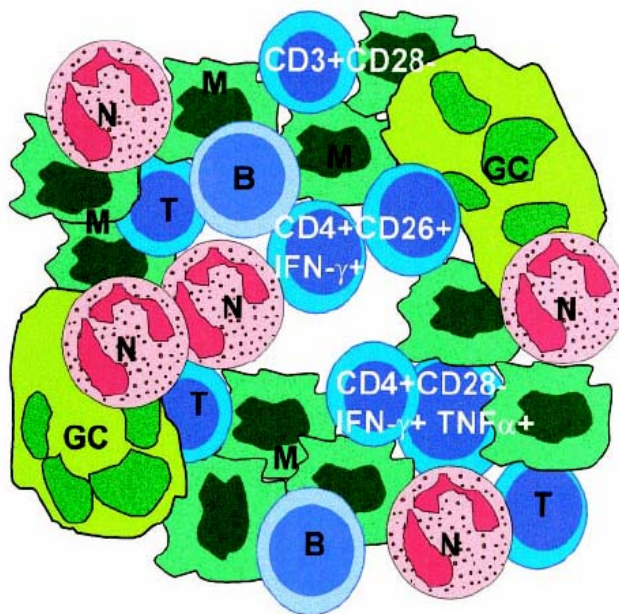


# A Wegener granulomatózis és a gyulladásos miopátiák tüdőmanifesztációjának klinikai megjelenésével és ezek kialakulásához vezető immunológiai eltérésekkel kapcsolatos vizsgálatok

Dr. Komócsi András  
Doktori (Ph. D.) értekezés



*Témavezető: Prof. Dr. Czirják László*

Ph. D. Program: B/372 A szisztémás autoimmun kórképek immunológiai és klinikai vonatkozásai

2003.

## 1. Bevezetés

A szisztémás autoimmun kórképek fogalma alatt egy jellemzően ismeretlen kórereditű, heterogén betegségecsoportot értünk. Ezen kórképek kialakításában számos ponton az immunrendszer hibás, túlzott működése –ún. autoimmun folyamatok- mutathatók ki. A betegségek kialakulásában genetikai hajlamot, illetve genetikai károsodást feltételezünk. Bár egyértelmű adatok nem támasztják alá újabban, állatkísérletes vizsgálatok alapján, két esszenciális gén együttes hatását feltételezik – az egyik az abnormális, autoimmun folyamatok kialakulásáért lenne felelős; míg a másik a célszerv-struktúrák károsodási hajlamát okozná. A betegség végső képe azonban, egyéb moduláló tényezők (diétás, hormonális, infekciós és egyéb környezeti faktorok) együttes hatásának függvénye [1]. Mind a genetikai tényezők, mind környezeti faktorok hatása együttesen az immunrendszer működését befolyásoló mediátorok (citokinek, kemokinek) felszabadulását, az immunválasz módját (celluláris / humorális válasz) meghatározó Th1/Th2 rendszer megváltozott egyensúlyát, oxidatív szabadgyökök felszaporodását, gyulladással szövetpusztulást, fokozott kollagénszintézist és az extracelluláris mátrixproteinek depozícióját eredményezi. Mindez végül súlyos szervi károsodáshoz és az érintett szervek elégtelen működéséhez vezet.

A szisztémás autoimmun betegségek lefolyása rendszerint hullámzó aktivitást mutat, remissziók és relapszusok tarkítják. A gyulladással járó folyamatok aktivitása az érintett szervekben nem egyidejű. Általános aktivitási tünetek hiányában is fennállhat egy –egy szervben aktív, látens progresszív folyamat.

A betegség által okozott károsodás mértékét lokális tényezők is befolyásolják. A helyi gyulladással járó szerepet játszó mechanizmusokra a szisztémás keringésből nyert mintákból csak közvetve tudunk következtetni. A károsító folyamatok jobb megismerése hozzájárulhat a kórkép progresszióját jobban befolyásoló, illetve kevésbé súlyos mellékhatásokkal járó, célzott, illetőleg oki terápia kialakításához. Azonban ezek megismeréséhez az aktív folyamat területéről történő mintavételre van szükség.

A terápia indikálásánál és hatásának le mérésénél elsődleges fontosságú a fokozott immunszuppresszióra szoruló betegcsoport -lehetőleg non-invazív szűrő módszerek alkalmazásán alapuló- kiszűrése.

A tüdő érintettségének az autoimmun kórképek közt kórképenként változó a jelentősége. A szisztémás autoimmun kórképek egy részében; így dermato / polimiozitiszben és a Wegener granulomatózisban a prognózist döntően befolyásolja a tüdő érintettség megléte, illetve a betegség lefolyása során észlelt progressziója [2-4]. A tüdő vizsgálatában mindennaposan alkalmazott diagnosztikus módszer a bronchoalveoláris lavage (BAL), ami lehetőséget nyújt abban, hogy segítségével a gyulladással járó folyamat helyéről, illetve annak közvetlen közeléből jussunk -annak sejt elemét jellemző- mintához, anélkül, hogy a beteget invazív vizsgálat kockázatának tennénk ki. E betegcsoportokban a BAL vizsgálat elvégzésének megalapozott szerepe van a kezelés meghatározásában, azonban a klinikai döntésekhez nyújtott segítség mellett, az így nyert minták tudományos szempontból történő további feldolgozása értékes adatokat nyújthat a kórképek kialakulásában szerepet játszó mechanizmusok feltárásához.

A szisztémás autoimmun betegségek tüdőmanifesztációi - a hozzájuk vezető sokféle patomechanizmus ellenére - a tüdő állományának károsodása kapcsán kialakuló klinikai jelek tekintetében, számos ponton közös jellegzetességet mutatnak. Ilyen a folyamat kezdeti szakaszában jellemző -klinikai tünetekkel kísért vagy ezek hiányában látens zajló- gyulladás, az alveolitisz.

Aktív alveolitiszről akkor beszélünk, ha az alveoláris térben steril gyulladás mutatható ki. Ennek során az alveoláris sejtek száma megnövekszik, a sejtcsoportok aránya megváltozik. Ebben részint a keringő sejtek gyulladással járó mediátorok hatására létrejövő szegregációja (homing-ja), részint helyi proliferációja játszik szerepet. A gyulladás során a megváltozott

sejtarányok szerint limfocitás alveolitiszt, és granulocitás alveolitiszt különböztetünk meg. Ezen sejtek mellett az összsejtszám növekedéséhez a monocitoid elemek számának emelkedése is hozzájárul. Az aktív gyulladást követően, illetve amellet -feltehetőleg regeneratív folyamatként kezdődő, de a folyamatos vagy epizodikus gyulladás által fenntartott- destruktív, degeneratív fibrózis jellemzi a kórképek jelentős részét. A betegek klinikai követése során alkalmazott képalkotó eljárások részint aktív gyulladással, részint inaktív, reziduális károsodást ábrázolnak. Ennek ismerete és helyes értelmezése a fokozott immunszuppresszióra szoruló betegcsoport meghatározása miatt elsődleges fontosságú. Nem ismertek azok a mechanizmusok, melyek a gyulladást a tüdőparenchyma pusztulásával járó, különböző fokú szövetpusztulással kísért alveolitisz, vagy a néhány kórképben jelentkező granulóma képződés irányába indítják el. Ebben fontos szerepet tulajdonítunk a szerzett immunválasz sejtjei által a gyulladás területén szecernált citokineknek.

## **1.1. A légzőszervi érintettség klinikai megjelenése és a létrejöttében szerepet játszó főbb mechanizmusok**

Jelen fejezet a tüdőmanifesztációra összpontosítva, a teljesség igénye nélkül bemutatja a dolgozatban érintett szisztémás autoimmun kórképeket, röviden ismerteti a tüdőmanifesztáció vizsgálatával kapcsolatos vizsgálati módszereket, és kitér a gyulladással kapcsolatos főbb patológiai eltérések ismertetésére, valamint a velük kapcsolatos kutatási eredményekre. A belső szervek, így a tüdő fibrózisához vezető folyamatokkal kapcsolatos nagyszámú adat ismertetése azonban túlhaladna jelen dolgozat keretein.

### **1.1.1. Kórképek rövid ismertetése**

#### **1.1.1.1. Dermatomiozitisz / polimiozitisz (DM/PM)**

Az idiopátiás gyulladással miopátiák; a dermatomiozitisz és a polimiozitisz, ismeretlen eredetű autoimmun megbetegedések. A kórképek jellegzetesen a proximális végtagizomzat szimmetrikus gyengeségével, ritkábban izomlázszerű fájdalmával járnak [5-8]. A dermatomiozitiszben (DM) a proximális végtagizomzaton kívül, súlyos esetben a garat-, illetve légzőizmok is érintettek lehetnek. A disfágia fellépte az orofaringeális izomzat gyengesége miatt észlelhető, ami súlyos esetekben aspirációhoz, táplálkozási képtelenséghez vezethet [9]. A légzőizomzat érintettsége többnyire súlyos, akután kezdődő miozitisz esetében alakul ki.

Dermatomiozitiszben specifikus bőrelváltozások jelentkeznek [10]. Ezek a felső szemhéj lilás elszíneződése, a fény által ért részekben észlelhető erythema, valamint az ízületek feszítő felszínén megjelenő, hámló jellegű lilás elváltozás, a kórképben előforduló vaszkulitiszes aktivitás jele; a Gottron jel. Ez utóbbi igen korai jel DM-ben. A körömágy kapillármikroszkópiás vizsgálat során megnagyobbodott kapillárisok, illetve avaszkuláris zónák, mind DM-ben mind PM-ben előfordulnak [11;12].

A polimiozitiszes, illetve dermatomiozitiszes betegeknél mérsékelten nagyobb, a tünetmentes populációval összevetve, a daganatos megbetegedések előfordulása. [13]. Ez elsősorban a kórlefolyás előtti közvetlen időszakokra és a tünetek kezdete utáni első év(ek)re jellemző.

A gyulladással miopátiák diagnosztikája komplex, a klinikai képet, a laboratóriumi eltéréseket (izomkárosodásra utaló enzimszint: CK, LDH emelkedés), a jellegzetes izombiopsziás leletet és a típusos EMG eltérések értékelését magában foglaló tevékenység. Egyes eltérések a fentiekből hiányozhatnak a diagnózis felállításához, ezért a betegek tüneteinek, és vizsgálati leleteinek átfogó értékelése és nemzetközileg elfogadott kritériumrendszer alkalmazása szükséges [14].

Az izomérítettség súlyossága mellett a betegség kimenetelét jelentősen befolyásolja a betegek 5-35%-ában észlelhető tüdőérintettség megjelenése, ezért ennek korai felismerése nagy

fontossággal bír [2;3;15]. Intersticiális tüdőbetegség (ILD) megjelenhet viszonylag enyhe izomtünetek mellett is, sőt olyan esetekben is, ahol nincs klinikailag manifeszt miozitisz [16-19]. Gyakrabban észlelünk tüdőérintettséget azokban a betegekben, akikben az anti-szintetáz antitestek egy csoportja, az anti-Jo-1 antitest kimutatható [6;7;14;15;20].

Az intersticiális tüdőbetegség a polimiozitisz és dermatomiozitisz gyakori komplikációja. [15;21-25]. Míg a nemzetközi irodalomban viszonylag nagy számú közlemény foglalkozott a gyulladós miopátiákban jelentkező intersticiális tüdőbetegség fennállásának non- invazív eszközökkel -köztük számos esetben nagyfelbontású tüdő CT-vel- történő bizonyításával [26-28], csak néhányban került a DM/PM-es betegek BAL sejtösszetétele leírásra. A közölt kis számú eset közt mind limfocitás, mind neutrofil, mind mindkét sejttípus arányának emelkedésével járó alveolitiszt is leírtak.

### **1.1.1.2. Wegener granulomatózis (WG)**

A kórkép az anti-neutrofil citoplazmatikus antitest (ANCA) jelenlétével, a kis és közepméretű artériákat érintő, immundepozitum nélküli (pauci-immun), nekrotizáló vaszkulitisszel, illetve a légző traktus érintettségével és nekrotizáló glomerulonefritisszel jellemezhető. A betegséget az elsődleges szisztémás vaszkulitisek közé soroljuk, annak ellenére, hogy gyakran elsőként a felső légutak granulomatózus elváltozásával jelentkeznek és ezt csak később, esetenként évekkel később követi a vaszkulitiszes léziók megjelenése.

Annak ellenére, hogy a betegek jelentős részében nem különíthető el élesen, a Wegener granulomatózis lefolyását két szakaszra; kezdeti (iniciális) és későbbi (generalizált) formára szokás felosztani [29]. Míg az iniciális stádiumra a felső légutak granulomatózus gyulladása a jellemző, a generalizált fázisban főleg a vesét és tüdőt érintő szisztémás vaszkulitisz képe dominál. Krónikus, relapszusokkal tarkított lefutás jellemzi, és gyakorlatilag bármely szervrendszer érintett lehet.

A WG kezdeti stádiumát tehát a felső légző traktus granulomatózus érintettsége uralja. A nekrotizáló granulómák következtében változatos klinikai kép alakul ki.

A generalizált stádiumba történő átmenetet gyakorta a vaszkulitisz indirekt jelei („B” tünetek, polimialgia, artralgia, artritisz) kísérik. A vaszkulitisz közvetlen tüneteként episzkleritist, a bőrön tapintható purpurát (szövettanilag leukocitoklasztikus vaszkulitisz), illetve perifériás polineuropátiát (mononeuritis multiplex) észlelünk. A kiteljesedő kórképben gyakorta jelentkezik a vese érintettsége, jellegzetes immundepozitumok hiányát mutató (pauci-immun) diffúz nekrotizáló, félholdas glomerulonefritisszel.

A Wegener granulomatózis pulmonális manifesztációjának gyakorisága a diagnosztikai eljárások indikációs stratégiájától függően 60-85%-ban észlelhető [30-32].

A granulóma, a vaszkulitisz és a nekrosis "klasszikus szövettani hármasa" a nyílt tüdőbiopsziás mintáktól eltekintve ritkán látható együtt.

A WG klasszikus radiológiai elváltozása a bilaterális, jól körülhatárolt, többszörös granulóma; amelyek némelyikében centrális nekrosis, másik részében az elváltozásból radiálisan kisugárzó spikuláció látható. Míg a granulómák mérete és a kavernaképződés közt nem áll fenn összefüggés [33] a spikulumok jelenlétét reparatív, fibrotizáló folyamatok jeleként értékelhetjük [34]. A klinikailag hatásos terápia következtében a granulómák száma és mérete csökken, jelentős részük teljesen, vagy fibrotikus köteg hátrahagyásával gyógyul [30;35]

A mellkasröntgenen leggyakrabban észlelt eltérés az infiltrátumok, egyes vagy többes kerekárnyékok megjelenése [4;31;36]. Az infiltrátumok vagy a betegség pneumonitisz formájában lezajló vaszkulitiszes formáját jelzik, vagy diffúz, alveoláris vérzésre, vagy pneumóniára utalnak [34]. Az infiltrátumok kimutatására és az immunuszuppresszív kezelésre adott válaszuk követésére alkalmasnak bizonyult a konvencionális röntgen technika.

A kerekárnyékok, amelyek a granulómáknak felelnek meg, rendszerint néhány centiméter nagyságúak, gyakorta láthatóak a mellkasröntgen képen is [4;31;36]. Az ennél kisebb

granulómák a hagyományos röntgen detektálási küszöbe alá esnek és csak computer tomográfiás eljárással mutathatók ki, [30;33;35;37-40] mely szenzitivitása 2-3 szorosa a röntgen képének [30;39]. A HRCT felvételen gyakorta ábrázolódik egy, a granulómához vezető ér (feeding vessel sign) ami a granulómák részben vaszkuláris kóreredetére utalhat, [38] azonban -mivel számos más kórképben is előfordul (pulmonális embólia, hematogén metasztázisok stb.)- nem tekinthető a WG-re specifikusnak [41]. Ezek mellett a HRCT alkalmas számos olyan, a hagyományos röntgennel nem kimutatható eltérés kimutatására is; mint a szeptális és nem-szeptális vonalak, és a tejüveghomály [4;30;35;39;40]. Ezen utóbbi csoport diagnosztikai jelentősége még nem teljesen tisztázott.

### **1.1.1.3. Szisztémás szklerózis (SSc)**

A szisztémás szklerózis a bőr és egyes belső szervek fibrózisával és következményes degeneratív elváltozásokkal jellemezhető kórkép. Napjainkban a kórkép szív és tüdőérintettségével kapcsolatos mortalitás és morbiditás jelent előtérben álló problémát. A szisztémás szklerózis esetében az aktív gyulladásos folyamatok részben rejtetten játszódnak le, és a betegek túlnyomó részénél csak a már kialakult fibrózist látjuk. Azonban a kórtörténeti adatok részletes elemzésével a betegek jelentős részénél azonosítható az aktív gyulladásos epizód, amire a bőr esetében annak diffúz duzzanatával járó "szkleroderma ödémás fázis", illetve a gyakorta szubklinikus formában jelentkező miozitiszes panaszok utalhatnak. A tüdő érintettségét illetően a betegek egy részénél csak a már gyakran súlyos formában jelentkező tüdőfibrózist észleljük. Azonban főleg a korai esetekben végzett BAL vizsgálatokkal az alveolusok szintjén játszódó, gyakorta klinikailag tünetmentes gyulladásos folyamatokat azonosíthatunk [42;43]. Jellegzetes a BAL folyadék sejtszámának megemelkedése, valamint az egyes sejtes összetevők arányának megváltozása. A megemelkedett arányú sejttípusok szerint a limfocitás, granulocitás vagy kevert alveolitiszről beszélünk. SSc esetén inkább granulocitás, a szekunder Sjögren szindrómával társuló SSc esetén inkább limfocitás alveolitiszt észlelünk.

### **1.1.2 Vizsgálómódszerek a szisztémás autoimmun kórképek tüdőmanifesztációjának vizsgálatában**

Az alveolitisz korai diagnosztizálása fontos feladat, mert az időben elkezdett kezeléssel a folyamat megállítható, a tüdőfibrózis kialakulása megelőzhető, vagy legalábbis a progresszió lassítható. Ezért különös jelentősége van egy non-invazív szűrőmódszereken alapuló vizsgálati-követési stratégia kialakításának, ami a fokozott kockázatú betegek kiválasztására koncentrálna.

Számos módszer áll rendelkezésre a fibrotizáló alveolitisz és a tüdőfibrózis kimutatására. A hagyományos mellkasröntgen-felvétel gyakorta a már klinikailag panaszos betegekben is negatív marad. Így az alveolitisz korai stádiuma felfedetlen maradhat. A restriktív légzési károsodás (csökkent belégzési vitálkapacitás IVC, és teljes tüdővolumen TLC) feltárására szolgáló légzésfunkciós vizsgálat sem tűnik elég szenzitívnek a tüdőérintettség követésére. A szénmonoxid diffúziós kapacitás vizsgálata igen érzékeny módszer és alkalmas a korai tüdőérintettség kimutatására, azonban ez a vizsgálat nem nyújt lehetőséget a folyamat kiterjedtségének vizsgálatához, illetve a gyulladásos (reverzibilis) és fibrotikus (irreverzibilis) folyamatok arányának meghatározásához. A nagyfelbontású tüdő computer-tomographiás vizsgálat (HRCT) szenzitív és reprodukálható módszernek bizonyult a miopátiák tüdőérintettségének kiterjedtségének vizsgálatára [26-28]. A HRCT-n ábrázolódó szubklinikus alveolitisz gyakran társul a tüdő morfológiai eltéréseihez, ami támogatja azt a feltételezést, hogy a gyulladás hozzájárul a kiterjedt tüdőfibrózis kialakulásához. Habár a

HRCT alkalmas a szubklinikus gyulladás kimutatására, normális HRCT esetén is jelen lehet jelentős intersticiális gyulladás [44].

A nagyfelbontású tüdő CT vizsgálat lehetővé teszi a viszonylag nagy számban előforduló tejüveghomály azonosítását. [4;45]. Ennek jelenléte -csak mikroszkóposan felismerhető-intraalveoláris, gyulladással exsudationak és/vagy az alveolusfalak megvastagodásának felel meg.

A vizsgálathoz kapcsolódó, jelentős morbiditás miatt a nyílt tüdőbiopsziát nem alkalmazzák kiterjedten az autoimmun betegségekhez kapcsolódó tüdőérintettség diagnosztizálásában. A bronchoalveoláris lavage-t (BAL) ezzel szemben biztonságos és költségkímélő eljárásnak tekintik számos intersticiális tüdőbetegség vizsgálatában. A BAL értékes információt ad a zajló gyulladással folyamatokat illetően. [18;20;28;43;46]. A BAL-ból nyert sejtek vizsgálatával a szubklinikus alveolitisz diagnosztizálható [18]. Az alveolitiszt a különböző sejtek fokozott beáramlása, illetve az alveoláris mosófolyadékban észlelt arányuk megváltozása jellemzi. Jellegzetes hypercellularitás észlelhető a BAL-ban, amely részint az alveoláris makrofágok abszolút számának növekedésével, részint a limfociták és/vagy granulociták (neutrofil, eozinofil) számának és arányának emelkedésével magyarázható.

### **1.1.3. A légzőszervi érintettség és a létrejöttében szerepet játszó mehanizmusok**

#### **1.1.3.1. Az alveolitisz formái és megjelenése**

A bronchoalveoláris lavage mosófolyadékban található sejtek vizsgálatával fény derült arra, hogy a szisztémás autoimmun betegségek jelentős részében -klinikailag minimális tünetekkel kísért, illetve gyakorta szubklinikus zajló- a kislégutakat, alveolusokat érintő gyulladás áll fenn [47]. Az alveolitisz a BAL sejtanyag megnövekedése, illetve az egyes sejtípusok arányának megváltozása formájában mutatható ki. Ennek alapján megkülönböztetünk limfocitás, granulocitás vagy kevert alveolitiszt. Limfocitás alveolitisz gyakorta jelentkezik az extratorakális granulomatózisokban (Crohn betegség, primer biliáris cirrhosis, extratorakális szarkoidózis) és néhány szisztémás autoimmun kórképben (Sjögren szindróma, reumatoid arthritisz, szisztémás lupus erythematosus). Neutrofil alveolitisz jelentkezik túlnyomórészt a kollagenózisokban, különösen szisztémás szklerózis, dermatopolimiozitisz és kevert kötőszöveti betegségben. Az eddigiekből is kiténik, hogy bár bizonyos kapcsolat az alveolitisz formája és a betegség közt fennáll (pl. CD4+ alveolitisz Boeck szarkoidózisban, vagy CD8+ sejtek túlsúly a DM-PM-es betegek alveolitiszében) a különböző típusú alveolitisz jelenléte nem specifikus egy-egy kórképre; jelenléte inkább a tüdőfolyamat aktivitási jelének fogható fel.

#### **1.1.3.2. Az ANCA pozitív vaszkulitisz kialakulásának immunológiai mechanizmusai**

A WG és a PR3-ANCA közti szoros összefüggés, illetve a betegség aktivitása közti kapcsolat miatt ezen antitesteknek a vaszkulitisz kialakításában játszott szerepe a kutatások fontos tárgyát képezi. A betegek egy jelentős részében elkülöníthető a betegség kétfázisú lefolyása. A kezdeti stádiumra granulóma képződés, míg generalizált stádiumra ezzel szemben az ANCA autoantitestes, vaszkulitiszes aktivitás a jellemzőbb. Az, hogy a WG betegből származó T sejteknél proliferációs választ váltható ki tisztított proteináz 3 (PR3) hozzáadásával, a T sejtek patogenetikai fontosságát látszik alátámasztani. A Wegeneres granulómák szövetmintáiból egyértelmű Th1-es citokinprofil mutatható ki [48;49].

Jelenlegi ismereteink alapján az aPR3-ANCA szerepét az ún. „ANCA sequence theory”-val magyarázzuk. Eszerint a gyulladásos citokinek hatására -melyek fertőzés kapcsán is felszabadulhatnak- a nyugvó granulocitákban csak a membránnal borított granulomokban megtalálható PR3 membránexpressziója jön létre [49]. Az ANCA antitestek és ezen célpontmolekulák kölcsönhatása következtében a sejtek degranulálódnak ami az endothel károsodáshoz, illetve következményes vaszkuláris károsodáshoz vezet [50;51]. Az ANCA képes TNF $\alpha$ -val előkezelt granulocitákból oxigén szabadgyök, lizoszomális enzimek, eikozanoidok szekrécióját kiváltani, aminek következtében ezek a sejtek az endothelsejtekhez kitapadni, és azokat károsítani képesek. Ezen mechanizmus mellett több más, az ANCA pathogenetikai szerepére utaló *in vitro* adat áll rendelkezésre. Többek közt a granulociták PR3 membrán expressziója létrejöhet apoptózis kapcsán is. ANCA hozzáadása esetén az apoptotikus granulocitákat eltakarító makrofágokban TNF $\alpha$  szekréció mutatható ki, míg egyébként a fagocitózist gyulladásos mediátorok felszabadulása nem kíséri. Mayet és munkatársai citokinekkal (TNF $\alpha$ , IL-1  $\alpha/\beta$ ) előkezelt emberi endothelsejteken PR-3 expresszióját tudták demonstrálni. Anti-PR-3 antitestek ezeken a sejteken vaszkuláris sejt adhéziós molekula-1 (VCAM-1) expresszióján keresztül citotoxikus hatást fejtettek ki [52;53].

### **1.1.3.3. Granuloma képződés mechanizmusa, a szarkoid és a Wegener granulomatózis kialakulásával kapcsolatos ismeretek**

A granulomatózus reakciókat az intracelluláris kórokozók terjedését megakadályozó fiziológiás folyamatnak tekinthetjük. Emellett számos kémiai anyag fehérjékkel képezett komplexe előidézheti a granulómák keletkezését (berillium, alumínium, cirkónium, és egyéb nem immunogén kemikáliák, mint a szilikátok, a bárium, olajak, talkum, stb.) Emellett azonban granulómák képződése jellemez számos, ismeretlen eredetű, szisztémás betegséget, mint a szarkoidózis, a Crohn betegség, vagy a Wegener granulomatózis, ahol a granulómák protektív szerepe nem ismert, jelenlétük a szöveti károsodás részjelensége. A tüdő granulomatózus károsodásának mechanizmusáról legtöbb részlet a szarkoidózis és a Wegener granulomatózisban észlelhető granulómákkal kapcsolatban ismert, mindazonáltal jelen ismereteink igen hiányosak ebben a tekintetben. E két granulomatózis több hasonlóságot is mutat, ezért a granulomaképződéshez vezető mehanizmusokkal kapcsolatos ismereteket a két kórképet összehasonlítva rendszereztük.

A szarkoidózis ismeretlen etiológiájú, több szervrendszert érintő megbetegedés. Rendszerint fiatal felnőtteknél jelentkezik, gyakorta a hiláris nyirokcsomók megnagyobbodásával, tüdőinfiltrációk kialakulásával, és a szem, valamint a bőr érintettségével jár. Immunológiai eltérések közül a késői túlérzékenységi reakciók csökkenése, a CD4/CD8 sejtek arányának megváltozása, a Th1 típusú sejteknek az aktivitás helyére történő beáramlása, B sejt hiperaktivitás és keringő immunkomplexek jelenléte jellemzi. Wegener granulomatózisban ehhez hasonlóan több kutatócsoport is Th1 típusú citokinek fokozott termelését és a granulóma területén CD4 sejtek fokozott megjelenését írta le [48;54].

A granulómák fénymikroszkópos és immunfluoreszcenciás képe azt sugallja, hogy kialakulásukban egy ismeretlen, a betegség aktivitási helyén perzisztáló antigénnel szembeni, fokozódó immunológiai folyamat játszhat szerepet. Számos betegben a gyulladásos és a gyulladást csökkentő tényezők egyensúlyának felborulása kiterjedt szövetkárosodást és következményes irreverzibilis fibrózis kialakulását idézi elő

A CD4+ sejteknek és a monocita-makrofágsejteknek a gyulladás helyén történő felhalmozódása jelenti a granulomaképződés első lépcsőjét. A szarkoidózisos betegségaktivitást mutató szövetekből -legyen az tüdő, lép, nyirokcsomó, konjunktíva, bőr vagy egyéb szövet- rendszeresen kimutatható a CD4+ sejtek infiltrációja. A gyulladásos sejteknek a gyulladás helyén történő felhalmozódása két úton jöhet létre. Egyrészt fokozódik

ezen sejteknek a keringő vérből történő kivándorlása, másrészt a gyulladásban résztvevő sejtek *in situ* proliferálnak. A CD4 pozitív T sejteknek a szarkoid granulómához történő vándorlásában a szarkoidózisos tüdőből kimutatható IL-16 és IL-8 kemotaktikus hatásának van komoly szerepe. Hasonlóan szerepet játszhat az IP-10 (CXC kemokin), melynek az aktív folyamatokban jelentősen magasabb a szintje, ami összefüggést mutat a BAL-ban észlelt limfocitózissal. Ennek a kemokinnek a receptora (CXCR-3) a Th1 sejtek felszínén fellelhető. Az IP-10 mellett a CXCR3 receptor által felismert egyéb INF $\gamma$  által indukált kemokinek (mint az INF $\gamma$  indukált monokin (Mig), vagy az INF $\gamma$  indukált T sejt kemoattraktáns (I-TAC)) is szerepet játszanak a szarkoid granuloma körüli limfocitagyűrű kialakításában. A WG-es betegek granulómáinak vizsgálatakor emelkedettnek találták a CCR5 és CCR3 expressziót, ami szintén a Th1 jellegű memóriasejteknek a granulomaképződés helyére történő vándorlásában játszhat szerepet [55;56].

Az utóbbi évek kutatásai alapján bizonyítottnak tűnik, hogy mind a limfociták, mind a makrofágok aktívan proliferálnak a granulomaképződés helyén. A Th1 citokinek, mint az IL-2, helyi növekedési faktorként hatnak a szarkoid T limfocitákra. Az IL-2 mellett az IL-15-nek is hasonló hatása lehet. Ez utóbbi szinergikus hatás fejt ki az IL-2-vel (melynek biológiai hatása, és receptora  $\beta/\gamma$  IL2-R részben közös) és az INF $\gamma$ -val. Hatására fokozódik a GM-CSF és TNF $\alpha$  termelés és emellett kemotaktikus hatása is van. Az IL-15 potens induktora a CC-, CXC-, és C típusú kemokinek termelésének. A szarkoidózisos szövetekben az infiltráló makrofágok IL-15 szekréciója mutatható ki, melynek szerepe lehet a T sejtek kemotaxisában és növekedésében.

A szarkoidózisos T sejteknél a T sejt receptor korlátozott használatára utaló adatok is napvilágot láttak. Ennek a jelenségnek többféle magyarázata lehet. Egyrészt elképzelhető, hogy egy ismeretlen antigén hatására alakul ki a megfelelő V $\alpha$ , V $\beta$  régiók klonális expanziója. Azonban szuperantigén (mint a mikobakteriózisos esetén) stimuláció is magyarázhatja a jelenséget. A TCR receptor oligoklonális expanziójára utaló jelet Wegener granulomatózisos betegek BAL vizsgálata során nem tudtak azonosítani [57], míg a perifériás vérrel kapcsolatos vizsgálatok ellentmondásosak [58;59].

Számos bizonyíték utal arra, hogy a T sejtek fontos szerepet játszanak a WG gyulladással járó folyamataiban. Ezek a sejtek jelentős számban jelen vannak a granulómákban és a belőlük származó sejtklonok túlnyomórészt egyértelmű Th1-es citokinprofil mutatnak [48;49]. Emellett a keringő T sejtek magas részarányban aktiváltak, amint az a fokozott HLA-DR és CD25 (IL-2 receptor) expressziójukból kitűnik. Mind ez utóbbi hasítási terméke sCD25 (sIL-2 receptor) mind a szolubilis CD30 szintje emelkedett WG-ben, illetve ezen T sejt aktivitási markerek szintje szoros összefüggést mutat a betegaktivitással [60].

#### **1.1.3.4. Th1/Th2 citokinprofil változása granulomatózus folyamatokban**

A T sejtek a szervezet védekezését elsődlegesen az általuk szecernált citokinek útján irányítják. Széles körben elfogadott, hogy a T sejt klónok heterogének citokinszekréciójukat illetően, és így heterogén a specifikus immunválasz indukációjára való képességük. Azonban az, hogy az így kialakult citokin minta milyen mértékben képes tükrözni az élő szervezetben jelenlévő memória/effector sejtpopulációk viszonyait; nagyjából ismeretlen [61].

A betegség korai szakaszában a szarkoid granulomás területek dominánsan Th1-es citokinprofilt mutatnak, amit a INF $\gamma$  és IL-2 emelkedett mRNS és proteinszintézise jellemez. A Th1-es válasz hatása a granuloma szerveződése és a fibrogenetikus folyamatok gátlása. Azonban a beteg hajlamától függően egy Th2 irányú eltolódás (Th2 switch) jelentkezhet progresszív szarkoidózissal ami tüdőfibrosis kialakulásához vezet [62]. Ezekben az esetekben a tüdőben található T sejtek Th2 citokinek szecernálnak, ideértve IL-4-et, ami az extracelluláris mátrixproteinek fokozott szintézisét és a fibroblastok számára kemoattraktáns



molekulák szintézisét váltja ki. Az IL-4 hatására a granulomatózus léziókban a fibroblastok hiperpláziája figyelhető meg, valamint az IL-4 serkenti a mesenchymális sejtpopulációt, ami megnövekedett extracelluláris mátrixlerakódáshoz vezet a granulóma környékén.

A Th1/Th2 váltáshoz vezető kulcsingerre vonatkozó adatok ellentmondásosak. Számos adat utal arra, hogy az INF $\gamma$  szekréción és az aktivált T sejtek proliferációját serkentő hatású IL-12-nek szerepe lehet a granulomatózus szövetben lejátszódó Th1 differenciálódásban. Legalábbis a korai esetekből származó szarkoid szövet makrofágjai in vitro kultúrában nagy mennyiségű IL-12-t produkálnak. Emellett ismert, hogy aktív szarkoidózisos betegek BAL mintáiban a p40 (IL-12 subunit) emelkedett szintjét mutatták ki. Szarkoidózisos tüdőből izolált CD4+ Th1 sejtek felszínén pedig kimutatható az IL-12 receptor funkcionális  $\beta$ 2 lánc, míg ez a Th2 típusú citokinszekréción mutató sejteken nem található meg. Az IL-12-höz hasonlóan, az IFN- $\gamma$ -indukáló faktorként is azonosított Interleukin-18 (IL-18) is fontos szerepet játszik a T helper 1 (Th1) válaszban. Szarkoidózisos betegekben mért szérumból és BAL szintje korrelációt mutat az INF $\gamma$  szinttel [63]. A T sejt aktiváció kialakításában feltehetően AP1 és NF- $\kappa$ B mediálta, fokozott IL-2 génexpresszió indukálásával játszik szerepet [64].

A fentiekkel analóg folyamatokat feltételeztek Wegener granulomatózisban is. Az iniciális, granulomatózus folyamatokat követően, a generalizált fázisban szisztémás vaszkulitisz és autoantitesttermelés, azaz Th2 jellegű mechanizmusok jelennek meg. Ennek és annak ellenére, hogy a vér szolubilis CD30 -ami szintén a Th2 jellegű folyamatok markere- szintje emelkedett WG-ben és ennek mértéke korrelál a betegség aktivitási mutatóival [60], napjainkban a Th1 típusú sejtek predominanciáját tartjuk jellemzőnek erre a kórképre. Ennek fenntartásában jelentős lehet a monociták IL-12 és TNF $\alpha$  termelése, ami az effektív citosztatikus kezelést követően normalizálódik [65].

### **1.1.3.5. Kostimulációs mechanizmusok a T sejtek aktivációjában, a CD28 expresszió változása különböző kórképekben**

A Wegener granulomatózis kórerredete az ANCA asszociált vaszkulitiszek területén tapasztalt intenzív kutatómunka előrelépései ellenére nem ismert. Számos jel bizonyítja, hogy ebben a folyamatban a T sejteknek fontos szerepük lehet. [48;49].

A CD4+ memória T sejtek számos potens effektor citokin szekréción útján koordinálják a vírusok és más patogének elleni immunválaszt. Ezért a CD4+ (T helper, Th) sejteket az adaptív immunrendszer fő szabályzó elemeiként tartjuk számon. Ezek a sejtek az antigénprezentáló sejtek (APC) felszínén, MHCII. molekula mellett bemutatott idegen fehérjéket a T sejt receptorral ismerik fel (TCR). Aktivációjuk során a CD4+ sejtek az immunválasz számos szintjén vezénylő szerepet játszanak. Ezen szerepüket citokin szekréción útján fejtik ki, így aktiválva és inaktíválva az immunválaszban résztvevő többi sejtet. Nem meglepő, hogy a T sejtek aktivációjára szoros, finoman szabályozott kontroll mechanizmusok révén történik [66].

A T limfociták aktivációjára igen összetett folyamat. Az antigénspecifikus T sejt receptor (TCR) az antigénprezentáló sejt (APC) - melyek lehetnek B limfociták, makrofágok, vagy dendritikus sejtek - felszínén, HLA molekulákhoz kapcsolatosan képes a peptidfragmentumok felismerésére. Ez a CD4 pozitív sejtek esetén az antigént második osztályba tartozó HLA (HLA-DR, DQ) míg a CD8 pozitív sejtek számára az első osztályba tartozó HLA (HLA A, B, C) melletti antigén prezantációval történik. Az azonban, hogy a T sejt receptor és az antigén kapcsolódását aktiváció, tolerancia kialakulása vagy a T sejtek apoptózisa követi, az APC-k és a T sejtek felületén expresszált egyéb molekulák által közvetített, másodlagos, ún. kostimulációs szignál függvénye. Az optimális CD4+ sejt aktiváció többszörös jelátviteli mechanizmust feltételez, melyben a TCR-CD3 komplexum mellett a CD28 vagy más (pl.

CD40-CD40 ligand) kostimulációs út vesz részt. A legismertebb ilyen rendszer a CD28, CTLA-4, ICOS, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86) molekulákkal kapcsolatosan ismert.

A CD28 a T sejteken található, míg ligandjai a B7-1 (CD80), és a B7-2 (CD86) az APC-ken jelenik meg. A T sejteken a TCR(CD3) és CD28-on keresztül kifejtett inger (pl. CD3 és CD28 elleni antitesttel) aktivációs folyamatokat indít meg, illetve a CD28-on keresztül egyidejűleg érkező szignál a T sejt receptor ingerlésével kiváltott választ erősíti. A CD28-al nagyfokú homológiát mutató CTLA-4 molekula aktivált T sejteken jelenik meg, ligandjai megegyeznek a CD28-al és hatására az aktiváció lecsengése alakul ki, ami a gyulladásszerű folyamatok korlátozásában játszott szerepére utal. A szintén rokon ICOS is aktivált limfocitákon jelenik meg, azonban benne a B7-1 és B7-2 felismeréséhez szükséges MYPPPY motívum hiányzik, ezért feltehetőleg más ligandok receptoraként funkcionál. Az ellene képzett antitestekkel történő ingerlés az anti-CD28-al hasonló mértékű kostimulációs potenciált mutat, azzal a különbséggel, hogy hatására az IL-2 termelés nem fokozódik, míg az IL-10 termelést a CD28-al kiváltható sokszorosára fokozza. Mivel az ICOS expressziója anatómiailag azokhoz a helyekhez kötött, ahol a T sejtek a B sejtek terminális differenciálódását idézik elő feltehető, hogy a molekula a T-B sejt kommunikációban, esetleg a Th1/Th2 switch kialakulásában játszhat szerepet [67].

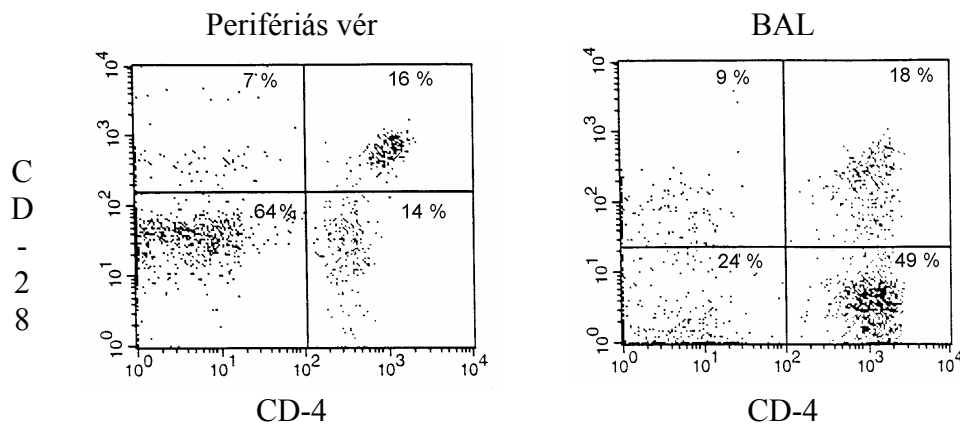
Számos kóros állapotban, ezek közt reumatoid artritiszben [68], Wegener granulomatózisban [69] és HIV fertőzésben leírták egy olyan T sejt populáció jelenlétét, ami a CD28 expressziót nem mutat. A Tc (CD8) pozitív sejtek közt ez a fenotípus -ami a CD45RA, CD11a, CD11b pozitivitással és CD62L (L-szelektin), CD27 és CD28 negativitással, jelentős INF $\gamma$ , TNF $\alpha$  szekrécióval és IL-2 IL-4 szekréció hiányával jár- az effektor funkciót betöltő citotoxikus T limfocitákra (CTL) jellemző [70]. Az egészségesek közt CD4+ CD28- sejt csak igen kis százalékban fordul elő. A WG-ban észlelt a CD28- sejtek gyakoribb előfordulása mellett *in vitro* aktivációt követően az APC-k megnövekedett B7 expresszióját is leírták [69].

Martens és munkatársai reumatoid artritiszes betegekben a CD4+ sejteken belül a CD28 molekula expressziójának hiányával jellemezhető sejtcsoportot írtak le [71]. Bár ilyen sejtek igen kis számban fordulnak elő, bimodális előfordulásuk alapján megkülönböztethető egy "nem-hordozó" és egy "hordozó" fenotípus, melyek közül az utóbbit a CD4+CD28- sejtek emelkedett számaránya jellemez. Ugyanezen csoport a "hordozók" magasabb arányát találta az RA-es betegek, mint az egészségesek közt. A betegek közt az extraartikuláris manifesztációjú betegek gyakrabban voltak hordozók (80%) ami ezen CD4+ sejt fenotípusnak a súlyosabb betegségfolyásával való kapcsolatát mutatta. A CD4+CD28- fenotípus korrelált az extraartikuláris betegségfolyással, míg sem a betegség tartamával, sem az antireumatikus kezeléssel, sem az ízületi destrukció fokával nem mutatott összefüggést [71].

Mind egészségesekben, mind RA betegekben a CD4+ CD28- sejteket oligoklonális eredetűnek találták. A sejtek limitált TCR diverzitása azt sugallja, hogy ezek a sejtek az antigének egy limitált spektrumát ismerik fel [72]. Az izolált sejtek pozitív reakciót mutattak autológ kevert limfocita tesztben, és a T sejt klónok proliferációs reakciót mutattak autológ vér adherens sejtek mellett. Ennek alapján felmerült, hogy a CD4+CD28- sejtek a perifériás toleranciából kilépett sejtek, amelyek autoimmun sajátosságokkal rendelkeznek [73].

Moosig és munkatársai vizsgálták Wegener granulomatózisban a CD28 expressziót. Eredményeik szerint a CD28- sejtek aránya a Betegség kiterjedtség index-el (DEI, Disease Extension Index) korrelált [69;74]. Ezen sejtek a granulomatózus aktivitás helyéről (orr nyálkahártya szövetminta), illetve annak közeléből származó (limfocitás alveolitiszes BAL minták) mintákban gyakoribb előfordulást mutattak, [75] **(1. Ábra)** ami alapján ezen sejteknek a gyulladás helyére vagy annak közelébe történő fokozott sequestrációjára enged következtetni. Bár hasonló gyulladás/keringés arányeltolódás a kontrollként vizsgált szarkoidózisos betegben is fennállt, a CD28- sejtek arány jelentősen magasabbnak találták WG-ban mint szarkoidózisban.

A CD28 + CD3 ingerlés Th2 választ okoz, ennek alapján a CD28- sejteknek szerepe lehet a helyi Th1 válasz kialakításában, melyben részben az általuk termelt INF $\gamma$  és IL-2 is szerepet játszhat [76-78].



## 1. Ábra

**A T limfociták CD28 expressziója ugyanazon, generalizált WG-os beteg perifériás vér és BAL mintájában.**

Az ábra a minták felszíni fluoreszcens jelölést követő, a CD45 és CD3 pozitív limfocitákra kapuzott FACS analízisét mutatja be. A pozitivitás határának megállapítása izotípus kontroll antitestek segítségével történt, a két vizsgálat nem azonos fluoreszcenciakompensációs beállításokkal készült. Saját nem publikált mérési eredmény, a technikai részleteket illetően utalunk a Módszerek fejezetre.

### 1.1.3.6 A humán citomegáliavírus hordozókban észlelt immunológiai eltérések különös tekintettel a CD28 expresszió változására

A humán citomegália vírus a herpeszvírusok családjához tartozik. A vírus ubiquiter, és napjainkban károsodott immunrendszerű betegek közt komoly mortalitás kapcsolódik hozzá, míg ép immunrendszerű egyéneknél látens vagy minimális klinikai tünetekkel járó infekciót okoz. A CMV fertőzés következtében vaszkulitisz is kialakulhat, bár ez nem jelenik meg minden fertőzöttben. A CMV számos, bonyolult védekezési mechanizmust fejlesztett ki, ami segítségével elárasztja a megfertőzött szervezetet, és ott egy életen át tartó latenciát/perzisztenciát alakít ki. Mai ismereteink szerint immunaktivációs mechanizmusok szükségesek a vírusnak a myeloid vonalhoz tartozó sejtekben történő perzisztálásából/latenciájából történő kilépéshez, és új vírusok szintéziséhez. Ezen folyamatok során számos, az immunrendszerrel kölcsönhatásba lépő fehérje szintézisére kerül sor. Az ép immunrendszerű fertőzöttek jól kontrollálják a fertőzést, azonban az infekció alatt, illetve a gyógyulás után számos immunológiai funkcionális változás játszódik le. Jellegzetes változások alakulnak ki a limfocita szubpopulációkban, ami leginkább a CD8+ limfocitákat valamint az NK sejteket érintő expanszió és aktiváció.

Másrészről a CMV -az egy élet során tartó- perzisztálásához számos, az immunrendszer figyelme alóli szökési stratégiát alkalmaz. A CMV megakadályozza a fertőzött sejtek I. osztályú MHC expresszióját, és csökkenti a makrofágok INF $\gamma$  hatásra bekövetkező MHC II

függő antigénprezentációt. expresszióját. Emellett a virális peptidek T sejtek által történő bemutatását akadályozó fehérjéket kódol [79-81].

A HLA-I. expresszió gátlása lehetővé teszi ugyan, hogy a vírus, illetve a fertőzött sejt elkerülje a CD8+ T sejtek általi felismerését, ugyanez a mechanizmus az NK sejtek számára teszi hozzáférhetővé. Nemrégiben napvilágot látott eredmények szerint a vírus, ezen sejtekkel szemben is rendelkezik védekező mechanizmussal. Vírus által kódolt HLA homológok az NK sejteken gátló szignált közvetíthetnek. A csökkent HLA-I. expresszió által kiesett negatív szignál hiányát ellensúlyozza, hogy bizonyos vírus termékek, köztük az UL-40 glikoprotein, a HLA-E expresszió fokozzák [82].

A CD57+CD28-CD8 T sejtek expanziója számos vírusinfekció jellemző velejárója (CMV, HIV) Ezek a memória CTL-ek a vírusfertőzött sejtekre specifikusak és így oligoklonalitás jellemzi őket [83]. Hooper és munkatársai közöltek elsőként adatokat a citomegalovírus szeropozitivitás és a CD4+CD28- és CD8+CD28- sejtek expanziója közti kapcsolatról RA-s betegekben [84].

Korábban a CD28 expresszió csökkenését korfüggőnek írták le több vizsgálat során [85]. Mivel a CMV átfertőzöttség is korfüggő, nem egyértelmű, hogy a két faktor közül melyik játszik független faktorként szerepet a CD28 expresszió csökkenésének kialakulásában. Ellentmondásos adatok láttak ez idáig napvilágot ebben a kérdésben, ha a CMV szerológiai státuszt is figyelembe vették [85;86].

Mind egészségesekben mind transzplantált betegekben szoros korrelációt írtak le a CMV infekció és a CD57+ (CD28-) CD8<sup>high</sup> T sejtek emelkedett aránya közt. A CMV másodlagos expozíciója a CD8+ sejtek által mediált másodlagos memóriaválaszt indít el. Míg számos adat ismert a CD8+ sejt-kompartimentben bekövetkező változások kinetikájáról [87;88] viszonylag kevés az ismeretünk a CD4+ sejtek szerepéről és annak kinetikájáról.

## **2. Célkitűzések**

Célunk a szisztémás autoimmun betegek tüdőérintettségének aktivitására utaló jeleinek vizsgálata volt. Ezeket kerestük a rendelkezésre álló, modern, non-invazív diagnosztikai eszközök segítségével észlelt eltérések közt, és próbáltuk eldifferenciálni a nem aktív jelektől. Laboratóriumi vizsgálataink során a BAL folyadék, és a perifériás vérből nyert minták vizsgálatával próbáltunk a klinikai kép kialakításáért felelős immunológiai eltéréseket kimutatni.

### **2.1. Bronchoalveoláris lavage (BAL) sejtösszetételének vizsgálata kezelt DM/PM-es betegeknél**

Vizsgálataink során a DM/PM klinikai/laboratóriumi jeleit, ezek előfordulási arányát kívántuk vizsgálni a pulmonális érintettség megítélése céljából. Arra kerestünk választ, hogy az izomfolyamat tekintetében remissziót mutató DM/PM-es betegcsoportból non-invazív vizsgálati stratégia segítségével kiemelhetőek-e az immunszuppresszív kezelés mellett, a betegség remissziója ellenére fennálló, alveolitiszes betegek.

Mivel egyéb kórképekben szerzett ismeretek alapján az alveolitisz típusa, annak terápiás válaszkészségét befolyásolja, meg kívántuk határozni az alveolitisz ezen betegcsoportra jellemző, típusát (limfocitás/granulocitás).

Célul tűztük ki az alveoláris makrofágok osztódási arányának vizsgálatát, annak kiderítésére, hogy az alveoláris térbe történő monocita sejtinflux mellett, a helyi proliferációnak mekkora szerepe van a mosófolyadékban észlelt emelkedett sejtszám kialakításában, és ez milyen összefüggésben állhat az alveolitisz egyéb jellemzőivel.

### **2.2. Wegener granulomatózisos betegek tüdőérintettségének HRCT vizsgálata**

A betegek követése során kiemelt jelentőségű annak megítélése, hogy az adott képalkotó eljárások által leírt morfológiai eltérések mennyiben tükröznek destruktív folyamatokat és mennyiben csak azok lezajlása utáni, részben reparatív, részben inaktív maradványok. A HRCT alkalmas számos, hagyományos röntgennel nem kimutatható eltérés ábrázolására, melyek diagnosztikai jelentősége még nem teljesen tisztázott. Ezért egy követéses tanulmányt készítettünk, megválaszolando a következő kérdéseket:

- milyen reziduális károsodás marad a standard immunszuppresszív kezelést követően a WG-os betegek tüdejében?
- lehetséges-e a HRCT segítségével elkülöníteni az aktív gyulladást és az inaktív, heges léziókat, illetve a leírt morfológiai eltérések mennyiben tükröznek destruktív folyamatokat; és mennyiben azok lezajlása utáni részben reparatív, részben inaktív maradványok.
- a perzisztáló kerekárnyékok gyulladást fészekként a relapszus magasabb gyakoriságával járnak-e.

### **2.3. T limfocita alcsoportok és monocita citokinszekréció vizsgálata Wegener granulomatózisban**

Célul tűztük ki a Wegener granulomatózisos betegek T sejt szubtypusainak és monocitának vizsgálatát, elemezve azok fenotípusos és funkcionális sajátosságait, különös tekintettel a Th1/Th2 immunregulációban szerepet játszó citokinek expressziójára.

Vizsgálatokat terveztünk a korábban a Wegener granulomatózisban is leírt, CD28-at nem vagy csökkent mértékben expresszáló sejtek kompartmentizációjának és citokinszekréciójának jellemzésére.

Elemezni kívántuk a citomegalovírus (CMV) szeropozitivitás és a T-helper sejtek CD28 expressziója közti összefüggést, és a CMV fertőzés esetleges a Wegener granulomatózis klinikai képét módosító hatását.

### **3. Beteganyag és Módszerek**

#### **3.1. Bronchoalveoláris lavage sejtösszetételének vizsgálata kezelt DM/PM-es betegekben**

A POTE II. sz. Belgyógyászati Klinika Immunológiai osztályán gondozott 30 DM/PM beteg közül non-invazív vizsgálatok alapján kiválasztott 8 és 2 ugyanezen metodikával kiválasztott szkleroderma / miozitisz overlap szindrómás beteg került a vizsgálatba bevonásra.

A tüdőérintettségre gyanús betegek kiválasztására az alábbi vizsgálati protokollt alkalmaztunk: a vizsgálat tapasztalt pulmonológus által végzett fizikális vizsgálattal és áttekintő mellkasröntgen felvétel értékelésével kezdődött. A felvételen ábrázolódó bibaziláris vagy diffúz fibrózis jelét tekintettük a pulmonális manifesztációt illetően kórjelzőnek. A betegek légzésfunkciós (System 2800 Whole Body Plethysmograph, Sensor Medics, USA), és szénmonoxid diffúziós kapacitás vizsgálatokon estek át. A légzésfunkciós paraméterek - a vitálkapacitás (IVC) a teljes tüdő kapacitás (TLC), a CO diffúziós kapacitás (DLCO) és az alveoláris térfogatra számított CO diffúziós kapacitás (DLCO/VA) - kiszámításánál a nemzetközi normáknak megfelelő referencia értékeket és minőségbiztosítási követelményeket alkalmaztuk [89]. Az IVC vagy TLC a korhoz és nemhez egyeztetett elvárt érték 80%-a alá történő csökkenését tekintettük kórosnak. Ehhez hasonlóan diffúziós kapacitás csökkenését a várt érték 80%-a alatt mondtuk ki. A tüdő érintettségét azon esetekben mondtuk ki, ahol a mellkasfelvételen tüdőfibrózis, és/vagy restriktív légzésfunkciós elváltozás vagy csökkent diffúziós kapacitás igazolódott.

##### **3.1.1. Nagyfelbontású tüdő CT (HRCT)**

A fent említett módszerekkel kiszűrt eseteknél az eredmények további finomítása, pontosabb meghatározása céljából nagy felbontású tüdő CT vizsgálatot végeztünk (HRCT). Tejüveghomály és/vagy fibrózis jelentkezése esetén az aktív alveolitisz kizárására BAL vizsgálatot végeztünk.

A tüdő HRCT egy 3. generációs, nem-spirál eszközzel (Somatom AR HP, Siemens, Erlangen, Németország) antero-posterior, fekvő helyzetben, normál légzés közben, nagyfelbontású algoritmussal (HiRes Lung scan), kontrasztanyag nélkül, natív módban készült a következő beállításokkal: slice thickness 2mm, detector side collimator setting 2 mm, slice distance: 10 mm, 130 kV és 210 mA. windowing method: default HiRes Lung setting (c:1000, w:-700) (minimális módosítással az optimális képértékeléshez) és 3 sec/scan, 20 slices, vizsgálati idő: összesen közel 3 perc. A tejüveghomály és a fibrózis értékelését két egymástól független radiológus végezte.

##### **3.1.2. Bronchoalveolaris lavage (BAL)**

Pulmonális érintettségre utaló panaszok, mellkas röntgen és légzésfunkciós módszerekkel kiszűrt eseteknél nagy felbontású tüdő CT vizsgálatot végeztünk (HRCT). Tejüveghomály és/vagy fibrózis jelentkezése esetén az aktív alveolitisz kizárására BAL vizsgálatot végeztünk. A bronchoalveoláris lavage (BAL) vizsgálatot csak nem dohányzó betegeknek, illetve azon dohányzó betegeknek végeztük el, akik minimum 3 hónapja el tudták hagyni a dohányzást. 5 egészséges, nem-dohányzó önkéntes vizsgálatából származó adatokat használtuk kontroll értékeként. A vizsgálat során standard technikát alkalmaztunk [43] hajlékony fiberoptikás bronchoszkóp használatával. A BAL öblítést egy, a középső lebony szubszegmentális bronchusában, 40 ml szobahőmérsékletű fiziológiás só oldat öt aliquotjának injekciójával

végeztük. Az aspiráció óvatos fecskendő-szívással történt. 50 ml-es műanyagfecskendőket használtunk. A „recovery”  $54 \pm 17\%$  volt. A visszanyert folyadékot enyhén alkalizáltuk (1:10 v/v 4,2% NaHCO<sub>3</sub> per BAL folyadék). Steril gézen történő átfiltrálás követően a folyadékot lecentrifugáltuk (400g, 4°C, 15 min.). A sejt pelletet használtuk a további vizsgálatok során. Kvantitatív és May-Grünwald-Giemsa szerint festett citocentrifugás preparátumon kvalitatív sejtszámolást végeztünk. A viabilitást trypan-kék kizárásos módszerrel vizsgáltuk, ami minden esetben 95% felett volt.

5 egészséges nem-dohányzó önkéntes vizsgálatából származó adatokat használtuk kontroll értékeként. Az egészséges kontrollcsoportban észlelt átlagértéket a szórás kétszeresével meghaladó sejtszámokat (mean + 2 SD) tekintettük emelkedettnek (azaz. 87.000/ml feletti értékeket a BAL összsejtszám, 3.720/ml a BAL neutrofil, és 12.200/ml BAL limfocita számnál). Limfocitás és granulocitás alveolitisz diagnózisát abban az esetben mondtuk ki, ha az adott sejtpopuláció abszolút sejtszáma meghaladta a fenti normál értékeket. Ha mind a limfocita és granulocita szám emelkedése jelen volt, ezt kevert alveolitiszként értékeltük. A Mann-Whitney féle U-tesztet használtuk a csoportok közti összehasonlításra. A nem-paraméteres analízis használatának oka az volt, hogy a BAL egyes sejtes komponensei nem mutattak normál eloszlást, és több esetben az összehasonlításra kerülő értékek szórása jelentősen különbözött.

Az alveoláris makrofágok proliferációját immuncitokémiával, streptavidin-biotin-peroxidáz módszert használva a Ki-67 proliferációs sejtmag antigén jelölésével határoztuk meg. Ugyanezen mintákban CD11a és CD11b festéseket is végeztünk. Ezen vizsgálatokra 11 SSc-os, 10 nem differenciált kollagenózisos, 8 DM/PM-es és 3 szkleroderma-miozitisz átfedő szindrómás, pulmonális manifesztációjú beteg esetén került sor.

### **3.1.3 A DM/PM-es betegek klinikai jellemzői**

A vizsgálatra a POTE Etikai Bizottságának engedélyével, valamennyi résztvevő felvilágosítását és írásos beleegyezését követően került sor. A bronchoalveoláris lavage vizsgálatra non invazív módszerekkel kiválasztott mind a nyolc miozitiszes beteg megfelelt a DM/PM diagnosztikai kritériumainak [90], ami mindegyiküknél izombiopsziával is megerősítésre került. A betegek életkora  $48.6 \pm 8.5$  év, átlagos követési idejük  $2.5 \pm 0.9$  év volt. 3 betegnél dermatomiozitisz, 5 esetben polimiozitisz volt a diagnózis. Egy betegnél a dermatomiozitisz uterus cervix carcinomával kapcsolatban, paraneopláziás tünetként jelentkezett. 2 betegnél jelentkeztek nyelési problémák. Légzési elégtelenség nem fordult elő. Raynaud jelenség 3 esetben, poliartritisz 6 esetben jelentkezett. Szkleroderma kapilláris rajzolat 3 esetben volt megfigyelhető. 3 betegben foltos, 1 esetben homogén antinukleáris antitest volt kimutatható HEp-2 sejteken indirekt immunofluorescenciával. Anti-Jo-1 antitest pozitívitas 3 esetben fordult elő. A betegek gyógyszeres kezelése 4-36 mg/nap *methylprednisolone*, és néhány esetben *azathioprine*-t foglalt magában (1. Táblázat). A kezelés hatására a bronchoalveoláris lavage idején mindegyik betegnél az izomfolyamat remisszióját észleltük. A kezdetben emelkedett CK értékek visszatértek a normál tartományba és az izomgyulladás klinikai jelei megszűntek.

A vizsgálatba további két beteg (19 és 46 éves nő) szkleroderma-miozitisz overlap szindrómával került bevonásra. Mindkettejükön limitált kután szisztémás szklerózishoz kapcsolódó nyelőcső és tüdőérintettség miatt kerültek gondozásukba. Mindkettejükön az anti-topoizomeráz és anti-Jo-1 antitest vizsgálat negatív volt. Mindkettejük izombetegsége remisszióban volt.

5 egészséges, nem dohányzó önkéntes képezte a kontroll csoportot. Átlagéletkoruk  $23.0 \pm 2.0$  év volt.



Beteg	Kor (év)	Betegség-tartam (hónap)	Diagnózis	Izom-érintettség	Klinikai jellemzők	Anti-Jo-1 antitest	MP (mg/ die p.o.)	Azathioprine (mg/die p.o.)
1	66	39	DM	P, S	A, G	--	4	50
2	47	4	PM	P	R	--	32	50
3	47	15	PM	P	A	+	20	--
4	40	3	PM	P	A, G	--	4	--
5	53	2	DM	P, S	R, M, G	--	36	--
6	52	75	PM	P	A, R	+	--	--
7	43	12	PM	P	A	--	8	--
8	41	9	DM	P	A	+	8	--
9	19	9	ScI/M	P, S	P, L, C	--	32	100
10	46	50	ScI/M	P, S	A, R, G, L	--	12	100

### 1. Táblázat

#### A BAL vizsgálatra került 10 gyulladássos myopátiás nőbeteg klinikai és laboratóriumi jellemzői.

Jelölések: *DM* dermatomiozitisz, *PM* polimiozitisz, *ScI/M* szkleroderma-miozitisz overlap, *P* proximális izomgyengeség, *S* nyelészavar, *A* artritisz, *R* Raynaud jelenség, *M* malignitás, *G* kapillármikroszkópiával leírt óriáskapillárisok, *L* limitált kután szisztémás szklerózis, *C* szubkután kalcinózis, *MP* *methylprednisolone*

### 3.2. Wegener granulomatózisos betegek tüdőérintettségének HRCT vizsgálata

A vizsgálatba a Lübecki Egyetem Reumatológiai Klinikáján gondozott, 28, aktív tüdőérintettségű WG-os beteget vontunk be. A betegek HRCT vizsgálaton esetek át a remisszió-indukáló kezelés előtt, majd egy második vizsgálatot végeztünk a legalább 6 hónapos remisszió idején. A két vizsgát közt átlagosan 13 hónap (8,9-14,1) telt el. A remisszió-indukáló kezelés tartama 11.0 hónap (interquartile range (IQR): 6-15.2) volt. A betegeket további 26.5 hónapig követtük (IQR: 20.0-33.8) annak megállapítása céljából, hogy a reziduális léziók a relapszusok emelkedett arányát jelzik-e.

A WG diagnózisát az 1990-es ACR kritériumoknak [91] és az 1992-es Chapel Hill-i konferencia definíciójának [92] megfelelően állítottuk fel. Mindegyik beteg aktív generalizált betegségben szenvedett. A klinikai jellemzőket a 2. Táblázatban foglaltuk össze.

17 betegnél az első HRCT, az iniciális diagnózis idején, míg a fennmaradó 11 betegnél relapszus idején történt. A betegség kiterjedtségének és aktivitásának meghatározására a kiterjesztett ELK klasszifikáción alapuló "betegség kiterjedtség mutató"-t, a DEI-t alkalmaztuk [93]. A pontrendszer vaszkulitiszes érintettség szervrendszerenkénti összeszámolásából áll, úgy, hogy minden egyes szervrendszer 2 pontot, míg a konstitucionális tünetek, a megítélés bizonytalansága miatt 1 pontot jelentenek. Ezek a pontrendszerben szereplő kategóriák: E: felső légút; L: tüdő; K: vese; Ey: szem; P: perifériás idegek; H: szív; Gi: gasztrointesztinális; A: reumatológiai tünetek; B:"B" tünetek. Az így kiszámított aktuális DEI a betegség aktivitásának, a kumulatív DEI a vaszkulitisz által okozott károsodás gyors felmérését teszi lehetővé. A DEI értékek középértéke 7.5 (5.0-9.0) volt, ami átlag 3-4 szervrendszer érintettségének felel meg. 23 beteg volt cANCA és 1 beteg pANCA pozitív.

Nő : Férfi (n)	15 : 13
Kor (év)	54.4 (44.7-56.6)
Betegség tartam (év)	25.4 (1.9-6.4)
Első diagnózis : Relapszus (n)	17 : 11
ANCA pozitivitás (n)	23
<b>Szervérintettség (n)</b>	
felső légúti	20
tüdő	28
vese	16
szem	4
perifériás idegrendszer	8
központi idegrendszer	2
szív	2
bőr	5
ízület	12

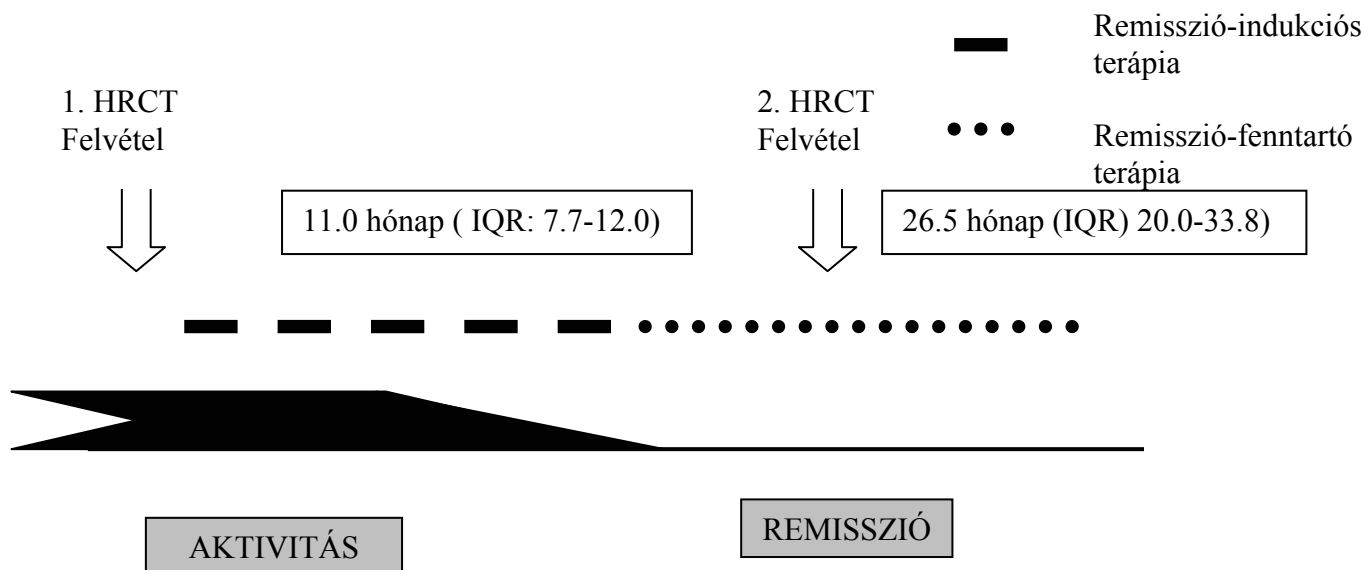
## 2. Táblázat

### A Wegener granulomatózisos betegek klinikai adatai a vizsgálatba történő felvétel időpontjában

A tüdőérintettség vizsgálata a betegvizsgálat mellett spirometriát és két síkban végzett mellkas röntgenfelvételt foglalt magában. HRCT vizsgálatot végeztünk a betegeknél ezek negativitása esetén, ha a beteg tüdőérintettségre utaló klinikai tünetekről számolt be, illetve abnormális légzésfunkciós, vagy a mellkasfelvételen ábrázolódó noduláris vagy lineáris árnyékok jelenléte esetén. Azon betegeket, akiknél pneumonitiszre utaló infiltrátum ábrázolódott, kizártuk a vizsgálatból, mivel ezek jól monitorozhatóak a hagyományos mellkasröntgen felvétellel, ezért CT vizsgálatra, ezen esetekben, nincs szükség. Így egy 28 betegből álló kohort állt fel, melynek tagjai közt 12 esetben a mellkas röntgen negatív, míg 16 esetben kórjelző volt.

#### 3.2.1. Kezelés és klinikai válasz

A kezdeti staging-et követően a betegeknél remisszió-indukáló kezelést kezdtünk, ami napi 100-150 mg per os *cyclophosphamide* (CPH) és *methylprednisolone* (MP)-ből állt. (napi 50 mg kezdődőzist követően lassan napi 5-7.5 mg-ra csökkentve.[94] 2 betegnél akik nem tolerálták a CPH-ot, visszatérő leukopenia miatt *methotrexate* (MTX) (15-22.5 mg/hét) és *methylprednisolone* adásra tértünk át. A remisszió-indukáló kezelés kezeléstartama 11.0 hónap (IQR: 7.7-12.0) volt. A stabil remissziót az Európai Vaszkulitisz Tanulmányozó Csoport (EVSG) kritériumainak megfelelően mondtuk ki. [95]. A remisszió idejére a betegek betegség kiterjedtség indexe (DEI) 7.5-ről (IQR: 5.0-9.0) 2.0-re (IQR: 0-4.0)( $p < 0.001$ ) esett, a Westergreen érték 40.0 mm/óráról (IQR: 25.5-83.0) 19.0 mm/óra (IQR: 14.0-38.5)( $p < 0.001$ ) míg az ANCA titer (reciprok) 256-ról (IQR: 50.8-320) 32-re csökkent (IQR:6.5-128)( $p < 0.001$ ). A remisszió elérését követően a *cyclophosphamide*-ről fenntartó alacsony dózisú MTX vagy *azathioprine*-re (AZT) tértünk át, [94] amit legalább 12 hónapig folytattunk. Az első HRCT vizsgálatot a remisszió-indukáló kezelés előtt; a második vizsgálatot a CPH-ról történő átálláskor vagy a fenntartó kezelés alatt végeztük. A vizsgálat felépítését a 2. Ábra mutatja be.



## 2. Ábra

### A Wegener granulomatózisos betegek tüdőérintettségének nagyfelbontású CT segítségével történő követéses vizsgálat felépítése.

Az aktivitás és a remisszió idején készült HRCT felvételek közt átlagosan 11.0 hónap ( IQR: 7.7-12.0) telt el, majd a betegeket a második vizsgálatot követően átlagosan 26.5 hónapig (IQR) 20.0-33.8) követtük.

### 3.2.2. HRCT

A tüdő HRCT-t Somatom Plus-S komputertomográfjal végeztük (Siemens, Erlangen, Németország). A scan maximális belégzésben a csúcstól a bázis felé haladva fekvő helyzetben történt. (Section 1 mm, table feed 10 mm, 275 mA, 137 kV). Nagyfelbontású frekvencia-rekonstrukciós algoritmust használtunk, a dokumentáció a tüdőparenchymának megfelelő ablakbeállítással történt. (2000/-450 HU). A HRCT-n észlelt eltéréseket a Fleischner társaság nomenklatúra bizottságának ajánlása szerint értékeltük,[96] azzal a módosítással, hogy a kerekárnyék két csoportját (nodules és masses) egy közös kategóriává vontuk össze.

### 3.2.3 Statisztikai feldolgozás

Az adatokat középérték (medián) és a 25-75-ös percentil közötti interquartilis range-ként (IQR) adjuk meg. A kezelésre adott választ Wilcoxon-Mann teszttel és Mann-Whitney U teszttel elemeztük.

## 3.3. Citokinszekréció vizsgálata T limfocita alcsoportokban és monocitákon Wegener granulomatózisban

A limfocita szubpopulációk és a CMV szeropozitivitás vizsgálatába 40, a Lübecki Egyetem Reumatológiai Centrumában gondozott beteget vontunk be.

Perifériás vérmintából és bronchoalveoláris lavage folyadékból izolált fehérvérsejtek áramlási citometriás analízisét, valamint szérum mintákból történő anti-CMV-IgG és IgM meghatározást végeztünk. Meghatároztuk a betegek CD3, CD4, CD28 sejtarányait, és azon

betegek véréből, ahol a perifériás CD4+CD28<sup>-</sup> sejtek aránya meghaladta a CD4<sup>+</sup> sejtek 10%-át, immunglobulinnal kombinált mikromágneses módszerrel (Miltenyi Microbeads) 2 lépésben a CD4+CD28<sup>-</sup> sejtek kinyerésére szolgáló depléciót végeztünk. Az így nyert sejt kultúrákban vizsgáltuk a sejtek jellegzetes felszíni markerkészletét, az anti-CD3 antitest stimuláció hatására jelentkező citokinszekréciót, a tenyészetek felülúszójából végzett ELISA meghatározásokkal, valamint PMA-ionomycin stimulációt követően a sejtek citokinprofilját intracelluláris direkt immunofluoreszcens jelölést követően többparaméteres áramlási citometriával.

A betegség meghatározásához a korábbiakban leírt betegségkiterjedtség indexel határoztuk meg. Disease Extent Index (DEI). Valamint meghatároztuk a BVAS pontszámot ami különböző vaszkulitiszes szimptomák validált és komputerezált értékelésén alapszik. 3. táblázat.

Kor (év)	49,7 ± 14,3
Nem (nő : férfi)	27 : 13
Betegségtartam (hónap)	57,26 ± 56,43
Aktuális DEI*	2,17 ± 2,02
Kumulatív DEI	7,6 ± 4,28
Süllyedés (mm/h)	23,65 ± 23,82
CRP (U/L)	1,77 ± 3,72
Creatinin (mg/dl)	1,36 ± 1,46
ANCA pozitivitás (cANCA : pANCA)	27:1
Biopsziával igazolt	26

### 3. Táblázat

#### **A limfocita szubpopulációkkal kapcsolatos vizsgálatba bevont 40 Wegener granulomatózisos beteg klinikai és laboratóriumi jellemzői**

Az adatokat átlag ± SD formában adtuk meg. Rövidítések: CRP: C-reaktív protein, ANCA: anti-neutrofil-citoplazma antitest, DEI: betegségkiterjedtségi mutató. \*A „betegség kiterjedési mutató” részletes leírását lásd a szövegben.

#### **3.3.1 A betegek alcsoportjainak jellemzői**

A 12 WG-es beteg perifériás mintáit használtuk fel a CD28<sup>-</sup> sejtek részletes fenotípus vizsgálatához. Ezen betegek közt a férfi nő arány 1:1 volt. A betegek kora 53.4±3.0 év volt (középtérték±SEM). A betegek süllyedése 44.4±6.3mm/h, C-reaktív protein szintje 3.9±1.4mg/dl, leukocitaszáma 7271±438/μl, és kreatinin szintje 1.4±0.3mg/dl volt. A CD28<sup>-</sup> T-sejtek aránya a CD4<sup>+</sup> T-sejt populációban (CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>) 24.4±5.4%-volt. A CD28<sup>-</sup> T-sejtek aránya a CD8<sup>+</sup> T-sejt populációban (CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>) 40.8±6.1% volt. Előző tanulmányokkal összhangban [69], a CD28<sup>-</sup> T-sejtek aránya a CD4<sup>+</sup> és CD8<sup>+</sup> T-sejtek közt magasabb volt a WG-os betegekben, mint a kor és nem szerint egyeztetett kontrollcsoportban (P<0.01). A betegek Betegség kiterjedtség indexe (DEI) 2.4±0.3, a brit vaszkulitisz aktivitási pontja (BVAS.1) (új vagy romló aktivitás) 8.0±1.8 és a BVAS.2 (perzisztáló destruktív betegség) 9.7±1.8 volt. Három beteg kapott orális CPH (napi 100mg p.o.) kezelést. 9 beteg MTX (heti 20-25mg i.v.), AZT (napi 100mg p.o.) vagy *leflunomide* (napi LEF 30mg p.o.) kezelést kapott. 4 beteg részesült steroid-immunoszuppresszáns kombinációban.

5 betegnél ahol a perifériás vérben a CD4+CD28<sup>-</sup> sejtek aránya meghaladta a CD4<sup>+</sup> sejtek 10%-át, a CD4+CD28<sup>-</sup> sejtek kinyerésére szolgáló depléciót, valamint a perifériás vérből

izolált limfociták intracitoplazmatikus immunfluoreszcens jelölésével ezek citokinszekréciónak vizsgálatát végeztünk. Ezen betegek adatait a 4. táblázat foglalja össze.

Beteg / nem <sup>1</sup>	R.M./n	K.G./f	R.D./n	R.E./n	L.H./n
Kor (év)	72,2	57,8	64,7	65,7	45,7
aCMV-IgM titer <sup>2</sup>	1:170	<1:42	<1:42	<1:42	1:60
aCMV-IgG titer <sup>3</sup>	1:11000	1:14000	1:20000	1:25000	1:31000
CD4 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup> <sup>4</sup>	16,1%	36,1%	53,2%	19,5%	25,2%
CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup> <sup>5</sup>	57,4%	51,9%	52,4%	37,5%	76,4%
Betegségtartam (hónap)	145	25	27	7	29
Aktuális szervérintettség <sup>6</sup>	B	L	E	E	L
Kumulatív szervérintettség <sup>6</sup>	E,L,K,Ey,P ,B,H	E,L,Ey,Gi, B,K,A,P	E,L,A,B,K	E	E,L,B
cANCA aktuális titer	1:2048	1:128	1:526	1:128	Negatív
Súlyyedés <sup>7</sup> (mm/óra)	30	42	18	25	28
CRP <sup>8</sup> (U/l)	0,9	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
LDH <sup>9</sup> (U/l)	16	383	203	157	191
se. Kreatinin (mg/dl)	1	3,2	1	0,8	9,7
Leukocitaszám (sejt/μl)	8600	12400	7010	6700	5200
Státusz <sup>10</sup>	PR	A	PR	A	PR

#### 4. Táblázat

#### A citokinszekréción vizsgálatába bevont 5 Wegener granulomatózisos beteg klinikai jellemzői

<sup>1</sup> f:férfi; n: nő

<sup>2</sup> aCMV-IgG: CMV elleni IgG antitest titer

<sup>3</sup> aCMV-IgM: CMV elleni IgM antitest titer

<sup>4</sup> CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> : CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> sejtek a CD4<sup>+</sup> sejtek százalékában

<sup>5</sup> CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> : CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> sejtek az összesCD8<sup>+</sup> sejt százalékában

<sup>6</sup> B:”B” tünetek; E: felső légút; L: tüdő; K: vese; Ey: szem; P: perifériás idegek; H: szív; Gi: gasztrointesztinális; A: reumatológiai tünetek;

<sup>7</sup> Súlyyedés: vvt. súlyyedés;

<sup>8</sup> CRP: C- reaktív protein.

<sup>9</sup> LDH: laktát-dehidrogenáz szérumszintje

<sup>10</sup>: A CMV szerológia és a CD28 expresszió ismerete nélkül a kezelőorvos által meghatározott általános státusz A: aktív; PR: parciális remisszió p.l. általános betegségaktivitás hiánya azonban reziduális (pl. mellkasröntgen ) lelet

A remisszió indukáló kezelésnek a monocita citokinszekréciónra kifejtett hatását, hat, biopsziával igazolt, generalizált WG-ban szenvedő beteg bevonásával végzett vizsgálat során kíséreltük meg meghatározni. Ezen betegek közt 3 férfi és 3 nő volt, életkoruk  $58 \pm 14,7$  év volt. Mindegyik beteg megfelelt a WG 1990-es ACR kritériumoknak és az 1992-es Chapel Hill-i konferencia definíciójának. Mindegyikük C-ANCA és PR3-ANCA pozitív volt. A vizsgálat kezdetekor a betegek aktív stádiumban voltak, két esetben frissen diagnosztizált, kezeletlen kórkép állt fenn, négyenél major relapszus zajlott. Ez utóbbiak közül 2 MTX és egy trimethoprime-sulphamethoxazole-al (TMP/SMX) végzett remissziófenntartó kezelést kapott a relapszus előtt, míg a negyedik beteg semmilyen gyógykezelésben nem részesült. A relapszus, illetve az újonnan jeletkezett kórkép diagnózisát követően, mindegyik beteg standard orális CPH + GC remisszió-indukációs kezelést kapott melyben 2 mg/kg CPH és 1

mg/kg GC kezdeti dózist alkalmaztunk, majd a GC adagját fokozatosan csökkentettük. Emellett 9 egészséges önkéntes vérmintáját használtuk fel. (ffi/nő = 2/7; kor = 38.3± 12.9 év).

### **3.3.2. Áramlási citometria**

A négy színű áramlási citometriás analízishez FACSCalibur™ flow-citométert használtunk (Becton Dickinson, Heidelberg, Németország) az adatokat CELL-Quest™ software-rel rögzítettük és analizáltuk (Becton Dickinson, Heidelberg, Németország). A limfocitákat fényszórási paraméterek alapján azonosítottuk, az így kapott sejtek adatait CD3, és CD4 festődésük alapján gyűjtöttük. 1 mintából 1000 limfocita adatait mértük le.

A pozitívan és negatívan festődő populációk arányát az izotípus-kontroll által meghatározott, quadráns analízissel számítottuk.

Annak elkerülése érdekében, hogy a CD 28+ vagy CD4+ sejtek arányának variációja az eredményeket jelentősen torzítsa, a citokin pozitív sejtek arányát az össz CD28+ vagy negatív sejtre vonatkoztatva számítottuk, az összlímocita vagy T helper szám százaléka helyett.

A monocitákkal kapcsolatos méréseknél heparinizált vérből készült kultúrákban basalisan, és 20 órás lipopolyszacharide (LPS) (100 ng/ml, Sigma) stimulálást követően végeztünk áramlási citometriás méréseket. A szekréció gátlására Monensin-t alkalmaztunk. Az áramlási citometriás mérés során a monocitákat fényszórási és CD14 festődésük alapján kapuztuk. 1000 monocita adatait gyűjtöttük.

#### **3.3.2.1. Antitestek**

A következő direkt jelölt, humán-sejtfelszíni-antigén elleni és human citokin-elleni antitesteket használtuk: Anti-humán CD45/CD19/CD16/CD56/CD3 (PerCP/APC/PE/FITC) és anti-humán CD45/CD3/CD8/CD4 (PerCP/FITC/PE/APC) 4 színű gyárilag előkészített antitest készlet IgG2a/IgG1 izotípus antitesteket (FITC/PE), APC conjugált anti-humán CD14, CD4, CD8, PE-conjugált, Cy-Chrome anti-humán CD3, PE-conjugált eger IgG1, anti-human CD28, HLA-DR, eger anti-humán TNF $\alpha$ , patkány anti-humán IL-13, IL-10, IL-12, IL-8, patkány IgG2a, patkány IgG1, valamint FITC-konjugált CD28, CD30, CD18, CD57, CD45-RA, CD69 CD95, patkány IgG1, IgG2, anti-humán INF $\gamma$ , IL-4, IL-5, IL-2 (gyártó: Becton Dickinson és Pharmingen Heidelberg, Németország). FITC konjugált anti CD25 (Immunotech Marseille, Franciaország) és FITC konjugált anti Fas-Ligand antitest (Hölzel Diagnostika Köln, Németország).

#### **3.3.2.2. Intracitoplazmatikus citokin meghatározás**

Na-heparinnal antikoagulált perifériás vérmintát használtunk fel. A vért PMA (10ng/ml) és ionomycin (1 $\mu$ g/ml) valamint monensin (2 $\mu$ M) dózisával 37°C-os nedvesített atmoszférájú 5% CO<sub>2</sub> inkubátorban stimuláltuk. Az stimulálás 5.-órájában 100 $\mu$ l 20 mM EDTA-t adtunk (végleges koncentráció: 2mM) a kultúrákhoz. Ezt követően a vvt-eket 10 percig szobahőmérsékleten lizáltuk 9 ml FACS Lysing Solution-el (Becton Dickinson, Heidelberg, Németország) A sejteket pufferoldattal mostuk (250g, 5 min, 4°C) (Ca<sup>2+</sup> és Mg<sup>2+</sup> nélküli PBS (Gibco BRL, Karlsruhe, Németország), + 0.1% BSA, 0.1% NA-azid (Sigma, München, Németország), pH=7.4). A pelletet 1000  $\mu$ l permeabilizáló pufferben (Ca<sup>2+</sup> és Mg<sup>2+</sup> nélküli PBS + 0.1% BSA, 0.1% Na-azide, 0.1% saponin (Sigma, München, Németország), pH=7.4) reszuszpendáltuk, majd szobahőmérsékleten 10 percig permeabilizáltuk. Jelölőpufferrel történő mosást követően a sejteket 100  $\mu$ l jelölőpufferben fluorokróm-konjugált monoclonális antitestekkel és megfelelő izotípus-kontroll antitestekkel jelöltük. (minden antitestet előzőleg teszteltünk az optimális koncentráció tekintetében). 30 perces szobahőmérsékleten történő inkubációt követően újabb mosást végeztünk. A jelölőpufferben gondosan reszuszpendált sejteken többparaméteres áramlási citometriás analízist végeztünk.

5 betegnél ahol a perifériás vérben a CD4+CD28- sejtek aránya meghaladta a CD4+ sejtek 10%-át, immunglobulinnal kombinált mikromágneses módszerrel (Miltenyi Microbeads) 2 lépésben, a CD4+CD28- sejtek kinyerésére szolgáló depléciót végeztünk. A betegek EDTA-val antikoagulált perifériás véreből mononukleáris sejteket izoláltunk Ficoll-Paque gradiens centrifugálással. A CD4+ T helper sejteket MACS CD4+ T Cell Izolációs Kit segítségével nyertük ki. (Miltenyi Biotech, Bergisch Galdbach Németország). A CD28+ sejteket PE konjugált anti-CD28 antitesttel jelöltük (Becton Dickinson, Heidelberg Németország) majd anti-PE MicroBeads (Miltenyi Biotech, Bergisch Galdbach Németország) segítségével depletáltuk. A negatív és pozitív frakciókat 5% FCS, 5 % humán szérum, 5 mM L-glutamin, 50 U/ml penicillin, és 50 mg/ml streptomycinnel szuplementált RPMI 1640-táptalajon (gyártó: Sigma, München, Németország) 37°C-on nedvesített atmoszférájú 5% CO<sub>2</sub> inkubátorba helyeztük. Az eljárás hatékonyságát áramlási citometriás mérésekkel ellenőriztük, melyek során a kultúrákban átlag 48,7% (22-79%) CD28<sup>null</sup> sejtet észleltünk a negatív (CD28<sup>null</sup> enriched) és 1,7% (0-4%) a pozitív (CD28<sup>null</sup> depleted)frakcióban.

### **3.3.3.1. Ciklofoszfamid kezelés *in vitro* modellezése**

A ciklofoszfamid kezelés *in vitro* modellezéséhez *mafosfamide*-ot ([4-(2-sulfonato-etiltio)]-ciklofoszfamid), a *cyclophosphamide* aktív metabolitját használtuk, mivel ez az anyag gyorsan hidrolízisen megy át, ennek során 4-hidroxi-ciklofoszfamid keletkezik, ez a CPH *in vivo* metabolizmusát imitálja, melynek során a máj citokróm P450 rendszerében hidroxilálódik 4-hidroxiciklofoszfamiddá. Az 1 órán át PBMC-ben szuszpendált sejteket 1 órás különböző koncentrációju (0, 10<sup>-9</sup>, 10<sup>-7</sup> és 10<sup>-5</sup> M) *mafosfamide* kezelésnek tettük ki majd mosást és pelletálást követően -70°C-on fagyasztottuk a további vizsgálatokig. Ez utóbbi során IL-12 p35 messenger RNA (mRNA) expresszióját GAPDH kontrollált RT-PCR-al vizsgáltuk.

### **3.3.3.2 ELISA**

A citokin szekréció a CD28- depletált és dúsított kultúrák felülúszójából, 24 órás 100 ng/ml anti- humán-CD3-al történő stimulációt követően Quantikine® humán INF $\gamma$ , IL-10, IL-12 és Quantikine® HS humán IL-4 ELISA kitek segítségével határoztuk meg. (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Németország)

### **3.3.4. Serologiai vizsgálatok**

Anti-CMV IgG és IgM antitestek szérum szintjének vizsgálatára EIA kitet használtunk (Dako, Németország)

### **3.3.5. Immunhisztológia**

Az immunhisztológiai vizsgálatok a Lübecki Egyetem Pathológiai Intézetében készültek. Ezekhez 3 WG-es beteg folyékony nitrogénben hirtelen fagyasztott biopsziás mintája került felhasználásra, melyeket aceton és kloroform fixálást követően APAAP (alkalikus foszfátáz - anti alkalikus foszfátáz) módszerrel, majd hematoxilinnal festettük. A felvételek Leica TCS SP konfokális mikroszkóppal készültek (Bensheim, Germany). Az alábbi antitesteket használtuk fel: nyúl anti CD3 antiszérum és APAAP-complex (DAKO), monoklonális egér anti-CD28 antitest (Biosource International, Nivelles, Belgium), anti-CD8 antitest (BD Biosciences, Heidelberg, Németország), Cy-3 konjugált kecske anti egér IgG és FITC-konjugált szamar anti nyúl IgG (Dianova, Hamburg, Németország).

### **3.3.6. Statisztikai feldolgozás**

Az adatok normál eloszlását Kolmogorov-Smirnov illeszkedési teszttel vizsgáltuk. Az összehasonlításokhoz kétmintás Student t próbát végeztünk. Korrelációs számításra a Spermann's korrelációs koefficiens számítottuk ki.  $p < 0,05$ -t tekintettünk statisztikailag szignifikánsnak. SPSS statisztikai softwarecsomagot használtunk a korrelációs számításokhoz valamint a többváltozós analízishez. Ez utóbbihoz többszörös lineáris korrelációs modellt használtunk.



## 4. Eredmények

### 4.1. Bronchoalveoláris lavage sejtösszetételének vizsgálata kezelt DM/PM-es betegekben

A 30 miozitiszes beteg közül 16 esetben (53%) kaptunk valamelyik non-invazív vizsgálati eljárás során kóros tüdővizsgálati leletet. Ebből 13 betegnél (43%) igazoltunk HRCT-vel tüdőfibrózist. 8 beteg (26%) esetén végeztünk bronchoalveoláris lavage vizsgálatot. Ezen betegek légzésfunkciós, HRCT és BAL eredményeit a 5. Táblázatban foglaltuk össze.

Betegek	Spirometria <sup>a</sup>	Diffúziós kapacitás <sup>b</sup>	HRCT		BAL <sup>e</sup>		
			Tejüveg-homály <sup>c</sup>	Fibrózis <sup>d</sup>	T	G	L
1	↓	↓↓	B	U	32.4	1.6	5.5
2	N	↓↓	B	M	20.1	1.0	3.2
3	N	N	N	U	*147.4	*13.3	*17.8
4	N	N	B, M	M	*122.8	*24.6	*17.2
5	N	N	N	M	*127.2	*3.8	*19.2
6	↓	↓	N	M	*205.3	*82	*24.6
7	N	N	B	M	*162.8	1.6	*21.1
8	↓	NP	N	M	*41.5	0.4	6.6
9	↓↓	↓	N	B	*210.8	0.6	*80.3
10	N	N	B	M	*156.2	1.5	3.1

### 5. táblázat

**A BAL vizsgálatra került 10 gyulladássos myopátiás nőbeteg légzésfunkciós, nagyfelbontású tüdő CT (HRCT) és jellemzői, valamint a bronchoalveoláris lavage sejtösszetétele.**

**a:** Spirometria: N, normál; ↓, <80% mint a kor és nem alapján várt vitálkapacitás; ↓↓, a várt érték 60%-a alatt.

**b:** CO Diffúziós kapacitás (DLCO). N, normál; NP, nem történt; □, DLCO a várt érték <80%-a alatt és a DLCO/VA a várt 80%-a felett; ↓↓, DLCO a várt érték 60%-a alatt, a DLCO/VA a várt 80%-a alatt.

**c:** HRCT, nagyfelbontású tüdő CT; Tejüveg-homály; N, nincs B, a tüdő bazális részén M, a középső tüdőmezőkben

**d:** Fibrózis: B, bibaziláris fibrózis; M, a középső és alsó tüdőmezőket érintő fibrózis; U, kiterjedt a felső tüdőmezőket is érintő fibrózis.

**e:** Sejtszámok; T, összsejtszám ( $10^3$ sejt/ml); G, granulocita szám; L, limfocita szám. \* a kontrollcsoportban észlelt középértéke + 2 SD-t meghaladó érték. (részletesen a módszerek bekezdésben).

A BAL-ban a nyolc DM/PM beteg közül, öt betegnél emelkedett összsejtszámot, öt betegnél makrofág szám emelkedés észleltünk. BAL granulocita szám emelkedés négy esetben fordult elő, ezen betegek közül mindegyik esetben kevert alveolitisz jelentkezett. Egy további esetben limfocitás alveolitiszt detektáltunk. Az BAL abszolút sejtszámemelkedés alapján összesen a nyolc beteg közül 5 mutatott (limfocitás és/vagy neutrofil) alveolitiszt. (5. Táblázat)

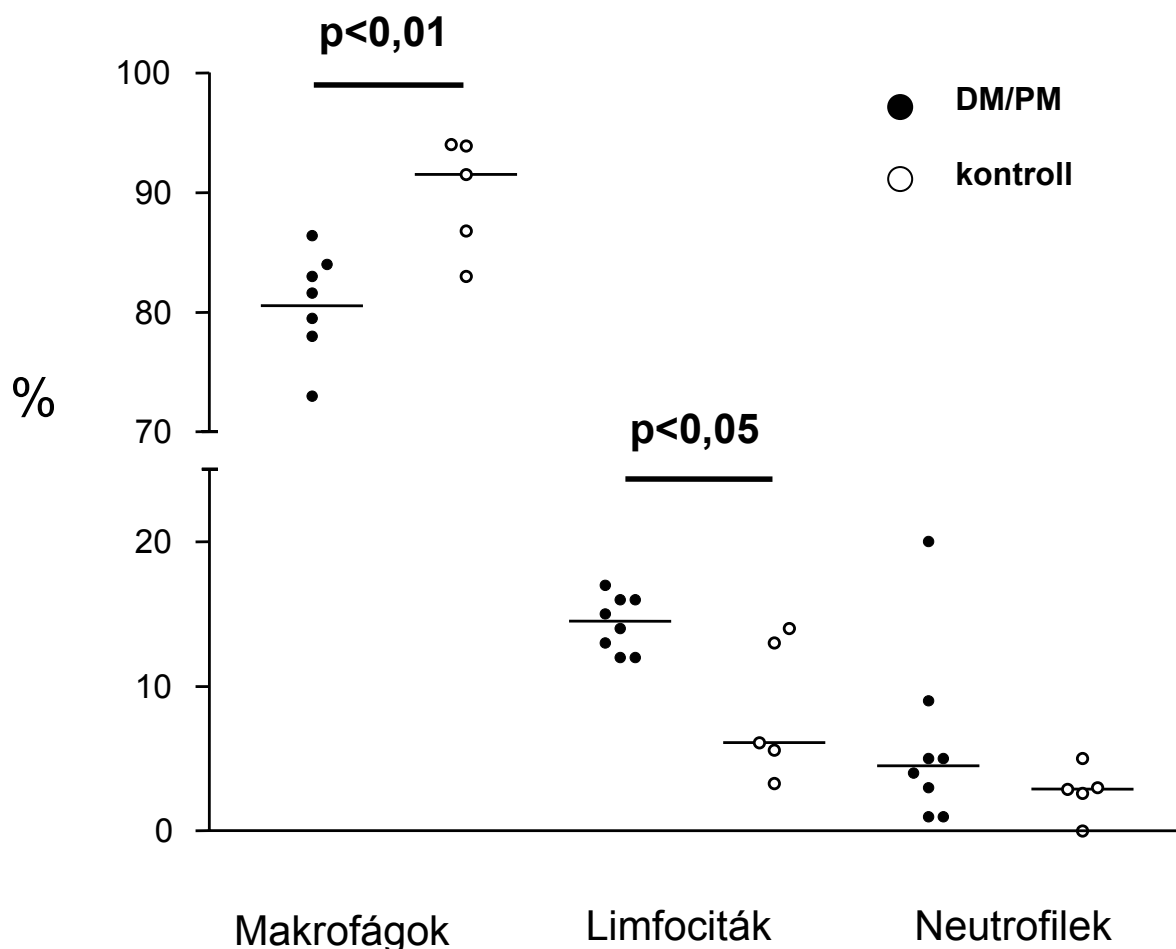
A nyolc DM/PM-es beteg közt, a BAL abszolút összsejtszámok átlaga magasabb volt, mint az egészséges kontrollok közt, azonban ez nem érte el a statisztikai szignifikancia szintjét. ( $107000 \pm 68000$  versus  $59100 \pm 13900$  sejt/ml). A különböző sejtcsoportok abszolút

sejtszámának átlagai (limfocita, granulocita, neutrofil) hasonlóan magasabbak voltak, de ez a különbség szintén nem volt szignifikáns.

A makrofágok százalékos aránya jelentősen csökkent az egészségeseknél észlelt értékhez képest. (átlag  $78.9 \pm 6.7\%$  versus  $89.8 \pm 4.8\%$ ) ( $p < 0.01$ ). A limfociták százalékos aránya ( $14.4 \pm 1.9\%$  versus  $8.3 \pm 4.7\%$ ) szignifikánsan magasabb volt ( $p < 0,05$ ), azonban ez az érték minden esetben alacsonyabb volt, mint 17%. Nem mutatott szignifikáns különbséget a neutrofil sejtek százalékos aránya. ( $5.9 \pm 6.3\%$  versus  $2.7 \pm 1.8\%$ ) (3. Ábra). A négy DM/PM-es betegnél, akiknél a granulociták abszolút száma emelkedett volt (Beteg 3.-7.), kettőnél emelkedett, míg kettőnél a normál tartományban lévő granulocita százalékot észleltünk. (9%, 20%, 3%, 4%) míg további 2 betegnél (1. és 2. Beteg) granulocita arányemelkedés jelentkezett (5% mindkét esetben), fokozott granulocita - influxra utaló jel, azaz a granulociták összszámának emelkedése nélkül. Így ezt a két utóbbi esetet nem értékeltük alveolitiszként.

A két szkleroderma-miozitisz overlap szindrómás eset közül mindkettőnél tüdőfibrózist észleltünk egy esetben limfocita alveolitisszel a BAL alapján (38%, 80.300 limfocita / ml) (4. Táblázat). Összesen, beleértve ezen két utóbbi esetet is, a 10 közül 7 gyulladáisos miopátiás esetben észleltünk emelkedett összsejtszámot (5. Táblázat), és 5 betegnél makrofágszám emelkedést. A limfociták abszolút száma 6, míg a polimorfonukleáris neutrofil sejtszám 4 betegben volt emelkedett. Ezen utóbbi 4 esetben kevert alveolitisz állt fent. A BAL lelet alapján, 10 esetből 6-ban alveolitisz (vagy limfociták vagy kevert) volt kimutatható.

A 3 anti-Jo-1 pozitív eset közül, 2-ben észleltünk kevert alveolitiszt. Sem a három anti-Jo-1 pozitív, sem azon három beteg, akikben szkleroderma kapilláris rajzolat került leírásra, nem mutatott jelentős különbséget; légzésfunkciós, HRCT vagy BAL lelet alapján a többi beteghez képest. ( 1., 5., Táblázatok).



### 3. ábra

#### A gyulladásoos miopátiás (DM/PM) és az egészséges kontroll csoport BAL mintáinak sejttöszetésele.

A pontok jelölik az egyes sejttípusoknak a BAL mintában mért százalékos értékét (• : a DM/PM-es betegek, o : az egészségesek közt mért értékek) A horizontális vonal a csoport középértékét jelöli.

Az alveoláris makrofágok proliferációs vizsgálata során emelkedett osztódási indexet igazoltunk miozitisz esetén, mely összefüggést mutatott a granulocita aránnyal. A jellemzően limfocitás alveolitist mutató, nem-differenciált kollagenózis esetén a proliferációs index a kontrollokéhoz volt hasonló. A miozitiszes csoportban 4 beteg (36%) mutatott -a kontrollcsoport alapján képzett normálértékhez képest- a Ki-67 pozitívítás alapján, emelkedett arányú alveoláris makrofág proliferációt.

Pozitív korrelációt találtunk a SSc-os és a miozitiszes betegek granulocita aránya, illetve a Ki-67+ makrofágok aránya között ( $r=0,6336$ ,  $p<0,005$ ). A makrofágok Ki-67 pozitívításával kapcsolatban további korrelációt nem találtunk, sem más sejtek arányával, sem a tüdőfunkciós paraméterekkel összevetve. A kontrollcsoportban az alveoláris makrofágok Ki-67 pozitívítása átlagosan  $5.4\pm 1.9\%$  volt. A miozitiszes betegek közt.  $9.8\pm 8.4\%$

A kontroll csoportban a CD11a pozitív makrofágok aránya  $17.2\pm 20.2\%$ , a CD11b pozitívok aránya  $2.7\pm 3.8\%$  volt. A miozitiszes betegek közt átlag a CD11a  $21.8\pm 24.1\%$  a CD11b  $6.0\pm 9.4\%$  volt. A miozitiszes betegek közül 2 esetben esett ki ez a kontroll csoportal meghatározott CD11a és 1 esetben a CD11b normálértékéből.

## 4.2. Wegener granulomatózisos betegek tüdőérintettségének HRCT vizsgálata

Az iniciális HRCT-n leggyakrabban észlelt eltérés a szoliter vagy többszörös kerekárnyék volt, amit 17 betegnél észleltünk. Ezek elhelyezkedésében nem volt predilekció megfigyelhető, az elváltozások nem respektálták az érintett lebeny határait, sem centrális sem szubpleurális irányban. A átmérők mediánja 18.0 mm (14.0-28.0) volt. A 17 beteg közül csak 8 esetben voltak a kerekárnyékok a mellkasfelvételen is észlelhetőek. 4 betegnél észleltünk centrális kavitációt ami a röntgenfelvételen nem, csak a HRCT-n volt látható.

Fokális tejüveghomály 12 betegnél volt megfigyelhető, ezek elhelyezkedésében sem volt predilekció megfigyelhető, így a dorzális részeken sem voltak gyakoribbak, mint más tüdő régiókban. Egyik esetben sem volt a mellkasröntgen felvételen eltérés. Vonalas árnyék 11 betegnél jelentkezett. 6 esetben szeptális, 6 esetben nem szeptális vonalak voltak megfigyelhetőek, 1 betegnél mindkét típus előfordult.

Az immunszuppresszív kezelésre bekövetkező változás a tejüveghomály esetében volt a legegyszerűbb, ezek mindegyike eltűnt a kontrollvizsgálat idejére. A kerekárnyékok esetében heterogénebb válasz volt megfigyelhető. 8 betegnél a nodulusok felszívódtak nyom nélkül vagy lineáris elváltozás hátrahagyásával. 7 betegnél csak részleges felszívódás volt megfigyelhető, ami a méret csökkenésében, vagy többszörös léziók esetén azok számának csökkenésében mutatkozott. 2 betegnél a léziók változatlanok maradtak. A perzisztáló nodulusok átmérője 14.0 mm (9.0-15.0) volt. Az eredményeket a 6. táblázat foglalja össze.

	HRCT adatok		
	1. HRCT	2. HRCT	
Kerekárnyékok	17	9	N.S.***
Kerekárnyékok (betegenkénti szám)	1,0 (0,85-2,9)	0 (0,2-1,0)	P<0,05 Mann-Whitney U test
Átmérő (mm)	18,0 (14,3-26,3)	14,0 (8,8-19,8)	N.S.* Mann-Whitney U test
Tejüveghomály	12	0	p<0,0001**

### 6. táblázat

#### A Wegener granulomatózisos betegek pulmonális aktivitás és remisszió idején készült HRCT vizsgálatán ábrázolódó eltérések összehasonlítása.

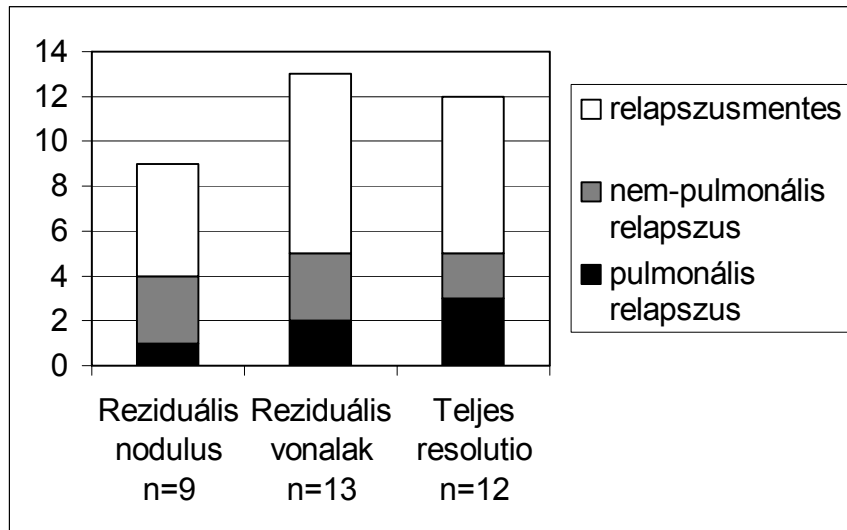
\*: N.S.: nem szignifikáns, \*\*: Fisher exact teszt

A kerekárnyékok kezdeti mérete nem korrelált a terápiára adott válasszal. A spikuláció jelensége megfigyelhető volt mind a későbbiekben perzisztáló, mind a regrediáló nodulusokon. A centrális üregképződés ezzel szemben prognosztikailag fontos jelnek bizonyult; a centrális kavitációt mutató 4 beteg közül 3 esetben teljes resolúciót figyeltünk meg, míg a negyedik esetben a kavított granulóma mérete 60%-os csökkenést mutatott a ciklofoszfamid terápia végére, és az MTX kezelés alatt teljesen felszívódott. Ennek alapján a granulómákban megfigyelt centrális üregképződés az aktív, reverzibilis folyamat jelének tekinthető.

A vonalas árnyékok tekintetében is heterogén volt a terápiát követő viselkedés. Az első HRCT-n szeptális és nem-szeptális vonalak 6-6 betegnél voltak megfigyelhetőek. Ezek mindkét kategóriában 2 betegnél tűntek el a kezelés hatására. Mindkét kategóriában a másik 4 esetben a kontroll HRCT-n változatlanul megfigyelhetőek voltak a vonalas árnyékok. A kontroll vizsgálaton a vonalas árnyékok emelkedett számát észleltük. Ekkorra új szeptális vonalazottság jelent meg 6, és lebenykehatárt nem követő árnyék 2 betegnél. A HRCT

morfológia nem nyújtott segítséget a terápiára reverzibilis és a perzisztáló vonalak elkülönítéséhez.

A második HRCT-t követően 26.5 hónapig (20.0-33.8) követtük a betegeket. Ez idő alatt 10 relapszust észleltünk. 4 esetben a relapszus a tüdőt is érintette, míg 6 esetben nem pulmonális relapszus történt. Sem a reziduális nodulusok, sem a vonalas árnyékok jelenléte nem kapcsolódott magasabb relapszusgyakorisághoz. A relapszusgyakoriság 44% volt a reziduális kerekárnyékok mellett, 38% a vonalas árnyékok eseteiben, és 42% azoknál, akiknél a 2. HRCT negatív volt. A pulmonális és nem pulmonális relapszusok egyenletesen oszlottak el a 3 csoport közt.



#### 4. ábra

**A relapszusok gyakoriságának alakulása a remisszióban készült, második HRCT-t utáni 26.5 hónapig tartó (20.0-33.8) követés alatt, az ezen a felvételen észlelt eltérések alapján felállított csoportok szerint**

### 4.3. Citokinszekréció vizsgálata T limfocita alcsoportokban és monocitákon Wegener granulomatózisban

#### 4.3.1. Remisszió-indukciós kezelés hatása a monocita citokinszekrécióra

A kezeletlen és az előzetes MTX vagy TMP/SMX kezelés ellenére relapszusba került WG-os betegek monocitáinak citokin expresszióját a betegség aktivitásának idején, valamint remisszió elérését követően vizsgáltuk. Az aktív folyamat idején vett mintákban intracitoplasmátikus IL-12 pozitív sejtek aránya szignifikánsan emelkedett volt az egészséges kontrollhoz képest, (átlag 25% versus 5%,  $P < 0.01$ ) Ez a különbség LPS stimulációt követően is megmaradt, azonban ekkor már nem volt statisztikailag jelentős (átlag 34% versus 18%). Hasonló eredményeket kaptunk a TNF $\alpha$  expressziót illetően (17% versus 4%,  $P < 0.05$  és 44% versus 31%). A két citokin bazális expressziója közt szoros korreláció áll fenn ( $r = 0.975$ ;  $p < 0.05$ ). Az IL-8 termelő sejtek aránya nem különbözött jelentősen a normál kontrolltól, sem stimuláció előtt, sem azt követően.

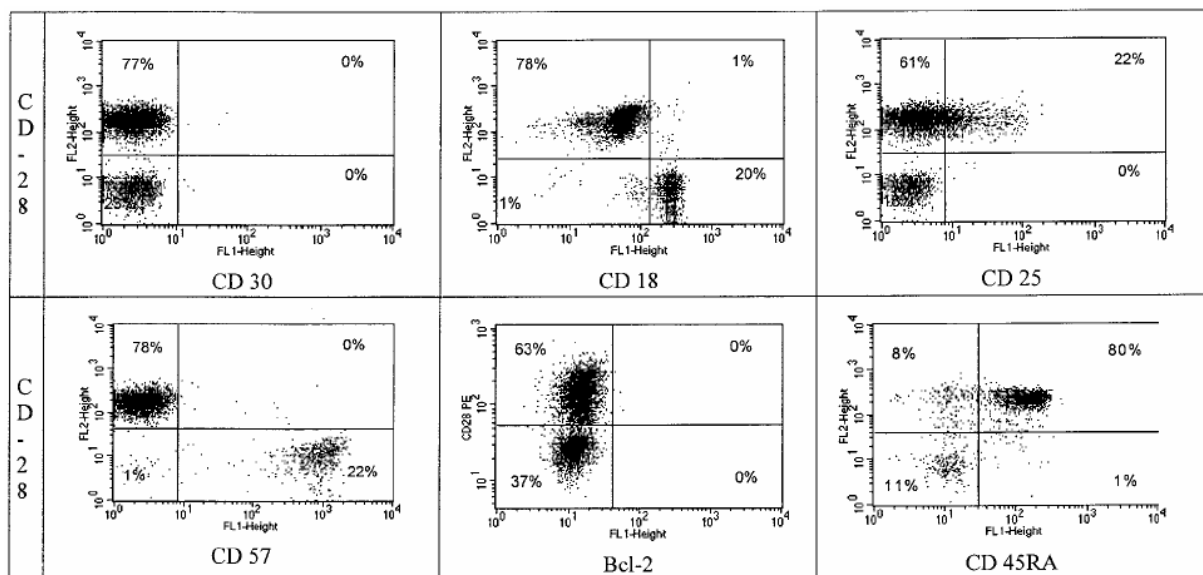
A CPH + GC kezelés citokintermelésre kifejtett hatását vizsgálandó, két időpontban egy korai (2 hét) és egy késői (12 hét) kontrollvizsgálatot végeztünk.

A standard napi orális CPH + GC kezelés, mind 3, mind 12 hetes kezelés után stabil remissziót idézett elő. Ekkor a monociták emelkedett IL-12 és TNF $\alpha$  expressziója

normalizálódott. A CPH aktív metabolitja in vitro az IL-12 mRNA expressziójának down-regulációját idézte elő.

#### 4.3.2. A CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T-sejt alcsoport fenotípezálása WG-ben

A felszíni CD18, CD25, CD30, CD45RA, CD57, CD95 és intracelluláris Bcl-2 és perforin direkt immunfluoreszcenciás jelölésével egyértelmű fenotípusbeli különbségtétel vált lehetővé a CD28<sup>+</sup> és a CD28<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T-sejtcsoport közt. Míg a CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> T-sejtek mintegy negyede expresszált CD25-öt (IL-2R  $\alpha$ -lánc), a CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> sejtek gyakorlatilag nem mutattak CD25 expressziót. Ezzel szemben a CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T-sejtek túlnyomó többsége CD57 pozitív volt, míg majdnem mindegyik CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> T-sejt CD57 negatív volt. Szoros negatív korrelációt tudtunk a CD28 és CD57 felszíni expressziója közt a CD4<sup>+</sup> T sejt populációban kimutatni. ( $r = 0.9317$ ,  $p < 0.001$ ). Csak a CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T-sejtek voltak perforin pozitívak. A CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T-sejtek fokozott  $\beta_2$ -integrin expressziót mutattak (CD18<sup>bright</sup>), míg a CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> T-sejtek CD18 festődése lényegesen kisebb volt (CD18<sup>dim</sup>). A CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T-sejtek többsége CD45RA negatív, míg a CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> T-sejtek túlnyomórészt CD45RA pozitívak voltak. Mindkét populáció többsége CD30 negatív volt, egyik sejtcsoport sem mutatott emelkedett CD95 (Fas) expressziót. Bcl-2 (B cell limfóma / leukémia 2 protein) expresszió gyakorlatilag nem volt kimutatható. A jellegzetes fenotípezálási jelöléseket a 5. ábra mutatja be



5. ábra

**Wegener granulomatózisos betegekből izolált CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T limfociták áramlási citometriával a felszíni CD28 expresszió szerinti kapuzást követően észlelt immunfluoreszcens festődési jellegzetességei.**

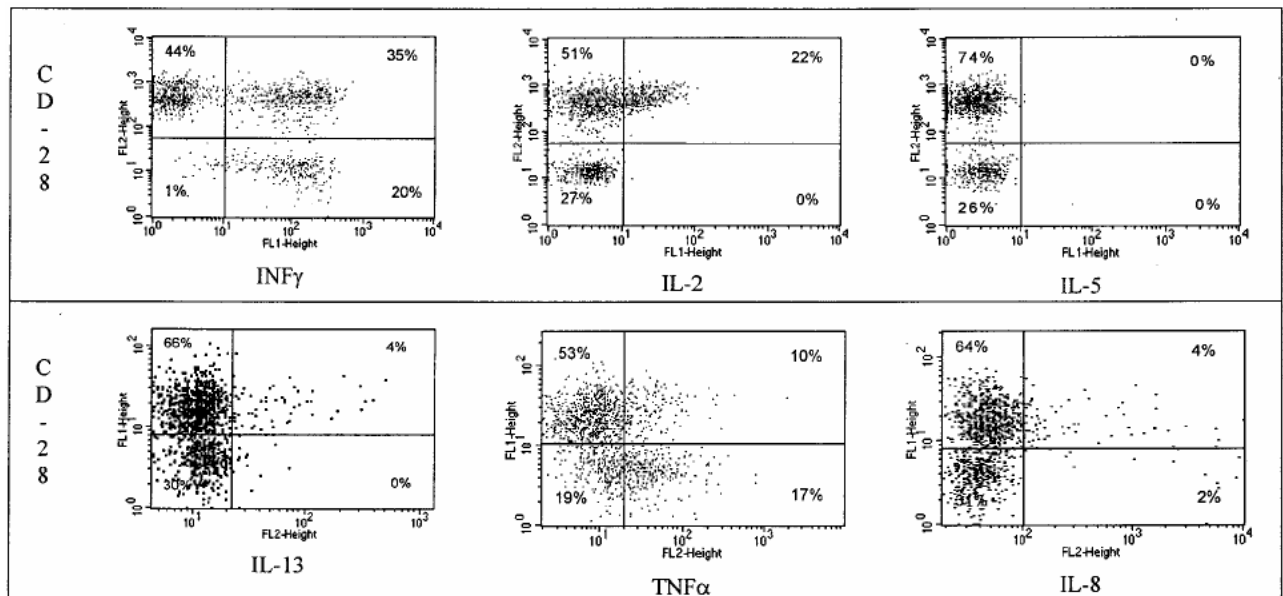
A vizsgálati körülményeket részletesen a Módszerek fejezet ismerteti. Az ábrák 3 betegből készült 3 mérési sorozat alapján készültek.

Annak megítélésére, hogy a CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T-sejtek CD28 expressziója csökkent (CD28<sup>low</sup>) vagy teljesen hiányzik, a sejtek fluoreszcencia értékét negatív izotípus kontrollal vetettük össze. A CD28<sup>-</sup> T-sejt frakció az izotípus kontrollal megegyező fluoreszcens intenzitása ezen sejtek komplett CD28 deficienciáját sugallta.

### 4.3.3. Intracitoplazmatikus citokin expresszió vizsgálata CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> és CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> T-sejtekben

Intracitoplazmatikus IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$ , IL-5, IL-8 és IL-13 jelölés segítségével szintén jelentős különbségeket tudunk a CD28<sup>+</sup> és CD28<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T-sejtek közt kimutatni. A CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T-sejtek jelentős része IFN- $\gamma$  termelt, míg IL-2-t nem. Ezzel szemben kevesebb CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> T-sejt volt IFN- $\gamma$  pozitív, de ezen sejtek közel egy harmada IL-2 expressziót is mutatott. A CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T-sejtek mintegy fele TNF- $\alpha$  pozitív volt, míg a CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> T-sejtek jelentősen kisebb hányada mutatott TNF- $\alpha$  expressziót. A CD28<sup>-</sup> és CD28<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-sejtfrakciók

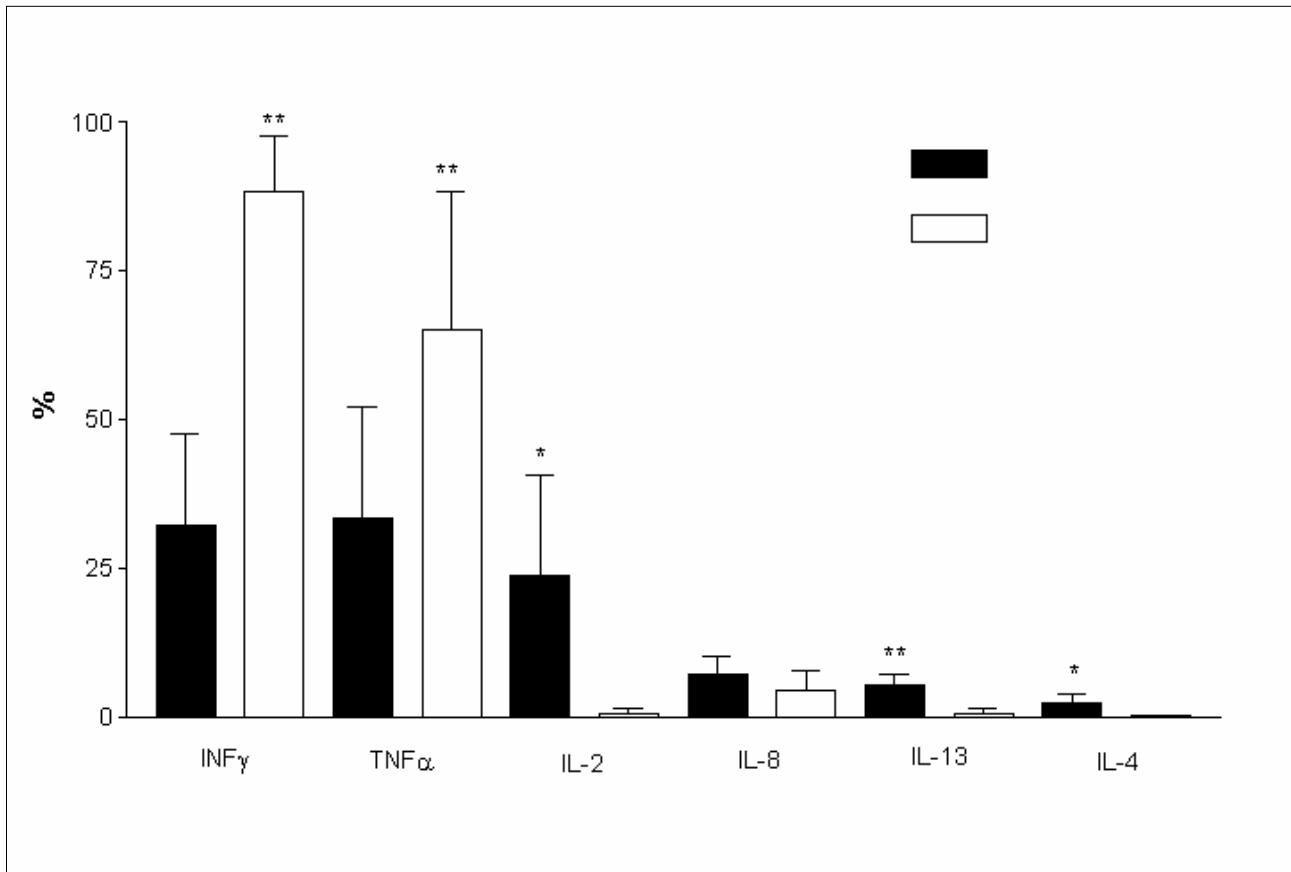
IL-4, IL-8 és IL-13 termelése olyan alacsonynak bizonyult, ami nem adott lehetőséget valódi különbségtételre. (6. ábra) Összességében a CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T-sejtek tűntek az IFN- $\gamma$  és TNF- $\alpha$  produkció fő forrásának, míg a CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> T-sejtek ezen citokinek szekrécijában kisebb szerepet játszhatnak, azonban csak ez utóbbi sejtcsoport mutatott IL-2 szekréciónak képességét. Az IL-8 szekréciónak nem mutatkozott különbség, míg a CD28<sup>+</sup> sejtek több IL-13-at és IL-4-et termeltek, bár ezen utóbbi citokinek szintje mindkét csoportban jelentősen alacsonyabb volt.(7. ábra)



6. ábra

**Perifériás vér Th (CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>) sejtjeinek CD28 és intracelluláris citokin jelöléséről készült reprezentatív ábra.**

Na-heparin antikoagulált perifériás vérmintát 5 órán át 10ng/ml PMA-val és 10mg/ml ionomycinnel kezeltünk monensin (2 $\mu$ M) jelenlétében, majd a sejteket fluorokróm konjugált antitestekkel jelöltük paraformaldehid fixálást és saponinnal történő permeabilizálást követően. A vizsgálati körülményeket részletesen a Módszerek fejezet ismerteti.



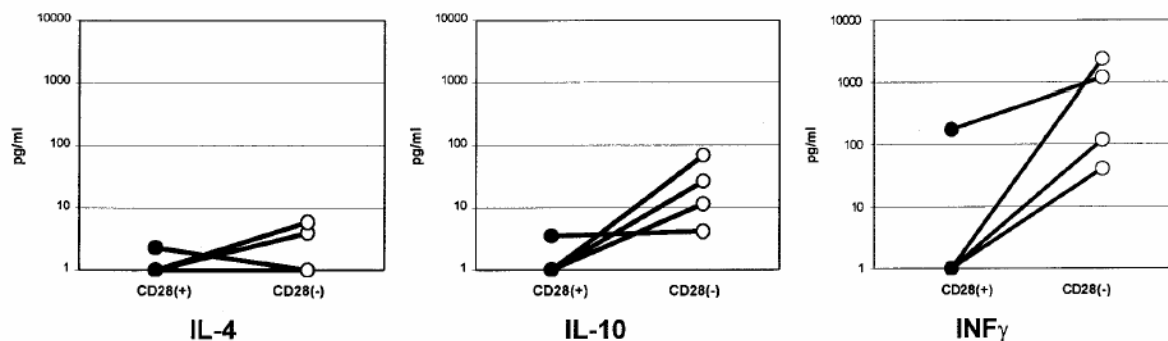
**7. ábra A CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> limfociták citokinszekréciójának intracitoplazmatikus jelölést követő áramlási citometriás mérése.**

Az oszlopok középértéket és standard deviációt jelölnek. A fekete oszlopok a citokin pozitív CD28<sup>+</sup> a fehérek a citokin pozitív CD28 negatív sejtek százalékát jelölik. \* p<0,05, \*\* p<0,001 CD28<sup>+</sup> vs.CD28<sup>-</sup>. A szignifikanciát jelző csillagot a magasabb érték fölé helyeztük.

**4.3.4. Citokin szekréció ELISA vizsgálata izolált CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> és CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> T-sejtkultúrák felülúszójában**

A FACS analízis során leírt citokin expresszióban észlelt különbségek megerősítésére, a aCD3 antitesttel történő stimulációt követő citokinszekréció mérését végeztük el ELISA módszerrel. A betegek vérmintájából perifériás mononukleáris sejteket izoláltunk, amiből 2 lépéses depléciónál CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> gazdag és CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> szegény sejtkultúrát képeztünk. A sejtkultúrákat anti-CD3 antitesttel 24 órán át exponáltuk, majd a felülúszóból ELISA meghatározásokat végeztünk. Az INF $\gamma$  szintje jelentősen magasabb volt a CD28<sup>-</sup> frakcióban. Hasonló különbséget észleltünk a IL-10 szekrécióját illetően, míg a IL-4 szintje mindkét sejtcsoport felülúszójában egyenlően alacsony volt. (8.ábra)





### 8. ábra

#### CD28- negatív sejtekre depletált (CD28+) és dúsított (CD28 -) sejt kultúrák citokintermelése.

A betegek vérmintájából perifériás mononukleáris sejteket izoláltunk, amiből 2 lépéses depléciónál CD4+CD28- gazdag és CD4+CD28- szegény sejt kultúrát képeztünk. A citokinszintek mérését a kultúrák felülúszójából 24 óra anti-human-CD3 stimulációt követően ELISA módszerrel végeztük.

#### 4.3.5. A CMV szerológia és a CD28 expresszió vizsgálata

Erős lineáris korrelációt találtunk a 40 WG-es beteg citomegáliavírus szerológiai eredménye (anti CMV IgG antitest titer), és a CD4+CD28- sejtek százalékos aránya közt. A CD4+CD28- sejtek aránya pozitívan korrelált a betegek korával ( $r_{\text{Spearman}}=0,43$ ,  $p<0,01$ ), a CD8+CD28- sejtek százalékos arányával ( $r_{\text{Spearman}}=0,544$ ,  $p<0,01$ ), és az anti-CMV-IgG antitest titerrel ( $r_{\text{Spearman}}=0,784$ ,  $p<0,01$ ).

Hasonló összefüggést találtunk a CD8+CD28- sejtek aránya, a kor és a CMV szerológia közt. ( $r_{\text{Spearman}}=0,494$ ,  $p<0,01$  és  $r_{\text{Spearman}}=0,53$ ,  $p<0,01$ ). Nem volt összefüggés a két sejtes csoport és a következő klinikai paraméterek közt: betegség tartam, aktuális és kumulált DEI, cANCA titer, vvt. süllyedés, CRP, szérumszint LDH, szérumszint kreatinin, leukocita szám. (6. táblázat)

	CMV <sup>+</sup> (n=24) Átlag± SD	CMV <sup>-</sup> (n=16) átlag± SD	P <sup>1</sup>
Kor (év)	54,10± 11,28	43,10± 16,10	0,015*
Betegségtartam (hónap)	62,12± 66,04	49,97± 38,71	0,468
cANCA aktuális titer	464,83± 910,09	292,00± 548,04	0,501
Süllyedés <sup>2</sup> (mm/h)	24,79± 24,13	21,93± 24,01	0,716
CRP <sup>3</sup> (U/l)	2,39± 4,69	0,83± 0,78	0,123
LDH <sup>4</sup> (U/l)	172,00± 64,42	166,75± 30,59	0,764
Se. Creatinin (mg/dl)	1,43± 1,83	1,26± 0,61	0,716
Leukocita szám (sejt/μl)	7707,91± 2133,72	7064,3± 3610,75 7	0,482
CD4 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup> <sup>5</sup>	12,31± 14,59	1,08± 0,62	0,001*
CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup> <sup>6</sup>	47,47± 18,19	33,08± 13,52	0,010*
DEI <sup>7</sup> aktuális	2,00± 1,61	2,43± 2,55	0,510
DEI kumulatív	7,6667± 4,7243	7,5000± 3,6515	0,906

## 6. Táblázat

### A CMV szeropozitív (CMV<sup>+</sup>) és CMV szeronegatív (CMV<sup>-</sup>) Wegener granulomatózisos betegek klinikai adatainak összehasonlítása

<sup>1</sup> kétoldalas nem párosított student T próba P értéke, \*: szignifikáns

<sup>2</sup> Süllyedés: vvt süllyedés;

<sup>3</sup> CRP: C- reaktív protein.

<sup>4</sup> LDH: laktát dehidrogenáz szérum szint

<sup>5</sup> CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>: CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> sejtek a CD4<sup>+</sup> sejtek százalékában

<sup>6</sup> CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>: CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> sejtek az összes CD8<sup>+</sup> sejt százalékában

<sup>7</sup> DEI: betegség kiterjedtség index, részletes leírását lásd a szövegben.

Továbbá azon betegekben, akik nemrégiben lezajlott CMV infekció vagy reinfekció szerológiai jeleit mutatták (pozitív IgM titer), a CD4<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> sejtek aránya jelentősen magasabb volt, mint az anti-CMV- IgM negatív betegek közt mért érték (p<0.05).

Mivel eredményeink során reprodukáltuk a korábban ismert aCMV szerológiai pozitivitás korrall történő emelkedését ( $r_{\text{Spearman}}=0,425$ ,  $p<0,01$ ) [86], az eddigiek alapján nem tudtuk elkülöníteni, hogy a CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> sejtek arányának emelkedésében a kor, a CMV infekció, vagy mindkettő szerepet játszott-e, mint azt korábban CD8<sup>+</sup> sejtekkel kapcsolatban leírták. Ezért ezen tényezők független kapcsolatának megközelítésére egy többszörös lineáris regressziós modellt állítottunk fel, és ebben többszörös variancia analízist végeztünk. Az analízis eredménye részletesen a 7. táblázatban látható. Eredményeink szerint, ha a CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> sejtek arányát vizsgáltuk dependens változóként, akkor ezt a CMV szerológia befolyásolta szignifikánsan, a kortól függetlennek bizonyult. A CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> sejtek esetében a korrall emelkedő trend nem érte el a szignifikancia határát míg a CMV szerológia szignifikáns determinánsnak bizonyult.

	B	s.e. B	P
Dependens változó: CD4 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup> (%) (n=40)			
Kor (év)	0,157	0,125	0,215
aCMV-IgG (állandó)	5,799 x 10 <sup>-4</sup> -5,372	<0,001 6,052	0,001*
Dependens változó: CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup> (%) (n=40)			
Kor (év)	0,314	0,173	0,079
aCMV-IgG (állandó)	7,843 x 10 <sup>-4</sup> 18,867	<0,001 8,406	0,002*

## 7. Táblázat

### Többszörös variancia analízis eredménye a betegek kora, CMV antitest titere és a CD28- sejtek aránya közötti összefüggés vizsgálatára felállított többszörös lineáris regressziós modellben

B: Regressziós koefficiens; s.e. B: a Regressziós koefficiens standard hibája; \*: szignifikáns

## 5. Összefoglalás

A szisztémás autoimmun kórképekben az egyes szervi manifesztációk az alkalmazott kezelésre különböző mértékben reagálhatnak. DM/PM-ben az izomfolyamat remissziója ellenére a szubklinikus alveolitisz perzisztálhat. Megállapítottuk, hogy a DM-PM-es betegek közt, még az izom-enzimvizsgálatok és a klinikai tünetek alapján hatásos, (*methylprednisolone (MP)* vagy *azathioprine (AZT)* + *methylprednisolone*-t tartalmazó) immunosuppresszív kezelés mellett is számos esetben kimutatható aktív alveolitisz jelenléte. A nem invazív módszerek segítségével (mellkas Rtg., spirometria, CO diffúziós kapacitás és nagy felbontású tüdő CT (HRCT)) kiválasztott DM/PM-es és szkleroderma-miozitisz overlap szindrómás betegek bronchoalveoláris lavage (BAL) vizsgálata során alveolitiszt igazoltunk. 4 miozitiszes betegnél észleltük a Ki-67 expresszáló alveoláris makrofágok számának megemelkedését, míg a nem differenciált kollagenózis betegek és az egészséges kontroll csoportban ezen sejtek száma alacsonynak bizonyult. A különböző autoimmun betegségben szenvedő, valamint a kontrollcsoport BAL sejtmintáinak adatai értékelése során pozitív korrelációt találtunk a BAL granulocita arány és a Ki-67+ makrofágok aránya között. A miozitiszes betegek BAL folyadékából nyert sejtek Ki-67 expresszióval igazolt, fokozott helyi proliferációja is az aktív gyulladásos folyamat jelenlétét bizonyítja.

A Wegener granulomatózisos betegek tüdőérintettségének HRCT vizsgálata során az iniciális HRCT-n leggyakrabban észlelt eltérés a szoliter vagy többszörös kerekárnyék volt. A mellkasfelvétellel összevetve a HRCT-n több lézió volt észlelhető, és ez a vizsgálat lehetővé tette finom morfológiai jellemzők, mint a centrális kavitáció, valamint a fokális tejüveghomály azonosítását. Ez utóbbinál egyik esetben sem volt a HRCT-vel egyidőben készült mellkasröntgen felvételen eltérés. Az immunosuppresszív kezelésre bekövetkező változás a tejüveghomály esetében volt a legegyszerűbb, ezek mindegyike eltűnt a kontrollvizsgálat idejére. A kerekárnyékok esetében heterogénebb válasz volt megfigyelhető. Perzisztálás, részleges és teljes felszívódás egyaránt előfordult. A kerekárnyékok kezdeti mérete nem korrelált a terápiára adott válasszal, valamint a spikuláció jelensége

megfigyelhető volt mind a későbbiekben perzisztáló, mind a regrediáló nodulusokon. A centrális üregképződés ezzel szemben prognosztikailag fontos jelnek bizonyult. A centrális kavitációt mutató 4 beteg közül 3 esetben teljes resolúciót figyeltünk meg, míg a negyedik esetében a kavitált granulóma mérete 60%-os csökkenést mutatott a *cyclophosphamide*(CPH) terápia végére, és az *methotrexate* kezelés alatt teljesen felszívódott. Így minden betegnél, akiben a granulómákban centrális üregképződés mutatható ki, ez az aktív, reverzibilis folyamat jelének tekinthető.

A második HRCT-t utáni követés során sem a reziduális nodulusok, sem a vonalas árnyékok jelenléte nem kapcsolódott magasabb relapszusgyakorisághoz. A pulmonális és nem pulmonális relapszusok egyenletesen oszlottak el a 3 csoport közt.

Wegener granulomatózisban, az aktív folyamat idején vett mintákban, a monociták intracitoplazmatikus IL-12 és TNF $\alpha$  expressziója emelkedett volt az egészséges kontrollhoz képest, míg az IL-8 termelő sejtek aránya nem. Az orális CPH+MP kezeléssel elért remisszióban a monociták emelkedett IL-12 és TNF $\alpha$  expressziója normalizálódott. A CYC aktív metabolitja *in vitro* az IL-12 mRNA expressziójának down-regulációját idézte elő.

Immunhisztológiai vizsgálataink alapján a Wegener granulomatózis területéről származó szövetmintákban a CD4+ T-sejtek túlnyomó része CD28-at nem expresszál és -a CD4+CD28-sejtek citokinszekréciónak vizsgálata alapján- ezek a sejtek tekinthetőek a Th1 (INF $\gamma$ , TNF $\alpha$ ) citokinek elsődleges forrásának Wegener granulomatózisban. A CD4-pozitív CD28-T-sejteken CD18 és CD57 valamint intracitoplazmatikusan perforin expressziót észleltünk, emellett felszínükön nem mutatható ki CD25 (IL-2 receptor/IL-2R). Ezzel szemben a CD4+CD28+ T-sejtek jelentős mennyiségben expresszálják CD25-öt, míg perforin-t nem, és a CD28-sejtekkel összevetve szélesebb spektrumú citokin szekréciónak mutattak.

A Wegener granulomatózisos betegek szerológiai vizsgálata során összefüggést tudtunk kimutatni a CD4+CD28-sejtek arányának emelkedése és a betegek kora, valamint az antiCMV IgG titere közt. A betegek közül 4 esetben a közelmúltban lezajlott CMV (re)infectio szerológiai jeleit észleltük, emelkedett antiCMV IgG és antiCMV IgM formájában. Ezen betegekben a CD4+CD28-sejtek aránya jelentősen magasabb volt, mint a antiCMV-IgM negatív esetekben.

## 6. Következtetések

Vizsgálataink során a szisztémás autoimmun betegségek -remissziókkal és relapszusokkal, valamint több esetben látens progresszióval jellemzett- jelenségköréből a betegek szempontjából leginkább jelentős, aktivitási jeleket kíséreltük meg karakterizálni.

Mivel az ebbe a körbe tartozó betegségek, jellegzetesen igen változatos kombinációban érintenek különböző szerveket és szervrendszereket, célunkat a több betegségben az életminőséget és a túlélést jelentősen befolyásoló tüdőérintettségre koncentrálni jelöltük ki. Két olyan betegcsoportban végeztünk tanulmányokat, ahol a pulmonális érintettség viszonylag gyakori és így lehetővé teszi a relatíve alacsony gyakoriság ellenére a homogén betegcsoport felállítását.

Kérdésfelvetéseink alapvetően klinikai indíttatásúak voltak. Igyekeztünk körvonalazni, meghatározni, lehetőleg non-invazív módszerekkel azonosítani azokat az érintetteket, akiknél az aktív terápiás lépések, azok veszélyei mellett a legnagyobb várható hasznot hozzák. Ennek során a modern, sok szempontból még nem jellemzett vizsgálómódszerek eredményeinek, klinikai adatokkal történő összevetésével, azok kritikus, értő alkalmazásához kíséreltük meg hozzájárulni.

A tüdő vizsgálata, annak klinikai jelentősége mellett tudományos érdeklődés szempontjából fontos lehetőséget nyújt azáltal, hogy a napi orvosi gyakorlatban alkalmazott non-invazív hörgőöblítés során kinyert sejtek vizsgálatával, a gyulladásos folyamatok helyéről történő

mintavételt tesz lehetővé. Az így nyert sejtek elemzése, a hagyományos biopsziás minták vizsgálatával összevetve, természetesen nem ad ugyan lehetőséget a klasszikus patomorfológiai elemzésre, azonban az újabb, részben általunk is alkalmazott módszerek segítségével, a gyulladással zajló folyamatokról értékes információkkal szolgálhat. Vizsgálataink során is demonstrálható volt az összefüggés a BAL sejtek összetétele és a WG-es betegek felsőlégtű mintáiban szövettani módszerekkel demonstrálható eltérések közt.

A DM/PM-es betegek közt végzett vizsgálataink eredménye felhívja a figyelmet arra, hogy a szisztémás autoimmun kórképek, bár a betegség lefolyása során és sokszor egyidőben több szervet /szervrendszert érintenek, az egyes manifesztációk az alkalmazott kezelésre különböző mértékben reagálhatnak. Az izomfolyamat remissziója ellenére a szubklinikus alveolitisz perzisztálhat. Ezen betegekben a BAL folyadékából nyert sejtek Ki-67 expresszióval igazolt, fokozott helyi proliferációja is az aktív gyulladással járó folyamat jelenlétét bizonyítja. Az általunk vizsgált betegcsoportban nem észleltünk a DM/PM-re egyértelműen jellemző alveolitisz típusot.

Míg a nemzetközi irodalomban viszonylag nagy számú közlemény foglalkozott a gyulladással járó miopátiákban jelentkező intersticiális tüdőbetegség fennállásának non- invazív eszközökkel (köztük számos esetben nagyfelbontású tüdő CT-vel) történő bizonyításával [26-28], csak néhányban került a DM/PM-es betegek BAL sejtösszetétele leírásra. (8. Táblázat). Grau és munkatársai csak dermatomiozitiszes betegekben észleltek alveolitiszt, míg sem polimiozitiszes, sem tumor-asszociált esetekben nem találtak súlyos alveolitiszt. A vizsgált 5 alveolitiszes betegből háromnál emelkedett neutrofil, egynél emelkedett limfocita arányt írtak le, míg egy esetben mindkét sejttípus aránya emelkedett volt [20]. Wallaert 3 esetből kettőben neutrofil alveolitiszt tudott kimutatni [18]. Sauty CD8 pozitív limfociták alveolitiszt írt le, négy anti-Jo-1 pozitív, de izomtűneteket nem mutató betegben [97], ami jelzi, hogy a tüdőbetegség az izomtűneteket megelőzheti. Schnabel egy prospektív tanulmányt közölt az intravénás bólus ciklofoszfamid kezeléséről kollagenózisokban. A közleményben szereplő 2 miozitiszes betegnél kezdetben kevert alveolitiszt igazoltak, amelyből a kezelés hatására csak a granulocita komponens csökkent egyértelműen a terápia hatására, míg a BAL limfocitózis fokozódott az egyik, csökkent de a megadott normálérték felett maradt a másik esetben [28]. Az irodalomban fellelt többi esetbemutatót az 8. Táblázatban foglaltuk össze.

Véleményünk szerint, míg a limfociták alveolitisz klinikai jelentősége DM/PM-ben és általában a kollagenózisokban vitatott és óvatosan értékelendő, a granulocita szám 5% fölé emelkedése technikailag helyesen végzett BAL mosófolyadékában, általánosan elfogadottan a zajló destruktív folyamatok jelének tekintendő. A közölt kis számú eset közt mind limfociták, mind neutrofil, mind mindkét sejttípus arányának emelkedésével járó alveolitiszt is leírtak. Ebben a betegcsoportban a gyors diagnózis és az időben megkezdett kezelés javítja a prognózist és a súlyos szövődmények kialakulását megelőzi, emellett a tüdő érintettsége a kórkép kezdeti stádiumában még rendszerint nem okoz jelentős tüneteket, ezért gyakorlatilag igen nehezen oldható meg kezeletlen betegek nagyobb számában történő vizsgálata. Ez a körülmény magyarázza, hogy mind az irodalomban mind saját anyagunkban változó hatékonyságú kezeléseken átesett betegek eredményei kerülnek ismertetésre, és szintén ez lehet az oka a heterogén eredményeknek. Az alveolitisz korai diagnosztizálása fontos feladat, mert az időben elkezdett kezeléssel a folyamat megállítható, a tüdő irreverzibilis károsodásának kialakulása megelőzhető, vagy legalábbis a progresszió lassítható. Ezért különös jelentősége van egy, a non-invazív szűrőmódszereken alapuló vizsgálati-követési stratégia kialakításának, ami a fokozott kockázatú betegek kiválasztására koncentrál. Ezen kivizsgálási algoritmus segítségével választhatóak ki az agresszívan kezelendő betegek.

BETEGSZÁM	ALVEOLITISZ	TÍPUSA	IRODALOM	
	Neutrofil alveolitisz <sup>1</sup>	Limfocitás		
5	4 (1)	1	Grau JM et al.	[20]
3	2		* Wallaert B et al.	[18]
4	2 (2)	2	Schnabel A et al. <sup>2</sup>	[28]
4		4	* Sauty A et al. <sup>3</sup>	[97]
1		1	* Fischer E et al.	[98]
3	1 (1)		Flammang d'Ortho MP et al. <sup>4</sup>	[19]
3	3 (2)		Toyoshima M et al.	[99]
2		1	Okuda Y et al.	[100]
1	1		Löhr HF et al.	[101]

### 8. táblázat

#### **Az angol nyelvű irodalomban fellelt, a dermatomiozitiszes / polimiozitiszes betegek BAL vizsgálati eredményeivel kapcsolatos közlemények összefoglalása.**

A táblázat összeállításánál 10% feletti limfocita és 5% feletti neutrofil granulocita számot vettünk emelkedettnek. Amennyiben a cikkben saját kontrollcsoport alapján ennél magasabb határértéket adtak meg, akkor azt vettük alapul. (csillaggal jelölt közlemények).

<sup>1</sup> zárójelben azon esetek száma ahol a limfocitaszám is emelkedett volt.

<sup>2</sup> Intravénás ciklofoszfamid kezelést vizsgáló prospektív vizsgálat. Részleteket illetően utalunk a szövegre

<sup>3</sup> anti-Jo1 antitest pozitív betegek akik között mindössze egynél jelentkeztek izomtünetek a 2 éves utánkövetés során.

<sup>4</sup> az ismertetett 3 beteg közül mindháromnál emelkedett sejtszámot észleltek, de csak egynél volt a sejt arányokban eltérés.

A WG-os betegek közt végzett követéses vizsgálatunk során kimutattuk, hogy a kezelt tüdő WG jelentős reziduális károsodást hagy hátra, jobbra kis kerekárnyékok és vonalak formájában. A tejüveghomály, a centrálisan kavított granulómák és a nagy granulómák rendszerint aktív betegsége utalnak. A remisszióban észlelt kis kerekárnyékok feltételezhetően heges maradványok és jelenlétük nem hozható összefüggésbe magasabb relapszus gyakorisággal.

A HRCT által kimutatott eltérések klinikai, prognosztikai jelentősége ebben a betegcsoportban még nem teljesen tisztázott. 2 korábbi vizsgálat azt sugallja, hogy egy részük nem aktív folyamat, hanem reziduális károsodást mutat. Reuter és munkatársai gyakrabban találtak kerekárnyékokat és tejüveghomályt aktív betegeknél, mint azoknál, akiknél a tüdőfolyamat remisszióban volt [39]. A szeptális /nem-szeptális vonalak mind aktív, mind remisszióban lévő betegeknél azonos gyakoriságúak voltak. Egy másik 10 tagú, WG-os kohort követéses adatait ismertető tanulmány szintén jelentős esetben talált perzisztáló granulómákat vagy tejüveghomályt a követési HRCT-n [35]. Azonban az inhomogén betegcsoport, a heterogén kezelés rezsimek, és a követési adatok hiánya miatt ez a két tanulmány nem teszi lehetővé a biztos különbségtételt, az irreverzibilis károsodás és az elégtelenül kezelt, perzisztáló aktív léziók közt.

Összevetve; a HRCT előnye a konvencionális röntgenteknikával szemben leginkább a frissen diagnosztizált esetekben jelentős, ahol a korábbi, lezajlott folyamatok differenciáldiagnosztikai szempontból kevésbé jönnek szóba. Hosszabb ideje fennálló WG-

ban az aktív és inaktív betegség közti, HRCT segítségével történő különbségtételnek a betegség aktivitásra specifikus eltérések jelenlétén, illetve hiányán kell alapulnia.

A HRCT, nagyobb szenzitivitása miatt, lényegesen több eltérés detektálására alkalmas. Valójában a tanulmányba bevont 28 beteg közül csak 12-nél nem voltak a remisszióban reziduális léziók. A HRCT különbségtételi képessége aktív és heges léziók közt egyértelműen limitált. Különösen a tejüveghomály, centrális üregképződést mutató kerekárnyékok és a nagy átmérőjű árnyékok azok, amelyek WG-os betegen nagy biztonsággal aktív, gyulladásos folyamatot jeleznek. Ezzel szemben a kis noduláris léziók -amelyek a leggyakoribb eltérések-hasonlóan a vonalas árnyékokhoz, mind aktív mind reziduális léziók is lehetnek.

A Wegener granulomatózisos betegekből származó szövettani mintákban jellemzően CD4+ T sejtek, monocita eredetű szöveti makrofágok, óriássejtek és neutrofilok mutathatók ki.

A granulóma kialakulásában, a vasculitis inicializálásában és fenntartásában a specializált, citokin-termelő T sejtek, aktivált monociták és makrofágok szerepe valószínűsíthető. A monociták fontos szerepet játszanak a citokinprofil korai kialakításában. A WG betegekből származó monociták emelkedett IL-12 szekréciónak mutatnak, ez a citokin a T-sejteket Th1 irányú citokinszekréciónak serkenti [54]. Továbbá fokozott TNF $\alpha$  gén expresszióról számoltak be ezen monocitákban [102], ami azt sugallja, hogy a veleszületett immunitás egyéb mechanizmusai is szerepelnek a WG immunopatogenezisében. A monocita eredetű citokinek, különösen az IL-12, szerepet játszhat immunoregulációs válasz korai Th1 irányú polarizálásában.

Az orális CPH + GC kezelés évek óta a WG kezelésének standardját jelenti. Hatásmechanizmusát illetően a B sejt funkció és az antitest termelés jelentős csökkentéséről voltak adataink, ami a CPH elsődlegesen a humorális immunitásra kifejtett gátló hatására utaltak [103]. A GC számos citokin, köztük az IFN $\gamma$  termelését gátolja. A pulzus *cyclophosphamide* és *methylprednisolone* terápiának az emelkedett IL-12 termelésre kifejtett normalizáló hatását tudták igazolni szklerózis multiplexes betegek fokozott IFN $\gamma$ -t termelő T sejtjein és monocitáin [104]. Vizsgálatunkkal kiterjesztettük ezen megfigyelést azzal, hogy GC dózisának jelentős csökkentését követően is kimutatható a monociták IL-12 és TNF $\alpha$  expresszióját normalizáló hatása. Továbbá kimutattuk, hogy a CPH aktív metabolitja 10<sup>-5</sup> M koncentrációban *in vitro* a WG-os betegek perifériás monocitáin az IL-12 mRNA expressziójának down-regulációját idézte elő.

Így klinikai adatok és a kísérleti eredmények alapján a CPH-nak a GC késői dóziscsökkentését követően is fennálló, a citokinprofil normalizálására kifejtett hatásának megmaradására következtetünk.

Igazoltuk hogy a CPH + GC terápia normalizálja a monocita eredetű IL-12 és TNF-a termelését WG-ban. Ezek az adatok azt sugallják, hogy a Th1 citokin profil normalizálása jellemzője és előfeltétele lehet a stabil remisszió elérésének WG-ban és ebben a hatásban a CPH szerepe lehet a domináló. Ezen eredmények alapján a jövő anticitokin elven alapuló terápiás kísérleteinek lehetséges célja lehet a Th1 polarizált immunválasz normalizálása WG-ban. Eredményeik számos ponton egyeznek a korábban publikált más módszerrel végzett vizsgálatokkal. Deguchi és munkatársai [105] emelkedett monocita TNF $\alpha$  gén expresszióról számoltak be. Ludviksson és munkatársainak korábban idézett kísérleteiben emelkedett IL-12 termelést mutattak azonban ELISA mérések során nem találtak fokozott monocita TNF $\alpha$  termelést, és főleg T sejtekben azonosították annak fő forrását [54]. Az ELISA és az áramlási citometriás citokin expresszió mérése közt igen jó korrelációt mutattak ki, míg utóbbinak értékes tulajdonsága, hogy egyes sejt szinten képes a jellemző citokinszekréciónak vizsgálatára. Az áramlási citometriás citokin termelés meghatározásának alapja a szekréciónak akadályozó gátlószer jelenlétében történő sejtstimuláció amit, fixálás, permeabilizálás és az akkumulált citokin intracitoplazmatikus festése követ [61]. Szekréciónak gátlására monensin-t használtunk ami hatásmechanizmusát tekintve egy nátrium ionofor. Streptomycos

Cinnamonensis-ből állítják elő és a sejt membránjain jelentkező, Na<sup>+</sup> és H<sup>+</sup> iongrádiens tönkretételével a Golgi transzportot akadályozza meg, ami így a citokinek intracelluláris felhalmozódásához vezet.

Emellett azonban az utóbbi során igazolt expresszió nem jelent feltétlenül az előbbivel kimutatható szekréciót. T sejteken végzett vizsgálataink arra utalnak, hogy a TNF $\alpha$  termelésnek a monociták mellett egyéb jelentős forrásai lehetnek. A monociták emelkedett TNF $\alpha$  gén expressziója [6] és az általunk igazolt TNF $\alpha$  kifejeződés alapján joggal feltételezzük, hogy ezek a sejtek jelentős TNF $\alpha$  források lehetnek, ami összhangban van azzal a ténnyel, hogy TNF $\alpha$  receptor antagonist terápia jótékonyan bizonyult WG-ben.

A Wegener granulomatózisban jelentkező limfocitás alveolitiszben azonosított és a betegek szisztémás keringéséből izolálható különleges fenotípusú T sejt populációval végzett vizsgálataink a CD4+CD28- sejtek a Th1-es citokinprofil kialakításában mutatott jelentős szerepére utalnak. A Wegener granulomatózisos betegek BAL és perifériás vér mintáiban expandált CD4+CD28-CD57+ T sejt szubpopuláció nagy mennyiségű INF $\gamma$  és TNF $\alpha$  szekréciójára specializálódott. Ez következményes Th1 válasz irányába történő eltolódást idézhet elő és így a WG patogeneziséhez hozzájárulhat. Az a megfigyelés, hogy ezen sejtek gyakoribb előfordulása a CMV szeropozitív betegekben fokozott, különösen fontos ezen ismeretlen patogenezisű megbetegedés kialakulásában szerepet játszó környezeti hatások azonosításának szempontjából. Mind az ANCA asszociált vaszkulitiszes egérmodellben észleltek, [106] mind a WG-ban évtizedek óta alkalmazott TMP + SMX kezelés alátámasztja azt a feltételezést, hogy a betegség aktivitásának alakulásában, illetve újra fellobbanásában, az aktuális, esetleg egészségesekben minimális tüneteket okozó, infekciók szerepet játszhatnak. Értelmezésünk szerint a CMV infekciónak ilyen jellegű hatása lehet a meglévő Th1 irányú reakcióra a normálisnál hajlamosabb szervezetben. Létrehozva a CD28- T sejtek expanszióját, az immunpatológiai folyamat akcelerációját, fellobbanását okozhatja, illetve a látenszen zajló gyulladási folyamat szövetdestrukciós hatását fokozhatja.

További vizsgálatokat tartunk szükségesnek annak vizsgálatára, hogy CMV infekció/reinfekció mennyiben befolyásolja a betegség klinikai képét.



## **7. Gyakrabban használt rövidítések**

ANCA -	anti-neutrofil citoplazmatikus antitest
APC -	antigénprezentáló sejt
AZT -	azathioprine
BAL -	bronchoalveoláris lavage
BVAS -	brit vaszkulitisz aktivitási pontrendszer (score)
CK -	kreatin kináz
CMV -	citomegalovírus
CPH -	cyclophosphamide
CRP -	C-reaktív protein,
CT -	computertomográfia
DEI -	betegség kiterjedtség index-el (DEI, Disease Extension Index)
DM/PM -	dermatomiozitisz / polimiozitisz
EMG -	elektromiogramm
HLA -	human leukocita antigén
HRCT -	nagyfelbontású tüdő computer-tomographiás vizsgálat
ILD -	intersticiális tüdőbetegség
IL-1 -	interleukin
INF $\gamma$ -	interferon gamma
LDH -	laktát dehidrogenáz
LEF -	leflunomide
LPS -	lipopolyszacharid
MHC.-	major hisztokompatibilitási komplex
MP -	methylprednisolone
MTX -	methotrexate
PR3 -	proteináz 3
TCR -	T sejt receptor
Th1 -	T helper 1
TMP/SMX -	trimethoprim-sulphamethoxazole
TNF -	tumor nekrosis faktor
VCAM-1	vaszkuláris sejt adhézios molekula-1
WG -	Wegener granulomatózis

## **8. A dolgozat témájával kapcsolatos közlemények**

### **Írásos közlemények:**

#### **Angol nyelvű:**

1. Komócsi A, Tóvári E, Kovács J, Czirják L. Physical injury as a provoking factor in three patients with scleroderma. Clin Exp. Rheumatol 2000; 18: 622-624.
2. Kumánovics G, Zibotics H, Juhász E, Dévényi K, Komócsi A, Czirják L.: Subclinical pulmonary involvement assessed by bronchoalveolar lavage in patients with undifferentiated connective tissue disease. Clin Exp. Rheum. 2001;19:551-559.
3. Komócsi A, Tóvári E, Pajor L, Czirják L. Histiocytic necrotising lymphadenitis preceding systemic lupus erythematosus. J Eur Acad Derm Vener 2001; 15: 473-475.
4. Komócsi A, Kumánovics G, Zibotics H, Czirják L. Alveolitis may persist during treatment that sufficiently controls muscle inflammation in myositis. Rheumatol Int 2001; 20: 113-118
5. Lamprecht P, Kumanovics G, Mueller A, Csernok E, Komocsi A, Trabandt A, Gross WL, Schnabel A.: Elevated monocytic IL-12 and TNFalpha production in Wegener's granulomatosis is normalized by cyclophosphamide and corticosteroid therapy. Clin Exp Immunol 2002 Apr;128(1):181-6
6. Komocsi A, Lamprecht P, Csernok E, Mueller A, Holl-Ulrich K, Seitzer U, Moosig F, Schnabel A, Gross WL.: Peripheral Blood and Granuloma CD4(+)CD28(-) T Cells Are a Major Source of Interferon-gamma and Tumor Necrosis Factor-alpha in Wegener's Granulomatosis. Am J Pathol 2002 May;160(5):1717-24
7. Komocsi A., Reuter M., Heller M., Muraközi H., Gross WL., Schnabel A.: Active disease and residual damage in treated Wegener's granulomatosis: an observational study using pulmonary high-resolution computed tomography. Eur Radiol 2003; 13: 36-42
8. Kumánovics G., Magyarlaki T., Komócsi A., Szekeres Gy., Czirják L.: Simultaneous presence of neutrophil alveolitis and Ki-67 positivity of alveolar macrophages in dermato-/polymyositis and systemic sclerosis Rheum Int. Rheumatol Int 2003; 23: 6-10

#### **Magyar nyelvű:**

1. Czirják L, Komócsi A. Tóvári E.: Provokációs tényezők szerepe a szisztémás szklerózis patogenezisében. Allergológia és Klinikai Immunológia. 2000; 3: 1-6
2. Czirják L, Zibotics H, Pfund Z, Gáti I, Varjú C, Komócsi A, Kumánovics G: Klinikai manifesztációk vizsgálata gyulladásos myopathiákban. Magyar Rheumatológia, 2000; 41: 211-215.

3. Czirják L, Komócsi A.: A microchimerismus esetleges szerepe a szisztémás sclerosis patogenesisében. Táplálkozás Allergia Diéta 2000; 5 (1): 2-6.
4. Komócsi A, Kumánovics G, Czirják L.: A Wegener granulomatózis. Allergológia és Klinikai Immunológia. 2001; 4: 1-7
5. Komócsi A, Kumánovics G, Czirják L.: A Wegener granulomatózisról 11 beteg kapcsán. Magyar Rheumatológia, 2001; 42: 79-84.
6. Kumánovics G., Zibotics H., Komócsi A., Czirják L.: Pulmonális fibrózis pathomechanizmusa systemás autoimmun kórképekben. Allergológia és Klinikai Immunológia 2001;4 (3): 67-73.
7. Kumánovics G., Zibotics H., Komócsi A., Czirják L.: Pulmonális fibrózis, alveolitis systemás autoimmun kórképekben. Allergológia és Klinikai Immunológia 2001;4 (4): 98-106.

#### **Előadások:**

##### **Angol és német nyelvű:**

1. Lamprecht P, Komocsi A, Csemok E, Mueller A, Seitzer U, Moosig F, Schnabel A, Gross WL: CD4-Positive Cd28-Negative T-Cells are the major source of Th-1 like cytokine production in Wegeners's granulomatosis. 65th Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology and 36th Annual Scientific Meeting of the Association of Rheumatology Health Professionals, San Francisco, CA November 10-15., 2001.  
Előadáskivonat: Arthritis & Rheumatism 44, no. 9 suppl., 2001.
2. Komocsi A, Muraközy H, Reuter M, Gross WL, Schnabel A.: Aktivitätsbeurteilung der pulmonalen Wegenerschen Granulomatose mittels hochauflösender Computertomographie (HRCT) Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie, Aachen 13-16 September 2000  
Előadáskivonat: Z Rheumatol 2000; 59:43
3. Komocsi A, Lamprecht P, Csernok E, Müller A, Seitzer U, Moosig F, Trabandt A, Schnabel A, Gross WL.: Expansion und Homing CD28- T-Zellen in granulomatöse Laesionen bei der Wegenerschen Granulomatose nach CMV-Reaktivierung. Tagung der Nordwestdeutschen Gesellschaft für Innere Medizin 02.02.2001 Hamburg
4. Komocsi A, Csernok E, Müller A, Moosig F, Dittmann R, Lamprecht P, Schnabel A, Gross WL: The expanded CD4+CD28-CD57+ T cell subset in Wegener's granulomatosis displays a predominantly polarized INF $\gamma$ +TNF $\alpha$ +IL-2-phenotype and is associated with cytomegalovirus seropositivity. Joint Annual Meeting of Immunology of the German and Dutch Societies (DGfI, NVvI) November 29 - December 2, 2000 Düsseldorf

## **Magyar nyelvű:**

1. Komócsi A., Tóvári E., Nagy Z., Czirják L.: Systemás vasculitisek a POTE II. sz. Belklinika immunológiai osztályán.  
A Magyar Belgyógyász Társaság dunántúli szekciójának XLIV. vándorgyűlése  
Siófok, 1997.junius 12-14.  
Előadáskivonat: Magyar Belorvosi Archivum SUPPL. 2/1997.p127.
2. Czirják L., Tóvári E., Kumánovics G., Komócsi A., Nagy Z.: Klinikai - laboratóriumi jellemzők vizsgálata nem differenciált kollagenózisban.  
Magyar Reumatológusok Egyesülete 1997. évi vándorgyűlése Bükkfürdő-  
Szombathely 1997.dec.4-7.  
Előadáskivonat: Magyar Rheumatológia 1997 (3)
3. Komócsi A., Tóvári E., Nagy Z., Magyarlaci T., Tóth T., Czirják L.: Veseérintettség polysystemás autoimmun kórképekben.Magyar Nephrologiai Társaság Nagygyűlése Pécs,1997.november 13-15.
4. Komócsi A., Balogh E., Magyarlaci T., Czirják L.: Veseérintettség vizsgálata a systemás autoimmun kórképekben.  
MAKIT XXVI. Kongresszusa Harkány 1998 május 13-15.  
Előadáskivonat: Allergológia és Klinikai Immunológia I. évf. 2. sz. 110.
5. Nagy Z., Kumánovics G., Komócsi A., Tóvári E., Czirják L.: A capillarmicroscopia jelentősége a systemás autoimmun kórképek és a Raynaud syndroma diagnosztikájában  
MAKIT XXVI. Kongresszusa Harkány 1998 május 13-15.  
Előadáskivonat: Allergológia és Klinikai Immunológia I. évf. 2. sz. 111.
6. Kumánovics G., Komócsi A., Zibotics H., Zoltán I., Juhász E., Tóth T., Czirják L.: Systemás sclerosis és korai, előfázisos esetek tüdőmanifesztációjának összehasonlító vizsgálata. A Magyar Immunológiai Társaság XXVIII. Kongresszusa 1998. Harkány, 1998. szeptember 30 - október 2.
7. Kumánovics G, Komócsi A, Tóth T, Czirják L: Bronchoalveoláris lavage jelentősége a polysystemás autoimmun betegségek tüdőmanifesztációjának vizsgálatában. MRE 99' Debrecen  
Előadáskivonat: Magyar Rheumatológia 1999; 40: 171.
8. Tóth M, Nagy M, Komócsi A, Czirják L: Szervesoldószer expositio vizsgálata szisztémás autoimmun kórképekben és Raynaud syndromában  
MRE 99' Debrecen  
Előadáskivonat: Magyar Rheumatológia 1999, 40, 171
9. Nagy Z, Tóvári E, Komócsi A, Kumánovics G, Czirják L: Klinikai vizsgálatok nem differenciált collagenosisban  
MRE 99' Debrecen  
Előadáskivonat: Magyar Rheumatológia 1999, 40, 167.

10. Nagy Z, Tóvári E, Komócsi A, Kumánovics G, Czirják L: Systemás vasculitisek jellemzői néhány esetünk kapcsán  
A Magyar Belgyógyász Társaság Dunántúli Szekciójának XLVI. Vándorgyűlése Zalaegerszeg (Alsópáhok) 1999.június 17-19.  
Előadáskivonat: MBA Suppl 1./1999 24.o.

11. Kumánovics G., Komócsi A. Czirják L.: Alveolitis vizsgálata nem differenciált collagenosisban és systemás sclerosiban. Magyar Immunológiai Társaság 1999. évi Kongresszusa, Bük. 1999. október 27-29.

12. Kumánovics G., Tóvári E., Komócsi A., Czirják L.: Klinikai/laboratóriumi vizsgálatok systemás sutoimmun kórképekhez társuló alveolitis és interstitialis tüdőfibrozis esetén. Fiatal Allergológusok Első Fóruma, Budapest. 1999. szeptember 30.

13. Kumánovics G, Komócsi A Czirják L: Alveolitis vizsgálata nem differenciált collagenosisban és systemás sclerosiban, MIT 99'

14. Czirják L, Kumánovics G, Komócsi A: Klinikai immunológiai vizsgálatok nem differenciált kollagenosisban.  
A magyar reumatológia '99 A csont és ízület évtizede (2000-2010) jegyében Semmelweis Orvostudományi Egyetem, Díszterem, 1085 Budapest, A magyar tudomány napja, Budapest, 1999. november 2.

15. Kumánovics G, Magyarlaci T, Szekeres Gy, Zibotics H, Komócsi A, Czirják L: KI-67 pozitív alveoláris makrofágok és neutrofil alveolitis egyidejű jelenléte systemás sclerosisos és myositises betegekben  
A Magyar Immunológiai Társaság Jubileumi (XXX.) Kongresszusa Budapest, 2000, október 25-27.

16. Komócsi A Nagy Z, Tóvári E, Kumánovics G, Czirják L: A Wegener granulomatózisról 9 eset kapcsán.  
MRE 2000' Kecskemét  
Előadáskivonat: Magyar Rheumatológia 2000, 3, 148.

17. Czirják L, Zibotics H, Pfund Z, Gáti I, Varjú C, Komócsi A, Kumánovics G: Szervi manifesztációk vizsgálata gyulladásos myopathiákban.  
MRE 2000' Kecskemét  
Előadáskivonat: Magyar Rheumatológia 2000, 3, 148.

## 9. Irodalom

1. Wick G, Sgonc R, Lechner O: Neuroendocrine-immune disturbances in animal models with spontaneous autoimmune diseases. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 840:591-8:591-598, 1998
2. Arsur EL, Greenberg AS: Adverse impact of interstitial pulmonary fibrosis on prognosis in polymyositis and dermatomyositis. *Semin.Arthritis Rheum.* 18:29-37, 1988
3. Maugars YM, Berthelot JM, Abbas AA, Mussini JM, Nguyen JM, Prost AM: Long-term prognosis of 69 patients with dermatomyositis or polymyositis. *Clin.Exp.Rheumatol.* 14:263-274, 1996
4. Aberle DR, Gamsu G, Lynch D: Thoracic manifestations of Wegener granulomatosis: diagnosis and course. *Radiology* 174:703-709, 1990
5. Dankó K, Szegedi G: A dermatomyositis és polymyositis betegek klinikai jellemzői. *Magyar Belorvosi Archivum*303-307, 1993
6. Dankó K, Csipo I, Devenyi K, Szegedi G: Anti-Jo-1 antitest jelenléte polymyositis/dermatomyositis betegek szérumában. *Magyar Belorvosi Archivum* 4:297-299, 1994
7. Dankó K, Czirjak L, Devenyi K, Kovács I, Szegedi G: Anti-szintetáz szindróma. *Magyar Belorvosi Archivum*255-259, 1998
8. Dankó K, Zilahi Z, Szegedi G: A polymyositis, dermatomyositis klinikai és immunológiai sajátosságai. *LAM* 2:814-821, 1992
9. de Merieux P, Verity MA, Clements PJ, Paulus HE: Esophageal abnormalities and dysphagia in polymyositis and dermatomyositis. *Arthritis Rheum.* 26:961-968, 1983
10. Marschalkó M, Pónyai G, Ablonczy É, Horváth A: Dermatomyositis: klinikai megfigyelések 34 betegen. *Orv.Hetil.* 141:225-229, 2000
11. Ganczarzyk ML, Lee P, Armstrong SK: Nailfold capillary microscopy in polymyositis and dermatomyositis. *Arthritis Rheum.* 31:326-330, 1988
12. Maricq HR, Spencer GG, LeRoy EC: Skin capillary abnormalities as indicators of organ involvement in scleroderma (systemic sclerosis), Raynaud's syndrome and dermatomyositis. *Am.J.Med.* 61:862-870, 1976
13. Vazquez-Abad D, Rothfield NF: Sensitivity and specificity of anti-Jo-1 antibodies in autoimmune diseases with myositis. *Arthritis Rheum.* 39:292-296, 1996
14. Czirjak L, Zibotics H, Pfund Z, Gáti I, Varjú C, Komocsi A, Kumanovics G: Klinikai megfigyelések vizsgálata gyulladássos myopathiákban. *Magyar Reumatológia* 41:211-215, 2000
15. Marie I, Hatron PY, Hachulla E, Wallaert B, Michon-Pasturel U, Devulder B: Pulmonary involvement in polymyositis and in dermatomyositis [see comments]. *J.Rheumatol.* 25:1336-1343, 1998
16. Friedman AW, Targoff IN, Arnett FC: Interstitial lung disease with autoantibodies against aminoacyl-tRNA synthetases in the absence of clinically apparent myositis. *Semin.Arthritis Rheum.* 26:459-467, 1996
17. Acosta Fernandez O, Alfonso Deniz J, Morales Umpierrez A, Rodriguez de Castro F, Esparza Morera R: [Asymptomatic polymyositis with pulmonary disease]. *An.Med.Interna.* 11:83-85, 1994
18. Wallaert B, Hatron PY, Grosbois JM, Tonnel AB, Devulder B, Voisin C: Subclinical pulmonary involvement in collagen-vascular diseases assessed by bronchoalveolar lavage. Relationship between alveolitis and subsequent changes in lung function. *Am Rev Respir Dis* 133:574-580, 1986
19. Flammang dM, Cadranet J, Milleron B, Zalcman G, Arvin-Berod C, Terrioux P, Akoun G: [Interstitial pulmonary involvement of polymyositis and dermatomyositis. Apropos of 3 cases. Review of the literature]. *Rev.Pneumol.Clin.* 47:29-36, 1991
20. Grau JM, Miro O, Pedrol E, Casademont J, Masanes F, Herrero C, Hausman G, Urbano-Marquez A: Interstitial lung disease related to dermatomyositis. Comparative study with patients without lung involvement. *J.Rheumatol.* 23:1921-1926, 1996
21. Tubery M, Lauque D, Murriss M, Didier A, Adoue D, Estivals M, Duffaut M, Carles P: [Course of interstitial lung diseases associated with inflammatory myopathies. Apropos of 5 cases]. *Ann.Med.Interne.(Paris)* 148:2-10, 1997
22. Maeda K, Kimura R, Komuta K, Igarashi T: Cyclosporine treatment for polymyositis/dermatomyositis: is it possible to rescue the deteriorating cases with interstitial pneumonitis? *Scand.J.Rheumatol.* 26:24-29, 1997
23. Songcharoen S, Raju SF, Pennebaker JB: Interstitial lung disease in polymyositis and dermatomyositis. *J.Rheumatol.* 7:353-360, 1980

24. Marguerie C, Bunn CC, Beynon HL, Bernstein RM, Hughes JM, So AK, Walport MJ: Polymyositis, pulmonary fibrosis and autoantibodies to aminoacyl- tRNA synthetase enzymes. *Q.J.Med.* 77:1019-1038, 1990
25. Varju C, Petho E, Kutas R, Czirjak L: The effect of physical exercise following acute disease exacerbation in patients with dermato/polymyositis. *Clin.Rehabil.* 17:83-87, 2003
26. Mino M, Noma S, Taguchi Y, Tomii K, Kohri Y, Oida K: Pulmonary involvement in polymyositis and dermatomyositis: sequential evaluation with CT. *AJR.Am.J.Roentgenol.* 169:83-87, 1997
27. Ikezoe J, Johkoh T, Kohno N, Takeuchi N, Ichikado K, Nakamura H: High-resolution CT findings of lung disease in patients with polymyositis and dermatomyositis. *J.Thorac.Imaging* 11:250-259, 1996
28. Schnabel A, Reuter M, Gross WL: Intravenous pulse cyclophosphamide in the treatment of interstitial lung disease due to collagen vascular diseases. *Arthritis Rheum.* 41:1215-1220, 1998
29. Gross WL, Rasmussen N: Treatment of Wegener's granulomatosis: the view from two non- nephrologists [editorial] [see comments]. *Nephrol.Dial.Transplant.* 9:1219-1222, 1994
30. Schubert F, Muhle C, Schnabel A, Handrock K, Reuter M, Spielmann RP, Gross WL, Heller M: [High-resolution CT (HRCT) of the lung in Wegener's granulomatosis]High-resolution CT (HRCT) der Lunge bei Wegenerscher Granulomatose. *Rofo.Fortschr.Geb.Rontgenstr.Neuen.Bildgeb.Verfahr.* 161:19-24, 1994
31. Hoffman GS, Kerr GS, Leavitt RY, Hallahan CW, Lebovics RS, Travis WD, Rottem M, Fauci AS: Wegener granulomatosis: an analysis of 158 patients [see comments]. *Ann.Intern.Med.* 116:488-498, 1992
32. Reinhold-Keller E, Beuge N, Latza U, de Groot K, Rudert H, Nölle B, Heller M, Gross WL: An interdisciplinary approach to the care of patients with Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum.* 43:1021-1032, 2000
33. Weir IH, Muller NL, Chiles C, Godwin JD, Lee SH, Kullnig P: Wegener's granulomatosis: findings from computed tomography of the chest in 10 patients. *Can.Assoc.Radiol.J.* 43:31-34, 1992
34. Travis WD, Hoffman GS, Leavitt RY, Pass HI, Fauci AS: Surgical pathology of the lung in Wegener's granulomatosis. Review of 87 open lung biopsies from 67 patients. *Am.J.Surg.Pathol.* 15:315-333, 1991
35. Attali P, Begum R, Ban Romdhane H, Valeyre D, Guillevin L, Brauner MW: Pulmonary Wegener's granulomatosis: changes at follow-up CT. *Eur.Radiol.* 8:1009-1113, 1998
36. Cordier JF, Valeyre D, Guillevin L, Loire R, Brechot JM: Pulmonary Wegener's granulomatosis. A clinical and imaging study of 77 cases. *Chest* 97:906-912, 1990
37. Maskell GF, Lockwood CM, Flower CD: Computed tomography of the lung in Wegener's granulomatosis. *Clin.Radiol.* 48:377-380, 1993
38. Kuhlman JE, Hruban RH, Fishman EK: Wegener granulomatosis: CT features of parenchymal lung disease. *J.Comput.Assist.Tomogr.* 15:948-952, 1991
39. Reuter M, Schnabel A, Wesner F, Tetzlaff K, Risheng Y, Gross WL, Heller M: Pulmonary Wegener's granulomatosis: correlation between high- resolution CT findings and clinical scoring of disease activity. *Chest* 114:500-506, 1998
40. Papiris SA, Manoussakis MN, Drosos AA, Kontogiannis D, Constantopoulos SH, Moutsopoulos HM: Imaging of thoracic Wegener's granulomatosis: the computed tomographic appearance. *Am.J.Med.* 93:529-536, 1992
41. Huang RM, Naidich DP, Lubat E, Schinella R, Garay SM, McCauley DI: Septic pulmonary emboli: CT-radiographic correlation. *AJR.Am.J.Roentgenol.* 153:41-45, 1989
42. Kumanovics G, Zibotics H, Juhasz E, Komocsi A, Czirjak L: Subclinical pulmonary involvement assessed by bronchoalveolar lavage in patients with early undifferentiated connective tissue disease. *Clin.Exp.Rheumatol.* 19:551-559, 2001
43. Czirjak L, Koncz A, Varga I, Devenyi K, Kumanovics G, Szucs G: Investigation of the alveolar macrophages and T lymphocytes in 15 patients with systemic sclerosis. *Clin.Rheumatol.* 18:357-363, 1999
44. Orens JB, Kazerooni EA, Martinez FJ, Curtis JL, Gross BH, Flint A, Lynch JP3: The sensitivity of high-resolution CT in detecting idiopathic pulmonary fibrosis proved by open lung biopsy. A prospective study. *Chest* 108:109-115, 1995
45. Devenyi K, Czirjak L: High resolution computed tomography for the evaluation of lung involvement in 101 patients with scleroderma. *Clin.Rheumatol.* 14:633-640, 1995
46. Takada T, Suzuki E, Nakano M, Kagamu H, Tsukada H, Hasegawa T, Satoh M, Haraguchi M, Ebe T, Arakawa M: Clinical features of polymyositis/dermatomyositis with steroid- resistant interstitial lung disease. *Intern.Med.* 37:669-673, 1998
47. Manganelli P, Salaffi F, Pesci A: Clinical and subclinical alveolitis in connective tissue diseases assessed by bronchoalveolar lavage. *Semin.Arthritis Rheum.* 26:740-754, 1997

48. Csernok E, Trabandt A, Muller A, Wang GC, Moosig F, Paulsen J, Schnabel A, Gross WL: Cytokine profiles in Wegener's granulomatosis: predominance of type 1 (Th1) in the granulomatous inflammation. *Arthritis Rheum.* 42:742-750, 1999
49. Csernok E, Ernst M, Schmitt W, Bainton DF, Gross WL: Activated neutrophils express proteinase 3 on their plasma membrane in vitro and in vivo. *Clin.Exp.Immunol.* 95:244-250, 1994
50. Sibelius U, Hattar K, Schenkel A, Noll T, Csernok E, Gross WL, Mayet WJ, Piper HM, Seeger W, Grimminger F: Wegener's granulomatosis: anti-proteinase 3 antibodies are potent inducers of human endothelial cell signaling and leakage response. *J.Exp.Med.* 187:497-503, 1998
51. Grimminger F, Hattar K, Papavassilis C, Temmesfeld B, Csernok E, Gross WL, Seeger W, Sibelius U: Neutrophil activation by anti-proteinase 3 antibodies in Wegener's granulomatosis: role of exogenous arachidonic acid and leukotriene B4 generation. *J.Exp.Med.* 184:1567-1572, 1996
52. Mayet WJ, Hermann EM, Csernok E, Gross WL, Meyer zum Buschenfelde KH: In vitro interactions of c-ANCA (antibodies to proteinase 3) with human endothelial cells. *Adv.Exp.Med.Biol.* 336:109-13:109-113, 1993
53. Mayet WJ, Csernok E, Szymkowiak C, Gross WL, Meyer zum Buschenfelde KH: Human endothelial cells express proteinase 3, the target antigen of anticytoplasmic antibodies in Wegener's granulomatosis. *Blood* 82:1221-1229, 1993
54. Ludviksson BR, Sneller MC, Chua KS, Talar-Williams C, Langford CA, Ehrhardt RO, Fauci AS, Strober W: Active Wegener's granulomatosis is associated with HLA-DR+ CD4+ T cells exhibiting an unbalanced Th1-type T cell cytokine pattern: reversal with IL-10. *J.Immunol.* 160:3602-3609, 1998
55. Lamprecht P, Erdmann A, Mueller A, Csernok E, Reinhold-Keller E, Holl-Ulrich K, Feller AC, Bruehl H, Gross WL: Heterogeneity of CD4 and CD8+ memory T cells in localized and generalized Wegener's granulomatosis. *Arthritis Res.Ther.* 5:R25-R31, 2003
56. Agostini C, Adami F, Semenzato G: New pathogenetic insights into the sarcoid granuloma. *Curr.Opin.Rheumatol.* 2000.Jan;12(1):71-6. 12:71-76, 2000
57. Schnabel A, Renz H, Petermann R, Csernok E, Gross WL: T cell receptor vbeta repertoire in bronchoalveolar lavage in Wegener's granulomatosis and sarcoidosis. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 119:223-230, 1999
58. Grunewald J, Halapi E, Wahlstrom J, Giscombe R, Nityanand S, Sanjeevi C, Lefvert AK: T-cell expansions with conserved T-cell receptor beta chain motifs in the peripheral blood of HLA-DRB1\*0401 positive patients with necrotizing vasculitis. *Blood* 92:3737-3744, 1998
59. Giscombe R, Grunewald J, Nityanand S, Lefvert AK: T cell receptor (TCR) V gene usage in patients with systemic necrotizing vasculitis. *Clin.Exp.Immunol.* 101:213-219, 1995
60. Wang G, Hansen H, Tatsis E, Csernok E, Lemke H, Gross WL: High plasma levels of the soluble form of CD30 activation molecule reflect disease activity in patients with Wegener's granulomatosis. *Am.J.Med.* 102:517-523, 1997
61. Picker LJ, Singh MK, Zdraveski Z, Treer JR, Waldrop SL, Bergstresser PR, Maino VC: Direct demonstration of cytokine synthesis heterogeneity among human memory/effector T cells by flow cytometry. *Blood* 86:1408-1419, 1995
62. Agostini C, Basso U, Semenzato G: Cells and molecules involved in the development of sarcoid granuloma. *J.Clin.Immunol.* 18:184-192, 1998
63. Shigehara K, Shijubo N, Ohmichi M, Takahashi R, Kon S, Okamura H, Kurimoto M, Hiraga Y, Tatsuno T, Abe S, Sato N: IL-12 and IL-18 are increased and stimulate IFN-gamma production in sarcoid lungs. *J.Immunol.* 166:642-649, 2001
64. Greene CM, Meachery G, Taggart CC, Rooney CP, Coakley R, O'Neill SJ, McElvaney NG: Role of IL-18 in CD4+ T lymphocyte activation in sarcoidosis. *J.Immunol.* 165:4718-4724, 2000
65. Lamprecht P, Kumanovics G, Mueller A, Csernok E, Komocsi A, Trabandt A, Gross WL, Schnabel A: Elevated monocytic IL-12 and TNF-alpha production in Wegener's granulomatosis is normalized by cyclophosphamide and corticosteroid therapy. *Clin.Exp.Immunol.* 128:181-186, 2002
66. Harris NL, Ronchese F: The role of B7 costimulation in T-cell immunity. *Immunol.Cell Biol.* 77:304-311, 1999
67. Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R, Anagnostopoulos I, Kroczeck RA: ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 397:263-266, 1999
68. Park W, Weyand CM, Schmidt D, Goronzy JJ: Co-stimulatory pathways controlling activation and peripheral tolerance of human CD4+CD28- T cells. *Eur.J.Immunol.* 27:1082-1090, 1997
69. Moosig F, Csernok E, Wang G, Gross WL: Costimulatory molecules in Wegener's granulomatosis (WG): lack of expression of CD28 and preferential up-regulation of its ligands B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) on T cells. *Clin.Exp.Immunol.* 114:113-118, 1998
70. Hamann D, Baars PA, Rep MH, Hooibrink B, Kerkhof-Garde SR, Klein MR, van Lier RA: Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells. *J.Exp.Med.* 186:1407-1418, 1997



71. Martens PB, Goronzy JJ, Schaid D, Weyand CM: Expansion of unusual CD4+ T cells in severe rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 40:1106-1114, 1997
72. Schmidt D, Martens PB, Weyand CM, Goronzy JJ: The repertoire of CD4+ CD28- T cells in rheumatoid arthritis. *Mol.Med.* 2:608-618, 1996
73. Schmidt D, Goronzy JJ, Weyand CM: CD4+ CD7- CD28- T cells are expanded in rheumatoid arthritis and are characterized by autoreactivity. *J.Clin.Invest.* 97:2027-2037, 1996
74. Komocsi A, Kumanovics G, Czirjak L: A Wegener granulomatosis. *AKI* 3:123-127, 2000
75. Lamprecht P, Moosig F, Csernok E, Seitzer U, Schnabel A, Mueller A, Gross WL: CD28 negative T cells are enriched in granulomatous lesions of the respiratory tract in Wegener's granulomatosis. *Thorax* 56:751-757, 2001
76. Rulifson IC, Sperling AI, Fields PE, Fitch FW, Bluestone JA: CD28 costimulation promotes the production of Th2 cytokines. *J.Immunol.* 158:658-665, 1997
77. Webb LM, Feldmann M: Critical role of CD28/B7 costimulation in the development of human Th2 cytokine-producing cells. *Blood* 86:3479-3486, 1995
78. King CL, Stupi RJ, Craighead N, June CH, Thyphronitis G: CD28 activation promotes Th2 subset differentiation by human CD4+ cells. *Eur.J.Immunol.* 25:587-595, 1995
79. Sweet C: The pathogenicity of cytomegalovirus. *FEMS Microbiol.Rev.* 23:457-482, 1999
80. Kano Y, Shiohara T: Current understanding of cytomegalovirus infection in immunocompetent individuals. *J.Dermatol.Sci.2000.Apr;22(3):196-204.* 22:196-204, 2000
81. Soderberg-Naucler C, Nelson JY: Human cytomegalovirus latency and reactivation - a delicate balance between the virus and its host's immune system. *Intervirolgy* 42:314-321, 1999
82. Biron CA, Brossay L: NK cells and NKT cells in innate defense against viral infections. *Curr.Opin.Immunol.* 13:458-464, 2001
83. Majumdar S, Li D, Ansari T, Pantelidis P, Black CM, Gizycki M, du Bois RM, Jeffery PK: Different cytokine profiles in cryptogenic fibrosing alveolitis and fibrosing alveolitis associated with systemic sclerosis: a quantitative study of open lung biopsies. *Eur.Respir.J.* 14:251-257, 1999
84. Hooper M, Kallas EG, Coffin D, Campbell D, Evans TG, Looney RJ: Cytomegalovirus seropositivity is associated with the expansion of CD4+CD28- and CD8+CD28- T cells in rheumatoid arthritis. *J.Rheumatol.* 26:1452-1457, 1999
85. Merino J, Martinez-Gonzalez MA, Rubio M, Inoges S, Sanchez-Ibarrola A, Subira ML: Progressive decrease of CD8high+ CD28+ CD57- cells with ageing. *Clin.Exp.Immunol.* 112:48-51, 1998
86. Looney RJ, Falsey A, Campbell D, Torres A, Kolassa J, Brower C, McCann R, Menegus M, McCormick K, Frampton M, Hall W, Abraham GN: Role of cytomegalovirus in the T cell changes seen in elderly individuals. *Clin.Immunol.* 90:213-219, 1999
87. Hazzan M, Labalette M, Noel C, Lelievre G, Dessaint JP: Recall response to cytomegalovirus in allograft recipients: mobilization of CD57+, CD28+ cells before expansion of CD57+, CD28- cells within the CD8+ T lymphocyte compartment. *Transplantation* 63:693-698, 1997
88. Labalette M, Salez F, Pruvot FR, Noel C, Dessaint JP: CD8 lymphocytosis in primary cytomegalovirus (CMV) infection of allograft recipients: expansion of an uncommon CD8+ CD57- subset and its progressive replacement by CD8+ CD57+ T cells. *Clin.Exp.Immunol.* 95:465-471, 1994
89. European Community for Coal and Steel: Standardized function testing. Report of working party on standardized lung function tests. *Eur J Respir Dis* 6:5-52, 1993
90. Bohan A, Peter JB: Polymyositis and dermatomyositis (first of two parts). *N.Engl.J.Med.* 292:344-347, 1975
91. Leavitt RY, Fauci AS, Bloch DS, Michel BA, Hunder GG, Arend WP, Calabrese LH, Fries JF, Lie JT, Lightfoot RW, Jr.: The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum.* 33:1101-1107, 1990
92. Jennette JC, Falk RJ, Andrassy K, Bacon PA, Churg J, Gross WL, Hagen EC, Hoffman GS, Hunder GG, Kallenberg CG: Nomenclature of systemic vasculitides. Proposal of an international consensus conference. *Arthritis Rheum.* 37:187-192, 1994
93. Reinhold-Keller E, Kekow J, Schnabel A, Schmitt WH, Heller M, Beigel A, Duncker G, Gross WL: Influence of disease manifestation and antineutrophil cytoplasmic antibody titer on the response to pulse cyclophosphamide therapy in patients with Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum.* 37:919-924, 1994
94. Gross WL: Treatment of Wegener's granulomatosis in 1994. *Ann.Med.Interne.(Paris)* 145:541-549, 1994
95. Jayne D, Rasmussen N: Treatment of antineutrophil cytoplasm autoantibody-associated systemic vasculitis: Initiatives of the European Community Systemic Vasculitis Clinical Trials Study Group. *Mayo Clin Proc* 72:737-747, 1997
96. Austin J, Müller NL, Friedman PJ: Glossary of terms for CT of the lungs: recommendations of the nomenclature committee of the Fleischner Society. *Radiology*327-331, 1996

97. Sauty A, Rochat T, Schoch OD, Hamacher J, Kurt AM, Dayer JM, Nicod LP: Pulmonary fibrosis with predominant CD8 lymphocytic alveolitis and anti-Jo-1 antibodies. *Eur.Respir.J.* 10:2907-2912, 1997
98. Fischer E, Thiele A, Stierle HE, Lang B: [Anti-Jo-1 antibodies: specific autoantibodies for polymyositis with interstitial pulmonary fibrosis. 2 case reports]. *Z.Rheumatol.* 54:171-177, 1995
99. Toyoshima M, Sato A, Chida K, Hayakawa H, Todate A, Imokawa S, Iwata M, Ohashi H, Shirai M, Yagi H: [Clinicopathological features of interstitial pneumonia associated with amyopathic dermatomyositis]. *Nihon.Kyobu.Shikkan.Gakkai.Zasshi.* 35:281-287, 1997
100. Okuda Y, Takasugi K, Imai A, Oyama T, Oyama H: [Two cases of acute progressive interstitial pneumonia associated with dermatomyositis--clinical features and immunological disorders]. *Ryumachi.* 33:293-301, 1993
101. Lohr HF, Bocher WO, Hermann E, Muller-Quernheim J, Schwickert H, Meyer zum Buschenfelde KH, Gerken G: Interstitial alveolitis as early manifestation of anti-Jo-1 positive polymyositis. *Z.Rheumatol.* 52:307-311, 1993
102. Deguchi Y, Shibata N, Kishimoto S: Enhanced expression of the tumour necrosis factor/cachectin gene in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic vasculitis. *Clin.Exp.Immunol.* 81:311-314, 1990
103. Zhu LP, Cupps TR, Whalen G, Fauci AS: Selective effects of cyclophosphamide therapy on activation, proliferation, and differentiation of human B cells. *J.Clin.Invest* 79:1082-1090, 1987
104. Comabella M, Balashov K, Issazadeh S, Smith D, Weiner HL, Khoury SJ: Elevated interleukin-12 in progressive multiple sclerosis correlates with disease activity and is normalized by pulse cyclophosphamide therapy. *J.Clin.Invest* 102:671-678, 1998
105. Deguchi Y, Shibata N, Kishimoto S: Enhanced expression of the tumour necrosis factor/cachectin gene in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic vasculitis. *Clin.Exp.Immunol.* 81:311-314, 1990
106. Specks U: Are animal models of vasculitis suitable tools? *Curr.Opin.Rheumatol.* 12:11-19, 2000

## 10. Tartalom

1.1. A légzőszervi érintettség klinikai megjelenése és a létrejöttében szerepet játszó főbb mechanizmusok.....	3
1.1.1. Kórképek rövid ismertetése.....	3
1.1.1.1. Dermatomiozitisz / polimiozitisz (DM/PM).....	3
1.1.1.2. Wegener granulomatózis (WG).....	4
1.1.1.3. Szisztémás szklerózis (SSc).....	5
1.1.2 Vizsgálmódszerek a szisztémás autoimmun kórképek tudómanifesztációjának vizsgálatában.....	5
1.1.3. A légzőszervi érintettség és a létrejöttében szerepet játszó mehanizmusok.....	6
1.1.3.1. Az alveolitisz formái és megjelenése.....	6
1.1.3.2. Az ANCA pozitív vaszkulitisz kialakulásának immunológiai mechanizmusai.....	6
1.1.3.3. Granuloma képződés mechanizmusa, a szarkoid és a Wegener granulomatózis kialakulásával kapcsolatos ismeretek.....	7
1.1.3.4.Th1/Th2 citokinprofil változása granulomatózus folyamatokban.....	8
1.1.3.5. Kostimulációs mechanizmusok a T sejtek aktivációjában, a CD28 expresszió változása különböző kórképekben.....	9
1.1.3.6 A humán citomegáliavírus hordozókban észlelt immunológiai eltérések különös tekintettel a CD28 expresszió változására.....	11
2. Célkitűzések.....	13
2.1. Bronchoalveoláris lavage (BAL) sejtösszetételének vizsgálata kezelt DM/PM-es betegekben.....	13
2.2. Wegener granulomatózisos betegek tüdőérintettségének HRCT vizsgálata.....	13
2.3. T limfocita alcsoportok és monocita citokinszekréció vizsgálata Wegener granulomatózisban.....	13
3. Beteganyag és Módszerek.....	15
3.1. Bronchoalveoláris lavage sejtösszetételének vizsgálata kezelt DM/PM-es betegekben.....	15
3.1.1. Nagyfelbontású tüdő CT (HRCT).....	15
3.1.2. Bronchoalveolaris lavage (BAL).....	15
3.1.3 A DM/PM-es betegek klinikai jellemzői.....	16
3.2. Wegener granulomatózisos betegek tüdőérintettségének HRCT vizsgálata.....	17
3.2.1. Kezelés és klinikai válasz.....	18
3.2.2. HRCT.....	19
3.2.3 Statisztikai feldolgozás.....	19
3.3. Citokinszekréció vizsgálata T limfocita alcsoportokban és monocitákon Wegener granulomatózisban.....	19
3.3.1 A betegek alcsoportjainak jellemzői.....	20
3.3.2. Áramlási citometria.....	22
3.3.2.1. Antitestek.....	22
3.3.2.2. Intracitoplazmatikus citokin meghatározás.....	22
3.3.3.1. Ciklofoszfamid kezelés in vitro modellezése.....	23
3.3.3.2 ELISA.....	23
3.3.4. Serologiai vizsgálatok.....	23
3.3.5. Immunhisztológia.....	23

3.3.6. Statisztikai feldolgozás.....	24
4. Eredmények.....	25
4.1. Bronchoalveoláris lavage sejtösszetételének vizsgálata kezelt DM/PM-es betegekben	25
4.2. Wegener granulomatózisos betegek tüdőérintettségének HRCT vizsgálata.....	28
4.3. Citokinszekréció vizsgálata T limfocita alcsoportokban és monocitákon Wegener granulomatózisban .....	29
4.3.1. Remisszió-indukciós kezelés hatása a monocita citokinszekrécióra.....	29
4.3.2. A CD4+CD28- T-sejt alcsoport fenotípezálása WG-ben .....	30
4.3.3. Intracitoplazmatikus citokin expresszió vizsgálata CD4+CD28- és CD4+CD28+ T-sejtekben.....	31
4.3.4. Citokin szekréció ELISA vizsgálata izolált CD4+CD28- és CD4+CD28+ T-sejtkultúrák felülszójában.....	32
4.3.5. A CMV szerologia és a CD28 expresszió vizsgálata .....	33
5. Összefoglalás.....	35
6. Következtetések .....	36
7. Gyakrabban használt rövidítések .....	41
8. A dolgozat témájával kapcsolatos közlemények.....	42
9. Irodalom .....	46
10. Tartalom.....	51