

VILNIAUS UNIVERSITETAS
VALSTYBINIS MOKSLINIŲ TYRIMŲ INSTITUTAS
INOVATYVIOS MEDICINOS CENTRAS

Gintaras Sūdžius

IMUNINĖS SISTEMOS POKYČIAI
PIRMINIO SJÖGRENO SINDROMO PATOGENEZĖJE

Daktaro disertacija
Biomedicinos mokslai, biologija (01B),
Imunologija, serologija, transplantacija (B 500)

Vilnius, 2013

Disertacija rengta 2008-2012 m. Vilniaus universiteto Imunologijos institute ir po reorganizacijos Valstybiniame mokslinių tyrimų institute Inovatyvios medicinos centre.

Mokslinis vadovas:

dr. Almantas Šiaurys (Valstybinis mokslinių tyrimų institutas Inovatyvios medicinos centras, biomedicinos mokslai, biologija – 01B, imunologija, serologija, transplantacija – B500).

Turinys

ĮVADAS	9
DARBO TIKSLAS	11
DARBO UŽDAVINIAI	11
MOKSLINIS NAUJUMAS	11
GINAMIEJI TEIGINIAI.....	12
2.1. Pirminio Sjögreno sindromo epidemiologija ir klasifikacija.....	13
2.2. Autoantikūnai ir pSS diagnostikos problemos.....	15
2.3. Imuninės sistemos veiksniai Sjögreno sindromo patogenezės mechanizmuose	16
2.3.1. Įgimto imuniteto komponentai Sjögreno sindromo patogenezėje...	16
2.3.2. Įgytojo imuniteto komponentai Sjögreno sindromo patogenezėje..	19
2.4. Imuninės sistemos ląstelės pirminio Sjögreno sindromo patogenezėje .	20
2.4.1. Limfocitai mažosiose seilių liaukose	20
2.4.2 Limfocitų populiacijų vaidmuo Sjögreno sindromo ir kitų reumatinių ligų patogenezėje	22
2.4.2.1. CD4 ⁺ T limfocitai	22
2.4.2.2. CD8 ⁺ T limfocitai	25
2.4.2.3. T reguliacinės ląstelės pirminio Sjögreno sindromo patogenezėje.....	26
2.4.2.4. NK ir NKT ląstelės pirminio Sjögreno sindromo patogenezėje	28
2.4.2.5. B limfocitai.....	28
2.5. Humoraliniai veiksniai Sjögreno sindromo patogenezėje	29
2.5.1. Komplemento komponento C4 fragmentas C4d	30
2.5.2. Laisvos lengvosios grandinės κ ir λ	30
2.5.3. Imunoglobulinas G	32
2.5.4. B ląstelių aktyvavimo faktorius	33
2.5.5. Interleukinas 27.....	34
2.5.6. Interleukinas 35.....	36
3. METODAI.....	37

3.1 Tiriamieji pacientai	37
3.2. Periferinio kraujo limfocitų populiacijų fenotipavimas tėkmės citometrijos metodu	40
3.2.1. Periferinio kraujo mėginių paėmimas ir paruošimas	40
3.2.2. Periferinio kraujo limfocitų populiacijų fenotipavimas	40
3.2.2.1. Nestimuliuotų limfocitų paviršiaus žymenų nustatymas	41
3.2.2.2. Nestimuliuotų limfocitų viduląstelinių žymenų nustatymas	41
3.2.2.3. Periferinio kraujo limfocitų stimuliacija ir viduląstelinių žymenų nustatymas	42
3.2.3. Citometrijos duomenų analizė	44
3.4. Imunofermentinis tyrimo metodas	45
3.4.1. Tyrime naudoti rinkiniai	45
3.4.2. Serumo paruošimas, imunofermentinė analizė ir rezultatų įvertinimas	48
3.6. STATISTINĖ DUOMENŲ ANALIZĖ	49
4. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	50
4.1. Limfocitų populiacijų identifikavimas ir kiekybinis įvertinimas	51
4.1.1. T limfocitų ir jų populiacijų kiekybinė analizė	51
4.1.1.1. Th17 ir Treg populiacijų analizė	55
4.1.1.2. CD8 ⁱ T limfocitų, turinčių CD57 ir/arba CD27 žymenis analizė	58
4.1.2. B ir NK limfocitų kiekybinė analizė	60
4.1.3. Sergančių pirminiu Sjögreno sindromu ir kontrolinių grupių tiriamųjų limfocitų populiacijų tarpusavio priklausomybės nustatymas ...	63
4.2. T helperinių limfocitų populiacijų periferiniame kraujyje nustatymas ir kokybinis įvertinimas	71
4.3. Humoralinių imuninės sistemos komponentų kiekybinis įvertinimas ...	77
4.3.1. B ląstelių aktyvavimo faktoriaus kiekybinis įvertinimas	78
4.3.2. Imunoglobulinų laisvų κ ir λ lengvųjų grandinių kiekybinis įvertinimas	80

4.3.3. Komplemento komponento C4 fragmento C4d kiekybinis įvertinimas	83
4.3.4. Imunoglobulino G kiekybinis įvertinimas.....	84
4.3.5. Sisteminė interleukinų -27 ir -35 raiška ir jos ryšys su klinikiniais žymenimis sergantiesiems pirminiu Sjögreno sindromu	87
5. IŠVADOS.....	89
6. PUBLIKACIJŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS	91
8. LITERATŪROS SĄRAŠAS	93
PADĖKA	113
PRIEDAI	113

SANTRUMPOS

- ANA – antibranduoliniai antikūnai (angl. *anti-nuclear antibodies*);
- anti-AMA – anti-mitochondriniai antikūnai (angl. *anti-mitochondrial antibodies*);
- anti-LKM-1– antikūnai prieš inkstų-kepenų 1 tipo mikrosomas (angl. *anti-liver kidney microsomal type 1 antibody*);
- anti-PCA– antikūnai prieš parietalines ląsteles (ląsteles kurios gamina druskos rūgštį)(angl. *anti-parietal cell antibodies*);
- anti-RNP – antikūnai prieš ribonukleoproteinus (angl. *anti-ribonucleoprotein antibodies*);
- anti-SM – anti-Smith antikūnai (angl. *anti-Smith antibody*);
- anti-SMA – antikūnai prieš žmogaus alfa lygiųjų raumenų aktiną (angl. *anti-smooth muscle antibodies*);
- APC – alofikocianinas (angl. *allophycocyanin*);
- BAFF – B ląstelių aktyvavimo faktorius (angl. *B cell activating factor*);
- BAFF-R – B ląstelių aktyvavimo faktoriaus receptorius (angl. *B cell activating factor receptor*);
- bcl-2 ir bcl-x – apoptozę reguluojantys baltymai (angl. *Bcl-2 family of regulator proteins that regulate cell death*);
- BCR – B ląstelių receptorius (angl. *B-cell receptor*);
- C3 – komplemento komponentas 3 (angl. *Complement component 3*);
- C4 – komplemento komponentas 4 (angl. *Complement component 4*);
- C4BP – C4b prisijungiantis baltymas (angl. *C4b-binding protein*);
- C4d – komplemento komponento C4 fragmentas C4d (angl. *complement 4 degradation fragment C4d*);
- CCR6 – chemokino receptorius 6 (angl. *chemokine receptor 6*);
- CD – diferenciacijos antigenas (angl. *Cluster of differentiation*);
- DMSO – dimetilsulfoksidas (angl. *dimethylsulfoxide*);
- EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis (angl. *ethylenediaminetetraacetic acid*);
- Fas – apoptozę reguluojantis baltymas (angl. *apoptosis antigen 1*);
- FBS – žymėjimo buferis (angl. *staining buffer*);

FITC - fluoresceino izotiocianatas (angl. *fluorescein isothiocyanate*);
FSC – tiesinė šviesos sklaida (angl. *forward scatter*);
HRP – krienu peroksidazė (angl. *horseradish peroxidase*);
ICAM-1 – ląstelių sukibimo molekulė 1 (angl. *intercellular adhesion molecule 1*);
IFN – interferonai (angl. *interferons*);
IgG – imunoglobulinas G (angl. *immunoglobulin G*);
IL-27R – interleukino 27 receptorius (angl. *interleukin-27 receptor*);
IL-interleukinai (angl. *interleukins*);
iTr35 – indukuoti T reguliaciniai limfocitai produkuojantys IL-35 (angl. *IL-35-dependent induced Tregs*);
La/SSB – Sjögreno sindromo antigenas B (autoantigenas La) (angl. *Sjögren's syndrome antigen B (autoantigen La)*);
LLG – laisvos lengvosios imunoglobulinų grandinės κ (kappa) ir λ (lambda) (angl. *immunoglobulin free light chains (FLC)*);
LOD – rinkinio jautrumas, nustatymo riba (angl. *lower limit of detection*);
M3 – muskarino M3 receptorius (angl. *muscarinic acetylcholine receptor M3*);
NK – ląstelės žudikės (angl. *natural killers*);
NKT – T ląstelės žudikės (angl. *natural killer T cells*);
PE – fikoeritinas (angl. *phycoerythrin*);
PerCP – peridinino-chlorofilo baltymų kompleksas (angl. *Peridinin-Chlorophyll-Protein Complex*);
PerCP-CY5.5 – peridinino-chlorofilo baltymų ir cianino dažo kompleksas (angl. *Peridinin-Chlorophyll-Protein Complex with a cyanine dye (Cy5.5)*);
PGE2 – prostaglandinas E2 (angl. *prostaglandin E2*);
PMA – forbolio 12-miristato-13-acetatas (angl. *phorbol myristate acetate*);
pSS – pirminis Sjögreno sindromas (angl. *primary Sjögren's syndrome*);
RNP – ribonukleoproteinai (angl. *ribonucleoprotein particle*);
RNR – ribonukleorūgštis (angl. *ribonucleic acid (RNA)*);
Ro/SSA – Sjögreno sindromo antigenas A (autoantigenas Ro) (angl. *Sjögren's syndrome antigen A (autoantigen Ro)*);

ROR γ t – transkripcijos faktorius (angl. *transcription factor ROR γ t*);
sicca kompleksas – sausumo kompleksas (sausas burna – kserostomija, sausos akys - kseroftalmija, galimas odos sausumas – kseroderma, vaginalinis sausumas ir kt.) (angl. *sicca complex*);
SS – Sjögreno sindromas (angl. Sjögren's syndrome);
SSC – šoninė šviesos sklaida (angl. *side scatter*);
STAT – signalo perdavėjai ir transkripcijos aktyvatoriai (angl. *signal transducers and activators of transcription*);
T-bet, T-box – transkripcijos faktoriai (angl. *transcription factors*);
TGF- β – transformuojantis augimo faktorius beta (angl. *transforming growth factor beta*);
Th – T ląstelės pagalbininkės, T helperiniai limfocitai (angl. *T helper cells*);
Th17/Th1-like – Th17/Th1-like limfocitai ekspresuojantys IL-17 ir IFN- γ ;
TLR – Toll receptoriai (angl. *Toll-like receptor*);
TNF – navikų nekrozės faktorius (angl. *tumor necrosis factor*);
Treg – T reguliaciniai limfocitai (angl. *regulatory T cells*);
VCAM-1 – kraujagyslių ląstelių sukibimo molekulė 1 (angl. *vascular cell adhesion molecule 1*);
ŽLA – audinių dermės antigenai, žmogaus leukocitų antigenai (angl. *human leukocyte antigen (HLA) system, major histocompatibility complex (MHC)*).

ĮVADAS

Sjögreno sindromas (SS) arba autoimuninis epitelitas – tai kompleksinė lėtinė autoimuninė liga, kuriai būdinga egzokrininių liaukų epitelio infiltracija autoreaktyviais limfocitais ir specifiniai Ro/SSA ir La/SSB ribonukleoproteinams autoantikūnai kraujo serume (Reksten, Jonsson et al. 2009). Dažniausi ligos simptomai yra varginantis akių ir burnos sausumas. Ligos pasireiškimo spektras platus - nuo specifinių organų (seilių, ašarų ir kitų egzokrininių liaukų) lokalaus pažeidimo iki sisteminio pasireiškimo, kai pažeidžiami kiti organai ir audiniai (kvėpavimo, virškinimo, inkstų ir nervų sistemos), ir limfomos išsivystymo. Pacientams sergantiems pirminiu Sjögreno sindromu (pSS) lyginant su bendra populiacija, 44 kartus didesnė ne-Hodžkino limfomos išsivystymo tikimybė (Voulgarelis, Giannouli et al. 2006). Sjögreno sindromas skirstomas į pirminį ir antrinį SS, kai kartu su kita autoimunine liga, dažniausiai reumatoidiniu artritu ar sisteme vilklige, nustatomas ir SS. Paprastai pirminiu Sjögreno sindromu sergantys pacientai skirstomi į dvi grupes: pacientai kuriems pažeidžiamos tik ašarų ir seilių liaukos (liaukinė raiška), ir pacientai kuriems sistemiškai pažeidžiami kiti organai ir audiniai (ekstra-liaukinė raiška).

Pirminis Sjögreno sindromas gali atsirasti įvairaus amžiaus pacientams, tačiau dažniausiai suserga moterys ketvirtame-penktame savo gyvenimo dešimtmetyje. Sergančių moterų ir vyrų santykis yra 9:1 (Anaya, Liu et al. 1995).

Sjögreno sindromas prieš keletą dešimtmečių buvo retai nustatomas susirgimas, tačiau pagerėjus diagnostikai ir priėmus vieningus diagnostikos kriterijus (Vitali, Bombardieri et al. 2002), diagnozuotų atvejų padaugėjo bene 10 kartų ir šiuo metu yra vienas dažniausių autoimuninių susirgimų. Sjögreno sindromo paplitimas bendroje populiacijoje manoma svyruoja nuo 0,05 iki 0,48 proc. (Helmick, Felson et al. 2008). Anksčiau Sjögreno sindromas dažnai būdavo nediagnozuojamas, pasireiškusius simptomus priskiriant kitoms ligoms, kurios savo požymiais mėgdžioja Sjögreno sindromą. Dėl tokios

simptomų mimikrijos ir dažnai silpnai išreikštų požymių liga buvo diagnozuojama po 6-10 metų nuo pirmųjų simptomų atsiradimo ir ligos pradžios (Manthorpe, Asmussen et al. 1997).

Sjögreno sindromas yra lėtinis autoimuninis susirgimas, su kol kas nelabai aiškia etiologija. Pastaruoju metu ypatingai intensyviai tiriami veiksniai, kurie gali paskatinti išsivystyti sindromą. Tarp tokių veiksnių yra paveldimumas (genetinis faktorius), hormonai (manoma estrogenas, kadangi 90 proc. sergančiųjų yra moterys), egzogeniniai faktoriai (virusinės ar bakterinės infekcijos) (Low and Witte 2011). Ligos eigoje atsiranda audinių ir organų pažeidimai, sukelti imuninės sistemos komponentų palaikomo uždegimo, sąlygojančio egzokrininių liaukų funkcijos susilpnėjimą, kuris prasideda po seilių liaukų latakėlių ir liaukinio audinio infiltracijos limfocitais ir plazminėmis ląstelėmis. Nepaisant intensyvių imuninės sistemos tyrimų, Sjögreno sindromo patogenezės modelis nėra pilnai aiškus. Daug tyrimų atliekama tiriant mažųjų seilių liaukų biopsinę medžiagą, kadangi seilių liaukos pirmiausia pažeidžiamos ligos eigoje. Tiriama limfocitų populiacijų sudėtis infiltrate, humoraliniai veiksniai ir jų ryšiai su imuninės sistemos ląstelėmis. Įvairių autorių literatūroje skelbiami rezultatai dažnai yra priešaringi. To priežastimi gali būti ir tyrimų nenuoseklumas, skirtingi tyrimo modeliai/sistemos, taip pat negalima atmesti sergančiųjų demografinių skirtumų (skirtingi genų rinkiniai būdingi tam tikram regionui). Mažiau dėmesio skiriama imuninės sistemos ląstelių tyrimams periferiniame kraujyje, o tyrimų rezultatai dažnai taip pat yra priešaringi. Pirminiu SS sergančiųjų kraujyje būdinga limfocitopenija. Siekiant nustatyti to priežastis atlikta nemažai tyrimų, tačiau trūksta detalesnių tyrimų, atskleidžiančių kokių ląstelių populiacijų padaugėja/sumažėja, bei kokių ląstelių populiacijų sąskaita, galbūt, tai vyksta. Trūksta tyrimų, kurie susietų imuninės sistemos ląstelių populiacijų pokyčius ir humoralinių veiksnių raišką. Periferinis kraujas yra patogus tyrimo objektas, todėl naujų biožymenų paieška kraujyje ir serume yra itin aktuali tema, ypač neseniai pradėjus taikyti biologinius preparatus autoimuninių ligų gydymui.

DARBO TIKSLAS

Įvertinti pirminiu Sjögreno sindromu sergančių pacientų su skirtinga ligos raiška sisteminio imuninio atsako komponentų pokyčius periferiniame kraujyje.

DARBO UŽDAVINIAI

1. Kiekybiškai įvertinti B, NK, NKT limfocitus pSS sergančių tiriamųjų periferinio kraujo mėginiuose.
2. Kiekybiškai įvertinti efektorinių ir reguliacinių CD4⁺ (pagal IL-17A ir CD25Foxp3 žymenis) ir CD8⁺ (pagal CD57 ir CD27 žymenis) T limfocitų populiacijų pokyčius pSS sergančių tiriamųjų periferinio kraujo mėginiuose.
3. Įvertinti T helperinių (Th) limfocitų Th1, Th2, Th17 ir Th17/Th1-like populiacijų santykinius pokyčius pSS sergančių tiriamųjų periferinio kraujo mėginiuose.
4. Ištirti humoralinio imuniteto sudedamųjų dalių – bendro imunoglobulinų kiekio, imunoglobulinų laisvųjų κ ir λ grandinių, BAFF faktoriaus, komplemento komponento C4 fragmento C4d – koncentraciją sergančiųjų Sjögreno sindromu kraujo serume ir įvertinti galimą jų ryšį su ląstelinio imuniteto komponentais.
5. Įvertinti interleukinų IL-27 ir IL-35 koncentraciją sergančiųjų Sjögreno sindromu kraujo serume.

MOKSLINIS NAUJUMAS

Atlikta detali, išsami B, NK, T limfocitų populiacijų analizė sergančių pSS pacientų periferiniame kraujyje. Iki šiol tokia detali analizė nebuvo atlikta, nes dauguma literatūroje skelbiamų mokslinių tyrimų susiję su įvairių imuninių ir kitų ląstelių sekretuojamų citokinų ir kitų faktorių nustatymu kraujo serume bei liaukinio audinio histologiniuose pjūviuose. Pirmą kartą pSS pacientų periferiniame kraujyje tirtos CD8⁺ limfocitų populiacijos pagal jų ekspresuojamus CD57 ir CD27 žymenis. Pirmą kartą

identifikuoti Th17/Th1-*like* limfocitai pSS pacientų periferiniame kraujyje. Mūsų darbe nustatyti nauji potencialūs imunologiniai biožymenys (CD4⁺IL17A⁺, CD8ⁱCD57⁻CD27⁺ ir Th17/Th1-*like* limfocitai) pSS pacientų periferiniame kraujyje. Nustatyta, kad pacientų sergančių pSS periferiniame kraujyje Th limfocitų populiacijų pusiausvyra yra sutrikusi, ir to priežastimi yra ne tik Th2 limfocitų populiacijos sumažėjimas, bet ir reikšmingas Th17/Th1-*like* limfocitų populiacijos pagausėjimas. Pirmą kartą pSS pacientuose, o ne modelinėse sistemose, iširta IL-27 ir IL-35 raiška kraujo serume. Nustatytas žymus šių interleukinų koncentracijos serume padidėjimas leidžia teigti, kad jie dalyvauja pSS patogenezėje. Iširta humoralinių veiksnių kaip bendras imunoglobulinų kiekis, kappa ir lambda laisvosios grandinės, BAFF faktorius, komplemento komponento C4 fragmento C4d raiška sergančiųjų pSS kraujo serume ir atlikta šių veiksnių ir tirtų limfocitų populiacijų ryšių analizė.

GINAMIEJI TEIGINIAI

1. Pirminiu Sjögreno sindromu sergantiesiems būdingą periferinio kraujo limfocitopeniją sąlygoja NK ląstelių ir specifinių T limfocitų populiacijų (CD4⁺ ir CD8⁺) ir jų subpopuliacijų (CD4⁺IL17A⁺, CD8ⁱCD57⁻CD27⁺) ląstelių absoliutaus skaičiaus sumažėjimas.
2. Sergančiųjų pirminiu Sjögreno sindromu pacientų periferiniame kraujyje T helperinių limfocitų pusiausvyra yra sutrikusi, ir to priežastimi yra Th2 limfocitų populiacijos procentinės dalies mažėjimo tendencija bei reikšmingai padidėjusi Th17/Th1-*like* limfocitų procentinė dalis.
3. Sergantiesiems pirminiu Sjögreno sindromu su ekstra-liaukiniais pakitimais stebimas didesnis, nei sergantiesiems sindromu tik su liaukine raiška, B ląstelių homeostazės sutrikimas, sąlygojamas humoralinių veiksnių BAFF, IgG, kappa ir lambda LLG, C4d raiškos disbalanso.
4. Interleukinai IL-27 ir IL-35 dalyvauja pirminio Sjögreno sindromo patogenezėje.

LITERATŪROS APŽVALGA

2.1. Pirminio Sjögreno sindromo epidemiologija ir klasifikacija

Sjögreno sindromas yra gana dažna autoimuninė liga. Remiantis įvairių studijų rezultatais, pSS paplitimas bendroje gyventojų populiacijoje svyruoja nuo 0,05 iki 0,48 proc. (Helmick, Felson et al. 2008). Didžiojoje Britanijoje SS yra antras pagal dažnį autoimuninis reumatinis susirgimas ir jo paplitimas apie 0,33 proc. (Thomas, Hay et al. 1998). Jungtinių Amerikos Valstijų (JAV) Nacionalinės artrito tyrimo grupės 2008 m. pateiktoje ataskaitoje Sjögreno sindromas yra labiausiai paplitusių autoimuninių reumatinių susirgimų trejetuke. Nuo 1998 m. iki 2008 m. JAV sergančių pSS skaičius išaugo nuo 0,4 milijono iki 3,1 milijono (Helmick, Felson et al. 2008). Tokį staigų diagnozuotų atvejų skaičių lėmė pagerėjusi diagnostika, priėmus bendrus Amerikos ir Europos Sjögreno sindromo klasifikacijos kriterijus. Pagal šiuos kriterijus SS diagnozė remiasi subjektyviais įrodymais (paciento apklausa dėl akių ir burnos sausumo) ir objektyviais sausos burnos (nestimuluota sialometrija, paausinių liaukų sialografija, seilių liaukų scintigrafija), sausų akių (Schirmer 1 testas, Bengal rožinio testas), histologinio mažųjų seilių liaukų biopsijos medžiagos tyrimo – židinių skaičius (*Focus score*) ≥ 1 (vienas židinytis – stebima >50 limfocitų/ 4mm^2), autoantikūnų kraujo serume (antikūnai prieš Ro/SSA ir/arba La/SSB ribonukleoproteinus) įrodymais. SS diagnozės patvirtinimui reikia bent trijų subjektyvių ir/arba objektyvių požymių, kartu nustatant autoantikūnus anti-Ro/SSA ir/arba anti-La/SSB arba liaukinio audinio infiltraciją leukocitais (Reksten, Jonsson et al. 2009).

Maždaug penktadaliui sergančiųjų pSS liga prasideda netipiškai. Pasireiškia neaiškios kilmės karščiavimu, padidintu eritrocitų nusėdimo greičiu, anemija, seropozityviu artritu, lėtiniu nuovargiu, skausmingos šlapimo pūslės sindromu, periferine polineuropatija ir kt. Dažnai netipinė ligos pradžia yra vėlyvos SS diagnozės priežastis. Vidutiniškai diagnozuojama po 6-8 metų nuo pirmųjų ligos simptomų atsiradimo (Fox 2005; Mieliauskaitė, Dumalakienė et al. 2009).

Stebimi 2 sergančiųjų amžiaus pikai, pirmasis po menarchės 2-3 gyvenimo dešimtmetyje ir antrasis po menopauzės, amžiaus vidurkis apie 50 metų (Kassan and Moutsopoulos 2004). Tačiau, Norvegijos mokslininkų tyrimai parodė 7 kartus didesnę sergamumą 71-74 m.amžiaus grupėje, nei 40-44 m. pacientų grupėje (Haugen, Peen et al. 2008).

Vienas iš būdingiausių ligos bruožų yra kserostomija. Ji pasireiškia beveik 100 proc. pacientų, sergančių SS. Tačiau, kserostomija būdinga ir beveik 30 proc. senyvo amžiaus žmonių (65 m. ir daugiau). Dažniausia kserostomijos priežastis yra įvairių medikamentų vartojimas, tai ir antihipertenziniai preparatai, antihistamininiai preparatai, migdomieji ir daugelis kitų, kuriems būdingas anticholinerginis veikimas (Mieliuskaitė 2010).

Pacientai, sergantys pSS, pagal klinikinių požymių pasireiškimą moksliniuose tyrimuose dažnai skirstomi į dvi grupes: pacientai kuriems klinikiniai požymiai pasireiškia tik liaukose (pacientai be ekstra-liaukinių požymių), ir pacientai kuriems pasireiškia plataus spektro sisteminiai klinikiniai požymiai ne tik liaukose, bet ir kituose organuose ir audiniuose (pacientai su ekstra-liaukiniais požymiais) (Szodoray, Papp et al. 2009; Szturmowicz, Wilinska et al. 2010). Liaukiniai požymiai yra tiesiogiai susiję su limfocitų infiltracija ir liaukinio audinio destrukcija. Dėl seilių ir ašarų liaukų destrukcijos vystosi sausų akių ir sausos burnos sindromas, vadinamas sicca kompleksu. Klinikiniai požymiai grupėse:

Liaukinei pSS raiškai būdingas sicca (sausumo) kompleksas – oralinis (sausą burna – kserostomija), okuliarinis (sausos akys (kseroftalmija), rečiau odos sausumas – (kseroderma) ir kitų liaukų sutrikimai (vaginalinis sausumas).

Ekstra-liaukinė pSS raiška pasireiškia raumenų-skeleto sistemos pažeidimais (artralgija, mialgija, miozitas), odos pažeidimais (vaskulitas, vaskulopatija), kraujagyslių pažeidimais (Reinolds'o fenomenas), kvėpavimo takų pažeidimais (intersticinė plaučių liga), hematologinės sistemos sutrikimais (limfadenopatija, leukopenija, limfoma), inkstų sistemos pažeidimais (intersticinis nefritas), gastro-intestinės sistemos pažeidimais (autoimuninis

hepatitas, biliarinė cirozė), nervų sistemos pažeidimais – centrinės (trumpalaikis atminties praradimas) ir periferinės (daugybinių mononeuritas).

Oda yra veikiama abiejų liaukinių ir ekstra-liaukinių pSS raiškos mechanizmų (Connolly 2001; Salazar, Gallego et al. 2010; Fox 2012). Vyrų ir moterų sisteminiai klinikiniai požymiai labai panašūs, tik vyrams liga pasireiškia didesniu sisteminiu poveikiu (Anaya, Liu et al. 1995).

2. 2. Autoantikūnai ir pSS diagnostikos problemos

Sjögreno sindromo diagnozavimas yra sudėtingas uždavinys kiekvienam reumatologui, nes nėra simptomų, būdingų išskirtinai SS, o taip pat nėra unikalių testų, kuriais galima būtų tiksliai ir užtikrintai diagnozuoti SS. Situacija pagerėjo 2002 m., priėmus bendrus Amerikos ir Europos Sjögreno sindromo klasifikacijos kriterijus. Remiantis tiek Amerikos, tiek Europos kriterijais SS diagnozei buvo būtini tiek akių ir/arba burnos simptomai, tiek laboratoriniai rodikliai. Amerikos ir Europos kriterijų specifiškumas yra atitinkamai 75 proc. ir 97,2 proc., o jautrumas yra mažesnis atitinkamai 65,7 proc. ir 48,6 proc. (Vitali, Bombardieri et al. 2002), todėl yra svarbu surasti skirtumus kurie galėtų būti panaudojami kaip diagnostiniai ar atmetimo kriterijai leidžiantys atskirti Sjögreno sindromą nuo dėl kitų priežasčių pasireiškiančio specifinių organų sausumo. Vienas tokių yra IgG4, jo koncentracijos padidėjimas rodo su IgG4 susijusios ligos simptomus (dar vadinama Mikuličiaus liga), kadangi šios ligos simptomai yra panašūs į SS, palyginti neseniai tokie pacientai buvo priskiriami SS pacientų grupei. Su IgG4 susijusios ligos požymiai yra panašūs į SS požymius (pažeidžiami organai – ašarų ir seilių liaukos bei kasa, nustatoma ašarų ir seilių liaukų infiltracija IgG4+ plazminėmis ląstelėmis ir audinių fibrozė), tačiau šie pacientai teigiamai reaguoja į gydymą kortikosteroidais ir neturi autoantikūnų anti-Ro/SSA ir anti-La/SSB (Masaki, Dong et al. 2009; Takahashi, Yamamoto et al. 2010). Autoantikūnai anti-Ro/SSA ir anti-La/SSB atitinkamai nustatomi tik 50-70 proc. ir 30-60 proc. pSS pacientų (Witte 2010; Hernandez-Molina, Leal-Alegre et al. 2011; Ter Borg, Risselada et al. 2011). Dažnai pSS pacientuose randama

ir kitų autoantikūnų, kaip reumatodinis faktorius, ANA, anti-RNP, anti-SM, anti-SMA, anti-PCA, anti-LKM-1, anti-AMA ir autoantikūnai alfafodrinui. Autoantikūnai randami 80-90 proc. pSS pacientų (Nardi, Brito-Zeron et al. 2006; Ter Borg, Risselada et al. 2011), tačiau nėra nei vieno autoantikūno, būdingo tik SS. Visi šie autoantikūnai gali būti randami ir sergant kitomis autoimuninėmis ligomis, tokiomis kaip reumatoidinis artritas ar sisteminė raudonoji vilkligė. Neseniai Borg ir kt. nustatė stiprią koreliaciją tarp anti-Ro/SSA autoantikūnų ir sisteminio SS pasireiškimo (Ter Borg, Risselada et al. 2011). Anti-La/SSB autoantikūnai yra labiau specifiški SS nei anti-Ro/SSA (Nakamura, Kawakami et al. 2006). Autoantikūnų nebuvimas 10-20 proc. serologiškai neigiamų pSS pacientų koreliuoja su švelnesne ligos eiga (Ter Borg, Risselada et al. 2011). Pastarųjų metų autoimuninių procesų tyrimai atskleidė autoantikūnų prognostinę vertę. Autoantikūnai anti-Ro/SSA ir anti-La/SSB nustatomi vidutiniškai 5 m. anksčiau nei pasireiškia aiškūs klinikiniai SS požymiai, todėl jie naudojami ir kaip prediktyviniai ligos žymenys (Agmon-Levin, Lian et al. 2011). Autoantikūnų anti-Ro/SSA ir anti-La/SSB buvimas gali rodyti ir ankstyvą ligos stadiją ir sunkesnės ligos eigos bei išgyvenamumo prognozę (Hernandez-Molina, Leal-Alegre et al. 2011).

2.3. Imuninės sistemos veiksniai Sjögreno sindromo patogenezės mechanizmuose

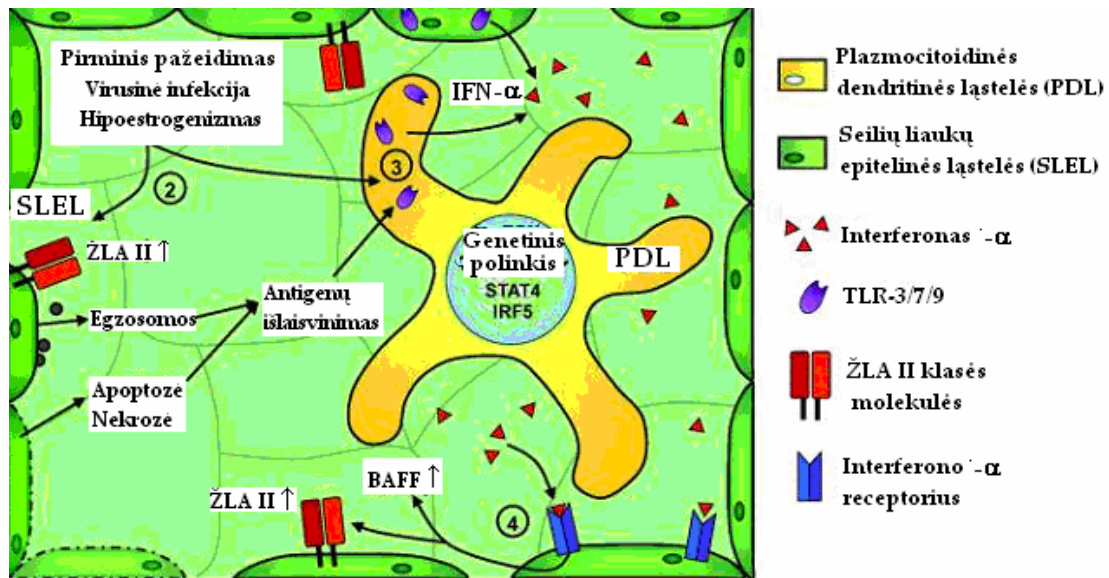
Sjögreno sindromo patogenezės mechanizmuose dalyvauja ir įgimto ir įgyto imuniteto komponentai, kurie tarpusavyje glaudžiai susiję.

2.3.1. Įgimto imuniteto komponentai Sjögreno sindromo patogenezėje

SS pacientų mažųjų seilių liaukų imunohistocheminė analizė atskleidė, kad šių organų epitelinėse struktūrose vyksta leukocitų infiltracija, todėl Sjögreno sindromo apibūdinimui ir buvo pasiūlytas terminas “autoimuninis epitelitas“ (Skopouli and Moutsopoulos 1994; Manoussakis and Moutsopoulos 2000). Šiuo metu manoma, kad Sjögreno sindromo patogenezės kelias prasideda

būtent epitelinėse liaukų struktūrose, todėl tyrėjai daug dėmesio skiria epitelinių ląstelių vaidmeniui.

Imunohistoscheminiai tyrimai parodė, kad seilių liaukų epitelinės ląstelės ekspresuoja aktyvacijos žymenis: žmogaus leukocitų antigenų (ŽLA) I ir ŽLA II klasės molekules, CD80 ir CD86 kostimuliacines molekules, bei adhezijos molekules ICAM-1 ir VCAM-1, taip pat lokaliai produkuoja įvairius chemokinus ir citokinus (IL-1, IL-6, B ląstelių aktyvavimo faktorių (BAFF)). Pastebėta, kad ašarų liaukų epitelinės ląstelės savo paviršiuje ekspresuoja autoantigeną SS-B(La). Taip epitelinės ląstelės, veikdamos kaip neprofesionalios antigeną pateikiančios ląstelės bei pritraukdamos ir aktyvuodamos B ir T limfocitus, skatina limfoidinių folikulų formavimąsi (DI. Yannopoulos 1992; Saito, Terauchi et al. 1993; Tsunawaki, Nakamura et al. 2002). Dėl moteriškos lyties atstovių dominavimo tarp sergančiųjų pSS, keliama ir hipoestrogenizmo (hormonų disbalansas sumažėjus estrogeno kiekiui), kaip pSS išsivystymą skatinančio veiksnio, teorija. Manoma, kad sumažėjęs estrogeno kiekis gali iššaukti egzokrininių liaukų epitelinėms ląstelėms paprastai nebūdingą ŽLA II klasės molekulių raišką (Low and Witte 2011). Didėjanti limfocitų infiltracija seilių liaukose (epiteliniui audiniui virstant limfoepiteliniu) koreliuoja su sumažėjusiu seilių sekreto išsiskyrimu, sukeliančiu kserostomiją (DI. Yannopoulos 1992; Jonsson, Vogelsang et al. 2011). Pagal siūlomą pSS patogenezės modelį (Low and Witte 2011) aktyvuotos epitelinės ląstelės aktyvuoja kitą įgimto imuniteto sudėtinę dalį – plazmocitoidines dendritines ląsteles (Pav.2.3.1.).



Pav. 2.3.1. Įgimto imuninio atsako schema pSS patogenezėje (Pagal (Low and Witte 2011)).

Genų ir jų koduojamų produktų, susijusių su pSS išsivystymu tyrimai atskleidė svarbų I tipo interferono (IFN- α/β) vaidmenį ligos patogenezėje. Plasmocitoidinės dendritinės ląstelės imuninio atsako metu išskiria iki 1000 kartų daugiau I tipo interferono nei kitos ląstelės (Gottenberg, Cagnard et al. 2006). pSS sergančiųjų periferiniame kraujyje buvo nustatytas plasmocitoidinių dendritinių ląstelių kiekio sumažėjimas, o atliekant imunohistocheminį tyrimą šios ląstelės buvo rastos tik pSS pacientų seilių liaukų biopsinėje medžiagoje, o sveikų kontrolinės grupės tiriamųjų seilių liaukose šių ląstelių neaptikta. Tai rodo plasmocitoidinių dendritinių ląstelių migraciją iš periferinio kraujo į pSS uždegimo židinius (Gottenberg, Cagnard et al. 2006). Plasmocitoidinių dendritinių ląstelių aktyvavimas per TLR receptorius didina I tipo interferono ir IL-12 sekreciją, o tai paskatina įsijungti įgyto imuninio atsako komponentus – limfocitus. Didėja T limfocitų, NK ląstelių ir dendritinių ląstelių gaminamo II tipo interferono sekrecija. Plasmocitoidinių dendritinių ląstelių sekretuojami INF- α ir IL-6 skatina ląstelių diferenciaciją ir autoantikūnų gamybą (Liu 2005). Taip sukuriamas “įdingas ratas” kuris į Sjögreno sindromo patogenezę įtraukia tiek įgimto, tiek ir įgyto imuninio

atsako komponentus. Viena iš šio rato jungčių yra I ir II tipo interferonai, kurie laikomi pagrindiniais BAFF sekrecijos sužadintojais. Savo ruožtu, BAFF hiperprodukcija aktyvuoja T ir B limfocitus. Tiriant pSS pacientus stebima padidinta BAFF sekrecija ne tik liaukų epitelinėse ląstelėse, bet ir T limfocituose bei monocituose (Low and Witte 2011).

2.3.2. Įgytojo imuniteto komponentai Sjögreno sindromo patogenezėje

Įgytojo, taip pat kaip ir įgimtojo, imuniteto sąvoka apima humoralinį ir ląstelinį imuninį atsaką.

Liaukinio audinio destrukcija siejama su limfocitų ($CD4^+$, $CD8^+$ ir B limfocitų) infiltracija. Liaukinio audinio infiltracija limfocitais skirstoma į etapus: nuo švelnaus pažeidimo su pavieniais židiniai, iki masinių ir difuzinių infiltratų, kurie sąlygoja liaukinio audinio struktūros praradimą. Su gausia seilių liaukų infiltracija limfocitais siejamas ir sisteminių ekstra-liaukinių požymių pasireiškimas sergantiems pSS. Pacientams su ekstra-liaukine raiška būdinga sunkesnė ligos eiga ir stipresnis autoimuninis atsakas (Mieliauskaitė, Dumalakienė et al. 2009; Christodoulou, Kapsogeorgou et al. 2010; Salazar, Gallego et al. 2010; Fox 2012). Viena iš pirmųjų SS patogenezės stadijų yra smulkiųjų kapiliarų ir aukštojo endotelio venulių adhezijos molekulių ekspresija ir chemokinių sekrecija, o tai sukelia imuninės sistemos ląstelių migraciją į liaukas, ir taip liaukose įjungiamas limfocitų ir dendritinių ląstelių "homing'o" ciklas (Xanthou, Polihronis et al. 2001; Salomonsson, Larsson et al. 2002; Fox 2005). Limfocitai, migravę į liaukas, sąveikauja su dendritinėmis ir liaukinio epitelio ląstelėmis. T ir B limfocitus aktyvuoja antigeną pateikiančios ląstelės, kuriose nuolat vyksta ŽLA II klasės ir kostimuliacinių molekulių raiška. Dėl šios priežasties, formuojasi įgytojo imuninio atsako komponentai - atminties limfocitai ir autoantikūnai (García-Carrasco, Fuentes-Alexandro et al. 2006). Esant nedidelio laipsnio uždegimui liaukų infiltrate vyrauja $CD4^+$ T limfocitai, taip pat randama kiek mažiau B limfocitų ir plazminių ląstelių. Vėlesnėse stadijose T limfocitų mažėja, o B limfocitų skaičius didėja (Christodoulou, Kapsogeorgou et al. 2010). Infiltrato T

limfocitams būdingas CD41 žymuo. Išskirti iš liaukų CD41 žymenį turintys limfocitai po stimuliacijos anti-CD3 ir anti-Fas antikūnais yra atsparūs apoptozei. Manoma, kad atsparumas apoptozei atsiranda dėl padidėjusios apoptozę reguliuojančių baltymų bcl-2 ir bcl-x raiškos (Manganelli and Fietta 2003). Padidėjęs atsparumas apoptozei būdingas tik seilių liaukų infiltrato T limfocitams priešingai, pSS sergančių pacientų periferiniame kraujyje stebima padidėjusi T limfocitų apoptozė lyginant su sveikų tiriamųjų periferinio kraujo T limfocitais (Ogawa, Dang et al. 1996). Manoma, kad dėl sutrikusio autoreaktyvių T limfocitų pašalinimo ir jų apoptozės kaltas bendras limfocitų genetinis defektas (Hayashi, Haneji et al. 1994). SS sergančiųjų B ląstelių homeostazė taip pat yra sutrikusi. Tarp naujai kaulų čiulpuose pasigaminusių jaunų B limfocitų net 50-75 proc. turi autoreaktyvų B ląstelių receptorių (BCR), tačiau tik 1-3 proc. žmonių populiacijos išsivysto autoimuninės ligos, nes limfocitams vystantis ir brestant vyksta atranka. Atrankos metu autoreaktyvūs klonai yra pašalinami arba sukeliama jų anergija. Esant normalioms fiziologinėms sąlygoms, dėl nedidelės BAFF koncentracijos serume ir B ląstelių ekspresuojamo nedidelio BAFF receptorių kiekio autoreaktyvūs B limfocitų klonai patiria apoptozę. Ženkliai padidėjusi BAFF produkcija pSS patogenezės metu leidžia išgyventi autoreaktyviems B ląstelių klonams. Šie, savo ruožtu, sukelia humoralinį autoimuninį atsaką (Varin, Le Pottier et al. 2010).

2.4. Imuninės sistemos ląstelės pirminio Sjögreno sindromo patogenezėje

2.4.1. Limfocitai mažosiose seilių liaukose

pSS pasireiškia lėtai progresuojančia autoimunine egzokrinopatija, kuriai būdinga įvairaus laipsnio vienbranduolių leukocitų infiltracija į pažeistus organus (dažniausiai ašarų ir seilių liaukas). Didžiąją dalį infiltrato (daugiau kaip 90 proc.) sudaro T ir B limfocitai. Bendros T limfocitų (CD3⁺)

populiacijos procentinė dalis tarp visų infiltrato vienbranduolių ląstelių kinta priklausomai nuo uždegimo liaukiniame audinyje laipsnio. Didžiąją T limfocitų dalį sudaro $CD4^+$ T limfocitai, kurie, liaukose esant lengvesnio laipsnio uždegimui, sudaro didžiausią infiltrato dalį. Gausėjant limfocitų kiekiui infiltrate, $CD4^+$ T limfocitų procentinė dalis tarp visų infiltrato vienbranduolių ląstelių mažėja. $CD8^+$ T limfocitų, sudarančių mažesnę T limfocitų populiacijos dalį, procentinė dalis keičiantis uždegimo laipsniui beveik nesikeičia, todėl didėjant uždegimo laipsniui mažėja $CD4/CD8$ T limfocitų santykis. Seilių liaukų infiltrate $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ (Treg) limfocitų populiacija taip pat kinta priklausomai nuo uždegimo laipsnio. Daugiausia Treg limfocitų liaukiniame audinyje būna esant vidutinio laipsnio uždegimui. Tiek esant nedidelio laipsnio uždegimui, tiek ir formuojantis didelio laipsnio uždegimui su labai gausia limfocitų (pagrindinė dalis B limfocitai) infiltracija, Treg procentinė dalis yra mažesnė. NK ląstelių kiekis infiltrate yra nedidelis ir jis pastebimai nesikeičia didėjant liaukinio audinio uždegimo laipsniui. Makrofagų kiekis infiltrate, nors procentinė jų dalis nedidelė, taip pat labai priklauso nuo uždegimo laipsnio ir didėja vystantis didesnio laipsnio uždegimui. B limfocitų dalis infiltrate, atvirkščiai nei T limfocitų kiekis palaipsniui didėja didėjant uždegimo laipsniui. Esant dideliame uždegimo laipsniui su itin gausia bendra limfocitų infiltracija, B limfocitai sudaro pagrindinę dalį visų infiltrato limfocitų. Dendritinių ląstelių populiacijų kiekiai infiltrate taip pat varijuoja. Folikulinių dendritinių ląstelių kiekis infiltrate nesikeičia didėjant uždegimo laipsniui, tačiau kinta jų lokalizacija. Esant nedidelio laipsnio uždegimui jos randamos perivaskuliariniuose agregatuose (infiltrato periferijoje). Didėjant uždegimo laipsniui ir formuojantis gemaliniams centrams, jos pradeda formuoti tinklą svarbų gemalinių centrų susiformavimui liaukiniame audinyje. Interdigitinės dendritinės ląstelės, esant nedidelio laipsnio uždegimui, dažniausiai randamos aplink liaukų latakėlių epitelines ląsteles, kurios yra laikomos pagrindinėmis vietinio autoimuninio atsako reguliuotojomis. Jos glaudžiai kontaktuoja su epitelio ląstelėmis, todėl interdigitinių ląstelių kiekio sumažėjimas esant didesnio laipsnio liaukinio

audinio pažeidimui, gali būti siejamas su epitelinio audinio destrukcija ir galima interdigitinių dendritinių ląstelių migracija į limfmazgius, kur jos pateikia antigenus, kuriuos pasikrovė liaukiniame audinyje (Christodoulou, Kapsogeorgou et al. 2010).

2.4.2 Limfocitų populiacijų vaidmuo Sjögreno sindromo ir kitų reumatinėlių ligų patogenezėje

2.4.2.1. CD4⁺ T limfocitai

Imuninio atsako mechanizme dalyvauja įvairių tipų imuninės sistemos ląstelės, tačiau CD4⁺ T limfocitai, dar vadinami T ląstelėmis pagalbininkėmis (Th) atlieka pagrindinį vaidmenį imuninio atsako reguliavime. Priklausomai nuo lokalaus citokinų derinio sukurtos aplinkos, CD4⁺ T limfocitai diferencijuoja į skirtingas populiacijas. Dažniausiai išskiriamos CD4⁺ limfocitų populiacijos - Th1, Th2, Treg ir palyginti neseniai atrasti Th17 limfocitai. Iki Th17 pripažinimo atskira Th limfocitų populiacija, autoimuninės ligos buvo skirstomos į Th1 ir Th2 limfocitų atsako sąlygojamas ligas. Viskas pasikeitė atradus naują Th ląstelių populiaciją kuri gamina interleukiną 17 (IL-17). Tai pakeitė iki tol vyravusią nuostatą, kad patologinio proceso autoimuninis atsakas priklauso nuo dominuojančios populiacijos limfocitų: Th1 arba Th2. Detalesni tyrimai parodė, kad Th17 ląstelių vystymasis skiriasi nuo Th1 ir Th2 ląstelių. Th17 efektorinėms ląstelėms vystantis nereikalingi transkripcijos veiksniai STAT1, T-bet, STAT4 ar STAT6 reikalingi Th1 ir Th2 ląstelių vystymuisi (Harrington, Hatton et al. 2005; Park, Li et al. 2005). pSS pacientų seilių liaukose ir kraujo serume randami padidinti IL-17 kiekiai, todėl manoma, kad IL-17, tuo pačiu ir Th17 limfocitų populiacija, dalyvauja pSS patogenezėje. Tai patvirtina ir nustatomi didesni kiekiai tokių citokinų kaip TGF-β, IL-6 bei IL-23, kurie yra pagrindiniai Th17 diferenciacijos aktyvatoriai. TGF-β yra pagrindinis diferenciacijos veiksnys Foxp3⁺ T reguliacinių ląstelių diferenciacijoje. Padidinti kiekiai Foxp3⁺ T reguliacinių

ląstelių randami biopsinėje mažųjų seilių liaukų medžiagoje esant nedidelio ir vidutinio laipsnio liaukinio audinio pažeidimui (Katsifis, Rekka et al. 2009).

Žinoma, kad IL-17 ir Th17 limfocitai dalyvauja ir daugelio kitų autoimuninių susirgimų patogenezėje, tokių kaip reumatoidinis artritas (Colin, Asmawidjaja et al. 2010), sisteminė raudonoji vilkligė (Wong, Lit et al. 2008), psoriazė (Wilson, Boniface et al. 2007), išsėtinė sklerozė (Tzartos, Friese et al. 2008), uždegiminės žarnyno ligos: Krono liga (Kobayashi, Okamoto et al. 2008) ir opinis kolitas (Annunziato, Cosmi et al. 2007). Nustatyta, kad IL-17 atlieka pagrindinį vaidmenį autoimuninių ligų patogenezėje ir pelių modelinėse sistemose, tokiose kaip kolagenu indukuotas artritas (Shahrara, Huang et al. 2008), eksperimentinis autoimuninis encefalitas (Graber, Allie et al. 2008) ir kt. Pelių modeliuose parodyta Th17 sekretuojamo IL-17 svarba ir SS patogenezėje. IL-17 vaidina labai svarbų vaidmenį seilių liaukų disfunkcijos procesuose, o terapijos, nukreiptos prieš IL-17, sušvelnina ligos simptomus (Nguyen, Yin et al. 2011).

Seilių liaukų CD4⁺ T limfocitai ir epitelio ląstelės taip pat sekretuoja ir IL-6, IL-10, IL-23 ir TGF-β citokinus (Fox, Kang et al. 1994; Kolkowski, Reth et al. 1999; Saito, Haruta et al. 1999; Sakai, Sugawara et al. 2008; Roescher, Tak et al. 2010), o šie citokinai yra būtini Th17 limfocitų diferenciacijos inicijavimui. CD4⁺ T limfocitai, randami pSS pacientų seilių liaukų histologiniuose pjūviuose, ekspresuoja Th1 limfocitams priskiriamus citokinus (IL-2, IFN-γ, IL-12 ir IL-18), o tai leidžia daryti prielaidą, kad Sjögreno sindromas taip pat yra su Th1 populiacijos sąlygotais reguliaciniais mechanizmais susijusi liga (Fox, Kang et al. 1994; Kolkowski, Reth et al. 1999; Fox 2005). Kai kurių autorių tyrimai parodė, kad sinergistiškai veikdami IL-17 ir IFN-γ sukelia uždegimą pelių žarnyno uždegiminiame modelyje, o tai leidžia manyti, kad ir Th1, ir Th17 limfocitai kartu dalyvauja patogenezės mechanizmuose (Hue, Ahern et al. 2006; Kullberg, Jankovic et al. 2006). Sakai su kolegomis taip pat patvirtino IFN-γ ir IL-17 ekspresiją sergančių SS pacientų seilių liaukose bei nustatė, kad IFN-γ⁺ limfocitų yra gerokai mažiau

nei IL-17⁺ limfocitų, o IFN- γ ⁺ limfocitai nekoekspresuoja IL-17 (Sakai, Sugawara et al. 2008).

2007 metais pasirodė pirmieji pranešimai apie Th17 limfocitus, kurie ekspresuoja tiek IL-17, tiek ir Th1 limfocitams specifinį citokiną IFN- γ (Acosta-Rodriguez, Rivino et al. 2007; Annunziato, Cosmi et al. 2007; McGeachy, Bak-Jensen et al. 2007). Šie limfocitai pavadinti „Th17/Th1-like“ limfocitais. Ši T limfocitų populiacija (apie 40% IL-17 produkuojančių Th17 limfocitų) buvo identifikuota pacientų, sergančių Krono liga, žarnyne (Muller and Lamprecht 2008; Rovedatti, Kudo et al. 2009). Tiek Th17, tiek Th17/Th1-like ląstelių klonai pasižymi selektyvia IL-23R, chemokino receptoriaus 6 (CCR6) ir transkripcijos faktoriaus ROR γ t ekspresija. Šie limfocitai taip pat panašūs ir savo funkcinėmis savybėmis, gali stimuliuoti B limfocitus, pasižymi žemu citotoksiškumu ir sunkiai pasiduoda autologinių Treg limfocitų poveikiui (Annunziato, Cosmi et al. 2007).

Šiuo metu dar tebediskutuojama ar organams specifinį autoimuninį atsaką SS patogenezėje sukelia kooperuodamosios abi, Th1 ir Th17, limfocitų populiacijos, ar jis sukeliamas CD4⁺ T limfocitų, kurie gamina tiek IL-17, tiek IFN- γ . Yra žinoma, kad esant TGF- β trūkumui ir veikiant IL-12, Th17 limfocitai yra perprogramuojami į IFN- γ gaminančius Th1 limfocitus. Tokiomis sąlygomis Th17 limfocituose mažėja ROR γ t/ α ir IL-17 gamyba, didėjant IFN- γ sekrecijai. Ar vyksta toks limfocitų fenotipo pasikeitimas seilių liaukose SS patogenezėje, esant sutrikusiai TGF- β ir IL-12/IL-23 pusiausvyrai, kol kas neaišku (Nguyen, Hu et al. 2008; Katsifis, Rekka et al. 2009).

Boniface ir kt. pastebėjo, kad kultivuojant žmogaus T limfocitus Th17 limfocitų diferenciacijos sąlygomis (IL-1 β , IL-23, ir prostaglandinas E2 (PGE2)), limfocitai sekretuojantys IL-17 ir IFN- γ arba tik IFN- γ savo charakteristikom panašesni į limfocitus, gaminančius tik IL-17 (Th17), nei į limfocitus gaminančius tik IFN- γ (Th1). Todėl, pagrindinį Th1 limfocitų žymenį IFN- γ , galima būtų priskirti ir Th17 limfocitams, priklausomai nuo kitų T limfocitų citokinų sukurtos aplinkos (Boniface, Blumenschein et al. 2010).

2.4.2.2. CD8⁺ T limfocitai

Sjögreno sindromo patogenezėje taip pat dalyvauja ir CD8⁺ limfocitai. Tai rodo mažųjų seilių liaukų histologiniuose pjūviuose randami CD8⁺ limfocitai. Jie sudaro nedidelę dalį visų T limfocitų liaukų infiltrate, o jų kiekis seilių liaukose, skirtingai nei CD4⁺ T limfocitų, mažai kinta ligos eigoje, todėl didėjant liaukos destrukcijos laipsniui ir mažėjant CD4⁺ T limfocitų kiekiui infiltrate, mažėja ir CD4/CD8 limfocitų santykis (Christodoulou, Kapsogeorgou et al. 2010).

Liaukinio audinio destrukcijos mechanizmuose taip pat dalyvauja perforinai ir granzimai. Žinoma, kad šias biologiškai aktyvias medžiagas gausiai išskiria NK ląstelės. Be NK ląstelių perforinus ir granzimus išskiria ir citotoksiniai CD8⁺ limfocitai (Polihronis, Tapinos et al. 1998). T citotoksiniai efektoriniai limfocitai gausiai ekspresuoja CD8 žymenį (Wang, Lehner et al. 1994), todėl žymimi CD8ⁱ (i-intensyvus) limfocitais. Po susidūrimo su antigenu ir aktyvacijos bei proliferacijos, dalis T limfocitų tampa atminties ląstelėmis (Mackay 1999). Pastaraisiais metais daugėja mokslinių straipsnių, įrodančių svarbų CD8⁺ atminties limfocitų vaidmenį autoimuninių ligų patogenezėje. Nemažai CD8⁺ atminties limfocitų populiacijų tyrimų atlikta tiriant psoriazę (Chamian, Lin et al. 2007), reumatoidinį artritą (Cho, Sim et al. 2012) ir kitas autoimunines ligas. CD8⁺ atminties limfocitų vaidmuo ir populiacijų pasiskirstymas pSS patogenezėje, mažai tirtas. CD8⁺ limfocitai randami liaukinio audinio infiltrate, o vienos iš liaukų destrukcijos mechanizmuose dalyvaujančių medžiagų yra jų sintetiniai perforinai/granzimai. Tikėtina, kad CD8⁺ atminties limfocitai, sintetinantys šias biologiškai aktyvias medžiagas, aktyviai dalyvauja pSS patogenezės mechanizmuose. Pagal CD57 ir CD27 žymenis atminties limfocitus galima suskirstyti į skirtingos diferenciacijos stadijos populiacijas. CD8⁺ atminties limfocitams senėjant (pasiekiant vėlesnę diferenciacijos stadiją), didėja CD57 žymens raiška, jie gamina didesnius kiekius perforinų A ir B, granzimų, nei jaunesnės, CD27 žymenį ir didesni

proliferacijos potencialą turinčios atminties ląstelės (Tsuda, Ambrosini et al. 2011).

Tyrimai rodo, kad $CD8^+CD57^+$ T limfocitų populiacijos atsiradimas yra susijęs su lėtine antigenine stimuliacija. Nustatyta, kad $CD8^+CD57^+$ T limfocitų populiacija gausėja: su amžiumi (Abedin, Michel et al. 2005; Vallejo 2005; Lazuardi, Herndler-Brandstetter et al. 2009; Weng, Akbar et al. 2009; Focosi, Bestagno et al. 2010), po hemopoetinių kamieninių ląstelių, audinių ar organų transplantacijos (Arosa 2002; Le Priol, Puthier et al. 2006), sergant lėtinėmis viduląstelinėmis mikroorganizmų (virusų, kai kurių bakterijų) sukeliomis ligomis (Mollet, Sadat-Sowti et al. 1998; Vallejo 2005; Le Priol, Puthier et al. 2006; Focosi, Bestagno et al. 2010), sergant lėtiniu alkoholizmu (Song, Coleman et al. 2001; Arosa 2002), sergant autoimuninėmis ligomis (Arosa 2002; Schirmer, Goldberger et al. 2002; Le Priol, Puthier et al. 2006; Focosi, Bestagno et al. 2010), onkologinėmis ligomis (Tsukishiro, Donnenberg et al. 2003; Filaci, Fenoglio et al. 2007; Characiejus, Pasukoniene et al. 2008).

CD27 žymuo - kostimuliacinė molekulė, kuri vaidina svarbų vaidmenį T limfocitų aktyvacijos, proliferacijos, diferenciacijos ir išgyvenimo procesuose (Yamada, Shinozaki et al. 2002; Tesselaar, Xiao et al. 2003; Arens, Schepers et al. 2004; Ochsenbein, Riddell et al. 2004). Šis žymuo siejamas su didesniu limfocitų proliferacijos potencialu, nes CD27 žymenį ekspresuojantys limfocitai dar nėra pasiekę galutinio diferenciacijos laipsnio (Friedman, Devillier et al. 2011). CD27 kostimuliacijos molekulių trūkumas gali sukelti T limfocitų anergiją ir apoptozę (Huang, Kerstann et al. 2006). Esant pastoviai antigeninei stimuliacijai ir didėjant T limfocitų diferenciacijos laipsniui, laipsniškai mažėja kostimuliacinių CD27 molekulių raiška, tai sukelia palaipsninį kloninį išsekimą vykstant ląstelių senėjimui ir proliferacijos potencialo mažėjimui (Albareda, Laucella et al. 2006).

2.4.2.3. T reguliacinės ląstelės pirminio Sjögreno sindromo patogenezėje

$CD4^+CD25^+Foxp3^+$ T limfocitai, kitaip dar vadinami T reguliacinėmis ląstelėmis (T_{reg}), yra labai svarbi imuninės sistemos grandis, atsakinga už

autoimuninių procesų prevenciją ir toleranciją. Sumažėję T_{reg} ląstelių kiekiai randami sisteminė raudonąja vilklige ir kitomis autoimuninėmis ligomis sergančiųjų periferiniame kraujyje. Tai rodo svarbų šių ląstelių vaidmenį žmogaus autoimuninių ligų patogenezėje (Liu, Lin et al. 2008).

Mokslinėse publikacijose pateikiami pSS sergančiųjų periferinio kraujo T_{reg} tyrimų rezultatai gana prieštaringi. Vieni autoriai aprašo periferinio kraujo T_{reg} ląstelių kiekio sumažėjimą (Li, Qian et al. 2007; Li, Li et al. 2007), o Gottenberg su kolegomis nustatė T_{reg} ląstelių kiekio padidėjimą pSS pacientų periferiniame kraujyje (Gottenberg, Lavie et al. 2005). Kiti autoriai teigia nenustatę patikimų T_{reg} kiekio pakitimų pSS pacientų periferiniame kraujyje, bet mažųjų seilių liaukų biopsijų histologiniuose pjūviuose buvo stebimas T_{reg} ląstelių pagausėjimas esant intensyvesniam liaukos infiltravimui vienbranduolėmis ląstelėmis (Sarigul, Yazisiz et al. 2010). Christodoulou ir kolegų pateikiami duomenys rodo, kad daugiausia T reguliacinių ląstelių mažųjų seilių liaukų histologiniuose pjūviuose randama esant vidutinio laipsnio pažeidimui ir vienbranduolių ląstelių infiltracijai. Didėjant pažeidimų mastui ir gausėjant B ląstelių infiltrate, T_{reg} ląstelių dažnis (populiacijos dalis procentais/bendras infiltrato vienbranduolių leukocitų skaičius) mažėja (Christodoulou, Kapsogeorgou et al. 2010). Manoma, kad skirtingais ligos etapais T_{reg} ląstelių kiekis periferiniame kraujyje gali mažėti dėl migracijos iš periferinio kraujo ir kaupimosi uždegiminiame audinyje. Esant vidutinio laipsnio uždegimui mažosiose seilių liaukose, T_{reg} ląstelių periferijoje randama mažiausiai, o infiltruotose seilių liaukose daugiausiai. Didėjant liaukinio audinio pažeidimui ir mažėjant T_{reg} kiekiui infiltrate, pastarųjų padaugėja periferiniam kraujyje. Dėl T_{reg} ląstelių kiekio sumažėjimo liaukiniame audinyje esant didelio laipsnio pažeidimui, ir migracijos į periferinį kraują, manoma, kad T reguliacinių ląstelių atsakas nėra efektyvus pSS patogenezėje (Christodoulou, Kapsogeorgou et al. 2008). To priežastimi gali būti nesubalansuotas T reguliacinių ląstelių kiekis sparčiai augant Th17 efektorinių ląstelių skaičiui (Katsifis, Rekka et al. 2009).

2.4.2.4. NK ir NKT ląstelės pirminio Sjögreno sindromo patogenezėje

Nemažai NK (ląstelės žudikės, angl. *natural killers*) ir NKT (T ląstelės žudikės, angl. *natural killer T cells*) ląstelių tyrimų atlikta pacientams sergantiems autoimuninėmis reumatinėmis ligomis, tačiau tyrėjų gaunami rezultatai prieštaringi. NK ląstelės dėl savo citotoksinių (Polihronis, Tapinos et al. 1998)) ir reguliacinių savybių yra viena iš autoimuninio proceso prevencijos grandžių (Lurati, Bertani et al. 2012). Kai kurių autorių duomenimis pacientų, sergančių pSS, sisteminė raudonąja vilklige, reumatoidiniu artritu, NK ląstelių kiekis periferiniame kraujyje yra sumažėjęs lyginant su sveikais tiriamaisiais, taip pat stebimas sumažėjęs jų funkcinis aktyvumas (Struyf, Snoeck et al. 1990; Green, Kennell et al. 2005). NKT, kaip ir NK ląstelės, yra viena iš autoimuninio proceso prevencijos grandžių ir gali veikti kaip T reguliacinės ląstelės. Nustatytas NKT limfocitų skaičiaus sumažėjimas ir funkcinės savybių susilpnėjimas sergant autoimuninėmis reumatinėmis ligomis (Kojo, Adachi et al. 2001; Wither, Cai et al. 2008) siejamas su autoimuninio proceso vystymusi ir autoantikūnų gamyba (Kojo, Adachi et al. 2001; Lurati, Bertani et al. 2012). Ne visi NK ir NKT ląstelių tyrimai parodė NK ir NKT ląstelių kiekio sumažėjimą pSS pacientų kraujyje. Szodoray su kolegomis, atlikę ląstelių, pasižyminčių reguliacinėmis savybėmis, tyrimą pacientų sergančių pSS periferiniame kraujyje, nustatė NK ir NKT ląstelių procentinės dalies padidėjimą pSS grupėje lyginant su sveikų asmenų rezultatais (Szodoray, Papp et al. 2009).

2.4.2.5. B limfocitai

Sergančiųjų pSS mažųjų seilių liaukų histologiniuose pjūviuose randamo limfocitų infiltrato viena pagrindinių sudedamųjų dalių yra B limfocitai. Esant nedidelio laipsnio uždegimui sergančiųjų pSS mažųjų liaukų infiltratuose vyrauja T, o didėjant liaukinio audinio pažeidimui įsivyrauja masyvi limfocitų infiltracija, kurios pagrindinę dalį sudaro B ląstelės (Christodoulou, Kapsogeorgou et al. 2010). Nagrinėjant Sjögreno sindromo patogenezę B ląstelės daugiau dėmesio sulaukė, kai preparatu rituximab (chimeriniai

monokloniniai antikūnai specifiniai CD20 baltymui, kuris pagrinde nustatomas ant B ląstelių) buvo pašalinti autoreaktyvūs B ląstelių klonai ir gauti teigiami gydymo rezultatai (Pijpe, van Imhoff et al. 2005; Meijer, Meiners et al. 2010; Hamza, Bos et al. 2012). Kaip vienas iš pagrindinių pSS požymių yra B ląstelių hiperaktyvumas. Tai pasireiškia autoantikūnų gamyba, cirkuliuojančių imuninių kompleksų atsiradimu, hipergamaglobulinemija, ektopinių limfinių struktūrų formavimusi, bei padidėja rizika susirgti B ląstelių limfoma (Kassan and Moutsopoulos 2004; Fox 2005; Hansen, Lipsky et al. 2005; Zintzaras, Voulgarelis et al. 2005). B limfocitų hiperaktyvumo humoraliniai žymenys yra uždegimo židiniuose vykstančių procesų atspindys. pSS pacientams būdingas ektopinių limfoidinių centrų formavimasis liaukiniame audinyje (Bombardieri and Pitzalis 2012). Ektopinių limfoidinių centrų formavimasis aprašomas ir kitų autoimuninių ligų atvejais, kai pasireiškia B ląstelių veiklos sutrikimai ir padidėja limfomos rizika. Tai autoimuniniai susirgimai, tokie kaip reumatoidinis artritas (Schroder, Greiner et al. 1996; Zintzaras, Voulgarelis et al. 2005), sisteminė raudonoji vilkligė (Hutloff, Buchner et al. 2004) ir autoimuninis tiroiditas (Hsi, Singleton et al. 1998; Ansell, Grant et al. 1999). pSS sergantiems pacientams, lyginant su bendra populiacija, 44 kartus didesnė ne-Hodžkino limfomos išsivystymo tikimybė (Voulgarelis, Giannouli et al. 2006). pSS pacientų B limfocitų homeostazė periferiniame kraujyje taip pat yra sutrikusi. Randami padidėję kiekiai aktyvuotų naivių B limfocitų ir gemalinių centrų B ląstelių, bei sumažėję kiekiai B ląstelių esančių ramybės fazėje (Bohnhorst, Bjorgan et al. 2001). Manoma, kad vienas pagrindinių veiksnių, išbalansuojantis B ląstelių homeostazę ir tolerancijos mechanizmą, yra BAFF, leidžiantis išgyventi autoreaktyviems B ląstelių klonams (Varin, Le Pottier et al. 2010).

2.5. Humoraliniai veiksniai Sjögreno sindromo patogenezėje

2.5.1. Komplemento komponento C4 fragmentas C4d

Neseniai mokslinėje literatūroje paskelbtas apžvalginis straipsnis, kuriame įvertinti šeši siūlomi nauji biožymenys sisteminėms autoimuninėms ligoms diagnozuoti, įvertinti jų aktyvumą, gydymo strategijos pasirinkimą ir nustatyti ligos vystymosi prognozes. Minimi žymenys: autoantikūnai prieš trombocitų augimo faktoriaus receptorių (sisteminės sklerozės atveju), serumo prokalcioninas, interferono genų raiška, C4d fragmentas, kolageno I ir II tipo C-telopeptidai (Tektonidou and Ward 2011).

Vienas iš šių biožymenų, žmogaus komplemento komponento C4 fragmentas C4d, siūlomas sisteminės raudonosios vilkligės aktyvumo įvertinimui. Serumo komplemento baltymų C3 ir C4 kiekybinis įvertinimas jau dešimtmečius naudojamas šios ligos aktyvumo įvertinimui, tačiau pastaruoju metu atsirado naujų duomenų, rodančių, kad komplemento skilimo produktai, susidarę komplemento kaskados aktyvavimo metu, geriau atspindi ligos aktyvumą (ypatingai artėjančius ligos paūmėjimus). Nagrinėjamos komplemento komponento C4 fragmento C4d, kaip stabilaus ir greitai nustatomo biožymens, panaudojimo perspektyvos (Tektonidou and Ward 2011).

Vienas pagrindinių pSS diagnozei ir klasifikavimui naudojamų veiksnių yra autoantikūnai, o komplemento sistemos funkcijų sutrikimai ir žemas C3 ir C4 kiekis daugiau identifikuojami kaip nepalankios ligos eigos, limfomos ir priešlaikinės mirties žymenys (Theander, Manthorpe et al. 2004; Ramos-Casals, Brito-Zeron et al. 2005). Neaišku, ar žemą komplemento kiekį apsprendžia išsekvojimas ar genetiniai veiksniai, o, gal būt, blogas komplemento sistemos aktyvinimo/inhibavimo reguliavimas.

2.5.2. Laisvos lengvosios grandinės κ ir λ

Imunoglobulinų lengvosios grandinės yra antikūnų molekulės sudėtinė dalis, stebima cirkuliacijoje ir laisvoje formoje, nes B ląstelės jų gamina nuo 10 iki 40% daugiau nei sunkiųjų grandinių. Ilgą laiką tai buvo laikoma nereikšmingu antikūnų surinkimo proceso komponentų pertekliumi, nes

lengvosios grandinės, skirtingai nuo sunkiųjų, neaktyvuoja komplemento ir nesiriša prie specifinių receptorių, tačiau tyrimai parodė, kad laisvų lengvųjų grandinių (LLG) koncentracija serume ar stuburo smegenų skystyje išauga uždegiminių susirgimų, tokių kaip autoimuninės ligos ar infekcijos, metu. Tai vyksta dėl B ląstelių aktyvinimo. LLG kiekis koreliuoja su ligos aktyvumo augimu. Pastarųjų metų tyrimai rodo ir tai, kad LLG, kaip signaliniai efektoriai ar priešuždegiminės molekulės dalyvauja eilėje imunologinių reakcijų (Nakano, Matsui et al. 2011).

LLG kiekybinis tyrimas ir dviejų šių grandinių tipų santykio (κ/λ) apskaičiavimas parodo vienos ar kitos grandinės perteklinę sintezę (didesnis santykis nei 1,65 rodo κ LLG perteklių, o mažesnis nei 0,26 – klonines λ LLG perteklių), o tai gali būti reikšmingas diagnostinis rodiklis klinikinėje praktikoje (Katzmann, Abraham et al. 2005). Per pastaruosius kelis metus laisvų κ ir λ LLG nustatymas kraujyje įdiegtas į klinikinę praktiką. Serume LLG koncentracija priklauso ir nuo plazminių ląstelių darbo, ir nuo inkstų funkcionavimo. Padidėjus polikloninei imunoglobulinų gamybai ar besivystant inkstų nepakankamumui, abiejų κ ir λ lengvųjų grandinių koncentracija gali padidėti 10-20 kartų, bet jų santykis nekinta. Priešingai, vėžinės ląstelės gamina tik vieno tipo grandines, todėl κ/λ santykis tampa nenormalus. Tikslus LLG kiekio įvertinimas imunotyrimu serume, kuris yra jautresnis nei elektroforezė ar imunotyrimas šlapime, leidžia pradėti gydymą, kol dar nepažeisti inkstai (LLG yra toksiškos inkstų kanalėliams), sekti gydymo efektyvumą (LLG skilimo pusperiodis kraujyje yra 150 kartų trumpesnis nei IgG molekulės) ir pan. (Bradwell 2005).

LLG κ ir LLG λ koncentracijos pokyčiai stebimi sergant įvairiomis ligomis (Nakano, Matsui et al. 2011). Literatūroje nurodoma, kad esant reumatoidiniam artritui ir pSS serume LLG kiekis didėja ir šis padidėjimas koreliuoja su ligos aktyvumu. Gottenberg su bendraautoriais nustatė, kad pacientų, sergančių reumatoidiniu artritu ir pSS, LLG kiekis serume buvo 1,5-2 kartus didesnis nei kontroliniuose sveikų tiriamųjų pacientų serumuose. 22,3 proc. pSS pacientų turėjo padidintą LLG kiekį, lyginant su kontrolinės grupės

tiriamaisiais, ir nenormalų (padidėjusį κ arba λ LLG kiekį) κ/λ santykį. LLG koncentracijos statistiškai reikšmingai koreliavo su IgG, reumatoidinio faktoriaus, β -mikroglobulino, BAFF koncentracijomis. LLG koncentracijos buvo didesnės kraujo serume autoantikūnus turinčių pacientų, ypač kai buvo randami abiejų tipų, anti-SSA ir anti-SSB, antikūnai. Pacientai su ekstra-liaukiniais pakitimais taip pat turėjo aukštesnes koncentracijas LLG, nei pacientai tik su liaukų pažeidimais. Tai rodo, kad ekstra-liaukiniai pažeidimai susiję su B ląstelių aktyvinimu (Gottenberg, Aucouturier et al. 2007). LLG koncentracijos padidėjimas, žemas serumo C4 lygis, maišyta monokloninė krioglobulinemija (II tipo) yra limfomą prognozuojantys žymenys Sjögreno sindromo patogenezės eigoje (Sutcliffe, Inanc et al. 1998; Gottenberg, Aucouturier et al. 2007). Nustačius šiuos biožymenis pSS pacientams, juos reikia iširti, įvertinant ar nėra susiformavusi limfoma, o jos nenustačius, stebėti dėl galimo limfomos išsivystymo.

2.5.3. Imunoglobulinas G

Bendro imunoglobulino G (IgG) koncentracijos kraujo serume nustatymas yra vienas iš siūlomų nespecifinių tyrimų pSS diagnostikoje (IgG > 1,445 mg/dl) (Shiboski, Shiboski et al. 2012). IgG koncentracija parodo B ląstelių aktyvumą, kadangi autoantikūnus gamina IgG⁺ plazminės ląstelės (Mietzner, Tsuiji et al. 2008). pSS pacientams būdingas IgG koncentracijos kraujo serume padidėjimas (Eriksson, Almroth et al. 1994; Liu and Li 2011). Bohnhorst ir kt. savo tyrimuose nustatė teigiamą ryšį tarp tirpaus CD27 baltymo ir bendro IgG koncentracijų pSS pacientų kraujo serume. Padidėjusi tirpaus CD27 baltymo koncentracija serume rodo T limfocitų aktyvaciją. Šios biomolekulės šaltiniai yra ne tik T limfocitai, bet ir B limfocitai bei plazminės ląstelės, todėl jis yra ir B ląstelių diferenciacijos ir aktyvacijos žymuo. pSS pacientų kraujo serume nustatyta stipri teigiama koreliacija tarp IgG ir tirpaus CD27 koncentracijų rodo aktyvią B limfocitų diferenciaciją į plazmines ląsteles, bei didelį plazminių ląstelių aktyvumą (Bohnhorst, Bjorgan et al. 2002). Daug dėmesio skiriama IgG poklasių IgG1, IgG2, IgG3 ir IgG4 tyrimams pSS pacientų kraujo

serume. Kaip vienas iš pSS diagnozės atmetimo kriterijų yra padidėjusi IgG4 koncentracija, kuri būdinga taip vadinamai su IgG4 susijusiai ligai (būdinga įvairių organų, audinių, ir ypač kasos, ašarų ir seilių liaukų infiltracija IgG4+ plazminėmis ląstelėmis) (Liu and Li 2011; Shiboski, Shiboski et al. 2012). Liu ir kt. ištyrę IgG poklasių koncentracijas pSS pacientų kraujo serumuose, nustatė žymiai didesnes IgG1, IgG2, IgG3 koncentracijas pSS pacientų serumuose lyginant su sveikų pacientų rezultatais, o taip pat rado teigiamą ryšį tarp IgG3 koncentracijos ir ligos trukmės. Pacientų turinčių anti-SSA/Ro ir anti-SSB/La autoantikūnus, IgG1 koncentracijos buvo žymiai didesnės. IgG4 koncentracija pSS pacientų serume buvo sumažėjusi lyginant su sveikų pacientų rezultatais (Liu and Li 2011).

2.5.4. B ląstelių aktyvavimo faktorius

Potencialus SS limfomagenezės veiksnys yra TNF šeimai priklausantis B ląstelių aktyvuojantis faktorius (BAFF), sukeliantis B-limfocitų proliferaciją, diferenciaciją ir tolerantiškumo saviems antigenams netekimą (išgyvenant autoreaktyviems klonams) (Daridon, Youinou et al. 2008). Šio faktoriaus kiekis organizme labai išauga sergant kai kuriomis autoimuninėmis ligomis, sisteminė raudonąja vilklige ar reumatoidiniu artritu, taip pat ir SS (Groom, Kalled et al. 2002). Padidėjusi BAFF ekspresija nustatyta SS seilių liaukose, ypač liaukų epitelinėse ląstelėse ir liaukas infiltruojančiuose T limfocituose (Lavie, Miceli-Richard et al. 2004). BAFF lygis serume koreliuoja su mažųjų seilių liaukų infiltratų židinių kiekiu (focus score – infiltrato židinių (turinčių bent 50 uždegiminių ląstelių 4 mm² liaukos pjūvyje) skaičius) (Jonsson, Szodoray et al. 2005) ir su gemalinių centrų formavimusi (Szodoray, Alex et al. 2005). Tyrimai parodė, kad BAFF atlieka labai svarbų vaidmenį vėžinių B ląstelių išgyvenime (Novak, Grote et al. 2004). Seilių liaukose limfocitai labiau atsparūs apoptozei ir tai yra susiję su padidėjusia apoptozę reguliuojančio baltymo bcl-2 ekspresija (Ohlsson, Szodoray et al. 2002), kurią ir indukuoja BAFF (Do, Hatada et al. 2000; Zhou, Tiemann et al. 2013). Quartuccio ir kt., nagrinėdami SS ir limfomos atvejus nustatė, kad serumo BAFF lygis

koreliuoja su terapiniu atsaku į rituximabą ir prednizoloną (Quartuccio, Fabris et al. 2008). Visi šie tyrimai patvirtina, kad BAFF gali būti panaudotas terapiniais tikslais kaip taikinyš arba kaip prognostinis veiksnys (Corneec, Avouac et al. 2009; Moreno 2009). BAFF koncentracija tiesiogiai priklauso nuo absoliutaus B ląstelių kiekio (Sellam, Miceli-Richard et al. 2007) (Lavie, Miceli-Richard et al. 2007), taip pat subrendusių B ląstelių kiekio kurios gamina didžiulius kiekius BAFF (Pollard, Abdulahad et al. 2013).

2.5.5. Interleukinas 27

IL-27 yra palyginti “naujas” interleukinas, juo susidomėta dėl jo imunoreguliacinių savybių. IL-27 yra vienas iš IL-12 superšeimai priklausančių interleukinų, kurie dėl savo pleotropinio veikimo svarbūs Th limfocitų vystymuisi/diferenciacijai ir funkcijoms (Hunter 2005). IL-27 yra heterodimeras sudarytas iš p28 ir Epstein-Barr viruso indukuojamo geno koduojamo glikoproteino (EBI3) p40 subvieneto, kuris įeina ir į IL-12 sudėtį. Signalo perdavimas vyksta per receptorių, sudarytą iš WSX-1/TCCR ir glikoproteino 130 (Pflanz, Timans et al. 2002; Pflanz, Hibbert et al. 2004). Po pirmųjų IL-27 funkcinių tyrimų manyta, kad antigeną pateikiančių ląstelių produkuojamas IL-27, kaip uždegimą skatinanti molekulė, palaiko Th1 imuninio atsako formavimąsi. Naiviuose T limfocituose IL-27 aktyvuoja STAT1, dėl to didėja T-box ir IL-12R β 2 ekspresija, padidinanti šių limfocitų jautrumą IL-12 (Hibbert, Pflanz et al. 2003; Lucas, Ghilardi et al. 2003; Takeda, Hamano et al. 2003). Vėlesni IL-27 tyrimai atskleidė jo galimybes kontroliuoti uždegimą, apsaugant organizmą nuo pažeidimų, galinčių atsirasti dėl per didelio T ląstelių aktyvumo (Hamano, Himeno et al. 2003; Villarino, Hibbert et al. 2003). IL-27 gali reguliuoti T_{reg} limfocitų populiacijos gausumą, supresuodamas IL-2 gamybą. Šio citokino trūkumas slopina naujų T_{reg} diferenciaciją ir T_{reg} limfocitų populiacijos atstatymą. T_{reg} populiacijos sumažėjimas gali įtakoti netinkamą imuninio atsako kontrolę (Wojno, Hosken et al. 2011).

Literatūroje aprašomi IL-27 funkciniai tyrimai imuninio atsako reguliavime atskleidžia jo pleotropines savybes. Vienų autorių tyrimai rodo, kad IL-27 veikia naivių T limfocitų proliferaciją ir inicijuoja Th1 tipo imuninio atsako formavimąsi, skatinant naivių T limfocitų vartimą Th1 limfocitais ir slopinant diferenciaciją į Th2 ir Th17 limfocitus (Chen, Ghilardi et al. 2000; Pflanz, Timans et al. 2002). Kitų autorių darbai rodo, kad IL-27 slopina efektorinių ir atminties T limfocitų citokinų sekreciją, kas leistų manyti, kad IL-27 turi ir priešuždegiminį poveikį (Artis, Johnson et al. 2004; Batten, Li et al. 2006). Reumatoidinio artrito pelių modelyje buvo nustatytas ryšys tarp IL-17 ir IL-27. Didėjant IL-17 ekspresijai didėja ir IL-27 ekspresija, o tai rodo autoreguliacinio mechanizmo ryšį tarp šių interleukinų (Baek, Lee et al. 2012). Dvejo IL-27 veikimą autoimuninių ligų modeliuose rodo ir kitų autorių darbai. IL-27 neutralizavimas antikūnais sušvelnino uždegimą sukkelto artrito modelyje (Goldberg, Wildbaum et al. 2004). Autoimuninio encefalomielito modelyje, t.y. IL-27R nokautinėms pelėms pasireiškė sunkesnio laipsnio uždegimas (Batten, Li et al. 2006; Stumhofer, Laurence et al. 2006). Kaip parodė Lee ir kt. tyrimas Sjögreno sindromo pelių modelyje, pelėms, intraveniškai gavusioms viruso vektorius, ekspresuojančius IL-27, pasireiškė ilgalaikis IL-27 lygio padidėjimas serume, kuris sąlygojo sušvelnėjusią ligos eigą (sumažėjo IL-17 kiekis serume, sumažėjo anti-branduolinių antikūnų titrai, sušvelnėjo klinikiniai požymiai susiję su seilių sekreto išsiskyrimu) (Lee, Carcamo et al. 2012). Padidėję IL-27 kiekiai randami ir sergančiųjų sisteminė skleroze pacientų serume (Yoshizaki, Yanaba et al. 2011). Autoimuninio diabeto pelių modelyje, IL-27 atskleidė savo patogeninį vaidmenį aktyvindamas uždegiminių citokinų sintezę ir supresuodamas priešuždegiminių citokinų ekspresiją (Wang, Han et al. 2008). IL-27 turi svarbią reikšmę ne tik T, bet ir B limfocitų veiklos reguliacijos mechanizmuose. Jis skatina anti-Ig ir anti-CD40 antikūnais aktyvuotų B limfocitų ir gemalinių centrų B limfocitų proliferaciją (Larousserie, Charlot et al. 2006). Šis citokinas sukelia plazminių ląstelių ir plazmoblastų chemotaksį į uždegimo vietas, o šių ląstelių veikla

pritraukia aktyvuotus T, T atminties limfocitus ir NK ląsteles (Cocco, Morandi et al. 2011).

2.5.6. Interleukinas 35

IL-35 taip pat palyginti “naujas” interleukinas. Juo, kaip ir IL-27, susidomėta dėl jo imunoreguliacinių savybių. IL-35 savo sandara labai panašus į IL-27. Taip pat IL-12 superšeimai priklausantis heterodimeras sudarytas iš p35 ir EBI3 subvienetų (Collison, Workman et al. 2007). IL-35 signalo perdavimas vyksta per heterodimerinę receptorių sudarytą iš IL-12Rβ2 ir glikoproteino 130 arba homodimerinius šių grandinių darinius (Collison, Delgoffe et al. 2012). Šį interleukiną išskirtinai gamina tik T_{reg} limfocitai, T efektoriniai limfocitai jo neekspresuoja (Collison, Workman et al. 2007). IL-35 skatina naivių T limfocitų vartimą į IL-35 produkuojančius indukuotus T_{reg} limfocitus (iT_{reg}35) (Collison, Delgoffe et al. 2012). IL-35 gali indukuoti Th1 tipo imuninį atsaką esant ūmiai infekcijai, arba selektyviai supresuoti efektorines ląsteles tokias kaip Th17 limfocitus esant aktyviai uždegimo stadijai indukuojant T_{reg} limfocitus. Tai vienas iš mechanizmų apsaugantis nuo autoimuninio atsako išsivystymo (Niedbala, Wei et al. 2007). Autoimuninio diabeto pelių modelyje IL-35 raiškos sukėlimas kasos β-ląstelėse, davė teigiamų rezultatų, sumažėjo kasos infiltracija CD4⁺ ir CD8⁺ ląstelėmis (Bettini, Castellaw et al. 2012). Thiolat su kolegomis, tirdami IL-35 poveikį reumatinio artrito pelių modelyje, parodė, kad IL-35 indukavo T_{reg} limfocitų aktyvaciją, padidindamas CD39 ekspresiją Treg limfocituose, tačiau kartu padidėjusi CD62L ekspresija sutrukdė T_{reg} limfocitams migruoti į uždegimo židinius iš antrinių limfinių organų ir atlikti savo imunosupresines funkcijas (Thiolat, Boissier et al. 2012).

Atsižvelgiant į tai, kad IL-35 pagrinde sekretuoja T_{reg} ląstelės, ir tik nedidelį jo kiekį sekretuoja kitos reguliacinės savybėmis pasižyminčios ląstelių populiacijos, daroma prielaida, kad IL-35 poveikis yra labiau imunosupresinis nei imunostimuliacinis ar uždegiminis (Collison, Workman et al. 2007).

3. METODAI

3.1 Tiriamieji pacientai

Tyrimams atlikti buvo gautas Vilniaus regioninio biomedicininų tyrimų etikos komiteto leidimas (Nr. 158200-03-299-73) (žr. priedą). Pacientų atranką ir klinikinį simptomų įvertinimą atliko Valstybinio mokslinių tyrimų instituto Inovatyvios medicinos centro vyresnioji mokslo darbuotoja dr. Diana Mieliauskaitė. Seilių liaukų imunohistologinius tyrimus atliko prof. habil. dr. Zygmunt Mackevič. Atrenkant tiriamuosius ir sudarant tiriamąsias grupes buvo remtasi Amerikos-Europos bendro sutarimo Sjögreno sindromo klasifikacijos kriterijais (Vitali, Bombardieri et al. 2002), kurie pateikti disertacijos priede. Sudarant tiriamųjų grupes buvo naudoti šie SS kriterijai:

1. Subjektyvių akių ir burnos sausumo požymių išaiškinimas.
2. Širmerio I testas.
3. Nestimuluota pilna sialometrija.
4. Mažųjų seilių liaukų biopsijų atlikimas bei histologinis biopsinės medžiagos ištyrimas.
5. Antikūnų prieš Ro/SSA ir La/SSB tyrimas kraujo serume imunofermentiniu metodu.

Į tyrimą neįtraukti asmenys, kuriems buvo taikytas galvos ir/arba kaklo radiologinis gydymas praeityje, sergantys hepatitu C, AIDS, limfoma; sarkoidoze, po organų persodinimo, bei vartojantys anticholinerginius vaistus.

Tyrimai buvo atliekami etapais. Kiekvieno etapo tyrimuose pacientai buvo suskirstyti į grupes, kurių dydis ir sudėtis skiriasi. Didžioji dalis pacientų II, III ir IV etapų tyrimuose buvo tie patys (Lentelė 3.1.). Tiriamųjų charakteristikos pateiktos lentelėje 3.2.

Lentelė 3.1. Darbo etapai, atlikti tyrimai ir tiriamųjų grupės.

Darbo etapai	Tyrimai	Tiriamųjų grupės		
		I	IL-27 ir IL-35	pSS*, n=50
II	Th fenotipavimas	pSS*, n=37	Kontrolė††, n=26	
III	Limfocitų populiacijų kiekybinė analizė	1pSS**, n=30	2pSS***, n=23	Kontrolė††, n=32
IV	BAFF, LLG, C4d	1pSS**, n=35	2pSS***, n=23	Kontrolė††, n=19
	IgG	1pSS**, n=29	2pSS***, n=21	Kontrolė††, n=24

* pirminių SS sergantys pacientai (bendra liaukinės raiškos ir ekstraliaukinės raiškos pacientų grupė);

** su liaukine raiška pirminių SS sergančių pacientų grupė;

*** su ekstra-liaukine raiška pirminių SS sergančių pacientų grupė;

† pacientai, kuriems nustatytas sausų akių ir burnos sindromas, nesusijęs su autoimuninėmis ligomis;

†† asmenys su padidėjusiu kraujo spaudimu arba pacientai, kuriems nustatytas sausų akių ir burnos sindromas, nesusijęs su autoimuninėmis ligomis.

Lentelė 3.2. I, II, III ir IV etapų tiriamųjų charakteristikos.

Etapai	Požymiai	pSS grupė		Kontrolinė grupė
I	Pacientų skaičius grupėse	(n = 50)		grupė (n = 50)
	Amžius, vidurkis (SN)	51,2 (11,9)		56,0 (10,3)
	Teigiami sausų akių simptomai, n (proc.)	50 (100)		42(84)
	Teigiami burnos simptomai, n (proc.)	50 (100)		48 (96)
	Širmerio I testas, ≤ 5 mm/ 5 min., n (proc.)	50 (100)		50 (100)
	Širmerio I testas, mm/5 min., vidurkis (SN)	1,9 (0,9)		3,7 (1,4)
	Nestimuluota pilna sialometrija, ≤ 1.5 ml/ 15 min., n (proc.)	50 (100)		50 (100)
	Nestimuluota pilna sialometrija, ml/15min. vidurkis (SN)	0,51 (0,35)		1,0 (0,27)
	Histopatologija, <i>focus score</i> ≥ 1, n (proc.)	50 (100)		0 (0)
	Anti-Ro/SSA, n (proc.)	40 (80)		0 (0)
	Anti-La/SSB, n (proc.)	2 (4)		0 (0)
	Anti-Ro/SSA ir anti-La/SSB, n (proc.)	2 (4)		0 (0)
II-IV		1pSS grupė	2pSS grupė	Kontrolinė grupė
	Pacientų skaičius grupėse	n=35	n=23	n=32
	Amžius, vidurkis (SN)	55,2 (10,5)	57,8 (14,6)	50,7 (10,4)
	Teigiami sausų akių simptomai, n (proc.)	35 (100)	23 (100)	22 (68,8)
	Teigiami burnos simptomai, n (proc.)	35 (100)	23 (100)	25 (78,1)
	Širmerio I testas, ≤ 5 mm/ 5 min., n (proc.)	35 (100)	23 (100)	23 (71,9)
	Širmerio I testas, mm/5 min., vidurkis (SN)	2,1 (0,9)	1,5 (1,3)	3,8 (1,8)
	Nestimuluota pilna sialometrija, ≤ 1.5 ml/15 min., n (proc.)	35 (100)	23 (100)	26 (81,3)
	Nestimuluota pilna sialometrija, ml/15min. vidurkis (SN)	0,82(0,13)	0,79(0,17)	1,3 (0,24)
	Histopatologija, <i>focus score</i> ≥ 1, n (proc.)	35 (100)	23 (100)	0 (0)
	Anti-Ro/SSA, n (proc.)	8 (22,8)	10 (43,5)	0 (0)
	Anti-La/SSB, n (proc.)	8 (22,8)	9 (39,1)	0 (0)
Anti-Ro/SSA ir anti-La/SSB, n (proc.)	7 (20)	8 (34,8)	0 (0)	

Viso ištirta 106 pirminiu SS sergantys ir 82 kontroliniai pacientai.

3.2. Periferinio kraujo limfocitų populiacijų fenotipavimas tėkmės citometrijos metodu

3.2.1. Periferinio kraujo mėginių paėmimas ir paruošimas

Tiriamų limfocitų populiacijų paviršinių ir viduląstelinių antigenų (žymenų) analizė buvo atliekama periferinio kraujo mėginiuose. Periferinis veninis kraujas tyrimams buvo imamas iš alkūnės linkio venos į sterilius mėgintuvėlius (vakutainerius) su antikoaguliantu natrio heparinu (Becton Dickinson, Jungtinė Karalystė). Mėgintuvėliai su krauju į laboratoriją buvo pristatomi vertikaliajoje padėtyje, vengiant didesnių temperatūros pokyčių. Kraujo tyrimas buvo atliekamas per 8 val. nuo jo surinkimo, mėginius laikant kambario temperatūroje. Absolūtus leukocitų skaičius kraujyje buvo skaičiuojamas Neubauerio hemocitometru, šie duomenys buvo naudojami limfocitų populiacijų absoliučių skaičių išskaičiavimui iš gautų tėkmės citometrijos duomenų.

CD4⁺ T ląstelių Th1/Th2/Th17 populiacijų fenotipavimui, buvo išskiriami periferinio kraujo limfocitai, panaudojant tankio gradientą Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Švedija). Limfocitai išskirti pagal su reagentais pateiktas rekomendacijas http://www-esbs.u-strasbg.fr/notesdecours/2eme-annee/purification_prot/PDF/18115269AB.pdf. Limfocitai resuspenduojami RPMI 1640 terpėje (Biochrom, Jungtinė Karalystė), kuri yra papildyta 10% fetalinio veršiuko serumo ir 1% glutamino. Limfocitų koncentracija nustatoma Neubauerio hemocitometru, ir ląstelės suspenduojamos terpėje iki 1mln/ml ląstelių.

3.2.2. Periferinio kraujo limfocitų populiacijų fenotipavimas

Kraujo limfocitų populiacijos ir subpopuliacijos įvertintos nestimuliuotuose kraujo mėginiuose identifikuojant paviršinius ląstelių žymenis – CD19, CD3, CD16+56, CD4, CD8, CD25, CD57, CD27, ir viduląstelinių ląstelių žymenį – Foxp3. Viduląstelinio IL-17A žymens įvertinimas atliktas stimuliuotuose kraujo mėginiuose.

3.2.2.1. Nestimuliuotų limfocitų paviršiaus žymenų nustatymas

Paviršiniams ląstelių žymenims identifikuoti taikytas tiesioginio žymėjimo metodas, panaudojant su fluorochromais konjuguotus monokloninius antikūnus. Į mėgintuvėlius su 100 µl tiriamojo periferinio veninio kraujo buvo pilamas atitinkamas kiekis (pagal gamintojo rekomendacijas) monokloninių antikūnų. Naudotos sekančios antikūnų kombinacijos:

1. antiCD19(PerCP) (Exbio, Čekija), antiCD3(FITC) (Exbio, Čekija), antiCD16+56-PE (Exbio, Čekija);

2. antiCD57(FITC) (Becton Dickinson, Jungtinė Karalystė), antiCD27(APC) (Exbio, Čekija), antiCD8(PerCP) (Becton Dickinson, Jungtinė Karalystė);

3. antiCD25(FITC) (Exbio, Čekija), antiCD4(PerCP) (Exbio, Čekija);

Analogiškai paruoštas mėginys su izotipinės kontrolės reagentais (atitinkamais fluorochromais žymėti atitinkamo izotipo imunoglobulinai : IgG1- PerCP, -FITC, -APC , IgG2 -PE, (Becton Dickinson, Jungtinė Karalystė), naudotas kaip neigiama kontrolė.

Visi mėginiai buvo inkubuojami 30 min. kambario temperatūroje tamsoje. Po inkubacijos eritrocitai 15 min. lizuojami Pharm Lyse (Becton Dickinson, Jungtinė Karalystė) tirpalu (4 ml kiekvienam mėginiui) kambario temperatūroje tamsoje, po to mėginiai centrifuguojami (500 x g), supernatantas nupilamas. Nusodintos ląstelės atsargiai sukratomos ir 2 kartus plaunamos (2 ml mėginiui) CellWash (Becton Dickinson, Jungtinė Karalystė) buferiniu tirpalu, atplautos ląstelės suspenduojamos 300µl CellWash (Becton Dickinson, Jungtinė Karalystė) tirpale ir mėginiai analizuojami tėkmės citometru.

3.2.2.2. Nestimuliuotų limfocitų viduląstelinių žymenų nustatymas

Foxp3 žymens nustatymui nestimuliuotuose periferinio kraujo limfocituose naudota viduląstelinių antigenų žymėjimo metodika. Paviršiniai ląstelių žymenys buvo dažomi pagal aukščiau aprašytas procedūras.

Ląstelės su pažymėtais paviršiniais žymenimis fiksuojamos, permeabilizuojamos ir dažomos su anti-Foxp3-PE (Becton Dickinson, Jungtinė Karalystė) monokloniniais antikūnais:

a) į kiekvieną mėgintuvėlį įpilama po 500 μl Cytotfix/Cytoperm (Becton Dickinson, Jungtinė Karalystė) buferinio tirpalo, ir ląstelės inkubuojamos 20 min. kambario temperatūroje tamsoje;

b) ląstelės plaunamos 2 ml Perm/Wash (Becton Dickinson, Jungtinė Karalystė) buferiniu tirpalu, 10 min centrifuguojamos (500 x g), supernatantas nupilamas;

c) į kiekvieną mėgintuvėlį pilama atitinkamas kiekis (pagal gamintojo rekomendacijas) monokloninių antikūnų anti-Foxp3-PE (Becton Dickinson, Jungtinė Karalystė) arba izotipinės kontrolės IgG1-PE (Becton Dickinson, Jungtinė Karalystė). Ląstelės inkubuojamos 30 min. kambario temperatūroje tamsoje;

d) ląstelės 2 kartus plaunamos (po 1 ml permeabilizavimo buferinio tirpalo), centrifuguojamos (500 x g), supernatantas nupilamas, o ląstelės resuspenduojamos 300 μl žymėjimo buferio (FBS) (Becton Dickinson, Jungtinė Karalystė) buferinio tirpalo. Mėginiai analizuojami tėkmės citometru.

3.2.2.3. Periferinio kraujo limfocitų stimuliacija ir viduląstelių žymenų nustatymas

Kiekybinės Th17 limfocitų analizės metu IL-17A žymens nustatymui periferinio kraujo limfocituose, limfocitai stimuliuoti polivalentiniais stimulatoriais ir naudota viduląstelių antigenų žymėjimo metodika.

Polikloninei limfocitų stimuliacijai buvo imama 1,5 ml kraujo mėginio ir atskiedžiama analogišku kiekiu RPMI 1640 terpės (Biochrom, Jungtinė Karalystė). Į mėginį iš dimetilsulfoksido (DMSO) (Sigma, Jungtinės Amerikos Valstijos) ištirpintų polivalentinių stimuliatorių koncentratų buvo įdedama: forbolio 12-miristato-13-acetato (PMA)(koncentratas 5mg/ml) (Sigma, Jungtinės Amerikos Valstijos) galutinė koncentracija 50 ng/ml ir jonomicino (koncentratas 3mM) (Sigma, Jungtinės Amerikos Valstijos) –galutinė

koncentracija 1 µg/ml. Kartu įdedamas baltymų sekrecijos inhibitorius monensinas (koncentratas 2mg/ml) (Becton Dickinson, Jungtinė Karalystė) iki 0,7 µl/ml galutinės koncentracijos mėginyje. Mėgintuvėliai su mėginiais inkubuojami 37⁰C, 5% CO₂ atmosferoje inkubatoriuje (Binder GmbH, Vokietija) 4,5 val. Po inkubacijos kraujas atsargiai supurtomas ir išpilstomas po 200 µl.

Pagal aukščiau aprašytas procedūras dažomi ląstelių paviršiniai žymenys. Žymėjimo buferiu FBS (Becton Dickinson, Jungtinė Karalystė) atplautos ląstelės buvo fiksuojamos, permealizuojamos ir dažomos su anti-IL-17A-APC (Becton Dickinson, Jungtinė Karalystė) monokloniniais antikūnais arba izotipine kontrole IgG1-APC (Becton Dickinson, Jungtinė Karalystė) pagal 3.2.2.2. skyrelyje aprašytas viduląstelinių antigenų žymėjimo procedūras.

CD4⁺ T ląstelių Th1/Th2/Th17 populiacijų fenotipavimui, išskirti periferinio kraujo limfocitai buvo stimuliuojami pagal šiame skyrelyje aukščiau aprašytą metodiką. Po stimuliacijos ląstelės nucentrifuguojamos prie 250 x g 10 min. ir 2 kartus plaunamos 1ml ląstelių žymėjimo buferiu FBS (Becton Dickinson, Jungtinė Karalystė). Limfocitai suspenduojami 1ml FBS (Becton Dickinson, Jungtinė Karalystė) buferio, ir jų koncentracija įvertinama skaičiuojant Neubauer kameroje. Į kiekvieną tėkmės citometro mėgintuvėlį pernešama po 1 mln. stimuliuotų limfocitų. Ląstelės nucentrifuguojamos prie 250 x g 10 min. Supernatantas nupilamas, o nuosėdos gerai sumaišomos likusiame tirpale. Toliau limfocitai suspenduojami 1 ml šalto Cytotfix buferio (Becton Dickinson, Jungtinė Karalystė) ir inkubuojami 10-20 min. kambario temperatūroje. Atsargiai nusiurbiamas supernatantas, paliekant 50-150 µl tirpalo. Ląstelės vėl plaunamos 2 kartus po 1 ml kambario temperatūros FBS (Becton Dickinson, Jungtinė Karalystė) buferiu ir centrifuguojama prie 250 x g 10 min. Pašalinamas FBS ir limfocitai suspenduojami 1 ml 1x Perm/Wash tirpalo (Becton Dickinson, Jungtinė Karalystė). Mėgintuvėliai inkubuojami 15 min., po to centrifuguojama prie 250 x g 10 min., supernatantas nusiurbiamas. Užfiksuoti ir permeabilizuoti limfocitai kruopščiai suspenduojami 50 µl Perm/Wash (Becton Dickinson, Jungtinė Karalystė) buferio.

CD4⁺ T ląstelių Th1/Th2/Th17 populiacijų įvertinimui buvo panaudotas komercinis rinkinys (Becton Dickinson, Jungtinė Karalystė). Rinkinį sudarė žmogaus limfocitų diferenciacijos antigenai CD4⁺ (CD4⁺ paviršinis, membraninis žymuo bendrai T ląstelių populiacijai) specifiniai pelių monokloniniai antikūnai, žymėti PerCP-CY5.5 fluorochromu, ir viduląsteliniais citokinams IFN- γ , IL-17A ir IL-4 specifiniai monokloniniai pelių antikūnai. IFN- γ (identifikuoja Th1 ląsteles) specifiniai pelių monokloniniai antikūnai, žymėti FITC, IL-17A (identifikuoja Th17 ląsteles) specifiniai pelių monokloniniai antikūnai, žymėti PE ir IL-4 (identifikuoja Th2 ląsteles) specifiniai pelių monokloniniai antikūnai, žymėti APC. Nespecifinei fluorescencijai atmesti buvo naudojamas izotipinės kontrolės rinkinys (Becton Dickinson, Jungtinė Karalystė), kurį sudarė monokloniniai antikūnai, žymėti PerCP-Cy5.5, prieš žmogaus limfocitų diferenciacijos žymenį CD4⁺ (klonas SK3), ir izotipinės kontrolės *FITC-Mouse IgG1*, κ (klonas MOPC-21), *PE-Mouse IgG1*, κ (klonas MOPC-21), *APC-Rat IgG1*, κ (klonas R3-34). Į mėgintuvėlius su po stimuliacijos užfiksuotais ir permeabilizuotais limfocitais įdėdama 20 μ l specifinių antikūnų mišinio arba izotipinės kontrolės. Mėginiai gerai supurtomi ir inkubuojami 30 min. tamsoje kambario temperatūroje. Ląstelės 2 kartus atplaunamos (1ml mėginiui) 1x Perm/Wash buferiu (Becton Dickinson, Jungtinė Karalystė), centrifuguojant prie 250 x g 10 min. Po to, limfocitai vėl suspenduojami FBS buferyje (Becton Dickinson, Jungtinė Karalystė) ir analizuojami tėkmės citometru.

3.2.3. Citometrijos duomenų analizė

Kraujo limfocitų populiacijų ir subpopuliacijų tyrimas atliktas keturių spalvų tėkmės citometru FACSCalibur (Becton Dickinson, Jungtinės Amerikos Valstijos). Analizei iš kiekvieno mėginio buvo renkama po 100 000 ląstelių ir duomenys buvo apdorojami naudojantis CELLQuest programa (Becton Dickinson, Jungtinės Amerikos Valstijos). Bendroji limfocitų populiacija taškinėse diagramose buvo išskiriama pagal morfologines ląstelių savybes atspindinčius tiesinės (FSC) ir šoninės (SSC) šviesos sklaidos parametrus.

3.4. Imunofermentinis tyrimo metodas

3.4.1. Tyrime naudoti rinkiniai

ELISA rinkinys, skirtas aktyvuoto komplekto komponento C4 fragmento C4d kiekybiniam nustatymui žmogaus kraujo serume (*MicroVue C4d fragment EIA kit, Quidel Corporation, JAV*).

Rinkinį sudaro 96 duobučių plokštelė, padengta pelių monokloniniais antikūnais prieš žmogaus komplekto C4 fragmentą C4d. Konjugatas (oškų antikūnai prieš žmogaus C4d) žymėtas krienų peroksidaze (HRP). Rinkinys tinkamas matuoti C4d fragmentus žmogaus kraujo serume ir plazmoje (EDTA) bei kituose kūno skysčiuose. Rinkinyje yra 2 kontrolės (aukštos ir žemos koncentracijų) ir 5 standartai, kurių koncentracijų ribos nuo 0,254 µg/ml iki 0,028 µg/ml. Rinkinio jautrumas, t.y. nustatymo riba (LOD) - 0,001 µg/ml. Rezultatų įvertinimo kriterijai, nurodomi rinkinyje: sveikų žmonių serume nustatoma 1,2 – 8,0 µg/ml C4d fragmento (vidurkis 4,6 µg/ml).

ELISA rinkinys, skirtas kiekybiškai nustatyti laisvas lengvas kappa ir lambda žmogaus imunoglobulinų grandis (*Human Immunoglobulin Free Light Chains Kappa and Lambda ELISA kit, BioVendor-Laboratori medicina a.s., Čekijos Respublika*).

Rinkinį sudaro dvi 96 duobučių plokštelės. Viena plokštelė padengta monokloniniais antikūnais prieš žmogaus laisvas lengvas κ grandines, kita prieš laisvas lengvas λ grandines. Antriniai antikūnai prieš atitinkamas laisvas lengvas grandines žymėti biotinu, o konjugatas – streptavidinas-HRP. Rinkinys skirtas matuoti laisvas lengvas grandines žmogaus kraujo serume ir plazmoje (EDTA, citratas, heparinas). Rinkinyje yra po 2 kontroles (abiem grandinėm atskiros - aukštos ir žemos koncentracijų) ir standartai (abiem grandinėm atskiri): κ – nuo 320 µg/l iki 10 µg/l, λ - nuo 560 µg/l iki 17,5 µg/l. Rinkinio jautrumas (LOD) κ grandinei - 6 µg/l, λ grandinei - 5 µg/l. Rezultatų įvertinimo kriterijai, nurodomi rinkinyje:

Laisvų κ grandinių normos ribos - $11,5 \pm 6,72$ mg/l (vidurkis $\pm 2 \times \text{SN}$);

Laisvų λ grandinių normos ribos - $17,39 \pm 13,68$ mg/l (vidurkis $\pm 2 \times \text{SN}$);

κ/λ santykis - $0,707 \pm 0,466$ (vidurkis $\pm 2 \times \text{SN}$).

ELISA rinkinys, skirtas BAFF (B ląsteles aktyvuojančio faktoriaus) kiekybiniam nustatymui žmogaus kraujo serume (BAFF, Soluble (human) ELISA Kit (hypersensitive), AdipoGen, Šveicarija).

Rinkinį sudaro 96 duobučių plokštelė, padengta monokloniniais antikūnais prieš žmogaus tirpų BAFF. Konjugatas - monokloniniai antikūnai prieš žmogaus BAFF, žymėti biotinu ir streptavidino-HRP tirpalas. Rinkinys tinkamas matuoti tirpų BAFF žmogaus kraujo serume. Rinkinyje yra rekombinantinis BAFF standartas, kuris ištitruojamas nuo 1000 pg/ml iki 15,6 pg/ml. Rinkinio jautrumas (LOD) - 8 pg/ml. Rezultatų įvertinimo kriterijai, nurodomi rinkinyje: sveikų žmonių serume nustatoma nuo 500 pg/ml iki >5000 pg/ml BAFF.

ELISA rinkinys, skirtas IgG (Imunoglobulino G) kiekybiniam nustatymui žmogaus kraujo serume (ELISA Kit for Human Immunoglobulin G, Wuhan EIAab Science Co.,Ltd.,Kinija)

Rinkinį sudaro 96 duobučių plokštelė, padengta monokloniniais antikūnais prieš žmogaus IgG. Antriniai antikūnai prieš žmogaus IgG žymėti biotinu, o konjugatas – avidinas-HRP. Rinkinys tinkamas matuoti IgG koncentraciją žmogaus kraujo serume, plazmoje, šlapime, audinių homogenatuose, ląstelių kultūrų supernatantuose ir kituose biologiniuose skysčiuose. Rinkinyje yra standartai, kurių koncentracijų ribos nuo 10 ng/ml iki 0,15 ng/ml. Rinkinio jautrumas (LOD) – 0,039 ng/ml. Rezultatų įvertinimo kriterijai: sveikų žmonių serume nustatoma nuo 4 mg/ml iki 16 mg/ml IgG.

ELISA rinkiniai interleukinų -27 ir -35 kiekybiniam nustatymui žmogaus kraujo serume (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For Interleukin 35 (IL35) ir Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For Interleukin 27 (IL27)*), *Uscn Life Science Inc. Wuhan, Kinija*)

Rinkinį sudaro 96 duobučių plokštelė, padengta antikūnais prieš žmogaus IL-27 arba IL-35. Antriniai antikūnai prieš atitinkamą interleukiną žymėti biotinu, o konjugatas – avidinas-HRP. Šie ELISA rinkiniai skirti kiekybiniam žmogaus IL-27 ir IL-35 matavimui *in vitro* serume, plazmoje ir kituose biologiniuose skysčiuose. ELISA rinkinio žmogaus IL-27 nustatymo ribos yra 15,6 – 1 000 pg/ml. Minimali šiuo rinkiniu nustatoma žmogaus IL-27 koncentracija yra mažiau nei 6,1 pg/ml. ELISA rinkinio žmogaus IL-35 nustatymo ribos yra 25 – 1 600 pg/ml. Mažiausia šiuo rinkiniu aptinkama žmogaus IL-35 koncentracija yra mažiau nei 8,9 pg/ml.

ELISA rinkiniai autoantikūnų SSA/Ro ir SSB/La nustatymui žmogaus kraujo serume (*ANTI-SSA (Ro) ANTIBODIES Enzyme immunoassay ir ANTI-SSB (La) ANTIBODIES Enzyme immunoassay, BioSystems S.A., Ispanija*)

Rinkinį sudaro 96 duobučių plokštelė, padengta arba SSA/Ro arba SSB/La antigenu. Konjugatas – žmogaus IgG specifiniai imunoglobulinai, žymėti HRP. Šie ELISA rinkiniai skirti kiekybiniam ir kokybiniam anti-SSA ir anti-SSB antikūnų nustatymui žmogaus kraujo serume ir plazmoje. Rinkinyje yra po 2 kontroles (aukštos ir žemos koncentracijų) ir 5 standartai, kurių koncentracijų ribos nuo 100 V/ml iki 6,25 V/ml. Nustatymo riba: 0,5 V/ml. Rezultatų įvertinimo kriterijai, nurodomi rinkinyje: teigiami mėginiai, kuriuose koncentracija viršija 12,5 V/ml arba absorbcijos santykis didesnis nei 1,0; neigiami mėginiai, kuriuose koncentracija žemesnė nei 7,5; įtartini mėginiai, kuriuose koncentracija yra tarp 7,5 -12,5 V/ml. Autoantikūnų, specifinių SSA/Ro ir SSB/La antigenams nustatymas buvo atliekamas patvirtinant pSS diagnozę pacientų atrankos metu.

3.4.2. Serumo paruošimas, imunofermentinė analizė ir rezultatų įvertinimas

Kraujas serumo paruošimui buvo renkamas į mėgintuvėlius be antikoagulantų. Mėgintuvėliai nucentrifuguojami prie 3000 aps./min. 5 min., serumas nusiurbiamas į švarų mikromėgintuvėlį ir užšaldoma prie -80°C. Tyrimo dieną serumo mėginiai atšildomi kambario temperatūroje ir atskiedžiami pagal rinkinių gamintojų rekomendacijas į rinkinių sudėtį įeinančiais mėginių atskiedimo tirpalais arba fosfatinu buferiniu tirpalu, pH 7,4. C4d tyrimui serumai buvo skiedžiami 70 kartų, laisvų lengvų grandinių tyrimui - 200 kartų, BAFF tyrimui - 30 kartų, bendro IgG tyrimui – 10 000 000 kartų, interleukinų-27 ir -35 tyrimui serumai nebuvo skiedžiami, anti-SSA/Ro ir anti-SSB/La – 100 kartų.

Toliau imunofermentinis tyrimas buvo atliekamas griežtai laikantis rinkinių gamintojų nurodymų ir pateiktų rekomendacijų. Trumpai, visi darbai buvo atliekami kambario temperatūroje (18-25°C), plokštelės plaunamos, į duobutes įpilant rinkiniuose pateiktus plovimo buferius (po 350µl). Į kiekvieno rinkinio plokšteles buvo išpilstomi dubliuojant pateikti standartai kiekybiniam tiriamų veiksmų įvertinimui, pateikti kontroliniai tirpalai ir tiriami serumai. Visuose rinkiniuose dvi duobutės buvo naudojamos nespecifinio surišimo įvertinimui, t.y. į jas vietoj serumų pilama tik mėginių skiediklio. Gautų reikšmių vidurkis buvo atimamas iš mėginių reikšmių. Tyrimų rezultatai buvo įvertinami prie 405 nm (C4d)(ABTS substratas, stabdyta oksalo rūgštimi) ir 450 nm (λ , κ , BAFF, IgG, IL-27, IL-35, anti-SSA, anti-SSB)(TMB substratas, stabdyta sieros rūgštimi) bangos ilgio spektrofotometru (BioTek Instruments, JAV). Tiriamų veiksmų koncentracijos buvo apskaičiuojamos iš kiekviename tyrime gautų standartinių kreivių, naudojantis specialia ELISA rezultatų įvertinimo programa Gen5 Microplate Data Collection & Analysis Software (BioTek Instruments, JAV). C4d fragmento koncentracijos išskaičiuotos iš standartinės kreivės, gautos naudojant tiesinę regresiją ($y=mx+b$), lengvų laisvų grandinių, IgG ir anti-SSA, anti-SSB antikūnų koncentracijos - iš standartinių kreivių, gautų naudojant 4-parametrų algoritmą, o BAFF koncentracijos - iš

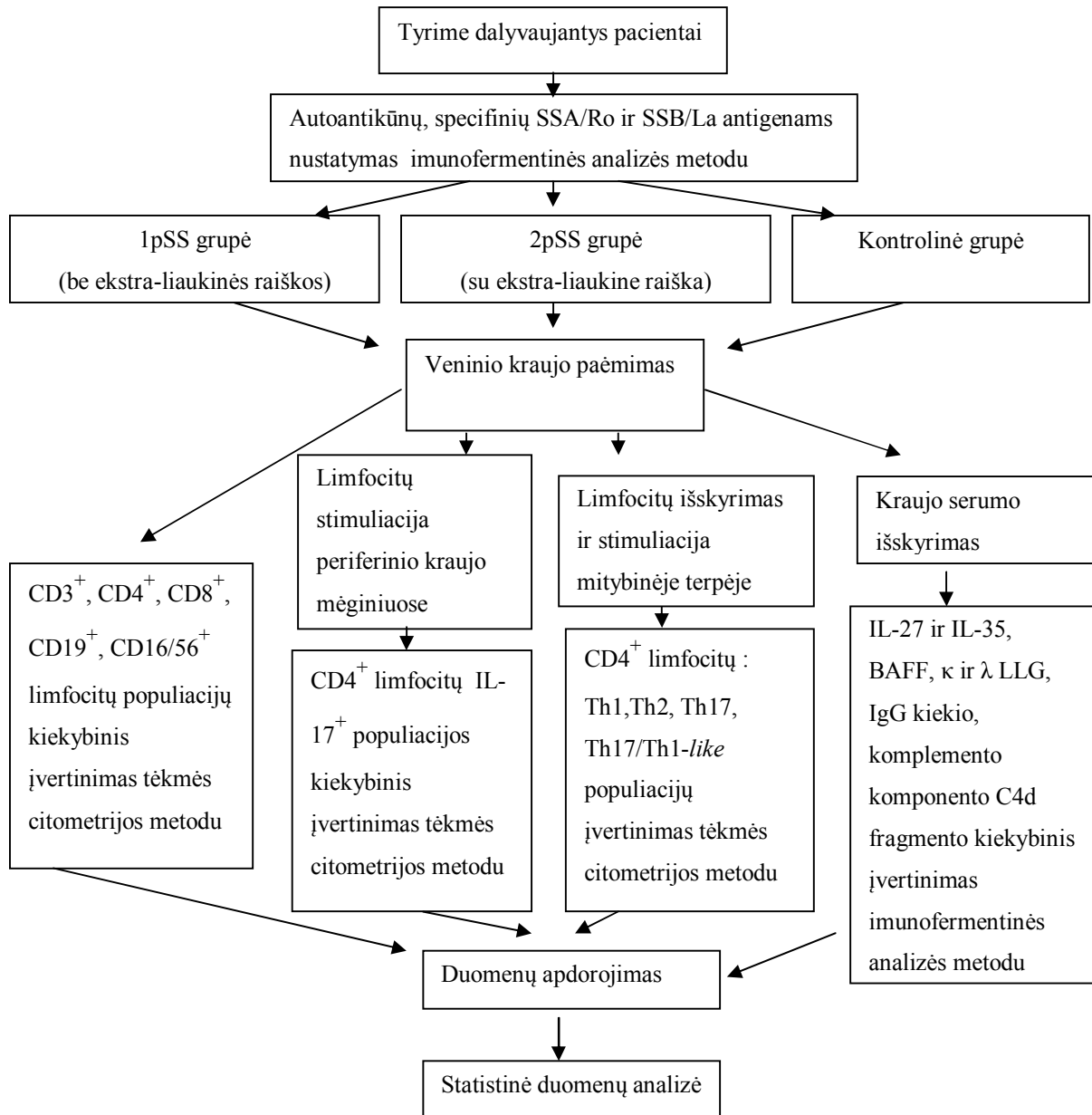
standartinės kreivės, gautos naudojant kvadratinę lygtį, IL-27 ir IL-35 - standartinės kreivės, gautos naudojant log-log algoritmą padauginus iš kiekviename tyrime aukščiau nurodytų mėginių atskiedimų skaičiaus.

3.6. STATISTINĖ DUOMENŲ ANALIZĖ

Statistinė duomenų analizė atlikta standartine statistine programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). Rezultatams vertinti taikytos šios statistinės charakteristikos: vidurkis ir standartinis nuokrypis (SN), mediana. Neparametrinių dydžių ar neatitinkantys normaliojo skirstinio sąlygos vidurkių skirtumai tarp dviejų grupių, buvo palyginti naudojant – Mann-Whitney U testą. Vertinant priklausomybės tarp kintamųjų laipsnį naudotas Spirmeno (angl. *Spearman`s*) ranginės koreliacijos koeficientas (r). Koreliacijos ryšys buvo vertinamas kaip silpnas, jei $r = 0,01-0,29$, vidutinis, jei $r = 0,3-0,69$ ir stiprus, jei $r = 0,7-0,99$. Duomenys buvo laikomi statistiškai reikšmingais, kai $p < 0,05$.

4. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Šiame darbe atliktų tyrimų tikslas – ištirti pacientų, sergančių pirminiu Sjögreno sindromu, imuninės sistemos komponentų kiekybinius ir kokybinius pokyčius bei jų tarpusavio sąsajas periferiniame kraujyje, siekiant įvertinti imuninės sistemos vaidmenį šios ligos patogenezės mechanizmuose. Bendra atliktų tyrimų schema pateikta 4.1. paveiksle.



Pav. 4.1. Pacientų periferinio veninio kraujo tyrimo schema.

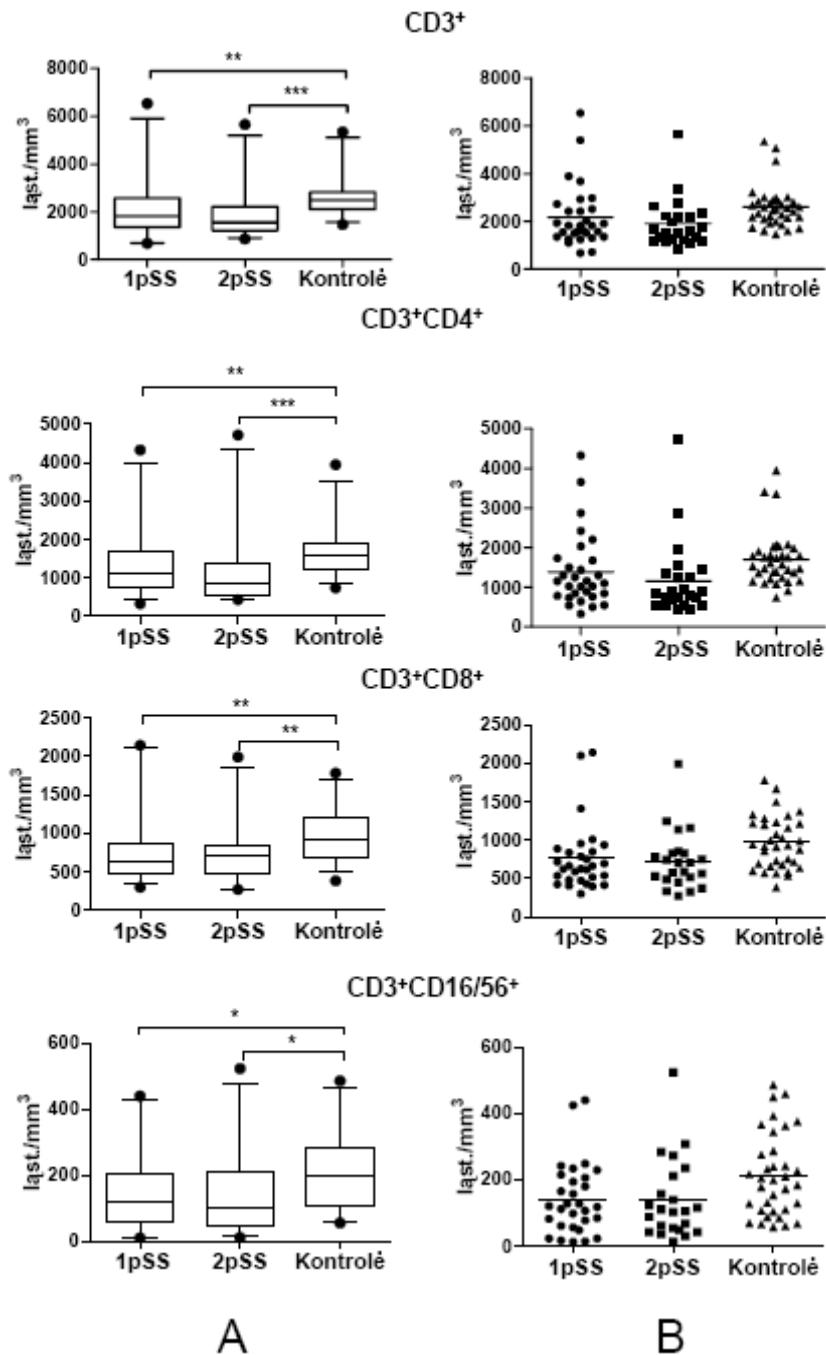
4.1. Limfocitų populiacijų identifikavimas ir kiekybinis įvertinimas

Pirminio Sjögreno sindromo, kaip uždegiminio proceso, patogenezei yra būdinga limfocitų recirkuliacija tarp uždegimo vietų ir periferinio kraujo, limfocitų migracija į uždegimo vietas (Mikulowska-Mennis, Xu et al. 2001), taip pat stebima intensyvesnė periferinio kraujo limfocitų apoptozė, bei sumažėjęs bendras T limfocitų kiekis (Ichikawa, Arimori et al. 1995; Ogawa, Dang et al. 1996; Zeher, Szodoray et al. 1999). Atsižvelgiant į šiuos faktus, savo tyrimuose analizavome įvairių limfocitų populiacijų kiekybinius rodiklius pSS ir kontrolinės grupių pacientų periferinio kraujo mėginiuose.

Nustatant paviršinius ir viduląstelinius limfocitų žymenis buvo įvertinti T, NKT, B, NK ląstelių ir jų atskirų populiacijų kiekybiniai rodikliai tiriamosiose grupėse.

4.1.1. T limfocitų ir jų populiacijų kiekybinė analizė

Atlikta T limfocitų, identifikuojamų pagal paviršinio žymens CD3 ekspresiją, kiekybinė analizė. Įvertintas ne tik bendras CD3⁺ ląstelių kiekis, bet ir pagrindinių T limfocitų populiacijų (CD4⁺ T limfocitų, CD8⁺ T limfocitų, o taip pat NKT ląstelių, turinčių tiek T limfocitų žymenį CD3, tiek NK ląstelių žymenis CD16/CD56) kiekis. Periferinio kraujo mėginiai ištirti 32 kontrolinės grupės tiriamųjų (n=32) ir pacientų, sergančių pirminiu Sjögreno sindromu be ekstra-liaukinės raiškos (1pSS)(n=30) ir su ekstra-liaukine raiška (2pSS)(n=23), (pav. 4.1.1.1.).



Pav. 4.1.1.1. Absoliutus CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD3⁺CD16/CD56⁺ limfocitų skaičius 1 mm³ periferinio kraujo (A - mediana ir 5-95 procentilės; B - rezultatų išsibarstymas ir vidurkis). * - Mann-Whitney U testas.

Įvertinus pacientų periferinio kraujo limfocitus, turinčius bendrą visiems T limfocitams CD3 žymenį, nustatytas statistiškai patikimas absoliutus T limfocitų kiekio sumažėjimas pirminiu Sjögreno sindromu sergančiųjų pacientų be ekstra-liaukinės raiškos ($p_{1pSS-K}=0,0042$) ir su ekstra-liaukine

raiška ($p_{2pSS-K}=0,0004$) grupėse lyginant su kontrolinės grupės tiriamųjų rezultatais. Patikimo skirtumo tarp sergančiųjų pirminiu Sjögreno sindromu 1pSS ir 2pSS grupių nebuvo nustatyta ($p_{1pSS-2pSS}=0,337$). T ląstelių absoliutaus kiekio sumažėjimas pSS pacientų grupėse gali būti susijęs su ląstelių migracija į uždegiminius židinius ir/arba su intensyvesne periferinių T limfocitų apoptoze. Tokias prielaidas daro ir Ichikawa su kolegomis, nustatę limfocitopeniją (ypatingai išreikštą $CD4^+$ limfocitopeniją) bei į apoptozę linkusių Fas+ (Fas molekulę ekspresuojančių) limfocitų procentinės dalies padidėjimą tarp $CD4^+$ ir $CD8^+$ T limfocitų populiacijų pSS pacientų periferiniame kraujyje (Ichikawa, Arimori et al. 1995). Ogawa ir kolegės taip pat nustatė padidėjusią pSS pacientų periferinio kraujo T limfocitų apoptozę *in vitro* po 48 val. kultivavimo. Gautus rezultatus autoriai aiškina padidėjusia apoptozės promotorių bax ir c-myc, bei sumažėjusia apoptozės inhibitorių, tokių kaip bcl-2, raiška pSS pacientų T limfocituose (Ogawa, Dang et al. 1996). Zeher su kolegomis gauti duomenys rodo padidėjusią apoptozės receptoriaus CD95 raišką tarp apoptozę patyrusių pSS pacientų periferinio kraujo T limfocitų. Nustatyta koreliacija tarp CD95 žymens ant $CD4^+$ limfocitų ir šių limfocitų apoptozės intensyvumo (Zeher, Szodoray et al. 1999).

Siekiant išsiaiškinti kurių T limfocitų populiacijų kiekybiniai pokyčiai nulemia pacientų, sergančių pSS, bendro $CD3^+$ T ląstelių kiekio sumažėjimą periferiniame kraujyje, toliau tyrėme $CD4^+$, $CD8^+$ ir NKT limfocitų populiacijas, kadangi manoma, kad šios populiacijos aktyviai dalyvauja pSS patogenezės mechanizmuose (Kojo, Adachi et al. 2001; Szodoray, Papp et al. 2009; Christodoulou, Kapsogeorgou et al. 2010).

Identifikavus T limfocitus turinčius CD4 arba CD8 žymenį, nustatytas statistiškai patikimas absoliutaus $CD4^+$ T limfocitų kiekio sumažėjimas ($p_{1pSS-K}=0,0066$, $p_{2pSS-K}=0,0001$) (pav. 4.1.1.1. C,D) ir absoliutaus $CD8^+$ T limfocitų kiekio sumažėjimas ($p_{1pSS-K}=0,0029$, $p_{2pSS-K}=0,0044$) (pav. 4.1.1.1. E,F) pacientų, sergančių pSS, periferiniame kraujyje lyginant su kontrolinės grupės pacientų rezultatais. Patikimo skirtumo tarp 1pSS ir 2pSS grupių tiriamųjų rezultatų nebuvo nustatyta nei vienoje tirtoje T limfocitų populiacijoje. Tai

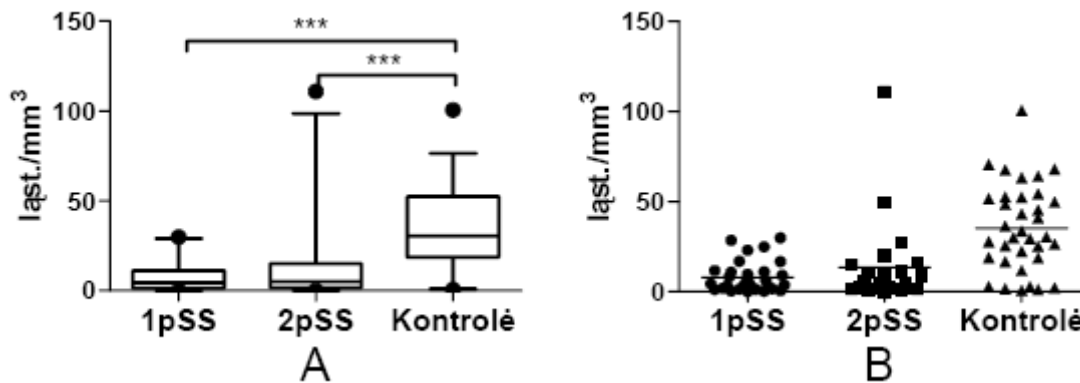
rodo, kad bendros CD3⁺ T limfocitų populiacijos sumažėjimo tendencijai pSS sergančių pacientų periferiniame kraujyje įtakos turi tiek CD4⁺ T, tiek CD8⁺ T limfocitų absoliutaus skaičiaus sumažėjimas. CD4⁺ T limfocitų kiekio sumažėjimą pSS sergančių pacientų periferiniame kraujyje patvirtina ir kitų autorių tyrimų rezultatai (Fox, Carstens et al. 1982; Ichikawa, Arimori et al. 1995; Ogawa, Dang et al. 1996; Zeher, Szodoray et al. 1999; Mandl, Bredberg et al. 2004). Analogišką, kaip ir mūsų tyrimuose, pSS pacientų suskirstymą į dvi grupes pagal liaukinę ir ekstra-liaukinę ligos raišką ir palyginimą su sveikų kontrolinių pacientų rezultatais atliko tik Zeher su kolegomis. Jie nustatė reikšmingą periferinio kraujo CD4⁺ limfocitų kiekio sumažėjimą pacientų su ekstra-liaukiniais požymiais grupėje, tačiau skirtingai nuo mūsų gautų rezultatų, pSS pacientų be ekstra-liaukinių požymių grupėje reikšmingo CD4⁺ limfocitų kiekio sumažėjimo nenustatė. Taip pat, šie autoriai nenustatė ir CD8⁺ limfocitų kiekio sumažėjimo pSS pacientų periferiniame kraujyje (Zeher, Szodoray et al. 1999). Mūsų nustatytas CD8⁺ limfocitų kiekio sumažėjimas pSS pacientų periferiniame kraujyje patvirtina, kad ir CD8⁺ limfocitai dalyvauja Sjögreno sindromo patogeneziniame mechanizme.

NKT limfocitai, taip pat priskiriami CD3⁺ T limfocitams, yra viena iš autoimuninio proceso prevencijos grandžių. Sergant autoimuninėmis reumatinėmis ligomis NKT limfocitų skaičiaus sumažėjimas ir funkcinių savybių susilpnėjimas siejamas su autoimuninio proceso progresavimu ir autoantikūnų gamyba (Kojo, Adachi et al. 2001; Lurati, Bertani et al. 2012). Tiriant šią populiaciją, turinčią CD3 ir CD16/CD56 žymenis, taip pat buvo nustatytas statistiškai reikšmingas ($p_{1pSS-K}=0,0175$, $p_{2pSS-K}=0,0105$) NKT limfocitų kiekio sumažėjimas pSS sergančių pacientų periferiniame kraujyje lyginant su kontrolinės grupės pacientų rezultatais. NKT limfocitų absoliutus skaičius 1pSS ir 2pSS grupėse buvo labai panašus. Mūsų gauti rezultatai, kaip ir Kojo su kolegomis pateikti NKT limfocitų populiacijos sumažėjimo pSS pacientų periferiniame kraujyje duomenys, patvirtina NKT limfocitų dalyvavimą pSS patogenezėje. Šie tyrėjai NKT limfocitų kiekio sumažėjimą nustatė ir kitomis autoimuninėmis ligomis - reumatoidiniu artritu, sisteminė

raudoną vilklige, sisteminę sklerozę sergančių pacientų periferiniame kraujyje (Kojo, Adachi et al. 2001). Priešingus rezultatus gavo Szodoray su kolegomis. Bendroje pSS pacientų grupėje jie nustatė padidėjusią NKT populiacijos kraujyje procentinę dalį skaičiuojant nuo visų limfocitų, tačiau suskirstę pSS pacientus pagal ligos raišką, reikšmingą NKT limfocitų procentinės dalies padidėjimą periferiniame kraujyje nustatė tik pSS pacientams su ekstra-liaukine raiška, lyginant su pSS pacientų be ekstra-liaukinės raiškos ir kontrolinės sveikų pacientų grupės rezultatais. Patikimo skirtumo tarp pSS pacientų be ekstra-liaukinės raiškos ir kontrolinės sveikų pacientų grupės nenustatė (Szodoray, Papp et al. 2009).

4.1.1.1. Th17 ir Treg populiacijų analizė

CD4⁺ T limfocitų, dar vadinamų T ląstelių pagalbininkų (Th), populiacija yra gana heterogeniška. Viena iš CD4⁺ T limfocitų populiacijų yra Th17 limfocitai, gausiai sekretuojantys uždegiminį citokiną IL-17 (dar žinomą kaip IL-17A). Šis citokinas dalyvauja daugelio autoimuninių ligų patogenezėje (Harrington, Hatton et al. 2005; Park, Li et al. 2005). Manoma, kad IL-17 dalyvauja ir pirminio Sjögreno sindromo patogenezėje, kadangi pSS atveju randami padidinti IL-17 kiekiai (Katsifis, Rekka et al. 2009; Mieliauskaite, Dumalakiene et al. 2012). Sakai su kolegomis nustatė, kad sergančių pSS mažųjų seilių liaukų infiltratuose Th17 limfocitų kiekis yra didžiausias lyginant su kitomis Th limfocitų populiacijomis (Sakai, Sugawara et al. 2008). Mūsų darbe buvo įvertinti Th17 limfocitų populiacijos galimi pokyčiai pacientų sergančių pSS periferiniame kraujyje (pav. 4.1.1.1.1.).



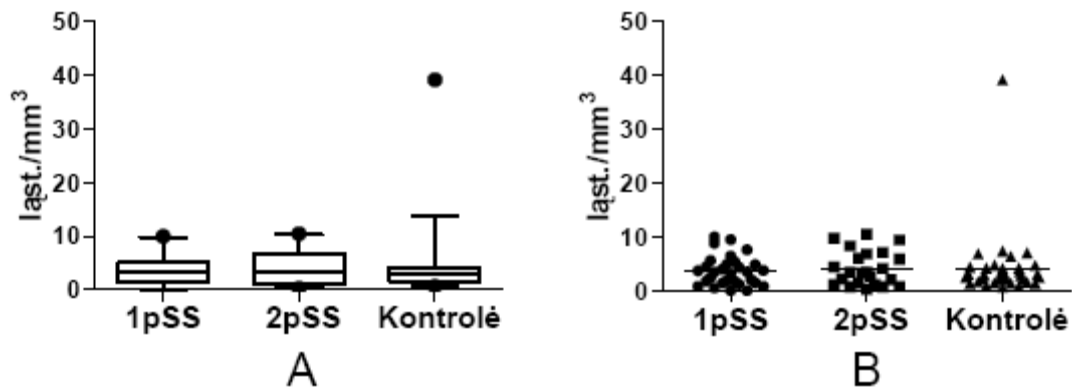
Pav. 4.1.1.1.1. Absoliutus Th17 limfocitų skaičius 1mm³ periferinio kraujo (A – mediana ir 5-95 procentilės; B – rezultatų išsibarstymas ir vidurkis. * - Mann-Whitney U testas.

Nustatytas statistiškai patikimas ($p_{1pSS-K} < 0,0001$, $p_{2pSS-K} < 0,0001$) absoliutus Th17 limfocitų kiekio sumažėjimas pSS sergančiųjų pacientų periferiniame kraujyje lyginant su kontrolinės grupės pacientų rezultatais. Patikimo skirtumo tarp 1pSS ir 2pSS pacientų grupių nebuvo nustatyta. Gauti rezultatai nesutampa su kitų autorių nustatyta IL-17 koncentracijos padidėjimu pSS pacientų kraujo serume (Katsifis, Rekka et al. 2009; Mieliauskaite, Dumalakiene et al. 2012), dėl ko galima buvo tikėtis ir padidėjusio absoliutaus Th17 limfocitų kiekio periferiniame kraujyje. Literatūroje nurodoma, kad IL-17 gamina ne tik Th17 ląstelės, bet ir NKT ir NK ląstelės, CD8 T ląstelės, $\gamma\delta$ T ląstelės ir dar visa eilė kitų kraujo ląstelių, ir tai galimai paaiškina mūsų gautų rezultatų ir kitų tyrėjų duomenų skirtumus (Pandya, Al-Jaderi et al. 2011; Vanaudenaerde, Verleden et al. 2011). Prieštarigus rezultatus taip pat gavo Kang su kolegomis, nustatę Th17 limfocitų procentinės dalies padidėjimą sergančiųjų pSS periferiniame kraujyje (Kang, Kim et al. 2012). Procentinės Th17 dalies tarp Th limfocitų įvertinimas neparodė reikšmingų skirtumų tarp pSS ir kontrolinių tiriamųjų (žr. skyrių 4.2. T helperinių limfocitų populiacijų periferiniame kraujyje nustatymas ir kokybinis įvertinimas), todėl galima būtų daryti prielaidą, kad Th17 limfocitų populiacijos sumažėjimo tendencija susijusi su bendru CD3⁺ ir CD4⁺ T limfocitų absoliutaus skaičiaus

sumažėjimau periferiniame kraujyje. Šiems prieštaravimams paaiškinti reikalingi detalesni ir didesnės apimties šios T limfocitų populiacijos tyrimai.

Daug diskusijų tarp tyrėjų, vertinant skirtingų T limfocitų populiacijų vaidmenį Sjögreno sindromo patogenezėje, sukėlė T reguliaciniai (Treg) limfocitai, identifikuojami pagal CD4 žymenį, intensyvią CD25 žymens raišką ir viduląstelinį Foxp3 žymenį.

Šie limfocitai yra viena iš autoimuninio proceso prevencijos grandžių, dalyvaujančių autoimuninių T limfocitų atsako slopinime (Sarigul, Yazisiz et al. 2010). Savo tyrime įvertinome Treg kiekybinius rodiklius periferiniame tiriamųjų kraujyje (pav. 4.1.1.1.2.).



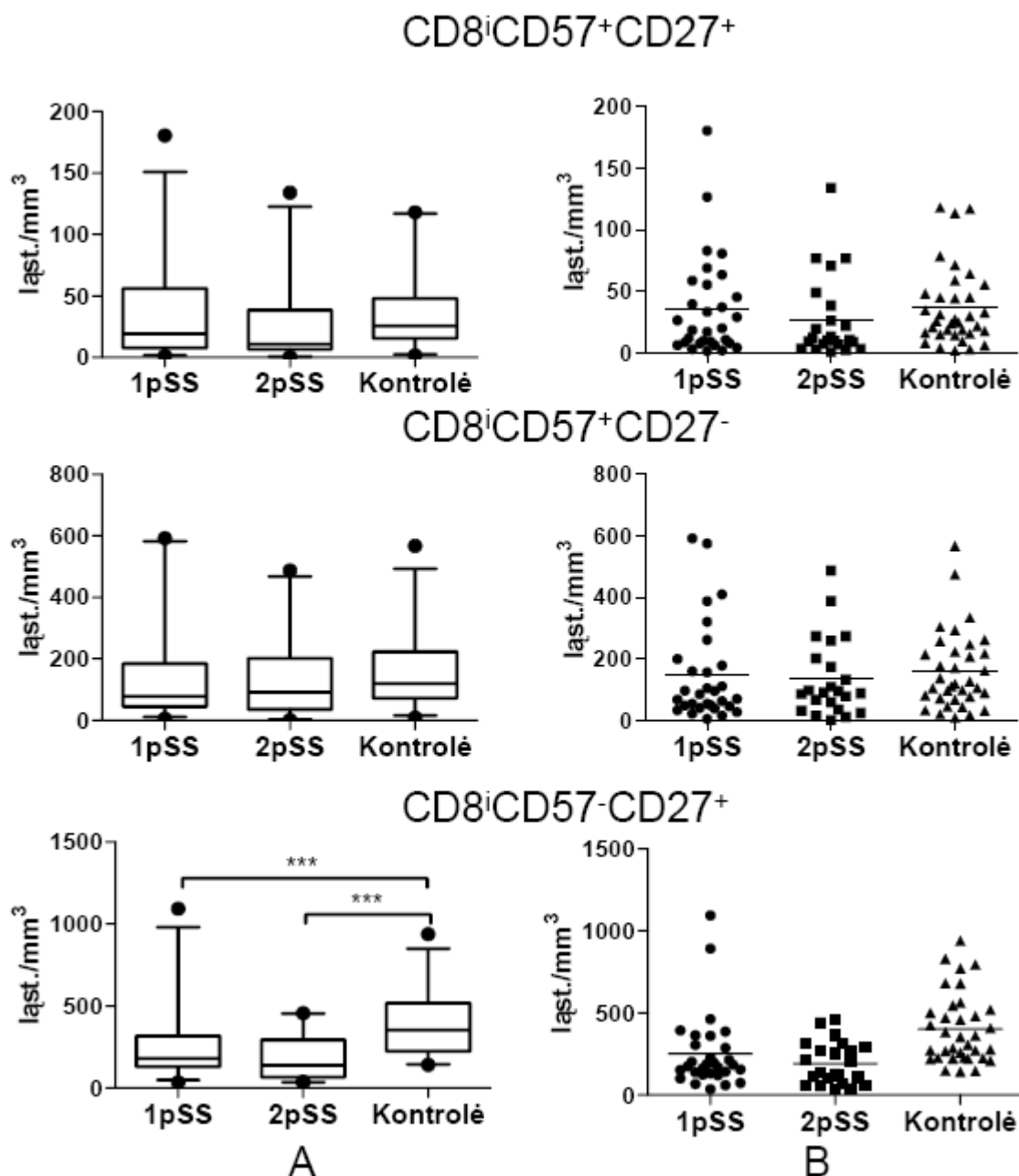
Pav. 4.1.1.1.2. Absoliutus CD4CD25ⁱFoxp3⁺ limfocitų skaičius 1mm³ periferinio kraujo. (A – mediana ir 5-95 procentilės; B – rezultatų išsibarstymas ir vidurkis).

Gauti rezultatai neparodė statistiškai patikimo absoliutaus Treg limfocitų skaičiaus skirtumo nei tarp abiejų pSS grupių ($p_{1pSS-2pSS}=0,7947$), nei tarp atskirų pSS grupių lyginant jas su kontrolinės grupės pacientų rezultatais ($p_{1pSS-K}=0,7273$, $p_{2pSS-K}=0,6335$). Literatūroje aprašomi prieštaringi Treg limfocitų tyrimų rezultatai. Mokslininkai Liu ir Li su savo tyrėjų grupėmis nustatė Treg limfocitų populiacijos sumažėjimą pSS pacientų periferiniame kraujyje, lyginant su sveikų asmenų kontrolinių grupių rezultatais (Li, Li et al. 2007; Liu, Lin et al. 2008), tačiau jie Treg limfocitus identifikavo tik pagal CD4 ir CD25ⁱ (i – intensyvi žymens raiška) žymenį. Mūsų tyrime naudotas

viduląstelinis Foxp3 žymuo padaro tyrimą labiau specifišką Treg limfocitams, kadangi Treg vystymuisi yra būtina FOXP3 geno raiška (Zelenay, Lopes-Carvalho et al. 2005). Kita vertus, Sarigul su kolegomis taip pat nerado $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ limfocitų kiekio periferiniame kraujyje skirtumų lyginant pSS ir kontrolinės sveikų pacientų grupės rezultatus (Sarigul, Yazisiz et al. 2010). Grupių rezultatų panašumą Treg atžvilgiu galimai nulemia įtraukimas į grupes pSS pacientų su skirtingu uždegimo laipsniu seilių liaukose, kas ir sąlygoja rezultatų išsibarstymą grupėse. Tokias prielaidas iš dalies patvirtina Christodoulou ir kolegų tyrimo rezultatai. Atlikę išsamų tyrimą pSS pacientų mažųjų seilių liaukų histologiniuose preparatuose ir periferiniame kraujyje, jie nustatė stipriai neigiamą koreliaciją tarp Treg esančių mažųjų seilių liaukų infiltrate ir periferiniame kraujyje (Christodoulou, Kapsogeorgou et al. 2008; Christodoulou, Kapsogeorgou et al. 2010). Remiantis Christodoulou ir kolegų tyrimo rezultatais, galima paaiškinti skirtingų tyrėjų gautus prieštarigus rezultatus, taip pat šio tyrimo rezultatus, motyvuojant netinkamu/per stambiu pSS grupių suskirstymu, neatsižvelgiant į uždegimo laipsnį organuose taikiniuose.

4.1.1.2. CD8ⁱ T limfocitų, turinčių CD57 ir/arba CD27 žymenis analizė

Įvairių autorių duomenimis svarbų vaidmenį Sjögreno sindromo patogenezėje atlieka ir $CD8^+$ limfocitai. Dalis šių limfocitų su jiems būdingų žymenų CD57 ir/arba CD27 ekspresija, laikomi atminties efektoriniais limfocitais, pasižyminčiais didesne perforinų A ir B, granzimų sinteze. Būtent šie limfocitų sintezės produktai ir dalyvauja seilių liaukų destrukcijos procese (Polihronis, Tapinos et al. 1998). $CD8^+$ atminties limfocitams senėjant (pasiekiant vėlesnę diferenciacijos stadiją), didėja CD57 žymens raiška ir jie gamina didesnius kiekius perforinų A ir B, granzimų, nei jaunesnės, CD27 žymenį turinčios ir didesniu proliferacijos potencialu pasižyminčios ląstelės (Tsuda, Ambrosini et al. 2011). Savo tyrime atlikome $CD8^i$ atminties limfocitų populiacijų, turinčių CD57 ir/arba CD27 žymenis, kiekybinį įvertinimą tiriamųjų periferiniame kraujyje (pav. 4.1.1.2.1.).



Pav. 4.1.1.2.1. Absoliutus $CD8^i57^+27^+$, $CD8^i57^+27^-$ ir $CD8^i57^-CD27^+$ limfocitų skaičius $1mm^3$ periferinio kraujo (A – mediana ir 5-95 procentilės; B – rezultatų išsibarstymas ir vidurkis). * - Mann-Whitney U testas.

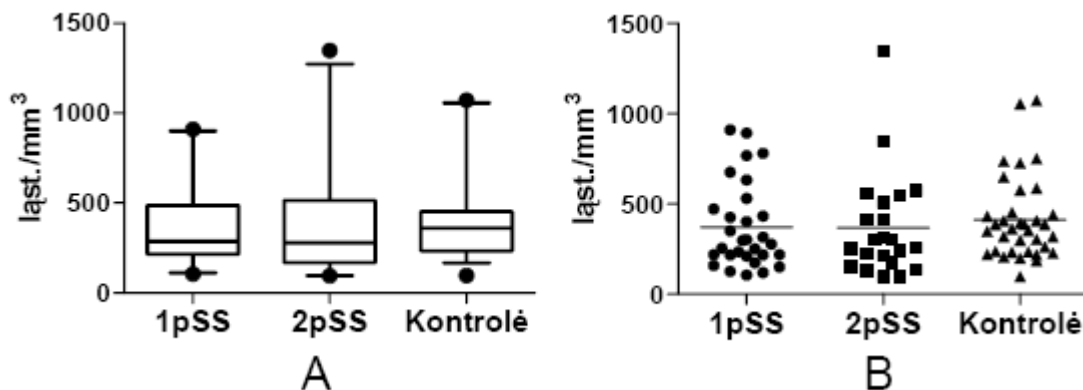
Absoliutus $CD8^iCD57^+CD27^-$ limfocitų skaičius periferiniame kraujyje tarp grupių nesiskyrė ($p_{1pSS-K}=0,2137$, $p_{2pSS-K}=0,2798$, $p_{1pSS-2pSS}=0,9071$) (pav. 4.1.1.2.1.). Nors žinoma, kad sergančių pSS limfocitai patiria pastovią antigeninę stimuliaciją, todėl galima buvo tikėtis, kad šių limfocitų kiekis gali būti išaugęs. Su lėtine antigenine stimuliacija yra susijęs $CD8^i$ T limfocitų,

ekspresuojančių CD57⁺ žymenį, populiacijos atsiradimas (Mollet, Sadat-Sowti et al. 1998; Arosa 2002; Tsukishiro, Donnenberg et al. 2003; Abedin, Michel et al. 2005; Vallejo 2005; Le Priol, Puthier et al. 2006; Lazuardi, Herndler-Brandstetter et al. 2009; Weng, Akbar et al. 2009; Focosi, Bestagno et al. 2010). Analizuojant CD8ⁱ limfocitus nepasiekusius galutinės diferenciacijos stadijos ir turinčius tiek CD57, tiek CD27 paviršines molekules, pastebėta CD8ⁱCD57⁺CD27⁺ limfocitų kiekio sumažėjimo tendencija 2pSS grupėje ($p_{2pSS-K}=0,0506$) (pav. 4.1.1.2.1.). Skirtumų lyginant 1pSS grupės rezultatus su kontrolinės ir 2pSS grupės rezultatais nenustatyta ($p_{1pSS-K}=0,426$, $p_{1pSS-2pSS}=0,404$). CD8ⁱ limfocitų populiacijų analizė parodė, jog tik ankstyvos diferenciacijos stadijos T limfocitų CD8ⁱCD57⁺CD27⁺ statistiškai reikšmingas ($p_{1pSS-K}=0,0002$, $p_{2pSS-K}<0,0001$) sumažėjimas stebimas pSS sergančių pacientų periferiniame kraujyje lyginant su kontrolinės grupės pacientais (pav. 4.1.1.2.1.). Skirtumo tarp 1pSS ir 2pSS grupių rezultatų ir šioje limfocitų populiacijoje nenustatyta ($p_{1pSS-2pSS}=0,3461$) (pav. 4.1.1.2.1.). Tikėtina, kad būtent šios populiacijos limfocitų kiekio sumažėjimas įtakoja visų CD3⁺ T limfocitų ir CD8⁺ T limfocitų absoliutaus skaičiaus sumažėjimą pSS sergančių pacientų periferiniame kraujyje. Negalime palyginti šio tyrimų rezultatų su kitų tyrėjų rezultatais, nes tokių tyrimų literatūroje neradome, tačiau toks CD8ⁱ limfocitų populiacijų persiskirstymas rodo, kad CD8ⁱ limfocitai aktyviai dalyvauja pSS patogenezės mechanizmuose.

4.1.2. B ir NK limfocitų kiekybinė analizė

B limfocitai - viena iš pagrindinių limfocitų populiacijų aktyviai dalyvaujanti pSS patogenezėje. B limfocitų homeostazė pSS patogenezėje yra sutrikusi dėl B ląstelių hiperaktyvumo, pasireiškiančio autoantikūnų gamyba, hipergamaglobulinemija, ektopinių limfoidinių struktūrų formavimu uždegimo vietose ir padidėjusia B-ląstelių limfomos išsivystymo rizika (Hansen, Lipsky et al. 2007). Siekiant nustatyti galimus B limfocitų populiacijos pokyčius pSS sergančių pacientų periferiniame kraujyje analizavome CD19 žymenį turinčius limfocitus (Pav.4.1.2.1.), tačiau statistiškai patikimų kiekybinių skirtumų tarp

sergančių ir kontrolinės grupių pacientų nenustatėme ($p_{1pSS-K}=0,2496$, $p_{2pSS-K}=0,2099$, $p_{1pSS-2pSS}=0,8169$).

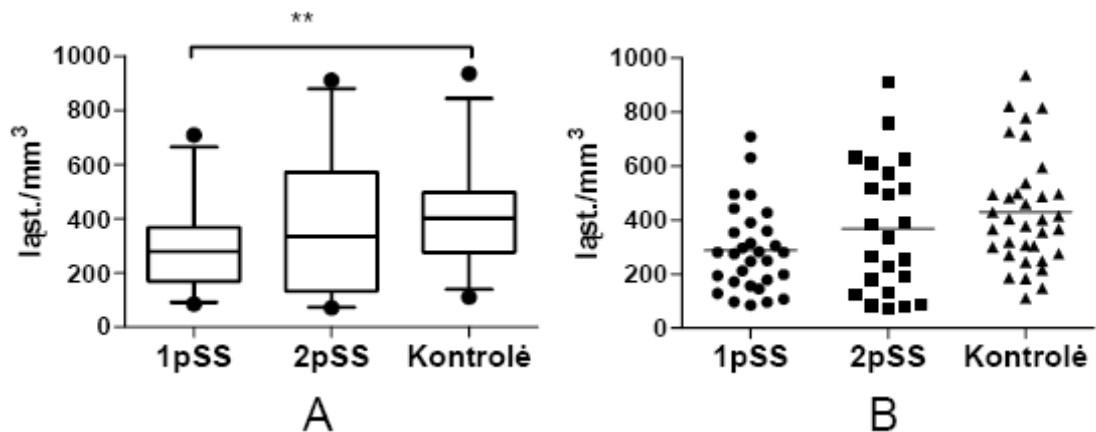


Pav. 4.1.2.1. Absolūtus CD19⁺ B limfocitų skaičius 1mm³ periferinio kraujo (A – mediana ir 5-95 procentilės; B – rezultatų išsibarstymas ir vidurkis).

1974 metais Talal ir kolegės atliko tyrimą, kurio metu nustatytas B limfocitų kiekio padidėjimas sergančiųjų Sjögreno sindromu kraujyje, tačiau tyrimas atliktas imunofluorescencija su polivalentiniais serumais arba su komplementu padengtais eritrocitais („rozečių“ metodas), kurių jautrumas neprilygsta tėkmės citometrijai (Talal, Sylvester et al. 1974). Kiti tyrėjai tyrimo objektu pasirinko ne bendra B limfocitų populiaciją, o kokybinius B limfocitų populiacijos pokyčius pagal diferenciacijos lygį ir funkcijas (Bohnhorst, Bjorgan et al. 2001; Binard, Le Pottier et al. 2009).

NK ląstelės dėl savo citotoksinių ir reguliacinių savybių yra viena iš autoimuninio proceso prevencijos grandžių (Lurati, Bertani et al. 2012), atliekančių svarbų vaidmenį ir pSS patogenezėje. Struyf su kolegomis savo publikacijoje pateikė duomenis, kad pacientų, sergančių pSS, sisteminė raudonąja vilklige NK ląstelių kiekis periferiniame kraujyje yra sumažėjęs lyginant su sveikų kontrolinių pacientų rezultatais, o taip pat buvo stebimas sumažėjęs jų funkcinis aktyvumas (Struyf, Snoeck et al. 1990). NK ląstelių kiekio sumažėjimą sisteminės raudonosios vilkligės pacientų kraujyje patvirtino Green ir kolegų atliktas tyrimas (Green, Kennell et al. 2005). Savo

darbe taip pat įvertinome NK ląstelių (CD3⁺CD16⁺/CD56⁺) kiekį pSS sergančių pacientų periferiniame kraujyje (Pav. 4.1.2.2.).



Pav. 4.1.2.2. Absolūtus NK limfocitų skaičius 1mm³ periferinio kraujo (A – mediana ir 5-95 procentilės; B – rezultatų išsibarstymas ir vidurkis). * - Mann-Whitney U testas.

Tyrimo rezultatai parodė statistiškai patikimą ($p_{1pSS-K}=0,003$) NK ląstelių absoliutaus skaičiaus sumažėjimą 1pSS grupės pacientų kraujyje, lyginant su kontrolinės grupės rezultatais, o lyginant kontrolinės ir 2pSS grupės rezultatus patikimo skirtumo nenustatyta ($p_{2pSS-K}=0,266$). Patikimo skirtumo nebuvo ir tarp 1pSS ir 2pSS grupių pacientų rodiklių ($p_{1pSS-2pSS}=0,404$). Skirtingus rezultatus gavo Szodoray su kolegomis, atlikę ląstelių, pasižyminčių reguliacinėmis savybėmis, tyrimą sergančių pSS pacientų kraujyje. Jie nustatė NK ląstelių procentinės dalies padidėjimą pSS grupėje lyginant su sveikomis kontrolėmis. pSS pacientų be ekstra-liaukinės raiškos rezultatai nesiskyrė nuo pacientų su ekstra-liaukine raiška (Szodoray, Papp et al. 2009). Tokį gautų rezultatų nesutapimą, galima būtų paaiškinti mūsų nustatytu plačiu pSS sergančių pacientų rezultatų išsibarstymu. Ypatingai didelis išsibarstymas stebimas 2pSS grupės pacientų rezultatuose. Tikriausiai 2pSS grupėje galima būtų išskirti dvi pacientų grupes su padidėjusiu arba sumažėjusiu NK ląstelių kiekiu. Manome, jog tyrimams reikėtų naudoti didesnes tiriamųjų grupes.

4.1.3. Sergančių pirminiu Sjögreno sindromu ir kontrolinių grupių tiriamųjų limfocitų populiacijų tarpusavio priklausomybės nustatymas

Atlikus kiekybinę sergančiųjų pirminiu Sjögreno sindromu ir kontrolinių asmenų limfocitų analizę periferiniame kraujyje, įvertinti/nustatyti ryšiai tarp limfocitų populiacijų. Vertinant priklausomybės tarp kintamųjų laipsnį, buvo naudojama Spirmeno ranginės koreliacijos analizė:

Tik 1pSS grupėje lyginant su 2pSS grupe nustatytos koreliacijos (Lentelė 4.1.3.1. ir Lentelė 4.1.3.2.): vidutinio stiprumo teigiama koreliacija nustatyta tarp $CD3^+$ ir $CD8^iCD27^+$, NK ir NKT, NK ir $CD4CD25^iFoxp3$, NK ir $CD8^i57^+CD27^-$ limfocitų populiacijų absoliutaus skaičiaus $1mm^3$ periferinio kraujo. Vidutinio stiprumo neigiama koreliacija nustatyta tarp $CD4CD25^iFoxp3$ ir $CD8^iCD57^+CD27^+$ limfocitų populiacijų absoliutaus skaičiaus $1mm^3$ periferinio kraujo. Stipri teigiama koreliacija nustatyta tarp $CD4^+$ ir B limfocitų, $CD4^+$ ir $CD8^i57^-CD27^+$ limfocitų populiacijų absoliutaus skaičiaus $1mm^3$ periferinio kraujo.

Tik 2pSS grupėje lyginant su 1pSS grupe nustatytos koreliacijos (Lentelė 4.1.3.3. ir Lentelė 4.1.3.4.): vidutinio stiprumo teigiama koreliacija nustatyta tarp $CD4^+$ ir Th17, $CD8^+$ ir NKT, $CD8^+$ ir $CD8^iCD57^+CD27^+$, Th17 ir $CD8^iCD57^-CD27^+$ limfocitų populiacijų absoliutaus skaičiaus $1mm^3$ periferinio kraujo.

Tik 1pSS grupėje lyginant su kontroline grupe nustatytos koreliacijos (Lentelė 4.1.3.1. ir Lentelė 4.1.3.2.): vidutinio stiprumo teigiama koreliacija nustatyta tarp $CD4^+$ ir NK, NK ir NKT, NK ir $CD4CD25^iFoxp3$, NK ir $CD8^iCD57^+CD27^-$ limfocitų populiacijų absoliutaus skaičiaus $1mm^3$ periferinio kraujo. Vidutinio stiprumo neigiama koreliacija nustatyta tarp $CD4CD25^iFoxp3$ ir $CD8^iCD57^+CD27^+$ limfocitų populiacijų absoliutaus skaičiaus $1mm^3$ periferinio kraujo.

Tik kontrolinėje grupėje lyginant su 1pSS grupe nustatytos koreliacijos (Lentelė 4.1.3.5. ir Lentelė 4.1.3.6.): vidutinio stiprumo teigiama koreliacija nustatyta tarp $CD3^+$ ir Th17, $CD4^+$ ir Th17, $CD8^+$ ir NKT, $CD8^+$ ir

CD8ⁱCD57⁺CD27⁺, NKT ir CD8ⁱCD57⁺CD27⁺, Th17 ir CD8ⁱCD57⁻CD27⁺ limfocitų populiacijų absoliutaus skaičiaus 1mm³ periferinio kraujo.

Tik 2pSS grupėje lyginant su kontroline grupe nustatytos koreliacijos (Lentelė 4.1.3.3. ir Lentelė 4.1.3.4.): vidutinio stiprumo teigiama koreliacija nustatyta tarp CD4⁺ ir NK limfocitų populiacijų absoliutaus skaičiaus 1mm³.

Tik kontrolinėje grupėje lyginant su 2pSS grupe nustatytos koreliacijos (Lentelė 4.1.3.5. ir Lentelė 4.1.3.6.): vidutinio stiprumo teigiama koreliacija nustatyta tarp CD3⁺ ir Th17, CD4⁺ ir CD8⁺, CD4⁺ ir B limfocitų, CD4⁺ ir CD8ⁱCD57⁻CD27⁺, NKT ir CD8ⁱCD57⁺CD27⁺ limfocitų populiacijų absoliutaus skaičiaus 1mm³ periferinio kraujo.

Visus sergančius pSS pacientus lyginant kaip vieną grupę su sveikų pacientų kontroline grupe, tik pSS grupėje nustatytas ryšys tarp CD4⁺ ir NK limfocitų populiacijų absoliutaus skaičiaus 1mm³, tuo tarpu tik sveikų kontrolių grupėje nustatytas ryšys tarp CD3⁺ ir Th17, bei NKT ir CD8ⁱCD57⁺CD27⁺ limfocitų populiacijų absoliutaus skaičiaus 1mm³ periferinio kraujo.

Apibendrinus rezultatus, gautus nagrinėjant koreliacijas tarp limfocitų populiacijų tyrimosiose grupėse galima teigti, kad tarpusavio ryšio skirtumai tarp ląstelių populiacijų, rodo ir patogenezinio mechanizmo skirtumus tarp sergančiųjų pSS grupių. Taip pat pakitusias sąsajas tarp ląstelių populiacijų lyginant sergančiuosius su sveikomis kontrolėmis.

Lentelė 4.1.3.1. Spirmeno ranginė koreliacija tarp limfocitų populiacijų absoliutaus skaičiaus 1mm^3 periferinio kraujo 1pSS grupėje.

Paryškintos juodos reikšmės rodo gautas teigiamas, raudonos neigiamas koreliacijas (kai $p < 0,05$).

	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	Blimfocitai	NK	NKT	Th17	Foxp3 ⁺	CD4CD25 ⁱ	CD8 ⁱ CD57 ⁺	CD8 ⁱ CD57 ⁺	CD8 ⁱ CD57 ⁻
CD3 ⁺		p<0,001	p<0,001	p<0,001	0,0063	0,3750	0,5419	0,1802	0,5784	0,3945	p<0,001	
CD4 ⁺	p<0,001		p<0,001	p<0,001	0,0068	0,3788	0,3425	0,1272	0,6325	0,6748	p<0,001	
CD8 ⁺	p<0,001	p<0,001		0,0016	p<0,001	0,0717	0,3686	0,3054	0,3548	p<0,001	p<0,001	
Blimfocitai	p<0,001	p<0,001	0,0016		0,0050	0,7910	0,8785	0,1592	0,4680	0,9637	p<0,001	
NK	0,0063	0,0068	p<0,001	0,0050		0,0334	0,7059	0,0058	0,6595	0,0278	0,2627	
NKT	0,3750	0,3788	0,0717	0,7910	0,0334		0,3523	0,6266	0,2359	p<0,001	0,4975	
Th17	0,5419	0,3425	0,3686	0,8785	0,7059	0,3523		0,1879	0,0128	0,9080	0,4739	
CD4CD25 ⁱ												
Foxp3 ⁺	0,1802	0,1272	0,3054	0,1592	0,0058	0,6266	0,1879		0,0105	0,8960	0,5888	
CD8 ⁱ CD57 ⁺												
CD27 ⁺	0,5784	0,6325	0,3548	0,4680	0,6595	0,2359	0,0128	0,0105		0,5720	0,0181	
CD8 ⁱ CD57 ⁺												
CD27 ⁻	0,3945	0,6748	p<0,001	0,9637	0,0278	p<0,001	0,9080	0,8960	0,5720		0,9340	
CD8 ⁱ CD57 ⁻												
CD27 ⁺	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	0,2627	0,4975	0,4739	0,5888	0,0181	0,9340		

Lentelė 4.1.3.2. Spirimo ranginė koreliacija tarp limfocitų populiacijų absoliutaus skaičiaus 1mm^3 periferinio kraujo 1pSS grupėje. Paryškintos juodos reikšmės rodo gautų teigiamų, raudonos neigiamų koreliacijų (kai $p < 0,05$) ryšio stiprumą (r_s).

	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	Blimfocitai	NK	NKT	Th17	CD4CD25 ⁱ Foxp3 ⁺	CD8 ⁱ CD57 ⁺ CD27 ⁺	CD8 ⁱ CD57 ⁺ CD27 ⁻	CD8 ⁱ CD57 ⁻ CD27 ⁺
CD3 ⁺		0,963	0,767	0,742	0,487	0,168	0,116	0,251	0,106	0,161	0,719
CD4 ⁺	0,963		0,682	0,767	0,483	0,167	0,180	0,285	0,091	0,080	0,715
CD8 ⁺	0,767	0,682		0,552	0,644	0,333	0,170	0,194	0,175	0,576	0,573
Blimfocitai	0,742	0,767	0,552		0,499	-0,051	0,029	0,264	0,138	0,009	0,729
NK	0,487	0,483	0,644	0,499		0,390	0,072	0,491	-0,084	0,402	0,211
NKT	0,168	0,167	0,333	-0,051	0,390		0,176	0,093	-0,223	0,599	-0,129
Th17	0,116	0,180	0,170	0,029	0,072	0,176		-0,247	0,449	-0,022	0,136
CD4CD25 ⁱ Foxp3 ⁺	0,251	0,285	0,194	0,264	0,491	0,093	-0,247		-0,460	-0,025	0,103
CD8 ⁱ CD57 ⁺ CD27 ⁺	0,106	0,091	0,175	0,138	-0,084	-0,223	0,449	-0,460		0,107	0,429
CD8 ⁱ CD57 ⁺ CD27 ⁻	0,161	0,080	0,576	0,009	0,402	0,599	-0,022	-0,025	0,107		0,016
CD8 ⁱ CD57 ⁻ CD27 ⁺	0,719	0,715	0,573	0,729	0,211	-0,129	0,136	0,103	0,429	0,016	

Lentelė 4.1.3.3. Spirmeno ranginė koreliacija tarp limfocitų populiacijų absoliutaus skaičiaus 1mm^3 periferinio kraujo 2pSS grupėje. Paryškintos juodos reikšmės rodo gautas teigiamas koreliacijas (kai $p < 0,05$).

	CD3⁺	CD4⁺	CD8⁺	Blimfocitai	NK	NKT	Th17	CD4CD25ⁱ	CD8ⁱCD57⁺	CD8ⁱCD57⁺	CD8ⁱCD57⁻
								Foxp3⁺	CD27⁺	CD27⁻	CD27⁺
CD3⁺		0,0006	0,0031	0,0045	0,0090	0,3101	0,2578	0,7812	0,1114	0,0539	0,0301
CD4⁺	0,0006		0,7402	0,0548	0,0204	0,7099	0,0210	0,5652	0,5900	0,6603	0,0881
CD8⁺	0,0031	0,7402		0,0111	0,0121	0,0138	0,2238	0,3515	0,0140	0,0043	0,0176
Blimfocitai	0,0045	0,0548	0,0111		0,0126	0,6115	0,4806	0,9662	0,2195	0,7817	0,0141
NK	0,0090	0,0204	0,0121	0,0126		0,2863	0,0800	0,1881	0,2185	0,2167	0,2115
NKT	0,3101	0,7099	0,0138	0,6115	0,2863		0,7709	0,1469	0,3013	0,0000	0,3123
Th17	0,2578	0,0210	0,2238	0,4806	0,0800	0,7709		0,2970	0,0406	0,3636	0,0028
CD4CD25ⁱ											
Foxp3⁺	0,7812	0,5652	0,3515	0,9662	0,1881	0,1469	0,2970		0,9038	0,1963	0,1429
CD8ⁱCD57⁺											
CD27⁺	0,1114	0,5900	0,0140	0,2195	0,2185	0,3013	0,0406	0,9038		0,4684	0,0123
CD8ⁱCD57⁺											
CD27⁻	0,0539	0,6603	0,0043	0,7817	0,2167	0,0000	0,3636	0,1963	0,4684		0,2597
CD8ⁱCD57⁻											
CD27⁺	0,0301	0,0881	0,0176	0,0141	0,2115	0,3123	0,0028	0,1429	0,0123	0,2597	

Lentelė 4.1.3.4. Spirmeno ranginė koreliacija tarp limfocitų populiacijų absoliutaus skaičiaus 1mm^3 periferinio kraujo 2pSS grupėje. Paryškintos juodos reikšmės rodo gautų teigiamų korelacių (kai $p < 0,05$) ryšio stiprumą (r_s).

		CD4CD25ⁱ	CD8ⁱCD57⁺	CD8ⁱCD57⁺	CD8ⁱCD57⁻						
	CD3⁺	CD4⁺	CD8⁺	Blimfocitai	NK	NKT	Th17	Foxp3⁺	CD27⁺	CD27⁻	CD27⁺
CD3⁺		0,659	0,589	0,582	0,532	0,221	0,246	0,061	0,341	0,407	0,453
CD4⁺	0,659		0,073	0,415	0,480	-0,082	0,478	-0,126	0,119	-0,097	0,364
CD8⁺	0,589	0,073		0,530	0,514	0,506	0,264	0,204	0,505	0,573	0,490
Blimfocitai	0,582	0,415	0,530		0,522	-0,115	0,159	-0,010	0,273	0,063	0,516
NK	0,532	0,480	0,514	0,522		0,232	0,373	0,285	0,267	0,268	0,271
NKT	0,221	-0,082	0,506	-0,115	0,232		0,064	0,312	0,225	0,807	-0,220
Th17	0,246	0,478	0,264	0,159	0,373	0,064		-0,227	0,430	-0,199	0,594
CD4CD25ⁱ											
Foxp3⁺	0,061	-0,126	0,204	-0,010	0,285	0,312	-0,227		-0,027	0,280	-0,315
CD8ⁱCD57⁺											
CD27⁺	0,341	0,119	0,505	0,273	0,267	0,225	0,430	-0,027		0,159	0,513
CD8ⁱCD57⁺											
CD27⁻	0,407	-0,097	0,573	0,063	0,268	0,807	-0,199	0,280	0,159		-0,245
CD8ⁱCD57⁻											
CD27⁺	0,453	0,364	0,490	0,516	0,271	-0,220	0,594	-0,315	0,513	-0,245	

Lentelė 4.1.3.5. Spirmeno ranginė koreliacija tarp limfocitų populiacijų absoliutaus skaičiaus 1mm³ periferinio kraujo kontrolinėje grupėje. Paryškintos juodos reikšmės rodo gautas teigiamas koreliacijas (kai p<0,05).

	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	Blimfocitai	NK	NKT	Th17	Foxp3 ⁺	CD27 ⁺	CD27 ⁻	CD27 ⁺
CD3⁺		p<0,001	p<0,001	p<0,001	0,0087	0,1997	0,0271	0,6313	0,1124	0,3562	p<0,001
CD4⁺	p<0,001		0,0324	p<0,001	0,1377	0,4806	p<0,001	0,1872	0,2189	0,1549	p<0,001
CD8⁺	p<0,001	0,0324		0,0346	0,0091	0,0307	0,0525	0,1413	0,0023	0,0153	p<0,001
Blimfocitai	p<0,001	p<0,001	0,0346		p<0,001	0,5460	0,0756	0,5407	0,3121	0,8094	0,0139
NK	0,0087	0,1377	0,0091	p<0,001		0,9211	0,4038	0,3427	0,9924	0,8630	0,0839
NKT	0,1997	0,4806	0,0307	0,5460	0,9211		0,9605	0,5852	0,0307	p<0,001	0,9465
Th17	0,0271	p<0,001	0,0525	0,0756	0,4038	0,9605		0,2226	0,0153	0,6941	0,0046
CD4CD25ⁱ											
Foxp3⁺	0,6313	0,1872	0,1413	0,5407	0,3427	0,5852	0,2226		0,7083	0,2702	0,6154
CD8ⁱCD57⁺											
CD27⁺	0,1124	0,2189	0,0023	0,3121	0,9924	0,0307	0,0153	0,7083		0,0627	0,0128
CD8ⁱCD57⁻											
CD27⁻	0,3562	0,1549	0,0153	0,8094	0,8630	p<0,001	0,6941	0,2702	0,0627		0,6988
CD8ⁱCD57⁻											
CD27⁺	p<0,001	p<0,001	p<0,001	0,0139	0,0839	0,9465	0,0046	0,6154	0,0128	0,6988	

Lentelė 4.1.3.6. Spirmeno ranginė koreliacija tarp limfocitų populiacijų absoliutaus skaičiaus 1mm^3 periferinio kraujo kontrolinėje grupėje. Paryškintos juodos reikšmės rodo gautų teigiamų koreliacijų (kai $p < 0,05$) ryšio stiprumą (r_s).

	CD3⁺	CD4⁺	CD8⁺	Blimfocitai	NK	NKT	Th17	CD4CD25ⁱ	CD8ⁱCD57⁺	CD8ⁱCD57⁺	CD8ⁱCD57⁻
								Foxp3⁺	CD27⁺	CD27⁻	CD27⁺
CD3⁺		0,704	0,573	0,676	0,437	0,222	0,373	0,084	0,273	0,161	0,636
CD4⁺	0,704		0,362	0,575	0,256	-0,123	0,559	0,228	0,213	-0,246	0,652
CD8⁺	0,573	0,362		0,358	0,435	0,366	0,331	-0,254	0,499	0,407	0,792
Blimfocitai	0,676	0,575	0,358		0,543	-0,106	0,304	0,107	0,176	-0,042	0,412
NK	0,437	0,256	0,435	0,543		0,017	0,146	-0,165	-0,002	-0,030	0,296
NKT	0,222	-0,123	0,366	-0,106	0,017		0,009	-0,096	0,366	0,626	0,012
Th17	0,373	0,559	0,331	0,304	0,146	0,009		0,211	0,407	-0,069	0,468
CD4CD25ⁱ											
Foxp3⁺	0,084	0,228	-0,254	0,107	-0,165	-0,096	0,211		-0,066	-0,192	-0,088
CD8ⁱCD57⁺											
CD27⁺	0,273	0,213	0,499	0,176	-0,002	0,366	0,407	-0,066		0,318	0,417
CD8ⁱCD57⁺											
CD27⁻	0,161	-0,246	0,407	-0,042	-0,030	0,626	-0,069	-0,192	0,318		-0,068
CD8ⁱCD57⁻											
CD27⁺	0,636	0,652	0,792	0,412	0,296	0,012	0,468	-0,088	0,417	-0,068	

4.2. T helperinių limfocitų populiacijų periferiniame kraujyje nustatymas ir kokybinis įvertinimas

Manoma, kad autoimuninių susirgimų, tame tarpe ir pirminio Sjögreno sindromo, patogenezėje yra sutrikusi Th limfocitų homeostazė (Kohriyama and Katayama 2000; Youinou and Pers 2011). Savo darbe tyrėme keturias Th populiacijas (Th1, Th2, Th17 ir Th17/Th1-like), siekiant išsiaiškinti ir galimai patvirtinti arba paneigti sutrikusios Th limfocitų homeostazės pSS patogenezėje prielaidą. Iki šiol tokio tyrimo kuris analizuotų visų keturių Th limfocitų populiacijų homeostazę periferiniame kraujyje analizuojant pačias ląstelių populiacijas, o ne matuojant jų produkuojamų citokinų kiekį literatūroje neaptikome. pSS sergančių pacientų šiame etape į 1pSS ir 2pSS grupes neskirstėme, darbo tikslas buvo išsiaiškinti Th limfocitų homeostazės būseną bendroje pSS grupėje.

Lentelė 4.2.1 Pacientų sergančių pirminiu Sjögreno sindromu ir kontrolinės grupės pacientų CD4⁺ T ląstelių pasiskirstymas pagal citokinų ekspresiją.

Th limfocitai	Kontrolinė grupė (n = 26)			pSS grupė (n = 37)			p*
	Vidurkis	Mediana	SN	Vidurkis	Mediana	SN	
Th1 (INF- γ^+)	11,90	13,14	6,47	12,50	10,05	12,49	0,3389
Th2 (IL-4 ⁺)	0,25	0,20	0,25	0,21	0,13	0,21	0,0683
Th17 (IL-17A ⁺)	1,06	0,97	0,51	1,06	0,85	0,58	1,0000
Th17/Th1-like (IL-17A ⁺ /INF- γ^+)	0,17	0,15	0,10	0,28	0,26	0,15	0,0029

Vidurkio, medianos ir standartinio nuokrypio (SN) reikšmės lentelėje pateiktos kaip procentas, skaičiuota nuo visų CD4⁺ limfocitų. * - Mann-Whitney U testas

Ištyrę Th populiacijų pasiskirstymą periferiniame kraujyje, aptikome statistiškai patikimą palyginti neseniai atrastos Th17/Th1-like limfocitų subpopuliacijos procento padidėjimą ($p=0,0029$) pirminiu Sjögreno sindromu sergančių pacientų periferiniame kraujyje lyginant su kontrolinės grupės rezultatais (Lentelė 4.2.1, Pav. 4.2.1). Müller ir kt. pacientų sergančių Krono liga periferiniame kraujyje ir uždegiminiame žarnyno audinyje taip pat nustatė CD4+IL-17⁺/IFN- γ ⁺ limfocitus (Muller and Lamprecht 2008), o Rovedatti ir kt. nustatė šių limfocitų procento padidėjimą pacientų kenčiančių nuo lėtinių uždegiminių žarnyno ligų žarnų biopsinėje medžiagoje, lyginant su kontrolinės grupės pacientų rezultatais (Rovedatti, Kudo et al. 2009). Kebir ir kt. pateikė duomenis, kuriuose nurodė padidėjusį CD4⁺IL-17⁺/IFN- γ ⁺ limfocitų procentą centrinėje nervų sistemoje alerginio eksperimentinio encefalomyelito pelių modelyje, bei nustatė, kad šios ląstelės lengviau pereina per smegenų barjerą ir dalyvauja aktyvioje uždegimo stadijoje (Kebir, Ifergan et al. 2009). Nustatytas šių limfocitų aktyvus patogeninis vaidmuo kitų lėtinių ligų uždegiminiuose procesuose, leidžia ir mums iškelti prielaidą, kad pSS periferiniame kraujyje padidėjęs Th17/Th1-like limfocitų procentas parodo, kad šios ląstelės dalyvauja pSS patogeneziniuose mechanizmuose.

Lyginant sergančių pSS ir kontrolinių pacientų grupių Th1 limfocitų kiekio periferiniame kraujyje vidurkius, patikimo skirtumo negauta ($p=0,3389$), nors reikšmių medianos rodo Th1 ląstelių procento mažėjimą (**Mediana**_K=13,14; **Mediana**_{pSS}=10,05) pSS grupėje (Lentelė 4.2.1, Pav. 4.2.1). Kohriyama ir kt. taip pat nustatė Th1 limfocitų procento sumažėjimą, bei sumažėjusį Th1/Th2 limfocitų santykį pSS sergančių pacientų periferiniame kraujyje lyginant su sveikų asmenų rezultatais. Straipsnyje, kaip ir mūsų tyrimuose, pateikta pSS pacientų grupė buvo mišri, į ją pateko tiek su ekstra-liaukine tiek ir be ekstra-liaukinės raiškos pacientai, skirtumų tarp pacientų be ir su ekstraliuikine raiška jie nenustatė (Kohriyama and Katayama 2000). Analogiškus rezultatus gavo ir van Woerkom lygindamas Th1 limfocitų aktyvumą ir Th1/Th2 limfocitų santykį pSS ir ne Sjögreno *sicca* pacientų periferiniame kraujyje. pSS pacientų periferiniame kraujyje Th1 limfocitų aktyvumas ir Th1/Th2 santykis buvo

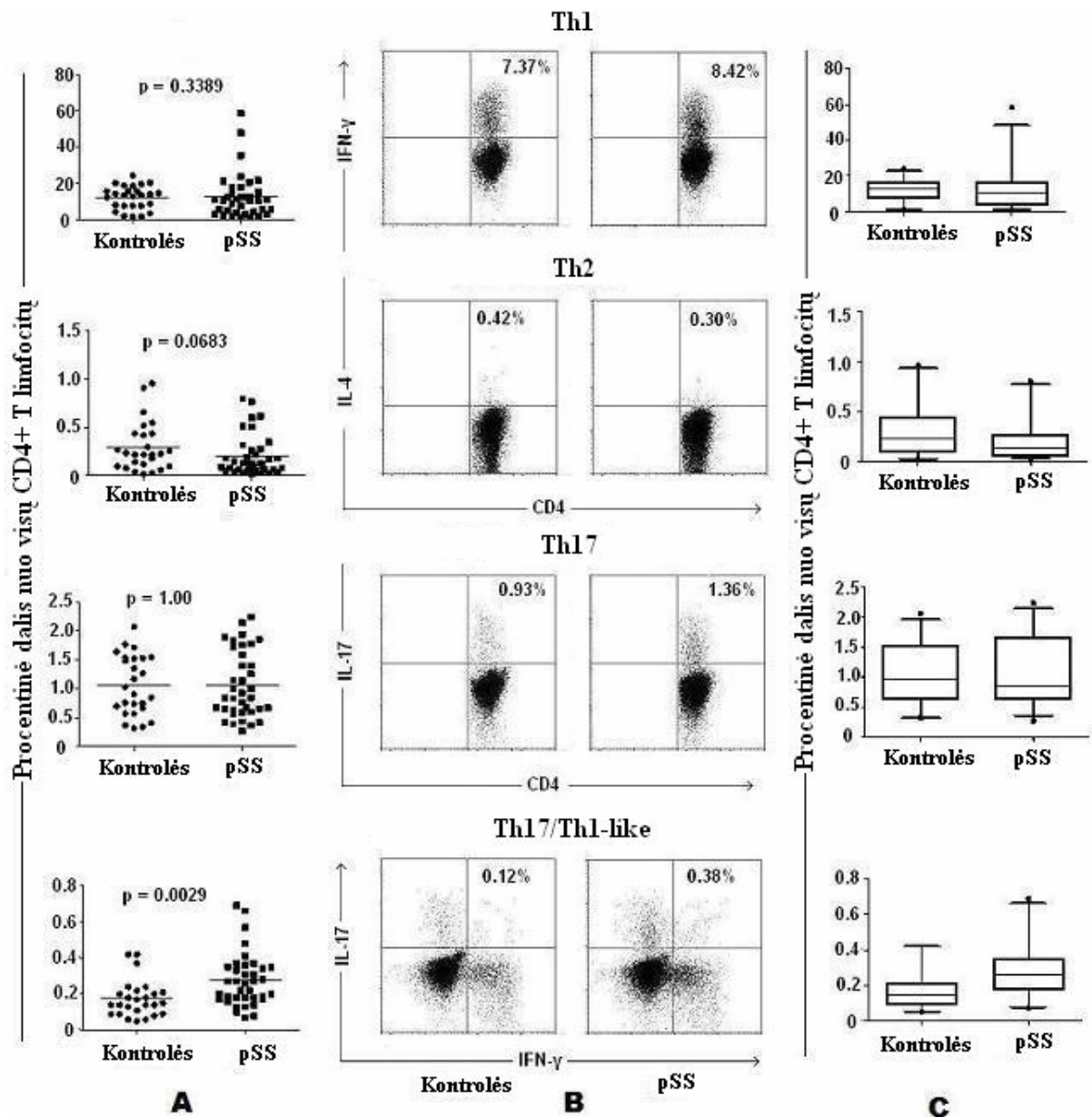
sumažėjęs lyginant su ne Sjögreno *sicca* pacientų rezultatais. Šiame tyrime Th aktyvumas buvo nustatomas tiriant limfocitų produktų IFN- γ , IL-4 kiekį (van Woerkom, Kruize et al. 2005). Priešingus rezultatus gavo Kang ir kt., nustatę Th1 limfocitų populiacijos padidėjimą pSS pacientų periferiniame kraujyje lyginant su sveikų pacientų rezultatais (Kang, Kim et al. 2012). Savo tyrime, nenustatėme reikšmingo Th1/Th2 santykio skirtumo tarp pSS pacientų ir kontrolinės grupės rezultatų.

Th2 limfocitų procentas sergančių pSS pacientų periferiniame kraujyje buvo sumažėjęs lyginant su kontroline grupe, tačiau skirtumas nebuvo statistiškai patikimas $p=0,0683$ (Lentelė 4.2.1, Pav. 4.2.1). Lyginant grupių medianos reikšmes jos skiriasi kone dvigubai, atitinkamai 0,25% ir 0,13 %. Literatūroje nurodoma, jog pacientams, turintiems genetinį polinkį išvystyti imuninį atsaką su Th2 limfocitams būdingu citokinų profiliu, ligos prognozė yra geresnė ir siejasi su švelnesniais ligos pasireiškimo simptomais (Pertovaara, Antonen et al. 2006). Galimai, tokie pacientai padaro sergančių pSS pacientų grupę heterogenišką pagal Th2 limfocitų aktyvumą periferiniame kraujyje. Kohriyama ir kt. savo tyrimuose taip pat nenustatė reikšmingų Th2 populiacijos pokyčių pSS pacientų periferiniame kraujyje lyginant su sveikų pacientų rezultatais (Kohriyama and Katayama 2000), kaip ir van Woerkom ir kt. nenustatė Th2 aktyvumo skirtumo periferiniame kraujyje tarp pSS ir ne Sjögreno *sicca* pacientų rezultatų (van Woerkom, Kruize et al. 2005).

Lyginat Th17 limfocitų populiacijos pokyčius, patikimo skirtumo ($p=1,000$) tarp grupių nenustatyta (Lentelė 4.2.1, Pav. 4.2.1). Kitokius rezultatus gavo Kang ir kt., nustatę Th17 limfocitų populiacijos padidėjimą pSS pacientų periferiniame kraujyje lyginant su sveikų pacientų rezultatais (Kang, Kim et al. 2012).

Analizuojant mūsų tyrimo duomenų išsibarstymą, galima įžvelgti, kad kiekvienoje grupėje pacientai pasidalina į dvi populiacijas. Galimos to prielaidos, kad kontrolinės grupės pacientai nėra jauno amžiaus atstovai, tokia amžiaus grupė rinkta atitinkamai sergančiųjų pSS grupei. Galimi nenustatyti lėtiniai susirgimai kontrolinės grupės pacientuose gali būti padidėjusio Th17

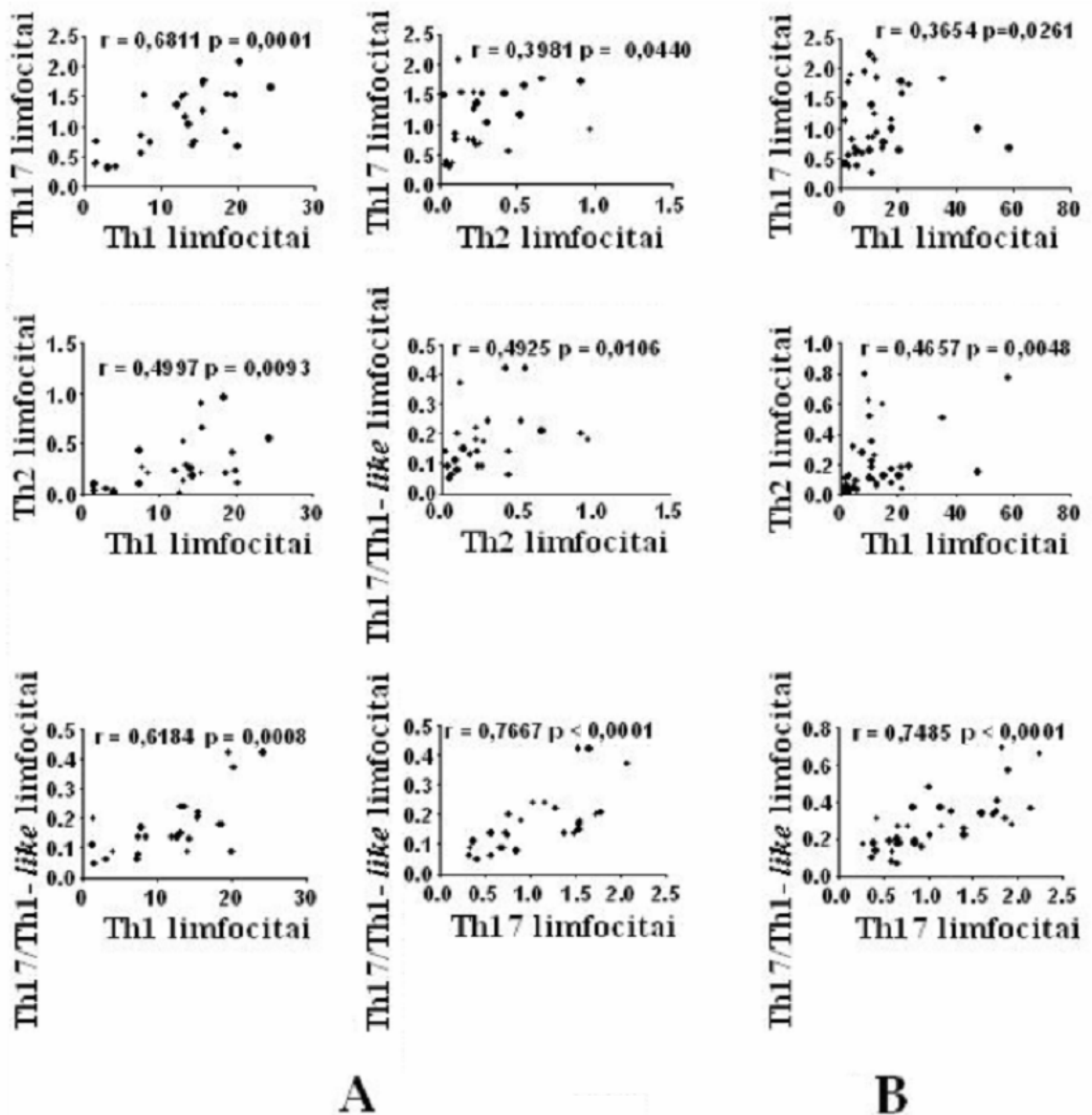
limfocitų procento priežastimi. Žvelgiant į sergančių pSS grupę taip pat galima išvelgti, kad grupė galimai sudaryta iš dviejų pacientų populiacijų. Galima prielaida - vyksta pastovi Th17 limfocitų recirkuliacija į uždegimo židinius ir atgal į kraują. Esant aktyviam uždegiminių procesui ląstelės aktyviai migruoja į uždegimines vietas. Esant ligos remisijai jos taip pat gali grįžti atgal į periferinį kraują. Tokias prielaidas daro Abdulahad ir kt., nustatę, jog Wegenerio granuliomatoze sergančių pacientų su aktyvia ligos eiga CD4⁺ T efektorinių limfocitų periferiniame kraujyje lyginant su kontroline grupe sumažėjo dėl jų migracijos į uždegimo židinius. (Abdulahad, van der Geld et al. 2006).



Pav. 4.2.1. Th limfocitų populiacijų pasiskirstymas periferiniame kraujyje. (A – rezultatų išsibarstymas ir vidurkis; B – IFN- γ , IL-4, IL-17 ir IL-17/IFN- γ po stimuliacijos ekspresuojančių CD4⁺ T limfocitų reprezentatyvios taškinės diagramos; C – mediana ir 5-95 procentilės). * - Mann-Whitney U testas.

Lyginant visų keturių Th1, Th2 ir Th17 Th17/Th1-like limfocitų populiacijų homeostazę periferiniame kraujyje ir jų tarpusavio ryšius gauti sekantys rezultatai. Nors lyginant Th populiacijų procentą periferiniame kraujyje statistiškai patikimas skirtumas rastas tik Th17/Th1-like aktyvumo padidėjime pSS sergančių pacientų periferiniame kraujyje, tačiau ryšių analizė

tarp Th limfocitų populiacijų pasiskirstymo atskleidė daugiau skirtumų tarp tirtų grupių (Pav. 4.2.2.). Kontrolinių pacientų grupėje visos keturios Th1, Th2, Th17 ir Th17/Th1-*like* limfocitų populiacijos koreliavo tarpusavyje. Vidutinis koreliacijos ryšys buvo tarp Th1 ir Th17 ($r=+0,6811$ $p=0,0001$), Th1 ir Th2 ($r=+0,4997$ $p=0,0093$) bei Th1 ir Th17/Th1-*like* ($r=+0,6184$ $p=0,0008$) limfocitų, taip pat tarp Th2 ir Th17 ($r=+0,3981$ $p=0,0440$), bei Th2 ir Th17/Th1-*like* ($r=+0,4925$ $p=0,0106$) limfocitų. Stipri koreliacija ($r=+0,7667$ $p<0,0001$) gauta tarp Th17 ir Th17/Th1-*like* limfocitų. Apibendrinant ryšius tarp šių Th populiacijų, galima teigti, kad visų keturių populiacijų pasiskirstymas periferiniame kraujyje glaudžiai susijęs ir bendrai didėja esant aktyvesniems imuniniams procesams organizme. Sergančių pSS pacientų grupės periferiniame kraujyje vaizdas kiek kitoks. Vidutinis koreliacijos ryšys nustatytas tik tarp tarp Th1 ir Th17 ($r=+0,3654$ $p=0,0261$), bei Th1 ir Th2 ($r=+0,4657$ $p=0,0048$) limfocitų kiekio periferiniame kraujyje. Stiprus koreliacijos ryšys nustatytas tik tarp Th17 ir Th17/Th1-*like* ($r=+0,7485$ $p<0,0001$) limfocitų. Tokie skirtumai tarp tiriamųjų grupių, kada tarp tirtų Th limfocitų populiacijų stebima Th2 limfocitų procento sumažėjimo tendencija ir Th17/Th1-*like* limfocitų procentas yra patikimai padidėjęs, aiškiai parodo, kad pirminio Sjögreno sindromo patogenezėje yra sutrikusi T ląstelių homeostazė. Ir galimai šį disbalansą sukelia sumažėjęs Th2 ir reikšmingai padidėjęs Th17/Th1-*like* limfocitų procentas.



Pav. 4.2.2. Spirmeno ranginė koreliacija tarp Th populiacijų aktyvumo periferiniame kraujyje. Kiekvienas taškas diagramoje vaizduoja vieną individualų tiriamąjį. **A** Koreliacijos tarp Th subpopuliacijų aktyvumo kontrolinėje grupėje. **B** Koreliacijos tarp Th populiacijų aktyvumo pSS grupėje.

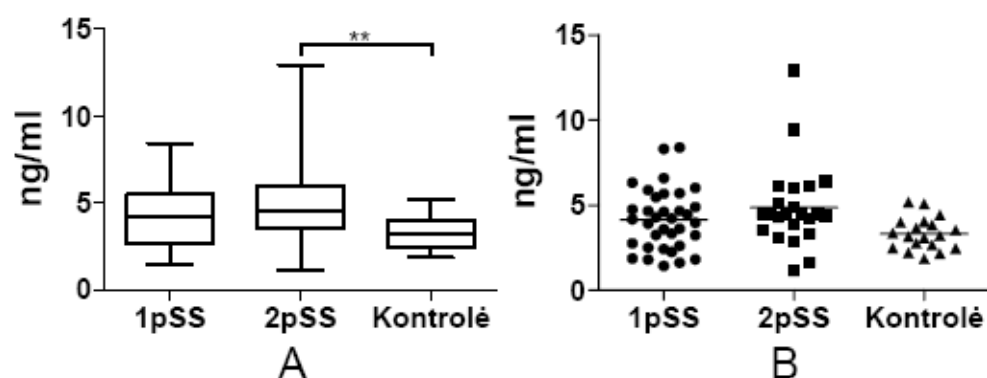
4.3. Humoralinių imuninės sistemos komponentų kiekybinis įvertinimas

Humoraliniai biožymenys atlieka svarbų vaidmenį diagnozuojant sistemines autoimunines ligas, įvertinant šių ligų aktyvumo stadijas, numatant

gydymo strategijas ir tolimesnio ligos vystimosi prognozes. Šių žymenų biologinė-klinikinė svarba priklauso nuo to, kiek tiksliai jie atspindi organizme vykstančius procesus, todėl svarbu įvertinti kaip jie yra įtakojami individualių pacientų savybių, terapinės intervencijos ar kitų pataloginių procesų (Tektonidou and Ward 2011). Analizavome keletą tokių biožymenų (BAFF, laisvos κ ir λ lengvos grandinės, Cd4, bendras IgG, IL-27, IL-35) pSS sergančiųjų tiriamųjų periferiniame kraujyje.

4.3.1. B ląstelių aktyvavimo faktoriaus kiekybinis įvertinimas

Vienas iš potencialių Sjögreno sindromo patogenezės humoralinių biožymenų yra TNF šeimai priklausantis B limfocitų aktyvatorius (BAFF), kuris indukuoja šių ląstelių proliferaciją, diferenciaciją ir tolerantiškumo praradimą ir gali būti susijęs su limfomos išsivystymu (Daridon, Youinou et al. 2008). Įrodyta, kad BAFF vaidina labai svarbų vaidmenį vėžinių B ląstelių išgyvenime, be to BAFF gamyba koreliuoja su histologiniu įvertinimu ir išgyvenamumu sergančių ne Hodžkino limfoma pacientų tyrimuose (Novak, Grote et al. 2004). BAFF yra vienas iš taikinių kuriant pSS terapijas nukreiptas prieš B limfocitus (Kallenberg, Vissink et al. 2011). Savo tyrime įvertinome BAFF koncentracijas 1pSS (n=30), 2pSS (n=22) ir kontrolinės grupės (n=18) pacientų kraujo serume (Pav. 4.3.1.; Lentelė 4.3.4.1.).



Pav. 4.3.1. BAFF lygis serume, (A – mediana ir 5-95 procentilės; B – rezultatų išsibarstymas ir vidurkis). * - Mann-Whitney U testas.

Ištirus pacientų periferinio kraujo serumo mėginius nustatytas BAFF koncentracijos padidėjimas pSS pacientų kraujo serume lyginant su kontroline grupe. Patikimo BAFF koncentracijos serume skirtumo tarp 1pSS grupės pacientų ir kontrolinės grupės rezultatų nenustatyta ($p=0,09$). Statistiškai patikimas BAFF koncentracijos padidėjimas nustatytas 2pSS grupės pacientų kraujo serume, rezultatus lyginant su kontrolinės grupės rezultatais ($p=0,004$), statistiškai reikšmingo skirtumo tarp pSS pacientų grupių nenustatyta ($p=0,2833$). Mariette ir kt. savo tyrimuose nustatė BAFF koncentracijos padidėjimą pSS pacientų kraujo serumuose rezultatus lyginant su sveikų asmenų rezultatais, taip pat jie nustatė teigiamą koreliaciją tarp BAFF ir autoantikūnų anti-Ro/SSA ir anti-La/SSB koncentracijos pSS pacientų kraujo serume (Mariette, Roux et al. 2003). Jonsson ir kt. taip pat nustatė BAFF koncentracijos padidėjimą pSS pacientų kraujo serume lyginant su sveikų asmenų rezultatais, bei nustatė, kad pacientų turinčių autoantikūnų anti-Ro/SSA ir anti-La/SSB serumuose BAFF koncentracijos buvo didesnės (Jonsson, Szodoray et al. 2005). Tačiau šie tyrėjai neskirstė pSS pacientų pagal liaukinę ir ekstraliaukinę raišką. Mes nustatėme vidutinio stiprumo koreliaciją tarp BAFF ir autoantikūnų anti-La/SSB koncentracijos kraujo serume tik 2pSS grupėje ($p=0,027$; $r=+0,494$). Panašius rezultatus, tirdami BAFF kiekį serume ir jo receptorių (BAFF-R) ant B limfocitų, gavo ir Sellam ir kt. Savo tyrimuose jie nustatė didesnę BAFF kiekį pSS su ekstra-liaukine raiška pacientų serume, nei pacientams be ekstra-liaukinės pSS raiškos, tačiau, kaip ir mūsų tyrime, negavo statistiškai reikšmingo skirtumo tarp pSS grupių. Šie tyrėjai taip pat nustatė reikšmingai sumažėjusią BAFF-R ekspresiją ant pacientų, sergančių pirminiu Sjögreno sindromu su ekstra-liaukine raiška, T ir B limfocitų ir susiejo BAFF-R ekspresijos sumažėjimą su padidėjusiu BAFF lygiu serume (Sellam, Miceli-Richard et al. 2007). Padidėjęs BAFF kiekis ne visada gali atspindėti ligos aktyvumą. Lavie ir kt. savo tyrimuose nustatė BAFF kiekio padidėjimą pSS pacientų kraujo serume po terapijos preparatu Rituximab, kuris pašalina B limfocitus. Jie daro prielaidas, kad tai vyksta dėl monocitų aktyviai gaminamo BAFF. Monocitai, sumažėjus B limfocitų kiekiui, negauna

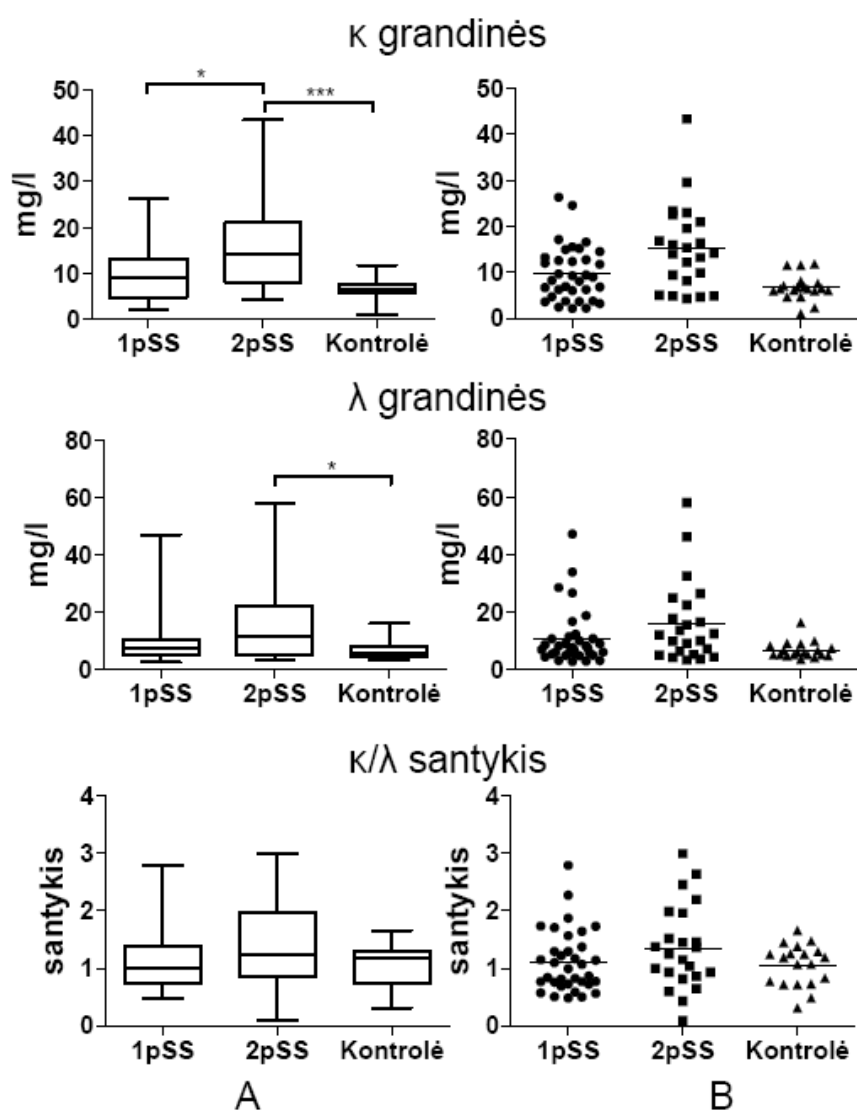
neigiamo reguliacinio signalo iš B limfocitų, ir produkuoja didesnius kiekius BAFF, bei tampa pagrindiniais padidėjusio BAFF kiekio serume kaltininkais. Dėl to BAFF kiekį serume reikia vertinti atsakingai, atsižvelgiant ir į naudotas pacientų gydymo metodikas (Lavie, Miceli-Richard et al. 2007; Pollard, Abdulahad et al. 2013).

Savo tyrimuose taip pat nustatėme priklausomybę tarp BAFF ir kitų humoralinių veiksnių raiškos serume, bei limfocitų populiacijų absoliučių skaičių periferiniame kraujyje. Tik 1pSS grupėje nustatyta koreliacija tarp BAFF ir laisvų lengvųjų κ , λ grandinių (atitinkamai $p=0,002$; $r=+0,513$ ir $p=0,004$; $r=+0,479$) kiekio serume. Koreliacija tarp BAFF raiškos serume ir limfocitų nustatyta taip pat tik 1pSS pacientų grupėje. Tai vidutinio stiprumo koreliacija tarp BAFF ir $CD3^+$ ($p=0,045$; $r=-0,369$), $CD3^+CD4^+$ ($p=0,038$; $r=-0,380$), $CD3^+CD8^+$ ($p=0,014$; $r=-0,445$), B ($p=0,026$; $r=-0,406$) ir $CD8^+CD57^-CD27^+$ ($p=0,011$; $r=-0,458$) limfocitų. 2pSS ir kontrolinėje grupėje patikimo ryšio tarp BAFF raiškos serume ir absoliutaus limfocitų populiacijų skaičiaus periferiniame kraujyje nenustatėme. Nors Zhu ir kt. daro prielaidą, kad BAFF saugo ne tik B, bet ir T limfocitus nuo apoptozės (Zhu, Shi et al. 2009), tačiau mūsų gauti duomenys rodo neigiamą ryšį tarp BAFF raiškos ir T limfocitų absoliutaus skaičiaus periferiniame kraujyje. Reikalingi detalesni ryšių tarp BAFF ir T limfocitų pSS patogeneizės mechanizmuose tyrimai.

4.3.2. Imunoglobulinų laisvų κ ir λ lengvųjų grandinių kiekybinis įvertinimas

Pastarųjų metų tyrimai parodė, kad laisvos lengvos imunoglobulinų grandinės (LLG) κ ir λ dalyvauja imunologinės reguliacijos mechanizmuose kaip signaliniai efektoriai ar priešuždegiminės molekulės (Nakano, Matsui et al. 2011). Šių molekulių kiekybinis tyrimas ir jų santykio (κ/λ) apskaičiavimas laikomi jautriu ir specifiniu metodu LLG ligų nustatymui (Katzmann, Abraham et al. 2005). Dar 1998 m. buvo atkreiptas dėmesys į tai, kad laisvos imunoglobulinų lengvosios grandinės kraujo serume gali būti prognostinis limfomos išsivystymosi žymuo pSS patogeneizėje (Sutcliffe, Inanc et al. 1998),

tačiau šiuose tyrimuose nebuvo išskirtos pSS pacientų grupės be ir su ekstra-
liaukine raiška. Mūsų tyrime bandėme susieti LLG pokyčius serume su kitais
tirtais veiksniais ir ląstelių populiacijų pokyčiais, bei įvertinti skirtumus tarp
1pSS ir 2pSS grupės. Įvertinus imunoglobulinų laisvų lengvųjų κ ir λ grandinių
koncentraciją tiriamųjų periferiniame kraujyje (Pav.4.3.2.), nustatėme, kad,
kaip teigiama ir kitų tyrėjų darbuose, šių molekulių koncentracija pSS pacientų
serumo mėginiuose yra padidėjusi.



Pav. 4.3.2. Laisvų kapa ir lamda lengvųjų grandinių raiška ir jų santykis
pacientų kraujo serume. (A – mediana ir 5-95 procentilės; B – rezultatų
išsibarstymas ir vidurkis). * - Mann-Whitney U testas.

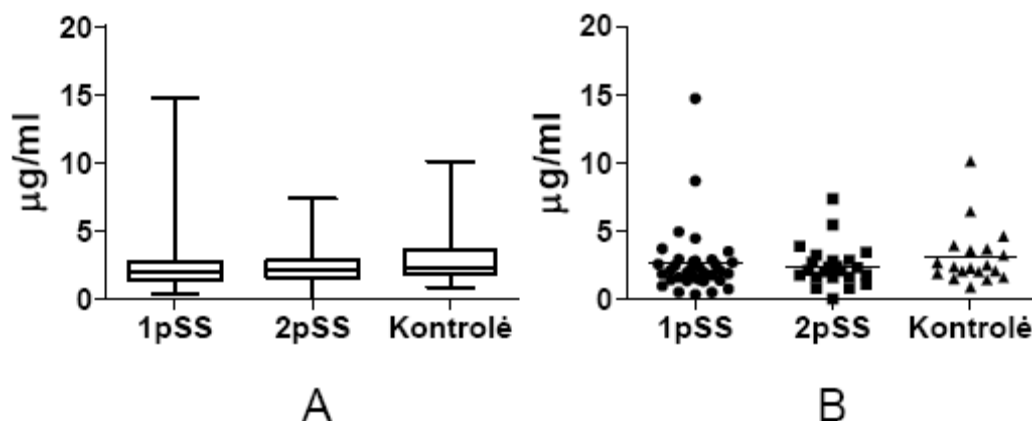
Gauti tyrimų duomenys parodė laisvų lengvųjų κ grandinių koncentracijos padidėjimą pSS pacientų kraujo serume. 1pSS grupės pacientų serume nustatytas κ grandinių koncentracijos padidėjimas, tačiau skirtumas nėra patikimas ($p=0,059$), tačiau patikimas κ grandinių koncentracijos padidėjimas nustatytas 2pSS grupės pacientų serume ($p=0,001$), lyginant su kontrolinės grupės tiriamųjų rezultatais. Laisvų κ grandinių koncentracija 2pSS pacientų grupės serume buvo reikšmingai didesnė ($p=0,0115$) ir lyginant su 1pSS grupės tiriamųjų rezultatais. Lengvųjų λ grandinių koncentracijos statistiškai patikimas padidėjimas ($p=0,012$) nustatytas 2pSS grupės pacientų serume, lyginant su kontrolinės grupės pacientų rezultatais. Šiuose tyrimuose tirti pacientai su ekstra-liaukine raiška turėjo aukštesnes koncentracijas laisvų lengvųjų κ ir λ grandinių, nei pacientai tik su liaukų pažeidimais (Pav. 4.3.2.; Lentelė 4.3.4.1.). Analogiškas tendencijas nustatė ir Gottenberg ir kt. Jų tyrimo rezultatai parodė padidėjusius kiekius κ ir λ grandinių pSS pacientuose lyginant su sveikų asmenų rezultatais, bei patikimai didesnius κ ir λ kiekius pacientų su ekstra-liaukine raiška serume lyginant su pacientų be ekstra-liaukinės raiškos rezultatais. Autoriai nustatė teigiamas koreliacijas tarp κ ir λ grandinių bei BAFF ir bendro IgG kiekio serume (Gottenberg, Aucouturier et al. 2007). Mes savo tyrime nustatėme koreliacijas 1pSS ir 2pSS grupėje tarp κ , λ grandinių (atitinkamai $p<0,001$; $r=+0,815$ ir $p=0,001$; $r=+0,630$). Tik 1pSS grupėje nustatytos koreliacijos tarp κ , λ grandinių ir BAFF kiekio serume (atitinkamai $p=0,002$; $r=+0,513$ ir $p=0,004$; $r=+0,479$), taip pat tarp κ grandinių ir bendro IgG kiekio serume ($p=0,022$; $r=+0,423$). 2pSS grupėje nustatėme neigiamą koreliaciją tarp λ grandinių koncentracijos ir κ/λ santykio ($p=0,002$; $r=-0,612$), taip pat nustatėme neigiamą koreliaciją tarp κ/λ santykio ir C4d koncentracijos serume ($p=0,006$; $r=-0,553$). 1pSS grupėje teigiama vidutinio stiprumo koreliacija nustatyta tarp κ/λ santykio ir B limfocitų ($p=0,024$; $r=+0,412$) bei NK ląstelių ($p=0,037$; $r=+0,383$) absoliučiais skaičiais periferiniame kraujyje, o 2pSS grupėje nustatyta neigiama vidutinio stiprumo koreliacija tarp λ grandinių kiekio serume ir absoliutaus $CD3^+CD4^+$ T limfocitų skaičiaus ($p=0,049$; $r=-0,424$), bei $CD3^+CD4^+/CD3^+CD8^+$ limfocitų

santykio ($p=0,047$; $r=-0,427$) periferiniame kraujyje. Gauti duomenys leidžia imunoglobulinų laisvų grandinių koncentracijos pokyčių nustatymą taikyti kaip biožymenį individualiai ligos eigai įvertinti pSS pacientuose.

4.3.3. Komplemento komponento C4 fragmento C4d kiekybinis įvertinimas

Dar vienas iš biožymenų, rekomenduojamų sisteminių autoimuninių ligų įvertinimui, yra žmogaus komplemento C4 fragmentas C4d, pasižymintis stabilumu ir lengvai nustatomas (Tektonidou and Ward 2011). Komplemento sistemos funkcijų sutrikimai, žemas C3 ir C4 kiekis, identifikuojami kaip nepalankios ligos eigos, limfomos ir priešlaikinės mirties, žymenys (Theander, Manthorpe et al. 2004) (Ramos-Casals, Brito-Zeron et al. 2005).

Mūsų tyrimo duomenys pateikti Pav. 4.3.3. ir lentelėje 4.3.4.1, rodo C4d koncentracijos skirtumus tarp atskirų tiriamųjų grupių.



Pav. 4.3.3. Komplemento C4 fragmento C4d koncentracija pacientų serume. (A – mediana ir 5-95 procentilės; B – rezultatų išsibirstymas ir vidurkis).

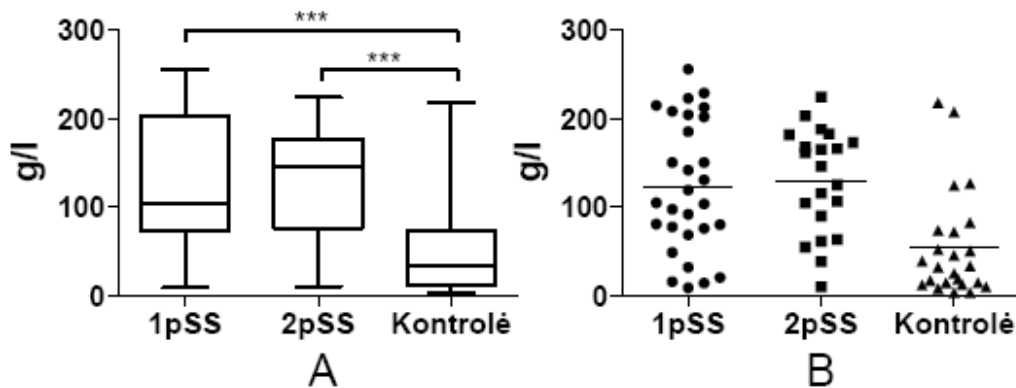
Šio tyrimo rezultatai parodo, kad sergančiųjų pSS be ekstra-liaukinės raiškos, su ekstra-liaukine ligos raiška ir kontrolinės grupės tiriamųjų kraujo serume esanti C4d koncentracija reikšmingai nesiskyrė ($p_{1pSS-K}=0,189$; $p_{2pSS-K}=0,356$; $p_{1pSS-2pSS}=0,757$). Padidėjęs C4d kiekis nurodomas kaip ūmi ligos stadija (Zadura, Theander et al. 2009; Chen, Daha et al. 2010), o sumažėjęs

kiekis – būdingas sunkesnėse ligos stadijose, nes susijęs su autoantikūnų gamyba ir sisteminiais ekstra-liaukiniais ligos požymiais (Theander, Manthorpe et al. 2004; Ramos-Casals, Brito-Zeron et al. 2005). Savo tyrime 2pSS pacientų grupės serume mes nustatėme vidutinio stiprumo neigiamą koreliaciją tarp C4d koncentracijos ir LLG κ/λ santykio ($p=0,006$; $r=-0,553$), taip pat neigiamo ryšio tendencijas tarp C4d ir autoantikūnų anti-Ro/SSA ir anti-La/SSB koncentracijų, bet jos statistiškai nereikšmingos (atitinkamai $p=0,0509$; $r=-0,431$ ir $p=0,054$; $r=-0,436$). Šio fragmento tyrimas, manoma, gali būti daugiau informatyvus vertinant individualiai pacientus, ypač lyginant su kitais klinikiniais rodikliais. Tai patvirtina ir detalesnis vienos 1pSS grupės pacientės kraujo mėginių tyrimas metų bėgyje, parodęs C4d fragmento koncentracijos mažėjimą (nuo 2,07 $\mu\text{g/ml}$ (2011.04.13), iki 1,33 $\mu\text{g/ml}$ (2011.09.13) ir 0,73 $\mu\text{g/ml}$ (2011.11.21)). Taip pat vienos 2pSS grupės pacientės C4d tyrimo mėginys rodė 0 vertę, o tai, remiantis literatūra rodo visišką komplemento sistemos išsekimą ir padidėjusią mirties riziką (Ioannidis, Vassiliou et al. 2002). Zadura ir kt. savo tyrimuose pSS pacientų su ekstra-liaukine raiška grupėje nustatė C4b prijungiančio baltymo (C4b-binding protein C4BP) koncentracijos serume sumažėjimo ryšį, paraleliai mažėjant C3 ir C4 komplemento dalių koncentracijai serume ir CD4^+ T limfocitų skaičiui. Analizuodami savo tyrimų rezultatus nenustatėme ryšio tarp C4d pokyčių ir $\text{CD3}^+\text{CD4}^+/\text{CD3}^+\text{CD8}^+$ ($\text{CD3}^+\text{CD4}^+/\text{CD3}^+\text{CD8}^+$ santykio duomenys nepateikti) santykio periferiniame kraujyje, bet nustatėme teigiamą vidutinio stiprumo koreliaciją tarp C4d ir $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$ ($p=0,023$; $r=+0,414$), $\text{CD8}^+\text{CD57}^+\text{CD27}^-$ ($p=0,026$; $r=+0,405$) bei NKT ($p=0,002$; $r=+0,550$) limfocitų absoliutaus skaičiaus periferiniame kraujyje 1pSS pacientų grupės rezultatuose.

4.3.4. Imunoglobulino G kiekybinis įvertinimas

B ląstelių polikloninis aktyvavimas yra vienas iš būdingiausių imunoreguliacijos sutrikimų, pasireiškiantis pSS patogenezėje. Šis sutrikimas yra lydimas hipergamaglobulinemijos ir įvairių autoantikūnų gamybos (Bohnhorst, Bjorgan et al. 2002). Šie imuninės reguliacijos sutrikimai yra

siejami su padidėjusia limfomos išsivystymo tikimybe pSS pacientuose (Solans-Laque, Lopez-Hernandez et al. 2011), todėl savo tyrime taip pat įvertinome bendro IgG koncentraciją pSS ir kontrolinės grupės tiriamųjų kraujo serume (Pav. 4.3.4.), bei ryšį su kitais tirtais imunologiniais rodikliais.



Pav. 4.3.4. IgG koncentracija pacientų serume, (A – mediana ir 5-95 procentilės; B – rezultatų išsibarstymas ir vidurkis). * - Mann-Whitney U testas.

Tyrimo rezultatai parodė, kad bendro IgG koncentracija 1pSS ir 2pSS grupių pacientų kraujo serume buvo statistiškai reikšmingai padidėjusi lyginant su kontrolinės grupės tiriamųjų rodikliais ($p_{1pSS-K}=0,001$; $p_{2pSS-K}=0,0003$). IgG koncentracijos padidėjimą pSS pacientų kraujo serume nustatė ir kiti tyrėjai (Bohnhorst, Bjorgan et al. 2002; Pollard, Abdulahad et al. 2013). Patikimo skirtumo tarp 1pSS ir 2pSS grupių rezultatų nenustatėme ($p_{1pSS-2pSS}=0,724$). Bohnhorst ir kt. savo tyrimuose nustatė stiprią teigiamą koreliaciją tarp tirpios CD27 molekulės koncentracijos ir IgG koncentracijos pSS pacientų kraujo serume (Bohnhorst, Bjorgan et al. 2002), o Gottenberg ir kt. nustatė teigiamą ryšį tarp IgG ir κ , λ laisvų lengvųjų grandinių koncentracijos padidėjimo pSS pacientų serume (Gottenberg, Aucouturier et al. 2007). Savo tyrime taip pat nustatėme teigiamą vidutinio stiprumo koreliaciją tarp IgG ir κ LLG koncentracijos ($p=0,022$; $r=+0,423$) 1pSS pacientų serume. 2pSS pacientų serume nustatėme teigiamą vidutinio stiprumo koreliaciją tarp IgG ir autoantikūnų anti-Ro/SSA koncentracijos ($p=0,029$; $r=+0,477$), tačiau savo

tyrime nenustatėme ryšių tarp IgG koncentracijos su BAFF, bei C4d. Nustatytas ryšys tarp padidėjusios IgG koncentracijos serume ir sumažėjusio absoliutaus Th17 limfocitų ($p=0,022$; $r=-0,448$) skaičiaus 1pSS pacientų periferiniame kraujyje, 2pSS grupėje nustatytas ryšys tarp padidėjusios IgG koncentracijos serume ir sumažėjusio absoliutaus $CD3^+$ ($p=0,0032$; $r=-0,627$), $CD3^+CD4^+$ limfocitų ($p=0,016$; $r=-0,531$), ir NK ($p=0,006$; $r=-0,591$) ląstelių skaičiaus, bei $CD3^+CD4^+/CD3^+CD8^+$ limfocitų santykio ($p=0,044$; $r=-0,454$) periferiniame kraujyje. Statistiškai reikšmingo skirtumo tarp pSS sergančiųjų su ekstra-liaukine raiška ir be jos analizuojant IgG koncentraciją tiriamųjų kraujo serume nenustatėme. Šie rezultatai, rodo skirtingus ryšius tarp hipergamaglobulinemijos ir limfocitų populiacijų pokyčių, galimai parodydami patogenezės mechanizmų skirtumus 1pSS ir 2pSS grupėse.

Lentelė 4.3.4.1. Sergančiųjų pirminiu Sjögreno sindromu 1pSS, 2pSS ir kontrolinių tiriamųjų BAFF, LLG κ ir λ , κ/λ santykio, C4d ir bendros IgG koncentracijos kraujo serume standartiniai nuokrypiai ir patikimumo rodikliai tarp grupių.

	1 pSS (I grupė) (n=35)		2 pSS (II grupė) (n=23)		Kontrolė (III grupė) (n=22)		P I-II	P I-III	P II-III
	vidurkis	SN	vidurkis	SN	vidurkis	SN			
BAFF (ng/ml)	4,273	1,768	4,941	2,465	3,290	1,105	0,283	0,004	0,09
κ (mg/l)	9,945	5,476	15,569	9,459	6,949	2,551	0,012	0,059	0,001
λ (mg/l)	10,297	9,298	16,259	14,224	6,937	3,206	0,108	0,119	0,012
κ/λ	1,16	0,56	1,35	0,75	1,06	0,34	0,150	0,928	0,256
C4d (μ g/ml)	2,22	1,55	2,46	1,59	2,86	1,90	0,757	0,189	0,356
IgG (g/l)	122,40	74,64	129,96	59,63	60,69	63,51	0,724	0,001	0,0003

* - Mann-Whitney U testas

4.3.5. Sisteminė interleukinų -27 ir -35 raiška ir jos ryšys su klinikiniais žymenimis sergantiesiems pirminiu Sjögreno sindromu

Pastaraisiais metais tiriant autoimuninių ligų modelius labai susidomėta IL-27 ir IL-35 reguliaciniu poveikiu autoimuniniams procesams. Todėl, šių interleukinų koncentracijos tyrimą pSS pacientų kraujo serume įtraukėme į imuninės sistemos dalių tyrimų planą. Sergantiesiems pSS nustatyta statistiškai reikšmingai padidėjusi IL-27 ($p < 0,001$) ir IL-35 ($p < 0,001$) koncentracija kraujo serume lyginant su kontrolinės grupės pacientų rezultatais (Lentelė 4.3.5.1.).

Lentelė 4.3.5.1. IL-27 ir IL-35 koncentracijų tiriamųjų kraujo serume palyginimas

	<i>Sveikos kontrolės</i> (<i>n</i> = 50)			<i>Pirminis Sjögreno sindromas</i> (<i>n</i> = 50)			p*
	vidurkis	mediana	SN	vidurkis	mediana	SN	
<i>IL-27</i> (pg/ml)	2255	2112	1824	62558	20085	80418	<0,001
<i>IL-35</i> (pg/ml)	3497	3231	2067	126059	42556	184382	<0,001

*- Mann-Whitney testas.

Panašius rezultatus gavo Yoshizaki ir kt. tirdami IL-27 raišką sergančiųjų sisteminė skleroze pacientų serume. Nustatytas padidintas IL-27 kiekis sergančiųjų sisteminė skleroze pacientų serume lyginant su sveikų asmenų rezultatais. Taip pat, nustatytas ryšys tarp IL-27 kiekio padidėjimo ir padidėjusio B ląstelių sintetinio IgG kiekio, bei padidėjusio CD4 limfocitų sintetinio IL-17 kiekio. IL-27 kiekis buvo didesnis tų pacientų kraujyje, kuriems ligos trukmė buvo ilgesnė (Yoshizaki, Yanaba et al. 2011).

Literatūroje aprašyti kitų autorių tyrimai, nagrinėjant IL-27 funkcijas imuninio atsako reguliavime, kiek kontraversiški. Skirtingų autorių duomenimis IL-27 gali veikti ir kaip apsauginis (Lee, Carcamo et al. 2012), ir

kaip uždegiminis humoralinis veiksnys (Wang, Han et al. 2008). Kaip parodė Lee ir kolegų tyrimas Sjögreno sindromo pelių modelyje, pelėms gavusioms injekcijas į veną viruso vektorius ekspresuojančius IL-27, pasireiškė ilgalaikis IL-27 lygio padidėjimas serume, kuris sąlygojo sušvelnėjusią ligos eigą, be to sumažėjo IL-17 kiekis serume, sumažėjo ANA titrai, sušvelnėjo klinikiniai požymiai susiję su seilių sekreto išsiskyrimu (Lee, Carcamo et al. 2012). Nepaisant nustatyto padidėjusio IL-27 lygio pSS sergančių pacientų kraujo serume, šių dienų mokslo supratimas apie IL-27 vaidmenį pSS patogenezėje labai ribotas. Reikėtų detalesnių tyrimų įvertinant kokį vaidmenį, apsauginį ar patogeninį, šis interleukinas vaidina pSS patogenezėje.

IL-35 savo funkcijomis labai panašus į IL-27. Šio interleukino poveikis dvejopas, esant ūmiai infekcijai jis gali aktyvinti efektorines ląsteles, o pasireiškiant aktyviai uždegimo stadijai – selektyviai supresuoti efektorines ląsteles indukuojant Treg limfocitus ir taip apsaugant nuo autoimuninio atsako išsivystymo (Niedbala, Wei et al. 2007). Literatūroje nėra duomenų apie šio interleukino vaidmenį pSS patogenezėje, tačiau mūsų nustatytas jo kiekio padidėjimas pSS pacientų kraujo serume rodo, kad jis taip pat atlieka tam tikrą vaidmenį šiame patologiniame procese.

5. IŠVADOS

1. Pirminių Sjögreno sindromu (pSS) sergančių pacientų periferiniame kraujyje nustatyta limfocitopenija dėl sumažėjusio T ir NK limfocitų absoliutaus skaičiaus. T limfocitų kiekio sumažėjimą nulemia statistiškai reikšmingai sumažėjęs absoliutus NKT limfocitų ir CD3⁺CD4⁺ ir CD3⁺CD8⁺ populiacijų, kuriose atitinkamai sumažėja CD4⁺IL-17A⁺ ir CD8⁺CD57⁻CD27⁺ limfocitų kiekis, ląstelių skaičius. Statistiškai reikšmingų B limfocitų absoliutaus skaičiaus pokyčių pSS sergančių pacientų periferiniame kraujyje nenustatyta.

2. Pirminių Sjögreno sindromu sergančių pacientų periferiniame kraujyje Th limfocitų populiacijų pusiausvyros disbalansą sąlygoja Th2 limfocitų populiacijos procentinės dalies sumažėjimo tendencija ir statistiškai reikšmingas Th17/Th1-like limfocitų populiacijos procentinės dalies padidėjimas ($p=0,0029$).

3. Humoralinio imuninio atsako komponentų disbalansas periferiniame kraujyje ryškiau išreikštas sergančių pirminių Sjögreno sindromu su ekstra-liaukine raiška (2pSS) tiriamųjų grupėje:

3.1 Statistiškai reikšmingas BAFF koncentracijos padidėjimas nustatytas sergančių pirminių Sjögreno su ekstra-liaukine raiška tiriamųjų serume ($p=0,004$), tačiau BAFF koncentracijos pokyčiai šioje grupėje nekoreliavo su ląstelinio imuninio atsako komponentų pokyčiais. Sergančių pirminių Sjögreno sindromu tiriamųjų tik su liaukine raiška (1pSS) grupėje BAFF koncentracija serume neigiamai koreliavo su B ir T limfocitų populiacijų pokyčiais (CD4⁺, CD8⁺ ir jos CD8⁺CD57⁻CD27⁺ subpopuliacija).

3.2 Sergančių pirminių Sjögreno sindromu tiriamųjų serume nustatytas laisvų lengvųjų κ ir λ grandinių koncentracijos padidėjimas, rodantis B ląstelių hiperaktyvumą ir jų produktų balanso sutrikimą, tačiau tik pacientų grupėje su sindromo ekstra-liaukine raiška šis padidėjimas buvo statistiškai reikšmingas ($\kappa p=0,001$, $\lambda p=0,012$).

3.3 IgG koncentracija statistiškai reikšmingai padidėja tiek sergančių pirminiu Sjögreno sindromu su ekstraliaukine raiška ($p=0,0003$), tiek ir sergančių pirminiu Sjögreno sindromu tik su liaukine raiška ($p=0,001$) tiriamųjų grupių serume.

4. C4d koncentracija serume reikšmingai nesiskyrė tarp tiriamųjų grupių, tačiau 2pSS pacientų grupės serume nustatyta neigiama koreliacija tarp C4d koncentracijos ir LLG κ/λ santykio, taip pat neigiamo ryšio tendencija su anti-Ro/SSA ir anti-La/SSB autoantikūnų koncentracija (atitinkamai $p=0,0509$; $r=-0,431$ ir $p=0,054$; $r=-0,436$). Šie koreliaciniai ryšiai su ligos eigos sunkumą apibūdinančiais veiksniais, rodo C4d fragmento potencialą vertinant ligos eigą.

5. Sergančių pSS serume nustatytas statistiškai reikšmingas interleukinų IL-27 ir IL-35 koncentracijų padidėjimas (atitinkamai ($p<0,001$) ir ($p<0,001$)), rodantis šių interleukinų svarbą pSS patogenezėje.

6. PUBLIKACIJŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS

1. G. Sūdžius, D. Mieliauskaitė, I. Butrimienė, A. Šiaurys, Z. Mackiewicz, I. Dumalakienė. Activity of T-helper cells in patients with primary Sjögren's syndrome. In Vivo. 2013. 27: 263-268. Straipsnis paskelbtas ir Global Medical Discovery [ISSN 1929-8536] puslapyje (<http://globalmedicaldiscovery.com>).
2. G. Sūdžius, D. Mieliauskaitė, A. Šiaurys, R. Vilienė, I. Butrimienė, D. Characiejus, I. Dumalakienė. Could the complement component C4 or its fragment C4d be a marker of the more severe conditions in patients with primary Sjögren's syndrome? Rheumatol Int (2013) j: 1–9. DOI 10.1007/s00296-013-2885-y

7. PRANEŠIMAI KONFERENCIJOSE

1. **G. Sudzius**, I. Dumalakiene, A. Siaurys, D. Mieliauskaite, I. Butrimiene, Z. Mackiewicz. Activity of T helper cells in patients with primary Sjogren's syndrome. European Congress of Immunology, ECI 2012 Glasgow, JK. Abstracts of poster session on 5-8 September, 2012. Tezės atspausdintos: Immunology, 2012, 137 (Suppl. 1), p. 345.

2. **Sudzius G**, Characiejus D, Mieliauskaite D, Siaurys A, Butrimiene I and Dumalakiene I. Distribution of peripheral blood lymphocyte populations in patients with primary Sjögren's syndrome. Conference Abstract: 15th International Congress of Immunology (ICI). Tezės atspausdintos: Frontiers in Immunology, 2013.

3. Dumalakiene I, Siaurys A, Mieliauskaite D, Butrimiene I, Characiejus D, Mauricas M and **Sudzius G**. BAFF, κ and λ free light chains, C4d and IgG in serum and relations with peripheral blood lymphocyte populations in patients with primary Sjögren's syndrome. Conference Abstract: 15th International Congress of Immunology (ICI). Tezės atspausdintos: Frontiers in Immunology, 2013.

8. LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Abdulahad, W. H., Y. M. van der Geld, et al. (2006). "Persistent expansion of CD4+ effector memory T cells in Wegener's granulomatosis." Kidney Int 70(5): 938-947.
2. Abedin, S., J. J. Michel, et al. (2005). "Diversity of NKR expression in aging T cells and in T cells of the aged: The new frontier into the exploration of protective immunity in the elderly." Experimental Gerontology 40(7): 537-548.
3. Acosta-Rodriguez, E. V., L. Rivino, et al. (2007). "Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells." Nat Immunol 8(6): 639-646.
4. Agmon-Levin, N., Z. Lian, et al. (2011). "Explosion of autoimmune diseases and the mosaic of old and novel factors." Cell Mol Immunol 8(3): 189-192.
5. Albareda, M. C., S. A. Laucella, et al. (2006). "Trypanosoma cruzi modulates the profile of memory CD8+ T cells in chronic Chagas' disease patients." Int Immunol 18(3): 465-471.
6. Anaya, J. M., G. T. Liu, et al. (1995). "Primary Sjogren's syndrome in men." Ann Rheum Dis 54(9): 748-751.
7. Annunziato, F., L. Cosmi, et al. (2007). "Phenotypic and functional features of human Th17 cells." J Exp Med 204(8): 1849-1861.
8. Ansell, S. M., C. S. Grant, et al. (1999). "Primary thyroid lymphoma." Semin Oncol 26(3): 316-323.
9. Arens, R., K. Schepers, et al. (2004). "Tumor rejection induced by CD70-mediated quantitative and qualitative effects on effector CD8+ T cell formation." J Exp Med 199(11): 1595-1605.
10. Arosa, F. A. (2002). "CD8+CD28- T cells: certainties and uncertainties of a prevalent human T-cell subset." Immunol Cell Biol 80(1): 1-13.
11. Artis, D., L. M. Johnson, et al. (2004). "Cutting edge: early IL-4 production governs the requirement for IL-27-WSX-1 signaling in the

development of protective Th1 cytokine responses following Leishmania major infection." J Immunol 172(8): 4672-4675.

12. Baek, S. H., S. G. Lee, et al. (2012). "Increased synovial expression of IL-27 by IL-17 in rheumatoid arthritis." Inflamm Res 61(12): 1339-1345.

13. Batten, M., J. Li, et al. (2006). "Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells." Nat Immunol 7(9): 929-936.

14. Bettini, M., A. H. Castellaw, et al. (2012). "Prevention of autoimmune diabetes by ectopic pancreatic beta-cell expression of interleukin-35." Diabetes 61(6): 1519-1526.

15. Binard, A., L. Le Pottier, et al. (2009). "Is the blood B-cell subset profile diagnostic for Sjogren syndrome?" Ann Rheum Dis 68(9): 1447-1452.

16. Bohnhorst, J. O., M. B. Bjorgan, et al. (2002). "Abnormal B cell differentiation in primary Sjogren's syndrome results in a depressed percentage of circulating memory B cells and elevated levels of soluble CD27 that correlate with Serum IgG concentration." Clin Immunol 103(1): 79-88.

17. Bohnhorst, J. O., M. B. Bjorgan, et al. (2001). "Bm1-Bm5 classification of peripheral blood B cells reveals circulating germinal center founder cells in healthy individuals and disturbance in the B cell subpopulations in patients with primary Sjogren's syndrome." J Immunol 167(7): 3610-3618.

18. Bombardieri, M. and C. Pitzalis (2012). "Ectopic Lymphoid Neogenesis and Lymphoid Chemokines in Sjogren's Syndrome: At the Interplay between Chronic Inflammation, Autoimmunity and Lymphomagenesis." Current Pharmaceutical Biotechnology 13(10): 1989-1996.

19. Boniface, K., W. M. Blumenschein, et al. (2010). "Human Th17 cells comprise heterogeneous subsets including IFN-gamma-producing cells with distinct properties from the Th1 lineage." J Immunol 185(1): 679-687.

20. Bradwell, A. R. (2005). "Serum free light chain measurements move to center stage." Clin Chem 51(5): 805-807.

21. Chamian, F., S. L. Lin, et al. (2007). "Alefacept (anti-CD2) causes a selective reduction in circulating effector memory T cells (Tem) and relative preservation of central memory T cells (Tcm) in psoriasis." J Transl Med 5: 27.
22. Characiejus, D., V. P. Pasukoniene, et al. (2008). "Peripheral blood CD8^{high}CD57⁺ lymphocyte levels may predict outcome in melanoma patients treated with adjuvant interferon-alpha." Anticancer Research 28(2B): 1139-1142.
23. Chen, M., M. R. Daha, et al. (2010). "The complement system in systemic autoimmune disease." J Autoimmun 34(3): J276-286.
24. Chen, Q., N. Ghilardi, et al. (2000). "Development of Th1-type immune responses requires the type I cytokine receptor TCCR." Nature 407(6806): 916-920.
25. Cho, B. A., J. H. Sim, et al. (2012). "Characterization of effector memory CD8⁺ T cells in the synovial fluid of rheumatoid arthritis." J Clin Immunol 32(4): 709-720.
26. Christodoulou, M. I., E. K. Kapsogeorgou, et al. (2010). "Characteristics of the minor salivary gland infiltrates in Sjogren's syndrome." J Autoimmun 34(4): 400-407.
27. Christodoulou, M. I., E. K. Kapsogeorgou, et al. (2008). "Foxp3⁺ T-regulatory cells in Sjogren's syndrome: correlation with the grade of the autoimmune lesion and certain adverse prognostic factors." Am J Pathol 173(5): 1389-1396.
28. Cocco, C., F. Morandi, et al. (2011). "Interleukin-27 and interleukin-23 modulate human plasmacell functions." J Leukoc Biol 89(5): 729-734.
29. Colin, E. M., P. S. Asmawidjaja, et al. (2010). "1,25-dihydroxyvitamin D3 modulates Th17 polarization and interleukin-22 expression by memory T cells from patients with early rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum 62(1): 132-142.
30. Collison, L. W., G. M. Delgoffe, et al. (2012). "The composition and signaling of the IL-35 receptor are unconventional." Nat Immunol 13(3): 290-299.

31. Collison, L. W., C. J. Workman, et al. (2007). "The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function." Nature 450(7169): 566-569.
32. Connolly, M. K. (2001). "Sjogren's syndrome." Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery 20(1): 46-52.
33. Cornec, D., J. Avouac, et al. (2009). "Critical analysis of rituximab-induced serological changes in connective tissue diseases." Autoimmun Rev 8(6): 515-519.
34. Daridon, C., P. Youinou, et al. (2008). "BAFF, APRIL, TWE-PRIL: who's who?" Autoimmun Rev 7(4): 267-271.
35. DI. Yannopoulos , R. S., Lamour A, Pennec YL, Moutsopoulos HM, Youinou P (1992). "Conjunctival epithelial cells from patients with Sjögren's syndrome inappropriately express major histocompatibility complex molecules, La (SS-B) antigen, and heat-shock proteins." J Clin Immunol 12: 259–265.
36. Do, R. K., E. Hatada, et al. (2000). "Attenuation of apoptosis underlies B lymphocyte stimulator enhancement of humoral immune response." J Exp Med 192(7): 953-964.
37. Eriksson, P., G. Almroth, et al. (1994). "IgG2 deficiency in primary Sjogren's syndrome and hypergammaglobulinemic purpura." Clin Immunol Immunopathol 70(1): 60-65.
38. Filaci, G., D. Fenoglio, et al. (2007). "CD8+ CD28- T regulatory lymphocytes inhibiting T cell proliferative and cytotoxic functions infiltrate human cancers." J Immunol 179(7): 4323-4334.
39. Focosi, D., M. Bestagno, et al. (2010). "CD57+ T lymphocytes and functional immune deficiency." J Leukoc Biol 87(1): 107-116.
40. Fox, R. I. (2005). "Sjogren's syndrome." Lancet 366(9482): 321-331.
41. Fox, R. I. (2012). "Extraglandular Manifestations of Sjögren's Syndrome (SS): Dermatologic, Arthritic, Endocrine, Pulmonary, Cardiovascular, Gastroenterology, Renal, Urology, and Gynecologic Manifestations." Sjögren's Syndrome 285-316.

42. Fox, R. I., S. A. Carstens, et al. (1982). "Use of monoclonal antibodies to analyze peripheral blood and salivary gland lymphocyte subsets in Sjogren's syndrome." Arthritis Rheum 25(4): 419-426.
43. Fox, R. I., H. I. Kang, et al. (1994). "Cytokine mRNA expression in salivary gland biopsies of Sjogren's syndrome." J Immunol 152(11): 5532-5539.
44. Friedman, K. M., L. E. Devillier, et al. (2011). "Augmented lymphocyte expansion from solid tumors with engineered cells for costimulatory enhancement." J Immunother 34(9): 651-661.
45. Garcí'a-Carrasco, M., S. Fuentes-Alexandro, et al. (2006). "Pathophysiology of Sjögren's Syndrome." Archives of Medical Research 37 921-932.
46. Goldberg, R., G. Wildbaum, et al. (2004). "Suppression of ongoing adjuvant-induced arthritis by neutralizing the function of the p28 subunit of IL-27." J Immunol 173(2): 1171-1178.
47. Gottenberg, J., N. Cagnard, et al. (2006). "Activation of IFN pathways and plasmacytoid dendritic cell recruitment in target organs of primary Sjögren's syndrome." Proc Natl Acad Sci U S A 103(8): 2770-2775.
48. Gottenberg, J. E., F. Aucouturier, et al. (2007). "Serum immunoglobulin free light chain assessment in rheumatoid arthritis and primary Sjogren's syndrome." Ann Rheum Dis 66(1): 23-27.
49. Gottenberg, J. E., F. Lavie, et al. (2005). "CD4 CD25high regulatory T cells are not impaired in patients with primary Sjogren's syndrome." J Autoimmun 24(3): 235-242.
50. Graber, J. J., S. R. Allie, et al. (2008). "Interleukin-17 in transverse myelitis and multiple sclerosis." J Neuroimmunol 196(1-2): 124-132.
51. Green, M. R., A. S. Kennell, et al. (2005). "Natural killer cell activity in families of patients with systemic lupus erythematosus: demonstration of a killing defect in patients." Clin Exp Immunol 141(1): 165-173.

52. Groom, J., S. L. Kalled, et al. (2002). "Association of BAFF/BLyS overexpression and altered B cell differentiation with Sjogren's syndrome." J Clin Invest 109(1): 59-68.
53. Hayashi, Y., N. Haneji, et al. (1994). "Pathogenesis of Sjogren's syndrome-like autoimmune lesions in MRL/lpr mice." Pathol Int 44(8): 559-568.
54. Hamano, S., K. Himeno, et al. (2003). "WSX-1 is required for resistance to Trypanosoma cruzi infection by regulation of proinflammatory cytokine production." Immunity 19(5): 657-667.
55. Hamza, N., N. A. Bos, et al. (2012). "B-cell populations and subpopulations in Sjogren's syndrome." Presse Med 41(9 Pt 2): e475-483.
56. Hansen, A., P. E. Lipsky, et al. (2005). "Immunopathogenesis of primary Sjogren's syndrome: implications for disease management and therapy." Curr Opin Rheumatol 17(5): 558-565.
57. Hansen, A., P. E. Lipsky, et al. (2007). "B cells in Sjogren's syndrome: indications for disturbed selection and differentiation in ectopic lymphoid tissue." Arthritis Res Ther 9(4): 218.
58. Harrington, L. E., R. D. Hatton, et al. (2005). "Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages." Nat Immunol 6(11): 1123-1132.
59. Haugen, A., E. Peen, et al. (2008). "Estimation of the prevalence of primary Sjögren's syndrome in two age-different community-based populations using two sets of classification criteria: the Hordaland Health Study." Scand J Rheumatol 37(1): 30-34.
60. Helmick, C. G., D. T. Felson, et al. (2008). "Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part I." Arthritis Rheum 58(1): 15-25.
61. Hernandez-Molina, G., G. Leal-Alegre, et al. (2011). "The meaning of anti-Ro and anti-La antibodies in primary Sjogren's syndrome." Autoimmun Rev 10(3): 123-125.

62. Hibbert, L., S. Pflanz, et al. (2003). "IL-27 and IFN-alpha signal via Stat1 and Stat3 and induce T-Bet and IL-12Rbeta2 in naive T cells." J Interferon Cytokine Res 23(9): 513-522.
63. Hsi, E. D., T. P. Singleton, et al. (1998). "Characterization of the lymphoid infiltrate in Hashimoto thyroiditis by immunohistochemistry and polymerase chain reaction for immunoglobulin heavy chain gene rearrangement." Am J Clin Pathol 110(3): 327-333.
64. Huang, J., K. W. Kerstann, et al. (2006). "Modulation by IL-2 of CD70 and CD27 expression on CD8+ T cells: importance for the therapeutic effectiveness of cell transfer immunotherapy." J Immunol 176(12): 7726-7735.
65. Hue, S., P. Ahern, et al. (2006). "Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation." J Exp Med 203(11): 2473-2483.
66. Hunter, C. A. (2005). "New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions." Nat Rev Immunol 5(7): 521-531.
67. Hutloff, A., K. Buchner, et al. (2004). "Involvement of inducible costimulator in the exaggerated memory B cell and plasma cell generation in systemic lupus erythematosus." Arthritis Rheum 50(10): 3211-3220.
68. Ichikawa, Y., K. Arimori, et al. (1995). "Abnormal expression of apoptosis-related antigens, Fas and bcl-2, on circulating T-lymphocyte subsets in primary Sjogren's syndrome." Clin Exp Rheumatol 13(3): 307-313.
69. Ioannidis, J. P., V. A. Vassiliou, et al. (2002). "Long-term risk of mortality and lymphoproliferative disease and predictive classification of primary Sjogren's syndrome." Arthritis Rheum 46(3): 741-747.
70. Yamada, S., K. Shinozaki, et al. (2002). "Involvement of CD27/CD70 interactions in antigen-specific cytotoxic T-lymphocyte (CTL) activity by perforin-mediated cytotoxicity." Clin Exp Immunol 130(3): 424-430.
71. Yoshizaki, A., K. Yanaba, et al. (2011). "Elevated serum interleukin-27 levels in patients with systemic sclerosis: association with T cell, B cell and fibroblast activation." Ann Rheum Dis 70(1): 194-200.
72. Youinou, P. and J. O. Pers (2011). "Disturbance of cytokine networks in Sjogren's syndrome." Arthritis Res Ther 13(4): 227.

73. Jonsson, M. V., P. Szodoray, et al. (2005). "Association between circulating levels of the novel TNF family members APRIL and BAFF and lymphoid organization in primary Sjogren's syndrome." Journal of Clinical Immunology 25(3): 189-201.
74. Jonsson, R., P. Vogelsang, et al. (2011). "The complexity of Sjögren's syndrome: novel aspects on pathogenesis." Immunol Lett 141(1): 1–9.
75. Kallenberg, C. G. M., A. Vissink, et al. (2011). "What have we learned from clinical trials in primary Sjogren's syndrome about pathogenesis?" Arthritis Res Ther 13(1).
76. Kang, G. S., S. H. Kim, et al. (2012). "Altered Th17 and Th1 cells responses in patients with primary Sjogren syndrome." Journal of Immunology 188.
77. Kassan, S. S. and H. M. Moutsopoulos (2004). "Clinical manifestations and early diagnosis of Sjogren syndrome." Arch Intern Med 164(12): 1275-1284.
78. Katsifis, G. E., S. Rekka, et al. (2009). "Systemic and local interleukin-17 and linked cytokines associated with Sjogren's syndrome immunopathogenesis." Am J Pathol 175(3): 1167-1177.
79. Katzmann, J. A., R. S. Abraham, et al. (2005). "Diagnostic performance of quantitative kappa and lambda free light chain assays in clinical practice." Clin Chem 51(5): 878-881.
80. Kebir, H., I. Ifergan, et al. (2009). "Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing TH17 cells in multiple sclerosis." Ann Neurol 66(3): 390-402.
81. Kobayashi, T., S. Okamoto, et al. (2008). "IL23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease." Gut 57(12): 1682-1689.
82. Kohriyama, K. and Y. Katayama (2000). "Disproportion of helper T cell subsets in peripheral blood of patients with primary Sjogren's syndrome." Autoimmunity 32(1): 67-72.

83. Kojo, S., Y. Adachi, et al. (2001). "Dysfunction of T cell receptor AV24AJ18+, BV11+ double-negative regulatory natural killer T cells in autoimmune diseases." Arthritis Rheum 44(5): 1127-1138.
84. Kolkowski, E. C., P. Reth, et al. (1999). "Th1 predominance and perforin expression in minor salivary glands from patients with primary Sjogren's syndrome." J Autoimmun 13(1): 155-162.
85. Kullberg, M. C., D. Jankovic, et al. (2006). "IL-23 plays a key role in Helicobacter hepaticus-induced T cell-dependent colitis." J Exp Med 203(11): 2485-2494.
86. Larousserie, F., P. Charlot, et al. (2006). "Differential effects of IL-27 on human B cell subsets." J Immunol 176(10): 5890-5897.
87. Lavie, F., C. Miceli-Richard, et al. (2007). "Increase of B cell-activating factor of the TNF family (BAFF) after rituximab treatment: insights into a new regulating system of BAFF production." Ann Rheum Dis 66(5): 700-703.
88. Lavie, F., C. Miceli-Richard, et al. (2004). "Expression of BAFF (BLyS) in T cells infiltrating labial salivary glands from patients with Sjogren's syndrome." J Pathol 202(4): 496-502.
89. Lazuardi, L., D. Herndler-Brandstetter, et al. (2009). "Microarray analysis reveals similarity between CD8(+)CD28(-) T cells from young and elderly persons, but not of CD8(+)CD28(+) T cells." Biogerontology 10(2): 191-202.
90. Le Priol, Y., D. Puthier, et al. (2006). "High cytotoxic and specific migratory potencies of senescent CD8+ CD57+ cells in HIV-infected and uninfected individuals." J Immunol 177(8): 5145-5154.
91. Lee, B. H., W. C. Carcamo, et al. (2012). "Gene therapy using IL-27 ameliorates Sjogren's syndrome-like autoimmune exocrinopathy." Arthritis Res Ther 14(4): R172.
92. Li, X., L. Qian, et al. (2007). "T regulatory cells are markedly diminished in diseased salivary glands of patients with primary Sjogren's syndrome." J Rheumatol 34(12): 2438-2445.

93. Li, X. M., X. P. Li, et al. (2007). "[Expression of CD4+ CD25+ regulatory T cells in peripheral blood and salivary gland of patients with primary Sjogren's syndrome]." Zhonghua Yi Xue Za Zhi 87(15): 1034-1036.
94. Liu, Y. and J. Li (2011). "Preferentially immunoglobulin (IgG) subclasses production in primary Sjogren's syndrome patients." Clin Chem Lab Med.
95. Liu, Y. J. (2005). "IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors." Annu Rev Immunol 23: 275-306.
96. Liu, M. F., L. H. Lin, et al. (2008). "Decreased CD4+CD25+bright T cells in peripheral blood of patients with primary Sjogren's syndrome." Lupus 17(1): 34-39.
97. Low, H. Z. and T. Witte (2011). "Aspects of innate immunity in Sjogren's syndrome." Arthritis Res Ther 13(3): 218.
98. Lucas, S., N. Ghilardi, et al. (2003). "IL-27 regulates IL-12 responsiveness of naive CD4(+) T cells through Stat1-dependent and -independent mechanisms." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100(25): 15047-15052.
99. Lurati, A., L. Bertani, et al. (2012). "NK cell count as predictor of clinical response in patients with rheumatoid arthritis treated with rituximab." Biologics 6: 83-87.
100. Mackay, C. R. (1999). "Dual personality of memory T cells." Nature 401(6754): 659-660.
101. Mandl, T., A. Bredberg, et al. (2004). "CD4+ T-lymphocytopenia--a frequent finding in anti-SSA antibody seropositive patients with primary Sjogren's syndrome." J Rheumatol 31(4): 726-728.
102. Manganelli, P. and P. Fietta (2003). "Apoptosis and Sjogren syndrome." Semin Arthritis Rheum 33(1): 49-65.
103. Manoussakis, M. N. and H. M. Moutsopoulos (2000). "Sjogren's syndrome: autoimmune epithelitis." Baillieres Best Pract Res Clin Rheumatol 14(1): 73-95.

104. Manthorpe, R., K. Asmussen, et al. (1997). "Primary Sjogren's syndrome: diagnostic criteria, clinical features, and disease activity." J Rheumatol Suppl 50: 8-11.
105. Mariette, X., S. Roux, et al. (2003). "The level of BLyS (BAFF) correlates with the titre of autoantibodies in human Sjogren's syndrome." Ann Rheum Dis 62(2): 168-171.
106. Masaki, Y., L. Dong, et al. (2009). "Proposal for a new clinical entity, IgG4-positive multiorgan lymphoproliferative syndrome: analysis of 64 cases of IgG4-related disorders." Ann Rheum Dis 68(8): 1310-1315.
107. McGeachy, M. J., K. S. Bak-Jensen, et al. (2007). "TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology." Nat Immunol 8(12): 1390-1397.
108. Meijer, J. M., P. M. Meiners, et al. (2010). "Effectiveness of rituximab treatment in primary Sjogren's syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial." Arthritis Rheum 62(4): 960-968.
109. Mieliauskaitė, D. (2010). "Kserostomija." Gerontologija 11(3): 185–188.
110. Mieliauskaitė, D., I. Dumalakienė, et al. (2009). "Sergančiųjų pirminių Sjogreno sindromu amžiaus ir klinikinių žymenų ryšys." Gerontologija 10(2): 92–95.
111. Mieliauskaite, D., I. Dumalakiene, et al. (2012). "Expression of IL-17, IL-23 and their receptors in minor salivary glands of patients with primary Sjogren's syndrome." Clin Dev Immunol 2012: 187258.
112. Mietzner, B., M. Tsuiji, et al. (2008). "Autoreactive IgG memory antibodies in patients with systemic lupus erythematosus arise from nonreactive and polyreactive precursors." Proc Natl Acad Sci U S A 105(28): 9727-9732.
113. Mikulowska-Mennis, A., B. H. Xu, et al. (2001). "Lymphocyte migration to is mediated by vascular inflamed lacrimal glands cell adhesion molecule-1/alpha(4)beta(1) integrin, peripheral node addressin/L-selectin, and

lymphocyte function-associated antigen-1 adhesion pathways." American Journal of Pathology 159(2): 671-681.

114. Mollet, L., B. Sadat-Sowti, et al. (1998). "CD8hi+CD57+ T lymphocytes are enriched in antigen-specific T cells capable of down-modulating cytotoxic activity." Int Immunol 10(3): 311-323.

115. Moreno, R. G. (2009). "B-cell depletion in autoimmune diseases Advances in autoimmunity." Autoimmun Rev 8(7): 585-590.

116. Muller, A. and P. Lamprecht (2008). "[Interleukin-17 in chronic inflammatory and autoimmune diseases: rheumatoid arthritis, Crohn's disease and Wegener's granulomatosis]." Z Rheumatol 67(1): 72-74.

117. Nakamura, H., A. Kawakami, et al. (2006). "Mechanisms of autoantibody production and the relationship between autoantibodies and the clinical manifestations in Sjogren's syndrome." Transl Res 148(6): 281-288.

118. Nakano, T., M. Matsui, et al. (2011). "Free immunoglobulin light chain: its biology and implications in diseases." Clin Chim Acta 412(11-12): 843-849.

119. Nardi, N., P. Brito-Zeron, et al. (2006). "Circulating auto-antibodies against nuclear and non-nuclear antigens in primary Sjogren's syndrome: prevalence and clinical significance in 335 patients." Clin Rheumatol 25(3): 341-346.

120. Nguyen, C. Q., M. H. Hu, et al. (2008). "Salivary gland tissue expression of interleukin-23 and interleukin-17 in Sjogren's syndrome: findings in humans and mice." Arthritis Rheum 58(3): 734-743.

121. Nguyen, C. Q., H. Yin, et al. (2011). "IL17: potential therapeutic target in Sjogren's syndrome using adenovirus-mediated gene transfer." Lab Invest 91(1): 54-62.

122. Niedbala, W., X. Q. Wei, et al. (2007). "IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells." Eur J Immunol 37(11): 3021-3029.

123. Novak, A. J., D. M. Grote, et al. (2004). "Expression of BLyS and its receptors in B-cell non-Hodgkin lymphoma: correlation with disease activity and patient outcome." Blood 104(8): 2247-2253.
124. Ochsenbein, A. F., S. R. Riddell, et al. (2004). "CD27 expression promotes long-term survival of functional effector-memory CD8+ cytotoxic T lymphocytes in HIV-infected patients." J Exp Med 200(11): 1407-1417.
125. Ogawa, N., H. Dang, et al. (1996). "Lymphocyte apoptosis and apoptosis-associated gene expression in Sjogren's syndrome." Arthritis Rheum 39(11): 1875-1885.
126. Ohlsson, M., P. Szodoray, et al. (2002). "CD40, CD154, Bax and Bcl-2 expression in Sjogren's syndrome salivary glands: a putative anti-apoptotic role during its effector phases." Scand J Immunol 56(6): 561-571.
127. Pandya, A. D., Z. Al-Jaderi, et al. (2011). "Identification of human NK17/NK1 cells." PLoS One 6(10): e26780.
128. Park, H., Z. Li, et al. (2005). "A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17." Nat Immunol 6(11): 1133-1141.
129. Pertovaara, M., J. Anttonen, et al. (2006). "Th2 cytokine genotypes are associated with a milder form of primary Sjogren's syndrome." Ann Rheum Dis 65(5): 666-670.
130. Pflanz, S., L. Hibbert, et al. (2004). "WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27." J Immunol 172(4): 2225-2231.
131. Pflanz, S., J. C. Timans, et al. (2002). "IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells." Immunity 16(6): 779-790.
132. Pijpe, J., G. W. van Imhoff, et al. (2005). "Rituximab treatment in patients with primary Sjogren's syndrome: an open-label phase II study." Arthritis Rheum 52(9): 2740-2750.

133. Polihronis, M., N. I. Tapinos, et al. (1998). "Modes of epithelial cell death and repair in Sjogren's syndrome (SS)." Clin Exp Immunol 114(3): 485-490.
134. Pollard, R. P., W. H. Abdulahad, et al. (2013). "Serum levels of BAFF, but not APRIL, are increased after rituximab treatment in patients with primary Sjogren's syndrome: data from a placebo-controlled clinical trial." Ann Rheum Dis 72(1): 146-148.
135. Quartuccio, L., M. Fabris, et al. (2008). "Resistance to rituximab therapy and local BAFF overexpression in Sjogren's syndrome-related myoepithelial sialadenitis and low-grade parotid B-cell lymphoma." Open Rheumatol J 2: 38-43.
136. Ramos-Casals, M., P. Brito-Zeron, et al. (2005). "Hypocomplementaemia as an immunological marker of morbidity and mortality in patients with primary Sjogren's syndrome." Rheumatology 44(1): 89-94.
137. Reksten, T. R., M. V. Jonsson, et al. (2009). "Cytokine and autoantibody profiling related to histopathological features in primary Sjogren's syndrome." Rheumatology (Oxford) 48(9): 1102-1106.
138. Roescher, N., P. P. Tak, et al. (2010). "Cytokines in Sjogren's syndrome: potential therapeutic targets." Ann Rheum Dis 69(6): 945-948.
139. Rovedatti, L., T. Kudo, et al. (2009). "Differential regulation of interleukin 17 and interferon gamma production in inflammatory bowel disease." Gut 58(12): 1629-1636.
140. Saito, I., K. Haruta, et al. (1999). "Fas ligand-mediated exocrinopathy resembling Sjogren's syndrome in mice transgenic for IL-10." J Immunol 162(5): 2488-2494.
141. Saito, I., K. Terauchi, et al. (1993). "Expression of cell adhesion molecules in the salivary and lacrimal glands of Sjogren's syndrome." J Clin Lab Anal 7(3): 180-187.
142. Sakai, A., Y. Sugawara, et al. (2008). "Identification of IL-18 and Th17 cells in salivary glands of patients with Sjogren's syndrome, and amplification

of IL-17-mediated secretion of inflammatory cytokines from salivary gland cells by IL-18." J Immunol 181(4): 2898-2906.

143. Salazar, J. R. G. d., J. M. S. Gallego, et al. (2010). "Manejo de las manifestaciones extraglandulares del síndrome de Sjögren primario. ." Reumatol Clin. 06(2): 6-11.

144. Salomonsson, S., P. Larsson, et al. (2002). "Expression of the B cell-attracting chemokine CXCL13 in the target organ and autoantibody production in ectopic lymphoid tissue in the chronic inflammatory disease Sjogren's syndrome." Scand J Immunol 55(4): 336-342.

145. Sarigul, M., V. Yazisiz, et al. (2010). "The numbers of Foxp3 + Treg cells are positively correlated with higher grade of infiltration at the salivary glands in primary Sjogren's syndrome." Lupus 19(2): 138-145.

146. Schirmer, M., C. Goldberger, et al. (2002). "Circulating cytotoxic CD8(+) CD28(-) T cells in ankylosing spondylitis." Arthritis Res 4(1): 71-76.

147. Schroder, A. E., A. Greiner, et al. (1996). "Differentiation of B cells in the nonlymphoid tissue of the synovial membrane of patients with rheumatoid arthritis." Proc Natl Acad Sci U S A 93(1): 221-225.

148. Sellam, J., C. Miceli-Richard, et al. (2007). "Decreased B cell activating factor receptor expression on peripheral lymphocytes associated with increased disease activity in primary Sjogren's syndrome and systemic lupus erythematosus." Ann Rheum Dis 66(6): 790-797.

149. Shahrara, S., Q. Huang, et al. (2008). "TH-17 cells in rheumatoid arthritis." Arthritis Res Ther 10(4): R93.

150. Shiboski, S. C., C. H. Shiboski, et al. (2012). "American College of Rheumatology classification criteria for Sjogren's syndrome: a data-driven, expert consensus approach in the Sjogren's International Collaborative Clinical Alliance cohort." Arthritis Care Res (Hoboken) 64(4): 475-487.

151. Skopouli, F. and H. Moutsopoulos (1994). "Autoimmune epithelitis: Sjögren's syndrome." Clin Exp Rheumatol 12(11): 9-11

152. Solans-Laque, R., A. Lopez-Hernandez, et al. (2011). "Risk, predictors, and clinical characteristics of lymphoma development in primary Sjogren's syndrome." Semin Arthritis Rheum 41(3): 415-423.
153. Song, K., R. A. Coleman, et al. (2001). "TH1 cytokine response of CD57+ T-cell subsets in healthy controls and patients with alcoholic liver disease." Alcohol 24(3): 155-167.
154. Struyf, N. J., H. W. Snoeck, et al. (1990). "Natural killer cell activity in Sjogren's syndrome and systemic lupus erythematosus: stimulation with interferons and interleukin-2 and correlation with immune complexes." Ann Rheum Dis 49(9): 690-693.
155. Stumhofer, J. S., A. Laurence, et al. (2006). "Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system." Nat Immunol 7(9): 937-945.
156. Sutcliffe, N., M. Inanc, et al. (1998). "Predictors of lymphoma development in primary Sjogren's syndrome." Semin Arthritis Rheum 28(2): 80-87.
157. Szodoray, P., P. Alex, et al. (2005). "Distinct profiles of Sjogren's syndrome patients with ectopic salivary gland germinal centers revealed by serum cytokines and BAFF." Clin Immunol 117(2): 168-176.
158. Szodoray, P., G. Papp, et al. (2009). "Cells with regulatory function of the innate and adaptive immune system in primary Sjogren's syndrome." Clin Exp Immunol 157(3): 343-349.
159. Szturmowicz, M., E. Wilinska, et al. (2010). "Primary Sjogren's Syndrome with two extraglandular sites involvement - case report." Pneumonol Alergol Pol 78(6): 445-450.
160. Takahashi, H., M. Yamamoto, et al. (2010). "The birthday of a new syndrome: IgG4-related diseases constitute a clinical entity." Autoimmun Rev 9(9): 591-594.

161. Takeda, A., S. Hamano, et al. (2003). "Cutting edge: Role of IL-27/WSX-1 signaling for induction of T-Bet through activation of STAT1 during initial Th1 commitment." Journal of Immunology 170(10): 4886-4890.
162. Talal, N., R. A. Sylvester, et al. (1974). "T and B lymphocytes in peripheral blood and tissue lesions in Sjogren's syndrome." J Clin Invest 53(1): 180-189.
163. Tektonidou, M. G. and M. M. Ward (2011). "Validation of new biomarkers in systemic autoimmune diseases." Nat Rev Rheumatol 7(12): 708-717.
164. Ter Borg, E. J., A. P. Risselada, et al. (2011). "Relation of Systemic Autoantibodies to the Number of Extraglandular Manifestations in Primary Sjogren's Syndrome: A Retrospective Analysis of 65 Patients in the Netherlands." Semin Arthritis Rheum 40(6): 547-551.
165. Tesselaar, K., Y. Xiao, et al. (2003). "Expression of the murine CD27 ligand CD70 in vitro and in vivo." J Immunol 170(1): 33-40.
166. Theander, E., R. Manthorpe, et al. (2004). "Mortality and causes of death in primary Sjogren's syndrome: a prospective cohort study." Arthritis Rheum 50(4): 1262-1269.
167. Thiolat, A., M. C. Boissier, et al. (2012). "Il-35 Gene Therapy in a Model of Rheumatoid Arthritis." Ann Rheum Dis 71: A13-A13.
168. Thomas, E., E. M. Hay, et al. (1998). "Sjogren's syndrome: a community-based study of prevalence and impact." Br J Rheumatol 37(10): 1069-1076.
169. Tsuda, M., Y. M. Ambrosini, et al. (2011). "Fine phenotypic and functional characterization of effector cluster of differentiation 8 positive T cells in human patients with primary biliary cirrhosis." Hepatology 54(4): 1293-1302.
170. Tsukishiro, T., A. D. Donnenberg, et al. (2003). "Rapid turnover of the CD8(+)CD28(-) T-cell subset of effector cells in the circulation of patients with head and neck cancer." Cancer Immunol Immunother 52(10): 599-607.

171. Tsunawaki, S., S. Nakamura, et al. (2002). "Possible function of salivary gland epithelial cells as nonprofessional antigen-presenting cells in the development of Sjogren's syndrome." J Rheumatol 29(9): 1884-1896.
172. Tzartos, J. S., M. A. Friese, et al. (2008). "Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis." Am J Pathol 172(1): 146-155.
173. Vallejo, A. N. (2005). "CD28 extinction in human T cells: altered functions and the program of T-cell senescence." Immunol Rev 205: 158-169.
174. van Woerkom, J. M., A. A. Kruize, et al. (2005). "Salivary gland and peripheral blood T helper 1 and 2 cell activity in Sjogren's syndrome compared with non-Sjogren's sicca syndrome." Ann Rheum Dis 64(10): 1474-1479.
175. Vanaudenaerde, B. M., S. E. Verleden, et al. (2011). "Innate and adaptive interleukin-17-producing lymphocytes in chronic inflammatory lung disorders." Am J Respir Crit Care Med 183(8): 977-986.
176. Varin, M. M., L. Le Pottier, et al. (2010). "B-cell tolerance breakdown in Sjogren's syndrome: focus on BAFF." Autoimmun Rev 9(9): 604-608.
177. Villarino, A., L. Hibbert, et al. (2003). "The IL-27R (WSX-1) is required to suppress T cell hyperactivity during infection." Immunity 19(5): 645-655.
178. Vitali, C., S. Bombardieri, et al. (2002). "Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group." Ann Rheum Dis 61(6): 554-558.
179. Voulgarelis, M., S. Giannouli, et al. (2006). "Long term remission of Sjogren's syndrome associated aggressive B cell non-Hodgkin's lymphomas following combined B cell depletion therapy and CHOP (cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone)." Ann Rheum Dis 65(8): 1033-1037.
180. Wang, E. C., P. J. Lehner, et al. (1994). "CD8high (CD57+) T cells in normal, healthy individuals specifically suppress the generation of cytotoxic T lymphocytes to Epstein-Barr virus-transformed B cell lines." Eur J Immunol 24(11): 2903-2909.

181. Wang, R., G. Han, et al. (2008). "The pathogenic role of interleukin-27 in autoimmune diabetes." Cell Mol Life Sci 65(23): 3851-3860.
182. Weng, N. P., A. N. Akbar, et al. (2009). "CD28(-) T cells: their role in the age-associated decline of immune function." Trends in Immunology 30(7): 306-312.
183. Wilson, N. J., K. Boniface, et al. (2007). "Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells." Nat Immunol 8(9): 950-957.
184. Wither, J., Y. C. Cai, et al. (2008). "Reduced proportions of natural killer T cells are present in the relatives of lupus patients and are associated with autoimmunity." Arthritis Res Ther 10(5): R108.
185. Witte, T. (2010). "Diagnostic markers of Sjogren's syndrome." Dev Ophthalmol 45: 123-128.
186. Wojno, E. D. T., N. Hosken, et al. (2011). "A Role for IL-27 in Limiting T Regulatory Cell Populations." Journal of Immunology 187(1): 266-273.
187. Wong, C. K., L. C. Lit, et al. (2008). "Hyperproduction of IL-23 and IL-17 in patients with systemic lupus erythematosus: implications for Th17-mediated inflammation in auto-immunity." Clin Immunol 127(3): 385-393.
188. Xanthou, G., M. Polihronis, et al. (2001). "'Lymphoid' chemokine messenger RNA expression by epithelial cells in the chronic inflammatory lesion of the salivary glands of Sjogren's syndrome patients: possible participation in lymphoid structure formation." Arthritis Rheum 44(2): 408-418.
189. Zadura, A. F., E. Theander, et al. (2009). "Complement inhibitor C4b-binding protein in primary Sjogren's syndrome and its association with other disease markers." Scand J Immunol 69(4): 374-380.
190. Zeher, M., P. Szodoray, et al. (1999). "Correlation of increased susceptibility to apoptosis of CD4+ T cells with lymphocyte activation and activity of disease in patients with primary Sjogren's syndrome." Arthritis Rheum 42(8): 1673-1681.

191. Zelenay, S., T. Lopes-Carvalho, et al. (2005). "Foxp3(+) CD25(-) CD4 T cells constitute a reservoir of committed regulatory cells that regain CD25 expression upon homeostatic expansion." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102(11): 4091-4096.
192. Zhou, J., K. Tiemann, et al. (2013). "Dual functional BAFF receptor aptamers inhibit ligand-induced proliferation and deliver siRNAs to NHL cells." Nucleic Acids Res.
193. Zhu, X. J., Y. Shi, et al. (2009). "The effects of BAFF and BAFF-R-Fc fusion protein in immune thrombocytopenia." Blood 114(26): 5362-5367.
194. Zintzaras, E., M. Voulgarelis, et al. (2005). "The risk of lymphoma development in autoimmune diseases: a meta-analysis." Arch Intern Med 165(20): 2337-2344.

PADĖKA

Norėčiau padėkoti visiems, kurie prisidėjo prie šio darbo atsiradimo.
Ypač norėčiau padėkoti:

- darbo vadovui dr. A.Šiauriui už idėjas, nuolatinę pagalbą ir begalinę kantrybę;
- dr. I.Dumalakienei už idėjas, nuolatinę pagalbą, kantrybę ir padaršimus;
- prof. dr. D.Characiejui, dr. D. Mieliauskaitei už idėjas ir vertingas pastabas;
- R.Vilienei už nuolatinę pagalbą;
- Visiems kolegoms už kritinį mąstymą ir vertingas pastabas;
- Savo šeimai už kantrybę, nuolatinį palaikymą ir supratimą.

Finansinė parama

- Lietuvos mokslo tarybos finansuojamo I kvietimo mokslininkų grupių projektas „Interleukinų -27, - 35 ir T helperių 1, 2, 17 vaidmuo autoimuninio epitelito patogenezėje“ (No. MIP - 96/2010);
- Lietuvos mokslo tarybos finansuojamos Nacionalinės programos „Lėtinės neinfekcinės ligos“ projektas „Autoimuninėmis ligomis sergančių ligonių T limfocitų populiacijų reikšmė ligos eigai“ (No. LIG-23/2010);
- Lietuvos mokslo tarybos finansuojama programa „Konkursinis trumpalaikių mokslininkų vizitų finansavimas“.

PRIEDAI



VILNIAUS UNIVERSITETAS
MEDICINOS FAKULTETAS

VILNIAUS REGIONINIS BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ ETIKOS KOMITETAS
M.K.Čiurlionio 21/27, 03101,Vilnius Tel./faks.:(85)2686998, el.p.: rbtek@mf.vu.lt

Biomedicininio tyrimo

2012-02-08 Nr. 158200-299-PP1-7

“Autoimuninėmis ligomis sergančių ligonių
T limfocitų populiacijų reikšmė ligos eigai ”
pagrindiniam tyrėjui dr.D.Characiejui

Dėl leidimo Nr. 158200-03-299-73

papildymo Nr. 1, 2012-01-06

PAŽYMA

Vilniaus regioninis biomedicininių tyrimų etikos komitetas susipažino su jūsų prašymu leisti papildyti biomedicininio tyrimo “ Autoimuninėmis ligomis sergančių ligonių T limfocitų populiacijų reikšmė ligos eigai ”, kuriam atlikti 2011-03-08 išduotas leidimas Nr. 158200-03-299-73, protokolą.

Komiteto posėdžio, vykusio 2012-02-07 metu pritarta jūsų prašymui ir neprieštarujama, kad:

1. Įtrauktumėte papildomą tyrėją Gintarą Sūdžių (biologą, VMTI Inovatyvios medicinos centro doktorantą).

Pirmininkė

Vytutė Pečiulienė

Amerikos ir Europos bendro sutarimo Sjögreno sindromo klasifikacijos kriterijai

I. Akių simptomai (turi būti nors vienas teigiamas atsakymas į šiuos klausimus):

1. Ar jaučiate kasdienį, nuolatinį, varginantį akių sausumą ilgiau nei 3 mėnesius?
2. Ar yra pasikartojantis „smėlio“ arba „žvyro“ pojūtis akyse?
3. Ar naudojate dirbtines ašaras dažniau kaip tris kartus per dieną?

II. Burnos simptomai (turi būti nors vienas teigiamas atsakymas į šiuos klausimus):

1. Ar jaučiate kasdienį burnos sausumą ilgiau nei 3 mėnesius?
2. Ar buvo pasikartojantis arba pastovus seilių liaukų padidėjimas, esant suaugusiam?
3. Ar reikia gerti skysčius tam, kad lengviau būtų nuryti maistą?

III. Objektyvūs akių sausumo įrodymai (turi būti nors vienas šių įrodymų):

Širmerio 1 testas, atliekamas be nuskausminimo – ≤ 5 mm/5 min.

Bengal rožinio testas – ≥ 4 pagal van Bijsterved'o skaičiavimo sistemą

IV. Histologinis mažųjų seilių liaukų biopsijos medžiagos tyrimas – židinių skaičius ≥ 1 (vienas židinytis – stebima daugiau negu 50 limfocitų 4 mm^2). Biopsija atliekama nepakenktoje burnos gleivinėje, histologinį tyrimą atlieka patyręs histologas.

V. Objektyvūs seilių liaukų pakenkimo įrodymai (turi būti nors vienas šių įrodymų):

Nestimuluota pilna sialometrija ($\leq 1,5$ ml/15 min.).

Paausinių seilių liaukų sialografija

Seilių liaukų scintigrafija.

VI. Autoantikūnai (kraujo serume):

Antikūnai prieš SSA (Ro) ir/arba antikūnai prieš SSB (La).