

Speciális Immunológiai Tényezők a Proteoglycan-Indukálta Arthritisben

PhD értekezés tézisei

dr. Bárdos Tamás

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar
Orthopaedia Klinika

2003

PhD Iskola Vezetője:	Prof. Dr. Nagy Judit
Programvezető:	Prof. Dr. Bellyei Árpád
Témavezetők:	Prof. Dr. Glant T. Tibor Dr. Lovász György

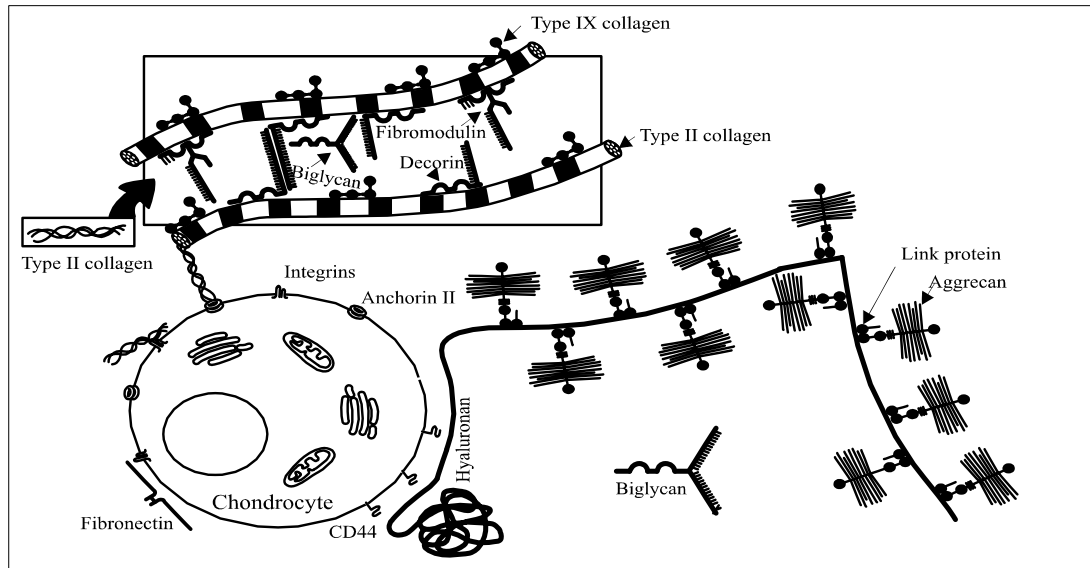
Bevezetés

Az ízületi porc funkciója és alkotói

A hosszú csontok végeit borító ízületi porc rendkívül fontos szerepet játszik az ízületek normál funkciójában. Rajta keresztül történik az erőátvitel az ízületi felszínek között, lehetővé teszi a szinte súrlódás mentes mozgást, egyenletesen szétoszlatja a ráható erőket az egész ízületen belül és csillapítja az esetleges nagyobb ütésekkel származó schockot is. Az emberi porcban a chondrocyták mindössze 0.4-2%-át teszik ki az össztérfogatnak, de szintetizáló kapacitásukkal biztosítják a nagy mennyiségű extracelluláris matrix termelését és fenntartását, ezen belül is a két legfontosabb fehérje alkotót: a kollagéneket és a proteoglykánokat.

Proteoglykánok

A proteoglykánok (aggrecan, decorin, biglycan, fibromodulin) a legnagyobb mennyiségben jelenlevő nem kollagén típusú komponensei az extracelluláris mátrixnak. Ennek a diverz fehérje családnak közös jellemzője, hogy a központi magproteinhez glycosaminoglycan (GAG) oldalláncok kapcsolódnak. Az aggrecan (nagy méretű aggregáló proteoglycan) a legprominensebb képviselője a proteoglycanoknak, mivel mintegy 90%-át teszi ki az összproteoglycan tartalomnak a porcban. Különleges, ún. kefe alakú struktúrát vesz fel a molekula a térben, molekulatömege eléri a 2-3 millió Da-t is, aminek 90%-át a belső proteinszállhoz kapcsolódó szulfatált GAG-ok és az O-, ill. N-kapcsolt oligoszacharidok teszik ki (1.Ábra). Az N-terminális végén elhelyezkedő globuláris doménon (G1) keresztül kapcsolódik az aggrecan a hyaluronsavhoz, míg a különösen hosszú középső részen (G2 és G3 globuláris domén között) találhatóak a GAG oldalláncok. Az aggrecan molekulák, mint azt a nevük is sugallja, nagy, akár 200 molekulát is magukban foglaló aggregátumokban találhatóak nonkovalensen kapcsolódva egy hosszú hyaluronsav szálcához, mely kapcsolatot a link protein stabilizálja.



1. Ábra Az extracelluláris matrix szerveződése a porcban

A porcalkotók immunogenitása

A porc egyike azon kevés immunoprivilegizált szövetnek, melyben, köszönhetően erősen avascularis felépítésének, az alkotók nincsenek kitéve szoros belső immunológiai ‘surveillance’-nak. Ha azonban a porc degradálódik, úgy új, speciális antigén tulajdonsággal rendelkező molekulák szabadulnak ki, s kerülnek azonnal felismerésre az immunrendszer által. E mechanizmus az alapja annak, hogy a porc komponensei immunválaszt triggerelhetnek, ill. tarthatnak fenn (immunogenitás). Az immuntámadás keresztreakció eredménye is lehet, amikor ízületől távol levő molekulák az események elindítója (molekuláris mimikri). Mindezen autoimmun folyamatok végeredményeként további porcdestrukció alakul ki és még több autoantigén szabadul fel. Ez aztán egy krónikus, önfenntartó, gyulladáshoz vezethet az arra predisponált egyéneknél. A porc proteoglycan (aggrecan) egyike azon porcalkotóknak, melyek legnagyobb valószínűség szerint oki vagy hozzájáruló tényezői ilyen autoimmun betegségeknek (pl. a rheumatoid arthritisnek).

A rheumatoid arthritis és állatmodeljei

A rheumatoid arthritis (RA) egy világszerte előforduló chronicus gyulladósos polyarthritis, mely a nőknél jóval gyakoribb előfordulást mutat. Bár a RA valódi oka még nem ismert, számos tény autoimmun etiológiát bizonyít. Mind sejt mediálta immunválasz, mind pedig autoantitest detektálható RA-ben olyan porcalkotók ellen, mint a proteoglycanok vagy a II-es típusú kollagén. RA-s betegeknek perifériás vérből kimutatható a proteoglycan ellenes celluláris immunitás (5-85%-a a betegeknek, felméréstől függően). Hasonló immunreaktivitást a proteoglycanokkal szemben juvenilis RA-ben is leírtak, RA-s betegek synoviumából pedig immunreaktív proteoglycan fragmentumokat mutattak ki. Spondylitis ankylopoeticában is találtak sejt mediálta immunválaszt proteoglycanok ellen.

Az ízületi gyulladások kísérletes állatmodelljei (pl. adjuváns indukálta arthritis, különböző antigén indukálta arthritisek, kollagén indukálta arthritis, proteoglycan indukálta arthritis, stb.) fontos előrelépést jelentettek a human betegség lehetséges mechanizmusainak vizsgálatában, valamint esetleges therápiás szerek kifejlesztésében. Munkám során a proteoglycan indukálta arthritisszel dolgoztam legtöbbit.

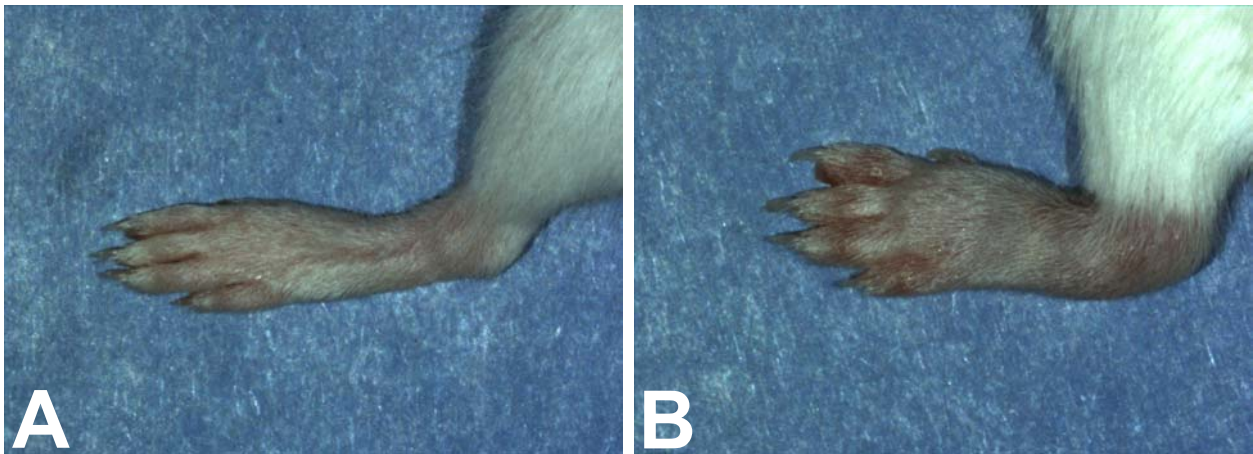
Proteoglycan indukálta arthritis (PGIA)

Ha arra hajlamos egértörzseket (BALB/c, C3H/HeJCr) human porcból előállított proteoglycannal immunizálunk az egerekben progresszív polyarthritis alakul ki. Az elváltozás minden nőtény BALB/c egérben kialakul, ha foetalis vagy újszülöttekből származó proteoglycant használunk az immunizáláshoz, Freund féle adjuvánsal emulzifikálva.

Ez az egérmodell számos hasonlóságot mutat a human RA-szel és a spondylitis ankylopoeticával. Ezt bizonyítják a klinikai adatok, a radiologiai képek, szcintigráfias csont elemzések, és a hisztopathologiai vizsgálatok az ízületek, ill. a gerinc területén. Az immunizáláshoz használt human proteoglycan ellenes antitestek az immunizálás második-harmadik hetén jelennek

meg. A proteoglycan ellenes T sejtés válasz az öttől a hetedik héten jelenik meg, s a humorális és celluláris immunitás a betegség chronikussá válásával valamelyest csökken.

A T sejtek, különösen a Th sejtek kritikusanak tűnnek az arthritis indukciójában. A Th sejtek két nagy csoportra oszthatók az általuk termelt cytokin szekréciójának megfelelően: Th1 és Th2. A Th1 sejtek interleukin IL-2-t, interferon (IFN)- γ -t és tumor necrosis factor (TNF)- β -t, míg a Th2 sejtek inkább IL-4-t, IL-5-t, IL-10-t és IL-13-t termelnek. A Th1 típusú cytokinek az arthritis és gyulladás fellángolásában vesznek részt, így pro-inflammatorikusnak tartják őket, míg a Th2 típusúak inkább anti-inflammatorikusnak imponálnak.



2.Ábra PGIA makroszkópos megjelenése. Normál (A) és arthritises (B) hátsó láb BALB/c egérben.

A kísérletek céljai

Az általam elvégzett munka célja az volt, hogy nagyobb rálátásunk legyen a PGIA-ban lezajló pathológiás folyamatok mögött álló immunológiai háttérre, valamint, hogy megértsük a betegség chronológiáját; továbbá kihasználva a RA állatmodellje nyújtotta lehetőséget olyan módszereket vizsgáljunk meg és próbáljunk ki, melyekkel befolyásolhatjuk a betegség lefolyását. Mindezeket annak reményében tettük, hogy eredményeinkkel hozzájárulhatunk egyes humán autoimmun betegségek (mint pl. a rheumatoid arthritis) megértéséhez, esetlegesen azok terápiájában végzett kutatásokhoz.

1. Fejezet

T és B sejt újjáéledés SCID egerekbe történő arthritis transzfer esetén.

Az autopathogén CD4⁺ Th1 sejteknek alapvető az antigén specifikus aktiváció syngenikus rendszerben.

Journal of Immunology 2002, 168:6013-6021

Bevezetés

Számos eredmény indikálja ma már, hogy a CD4⁺ T helper (Th) sejtek fontos szerepet játszanak a PGIA-ban. Míg a CD4⁺ T sejtek legfontosabb funkciójának az arthritis indukciót tartják, az egér saját PG ellen termelt antitestek, ill. a B sejtek szerepe itt még nem teljesen tisztázott. Ami eddig biztosan tudott, hogy nagyon specifikus kooperáció szükséges az antigén-stimulált CD4⁺ Th1 és a B sejtek között a betegség kifejlődéséhez.

A T sejt homeosztázis fontos szabályzója az immunrendszernek, amely fenntartja az egyensúlyt a perifériás T sejtek számában és egymás közötti arányában. A homeosztatisz polyklonális T sejt proliferáció (az eredeti T sejt pool helyreállítása céljából) súlyos lymphopeniás állapotokban fordul elő, mint amilyenek irradiáció, chemoterápia után jönnek létre, vagy éppen a mi esetünkben amikor kis számú lymphocytát viszünk át súlyosan immunhiányos egerekbe (*nu/nu* vagy SCID). Egészen kis számú T sejt csak akkor képes újra populálni az összes lymphoid szervet, ha syngenikus körülményeket biztosítunk, mivel ebben az egy esetben biztosított csak a széles spektruma a saját MHC által presentált saját peptid ligandoknak, melyeket az ehhez passzoló T sejt receptorok felismernek. A PGIA transzfer BALB/c egerekből SCID egerekbe tehát mind az MHC, mind pedig a nem MHC kapcsolt gének szintjén is ideális rendszernek tűnik arra, hogy T sejt populáció helyreállítását vizsgáljuk esetünkben egy T sejt mediálta autoimmun betegséggel kapcsolatban.

Eredmények

PGIA transzfer SCID egerekbe lép sejt használataival

Annak érdekében, hogy leteztelhessük, az arthritises állatok lépsejtjei milyen körülmények mellett képesek átvinni az arthritist SCID egerekbe arthritises ill. normál BALB/c egerekből származó

(donor) lépsejteket injektáltunk SCID egerekbe különböző tisztítást, ill. depléciót követően, ko-injekciókkal, ill. *in vitro* stimulálás után. Kísérleteink eredményeit az I. Táblázat összegezi. Egyértelművé vált, hogy az ‘arthritises’ sejtek mellett PG co-injekcióra vagy *in vitro* PG stimulációra volt szükség a sikeres transzferhez. Az átvitt arthritis klinikai megjelenésében és histopathológiájában is teljesen megegyezett a primer PGIA-szel a donor állatban. Ezen túlmenően saját (egér) proteoglycannal is képesek voltunk a transzferált sejteket arthritis létrehozására serkenteni, ami az első közvetlen bizonyítéka annak, hogy az egér PG lenne a végső célmolekula autoimmun arthritisre hajlamos egerekben.

Donor sejtek BALB/c egerekből	Donor sejtek depletálása	<i>In vitro</i> stimuláció	Co-injekció donor sejtek mellett	Arthritis előfordulása (arthrit./totál)	Maximum kumulatív súlyosság (SCID)
Naïve (nem immuniz.)	-	-	hPG	0/10	-
OVA-immunizált	-	-	hPG	0/10	-
Arthritisesz	-	-	-	0/24	-
Arthritisesz	-	-	hPG	36/36	12.1±1.8
Arthritisesz	-	hPG	-	30/30	9.7±2.7
Arthritisesz	-	-	mPG	16/16	11.3±2.9
Arthritisesz	-	Con A	-	0/20	-
Arthritisesz	-	LPS	-	0/21	-
Arthritisesz	-	Con A+LPS	-	0/15	-
Arthritisesz	B sejtek	-	hPG	21/21	14.2±2.8
Arthritisesz	T sejtek	-	hPG (1x)	0/8	-
Arthritisesz	T sejtek	-	hPG (2x)	18/18	10.0±3.1

- : nem történt; hPG: humán porc eredetű proteoglycan; mPG: egér porc eredetű proteoglycan; OVA: ovalbumin; Con A: concanavalin A; LPS: lipopolysaccharide

I. Táblázat Arthritis előfordulása transzferrált SCID egerekben

Antigén specifikus T sejt válasz, antitest termelés a recipiens SCID egerekben; T és B sejt depláció hatása az arthritis transzferre

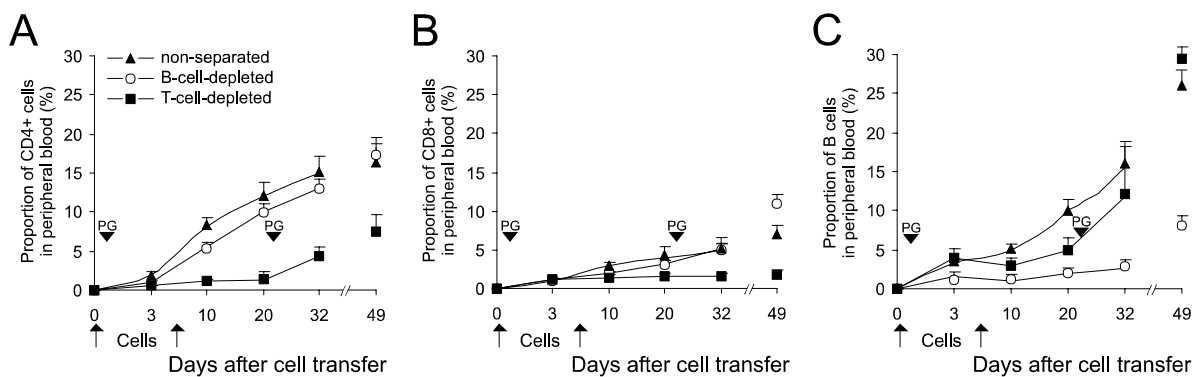
Azt találtuk, hogy antigén (PG) specifikus T sejt válasz és antitest termelés csak arthritises egerekben volt detektálható, és leginkább a betegség megjelenésével, annak súlyosságával korrelált. Becsléseink szerint a PG specifikus T sejtek száma mintegy négyszer magasabb volt az arthritises SCID egerekben, mint a donor arthritises BALB/c egerekben, azt sugallva, hogy antigén specifikus T sejt expanzióknak kellett történnie a recipiens SCID egerekben.

Annak érdekében, hogy megvilágítsuk a különböző immunsejtek szerepét a betegség kialakulásában T, ill. B sejt depletált donor lymphocytákat injektáltunk recipiens SCID egerekbe. Azok a SCID egerek, amik B sejt depletált donor T lymphocytákat kaptak a transfer során minden késedelem nélkül váltak arthritiszesekké. Ez a sejtszuspenzió mindössze 0.5-1% CD45R/B220⁺ sejtet tartalmazott, mégis a B sejtek aránya a 12-15%-ot is elérte az arthritiszes SCID egerekben a kísérletek végére (49. nap). Ezzel szemben, amikor T sejt depletált donor lymphocytákat transzferáltunk PG co-injekcióval egyetlen SCID recipiens sem mutatott arthritises jeleket a 10 hetes megfigyelés végéig. Annak eldöntésére, hogy az így átvitt igen kis T sejt populáció rendelkezik-e arthritogenikus potenciállal az ezt követő kísérletekben addicionális 100 µg PG antigén dózist kaptak a recipiensek a 21. napon. Ennek hatására minden SCID egér amelyik T sejt depletált lymphocytákat kapott arthritiszes lett 5-12 napon belül. A CD3⁺ T sejtek aránya a 7. hét végére itt elérte a 7-10%-ot. Meglepő módon ezen T sejteken belül 92-96%-os arányban voltak jelen a CD4⁺ sejtek. Intracelluláris cytokin mérésekkel azt is megállapítottuk, hogy az arthritiszes SCID egerekben a Th1 sejtek aránya jóval magasabb volt mint a donor arthritises BALB/c egerekben, valószínűsítve azt, hogy PG specifikus szelektív Th1 sejt proliferáció történt a recipiens SCID egerekben.

A PG specifikus antitest termelés T sejt függő és korrelációt mutat az arthritisszel

Az általunk talált egyik legváratlanabb eredmény az volt, hogy a PG ellenes antitestek teljesen hiányoztak azokban a T sejt depletált sejtekkel (vagyis B sejtekben dúsított sejtekkel) transzferált SCID egerekben, amik csak egyszer kaptak PG antigén injekciót. A második antigén injekció hatására a túlélő CD4⁺ T sejtek nagyfokú expanzió mentek át a CD8⁺ T sejtek proliferációja nélkül (2. Ábra). Ezt követte a PG ellenes antitestek termelése is. Ezen adatok azt sugallják, hogy a B sejtek mellett fontos, hogy a CD4⁺ sejtek (valószínűleg Th1 sejtek) is megfelelő számban legyenek jelen és kooperáljanak az arthritis indukciójában. Az antitest produkció teljesen visszaállt B sejt depletált egerekben a 8-12-ik npra a transzfert követően. Magyarázatként azt vártuk, hogy rapid B sejt felépülést találunk a háttérben, de az áramlásos cytometriai analízis ezt nem igazolta (2. Ábra).

Pathogén CD4⁺ Th1 sejtek újraéledése extrémén kis sejt populációból egy autoimmun transzfer szisztémában teljesen új megfigyelésnek számít, mivel a korábban elvégzett transzfer kísérletek egyikében sem vizsgálták, monitorozták az antigén specifikus T sejtek helyreállítását, chronológiáját.



2. Ábra Lymphocyták újraépülése az arthritis kialakulása során SCID egerekben.

A grafikonok összegzik a SCID egerek peripheriás véréből mért áramlási cytometriai adatokat a CD4⁺ (A), CD8⁺ (B), és B sejtek (C) helyre állító szaporodásával kapcsolatban (ill. a lépben a 49. napon). SCID egerek vagy nem szeparált (-▲-), vagy B sejt depletált (-○-), vagy pedig T sejt depletált (-■-) lymphocytákat kaptak arthritikus donor BALB/c egerekből PG antigénnel együtt. A nyilak jelzik a sejtrnaszfer, a nyílhegyek pedig az antigén transzfer napját (csak a T sejt depletált esetekben kaptak kétszer antigén injectiót).

2. Fejezet

A folyamatos nazális antigén bevitel kritikus jelentőségű a tolerancia fenntartásához SCID egerekbe transzferált autoimmun arthritis esetén

Clin Exp Immunol 2002, 129:224-232.

Bevezetés

Napjainkban a legígéretesebb therápiás megközelítése az autoimmun betegségeknek az, amikor antigén specifikus immunszupressziót hozunk létre, nem befolyásolva ezzel az egész immunrendszert, mégis szignifikánsan csökkentve az antigén specifikus T sejt klónok aktivitását. A mukozális tolerancia egy fiziológiásan is előforduló tünet, amely megakadályozza a felesleges és önvészélyes immunreakciót olyan 'veszélytelen' antigének ellen, mint pl. az ételek protein komponensei, vagy pl. a levegőben található pollenek vagy porszemcsék.

Annak megállapítására, hogy tudunk-e nazális toleranciát indukálni PGIA-ben BALB/c egereket immunizáltunk PG-vel. Egyidejűleg nazális PG kezelést is adtunk az egész kísérlet időtartama alatt, és arthritisre monitoroztuk az egereket. Ezután lymphocytákat transzferáltunk PG-vel tolerizált, ill. nem tolerizált donor BALB/c egerekből MHC kompatibilis SCID egerekbe. Ez a transzfer lehetővé tette, hogy új aspektusból is megvizsgáljuk a nazális szupresszió működési elvét és megállapítsuk a létrehozásához, ill. fenntartásához elengedhetetlen feltételeket PGIA-ben.

Eredmények

Nazális tolerancia kialakítása PGIA-es BALB/c egerekben

BALB/c egereket intranazálisan porcból kivont PG-nal (10 vagy 100 µg), ovalbuminnal (OVA -100 µg) vagy vehiculummal (PBS) kezeltük intranazálisan négy egymást követő napon 10 nappal az immunizálás megkezdése előtt, majd fenntartás céljából ugyanezen dózisokat hetente adtuk az állatoknak. A kontrol BALB/c egerek (vehiculummal tolerizált) 100%-ban arthritiszesek lettek az

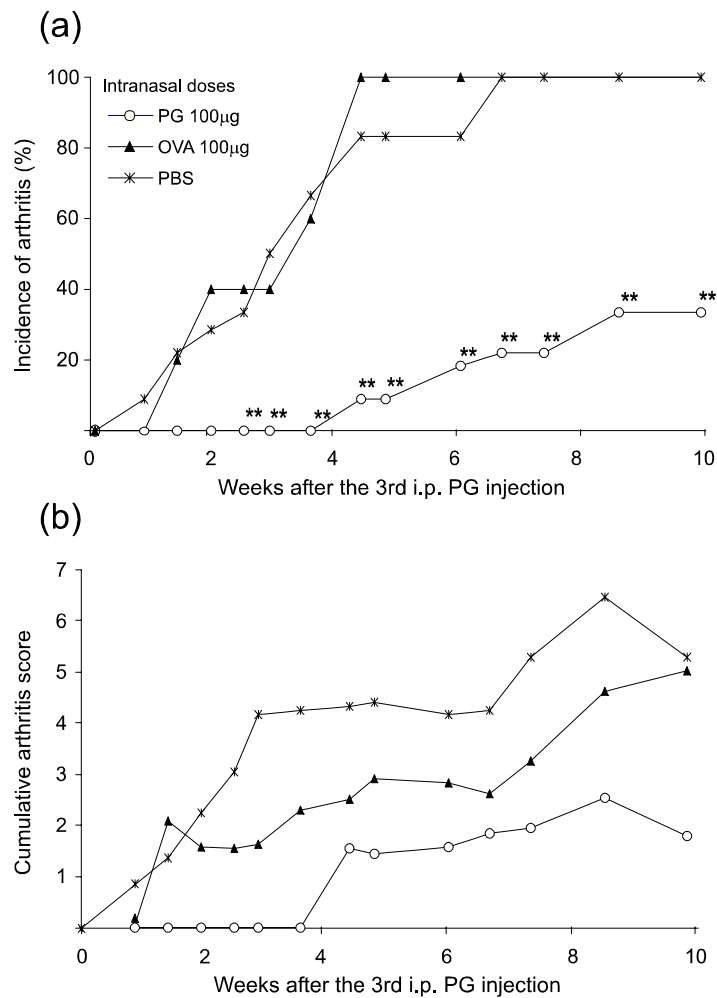
immunizálás hatására, míg azon egerek amik 100 µg PG-t kaptak intranazálisan szignifikánsan később és kevésbé súlyos arthritist mutattak (3. Ábra).

Celluláris és humorális PG ellenes immunválasz nazálisan tolerizált egerekben

Azok az egerek, amik PG-vel intranazális tolerizációban részesültek szignifikánsan csökkent T sejtés válszt mutattak *in vitro* (mind antigén specifikus proliferációban, mind pedig IL-2 termelésben). A szérumban az egér PG, ill. a humán PG ellenes antitest szintek szoros korrelációt mutattak a betegség klinikai megjelenésével. A PG-vel nazálisan tolerizált egerek szignifikánsan alacsonyabb antitest szintet mutattak mind egér, mind humán PG ellen, valamint immunoglobulin izotípus szintjén az IgG1 és az IgG2a is alacsonyabb volt.

Arthritis és tolerancia átvitele SCID egerekbe

Itt is, korábbi megfigyelésünknek megfelelően, csak lépsejtekkel együtt adott PG esetében volt sikeres az arthritis transfer SCID egerekbe. Annak kiderítésére, hogy a nazálisan indukált tolerancia is átvihető-e transzferrel SCID egerekbe PBS-sel, OVA-val ill. PG-vel tolerizált BALB/c egerekből származó lépsejteket adtunk be stimuláló PG-vel együtt a SCID egereknek intraperitoneálisan. Meglepő módon nem volt semmi különbség arthritis incidencia, súlyosság szempontjából a tolerizált, ill. a nem tolerizált egerek sejtjeivel transferált SCID egerek között. Ezzel szemben, ha a SCID egerek is kaptak nazálisan PG antigént már szignifikáns redukción tudtunk elérni az arthritis súlyosságát illetően, tehát a tolerancia átvihető, de folyamatos fenntartó nazális adagolás szükséges. Valószínűsíthető, hogy a transzferrel átvitt lymphocyták képesek voltak a mucosába vándorolni és az ottani microkörnyezet hatására anergikusak maradni, míg ha ez az anergizáló szignál elmaradt a sejtek proliferáltak, expansió után pedig energikusává váltak.



3. Ábra Arthritis incidenciája és súlyossága az intranazális kezelést kapott BALB/c egerekben.

Az ábrán az arthritis incidenciát (a) és akut arthritis súlyossági pontszámokat (b) mutatjuk a harmadik PG immuizálást követően (mint 0. hét van feltüntetve). Szignifikancia szinteket a control csoporthoz (PBS kezelt) számoltuk (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; -○-PG 100µg (n=42); -▲-OVA 100µg (n=27); -* -PBS (n=42)).

3. Fejezet

A TSG-6 (TNF α Stimulált Gén-6) Anti-Inflammatorikus és Chondroprotektív

Hatása Egér Kísérleti Arthritis Modellekben

American Journal of Pathology: 2001; 159(5):1711-1721

Bevezetés

A tumor necrosis factor-alpha (TNF α)-stimulált gén 6 (TSG-6) egy glikoprotein, melyet gyakorlatilag minden sejt képes termelni különböző stimulatorikus hatásokra *in vitro* vagy *in vivo*.

A mai tudásunk szerint ez a fehérje fontos szerepet játszik az extracelluláris matrix formálásában, a gyulladásos sejt migrációban, a sejt proliferációban és az embrionális fejlődésben.

Míg a TSG-6 nem detektálható egészséges egyének szérumában vagy synoviális folyadékában, rheumatoid arthritisben szenvedő betegek synoviocytái folyamatosan termelik a TSG-6 fehérjét és a szérumukban, ill. ritkábban arthrosisos betegek szérumában is kimutatható.

A TSG-6 proinflammatorikus cytokinek indukáló hatására termelődik a gyulladás helyén és azonnal szorosan kapcsolódik az inter- α -trypsin inhibitorhoz (I α I) megnövelve annak szerin proteáz inhibitoros képességét közel 100-szorosára. Ennek megfelelően a TSG-6 kulcs szereplő lehet a helyi arthritiszes gyulladásos folyamatok kontroljában, mint negative feedback kör.

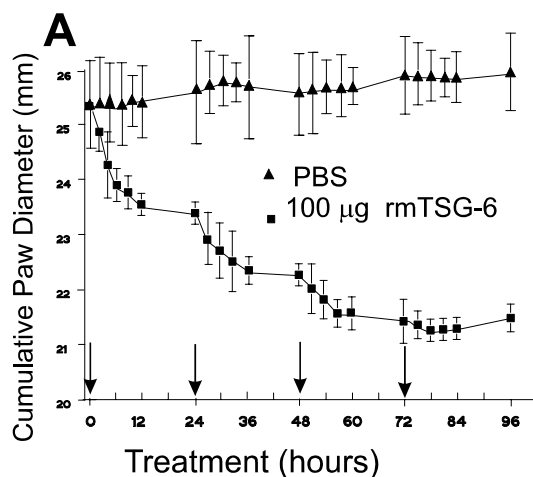
Azt vizsgáltuk, vajon a TSG-6 szerepet játszik-e a porcpusztulási folyamatok megelőzésében. Ehhez két különálló kísérleti arthritiszes állatmodellt használtunk. A PGIA-t, mint arthritis modellt használtuk a TSG-6 szisztémás hatásainak *in vivo* tanulmányozására (I). A térdbe intraarticulárisan adott TSG-6 helyi hatásainak le mérésére az arthritiszes monoarticularis formáját modellező antigén indukálta arthritist (AIA) használtuk (II).

Eredmények

A TSG-6 hatása az ízületi duzzanatra PGIA egérmodelben

BALB/c egereket immunizáltunk humán PG-vel és PGIA indkáltunk, majd az akut arthritises egereknek 100 µg rekombináns egér (rm) TSG-6-t adtunk intravénásan. Az ízületi oedema a duzzadt végtagokon dramatikusan csökkent mindössze néhány óra leforgása alatt (4. Ábra). Ezt követő intravénás injekciók tovább csökkentették az ízületi duzzanatot, bár ezek hatása mind kevésbé volt szembetűnő, amíg szinte teljesen el nem tűnt az oedema a gyulladt végtagon. Ezzel szemben a kontrol csoportban az egerek nem mutattak semmi jelet az oedema csökkenésére, sőt inkább enyhe fokú növekedés volt jellemző (4. Ábra). A hisztológiai kép – a csökkent periartikuláris oedémát leszámolva a TSG-6 kezelt állatokban – nem különbözött a kontrol ill. a kezelt csoportokban.

Hosszútávú vizsgálatok során megállapítottuk azt is, hogy a TSG-6 nemcsak a gyulladt végtagokon hat, hanem a még nem érintett lábokban is megelőzi az arthritis klinikai jeleinek kialakulását (duzzanat, bőrpír)



4. Ábra rmTSG-6 hatása a gyulladt végtagok oedemájára.

A két csoportba random módon válogatott egerek nagyjából hasonló súlyosságú arthritisben szenvedtek, és a kezelés során napi öt alkalommal mértük a kumulatív ízületi átmérőt. Mindkét csoport 16 állatot foglalt magába négy független kísérletben. Az intravénásan beadott injekciókat nyilak jelzik. A boka és csukló ízületeit frontális és saggitális síkban mértük és a négy végtag kumulatív ízületi vastagságát (minden állaton nyolc mérés) mutatja a grafikon.

A rmTSG-6 és a hyaluronsav kötődésének kompetitív in vitro és in vivo tesztelése

Annak megítélésére, hogy a TSG-6 oedema csökkentő hatása a hyaluronsav (HA) leszorításának köszönhető-e a sejtfelszíni CD-44 receptorokról *in vitro* kompetíciós assayt végeztünk. A sejteket fluorescein jelölt HA-val valamint felmenő koncentrációjú TSG-6-tal inkubáltuk, majd mértük a HA kötődést áramlási cytometriai analízisekkel. A kapott eredmények azt mutatták, hogy a rmTSG-6 valóban képes versengeni a CD44-gyel a HA kötőhelyekért méghozzá dózis dependens módon.

A TSG-6 protektív hatása a térdízületben antigén indukálta arthritisben

A TSG-6 lokális chondroprotektív hatásának tanulmányozására egy adott ízületen belül antigén indukálta arthritist (AIA) indukáltunk. mBSA-val előimmunizált egerek térdízületébe 100 µg mBSA-t adtunk be. Ebben a modelben a késői típusú hyperszenzitivitási reakció egyetlen ízületre lokalizálódik, a kontralaterális ízület mint control szerepel, a porcdegradáció pedig precízen, napi lebontásban vizsgálható.

Az intraarticuláris antigénre (mBSA) adott legkorábbi immunválaszt (lymphocytá infiltráció) a 2-3-ik napon detektáltuk és az 5-ik napra vált kifejezetté. Az ötödik napra a porc PG vesztese is evidenssé vált az ízületi porc felső-középső rétegeiből (safranin-O festés), melynek megfelelően intenzív akkumulációt mutatott a metalloproteinázok és aggrecanázok működését indikáló, a porc aggrecan hasítási helyeinek C-terminális végén található VDIPEN és a NITEGE neoepitópok immunfestése.

A mBSA-val előimmunizált egerek térdízületébe mBSA-t injektáltunk TSG-6-tal vagy annélkül. Minden ízületben, függetlenül attól, hogy csak mBSA antigént vagy TSG-6-t is adtunk be az ízületbe, azonos erősségű gyulladós jelek alakultak ki. Hagyományos histopathológiai vizsgálatokkal (hematoxylin-eosin festett metszetek) nem tudtunk semmiféle különbséget találni ezen két csoport között. Ezzel szemben azon egerekben, akik mBSA-t és TSG-6-t is kaptak intraartikulárisan a safranin-O festés intenzív maradt a felső porcrétegekben is 5-7 napig az

injekciót követően, és az immunhisztológiai metszetek sem mutattak megnövekedett aktivitást. Tehát egyetlen 100 µg-os rmTSG-6 injekció (mBSA-val együtt adva) blokkolta az aggregan degradációját és távozását a porcból.

Új eredmények

A rheumatoid arthritis egy ismeretlen etiológiájú, szisztémás, autoimmun betegség, melyet több ízületet érintő akut és chronikus gyulladós manifesztációk jellemeznek. Legfontosabb törekvések a kutatásban, hogy a rheumatoid arthritis pathogenesisét valamelyest jobban megértsük és célzott therápiákat találjunk, melyek szelektíven megállíthatják a porc degradációját.

PhD munkám során először az autoimmun arthritis kifejlődését vizsgáltuk egy relative új aspektusból. Kikísérleteztünk egy arthritis transzfer modelt, ahol a proteoglycan (PG) indukálta arthritist súlyosan immundeficiens egerekbe (SCID) vittük át, és az átvitelhez használt tisztított, ill. depletált sejtek újraépülését, repopularizációját vizsgáltuk a recipiensben az arthritis kialakulása során. Azt találtuk, hogy a T helper (különösen a Th1) sejtek esszenciálisak a betegség kialakításában, továbbá a Th sejtek központi jelentőségűek az antitest termelésében is. Elsőként kimutattuk, hogy egér eredetű PG (saját antigén) is képes arthritist indukálni egérben, tehát nagy valószínűség szerint ez a végső célmolekula a PG indukálta arthritisben.

A rheumatoid arthritis kezelésében használt mukózális tolerizálás II-es típusú kollagénnel csak közepes sikereket hozott a humán klinikai kipróbálások során, ezért új erőfeszítéseket kell tennünk, új utakat kell keresni, hogy a mukózális tolerancia hatásosságát növelni tudjuk. Ennek egyik lehetősége, hogy új porcalkotókat próbálunk használni. Mi azt találtuk, hogy az intranazálisan adott PG képes szupresszálni az arthritist egerekben (PG indukálta arthritisben), hiszen a nazálisan PG-vel kezelt egerek alacsonyabb incidenciával alakítottak ki arthritist, és ebben az esetben is a súlyossága elmaradt a kontrol csoportétól. Genetikailag kompatibilis SCID egereket használva

recipiensként képesek voltunk a létrehozott nazális toleranciát transferálni, de a folyamatos nazális antigén adása itt is elkerülhetetlen volt.

Harmadik vizsgálatunkban a szisztémásan (intravénásan) és lokálisan (intraarticulárisan) használt TSG-6 fehérjéről állapítottuk meg, hogy kifejezetten erős védő hatású a porc degradációban, még erősen gyulladt ízületek esetén is. Ezen túlmenően, a szisztémásan adott TSG-6 csökkentette az oedemát az arthritis akut fázisában PG indukálta arthritisben. Meglepő módon a TSG-6 ezt anélkül tette, hogy befolyással lett volna a gyulladásosejtek migrációjára az ízületi térbe. Ezen megfigyelések segítségével betekintést nyertünk egy új porcprotektív eljárás működésébe.

Remélem, és hiszek benne, hogy munkám a rheumatoid arthritis ezen állatmodelljén keresztül segített közelebbkerülni a válaszhoz, hogy miért és hogyan alakul ki ez az autoimmun folyamat és segítségével talán előbb tudunk majd igazi megoldást nyújtani erre a megmagyarázatlan betegségre, mely a mai napig oly sok életet nyomorított meg.

Irodalomjegyzék

Tudományos folyóiratban megjelent publikációk

1. Glant TT, Bárdos T, Vermes C, Chandrasekaran R, Valdez JC, Otto JM, Gerard D, Velins S, Lovász G, Zhang J, Mikecz K, Finnegan A: Variations in susceptibility to proteoglycan-induced arthritis and spondylitis among C3H substrains of mice. *Arthritis Rheum* 2001; **44**: 682-692. [IF:7.054]
2. Zhang J, Bárdos T, Mikecz K, Finnegan A, Glant TT: Impaired Fas signaling pathway is involved in defective T cell apoptosis in autoimmune murine arthritis. *J Immunol* 2001, **166**: 4981-4986. [IF:7.145]
3. Bárdos T, Kamath RV, Mikecz K, Glant TT: Anti-inflammatory and chondroprotective effect of TSG-6 (Tumor Necrosis Factor alpha-stimulated gene-6) in murine models of experimental arthritis. *Am J Pathology* 2001, **159**:1711-1721. [IF:6.436]
4. Bárdos T, Mikecz K, Finnegan A, Zhang J, Glant TT: T and B cell recovery in arthritis adoptively transferred to SCID mice. Antigen-specific activation is required for restoration of autopathogenic CD4⁺ Th1 cells in a syngeneic system. *J Immunol* 2002, **168**:6013-6021. [IF:7.145]
5. Bárdos T, Czipri M, Vermes C, Zhang J, Mikecz K, Glant TT: Continuous nasal administration of antigen is critical to maintain tolerance in adoptively transferred autoimmune arthritis in SCID mice. *Clin Exp Immunol* 2002, **129**:224-232. [IF:2.831]
6. Glant TT, Kamath RV, Bárdos T, Gál I, Szántó S, Murad YM, Sandy JD, Mort JS, Roughley PJ, Mikecz K: Cartilage-specific constitutive expression of TSG-6 protein (TNF α -stimulated gene-6) protein provides a chondroprotective, but not an anti-inflammatory effect in antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 2002, **46**:2207-2218. [IF:7.054]
7. Adarichev VA, Bárdos T, Christodoulou S, Phillips TM, Mikecz K, Glant TT: Major Histocompatibility complex controls susceptibility and dominant inheritance, but not the severity of the disease in mouse models of rheumatoid arthritis. *Immunogenetics* 2002, **54**:184-192. [IF:2.899]
8. Zhang J, Bárdos T, Li D, Gál I, Vermes C, Xu J, Mikecz K, Finnegan A, Lipkowitz S, and Glant TT: Cutting Edge: Regulation of T Cell Activation Threshold by CD28 Costimulation Through Targeting Cbl-b for Ubiquitination. *J Immunol* 2002, **169**: 2236-2240. [IF:7.145]
9. Bárdos T, Zhang J, Mikecz K, David CS, Glant TT: Mice lacking endogenous MHC class II develop psoriatic arthritis at advanced age. *Arthritis Rheum* 2002, **46**:2465-75. [IF:7.054]
10. Bárdos T, Czipri M, Vermes C, Finnegan A, Mikecz K, Zhang J: CD4⁺CD25⁺ Immunoregulatory T Cells May Not Be Involved in Controlling Autoimmune Arthritis. *Arthritis Research & Therapy* 2003, **5**:106-113. [IF:N/A]

Publikált, idézhető abstractok

1. Bárdos T, Kamath RV, Stoop R, Finnegan A, Mikecz K, Glant TT: Proteoglycan-induced progressive polyarthritis of BALB/c mice can adoptively transfer to SCID mice, but requires antigen challenge. *Arthritis Rheum* **43**:S75, 2000
2. Bárdos T, Buzás EI, Glant TT: Proteoglycan-induced arthritis is significantly altered by self and non-self peptide sequences in pre- and co-immunization experiments. *Arthritis Rheum* **43**:S231, 2000
3. Otto JM, Bárdos T, Vermes C, Glant TT: Genetic analysis of MHC haplotypes in mouse models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **43**:S234, 2000
4. Buzás EI, Bárdos T, Mikecz K, Finnegan A, Glant TT: T-cell recognition of arthritogenic epitopes of cartilage proteoglycan (aggrecan) in C3H mice: a novel model of autoimmune arthritis. *Arthritis Rheum* **43**:S374, 2000
5. Zhang J, Bárdos T, Mikecz K, Finnegan A, Glant TT: Impaired Fas signaling pathway is involved in defective T cell apoptosis in autoimmune murine arthritis. *Arthritis Rheum* **43**:S378, 2000
6. Bárdos T, Buzás EI, Finnegan A, Mikecz K, Glant TT: Altered peptide ligands dictate cytokine profiles and modify the clinical appearance of arthritis. *Arthritis Rheum* **43**:S396, 2000
7. Bárdos T, Vermes C, Lovász G, Finnegan A, Mikecz K, Glant TT: A new murine model for progressive polyarthritis and ankylosing spondylitis. *Trans ORS* **26**:0649, 2001
8. Bárdos T, Zhang J, Finnegan A, Mikecz K, Glant TT: The adoptive transfer of cartilage proteoglycan (aggrecan)-induced arthritis to SCID mice requires co-administration of T cells and antigen. *Trans ORS* **26**:0646, 2001
9. Glant TT, Kamath RV, Bárdos T, Otto JM, Mort J, Sandy J: Tissue (cartilage)-specific overexpression of TSG-6 (TNF α -stimulated gene-6) completely prevents proteoglycan (aggrecan) and cartilage degradation in antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* **44**:S157, 2001
10. Adarichev VA, Otto JM, Bárdos T, Mikecz K, Finnegan A, Glant TT: Collagen-induced and proteoglycan-induced arthritis: two murine models with diverse pathophysiology and genetic background. *Arthritis Rheum* **44**:S177, 2001
11. Bárdos T, Czipri M, Vermes C, Lovász G, Finnegan A, Mikecz K, Glant TT: Progressive spondyloarthropathy with ankylosis in murine models of arthritis. *Arthritis Rheum* **44**:S240, 2001
12. Bárdos T, Hanyecz A, David CS, Glant TT: Human MHC class II transgenic mice recognize peptide epitopes of human cartilage proteoglycan (PG). *Arthritis Rheum* **44**:S298, 2001
13. Bárdos T, Czipri M, Zhang J, Gál, I, Finnegan A, Mikecz K, Glant TT: Nasal tolerance to proteoglycan (aggrecan)-induced arthritis in BALB/c mice can be adoptively transferred and the tolerance reconstituted in SCID mice. *Arthritis Rheum* **44**:S87, 2001

14. Bárdos T, Zhang J, Mikecz K, David CS, Glant TT: Mice lacking endogenous murine MHC class II develop spontaneous arthritis at advanced age. *Arthritis Rheum* **44**:S270, 2001
15. Bárdos T, Kamath RV, Mikecz K, Glant TT: Anti-inflammatory and chondroprotective effect of TNF- α -stimulated gene-6 (TSG-6) in murine models of experimental arthritis. *Arthritis Rheum* **44**:S114, 2001
16. Czipri M, Bárdos T, Stoop R, Vermes C, Gál, I, Hanyecz A, Mikecz K, Watanabe H, Yamada Y, Glant TT: A novel approach for gene therapy: complete rescue of otherwise embryonic lethal defect in skeletal development. *Arthritis Rheum* **44**:S149, 2001
17. Firneisz G, Hanyecz A, Vermes C, Bárdos T, Glant TT: Gene expression profile in an animal model of rheumatoid arthritis using cDNA microarrays. *Arthritis Rheum* **44**:S177, 2001
18. Zhang J, Bárdos T, Mikecz K, Finnegan A, Glant TT: The CD4+CD25+ regulatory T cell subset is not required for prevention of autoimmune arthritis. *Arthritis Rheum* **44**:S86, 2001
19. Zhang J, Bárdos T, Mikecz K, Glant TT, Xu J, Stoop R, Finnegan A: Caspases promote T cell proliferation via the regulation of cell cycle progression *Arthritis Rheum* **44**:S301, 2001
20. Bárdos T, Kamath RV, Mikecz K, Mort J, Sandy J, Glant TT: Anti-inflammatory and chondroprotective effect of TSG-6 in murine models of experimental arthritis. *Trans ORS* **27**:0231, 2002
21. Bárdos T, Zhang J, Mikecz K, David CS, Glant TT: Mice lacking endogenous MHC class II develop osteo-degenerative toe disease resembling psoriatic arthritis *Trans ORS* **27**:0307, 2002
22. Bárdos T, Czipri M, Vermes C, Mikecz K, Glant TT: Suppression of autoimmunity in experimental arthritis by nasal tolerance. *Trans ORS* **27**:0692, 2002
23. Vermes C, Bárdos T, Czipri M, Hanyecz A, Lovász G, Bellyei Á, Fritz E, Roebuck K, Jacobs J, Galante J, Andersson GBJ, Glant TT: Differential effects of bacterial lipopolysaccharide (LPS) and tumor necrosis factor-alpha on the functions of human osteoblast cells. *Trans ORS* **27**:0537, 2002
24. Czipri M, Bárdos T, Vermes C, Gal I, Mikecz K, Watanabe H, Yamada Y, Glant T T: Genetic rescue of an otherwise perinatal lethal defect in skeletal development. *Trans ORS* **27**:0311, 2002
25. Adarichev AV, Bárdos T, Nesterovitch AB, Mikecz K, Finnegan A, Glant TT: Gender Effect on Clinical and Immunological Traits of Proteoglycan-induced Arthritis. *Arthritis Rheum* **45**:S, 2002
26. Hanyecz A, Bárdos T, Berlo SE, Mikecz K, Szanto S, Glant TT: A T Cell Hybridoma, Specific for an Epitope in the G3 Domain of Human Cartilage Proteoglycan, Induces Arthritis in SCID Mice. *Arthritis Rheum* **45**:S, 2002

27. Hanyecz A, Bárdos T, Berlo SE, Mikecz K, Vermes C, Glant TT: A Novel Approach Creating a "Prearthritic" Stage, for Investigating the in vivo Arthritogenic Effect of T Cell Hybridomas. *Arthritis Rheum* **45**:S, 2002

Egyéb saját előadások:

1. Bárdos T, Kránicz J, Czipri M: Tapasztalataink 900 operált dongalábas eset feldolgozása után. Magyar Ortopéd Társaság Vándorgyűlése 1999, Kaposvár, Hungary
2. Bárdos T, Zhang J, Stoop R, Finnegan A, Mikecz K, Glant TT. The adoptive transfer of proteoglycan (PG)-induced polyarthritis of BALB/c mice into SCID mice requires antigen specific challenge. Autumn Immunology Conference, 2000, Chicago, IL
3. Bárdos T, Hanyecz A, Buzás IE, Glant TT: Pre-and co-immunization with self and non-self peptide sequences significantly modify proteoglycan-induced arthritis in BALB/c mice. Rush University Forum for Research and Clinical Investigation, 2001, Chicago, IL
4. Bárdos T, Zhang J, Stoop R, Finnegan A, Mikecz K, Glant TT: Antigen specific challenge is essential for the successful adoptive transfer of proteoglycan-induced polyarthritis of BALB/c mice into SCID mice. Rush University Forum for Research and Clinical Investigation, 2001, Chicago, IL
5. Bárdos T, Czipri M, Vermes C, Lovász G, Bellyei Á, Glant T: Athritis psoriatica humanizált egerekben - új lehetőség a betegség immuneredetének vizsgálatára. Magyar Ortopéd Társaság Vándorgyűlése 2002, Pécs
6. Bárdos T, Kamath RV, Bellyei Á, Glant TT: A TSG-6 gyulladáscsökkentő és kondroprotektív hatása egér kísérletes modelben. Magyar Ortopéd Társaság, Fiatal Ortopédek Fóruma 2002, Kecskemét

[Kumulatív impact factor: 54.763]