitestek** (antifoszfolipid **antitestek**) A sejtmembrán foszfolipidjeire specifikus **autoantitestek**. Számítlan klinikai állapotban kimutathatók, pl. visszatérő thromboticus eseményekkel kapcsolatosan, thrombocytopeniában, ismétlődő abortus és kötőszöveti betegségek, pl. szisztémás lupus erythematosus (**SLE**) esetében. Az antifoszfolipid szindróma kifejezést gyakran használják ezeknek az antitesteknek a jelenlétével kapcsolatos állapotok leírására. Az antitestek a syphilis **Wassermann-tesztjében** is kimutathatók.

**CBA-egér Beltenyészett** egértörzs. Több altörzse létezik, amelyek közül a CBA/H-T6 – amely homozigóta a T6 citológiai marker transzlokációjára – a legfontosabb az immunológusok számára.



Új, non-invazív lehetőség az ízületi folyadék összetételének helyreállítására!

## **Bélrendszeren keresztül felszívódó, klinikailag tesztelt Hyal-Joint<sup>™</sup> hialuronsavval**



Szervezetünkben az életkor előrehaladtával kevesebb hialuronsav termelődik, a kötőszövetek rugalmassága, illetve az ízületi folyadék viszkozitása csökken, ezért fájdalmas ízületi gyulladás, porckárosodás alakulhat ki - arthrosis, melynek az injekciós kezelés volt eddig az egyik hatékony megoldása.

A spanyol Bioiberica gyógyszeralapanyaggyártó cég áttörést ért el a bélrendszeren keresztül felszívódó hialuronsav kutatásban.

**Természetes alapanyagból egy újfajta szabadalmaztatott eljárással, előállította a Hyal-Joint<sup>™</sup> nevű hatóanyagot, kapszula formájában!**

- A hialuronsav szájon át történő szedésének előnyei: az összes ízületnél kifejtheti hatását, egyben segíthet a kötőszövetek víztartalmát, rugalmasságát regenerálni, fenntartani.
- Egyszerű, költséghatékony alkalmazás.
- Tudományos kutatások, klinikai tesztek igazolták, hogy a Hyal-Joint<sup>™</sup> hialuronsav hatásosabb a fermentációs eredetű hialuronsavnál.
- Jól felszívódik a patkóbélből, gyulladáscsökkentő és porcvédő hatású.
- A Hyal-Joint<sup>™</sup> szedése növelheti az ízületi folyadék viszkozitását, így az ízületek ismét aktívak és fájdalommentesek lehetnek!

Forgalmazó: Kőrös-Net Kft.

6200 Kiskőrös, Erdőtelki u. 4. [www.dietpharm.hu](http://www.dietpharm.hu) [info@dietpharm.hu](mailto:info@dietpharm.hu)

## V. Károly császár utolsó hónapjai

V. Károly (1500–1558) 1516-tól 1556-ig német-római császár, spanyol, nápolyi-szicíliai király, Németalföld, Lombardia és az amerikai gyarmatok uralkodója (1. ábra) – „akinek birodalmában sohasem nyugodott le a nap” – a Habsburg uralkodóházból, a belgiumi Gentben született, Szép Fülöp és Őrült Johanna gyermekeként. Országainak nagy részét több rokonától, már fiatalkorában, örökségként nyerte el. Számtalan címe között „Magyarország királya” is szerepelt. Császárrá történt választásáért nagy összeget fizetett a német választófejedelmeknek. Anyanyelve a francia és a flamand volt, később tanult meg spanyolul és valamennyire németül és olaszul. Az utolsó császár volt, akit pápa megkoronázott. Uralkodását I. Ferenc francia királlyal, a fellázadt német paraszttal és a német protestáns fejedelmekkel való háborúskodás töltötte ki. Csapatái VII. Kelemen pápának a fran-



1. ábra  
V. Károly. Tiziano V. olajfestménye. 1548 (205 x 122 cm).  
München, Alte Pinakothek

ciákkal való szövetkezése miatt 1527-ben Rómát is feldúlták és kifosztották. Sok gondot okozott neki a törökök magyarországi terjeszkedése és Luther hitújítása is. Sikertelenül próbálkozott megegyezést létrehozni a német katolikusok és protestánsok között. Mindebbe belefáradva, 1555-ban Brüsszelben ünnepélyesen bejelentette lemondási szándékát. 1556-ban királyságát és Németalföldet fiára (II. Fülöpre), császári méltóságát pedig öccsére (I. Ferdinánd magyar és cseh királyra) ruházta. Röviddel előbb a spanyolországi Yuste kolostorának temploma mellé egy szerény kis palotát (2. ábra) építtetett magának, és lemondása után ide költözött. Haláláig 18 hónapot töltött Yustében.

A császár ismeretes volt nagy étvágyáról, még időskorában is naponta hatalmas mennyiségű húst és sört fogyasztott. Rossz fogzatának és állkapocs-rendellenességének



2. ábra  
A Yuste-i palota, mögötte a templom

(progenia) is betudható, hogy emésztési zavarokkal küzdött. Ezekhez később súlyos köszvény és aranyér társult, amelyek a lovaglást lehetetlenné tették számára.

Az 1408-ban alapított jeromosrendi kolostor (San Jerónimo de Yuste) Spanyolország Extremadura autonóm közösségének Cáceres tartományában, La Vera járásban Cuacos de Yuste kisváros közelében, erdős területen fekszik. Az épületkomplexumban egy gótikus és egy reneszánsz kerengő található, a XV., illetve a XVI. századból. Temploma is gótikus (3. ábra). 1809-ben, a napóleoni háborúk során a franciák feldúlták. 1949-ben újjáépítették, de a szerzetesek csak 1958-ban tértek vissza. Létszámuk csökkenése miatt 2009-ben elhagyták a kolostort, amelybe 2013-ban Lengyelországból pálosok (OSPPE) költöztek. A spanyolok számára igen jelentős történelmi emlékhelyet, amely 2007 óta a világörökség része, biztonsági őrök szigorúan felügyelik (belül tilos a fényképezés).



3. ábra

A kolostor templomának homlokzata

A spanyol eredetű jeromosrend (OSH), amelyet 1373-ban XI. Gergely pápa hagyott jóvá, hajdan igen elterjedt volt Spanyolországban és Portugáliában. Rómában is volt kolostoruk (S. S. Bonifazio ed Alessio). Ők gondozták többek között a Madrid melletti El Escorial kolostorát és a lisszaboni Belém-torony közelében lévő, Szűz Máriáról nevezett, hatalmas kolostort (Mosteiro Santa Maria de Belém dos Jerónimos), amelyek ma a világörökség részei. A XIX. sz. elején a spanyol liberális kormányok a kolostorok nagy részét kisajátították (ekkor a rendnek 48 kolostora volt, 1000 szerzetessel). Az elkobozott épületeket lerombolták vagy világi célokra átalakították, a földeket eladták, a szerzeteseket elűzték. A rendet 1925-ben sikerült újjáéleszteni, de a véres egyházüldözéssel járó polgárháború (1936–1939) megakasztotta gyarapodásukat. Napjainkban már csupán a segoviai Santa Maria del Parral kolostorban élnek 11-en. Címerük lépő oroszlánt ábrázol (4. ábra). A szigorú szabályzatú, kontemplatív rend tagjai fehér habitust és barna skapulárét viselnek, hegyes csuklyával. Régebben elől kerek, hátul hegyes vállgallért is hordtak a csuklya alatt (5. ábra).

V. Károly 1556 őszén Brüsszélből hajón érkezett a Vizcayai-öböl mellett fekvő Laredo kikötőjébe. Egyre erősödő köszvényes fájdalmi miatt különleges – tehergépkocsi elejére emlékeztető – hordszékben (6. ábra) szállították Yuste-be, kb. 550 km-es, négy hónapig tartó úton. Mintegy 60 fős



4. ábra

A jeromosrendiek címere



5. ábra

Jeromosrendi szerzetes

személyzettel és óragyűjteményével együtt 1557 elején költözött be a palotába. Közlekedésének megkönnyítésére eme-



6. ábra  
A császár hordszéke

leti lakrészéhez lépcső helyett lejtőt építettek (2. ábra). Lábtartóval ellátott karosszéket is készítettek számára. Volt hálszobája közvetlenül a templom szentélye mellett helyezkedik el, innen egy ajtónyíláson át, ágyából is figyelemmel kísérhette a szertartást. (Ugyanilyen II. Fülöp szobája is az El Escorialban.) Feleségét haláláig gyászolva, fekete ruhát viselt, és a szoba falait is fekete drapériával borította. Sűrű

levelezés és követek útján összeköttetésben maradt a spanyol kormányzattal, és azt tanácsokkal látta el. Yuste-ben fia, II. Fülöp és Ausztriai János (Don Juan d'Austria, a későbbi lepantói győző) is meglátogatták. A császár 58 éves korában, 1558. szeptember 21-én, maláriában halt meg. Holtteste a kolostortemplom dísztelen kriptájának falfülkéjében talált ideiglenes nyughelyet. 1574-ben átszállították a San Lorenzo de El Escorialba. Eközben levált a mumifikálódott holttest V. kézujjának körömperce, amelyet külön őriztek meg. Ezt 2007-ben a barcelonai egyetemen korszerű módszerekkel megvizsgálva megerősítették a köszvény és a trópusi malária diagnózisát.

A Madridtól ÉNy-ra, kb. 45 km-re fekvő Szent Lőrinc Királyi Kolostort (Real Monasterio de San Lorenzo de El Escorial) II. Fülöp építtette (1563–1584, J. de Toledo és J. de Herrera). A hatalmas (207 x 162 m-es), négyszögletes, háromemeletes épület a kolostoron kívül királyi palotát, panteont, könyvtárat, múzeumot és főiskolát egyesít magában. Benne 2000 helyiség és 86 lépcsőház található. Komor, sárgásszürke homlokzata dísztelen. Központját a 95 m magas kupolájú, görög kereszt alaprajzú templom képezi. Gondozását 1885-től az ágostonrendi szerzetesek (OSA) látják el. (Belül tilos a fényképezés.) A templom főoltára alatti kápolna a spanyol királyok és királynék temetkezőhelye. (Csak azok a királynék kaphattak itt helyet, akiknek fiából király lett.) Az aranytól csillogó, nyolcszögletű, kupolás terem falfülkéiben 26, díszes kőkoporsó helyezkedik el (7. ábra). Közülük kettő még üres. A legelső, akit itt eltemettek, V. Károly volt. (Szarkofágján is így van feltüntetve, holott I. Károly néven volt spanyol király.) Az idevezető lépcső mellett, egy ajtó felett a „Pudriero” (rothasztó) felírást láthatjuk. A mögötte lévő ablak-



7. ábra  
Az Escorial királyi panteonja

talán, boltozatos helyiségben a királyi személyek holttestét a szerzetesek 20–30 évig tartják koporsóban, míg lágy részeik teljesen elbomlanak, ezután ólomládában átviszik a csontokat a mauzóleum szarkofágjaiba. Jelenleg két holttest vár erre (János Károly király szülei). Ezzel az ottani helyek be is telnek. A többi királyi családtagok – nagyrészt csecsemők és gyermekek – fehér márványkoporsói más helyiségekben találhatóak, számukra külön pudriderőt létesítettek. Sic transit gloria mundi!

**Köszönetnyilvánítás.** A szerző a közlemény ábraanyagának kiegészítéséért köszönetet mond Fr. Andrés G. Torralvo (OSH) priornak (Segovia) és a Bayerische Staatsgemäldesammlungen Igazgatóságának (München).

## IRODALOM

- [1] De Zuleta J: The cause of death of Emperor Charles V. *Parasitologia* 2007; 49: 107–109.
- [2] Gachard M: *Retraite et mort de Charles-Quint au monastère de Yuste*. M Hayez Bruxelles, 1854.
- [3] Ordi J, Alonso PL, de Zuleta J, et al.: The severe gout of Holy Roman Emperor Charles V. *N Engl J Med* 2006; 355: 516–520.
- [4] Pérez-Ramírez B: Diagnóstico de la enfermedad del Emperador Carlos V a los 450 años de su muerte. *Caballeros de Yuste* 2010; No 22,. 46–50.
- [5] Stirling-Maxwell W: *The cloister life of the Emperor Charles V*. J. C. Nimmo. London 1891.

Krutsay Miklós

## Tudta-e Ön ...

1. ...hogyan az amerikai válogatott legutóbbi foci VB-n szerepelt kapusa, Tim Howard magyar-amerikai kettős állampolgár? A kiváló portás édesanyja Fekete Eszter, nagyszülei a 2009-ben elhunyt Fekete Pál és felesége Éva alapító tagjai voltak a Magyar Öregdiák Szövetségnek és az Amerikai Magyar Koalíciónak. Az 1956-ban emigrált Fekete Pál vezető kutatóként dolgozott a Johnson & Johnson vállalatnál.
2. Mindig érdekes és egyben példamutató, ha orvos kollégáink közül valaki nem szorosan vett szakmai publikációval tűnik ki. Rodé Magdolna gyermekorvos, főleg az elhízással foglalkozó könyvei után most Gaál Bátor Richárd társszerzővel különleges kötettel jelentkezett: „Digitális világunk ma és holnap”. A kötet a világháló megjelenésének szerteágazó következményeivel foglalkozik – és így mindenkinek érdekes lehet a Publio kiadó új kiadványa.
3. Azt nyilván nagyon sokan tudják, hogy William Somerset Maugham (1874–1965) orvosi végzettséggel rendelkezett. A londoni St. Thomas kórházban fejezte

- be orvosi tanulmányait. A sokak szerint Dickens után a leghíresebb angol író Párizsban született. Apja ott folytatott ügyvédi gyakorlatot. 10 éves korára árva lett, és akkor került Nagy-Britanniába.
4. Az általános renoválás befejeztével újra megnyitották az Országgyűlési Könyvtárat. Az Országház dunai frontjának közepén található, de csak az épület déli oldaláról, a metróállomás felőli részen át lehet bejutni. Az intézmény 1952-ben lett közkönyvtár, ahová minden 18 éven felüli állampolgár beiratkozhatott. Az olvasóterem szépséges, az ember az angol parlamentben érezheti magát.
5. Nem ok nélkül lehet büszke kollégánk, dr. Gara Imre belgyógyász, címzetes egyetemi tanár arra, hogy az év során, a sakkolimpián induló magyar csapatban mindkét lánya, Anita és Tícia is szerepelt.

Dr. Gömör Béla  
Dr. Szekanecz Zoltán



## Gomez Roberto (1948–2014)

Gomez Roberto 1948. május 11-én Bolíviában, Potosi városában született. Egész életét a segítő szándék, az együttérzés, a tenni akarás, mások segítségének igénye jellemezte. Talán ebből is ered az orvosi pálya felé irányuló érdeklődése:

az emberek sorsával való törődés és a biológia iránti fogékonysága, az orvosi hivatásban öltöttek testet számára. A különböző kultúrák iránti érdeklődésének köszönhetően 1969-ben ösztöndíj program segítségével Magyarországra érkezett, hogy tanulmányokat folytasson. Megküzdve a nyelvi és beilleszkedési nehézségekkel, 1976-ban általános orvosként végzett a Debreceni Orvostudományi Egyetemen. Ezt követően a debreceni III. Sz. Belgyógyászati Klinika orvosa lett, ahol belgyógyászatból, majd reumatológiából és fizioterápiából szerzett szakvizsgát. Gyógyító tevékenysége mellett a kutatómunkában is aktívan részt vett.

1982-ben a Városi Egészségügyi Szolgálat (VESZ) kötelekébe került félállásban, ahol 1985-től mint reumatológus a városi szakrendelés vezetőjeként szervezte Debrecen reumatológiai járóbeteg-szakellátását. 1991-ben szakmai átszervezés miatt egy évig családorvosként dolgozott, majd 1992-ben felkérést kapott a Vízmű és Gyógyfürdő Kht. akkori igazgatójától a Nagyerdei Gyógyfürdő gyógyászati részlegé-

nek vezetésére. Lelkesen, teljes odaadással irányította a rábízott részleget, melynek működése sok mozgásszervi beteg fájdalmának enyhítését tette lehetővé. Ez időben szakmailag elmélyült a balneológia tanulmányozásában, melynek nagyszerűségére és kiaknázatlanságára, a benne rejlő lehetőségekre igyekezett felhívni a mindenkori szakmai és városi vezetés figyelmét. Ekkor már a III. Belgyógyászati Klinikán vállalt ügyeleteit is visszamondva, teljes állásban a Gyógyfürdőben dolgozott.

2004-ben a Gyógyfürdő struktúrájának átalakításával újabb fordulatot vett élete: a VESZ Egészségügyi Kht. dolgozója, a Városi Reumatológiai Járóbeteg-szakrendelés vezető főorvosa lett. Vezetői feladatait 2011-ben bekövetkező betegsége miatt feladva, munkáját töretlen lelkesedéssel tovább folytatta.

A gyógyítás mellett 1999-től először a Nyíregyházi Főiskolához, majd 2000-tól a Debreceni Egyetem Egészségügyi Főiskolai Karhoz tartozó Gyógytornász Szak szakigazgató helyetteseként, a Fizioterápiás Tanszék vezetőjeként nagy elszántsággal vett részt a debreceni gyógytornászképzés elindításában, fejlesztésében, szervezésében. Nagyon közel állt szívéhez egészen haláláig végzett oktatói tevékenysége, melyet a gyógytornász- és orvostanhallgatók képzésében és gyógymasszőri tanfolyamok vezetésében fejtett ki.

Az egész reumatológus szakma nevében búcsúzom ettől a jámbor, nemes, nagylelkű, segítőkész, önzetlen, adakozó, szívélyes és örökké küzdő kollégától.

Szekanecz Zoltán

## EULAR kongresszus, Párizs, 2014. június 11–14.

Az Európai Reumaliga (EULAR) szokásos évi kongresszusát 2014 júniusában a csodálatos Párizsban tartotta. Évről évre egyre több résztvevő jön el erre az igen magas színvonalú kongresszusra (idén már 13-14 ezer).

### Rheumatoid arthritis

Igen kitűnő volt az RA prognosztikájával és kimenetelével kapcsolatos szekció. Humphreys előadásában a szeropozitivitás és az RF, illetve az ACPA mennyiségének jelentőségét emelte ki. E tekintetben a felső határértéket meghaladó pozitívitas „alacsony”, a felső határérték háromszorosát meghaladó érték „magas” pozitívítást jelent. A magasan pozitív RF vagy ACPA a mortalitást kétszeresére növeli. Schulze-Koops a methotrexat (MTX) farmakogenetikájáról számolt be. Illumina platformon végzett genomikai vizsgálatukban 1000 RA-s beteget MTX-szel vagy placebóval kezeltek. Az MTX hatékonyságával több lokusz (TNFA, PTPRC, STAT4, HLADRB1) összefüggést mutatott. Kuijper arra mutatott rá, hogy a többszörös hagyományos DMARD kezelésre (tDMARD) még a biológiai terápia korában is szükség van. A tREACH vizsgálatban a háromszoros tDMARD kombinációt kapó betegek nagyobb valószínűséggel érték el az alacsony betegségaktivitást (LDA) az MTX monoterápiával kezeltékhez képest. Előbbi betegekben jóval kisebb arányban volt későbbi szükség biológiai kezelésre. Kelly előadásában szó esett az RA és az interstitialis tüdőbetegség (ILD) kapcsolatáról. Ez utóbbi a mortalitási rizikót megháromszorozza. Az Egyesült Királyságban BRILL elnevezéssel (British Rheumatoid Interstitial Lung Network) 16 centrum bevonásával gyűjtik az adatokat a tüdőrintettség és a várható kimenetel szempontjából. Megállapították, hogy továbbra is a hrCT jelenti a diagnózis alapját, és cyclophosphamidkezelés esetében jobb volt a túlélési idő, bár a mortalitási arányokban nem volt lényeges különbség. Rituximab, azathioprin, micophenolat, TNF-gátlók és IL2 vonatközében prospektív vizsgálatok vannak folyamatban. Barnabe kanadai munkacsoportja korai arthritises kohorsz eredményeket prezentált, igyekeztek hasonló betegségkimenetelű betegcsoportokat azonosítani. A legfontosabb csoportjellemzők között szerepeltek a komorbitások, RF-, ACPA-pozitivitás, demográfiai különbségek, a foglalkoztatottság. Mindezek alapján az egyénre szabott terápia jelentőségét emelték ki. Emery előadásában a PRIZE study eredményeiről beszélt, amelyben az etanerceptkezelést a standard kezeléssel vetették össze. Az első év végén a remissziós arány 64% volt az etanercept, 40% az MTX és 23% a placebo csoportban. A remisszió kiindulási előrejelzői a magas We- és CRP-érték, idősebb életkor, amelyek megléte esetén kisebb

a tartós remisszió esélye. Van der Helm munkacsoportja arra kereste a választ RCT adatok alapján, hogy milyen hosszú lehet optimális esetben a terápiás ablak a rheumatoid arthritis kezdetén. Maximum 15–19 hetes tünetfennállás a legoptimálisabb a kezelés, ill. a perzisztáló RA szempontjából. Niki-forou tanulmányából kiderült, hogy az évek folyamán az RA súlyossága egyre csökken. Főleg az aktív DMARD és biológiai kezelés következtében az utóbbi évekre csökkent a lefolyás súlyossága és a sebészi beavatkozások szükségessége.

A csontdestrukció súlyossága nagyon változó RA-ban. Egy bemutatott vizsgálat célja volt többek között genetikai rizikófaktorokat azonosítani genetikai szuszceptibilitási lokuszok tanulmányozásával több autoimmun betegségben. A genotipizálást immuno-chip segítségével végezték. SNP-k, >0,01MAF (minor allél frekvenciák) és az ízületi destrukció mértékének analízise történt meg. A vizsgálat első fázisában 109 SNP-t azonosítottak, amelyek jelentős összefüggésben voltak az ízületi destrukcióval. Hetvenhatot a HLA és 33-at a non-HLA régióban. Két variánst találtak, amely szignifikáns összefüggésben volt az ízületi destrukció súlyosságával: rs451066 a 14-es kromoszómán és az Rs11908352 a 20-as kromoszómán, közel az MMP-9-et kódoló régióhoz. Az MMP-9 szérumszintek szignifikáns összefüggésben voltak az rs11908352 genotípussal. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a két lokusz befolyásolja az ízületi destrukció súlyosságát. Többek között az Rs11908352 allél az MMP-9-termelésen keresztül is befolyásolhatja az ízületi destrukciót.

### Spondyloarthritisek

A spondyloarthritis (SpA) fogalomkör bevezetése óta gyakran felmerülő kérdés, hogy mennyire tekinthető ez a betegségcsoport homogénnek. A teljes genomot átfogó szűrővizsgálatok (GWAS) eredményei arra utalnak, hogy a betegségcsoport jól elkülönül az autoimmun kórképektől, viszonylag jelentős átfedés mutatható ki a gyulladásos bélbetegségekkel, és ennél jóval kisebb a rokonság a psoriasisal. A SpA-k kialakulásukat tekintve az autoimmun és az autoinflammatoricus betegségek között helyezkednek el, utóbbihoz valamivel közelebb állva. A betegségcsoport tagjainak közös patomechanizmussal kapcsolatosan elhangzott támogató érvek közül kiemelhető a jelentős genetikai átfedés az egyes kórképek esetén, így a spondylitis ankylopoetica (AS) és az arthritis psoriatica (PsA) esetén közös genetikai tényezőként szerepel az IL-23R és az IL-1A. A HLA-B27 szerepét tekintve továbbra is a kóros antigénbemutató által létrehozott autoreaktív T-sejtek, a nehéz láncok homodimer képződése okozta NK-sejt-aktiváció és a nehéz láncok károsodott térszer-

kezete okozta ún. „unfolded protein” mechanizmus tekinthető leginkább elfogadottnak. A patomechanizmus szempontjából egyre nyilvánvalóbb az egyes kórképek esetén az IL-17/23 érintettsége, ezen belül új eredménynek tekinthető, hogy a betegcsoportra jellemző enthesitisek helyén fokozott IL-23-expresszió észlelhető.

Az SpA-k kezelésével kapcsolatos újdonságok közül kiemelendő, hogy az Európai Gyógyszerhatóság törzskönyvezte a TNF-gátló adalimumabot és a certolizumab pegolt az axiális nem röntgen SpA-k kezelésében az Ability I és a Rapid-ax-SpA vizsgálatok eredményei alapján. Egyéb célpontot támadó biológiai terápiás készítményeket egyelőre a „klaszikus” kórképekben tesztelték nagyszámú betegen. PSA-ban az IL-12/23 blokkoló ustekinumabbal, a PDE4-inhibitor apremilasttal és az IL-17-blokkoló sekukinumabbal jó, de a TNF-gátlók hatásánál gyengébb eredményeket értek el. AS-ben az IL-17 blokkolásával látványos gyulladáscsökkenés volt észlelhető MRI-vizsgálattal, és az ASAS20 választ mutatók aránya is 65% körül volt, az IL-12/23 blokkolás pedig ennél is jobb eredményt adott, bár utóbbit csak kis betegszámú „pilot” tanulmányban vizsgálták. Ezekon kívüli egyéb biológiai terápiákkal egyelőre látványos eredményt nem sikerült elérni. Az IL-6 blokkolása több szerrel sem volt sikeres, akár csak a foszfodiészteráz útvonal gátlása sem.

Gyakran felmerülő kérdés, hogy SpA-kban meddig szükséges folytatni a TNF-gátló kezelést. Az InFast vizsgálatban a nem röntgen axiális SpA-ban az infliximab elhagyása után a betegek jelentős része parciális remisszióban maradt, de arányukat nem befolyásolta, hogy NSAID vagy placebokezelésben részesültek-e. Az SpA-s betegeket kezelő reumatológusok körében ugyancsak érdeklődésre számot tartó témának tekinthető a radiológiai progresszió kérdése. Az elmúlt évek kutatásai bizonyították, hogy a tartósan alkalmazott TNF-gátlók lassítják az elcsontosodás folyamatát. Ennek előrejelzésében a laboratóriumi vizsgálatok közül az emelkedett VEGF- és CRP-szint, míg képalkotó eljárások közül az MRI-n kimutatható zsíros degeneráció és a röntgennel igazolható sacroiliacalis strukturális elváltozások tekinthetők prediktív tényezőnek. Ugyanakkor egyre több a bizonyíték arra is, hogy az elcsontosodási folyamat még a lehető legkorábban megkezdett hatékony gyulladáscsökkentéssel sem állítható meg teljesen, mivel a folyamatban mechanikai tényezők is fontos szerepet játszanak.

Az „Axialis spondyloarthritis: new name of an old disease” szekcióban Rudwaleit előadásában beszélt arról az új megközelítésről, miszerint az SpA-k között a nem röntgen axiális spondyloarthritis (nr axSpA) valójában önmagában külön entitás, és nem mindig a spondylitis ankylopoeticát (AS) megelőző állapot. Kitért arra, hogy a gyulladásos deréktáji fájdalom diagnosztikájában jelentős előrelépést jelentett az MRI, hiszen itt még jelentős strukturális károsodás nélkül már felismerhető korai szakban a gyulladás. Mindez az axiális SpA-k új koncepcióját hozta magával, beleértve a nem

röntgen axiális SpA-t és az AS-t is. Újabban egyre több vizsgálat van, amely az SpA teljes spektrumát, kimenetelét elemzi. Azt találták, hogy a nr axSpA-s betegek körében több volt a nő, kevésbé volt markáns a CRP-emelkedés és a HLA-B27-pozitivitás kisebb arányban fordult elő. Mindez arra enged következtetni, hogy a férfi nem, az emelkedett CRP erős prediktorok az SpA progressziójára, beleértve akár az nr axSpA-ból AS-ba való progressziót is. Adatok szerint az nr axSpA-s betegek kb. 10%-a lesz AS-es, ugyanakkor lehetséges, hogy önmagában az nr axSpA kevésbé agresszív betegség.

van den Bosch előadásában is hallhattunk arról, hogy az axiális SpA új entitás lehet, nem szükség szerint AS-t megelőző állapot. Kezelésükben mindkettőnél kiemelte a mozgás, gyógytorna jelentőségét. Beszélt arról, hogy a gyulladásos fájdalom csökkentésében NSAID-ok ajánlottak, amennyiben nem használnak, a TNF-gátlók jönnek szóba. Az etanercept-kezelés hatékonyságáról beszélt, összehasonlítva az nr axSpA-s és SpA-s betegeket, ami mindkettőnél hatékonynak bizonyult, talán jobb választ adtak az SpA-ban szenvedő betegek. TNF-gátló kezelésre hatékony választ mutató betegeknél prediktor szerepe volt a CRP-nek, férfi nemnek és a HLA-B27-pozitivitásnak.

Landewé előadásában a hosszú távú kimenetelről, strukturális károsodásról hallhattunk. Elmondta, hogy a Wnt szignálút vonal szerepe itt különbözik a klasszikus rheumatoid arthritisben ismerttől. Három teóriát említett a syndesmophyta kialakulásáról, a strukturális károsodásról. Egyik szerint a syndesmophytakialakulás nincs kapcsolatban a gyulladással. Másik szerint egy ismeretlen folyamat triggereli a syndesmophyta kialakulását, amelyhez hozzájárul a gyulladás. A 3., trigger teória szerint a gyulladás a syndesmophyta kialakulását eredményezheti, megfigyelések, rtg-értékelések szerint kb. 2 éves időablakkal későbbi megjelenést eredményezve.

Ramiro érdekes előadásában számolt be arról a vizsgálatról, ahol az AS-es betegeknél bekövetkező strukturális károsodásokat nézték, ill. azt, hogy azok mennyire mutattak összefüggést a fizikai munkával. 12 éves eredményeket értékelték, félévente értékelték a röntgenfelvételen látható eltéréseket mSASSS score szerint, emellett felmérték a szociális anamnézist, külön csoportba sorolták a fizikai vagy nem fizikai munkát végző betegeket. 154 beteget vizsgáltak (77% férfi, átlagéletkor 41 év, tünetek fennállása átlagosan 18 év, 81% HLA-B27-poz.). Azt tapasztalták, hogy a betegségaktivitás, következményes radiológiai progresszió szignifikánsan erősebb kapcsolatot mutatott a fizikai munkát végző betegeknél. Feltételezés szerint a fizikai munka felerősítheti a betegségaktivitást, ill. a radiológiai progressziót is.

Varkas a belga spondyloarthritis kohorsz (Be-Giant) eredményeiről számolt be. A vizsgálatba ASAS kritériumok alapján SpA-snak tartott betegek adatai kerültek be. Eredmények többnyire összecsengtek az eddigi vizsgálatok eredményével, de még nagyobb betegszámmal. Eredményeikből

kiemelhető, hogy nr axiális SpA-ban magasabb volt a HLA-B27-pozitivitás aránya a perifériással összehasonlítva. Nr axiális SpA-ban a férfi nem aránya 44,3%, míg perifériás érintettségénél 62,8%.

Ami az arthritis psoriaticát illeti, a PALACE vizsgálat kapcsán Kavanagh többek között beszámolt az apremilastról, mely egy orális foszfodiészteráz-4-gátló szer. Ebben a vizsgálatban placebóval és hagyományos DMARD-okkal és/vagy biológiai szerekkel hasonlították össze a klinikai hatékonyságot arthritis psoriaticában szenvedő betegek esetén. A 16. héten szignifikánsan több (40%) apremilastterápiában (20 mg, illetve 30 mg) részesülő beteg érte el az ACR20 választ a placebo csoporthoz (19%) képest. Szignifikáns javulás jelentkezett a fizikális funkciókban és a bőrtünetekben mindkét dózisu apremilast csoportban. A leggyakrabban gastrointestinalis mellékhatások jelentkeztek, rendszerint korán, ami miatt azonban a vizsgálati szer adását nem kellett felfüggeszteni. Összességében jó hatásúnak bizonyult az arthritis psoriatica kezelésében, a tünetek javulásában és a fizikális funkciókat illetően, jól tolerálható és elfogadható a biztonságossági profilja.

## Szisztémás autoimmun betegségek

A korai szisztémás sclerosis fontos csoport a sclerodermán belül, ahol a Raynaud-szindróma mellett már jelen vannak a specifikus autoantitestek és kapillármikroszkópos eltérések a típusos klinikai tünetek nélkül. Vettori az IL-1 szupercsaládba tartozó IL-33 magasabb szintjét találták ebben a csoportban, amely potenciális biomarkere lehet a korai sclerodermának. A Sulli által végzett ultrahangvizsgálatok kimutatták, hogy a limitált scleroderma csoportban is diffúz dermalis érintettség észlelhető, így a későbbiekben újabb klasszifikáció válhat szükségessé ebben a betegségben. Kowal-Bielecka munkacsoportja kapcsolatot talált a CD163-TWEAK interakció és az ujjfékelyek kialakulása között. De Luca kutatásából az is kiderült, hogy a ventricularis extraszisztolék száma korrelál a kardiológiai érintettséggel, így a betegek Holter-EKG-vizsgálatának fontos szerepe van a kivizsgálás menetében.

Az óriássejtes arthritisek (GCA) új prespektíváját foglalták össze öt előadás keretében, elsődlegesen diagnosztikai, majd terápiás szempontból. A nagyereket érintő vasculitisek kimutatására alkalmazott képalkotó vizsgálatok a színes Doppler-ultrahang, az MRI, a CT-angiográfia, melyek mind az artériafal, mind a lumen megjelenítésére alkalmasak. Ezek mellett az érfalgyulladás alternatív kimutatási módszere lehet a pozitronemissziós tomográfia (PET). A PET elsősorban a gyulladás kiterjedésének, intenzitásának detektálására alkalmas, de nem megfelelő a direkt anatómiai eltérések (stenosis, aneurysma) kimutatására. Boysson 133 GCA-s beteget vizsgált, ahol a PET a betegek 51%-ában volt pozitív, és ez a pozitivitás elsősorban az extracephalicus manifestációkkal

mutatott szignifikáns összefüggést. Következésképpen a PET-vizsgálat elsősorban azokban az esetekben hoz diagnosztikus előnyt, ahol a magas gyulladási paraméterek mellett az aorta érintett, és nincs cephalicus artériás érintettség. A GCA kezelésében az új eredmények a patogenezisen belüli célpontokra vonatkoznak. A GCA Th1-mediált betegségnek tekinthető, ahol kifejezett IFN $\gamma$ -expresszió igazolható, ami potens makrofágaktivátor, és fokozza a sejtek gyulladási citokin (IL-1, TNF $\alpha$ , IL-6) termelését. A TNF $\alpha$  és IL-6 szöveti expressziója és szérumkoncentrációja összefüggést mutat a betegség perzisztálásával/relapszusával. Ezek alapján szükség-szerű volt a TNF $\alpha$ -gátló kezelés kipróbálása GCA-ban, sajnos azonban a kezelés nem eredményezett tartós remissziót, valószínűleg a citokin pathway redundanciája miatt. Úgy tűnik, hogy az IL-6-receptor-gátlás (tocilizumab), illetve a CD28-mediált T-sejt-kostimuláció-gátlás (abatacept) hatékonyabb terápiák. Erre vonatkozóan több multicentrikus klinikai tanulmány van folyamatban.

Szisztémás lupus erythematosusban (SLE) is gyűlnek az eredmények a régi hagyományos és új biológiai terápiákkal kapcsolatban. Egyre nagyobb betegszámú megfigyeléses vizsgálatban igazolt a tartós hydroxychloroquinkezelés és a hosszabb túlélés összefüggése (Fredri), illetve egyre több adat van a rituximab hatékonyságára vonatkozóan terápiarefrakter lupus nephritisben (Tsanyan). Schwarting előadásában a Németországban történt megfigyeléses vizsgálat eredményei a legalább 6 hónapos belimumabkezelés hatásosságát igazolták a napi gyakorlatban is, ahol a klinikai javulás mellett a kortikoszteroid dózisa is jelentősen csökkenthető volt, és a betegek jól tolerálták a kezelést (102 betegből csak 6 beteg szakította meg a kezelést fél éven belül). Powell az USA-ban a belimumabkezelés melletti terhességek kimene-telét összegezte. Összesen 66 terhességet vizsgálva a belimumabkezelés mellett a vetelés hasonló mértékű volt az egyéb kezelést kapó SLE-sek esetén tapasztalattal, és nem volt magasabb a fejlődési rendellenességek előfordulása sem. Sajnos a többi biológiai terápia egyelőre nem bizonyult hatékonynak. Az atacicept vizsgálat során a kisebb dózis nem hozott szignifikáns javulást, ami a nagyobb dózisonál már kimutatható volt, ugyanakkor a nagyobb dózissal történő kezelést le kellett állítani halálesetek miatt (Gordon). Fragoso-Loyo az abatacept-placebo kezelést hasonlította össze abatacept mellett EuroLupus protokollt kapó lupus nephritis betegekben, ahol az abatacept hozzáadása nem vezetett plusz eredményre. Vollenhoven nem találta hatékonynak az IL-6-gátló sirukumabkezelést aktív lupus nephritisben.

A gyulladási izombetegségeket tekintve, dermatomyositiszettel gyakrabban társulnak szekunder tumorok, mint polymyositiszettel (Oddis). A tumorok előfordulása megfelel az életkori incidenciának, de leggyakrabban ovarialis tumorok fordulnak elő, ILD esetén és overlap szindróma mellett kisebb a tumor valószínűsége. Ami a myositisek terápiás újdonságait illeti, a mycofenolat mofetil (MMF) terápia 2-3 g/nap



dózisban hatékony volt a bőrtünetek kezelésében, jelentős szteroidspóroló effektust lehetett elérni, jól tolerálták a betegek. IVIg-terápia vonatkozásában csak két RCT történt, oesophagusmanifesztáció esetén hatékony, illetve rapidan progrediáló, akut komplikációkkal jelentkező betegeknél, refrakter rash esetén. A rituximabmal végzett RIM vizsgálatban a betegek nem érték el az elsődleges és másodlagos végpontokat, de 83%-ban volt javulás. Végül, anti-P155-140 antitest jelenléte felnőttekben súlyos dermatomyositisszal vagy tumorasszociált myositisszal jár együtt, juvenilis DM-es betegeknél pedig ulceratióval, oedemával és calcinosisal.

## Társbetegségek

Az elmúlt években egyre nagyobb figyelmet kapnak a komorbiditások, amelyek a reumatológiai betegek megnövekedett halálához vezetnek. Döntően a cardiovascularis (CV) és malignus kórképek jelentősek. Több kiváló szekció foglalkozott a gyulladásos atherosclerosis vascularis és metabolikus aspektusaival. A lipidekre és anyagcserére vonatkozó kitűnő szekcióban Choy bemutatta az arthritisekre jellemző lipidparadoxont. Az arthritises betegek egyharmadában klinikailag manifesztálódó CV betegség jelentkezik. Az atherosclerosis kialakulásában az IL-6 citokin központi helyet foglal el. Az IL-6 a CRP fő induktora. Gyulladásos kórképekben a CRP megnövekedésével együtt a lipidek [összcholesterin (TC); triglicerid (TG); HDL-C, LDL-C] szintje csökken, ezt nevezzük lipidparadoxonnak. A gyulladás csökkenésével, a biológiai terápia bevezetésével a CRP csökken, ezért észlelhető a lipidszintek emelkedése. Charles-Shoeman a kezelés lipidekre gyakorolt hatását mutatta be. A TNF-gátlók, de különösen az IL-6-gátló tocilizumab és a JAK-gátló tofacitinib emeli a vérzsírok szintjét de ez, a fentiek ismeretében, várható hatás, amely a gyulladáscsökkentéssel függ össze. A biológiai terápia hatására kvantitatív lipidváltozások is bekövetkeznek, így a HDL antiinflammatoricus irányba tolódik, a lipoprotein (a) csökken és az antiatherogen paraoxonáz-1 (PON-1) szintje nő. McInnes pedig gyakorlati útmutatást adott az arthritises betegek CV monitorozására vonatkozóan. A vérnyomást, éhomi lipideket, dohányzást és BMI-t rendszeresen monitorozni kell, de az alapbetegség remisszióba hozása az elsődleges.

Egy másik, szintén a CV társbetegségekkel foglalkozó szekcióban Gabay a lipoprotein (a) szerepére mutatott rá. A biológikumok közül elsősorban a tocilizumab csökkentette az Lp(a)-szintet. Strangfeld a német RABBIT regiszter adatai alapján elemezte a szívelégtelenség (CHF) epidemiológiáját. Összesen 242 RA-s betegben észleltek CHF-t. Az esetek 30%-a NYHA I., 54%-a NYHA II., 16%-a NYHA III. stádiumú volt. Érdekes összefüggést találtak a CHF és az infekciók között. Ha a betegnek CHF-je is van, akkor a fertőzőes mortalitás megnő. A CV megbetegedések mellett szintén fontos a stroke

előfordulása is, amit Mantel tárgyalt. RA-ban a stroke rizikója 1,4-szeres.

Ami a terápia és a komorbiditások összefüggéseit illeti, randomizált vizsgálatokból készült analízis alapján fokozott a szívizominfarktus rizikója stroncium-ranelatot szedő betegek esetén. Egy dán vizsgálatban 2005 és 2011 között stroncium-ranelattal kezelt posztmenopauzában lévő nőbetegek esetén vizsgálták az akut coronaria szindróma rizikóját. Első alkalommal stroncium-ranelat-terápiában újonnan (n = 1798) vagy első vonalbeli biszfoszfonát terápia egyikében (alendronat és riszedronat; n = 65 236) részesülő betegek esetén. A vizsgálat második részébe egyrészt újonnan stroncium-ranelat-terápiában részesülő, másrészt olyan betegeket vontak be, akik esetében első vonalbeli biszfoszfonát terápiairól történt a váltás stroncium-ranelatra (n = 1219) vagy ibandronsavra (n = 2290). Primer végkimeneteli pontok voltak: akut coronaria szindróma (instabil angina vagy szívizominfarktus). Összehasonlítva az alendronat/riszedronat csoporttal, a stroncium-ranelat szedése ebben a vizsgálatban nem volt összefüggésbe hozható az akut coronaria szindróma fokozott rizikójával, és ez a második csoport esetén is elmondható volt.

## Szakmapolitika

Szólnunk kell a magyar részvételről és a szakmapolitikai kérdésekről is. Szekanecz Zoltánt, az MRE elnökét 2014-től 3 évre beválasztották az EULAR tudományos bizottságába, így részt veszünk a program összeállításában és a szervezésben. Emellett honfitársaink továbbra is aktívan működnek az EULAR egyes szakmai bizottságaiban. Az új elnök, Maurizio Cutolo „rendet teremtett”, így most már minden bizottságban egy, az adott országot hivatalosan képviselő, a nemzeti társaság által delegált képviselő ül. Ennek megfelelően 2013-tól Magyarországot az EULAR-ban és az EULAR kongresszusok idején tartott bizottsági üléseken Bálint Péter (mozgásszervi képzés, ESCMI), Constantin Tamás (gyermekreumatológia, ESCPR), Nagy György (reumatológiai kutatások, ESCIR), Szántó Sándor (epidemiológia és egészségügyi ellátás, ESCHEHSR), Szekanecz Zoltán (oktatás, ESCET) és Szűcs Gabriella (klinikai ügyek, ESCCA) képviseli.

Nagyon fontos megemlíteni, hogy a nagyszámú magyar részvétel ellenére az aktív magyar prezentációk száma elenyészően kevés. Gratulálunk kell Czirják Lászlónak és Péntek Mártának, akik üléselnökök voltak, illetve Szentesi Margitnak, aki poszterét szóban is bemutathatta. Ezenkívül honfitársaink mintegy 20 poszteren szerepeltek döntően társszerzőként, nemzetközi kollaborációkban. Összesen 6(!) hazai műhelyben készült munka került bemutatásra. Persze meg kell említenünk, hogy a zsűrizés évről évre egyre szigorúbb, hiszen a több mint 4000 beküldött összefoglaló mindössze 7%-a került előadásra, 45%-a poszterbemutatásra.

Az oktatási bizottság (ESCET) ülésén hangsúlyozták, hogy

az EULAR online kurzus ára negyedére csökkent, ma már csak 100 euró, ezért mindenkit buzdítanak ennek elvégzésére. Évente 10 utazási grant is van, amely néhány hónapos tanulmányút költségeit fedezi.

Az ESCIR a kísérletes kutatások koordinálására létrehozott bizottság, amely kiváló lehetőséget biztosít nemzetközi kollektívák szervezésére. Az ESCIR rendszerint évente két alkalommal ülésezik, az EULAR és az EWRR (European Workshop for Rheumatology Research) konferenciák alatt. A bizottság jelenlegi vezetője Rik Lories. Az ESCIR égiszén belül működő, egy-egy területre specializálódott kutatói csoportok: EULAR Study Group for Risk Factors for RA (SGRFRA); EULAR Gene and Cell Therapy Study Group (GCTSG); EULAR Study Group on Animal Models for Rheumatic Diseases (SGAM); EULAR Synovitis Study Group (ESSG); EULAR European Consensus Finding Study Group on Laboratory Investigation in Rheumatology (ECFSG); EULAR Study Group on Neuro Endocrine Immunology of the Rheumatic Diseases (NEIRD). A párizsi konferencia során történt bizottsági ülésen két új csoport megalakulását jelentették be. A mikrovaskulátúra vizsgálata különböző kórképekben az EULAR Study Group on Microcirculation in Rheumatic Diseases munkacsoport feladata, míg az arthrosis patogenezisének vizsgálatára az EULAR Study Group on OA (SGOA) alakult meg. Minden munkacsoport vezetője röviden beszámolt az elért eredményekről és a tervekről. A megbeszéléseken a legtöbbet érintő visszatérő probléma a kutatási támogatások kérdése. Jelenleg a

legtöbb országban elérhető nemzeti pályázati lehetőségek mellett európai programokra is lehet pályázni, az utóbbiak elnyerésére többnyire nagy centrumok összefogásával van lehetőség. Általánosságban elmondható, hogy jelenleg csak kevés pályázati lehetőség érhető el Európában kísérletes reumatológiai kutatások támogatására, az is igen erős versenyben, de természetesen az egyes országok között igen nagyok a különbségek ebben a tekintetben. Az EULAR alapítványán (European Rheumatology Research Foundation) keresztül támogatásokat, eddig az arthrosis témában lehetett pályázni, a közeljövőben további kiírások várhatók.

Természetesen a fentiek mellett még számos egyéb újdonság volt, most csak a legérdekesebbeket kívántuk felvilágitani. Nagyon köszönjük a szponzoroknak, hogy számos magyar kollégának is lehetővé tették e színvonalas kongresszuson való részvételt. Jövőre Rómában folytatjuk!

Bodnár Nóra  
Horváth Ágnes  
Nagy György  
Szabó Zoltán  
Szamosi Szilvia  
Szántó Sándor  
Szekanecz Zoltán  
Szűcs Gabriella  
Vánca Andrea

## Kongresszusi naptár

### Hazai és itthon tartott nemzetközi kongresszusok

#### 2015

2015. március 5–7.  
European Workshop of Rheumatology Research (EWRR)  
Budapest, Hotel Helia  
Információ: [www.ewrr.org](http://www.ewrr.org)

2015. május 7–9.  
Magyar Allergológiai és Klinikai Immunológiai Társaság (MAKIT) vándorgyűlése  
Balatonalmádi, Hotel Ramada  
Információ: [www.makit.hu](http://www.makit.hu)

### Külföldi kongresszusok

#### 2014

2014. november 6–11.  
American College of Allergy, Asthma and Immunology (ACAAI) annual meeting  
Atlanta, GA, USA  
Információ: [www.acaaai.org](http://www.acaaai.org)

2014. november 14–19.  
American College of Rheumatology (ACR) Annual Conference  
Boston, MA, USA  
Információ: [www.rheumatology.org](http://www.rheumatology.org)

#### 2015

2015. március 5–7.  
European Workshop of Rheumatology Research (EWRR)  
Budapest  
Információ: [www.ewrr.org](http://www.ewrr.org)

*Akinek további hazai vagy külföldi kongresszusokról van információja, kérjük, Kongresszusi Naptárunk számára jelezze ([szekanecz.zoltan@med.unideb.hu](mailto:szekanecz.zoltan@med.unideb.hu)).*

# A MEDICINA KÖNYVKIADÓ *ajánlata*

Hazánkban az inzulinanalógokról elsőként 2006-ban jelent meg könyv formájában egy kitűnő áttekintés Gerő László és Jermendy György tollából „Inzulinanalógok” címmel.

Azóta nyolc év telt el, amelynek során egyrészt új készítmények fejlesztésére is sor került, de elsősorban az inzulinanalógokkal szerzett tapasztalatok és irodalmi adatok sokasodtak meg olyan mértékben, hogy időszerűvé vált a könyv újabb, bővített kiadásának megjelentetése. Mindezen túlmenően diabetológiai gyakorlatunkban és az egyes készítmények finanszírozásában is szemléletváltásra került sor, ami szintén indokolja a témakör újabb szempontok szerinti, áttekintő ismertetését.

A korábbihoz képest kibővült cím („Inzulinanalógok a klinikai gyakorlatban”) is azt a fő törekvést fejezi ki, hogy a klinikai bizonyítékok fényében adjon útmutatást a betegellátást végző kollégák számára.

Ára: 3200 Ft

Terjedelem: 220 oldal

Méret: 150 x 230 mm

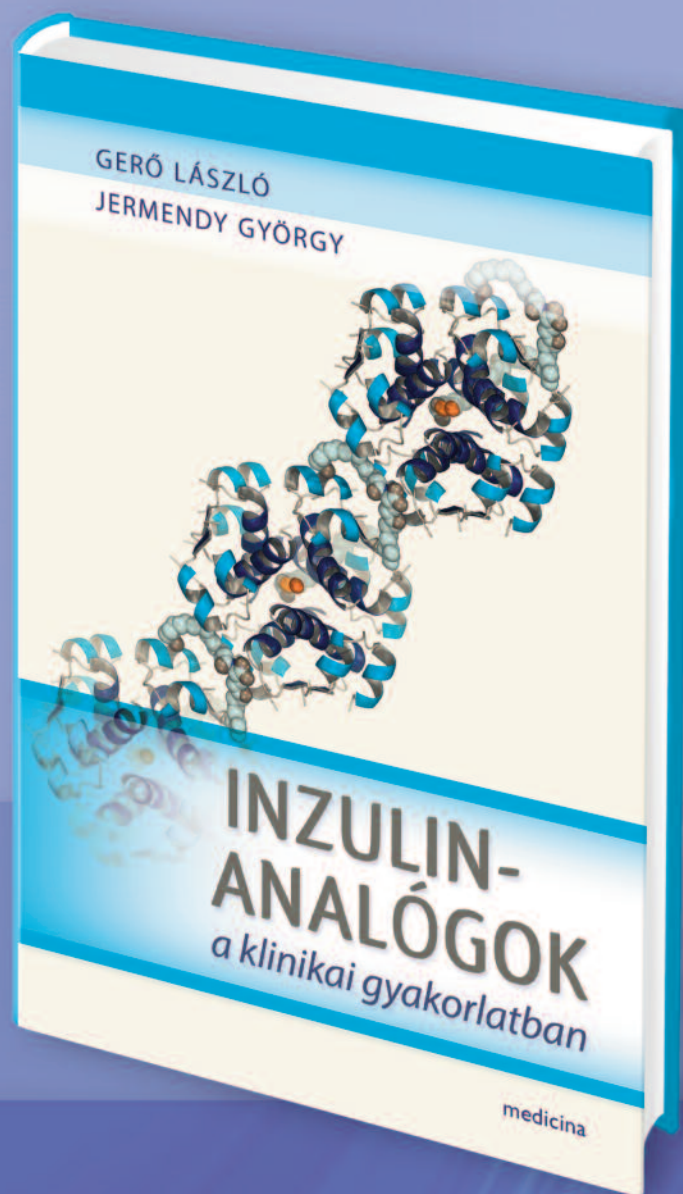


medicina

**Medicina Könyvkiadó Zrt.**

1072 Budapest, Rákóczi út 16.

tel.: 36(1)312-2650



Keresse könyveinket honlapunkon • [www.medicina-kiado.hu](http://www.medicina-kiado.hu)  
valamint márkaboltjainkban!

1091 **Budapest**, Üllői út 91/A. tel.: 36(1)215 3786, 36(1)215 9618 • 1091 **Budapest**, Üllői út 89/C. tel.: 36(1)216 0596  
1088 **Budapest**, Baross u. 21. tel.: 36(1)317 0931 • 4032 **Debrecen**, Nagyerdei krt. 98. tel.: 36(52)423 855  
7624 **Pécs**, Szigeti u. 12. tel.: 36(72)536 001/31720 • 6720 **Szeged**, Tisza L. krt. 48. tel.: 36(62)420 418

