

VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETO  
FIZIOLOGIJOS, BIOCHEMIJOS IR  
LABORATORINĖS MEDICINOS KATEDRA

**MAGISTRO DARBAS**

SERGANČIŲJŲ SJOGRENO SINDROMU T LIMFOCITŲ  
SUBPOPULIACIJŲ TYRIMAI

Magistrantė GRETA MAGELINSKAITĖ

\_\_\_\_\_  
(parašas)

Darbo vadovas  
dr., prof. D. Characiejus

\_\_\_\_\_  
(parašas)

VU MF Fiziologijos, biochemijos ir  
Laboratorinės medicinos katedros vedėja  
hab.dr., prof. Z. Kučinskienė

leidžiama ginti

\_\_\_\_\_  
(parašas)

Darbo įteikimo data \_\_\_\_\_  
Registracijos Nr. \_\_\_\_\_

## TURINYS

SANTRUMPOS.....	3
ĮVADAS .....	5
PADEKOS .....	7
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	8
1.1. Imuninė tolerancija, autoimuniteto išsivystymo mechanizmai.....	8
1.2. Imuninės sistemos ląstelės .....	9
1.2.1. T limfocitai .....	9
1.2.2. B limfocitai .....	15
1.2.3. NK ląstelės.....	15
1.3. Sjogreno sindromas.....	16
1.4. Tėkmės citometrija .....	22
2. TYRIMO METODAI IR APIMTIS .....	26
2.1. Tyrimo apimtis.....	26
2.2. Tėkmės citometrijos metodas .....	26
2.3. Kraujo mėginių paėmimas .....	27
2.4. Mėginių paruošimas.....	28
2.5. Statistinė duomenų analizė .....	31
3. TYRIMO REZULTATAI.....	32
3.1. Limfocitų analizė tėkmės citometru .....	32
3.2. Pirminiu Sjogreno sindromu ir neautoimuninės kilmės sausumo sindromu sergančių ligonių limfocitų ir jų subpopuliacijų periferiniame kraujyje palyginimas .....	38
3.3. Priklausomybė tarp CD8 <sup>i</sup> CD57 <sup>+</sup> ir CD8 <sup>i</sup> CD27 <sup>+</sup> limfocitų populiacijų .....	47
4. REZULTATŲ APTARIMAS.....	49
IŠVADOS .....	52
SANTRAUKA (SUMMARY) .....	53
LITERATŪROS SARAŠAS .....	54
PRIEDAI.....	66

## SANTRUMPOS

- ANA (angl. *anti nuclear antibodies*) – Antinukleariniai antikūnai
- Anti-SS-A (Ro) – antikūnai prieš SS-A
- Anti-SS-B (La) – antikūnai prieš SS-B
- APC (angl. *allophycocyanin*) – alofikocianinas
- APL – antigeną pateikianti ląstelė
- B-1, B-2 – B limfocitų subpopuliacijos
- B7 – kostimuliuojanti molekulė, kurios ligandas yra CD28 molekulė T helperių membranoje
- BCR (angl. *B cell receptor*) – B limfocitų receptoriai
- BD – Becton Dickinson
- CD (angl. *cluster of differentiation*) – leukocitų diferenciacijos antigenas
- CD8<sup>i</sup> (angl. CD8<sup>high</sup>) – intensyvi CD8 žymens raiška
- CD8<sup>s</sup> (angl. CD8<sup>low</sup>) – silpna CD8 žymens raiška
- CMV – citomegalo virusas
- CTLA-4 (angl. *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*) – citotoksinių T limfocitų antigenas 4
- DNR – deoksiribonukleino rūgštis
- EBV (angl. *Epstein – Barr virus*) – Epšteino – Bar virusas
- Fas (angl. *fragment antigen binding*) – antikūno molekulės fragmentas, prijungiantis antigeną
- FasL – Fas ligandas
- FcR – receptoriai antikūno Fc fragmentui.
- FITC (angl. *fluorescein isothiocyanate*) – fluoresceino izotiocianatas
- FL1, 2, 3, 4 – fluorescencijų detektoriai
- Foxp3 – transkripcijos veiksnys
- Id3 – 13kDa branduolio baltymas, dalyvaujantis T limfocitų brendime
- Ig – imunoglobulinas
- IL – interleukinas
- INF-γ – γ-interferonas
- kDa - kilodaltonas
- M3R – muskarininis trečio tipo acetilcholino receptoriai
- M6P-R – manozės-6 fosfato receptoriai
- MHC (angl. *major histocompatibility complex*) – pagrindinis audinių suderinamumo kompleksas
- NK (angl. *natural killer*) – natūralių kilerių ląstelė
- NK T – T natūralus kileris

NOD pelės (angl. *non-obese diabetic mouse*) – nenutukusios diabetinės pelės  
PE (angl. *phycoerythrin*) – fikoeritinas  
PerCP (angl. *peridinchlorophyll protein*) – peridinchlorofilo proteinas  
RNP – ribonukleoproteinai  
ŠŠS (angl. SSC – *side scattered*) – šonine šviesos sklaida  
T<sub>C</sub> – citotoksiniai T limfocitai  
TCR (angl. *T cell receptor*) – T limfocitų receptorius  
TGF-β (angl. *transforming growth factor- β*) – β transformuojantis augimo veiksnys  
T<sub>H</sub> (angl. *T helper*) – T helperis  
T<sub>H</sub> FH (angl. *follicular helper T cell*) – folikulinis T helperis  
TNF-R (angl. *tumor necrosis factor receptor*) – navikų nekrozės faktoriaus receptorius  
Tr1 – T reguliacinių limfocitų subpopuliacija  
TŠS (angl. FSC – *forward scattered*) – tiesine šviesos sklaida  
ŽLA (angl. *HLA – human leukocyte antigens*) – žmogaus leukocitų antigenai

## IVADAS

Imuninės sistemos reakcija į savo organizmo antigenus, vadinama autoimunitetu. Autoreaktyvūs limfocitai cirkuliuoja sveikų individų kraujyje, o organizmą nuo jų saugo tolerancijos mechanizmai. Pastarųjų nepakankamumas sudaro sąlygas autoreaktyviems T ir B limfocitų klonams aktyvintis ir ląsteliniam bei humoraliniam imuniniam atsakui į nuosavus antigenus susidaryti. Šios reakcijos sukelia sunkius ląstelių ir organų pažeidimus, kurie vadinami autoimuninėmis ligomis [1]. Taigi, autoimunitetas susidaro dėl nuosavų antigenų sukeliama specifinio atsako, tai susiję su imuniteto reguliacinių ląstelių trūkumu, netinkama imuniteto aktyvacija ir reaktyviu atsaku virusiniams antigenams [2].

Sjogreno sindromas yra viena iš dažniausiai paplitusių autoimuninių ligų [3], kuriai būdinga seilių ir ašarų liaukų destrukcija ir disfunkcija. Sisteminis pasireiškimas pasitaiko beveik trečdaliui Sjogreno sindromo pacientų. Gydytas jau seniai yra nuviliantis, daugiausiai remiamasi lokaliu gydymu dirbtinėmis ašaromis ir burnos tepalais arba naudojama sisteminės ligos imunosupresinė terapija. Geresnis Sjogreno sindromo patogenezės pažinimas suteikia naujų perspektyvų lokaliui ir sisteminiui šios ligos gydymui [4, 5].

Autoimuninėms ligoms būdinga tai, kad specifinių citotoksinių limfocitų populiacijų susiformavimas gali nulemti ligos progresavimą, o reguliacinių limfocitų populiacijos gali nulemti autoimuninių reakcijų slopinimą ir ligos remisiją. Taigi, svarbi pusiausvyra tarp citotoksinių ir reguliacinių limfocitų.

Ligonų gydymo rezultatai gali būti nevienodi ta pačia ligos forma sergantiems ligoniams, todėl svarbus gydymo skyrimas atsižvelgiant į ligonio imuninės sistemos rodiklius. Deja, kol kas nežinoma kokios limfocitų populiacijos dalyvauja Sjogreno sindromo patogenezėje, nuo kokių imunologinių rodiklių priklauso Sjogreno sindromu sergančių ligonių pasveikimas ar ligos progresavimas.

Atsako į gydymą numatymas (predikcija) leistų parinkti optimalų gydymo būdą konkrečiam ligoniui ir išvengti neefektyvaus gydymo šalutinio poveikio.

Šis darbas – tai pati pradžia projekto „Autoimuninėmis ligomis sergančių ligonių T limfocitų populiacijų reikšmė ligos eigai“. Magistrantė praktinę darbo dalį pradėjo vykdyti nuo pirmųjų tyrimų pradžios. Darbo eigoje įsigilinta į tyrimo metodiką. Vertinimas atliktas stebint profesionalui, o duomenų statistinė analizė vykdyta savarankiškai.

Darbo tikslas – ištirti sergančiųjų Sjogreno sindromu T limfocitų subpopuliacijų kiekybinius pokyčius.

Iškelti šie pagrindiniai darbo uždaviniai:

1. Nustatyti T, B limfocitų ir natūralių kilerių (NK) kiekius sergančiųjų pirminiu Sjogreno sindromu periferiniame kraujyje.
2. Atlikti detalią kiekybinę  $CD8^+$  T limfocitų subpopuliacijų analizę nustatant citotoksinius T limfocitus ir jų subpopuliacijas pagal  $CD57$  ir  $CD27$  žymenų raišką.
3. Atlikti detalią kiekybinę  $CD4^+$  T limfocitų subpopuliacijų analizę nustatant T reguliacinius limfocitus ( $CD4^+CD25^+$ ) ir T helperius 17 ( $CD4^+IL-17A^+$ ).

## PADĖKOS

Nuoširdžiai dėkoju šio darbo vadovui dr., prof. D. Characiejui už pasiūlytą tyrimų idėją, suteiktas žinias ir patarimus.

Taip pat dėkoju: dr. A. Šiauriui ir dkt. G. Sūdžiui už praktinius pamokymus, pagalbą rašant šį darbą bei begalinę kantrybę; dr. D. Mieliauskaitei už vertingus patarimus ir pastebėjimus.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1. Imuninė tolerancija, autoimuniteto išsivystymo mechanizmai

Imuninė tolerancija – tai antigenų sukeltas specifinių limfocitų funkcinis neaktyvumas arba žūtis, dėl kurių organizmo imuninė sistema į jį nereaguoja. Normaliomis sąlygomis visi antigenai yra toleruojami.

Autoimunines ligas gali sukelti tolerancijos mechanizmų nepakankamumas, dėl kurių susidaro sąlygos autoreaktyviems T ir B limfocitų klonams aktyvintis ir ląsteliniam bei humoraliniam imuniniam atsakui į nuosavus antigenus susidaryti [1]. Autoimuninėms ligoms, įskaitant Sjogreno sindromą, būdinga silpnesnė imuninė tolerancija saviems antigenams [6].

Galimi autoimuninių reakcijų sukėlimo mechanizmai:

- Sekvestruotų antigenų išskyrimas – antigenai, nepatekę į čiobrialiaukę ir į cirkuliaciją (sekvestruotieji), nesukels klonų delecijos. Sekvestruotų antigenų (pvz., mielininio pagrindinio baltymo, spermos, lęšiuko, miokardo baltymų) gali patekti į cirkuliaciją dėl traumos, virusinės ar bakterinės infekcijos, miokardo infarkto [7].
- Molekulinė mimikrija – kai kurių virusų ir bakterijų antigeninės determinantės normaliems šeimininko ląstelių komponentams identiškos arba į juos panašios. Infekcija sukelia humoralinį ir ląstelinį atsaką į jų antigenus, bet specifiški T efektoriniai ir antikūnai reaguos ir su šeimininko baltymų komponentais [1].
- Polikloninis T limfocitų aktyvinimas – superantigenai aktyvuoja visas T limfocitų šeimas ir ši efektyvi aktyvacija gali įveikti T reguliacinių limfocitų gebėjimą slopinti tik kartais pasitaikančius autoreaktyvius T limfocitus. Superantigenai jungiasi prie MHC II klasės receptoriaus šono. Receptoriai iš išorės nėra tokie specifiniai, todėl aktyvinama daugiau nespecifinių T limfocitų. Bakterijų superantigenai sukelia masyvią T limfocitų aktyvaciją [7].
- Polikloninis B limfocitų aktyvinimas – gram<sup>-</sup> bakterijos, CMV, EBV per receptorius gali aktyvinti daugelį B limfocitų klonų, tarp jų gali būti ir autoreaktyvių B limfocitų, galinčių diferencijuotis į autoantikūnus sekretuojančias ląsteles [1].
- Audiniai gali įgyti gebėjimą pateikti antigenus (netinkama MHC molekulių ekspresija) – audinių infekcija sukelia makrofagų susitelkimą audinyje. Jie turi citokinus ir kostimuliuojančias molekules, kurios paprastai nerandamos audinyje. Gali būti sukurta MHC II klasės molekulių ekspresija ląstelėse, kurios neekspresuoja šių molekulių (normos atveju MHC II ekspresuoja makrofagai, dendritinės ląstelės, B limfocitai, bei aktyvinti T limfocitai). Taigi, nuosavi antigenai, MHC II klasės molekulės periferinių



audinių ląstelėse kartu su makrofagų sukelta kostimuliacija gali inicijuoti autoimuninį atsaką [1, 7].

- Savarankiškas pokytis (angl. *altered self*) – jungiantis haptensams prie organizmo molekulių jie gali jas pakankamai pakeisti, kad būtų išvengta tolerancijos mechanizmų ir sukeltas imuninis atsakas (pvz., penicilino sukelta hemolizinė anemija) [7].
- Slaptų epitopų buvimas – kai yra sutrikęs makrofagų gebėjimas fagocituoti, antigenas lieka prieinamas [7].
- Imunitetą reguliuojančių molekulių genetinis defektas [7].

Autoimuninių ligų etiologijai yra svarbūs genetiniai, imunologiniai, hormoniniai, aplinkos veiksniai, infekcijos ar net vakcinos [8].

Apytiksliai 5 % Vakarų šalių populiacijos serga autoimuninėmis ligomis [9].

## 1.2. Imuninės sistemos ląstelės

Imuninės sistemos ląstelės cirkuliuoja kraujyje ir limfoje, telkiasi limfiniuose organuose, migruoja visuose audiniuose ir organuose. Tai limfocitai, monocitai, makrofagai, dendritinės ląstelės [1].

Limfocitai – pagrindinės specifinio imuninio atsako ląstelės, nes organizme jos vienintelės gali specifiskai atpažinti ir atskirti įvairias antigenines determinantes (epitopus). Jie lemia imuninio atsako įvairovę, specifiskumą, imuninę atmintį. Tai apvalios, 7 – 12 μm skersmens, nefagocituojančios ląstelės. Citoplazma sudaro nedidelį ruoželį apie branduolį. Joje yra glikogeno, pavienių mitochondrijų, ribosomų, lizosomų. Branduolio chromatinas labai tankus. Pagal funkciją ir ląstelės membranoje ekspresuojamas molekules, limfocitai skirstomi į tris pagrindines populiacijas: T limfocitai, B limfocitai ir natūralūs kileriai (NK ląstelės) [1].

### 1.2.1. T limfocitai

T ląstelių receptorius (TCR) – tai antigenus atpažįstanti struktūra. TCR – transmembraninis baltymas, kurio dėka T limfocitai apažįsta antigenus, asocijuotus su MHC I arba MHC II klasės molekulėmis. Antigenui specifiniai T limfocitai nesugeba aptažinti laisvo ar tirpaus antigeno, tačiau atpažįsta baltyminių antigenų dalis, kai jie yra kovalentiškai sujungti su MHC molekulėmis [1]. MHC I klasės molekules ekspresuoja visos branduolį turinčios ląstelės ir trombocitai, o MHC II klasės molekules – dendritinės ląstelės, monocitai, makrofagai, B limfocitai, aktyvuoti T limfocitai, čiobrialiaukės epitelio ląstelės. MHC I klasės

molekulės leidžia ląstelei pateikti viduląstelinių patogenų antigenus citotoksiškiems T limfocitams. Tokiu būdu  $CD8^+$  T limfocitai sunaikina ląsteles, infekuotas virusais ar bakterijomis. MHC II klasės molekulės pateikia antigenus iš tarpląstelinės aplinkos  $CD4^+$  T limfocitams. Tokiu būdu  $CD4$  T limfocitai aptinka patogenus ir jų produktus, ir aktyvuoja kitas ląsteles, kurios sunaikina patogeną [7].

Taigi, T limfocitai yra skirstomi į subpopuliacijas. Vieni jų membranose ekspresuoja  $CD4$  molekules ir vadinami T helperiais ( $T_H$  arba  $CD4^+$  T limfocitais). Kitų T limfocitų membranose yra  $CD8$  molekulių. Tai T citotoksiškiai ( $T_C$  arba  $CD8^+$  T) limfocitai [1].

Sjogreno sindromą, kaip ir reumatoidinį artritą, galima priskirti T limfocitų sukeltiems sutrikimams [10, 11]. Manoma, kad T limfocitai Sjogreno sindromo patogenezėje svarbūs iki ligos progresavimo, tai yra pirminiame ligos etape, o liaukų sekretinio atsako praradimas priklauso nuo B limfocitų ir autoantikūnų [12].

### **$CD4^+$ T limfocitai**

T helperių pavadinimas kilęs nuo to, kad jie savo išskiriamais citokinais padeda kitoms efektorinėms ląstelėms aktyvintis, pavyzdžiui, B limfocitams, makrofagams, uždegime dalyvaujantiems leukocitams ir kt. Taigi, T helperių pagrindinė veikla – įvairių citokinų (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  ir t.t.) gamyba ir išskyrimas [13].

Šiuo metu yra išskirti šie  $CD4^+$  T limfocitų tipai:  $T_H1$ ,  $T_H2$ ,  $T_H3$ ,  $T_H9$ ,  $T_H17$ ,  $T_H$  FH, T reguliaciniai limfocitai,  $\gamma\delta$  T limfocitai. Šiame darbe bus tiriamas bendras  $CD4^+$  T limfocitų kiekis ir šios  $CD4^+$  T limfocitų subpopuliacijos:  $CD4^+$   $CD25^+$  bei  $CD4^+$   $IL-17A^+$ . Tačiau svarbu paminėti ir kitas subpopuliacijas, kurių svarba autoimuninių ligų vystymuisi taip pat intensyviai tiriama ir nagrinėjama moksliniuose darbuose.

$T_H1$  ir  $T_H2$  ląstelės skiriasi sekretuojamais citokinais, kurie aktyvina įvairias imuniniame atsake dalyvaujančias ląsteles.  $T_H1$  turi įtakos makrofagų,  $CD8^+$  T limfocitų, NK ląstelių funkcijai, gali aktyvinti neutrofilus, endotelio ląsteles. Pagrindinis  $T_H2$  taikinytis – B limfocitai.  $T_H2$  svarbūs jų proliferacijai ir diferencijacijai į plazmines ląsteles ir B atminties ląsteles. Taip pat šios T limfocitų subpopuliacijos sekretuojamais citokinais veikia ir viena kitą:  $T_H1$  sekretuoja IL-10, TGF- $\beta$ , kurie slopina  $T_H2$  aktyvinimąsi, o  $T_H2$  – IFN- $\gamma$ , kuris slopina  $T_H1$  [13]. 1980 m. Robert Coffman ir Tim Mosmann paskelbė, kad  $T_H1$  sukelia ląstelinių imuninių atsakų, lemiančių audinių pažeidimą, o  $T_H2$  lemia antikūnų sukeltą atsaką. Todėl buvo manoma, kad autoimunines ligas sukelia  $T_H1$  perteklius [14].  $T_H2$  sekretuoja IL-4, IL-5 ir IL-10, kurie slopina  $T_H1$  funkcijas. Ši išvada paskatino spekuliacijas, kad autoimunines ligas galima išgydyti pakreipiant funkcinį balansą tarp  $T_H1$  ir  $T_H2$  link  $T_H2$ . Ši idėja buvo patvirtinta atlikus daug tyrimų, įrodančių, kad  $T_H2$  vyravimas yra veiksmingas.  $T_H1$  daugiau

nei dvidešimt metų buvo laikomi svarbiausiais autoimunitetui pasireikšti. Vis dėlto, buvo pastebėta, kad net trūkstant  $T_H1$  pelėms vystosi autoimuninės ligos. Taigi, iškilo klausimas ar tikrai  $T_H1$  yra lemiamas veiksnys autoimuninių ligų vystymuisi [15]. Ši  $T_H1/ T_H2$  hipotezė, nepaisant jos trūkumų, ilgai vyravo. Tiesa, ji suformulavo imunologinį supratimą, kad T limfocitų subpopuliacijos išskiriamais citokiniais veikia viena kitą [14].

$T_H3$  kaip ir  $Tr1$  vyrauja žarnyne ir taip pat slopina imuninį atsaką prieš su maistu gautus antigenus, reguliuoja kitų limfocitų veiklą [13, 16].  $T_H3$  sekretuoja IL-4, IL-10 ir TGF- $\beta$  po stimuliacijos antigenu [7, 17].

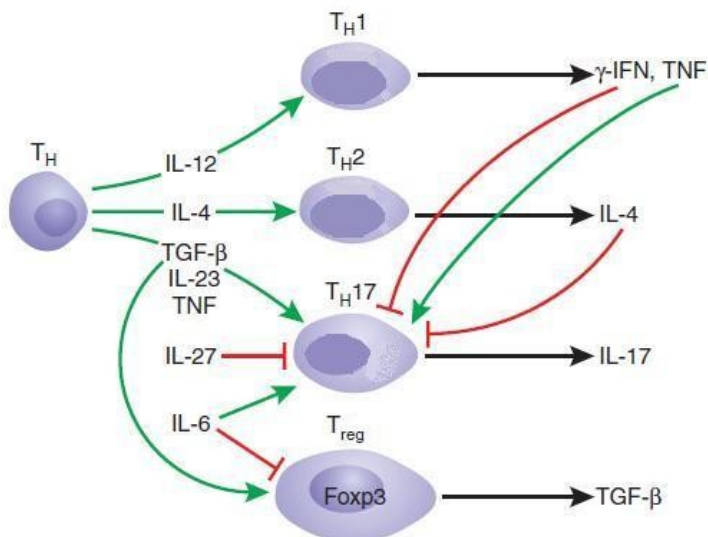
IL-9 sekretuojantys limfocitai anksčiau buvo priskiriami  $T_H2$ . Tačiau šiuo metu IL-9 sekretuojančios ląstelės, priklausančios nuo TGF- $\beta$ , buvo pripažintos kaip atskiras  $T_H$  pogrupis ir vadinamos  $T_H9$ . Manoma, kad TGF- $\beta$  paveikia T helperius 2 taip, kad jie praranda gebėjimą gaminti  $T_H2$  būdingus citokinus, o pradeda gaminti IL-9 ir IL-10 [18].  $T_H9$  veikia eozinofilus, stiprina antihelminčių imunitetą [16].

$T_H$  FH (angl. *Follicular Helper T cells*) – aprašytos 2000 – 2001 metais. Jos aktyvina B limfocitus, indukuoja užuomazginius (germinacinius) centrus limfoidiniuose organuose. Šių limfocitų pagrindinis sekretuojamas citokinas – IL-21 [13, 16, 19, 20].

$\gamma\delta$  T limfocitai – tai intraepileliniai limfocitai, specializuojasi atpažinti lipidinius antigenus, pasižymi fagocitavimo gebėjimu [16]. Dauguma šių limfocitų neturi nei CD4, nei CD8 žymenų. Vystosi čiobrialiaukėje, migruoja į kūno audinius, ypač epitelį (žarnyno, odos, gleivinės, makšties).  $\gamma\delta$  T limfocitai sudaro ne daugiau kaip 5 % visų T limfocitų [13].

## **$T_H17$**

$T_H17$  yra neseniai atrastos  $T_H$  ląstelės, gaminančios IL-17. IL-17 šeimos citokinus sudaro šeši nariai: IL-17A (IL-17), IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (IL-25), ir IL-17F. Šios molekulės yra stiprūs uždegiminiai citokinai, kurie aktyviai lemdami uždegiminių citokinų ir chemokinių ekspresiją dalyvauja audinių uždegime [21]. Svarbiausiais IL-17 šeimos citokiniais laikomi IL-17A ir IL-17F, nes jie daugiausiai koekspressojami [22-24]. Manoma, kad  $T_H17$  vystosi kaip atskira ląstelių linija nuo  $T_H1$  ir  $T_H2$ . Jiems nereikalingi tokie transkripcijos veiksniai ir signalinės molekulės kaip pastariesiems limfocitams [25].  $T_H17$  diferenciaciją iš naiviųjų T limfocitų lemia IL-6 bei TGF- $\beta$ , o IL-23 palaiko  $T_H17$  augimą ir išlikimą [14, 26]. Priešingai veikia IL-4, IFN- $\gamma$ , kurie slopina  $T_H17$  diferenciaciją. Pastarieji citokinai yra pagrindiniai stimulatoriai  $T_H1$  ir  $T_H2$  vystymuisi [15].



1 pav. CD4<sup>+</sup> T limfocitų diferenciacijos schema [14].

IL-6 yra uždegiminis citokinas, skatinantis autoimunines reakcijas, o TGF- $\beta$  yra priešuždegiminis citokinas, kuris ne tik lemia TH17 diferenciaciją, bet taip pat aktyvina Foxp3<sup>+</sup> raišką T reg ląstelėse [24, 27, 28]. Taigi, manoma, kad TGF- $\beta$  slopina autoimunines ligas, reguliuodamas T reguliacinių limfocitų skaičių in vivo [29].

TGF- $\beta$ 1 yra sekretuojamas baltymas, reguliuojantis įvairių ląstelių proliferaciją, diferenciaciją ir apoptozę. Šio baltymo veikimo sutrikimai yra siejami su autoimuniniais procesais, uždegimu bei onkologinėmis ligomis [30]. Mieliauskaitės D. ir kt. atlikto tyrimo metu nustatyta, kad TGF- $\beta$ 1 koncentracija kraujo serume gali atspindėti autoimuninį uždegimą „organuose – taikiniuose“ [6].

TH17 gali sukelti sunkias autoimunines ligas, tačiau šie limfocitai atlieka ir labai svarbią antibakterinę funkciją epitelio/gleivinės barjeruose. TH17 sekretuojami citokinai (IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22) lemia įvairiose ląstelėse uždegiminių citokinų ir chemokinų gamybą, kurie sutelkia neutrofilus patogenų patekimo vietoje. Tokie patogenai, kaip *Citrobacter rodentium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacteroides spp.*, *Borrelia spp.*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pneumocystis carinii* ir *Candida albicans* gali sukelti stiprų TH17 atsaką [24]. Taigi, jei yra TH17 stoka gali pasireikšti įvairios oportunistinės infekcijos.

### T reguliaciniai limfocitai

1980 m. Dr. Shimon Sakaguchi (Kyoto universitetas, Japonija) įrodė, kad T limfocitų subpopuliacijos stoka gyvūnams sukelia autoimunines reakcijas [31]. Šis tyrimas padėjo jam 1990 metais atrasti T reguliacinius limfocitus, arba T reg ląsteles [32]. Šios ląstelės priklauso

CD4<sup>+</sup> T limfocitų populiacijai, kuri koekspresso CD25<sup>i</sup> ir Foxp3<sup>+</sup> žymenis. Organizme T reg ląstelės palaiko imuninės sistemos toleranciją nuosaviems antigenams, o jų funkcijos sutrikimas gali sukelti įvairių autoimuninių ligų [27, 33, 34]. Įrodyta su pelėmis, kad fiziniai, cheminiai, biologiniai veiksniai bei genetiniai pakitimai, mažinantys T reg limfocitų skaičių, gali sukelti autoimunines ligas [27]. Tačiau taip pat šios ląstelės gali susilpninti organizmo reakciją į vėžinius susirgimus bei infekcijas [34]. Taigi, sumažėjęs T reg limfocitų skaičius susijęs su autoimuninių ligų vystymusi [29, 35], o priešingai – padidėjęs T reg ląstelių skaičius periferiniame kraujyje sukelia imunosupresijos būklę [36].

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T reguliacinių limfocitų veikla, slopinanti autoimunitetą ir apsauganti nuo audinių pažeidimo, indukuojama TGF-β kai aplinkoje nėra IL-6 [14]. Remiantis šiais duomenimis, IL-6 yra lemiantis veiksnys ar imuniniame atsake dominuoja T reguliaciniai limfocitai, ar T<sub>H</sub>17 [24].

T reguliaciniai limfocitai sudaro 5 – 10 % CD4<sup>+</sup> T limfocitų skaičiaus. Jų transkripcijos veiksnį Foxp3<sup>+</sup>, kuris naudojamas kaip žymuo atskiriant T reg ląsteles, koduoja *foxp3* genas [37]. CD25 (IL-2Rα) žymuo ekspresuojamas po aktyvacijos antigenu [38]. Aktyvuoti šie limfocitai išskiria daug IL-10. IL-10 yra stiprus imunosupresantas ir gali būti vienas iš T reguliacinių limfocitų veikimo būdų slopinant T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2, T<sub>H</sub>17 aktyvaciją ir galbūt T citotoksinių limfocitų veiklą. Taip pat T reg ląstelės jungdamosis per CTLA-4 su B7, esančiu dendritinių ląstelių, B limfocitų, citotoksinių T limfocitų bei NK ląstelių membranoje, gali jas sunaikinti [13].

T reguliacinių limfocitų pogrupyje dar išskiriami Tr1 limfocitai (aprašyti 1997 m.) [39]. Tr1 ląstelės panašios į T reg ląsteles, nors jos neekspresuoja taip gausiai CD25 ir Foxp3 žymenų. Jų formavimuisi reikalingas IL-10, o subrendę taip pat sekretuoja TGF-β. Tr1 ląstelių gausu žarnyne ir jų pagrindinė funkcija – toleruoti daugelį antigenų, patenkančių su maistu. Tai grindžiama tuo, kad pelėms su IL-10 trūkumu vystosi storosios žarnos uždegimas [13]. Taip pat Tr1 periferinės tolerancijos metu slopina autoreaktyvius T limfocitus [40], T<sub>H</sub>1 ir T<sub>H</sub>2 sukeltą imuninį atsaką per IL-10, TGF-β gamybą [7, 41]. Taigi, Tr1 vaidmuo yra sukelti toleranciją svetimiams ir kai kuriems nuosaviems antigenams [39].

Pastaraisiais metais atsirado duomenų, jog Foxp3<sup>+</sup> žymuo nėra specifiškas T reg limfocitams. Kelios studijos įrodė, jog aktyvinti CD4<sup>+</sup> ir CD8<sup>+</sup> limfocitai po sąveikos su antigenu gali laikinai ekspresuoti Foxp3. Šis tyrimas paskatino ieškoti kitų žymenų, būdingų tik T reg limfocitams. Nustatyta, jog sumažėjusi CD127 gamyba ląstelių paviršiuje – galimas šių limfocitų žymuo, ypač vertinant jį kartu su teigiama CD25 ir Foxp3 ekspresija. Vis dėlto iki šiol nėra vienos nuomonės dėl šių žymenų naudojimo T reg limfocitams aptikti [42].

Šiuo metu visame pasaulyje aktyviai tyriami T reguliaciniai limfocitai, siekiant sukurti naujus imuninės sistemos slopinimo ir intervencijos būdus [31].

### **CD8<sup>+</sup> T limfocitai**

CD8<sup>+</sup> T efektoriai atpažįsta ir sunaikina pakitusias nuosavas ląsteles, infekuotas virusų, pirmuonių, bakterijų ir navikines ląsteles. Jos gali lemti transplantato atmetimo reakcijas [13]. CD8<sup>+</sup> T limfocitų granulėse yra perforino ir proteazių, vadinamų granzimais. Perforinas polimerizuojasi ir įsiterpia į ląstelės taikinio membraną, taip suformuodamas joje poras, tada granzimai gali patekti į ląstelę ir aktyvinti kaspazes, kurios sukelia ląstelės – taikinio apoptozę [7].

Citotoksiniai T limfocitai taip pat gali sukelti ląstelės – taikinio apoptozę nuo perforino nepriklausomu būdu. Infekuotų ląstelių yra padidėjusi Fas ekspresija, CD8<sup>+</sup> T efektoriai jungiasi per FasL, aktyvuojamos kaspazės ir sukeliami ląstelės – taikinio apoptozė [7].

Be perforino ir granzimų citotoksiniai T limfocitai gamina IFN- $\gamma$  (skatina MHC I klasės molekulių ekspresiją, slopina viruso replikaciją, aktyvina makrofagus), TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  (aktyvina makrofagus) [7].

Citotoksiniai T limfocitai nustatomi pagal CD8 antigeno ekspresiją ląstelės paviršiuje. Šiems limfocitams būdinga intensyvi CD8 žymens ekspresija (CD8<sup>i</sup>, „i“ – intensyvi žymens raiška). Nors 30 – 40 % periferinio kraujo natūralių kilerių turi CD8 antigenus, tačiau jie pasižymi mažesne ekspresija nei esantys T limfocitų paviršiuje. Dėl šios priežasties dažnai visa CD8<sup>+</sup> limfocitų subpopuliacija pagal CD8 ekspresiją ir galimas funkcijas skirstoma į CD8<sup>i</sup>CD57<sup>+</sup> – citotoksinius T limfocitus ir CD8<sup>s</sup>CD57<sup>+</sup> („s“ – silpna žymens raiška) – natūralių kilerių (NK) savybėmis pasižyminčius limfocitus [43, 44]. CD8<sup>i</sup> T limfocitai gali būti skirstomi į subpopuliacijas pagal CD28 paviršiaus antigeną. Šis antigenas reikalingas antrajam, kostimuliaciniam, signalui perduoti T limfocitų aktyvacijos metu [44]. CD57<sup>+</sup> T limfocitai – tai efektorinių CD8<sup>+</sup> T limfocitų subpopuliacija. Paprastai CD57 žymenį (tai glikoproteinas) ekspresuoja apie 16 % CD8<sup>+</sup> T limfocitų [45].

Citotoksiniai T limfocitai lemia stiprią apsaugą nuo virusų infekuotų ar vežinių ląstelių. Tačiau esant tam tikroms sąlygoms gali lizuoti sveikų audinių ląsteles, sukeldamos autoimuninį organų – taikinių pažeidimą [11], pavyzdžiui, sunaikina Langerhanso salelių beta ląsteles sergant I tipo cukrinio diabetu [13].

Yra duomenų, kad CD8<sup>+</sup> CD57<sup>+</sup> limfocitų subpopuliacija išauga vyresniame amžiuje [46-48], esant lėtinei virusinei infekcijai [49, 50] ir autoimuninių ligų [51, 52] atveju.

### 1.2.2. B limfocitai

B limfocitai – tai ląstelės, sujungiančios tirpius antigenus savo receptoriais (BCR) bei juos pateikiančios per MHC II T helperiams (antigenas į B limfocitą patenka per receptoriaus sukeltą endocitozę, lizosomoje antigenas perdirbamas ir per MHC II pateikiamas T helperiams) [13].

B limfocitai atsakingi už humoralinį imunitetą. Pagrindinės B ląstelių funkcijos yra diferencijuotis į plazmines ląsteles ir gaminti antikūnus prieš svetimus antigenus, pateikti antigenus (APL), bei po susidūrimo su antigenu vystytis į atminties ląsteles. Visi vieno klonu efektoriai sekretuoja antikūnus, specifiskus tam pačiam antigenui [53].

Skiriami šie B limfocitų tipai – tai plazminės bei atminties ląstelės, B-1 ir B-2 limfocitai. B-1 limfocitai – tai B limfocitų subpopuliacija, kuri atlieka tokias pat funkcijas kaip ir pagrindiniai B limfocitai (B-2), tačiau nesidiferencijuoja į atminties ląsteles bei bręsta periferijoje, o ne kaulų čiulpuose, kaip B-2 limfocitai. B-1 limfocitų daugiausiai randama pilvaplėvės ir pleuros ertmėse. Manoma, kad jie lemia įgimtą imunitetą. Paprastai B-1 limfocitai sudaro apie 1 – 5 % visų B limfocitų. B-1 limfocitai dar skiriami į B-1a ir B-1b limfocitų subpopuliacijas [54-55].

Sutrikusi B limfocitų antikūnų sekrecija būdinga daugeliui autoimuninių ligų (pvz., reumatoidiniam artritui, sisteminei raudonajai vilkligei). B ląstelės taip pat jautrios piktybinei transformacijai [56].

Autoreaktyvių B limfocitų aktyvacija yra vienas iš patologinių pirminio Sjogreno sindromo bei sisteminės raudonosios vilkligės požymių. Stebimas imunoglobulinų ar jų fragmentų pagausėjimas, kuris galėtų būti informatyvus autoimuninių ligų diagnozavimui ar ligos eigos vertinimui [57].

### 1.2.3. NK ląstelės

1974 m. Cantor H., Wigzell H., Playfair J.H., ir kiti autoriai aprašė ląsteles, kurias pavadintos NK ląstelėmis [58]. NK ląstelės sudaro apie 5 – 15 % cirkuliuojančių limfocitų populiacijos sveikų žmonių kraujyje [59]. Membranose jos neturi molekulių, būdingų T (CD3) ir B limfocitams (CD19, CD20) [60], tačiau turi CD16 (FcγRIII). Pastarojo receptoriaus dėka NK ląstelė gali lizuoti antikūnais padengtas, virusais infekuotas ir navikines ląsteles (nuo antikūnų priklausomas ląstelių citotoksiškumas). NK ląstelėms būdingas CD56 – tai adhezijos molekulė. CD16 ir CD56 yra NK ląstelių žymenys [61]. NK ląstelės neekspresuoja T, B limfocitams būdinų receptorių (TCR, BCR) [59], todėl gali sunaikinti

MHC I klasės molekulių neekspresuojančias ląsteles [9]. NK ląstelės naikina ląsteles – taikinius, išskirdamos iš granulių perforiną ir granzimus (kaip ir citotoksiniai T limfocitai) [62]. NK ląstelės gausiai gamina IFN- $\gamma$ , IL-12, kurie aktyvina kitas imuniniame atsake dalyvaujančias ląsteles (T limfocitus, makrofagus) [61].

Nekontroliuojamas ar netinkamas NK ląstelių atsakas sukelia patologines būkles, tokias kaip transplantato atmetimas, diabetas, transplantatas prieš šeimininką, įvairias autoimunines ir neurologines ligas [62].

Manoma, kad NK ląstelės gali dalyvauti imunoreguliacijoje ir/arba autoimuninių ligų patogenezėje. Daugelio tyrimų duomenimis NK ląstelių funkcijos ar skaičiaus sumažėjimas randamas ligoniams, sergantiems įvairiomis autoimuninėmis ligomis, tokiomis kaip Sjogreno sindromas, išsėtinė sklerozė, sisteminė raudonoji vilkligė, reumatoidinis artritas [9, 59].

Ekspimentiniai pelių tyrimai rodo, kad NK ląstelės gali sukelti autoimunines reakcijas keliais mechanizmais: 1) slopinant virusinę infekciją dėl molekulinės mimikrijos ar polikloninės imuninės aktyvacijos; 2) moduluojant kitų imuninės sistemos ląstelių autoreaktyvų atsaką; 3) tiesiogiai sukeldami audinių pažeidimą [59].

NK ląstelių populiacijoje išskiriami NK T limfocitai. Tai limfocitai, priklausantys dviem subpopuliacijoms, turintys CD4<sup>+</sup> arba neturintys CD4<sup>-</sup> ir CD8<sup>-</sup> paviršiaus žymenis (dvigubai neigiami, DN) [63]. Jie pasižymi tarpiniu vaidmeniu tarp įgimto ir įgyto imuniteto, antigenus atpažįsta per CD1d receptorius [16]. Manoma, kad NK T limfocitai yra heterogeniška populiacija, turinti daug ląstelių potipių, kurie aktyvuojami skirtingais signalais įvairaus imuninio atsako metu [64].

### 1.3. Sjogreno sindromas

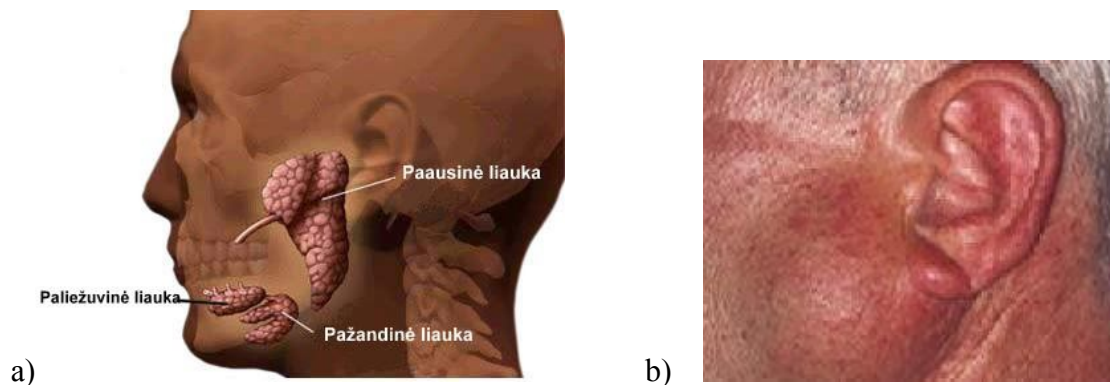
Sjogreno sindromas, arba autoimuninis epitelitas, – tai neaiškios kilmės lėtinė autoimuninė liga, pažeidžianti egzokrinines liaukas ir dažniausiai pasireiškianti „sausuoju keratokonjunktyvitu“ ir kserostomija. Šis sindromas pasižymi plačia klinicine raiška, apimančia tiek ir autoimuninę egzokrinopatiją, tiek ir sisteminį organizmo pažeidimą (pvz., kraujagyslių, plaučių, inkstų) [65-69].

Sjogreno sindromas skiriamas į pirminį, kai kitos autoimuninės ligos nėra, ir antrinį, kuris atsiranda sergant kitomis autoimuninėmis ligomis, pavyzdžiui, reumatoidiniu artritu, sisteminė raudonąja vilklige, autoimuniniu tiroiditu, pirmine biliarine ciroze, miozitu, mišria krieglobulinemija [70]. Pirminio Sjogreno sindromo metu atsiranda autoimuninis atsakas į pakitusius arba nenormalius savus, egzokrininių liaukų epitelio ekspresuojamus, antigenus.



Nors sausumo simptomai būdingi pirminiam ir antriniam Sjogreno sindromui, tačiau klinikiniai ir autoantikūnų profiliai, bei imunogenetinės charakteristikos skiriasi, dėl to tai paprastai vertinama atskiriant pirminį ir antrinį Sjogreno sindromus [71].

70 – 90 % sergančiųjų pirminiu Sjogreno sindromu nustatomi antinukleariniai antikūnai (ANA) – SS-A (Ro), SS-B (La) [72]. Jų buvimas sutampa su didelio dažnio ekstraglanduline raiška [68]. Šiems ligoniams klinikinė ligos eiga yra sunkesnė: patinsta pažandinės, paausinės seilių liaukos, smarkiai sutrinka seilių liaukų veikla, atsiranda hipergamaglobulinemija, limfopenija ir trombocitopenija [5, 11, 73].



2 pav. a) seilių liaukų išsidėstymas [74], b) paausinės seilių liaukos patinimo vaizdas [75].

Mieliauskaitės D., ir kt. tyrimo rezultatai rodo, kad vyresniame amžiuje sergantiesiems pirminiu Sjogreno sindromu rečiau randami autoantikūnai kraujyje. Galima teigti, jog sergančiųjų pirminiu Sjogreno sindromu amžius turi ryšį su autoantikūnų raiška kraujyje [76]. Taip pat sergant Sjogreno sindromu, bei kartu esant reumatoidiniam artritui ar mišriai jungiamojo audinio ligai, autoantikūnų SS-A (Ro) bei SS-B (La) paplitimo dažnis yra mažesnis. Antikūnų SS-A dažniau randama sergantiems pirminiu Sjogreno sindromu, o antikūnų SS-B nors ir nedideliais kiekiais, randama sergantiesiems kartu ir Sjogreno sindromu, ir sisteminė skleroze [77].

Antinukleariniai antikūnai (ANA) – tai autoantikūnai, nukreipti prieš branduolio antigenines struktūras, tokias kaip deoksiribonukleino rūgštis (DNR), ribonukleoproteinai (RNP), histonai ir kiti. Antinuklearinių antikūnų atsiradimo priežastys: apoptozės defektas sutrikdo visišką autoreaktyvių T limfocitų pašalinimą, kurie indukuoja autoantikūnų gamybą; pailgėjusi apoptozė (dėl įgimtų ar įgytų veiksnių), didina apoptozinių ląstelių ir autoantigenų koncentraciją kraujyje; per kurį laiką padidėjusi autoantigenų koncentracija kraujyje sutrikdo apoptozinės medžiagos pašalinimą; autoantigenai atsipalaidavę iš apoptozinių ląstelių yra labai jautrūs oksidaciniams pokyčiams, sukeliantiems jų modifikacijas, kurios dar labiau didina antigenų imunogeniškumą. Antikūnai prieš nukleoplazminius antigenus –

anti-SSA (Ro) ir anti-SSB (La) svarbūs diagnozuojant sisteminę raudonąją vilkligę, sisteminę sklerodermiją, Sjogreno sindromą [73].

Autoimuninės ligos apibūdinamos limfocitų sudėties nukrypimu dėl netinkamos ląstelių taikinių apoptozės. Dėl autoantigenų sukeliama atsako infiltruojami organai taikiniai [78]. Tačiau manoma, kad pagrindinis pirminio Sjogreno sindromo patologinis veiksnys yra padidėjusi epitelinių ląstelių apoptozė, kuri skatina egzokrininių liaukų infiltraciją limfocitais ir autoantikūnų gamybą [5].

Apoptozė yra neabejotinai susijusi su seilių liaukų pažeidimu. Įrodyta pacientų seilių liaukose apoptozę reguliuojančių baltymų raiška, tai rodo apoptotinių ląstelių žūtis reikšmę liaukų pažeidimo patogenezėje sergant šia autoimunine liga [78]. Anti-SSA (Ro) ir anti-SSB (La) autoantikūnai patenka į seilių liaukas ir sukelia jų ląstelių žūtį per apoptozės mechanizmus [68]. Sjogreno sindromui būdingi du patologiniai etapai: pirmame etape seilių ir ašarų liaukose netinkamai pakinta apoptozė, vėlesniame limfocitų infiltracijos (svarbus Sjogreno sindromo bruožas [79]) ir autoimuninės agresijos etape laipsniškai progresuoja liaukų destrukcija ir funkcijos nepakankamumas [80]. Taip pat Sjogreno sindromui būdingas B ląstelių hiperreaktyvumas, dėl to stebima hipergamaglobulinemija, autoreaktyvių antikūnų gamyba ir kartais monokloninių B limfocitų ekspansija [81]. 4 – 5% Sjogreno sindromo pacientų gali išsivystyti ne Hodžkino B ląstelių limfoma, kai kuriems iš jų didelio piktybiškumo [82, 83].

Be akivaizdžių pradinio pažeidimo vietų, kiti organai taip pat gali būti pažeidžiami – tai visas virškinamasis traktas, oda, plaučiai, kraujagyslės, inkstai, šlapimo pūslė, makštis [79, 84, 85]. Apie penktadaliui sergančiųjų pirminiu Sjogreno sindromu liga prasideda netipiškai, pavyzdžiui, 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 Sjogreno sindromo diagnozės patvirtinimo priežastis [77].

Kaip ir daugeliui autoimuninių jungiamojo audinio ligų, taip ir Sjogreno sindromui būdingas lytinis (seksualinis) dimorfizmas, kuomet moterys 10 – 20 kartų dažniau serga nei vyrai [8, 86, 87]. Klinikiniais tyrimais nustatyta, kad moterys santykiu 9 su 1 serga dažniau nei vyrai ir liga dažniausiai prasideda 40 – 50 gyvenimo metais [5, 88, 89]. Tačiau Sjogreno sindromu serga ir vaikai. Cimaz R. ir kt. tyrimo metu nustatyti 40 pirminio Sjogreno sindromo atvejai vaikams iki 16 m. (iš jų 35 mergaitės) [90]. Sjogreno sindromo atsiradimas jauname amžiuje gali būti sunkios sisteminės ligos eigos, neliaukinės raiškos ir limfoproliferacinio proceso atsiradimo rizikos veiksnys [76]. Kitų autorių duomenimis pirminiu Sjogreno sindromu dažniausiai suseraga moterys po menarchės, t. y. antrajame ir

trečiajame gyvenimo dešimtmetyje, ir prasidėjus menopauzei, t. y. penktojo dešimtmečio viduryje [91].

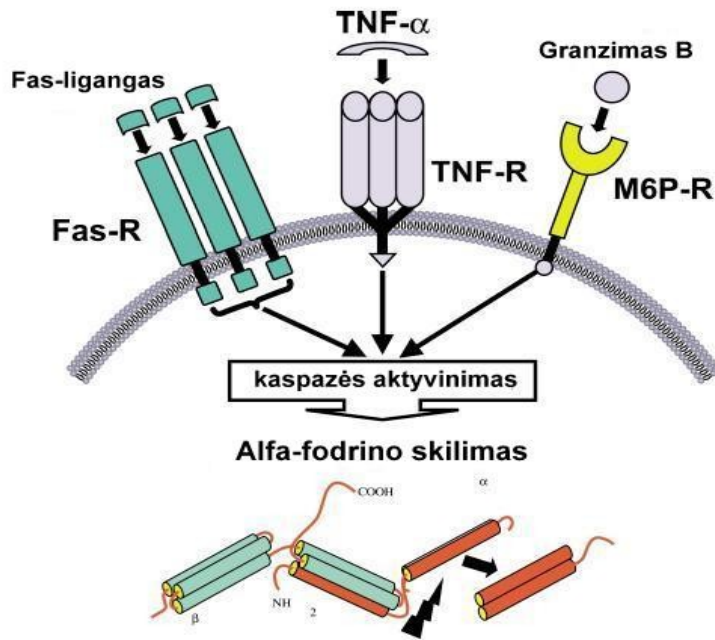
Pirmasis aprašytas Sjogreno sindromo atvejis priskiriamas J.Mikulicz, kuris 1892 m. aprašė 42 m. vyro seilių ir ašarų liaukų mažų apvalių ląstelių infiltratą [91]. 1933 m. Danijos oftalmologas dr. Henrik Sjögren (1899 – 1986) įvedė terminą *keratoconjunctivitis sicca* ir sudarė klinikinių ir histologinių požymių aprašą apie jį. Tai sudaro Sjogreno sindromo pagrindą. Nuo to laiko išsamiais tyrimais buvo siekama nustatyti Sjogreno sindromo etiologiją [85]. Įvairiais tyrimais nagrinėjamas androgenų trūkumas [92], voko kremzlės (Meibomo) liaukos disfunkcija [93], virusinė infekcija [91, 94, 95] ir daug kitų veiksnių. Galvoti apie genetinį polinkį sirgti pirminiu Sjogreno sindromu skatina šeiminiai šios ligos atvejai, gyvūnų modelių bei geno kandidato tyrimų rezultatai [96]. Vien Lietuvoje konsultavus 418 pacientų dėl akių ir burnos sausumo simptomų, nustatyti 11 šeiminio pirminio Sjogreno sindromo atvejų [97].

2002 m. Europos – Amerikos bendro sutarimo grupė patikslino klasifikacijos kriterijus pagal kuriuos diagnozuojamas Sjogreno sindromas. Remiamasi keletu vertinimu, įskaitant ir paciento subjektyvų akių ir burnos sausumo apibūdinimą, objektyviais požymiais, kuomet nustatoma seilių liaukų infiltracija limfocitais (kiekybinis histopatologinis vertinimas) bei randami autoantikūnai kraujo serume (anti-SSA (Ro) ir anti-SSB (La)) [98]. Histologiniai tyrimai rodo, kad infiltruojančios ląstelės daugiausiai yra CD4<sup>+</sup> T limfocitai iš aplinkinių kraujagyslių kraujo [69]. Limfocitų telkimąsi iš kraujagyslių į audinius lemia integrinai, chemokinai ir citokinai [128]. Eksperimentiniais tyrimais parodyta, kad Sjogreno sindromui svarbūs T limfocitai, nes Id3-deficitinėms pelėms su T limfocitų stoka nepavyko įrodyti Sjogreno sindromo vystymosi. Id3 yra 13kDa branduolio baltymas, dalyvaujantis besivystant T limfocitams [84].

Kito tyrimo metu nustatyta, kad T<sub>H</sub>17 limfocitai yra būdingi egzokrinių liaukų infiltratui sergant Sjogreno sindromu ir C57BL/6.NOD-Aec1Aec2 pelėms. T<sub>H</sub>17 efektorinės ląstelės pasižymi unikaliu sugebėjimu išskirti IL-17 po stimuliacijos TGF-β1 ir IL-6 ir yra pagrindiniai veiksniai autoimuninėms ligoms pasireikšti. Taip pat buvo pripažinta, kad pelių autoimuninių ligų atveju liga sunkesnė jei yra T<sub>H</sub>1 trūkumas, o ne perteklius [99]. Naudojant NOD.Igμ<sup>null</sup> peles nustatyta, kad T limfocitai Sjogreno sindromo patogenezei svarbūs iki ligos progresavimo, o liaukų sekretinio atsako praradimas priklauso nuo B limfocitų ir autoantikūnų [12]. Kito tyrimo metu parodyta, kad NOD pelėms Sjogreno sindromas nesivysto tol, kol T limfocitai neinfiltuoja liaukos [91].

Šiuo metu daug dėmesio skiriama serologiniams vertinimams, kurie rodo reumatoidinio faktoriaus buvimą, hipergamaglobulinemiją, ir antikūnus prieš muskarininius acetilcholino receptorių, ypač trečio tipo (M3R) [88, 100-102].

Daugiažidininė limfocitų infiltracija seilių ir ašarų liaukose lemia acinusų atrofiją ir parenchiminę fibrozę [5].  $CD4^+$  T limfocitai, nedidelis kiekis B limfocitų, plazminės ląstelės, vietiskai sekretuojančios antikūnus, sudaro infiltratą ir trikdo liaukų funkciją keliais būdais: ląsteliniai mechanizmai sukelia liaukinio audinio destruktiją; sekretuojami citokinai, kurie aktyvuoja 1 ir 2 tipo interferonus; autoantikūnų gamyba, jie susijungia su muskarininiais



3 pav. Kaspazės-3 aktyvavimas [103].

receptoriais; metaloproteinazių sekrecija, jos žeidžia liaukos ląstelių ekstraceliulinę medžiagą, kuri būtina veiksmingai liaukos funkcijai [91, 104], toliau vyksta lėtinis uždegimas. 70 – 80 % infiltruojančių ląstelių yra T limfocitai, B limfocitai sudaro apie 20 – 30 %, gali būti pavienių makrofagų [129, 130]. Maždaug 70 % T limfocitų yra  $CD4^+$ , o apie 25 % sudaro  $CD8^+$  [105, 131].

Iškelta hipotezė, kad apoptozę inicijuoja  $\alpha$ -fodrinus suskaldymas: atidengiami slapti epitopai, imuninė sistema gali reaguoti, todėl prasideda antikūnų prieš SSA (Ro) ir SSB (La) gamyba [85].

Acinusinių ląstelių apoptozė yra histologinis Sjogreno sindromo požymis. Tai gali būti dėl liaukų uždegimo arba acinusų ir latakėlių epitelinių ląstelių sutrikusios funkcijos.  $\alpha$ -fodrin proteolizė ar Fas/Fas-ligando sąveika sukelia acinusų audinio apoptozę [85].  $\alpha$ -fodrin yra 240 kDa su membrana susijęs citoskeleto baltymas. Suaktyvinus kaspazę-3  $\alpha$ -fodrinus

suskaldomas į tris fragmentus – 150, 120 ir 23 kDa. 120 kDa fragmentas yra autoantigenas. Kaspazė-3 aktyvina bei sukelia  $\alpha$ -fodriną proteolizę Fas/Fas-ligando sąveika, TNF- $\alpha$ , granzymas B.  $\alpha$ -fodriną yra susijęs su ląstelės membrana bei jonų kanalais ir siurbliais; autoantikūnai prieš  $\alpha$ -fodriną sutrikdo jų veiklą, tikriausiai todėl slopinama liaukų sekretinė funkcija ir jaučiamas Sjogreno sindromui būdingas akių ir burnos sausumas. Taip pat  $\alpha$ -fodriną proteolizė lemia ląstelės membranos susitraukimą [103] (3 pav.). Buvo nustatyta, kad in vitro 120 kDa fragmentas gali stimuliuoti T limfocitų proliferaciją ir citokinų sekreciją (IL-2, INF- $\gamma$ ) [106].

Tyrimai parodė, kad IgA antikūnai reaguojantys su  $\alpha$ -fodrinu aptinkami 64 % pacientų sergančių pirminiu Sjogreno sindromu, 47% pacientų, sergančių antriniu Sjogreno sindromu ir sisteminė raudonąja vilklige, ir 86% pacientų, sergančių antriniu Sjogreno sindromu ir reumatoidiniu artritu [107].

Pirminis Sjogreno sindromas rodo asociaciją su tam tikrais ŽLA alelių lokusais: ŽLA-B8, ŽLA-DR3 ir ŽLA-DRW52, taip pat ŽLA-DQA1 ir ŽLA-DQB1. SSB (La) serumo antikūnai randami 44 % dažniau esant ŽLA-DR $\beta$ 1\*3. Pacientams, kuriems kraujo serume randami antikūnai prieš SSA arba prieš SSB, dažnai būdingi specifiniai ŽLA-DQA1 ir ŽLA-DQB1 aleliai. Tai įrodo, kad galima turėti polinkį sirgti Sjogreno sindromu [83]. Taip pat imunohistologiniai sergančiųjų pirminiu Sjogreno sindromu seilių liaukų limfoidinių infiltratų tyrimai demonstruoja didelę žmogaus leukocitų antigeno ŽLA-DR ekspresiją acinusų ir latakėlių epitelio ląstelėse. Tai įrodo, kad jos gali veikti kaip „neprofesionalios“ pateikiančios antigeną ląstelės ir sąveikauti su CD4<sup>+</sup> T limfocitais. Ši epitelinių ląstelių ir T limfocitų sąveika turi įtakos tolimesnei citokinų ir chemokinų produkcijai ir B limfocitų proliferacijos bei diferenciacijos stimuliacijai [108].

Pagrindiniai veiksniai reguliuojantys vandens, elektrolitų ir baltymų kiekį seilėse ir ašarose yra simpatiniai ir parasimpatiniai nervai [12]. Sjogreno sindromas gali turėti žalingos įtakos egzokrininių liaukų inervacijai. Dėmesys buvo sutelktas į anti-M3R autoantikūnus, kurie blokuoja receptorių ar antagonistinius antikūnus, slopinančius skysčio sekreciją. Kitos galimos priežastys išsivystyti egzokrininių liaukų pažeidimui: 1) parasimpatinių neuronų pažeidimas; 2) infiltruojančių limfocitų išskiriami citokinai, kurie slopina neurotransmiterių išskyrimą; 3) muskarininių receptorių internalizacija po sąveikos su autoantikūnais, todėl sumažėja acinusų ląstelių raiška. Šis receptorių tarpininkauja cholinerginiam stimului ašarų ir seilių liaukose, ir Sjogreno sindromo gyvūnų modelių tyrimai parodė, kad pirminio Sjogreno sindromo pacientų serume antikūnai, reaguojantys su M3R, yra labai svarbūs sukeliant liaukų disfunkciją [88]. Tačiau šie autoantikūnai (anti-SSA, anti-SSB) siejami ne tik su Sjogreno sindromu, bet taip pat su kitomis ligomis, kaip antai, sisteminė raudonąja

vilklige, įgimta širdies blokada, raudonuoju dermatitu [5, 88]; 4) nuolatinis muskarininių receptorių stimuliavimas antikūnais, dėl kurio sumažėja jautrumas ir sekrecijos pajėgumas [109, 110]. L. Kovacs ir kt. tyrimų duomenys rodo, kad 66 iš 73 (90 %) pirminio Sjogreno sindromo pacientų randami antimuskarininiai antikūnai [65]. Taip pat tirtiems pirminio Sjogreno pacientams nustatytas sutrikęs kraujagyslių atsakas į cholinerginį stimuliavimą [111].

Taigi, Sjogreno sindromas yra daugiaveiksnė autoimuninė liga, apimanti daugelį priežasčių [96] ir pagrindinė patologija yra sudėtinė, atsižvelgiant į tai, kad autoreaktyvių limfocitų ekspansija galima dėl limfocitų apoptozės defekto antriniuose limfiniuose oragnuose [112].

Pagal 2002 m. bendru sutarimu patvirtintus Amerikos – Europos Sjogreno sindromo klasifikacijos kriterijus nustatyta, kad apie 0,2 % suaugusiųjų serga pirminiu Sjogreno sindromu, kasmet sustatomi 4 nauji atvejai iš 100 000 bendros populiacijos [113]. Duomenų apie Sjogreno sindromo paplitimo rodiklius Lietuvoje nėra.

#### 1.4. Tėkmės citometrija

Tėkmės citometrija – tai analitinis metodas, leidžiantis greitai nustatyti ir registruoti tam tikro bangos ilgio apšviestų dalelių ar ląstelių savybes. Terminas „tėkmės citometrija“ kilo nuo to, kad pavienės ląstelės išrikiuojamos eilute viena po kitos ir taip praeina pro detektorius [114].

Kiekybinės citometrijos era prasidėjo nuo T. Casperssono darbų apie ląstelių nukleorūgščių matavimus 1930 m. [115]. 1934 m. A. Moldavanas žengė pirmą žingsnį nuo statinės mikroskopijos link tėkmės sistemos. Jis pasiūlė sukurti aparatą, skirtą skaičiuoti eritrocitus, kurie kapiliaru patektų į mikroskopą [116]. 1953 metais P. Crossland – Tayloras atrado ir pritaikė laminarinės tėkmės hidrodinaminio fokusavimo principą, kuriuo suspensijos daleles galima „išrikiuoti“ vieną paskui kitą. Remdamasis šiuo ir kitais laimėjimais, 1965 metais L. Kamentzky sukūrė pirmąjį tėkmės citometro prototipą, gebantį vienu metu vertinti daugiau negu vieną ląstelės parametą. Šiuo tyrimu galima įvertinti nuo 500 iki 4000 ląstelių per sekundę ir nustatyti kelis jų parametrus vienu metu (dydį, skaičių, grūdėtumą, įvairius paviršinius ir viduląstelinius žymenis) [117].

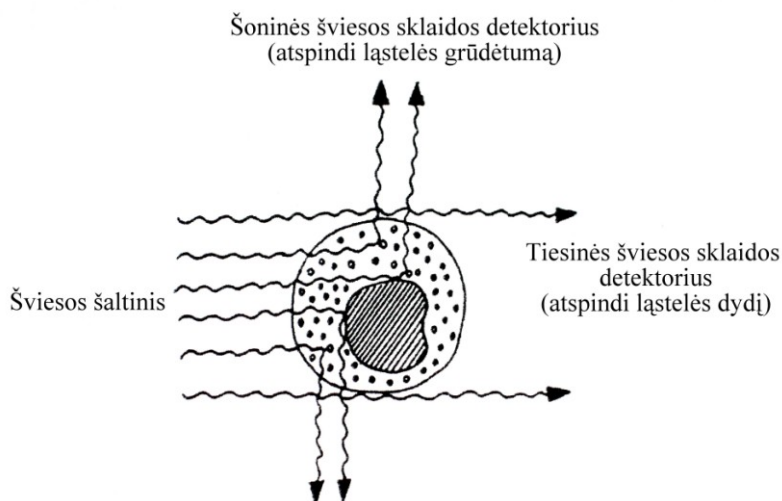
Elektrinės varžos matavimas leido ląsteles klasifikuoti tik pagal dydį. Šviesos sklaidos matavimas pagal įvairiais kampais atspindėtą šviesą leido patikimiau įvertinti ne tik ląstelės dydį, bet ir jos vidinių struktūrų tankumą. Pasitelkus monochrominės šviesos šaltinius

(lazerius) ir skirtingus fluorochromus galima įvertinti nuo trijų iki keturių papildomų ląstelės parametrų vienu metu [16].

Principas remiasi ląstelių šviesos sklaidos ir fluorescencinių savybių matavimu po to, kai ląstelės nešančiojo skysčio sraute susiduria su fokusuotu lazerio spinduliu. Tėkmės citometrus sudaro keletas technologinių sistemų:

- 1) Hidrodinaminė sistema – sukuria tiriamų dalelių srautą;
- 2) Apšvietimo sistema – sužadavimo bangų šviesos šaltinis (lazeris);
- 3) Optinė sistema – linzių, veidrodžių, filtrų sistema, kuri fluorescencijos bei šviesos sklaidos signalus nukreipia į detektorius;
- 4) Elektroninė sistema – šviesos signalų registracija ir virtimas elektroniniu signalu;
- 5) Kompiuterizuota duomenų rinkimo ir analizės sistema [116, 118-120].

Skysčio sraute tekėdamos ląstelės susiduria su lazerio spinduliu ir jį išsklaido. Išsklaidymo laipsnis priklauso nuo ląstelės dydžio ir kitų morfologinių savybių. Šis parametras vadinamas tiesine šviesos sklaida (TŠS). Lazerio spindulys susitikęs su ląstele prasiskverbia pro ją ir susidurdamas su vidinėmis ląstelės struktūromis bei nuo jų atsispindėdamas įvertina jos grūdėtumą ir kompleksškumą. Tai vadinama šonine šviesos sklaida (ŠŠS). Lazerio spindulio išsklaidymas fiksuojamas  $90^{\circ}$  ir  $180^{\circ}$  kampu, taip gaunami TŠS ir ŠŠS parametrai [117, 121].



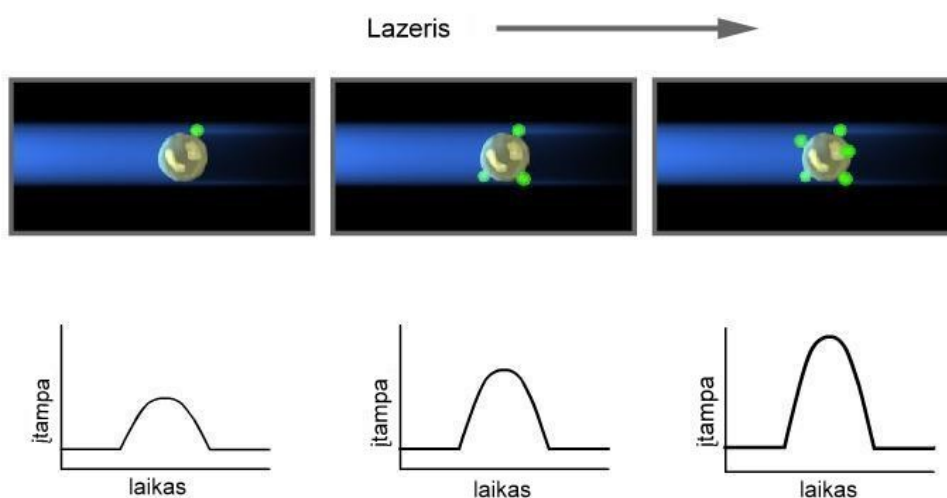
4 pav. Šviesos sklaida ląstelei kertant lazerio spindulį [122].

Tėkmės citometras registruoja ne tik ląstelių sukeltą lazerio šviesos išsklaidymą, bet ir prie ląstelės komponentų prijungtus monokloninius antikūnus su fluorochromais. Monokloniniai antikūnai gaunami naudojant hibridomų technologiją, o po to prie Fc fragmento yra prijungiamas fluorochromas. Ląstelės savo paviršiuje ekspresuoja skirtingus

antigenus, todėl panaudojus monokloninius antikūnus prieš atitinkamų ląstelių paviršinius žymenis, tėkmės citometru nustatomos dominančios ląstelės [123]. Kadangi sužadinti fluorochromai skleidžia skirtingų bangos ilgių švytėjimą, todėl tėkmės citometre panaudojus įvairius optinės sistemos elementus ir fotodetektorius galima vienu metu registruoti skirtingų fluorochromų, esančių toje pačioje ląstelėje, švytėjimą. Dauguma tėkmės citometrų vienu metu gali nustatyti keturių ir daugiau fluorochromų švytėjimus. Dažniausiai naudojami fluorochromai: FITC (fluoresceino izotiocianatas), PE (fikoeritinas), PerCP (peridinochlorofilo proteinas), APC (alofikocianinas) [124]. Tėkmės citometrijoje labai svarbu fluorochromus parinkti taip, kad jų išspinduliuotos šviesos (emisijos) spektrai būtų kuo toliau vienas nuo kito. Kuo emisijos spektrai toliau vieni nuo kitų, tuo „švaresnis“ signalas fiksuojamas detektoriuje ir reikalinga minimali emisijos spektro korekcija atimant iš kito fluorochromo spektro užklydusį signalą [16].

Optinė citometro sistema tam tikro bangos ilgio šviesos spindulius nukreipia į atitinkamus fotodetektorius, kur šviesos signalai sustiprinami ir paverčiami elektroniniais signalais, t. y. atsispindėjusi ar fluorescencinė šviesa matuojama šviesos nustatymo prietaisais – fotodiodais ir fotodaugintuvais, kurie paverčia šviesą elektriniu signalu [116]. Elektrinio signalo dydis yra proporcingas nustatytos šviesos kiekiui, kuris fluorescencinės šviesos atveju susijęs su prie ląstelės prisijungusių švytinčių molekulių skaičiumi (5 pav.) [122].

Tėkmės citometru matuojami keli individualios ląstelės parametrai, o tai leidžia atlikti palyginamąją analizę ir mėginyje išskirti įvairius ląstelių tipus, galima nustatyti ir kiekybiškai įvertinti visos ląstelių populiacijos heterogeniškumą [121].

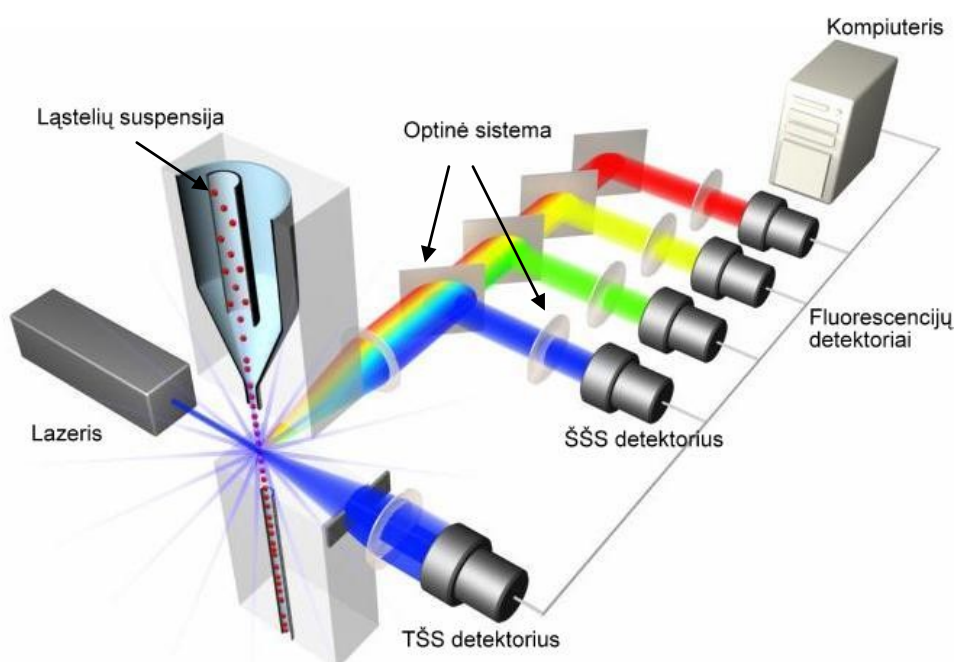


5 pav. Elektrinės įtampos pokyčio matavimas, priklausomai nuo prisijungusių fluorochromų kiekio [125].



Taigi, tėkmės citometrija pagrįsta keliais principais:

- Hidrodinaminiu ląstelių, tekančių nešančio skysčio srovėje, fokusavimu, dėl kurio ląstelės išsirikiuoja viena paskui kitą prieš kirsdomos lazerio spindulį. Šį principą užtikrina tėkmės citometro slėgio ir skysčių sistemos;
- Monochrominės lazerio šviesos sklaida, kuria įvertinamas ląstelės dydis (pagal tiesinę šviesos skaidą) ir grūdėtumas (pagal šoninę šviesos skaidą); fluorochormų sužadiniu ir skirtingų ilgių šviesos emisija;
- Monochrominė lazerio šviesa galima vienu metu sužadinti skirtingus fluorochormus ir gauti informaciją apie kelis ląstelės požymius [122].



6 pav. Tėkmės citometro schema [125].

Tėkmės citometru galima nagrinėti ne tik ląstelių fenotipines savybes, bet ir ląstelės ciklo dėsningumus, DNR, RNR, gyvybingumą, apoptozės, nekrozės procesus, ląstelių kultūras, bakterijas, chromosomas, fagocitozės procesą ir panašiai [114].

Apžvelgus literatūros šaltinius, matyti, jog moksliniuose darbuose daug dėmesio skiriama įvairių limfocitų populiacijų analizei sveikame organizme bei patologijų atveju. Tačiau Sjogreno sindromo atveju lieka neaiškus limfocitų populiacijų vaidmuo Sjogreno sindromo patogenezėi, nėra pakankamai ištirta šių populiacijų reikšmė ligos eigai. Kol kas nežinoma

nuo kokių imunologinių rodiklių priklauso sergančiųjų Sjogreno sindromu ligos raiška, pasveikimas ar ligos progresavimas.

Pateikta literatūros apžvalga rodo, kad sergančiųjų Sjogreno sindromu T limfocitų subpopuliacijų tyrimai yra aktualūs ir reikalingi.

## 2. TYRIMO METODAI IR APIMTIS

### 2.1. Tyrimo apimtis

Tiriamąją grupę sudarė devyni asmenys, 2011 m. dėl sausumo sindromo besikreipusių į Vilniaus Universiteto ligoninės Santariškių klinikas (VULSK). Tiriamojoje grupėje buvo devynios moterys, kurių amžiaus vidurkis 48 m. ± 16,4 (min 20 m., max 67 m.). Sergančios pirminiu Sjogreno sindromu (n=5, amžiaus vidurkis 45,2 m. ± 15,96, min 20 m., max 61 m.) ir neautoimuninės kilmės sausumo sindromu (n=4, amžiaus vidurkis 51,75 m. ± 18,5, min 25 m., max 67 m.) ligonės nustatytos VULSK gydytojų, pagal Amerikos ir Europos bendro sutarimo Sjogreno sindromo klasifikacijos kriterijus ir taisykles (pateikiamos 1 priede). Gauti grupių duomenys buvo palyginti tarpusavyje.

Šio darbo metu nustatyti pacientų periferinio kraujo T, B limfocitų ir natūralių kiliarių (NK) kiekiai. Detaliau tirtos CD4<sup>+</sup> T limfocitų (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup>) ir CD8<sup>+</sup> T limfocitų (CD8<sup>i</sup>CD57<sup>+</sup>, CD8<sup>i</sup>CD57<sup>-</sup>, CD8<sup>i</sup>CD27<sup>+</sup>, CD8<sup>i</sup>CD27<sup>-</sup> bei CD8<sup>i</sup>CD57<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>, CD8<sup>i</sup>CD57<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>, CD8<sup>i</sup>CD57<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>, CD8<sup>i</sup>CD57<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>) subpopuliacijos.

Tyrimai atlikti Valstybiniame mokslinių tyrimų institute, Inovatyvios medicinos centre.

### 2.2. Tėkmės citometrijos metodas

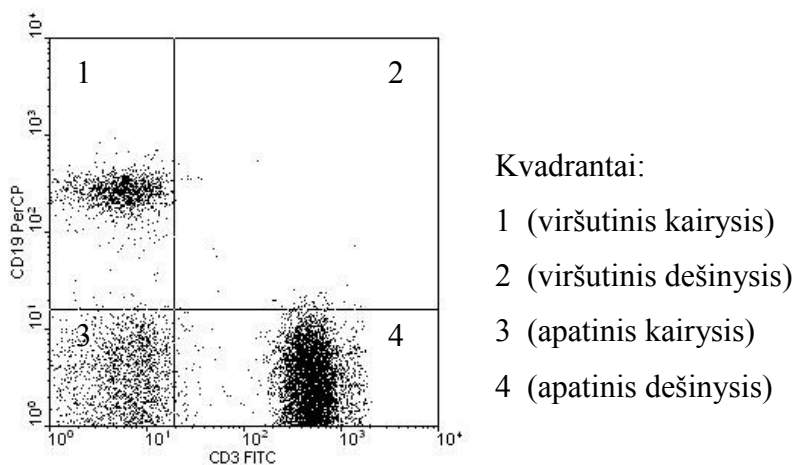
Limfocitų analizė atliekama Becton Dickinson FacsCalibur tėkmės citometru. Šis prietaisas matuoja šešis analizuojamų ląstelių parametrus – tiesinę šviesos sklaidą (TŠS) ir šoninę šviesos sklaidą (ŠŠS) bei keturias fluorescencijų detektoriais (FL) fiksuojamas fluorescencijas. Tėkmės citometre naudojami žalios spalvos 530/30 nm, oranžinės 585/42 nm, raudonos 650/20 nm bangos ilgio šviesos absorbcijos filtrai ir detektoriai. Pavyzdžiui, FL1 registruoja žalią fluorescenciją ir šviesa filtruojama 530/30 nm bangos ilgio filtru. Toks filtras praleidžia tik 515 – 545 nm bangos ilgio šviesą.

Ląstelės buvo analizuojamos CellQuest ir WinMDI 2.8 programomis. Analizei surenkama ne mažiau 50 000 ląstelių, tiriant paviršinius žymenis, bei ne mažiau 100000 ląstelių, tiriant viduląstelinius žymenis.

Lizuoto kraujo ląstelių taškinės diagramos leidžia atskirti limfocitus, monocitus ir granulocitus. Tiesinė šviesos sklaida atspindi ląstelių dydį, o šoninė – vidinį ląstelių granuluotumą. Limfocitai iš visų leukocitų yra mažiausi ir pasižymi mažiausiu granuluotumu.

Gaunama tirtų ląstelių diagrama, iš kurios galima analizuoti visas ląsteles arba tik dominančią ląstelių populiaciją. Išskirti dominančią populiaciją galima apibrėžiant jos regioną (angl. *gate*) histogramoje ar taškinėje diagramoje. Šios ląstelės toliau gali būti tiriamos siekiant nustatyti kitus parametrus.

Dar vienas paplitęs būdas apibrėžti ląstelių populiacijas norint nustatyti įvairių žymenų ekspresiją – tai taškinės diagramos suskirstymas kvadrantais. Šių kvadrantų analizė leidžia atskirti teigiamos žymenų ekspresijos ląstelių populiaciją nuo neigiamos (8 pav.), analizuojamos kvadrantų statistikos.



8 pav. Taškinės diagramos suskirstymas kvadrantais.

Taigi, limfocitų populiacijų procentiniai kiekiai periferinio kraujo leukocituose nustatomi, analizuojant fluorescuojančias ląsteles iš limfocitų regiono. Limfocitų neigiamai fluorescencijai atskirti naudojami Simultest Control  $\gamma_1$ APC/ $\gamma_2$ aPE/ $\gamma_1$ FITC reagentai (Becton – Dickinson).

### 2.3. Kraujo mėginių paėmimas

Tyrimui imtas veninis kraujas. Siekiant standartizuoti preanalizinį tyrimo etapą, veninis kraujas imamas standartinėmis sąlygomis į 5 ml vakuuminius Vacutainer mėgintuvėlius su natrio heparinu. Bandinio ėmimo metu buvo griežtai laikomasi gamintojo rekomendacijų: timpa laikoma ne ilgiau kaip minutę, draudžiama gnaužyti kumštį, dezinfekcinei medžiagai

leidžiama visiškai nudžiūti, mėgintuvėlis užpildomas  $\pm 10\%$  nurodyto tūrio, kad kraujo ir antikoagulianto santykis būtų tinkamas, mėgintuvėliai švelniai pavartomi (8 – 10 kartų).

Mėgintuvėliai su krauju pristatomi stovelyje vertikaloje padėtyje, vengiant didesnių temperatūros pokyčių. Transportavimo temperatūra negali būti žemesnė nei  $+4^{\circ}\text{C}$  ir aukštesnė nei  $+30^{\circ}\text{C}$ . Pristatyti kraujo bandiniai ruošiami limfocitų tėkmės citometrijai iš karto po pristatymo, tačiau esant reikalui mėginio ruošimas gali būti pradėtas ne vėliau kaip po 6 val., laikant kraują kambario temperatūroje. Kiekvieno bandinio vientisumas patikrinamas vizualiai: ar nėra krešulių, ar tinkamas kraujo ir antikoagulianto santykis.

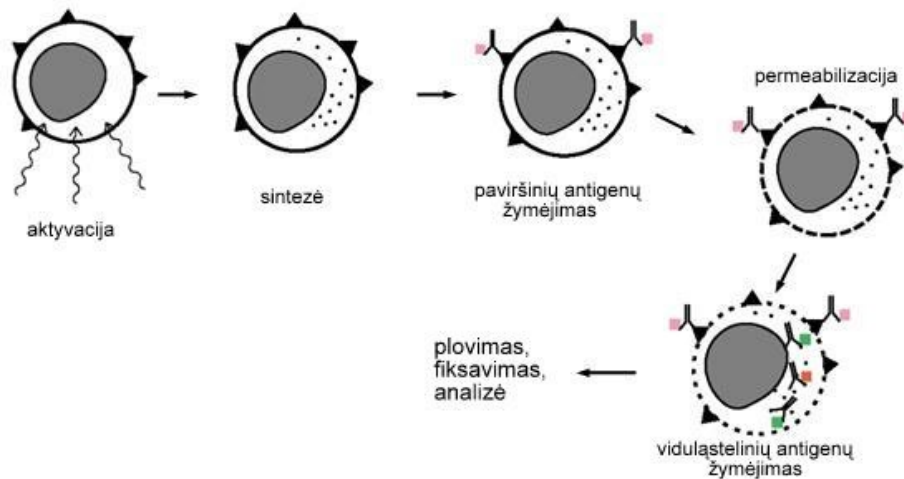
## 2.4. Mėginių paruošimas

Naudojama Becton Dickinson Immunocytometry Systems (JAV) rekomenduojama metodika, skirta nustatyti paviršinių bei viduląstelių žymenų ekspresiją.

Lizavimas (angl. *lysed whole blood, LWB*) atliekamas siekiant pašalinti eritrocitus, juos lizuojant specialiu lizavimo reagentu. Lizavimo tirpalas susprogdina eritrocitus, tačiau neveikia leukocitų.

Metodika paviršiniams antigenams nustatyti: į 12x75 mm citometrinius mėgintuvėlius automatiškai pipete įpilama po 50  $\mu\text{l}$  kraujo ir po 5  $\mu\text{l}$  konjuguotų su fluorochromais monokloninių antikūnų prieš limfocitų paviršinius žymenis. Švelniai sumaišoma ir inkubuojama 25 min. kambario temperatūroje tamsoje. Po inkubacijos į mėgintuvėlius įpilama po 2 ml lizuojančio tirpalo (FACS – Lysing Solution, Becton – Dickinson, JAV) ir eritrocitai lizuojami 15 min kambario temperatūroje tamsoje. Po to centrifuguojama 5 min 500xg, supernatantas nupilamas, nuosėdos sumaišomos. Į mėgintuvėlius pilama po 2 ml plovimo buferio (Cell Wash, Becton – Dickinson, JAV) ir centrifuguojama 5 min 500xg, supernatantas nupilamas, nuosėdos sumaišomos. Dar kartą įpilama plovimo buferio (po 500  $\mu\text{l}$  Cell Wash, Becton – Dickinson, JAV) ir analizuojama tėkmės citometru.

Tiriant limfocitų viduląstelines struktūras, ląstelės papildomai apdorojamos membranos pralaidumą didinančiais (permeabilizavimo) tirpalais, kad reagentai galėtų patekti į ląstelės vidų (9 pav.).



9 pav. Mėginių, skirtų vidulasteliniams žymenims nustatyti, paruošimo schema.

Metodika vidulasteliniams antigenams nustatyti: į mėgintuvėlį automatine pipete įpilama 1,5 ml kraujo, 1,5 ml terpės (RPMI), 3 ml (50 ng/ml galutinės koncentracijos) PMA, 3 ml (1 μmol/ml galutinės koncentracijos) jonomicino, 2,1 μl (0,7 μl/ml) GolgiStop<sup>TM</sup>. 4,5 val. laikoma 5% CO<sub>2</sub> 37° C inkubatoriuje. Po to sumaišoma ir išpilstoma po 200 μl į mėgintuvėlius. Įpilama po 5 μl konjuguotų su fluorochromais monokloninių antikūnų prieš limfocitų paviršinius žymenis. Švelniai sumaišoma ir inkubuojama 30 min. 5% CO<sub>2</sub> 37° C inkubatoriuje. Po inkubacijos į mėgintuvėlius įpilama po 4 ml lizuojančio tirpalo (FACS – Lysing Solution, Becton – Dickinson, JAV), ir eritrocitai lizuojami 15 min kambario temperatūroje tamsoje. Po to centrifuguojama 5 min 500xg, supernatantas atsargiai nusiurbiamas, nuosėdos sumaišomos. Į mėgintuvėlius įpilama po 1 ml žymėjimo buferio (FBS) ir centrifuguojama 5 min 500xg. Supernatantas atsargiai nusiurbiamas, nuosėdos sumaišomos. Įpilama po 500 μl Fixation/Permeabilisation buferio, sumaišoma ir inkubuojama 20 min kambario temperatūroje tamsoje. Po inkubacijos mėginiai centrifuguojami 5 min 500xg, supernatantas atsargiai nusiurbiamas, nuosėdos sumaišomos. Įpilama po 2 ml BD Perm/Wash buferio ir centrifuguojama 5 min 500xg, supernatantas atsargiai nusiurbiamas, nuosėdos sumaišomos. Į mėgintuvėlius pilama po 100 μl BD Perm/Wash buferio, supipetuojami. Įpilama po 5 μl konjuguotų su fluorochromais monokloninių antikūnų prieš limfocitų vidulastelinius žymenis, švelniai sumaišoma ir inkubuojama 30 min. kambario temperatūroje tamsoje. Po inkubacijos įpilama po 2 ml BD Perm/Wash buferio ir centrifuguojama 5 min 500xg. Supernatantas atsargiai nusiurbiamas, nuosėdos sumaišomos. Dar kartą įpilama po 2 ml BD Perm/Wash buferio, centrifuguojama 5 min 500xg,

supernatantas atsargiai nusiurbiamas, nuosėdos sumaišomos. Įpilama po 400 µl žymėjimo buferio (FBS) ir analizuojama tėkmės citometru.

Žalios spalvos (FL1) fluorescencijai naudotas fluoresceino izotiocianatas (FITC), oranžinės (FL2) – fikoeritinas (PE), raudonos (FL3) – peridinochlorofilo proteinas (PerCP) bei taip pat raudonos spalvos (FL4) – alofikocianinas (APC). Monokloniniai antikūnai derinami priklausomai nuo konjuguotų fluorochromų, pavyzdžiui, anti-CD19PerCP/anti-CD3FITC/anti-CD16+anti-CD56PE, anti-CD4PerCP/anti-CD25FITC ir panašiai. Naudotų monokloninių antikūnų charakteristikos pateikiamos 1 lentelėje.

1 lentelė. Monokloninių antikūnų charakteristikos.

Monokloniniai antikūnai pagal CD klasifikaciją	Konjuguotas fluorochromas	Specifiškumas
CD3	FITC	T limfocitų žymuo
CD19	PerCP	B limfocitų žymuo
CD16/56	PE	NK žymenys
CD4	PerCP	T helperių žymuo, silpniau ekspresuojamas ir monocitų/makrofagų
CD8	PerCP	Citotoksinių T limfocitų žymuo, silpniau ekspresuojamas ir kai kurių NK ląstelių
CD57	FITC	Ekspresuojamas daugumos NK ląstelių ir dalies T limfocitų
CD25	FITC	T reguliacinių limfocitų žymuo (IL-2 receptorius)
CD27	APC	Citotoksinių T limfocitų žymuo
IL-17A	APC	T helperių 17 žymuo
γ <sub>1</sub> (IgG <sub>1</sub> )	APC	Specifinis pelių ląstelių žymuo, kurio neturi žmogaus ląstelės
γ <sub>2a</sub> (IgG <sub>2a</sub> )	PE	Specifinis pelių ląstelių žymuo, kurio neturi žmogaus ląstelės
γ <sub>1</sub> (IgG <sub>1</sub> )	FITC	Specifinis pelių ląstelių žymuo, kurio neturi žmogaus ląstelės

Prieš tiriant mėginį atliekama:

- 1) Tiriamų populiacijų pavaizdavimas TŠS/ŠŠS taškinėje diagramoje.
- 2) Neigiamos ir teigiamos populiacijų ribos nustatytos pagal nedažyto mėginio fluorescencijos lygį, nes dalis ląstelių pasižymi autofluorescencinėmis savybėmis.
- 3) Neigiama izotipinė kontrolė, kurios metu naudojami izotipiniai reagentai prieš žmogaus organizme nesančius antigenus. Taip patikrinama ar nėra nespecifinio antikūnų jungimosi prie tiriamų ląstelių populiacijų.

## 2.5. Statistinė duomenų analizė

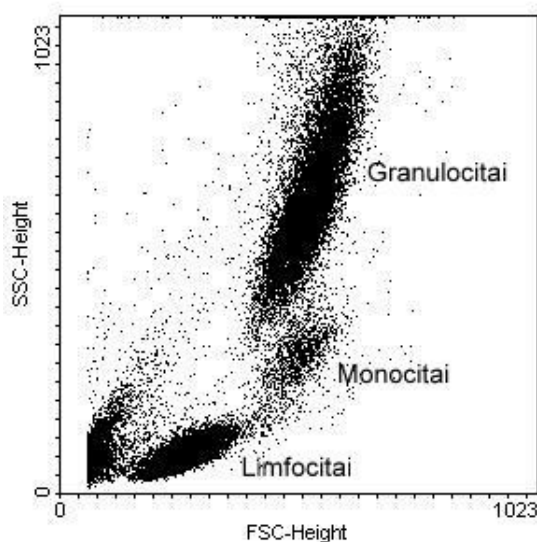
Statistinė duomenų analizė atlikta taikant kompiuterinės Statistica for Windows ir Microsoft EXEL 2003 programas. Darbe naudotos padėties (vidurkiai, min – max reikšmės) ir sklaidos (standartiniai nuokrypiai) statistikos. Duomenys lyginti pagal Mann'o ir Whitney U testą. Tai žinomiausias ir plačiausiai taikomas dviejų nepriklausomų imčių neparametrinio palyginimo testas. Mann'o ir Whitney U testas yra Stjudento t-testo dviem nepriklausomoms imtims neparametrinis analogas [126, 127]. Skirtumai yra statistiškai reikšmingi, kai  $p < 0,05$ . Siekiant nustatyti tiesinę priklausomybę tarp kintamųjų laipsni, buvo apskaičiuotas Pearson'o koreliacijos koeficientas  $r$ . Koreliacinis ryšys buvo vertinamas kaip labai silpnas, jei  $r=(0,00 - 0,19)$ , silpnas, jei  $r=(0,20 - 0,39)$ , vidutinis, jei  $r=(0,40 - 0,69)$ , stiprus, jei  $r=(0,70 - 0,89)$ , labai stiprus, jei  $r=(0,90 - 1,00)$ . Nors limfocitų koncentracijų vidurkiai, lyginant sergančius pirminiu Sjogreno sindromu su neautoimuninės kilmės sausumo sindromu, ligonių grupėse statistiškai reikšmingai nesiskyrė, tačiau reikšmių pasiskirstymo pobūdis abiejose grupėse buvo nevienodas.

### 3. TYRIMO REZULTATAI

#### 3.1. Limfocitų analizė tėkmės citometru

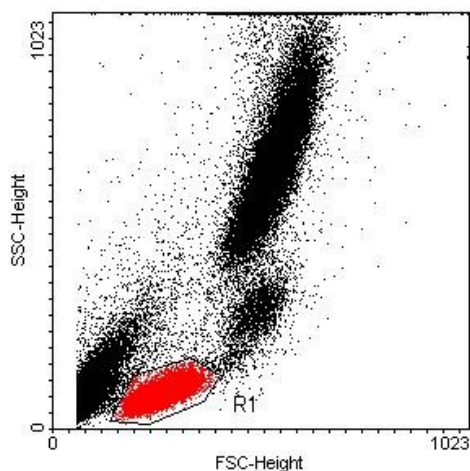
Ištirti devyni pacientai, besiskundžiantys sausumo sindromu. Atlikta šių pacientų periferinio kraujo fenotipinė analizė tėkmės citometru.

Pagal tiesinę (TŠS) ir šoninę (ŠŠS) šviesos sklaidas leukocitai taškinėje diagramoje išsidėsto priklausomai nuo dydžio ir granuliuotumo (10 pav.).



10 pav. Dvimatė taškinė kraujo leukocitų diagrama pagal tiesinę ir šoninę šviesos sklaidą.

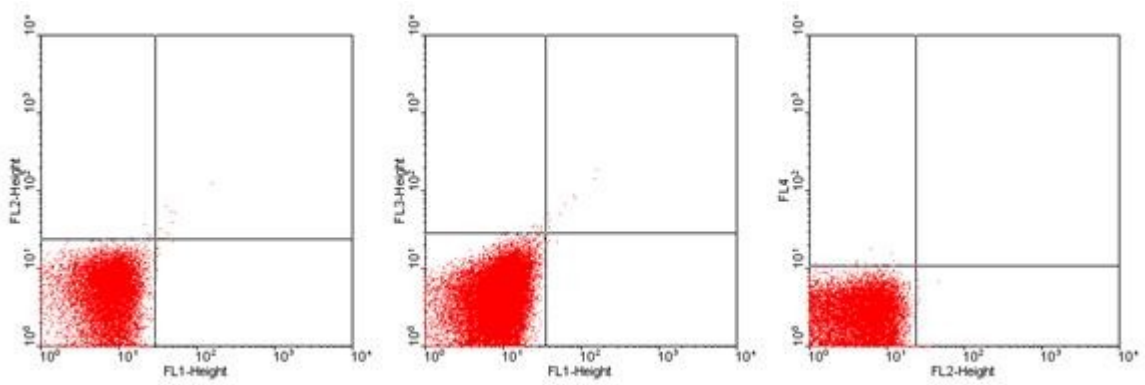
Taškinėje diagramoje apibrėžiamas limfocitų regionas (R1), kuris yra tiriamas toliau (11 pav.).



11 Pav. Apibrėžtas limfocitų regionas (R1).

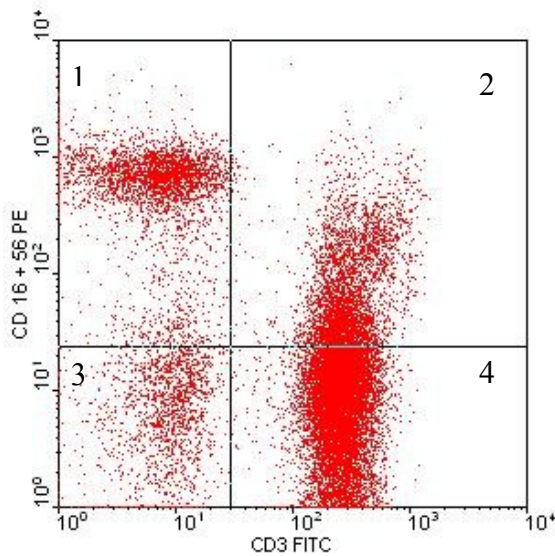
Pagal nedažyto mėginio fluorescencijos lygį nustatomos neigiamos ir teigiamos populiacijų ribos, t.y. suskirstoma kvadrantais (12 pav.).





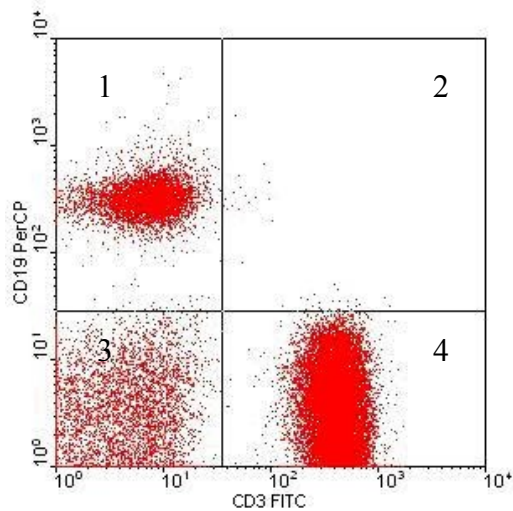
12 pav. Limfocitų fluorescencijos neigiamų kontrolių taškinės diagramos.

Bendram limfocitų populiacijų (NK, B, T limfocitų) identifikavimui naudoti monokloniniai antikūnai: anti-CD3FITC, anti-CD19PerCP, anti-CD16/CD56PE. T limfocitai, kurių žymuo yra CD3, matomi antrame ir ketvirtame kvadrantuose, o NK ląstelės, ekspresuojančios CD16 ir CD56 žymenis, išsidėsčiusios pirmame kvadrante. Trečiame kvadrante esančios ląstelės nepasižymi nei CD3, nei CD16/CD56 raiška (13 pav.).



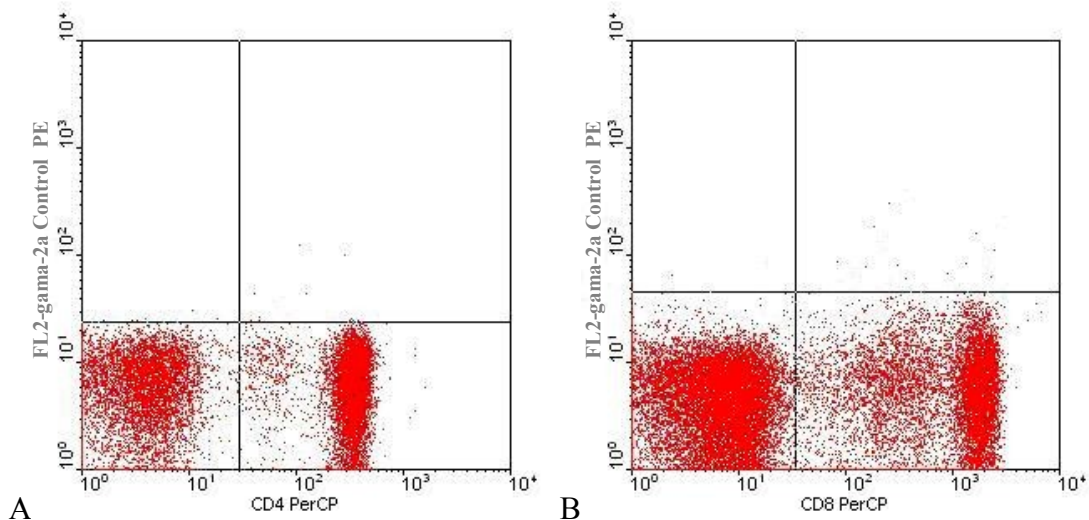
13 pav. Limfocitų populiacijų identifikavimas naudojant anti-CD3FITC, anti-CD16/CD56PE monokloninius antikūnus. T limfocitai (2 ir 4 kvadrantai), NK ląstelės (1 kvadrantas).

B limfocitų populiacija, ekspresuojanti žymenį CD19, matoma 14 pav., pirmame kvadrante. Šioje taškinėje diagramoje taip pat stebimi T limfocitai, kurių žymuo yra CD3 (ketvirtas kvadrantas).



14 pav. Limfocitų populiacijų identifikavimas naudojant anti-CD3FITC, anti-CD19PerCP monokloninius antikūnus. B limfocitai (1 kvadrantas), T limfocitai (4 kvadrantas).

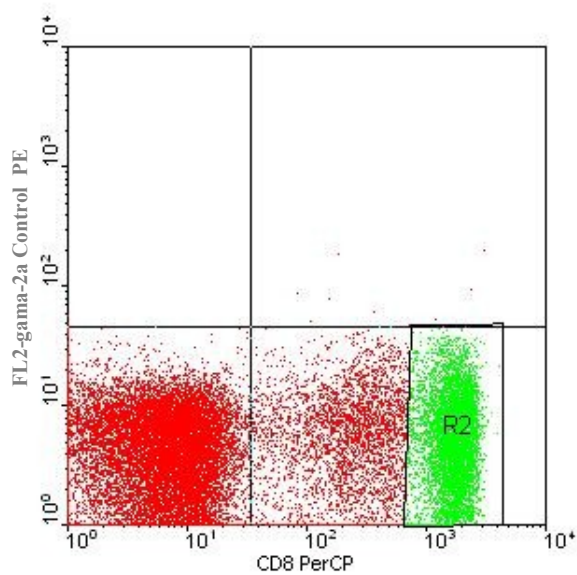
Toliau išsamiau tirtos T limfocitų subpopuliacijos, ekspresuojančios CD4 bei CD8 žymenis (15 pav.). Ląstelės inkubuotos su anti-CD4PerCP, anti-CD8PerCP monokloniniais antikūnais.



15 pav. Limfocitų populiacijų identifikavimas naudojant anti-CD4PerCP, anti-CD8PerCP monokloninius antikūnus. A – CD4<sup>+</sup> T limfocitai; B – CD8<sup>+</sup> T limfocitai.

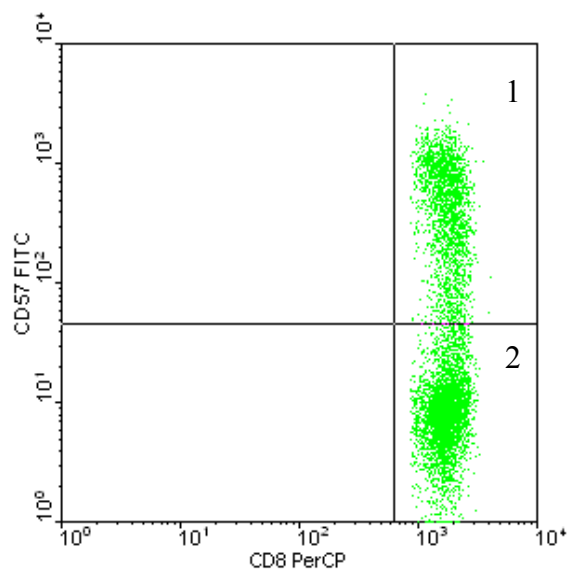
Detalesnei CD8<sup>+</sup> T limfocitų analizei reikalingi anti-CD57FITC, anti-CD27APC monokloniniai antikūnai.

Visa CD8<sup>+</sup> T limfocitų subpopuliacija pagal CD8 ekspresiją ir galimas funkcijas skirstoma į CD8<sup>i</sup>CD57<sup>+</sup>/CD8<sup>i</sup>CD57<sup>-</sup> – citotoksinius T limfocitus, ir CD8<sup>low</sup>CD57<sup>+</sup> – natūralių kilerių (NK) savybėmis pasižyminčius limfocitus. Todėl tolimesnei CD8<sup>+</sup> limfocitų analizei pasirenkami CD8<sup>i</sup> limfocitai – pažymimas jų regionas (R2) (16 pav.).



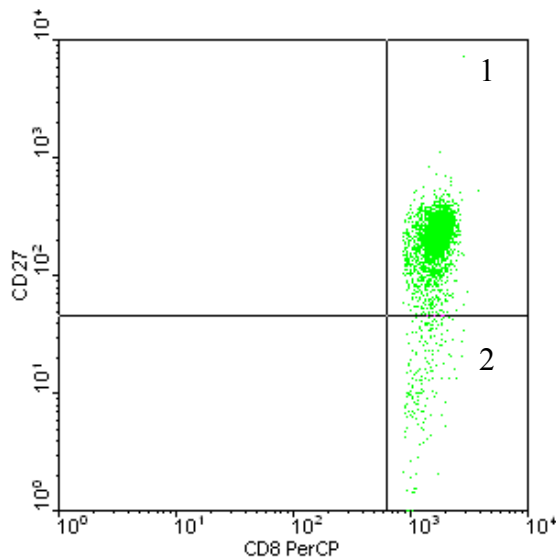
16 pav. Pažymėtas CD8<sup>i</sup> T limfocitų regionas (R2).

17 pav. matyti CD8<sup>i</sup> T limfocitų dalis (vidutiniškai 19% visų CD8<sup>i</sup> T limfocitų), kuriai būdinga CD57 žymens raiška.



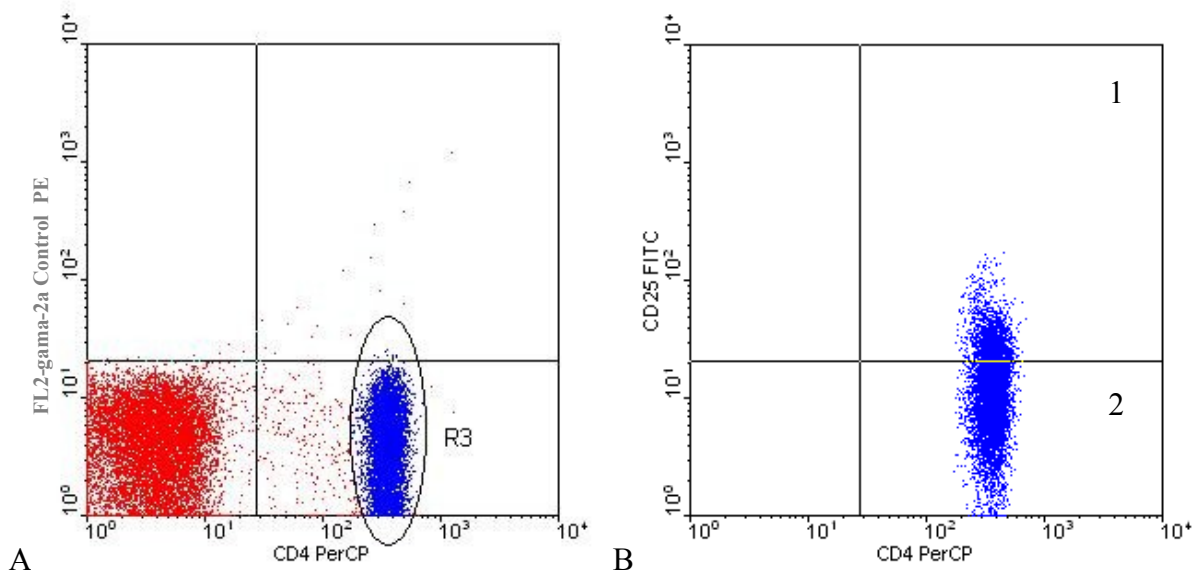
17 pav. CD8<sup>i</sup> T limfocitų subpopuliacijų identifikavimas naudojant anti-CD8PerCP ir anti-CD57FITC monokloninius antikūnus. Pirmame kvadrante matomi CD8<sup>i</sup> T limfocitai, ekspresuojantys CD57 žymenį.

Kaip matome iš 18 pav. didžioji dalis  $CD8^i$  T limfocitų (vidutiniškai 70% visų  $CD8^i$  T limfocitų) pasižymėjo CD27 žymens raiška.



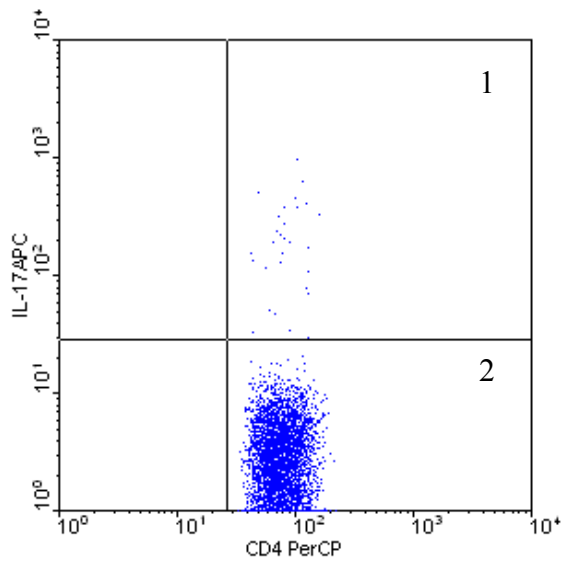
18 pav.  $CD8^i$  T limfocitų subpopuliacijų identifikavimas naudojant anti-CD8PerCP ir anti-CD27APC monokloninius antikūnus. Pirmame kvadrante matomi  $CD8^i$  T limfocitai, ekspresuojantys CD27 žymenį.

Detalesnei  $CD4^+$  T limfocitų analizei reikalingi anti-CD25FITC, anti-IL-17A APC monokloniniai antikūnai. Tolimesnei analizei pažymimas  $CD4^+$  T limfocitų regionas (R3) (19 pav. A), nustatoma  $CD4^+$  T limfocitų dalis, pasižyminti CD25 žymens raiška (19 pav. B).



19 pav.  $CD4^+$  T limfocitų subpopuliacijų identifikavimas naudojant anti-CD4PerCP ir anti-CD25FITC monokloninius antikūnus. A – pažymėtas  $CD4^+$  T limfocitų regionas (R3), B – pirmame kvadrante matomi  $CD4^+$  T limfocitai, ekspresuojantys CD27 žymenį.

Vidulastelinis  $CD4^+$  T limfocitų žymuo IL-17A nustatytas tik nedaugeliui  $CD4^+$  T limfocitų, vidutiniškai 1,66% visų  $CD4^+$  T limfocitų (20 pav., 1 kvadrantas).



20 pav.  $CD4^+$  T limfocitų subpopuliacijų identifikavimas naudojant anti-CD4PerCP ir anti-IL-17APC monokloninius antikūnus. Pirmame kvadrante matomi  $CD4^+$  T limfocitai, ekspresuojantys IL-17A žymenį.

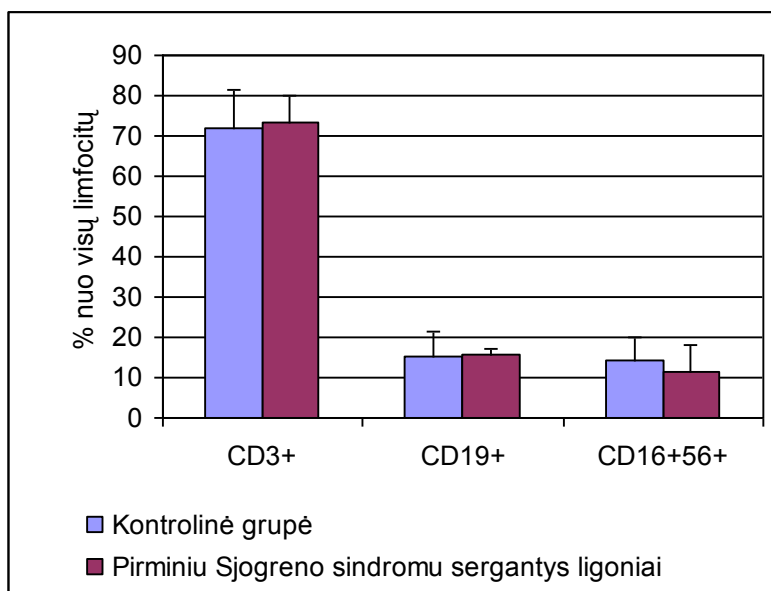
### 3.2. Pirminiu Sjogreno sindromu ir neautoimuninės kilmės sausumo sindromu sergančių ligonių limfocitų ir jų subpopuliacijų periferiniame kraujyje palyginimas

Tyrimo metu iš devynių sausumo sindromu besiskundžiusių pacienčių nustatytos penkios ligonės, sergančios pirminiu Sjogreno sindromu, ir keturios ligonės, sergančios neautoimuninės kilmės sausumo sindromu. Atliktas šių ligonių limfocitų populiacijų bei subpopuliacijų santykinų kiekių palyginimas (2 lentelė). Neautoimuninės kilmės sausumo sindromu sergančios ligonės sudarė kontrolinę grupę.

2 lentelė. Pirminiu Sjogreno sindromu sergančių ligonių ir kontrolinės grupės žmonių limfocitų populiacijų ir subpopuliacijų palyginimas.

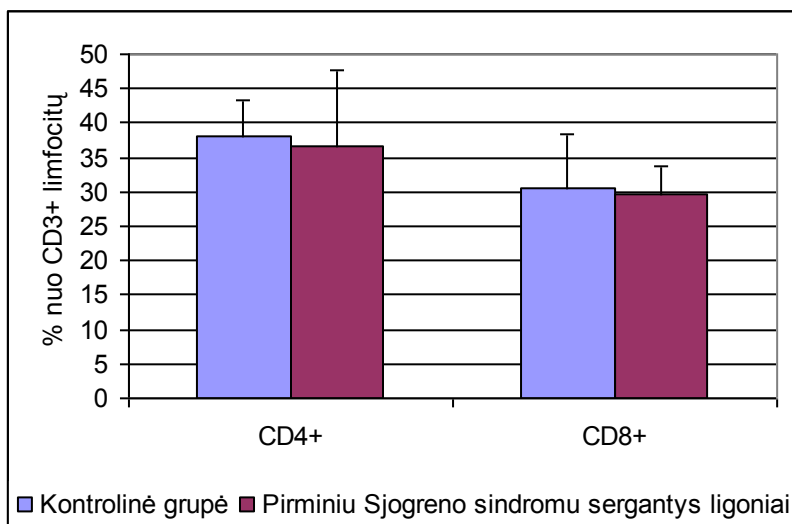
Žymuo		Vidurkis ± vid.st.nuokrypis		Abs.ribos (min - max)	
		Kontrolinė grupė, žymens raiška % (n=4)	Pirminiu Sjogreno sindromu sergantys ligoniai, žymens raiška % (n=5)	Kontrolinė grupė, žymens raiška % (n=4)	Pirminiu Sjogreno sindromu sergantys ligoniai, žymens raiška % (n=5)
% nuo visų limfocitų	CD3 <sup>+</sup>	71,98 ± 9,53	73,19 ± 6,87	60,59 ± 80,08	64,86 ± 80,81
	CD19 <sup>+</sup>	15,36 ± 5,92	15,51 ± 1,71	11,48 ± 24,01	13,22 ± 17,56
	CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	14,14 ± 5,89	11,58 ± 6,63	8,95 ± 21,24	4,81 ± 19,57
% nuo CD3 <sup>+</sup> limfocitų	CD4 <sup>+</sup>	38,21 ± 5,09	36,65 ± 10,94	31,9 ± 44,32	19,27 ± 48,18
	CD8 <sup>+</sup>	30,40 ± 7,85	29,57 ± 4,09	22,61 ± 39,27	25,04 ± 34,61
	CD8 <sup>l</sup>	18,36 ± 7,35	20,09 ± 3,67	9,61 ± 26,91	14,00 ± 23,28
% nuo CD8 <sup>l</sup> limfocitų	CD8 <sup>l</sup> CD57 <sup>+</sup>	19,02 ± 14,16	24,59 ± 10,32	4,41 ± 37,54	12,8 ± 40,5
	CD8 <sup>l</sup> CD57 <sup>-</sup>	80,99 ± 14,16	75,41 ± 10,32	62,46 ± 95,59	59,5 ± 87,20
	CD8 <sup>l</sup> CD27 <sup>+</sup>	69,06 ± 23,79	71,08 ± 9,85	40,11 ± 97,76	56,35 ± 78,7
	CD8 <sup>l</sup> CD27 <sup>-</sup>	31,94 ± 22,21	28,92 ± 9,85	6,24 ± 59,89	21,3 ± 43,65
	CD8 <sup>l</sup> CD57 <sup>-</sup> CD27 <sup>-</sup>	16,66 ± 9,40	12,13 ± 4,48	4,29 ± 27,15	5,13 ± 16,89
	CD8 <sup>l</sup> CD57 <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup>	3,88 ± 1,14	8,00 ± 1,53	2,46 ± 4,95	6,56 ± 10,13
	CD8 <sup>l</sup> CD57 <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup>	14,99 ± 13,14	16,15 ± 10,30	1,96 ± 32,60	5,80 ± 31,77
	CD8 <sup>l</sup> CD57 <sup>-</sup> CD27 <sup>+</sup>	63,91 ± 23,37	62,18 ± 9,10	35,09 ± 91,54	47,65 ± 68,75
% nuo CD4 <sup>+</sup> limfocitų	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	10,30 ± 5,25	11,39 ± 4,09	4,66 ± 15,60	5,82 ± 16,61
	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup>	89,65 ± 5,20	88,61 ± 4,09	84,37 ± 95,17	83,39 ± 94,19
	CD4 <sup>+</sup> IL-17A <sup>+</sup>	1,66 ± 0,93	1,09 ± 0,28	0,68 ± 2,77	0,84 ± 1,54

Pagal gautus duomenis sudarytos diagramos. 21 pav. matomi T (CD3<sup>+</sup>), B (CD19<sup>+</sup>) limfocitų ir NK (CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) ląstelių procentai visuose limfocituose pirminiu Sjogreno sindromu sergančių ligonių ir kontrolinės grupės žmonių periferiniame kraujyje. T, B limfocitų bendras kiekis grupėse praktiškai nesiskyrė, tačiau NK ląstelių kiekiai mažesni ligonių, sergančių pirminiu Sjogreno sindromu. Ši ląstelių populiacija mažesnė 2,56% lyginant su kontroline grupe (21 pav.).



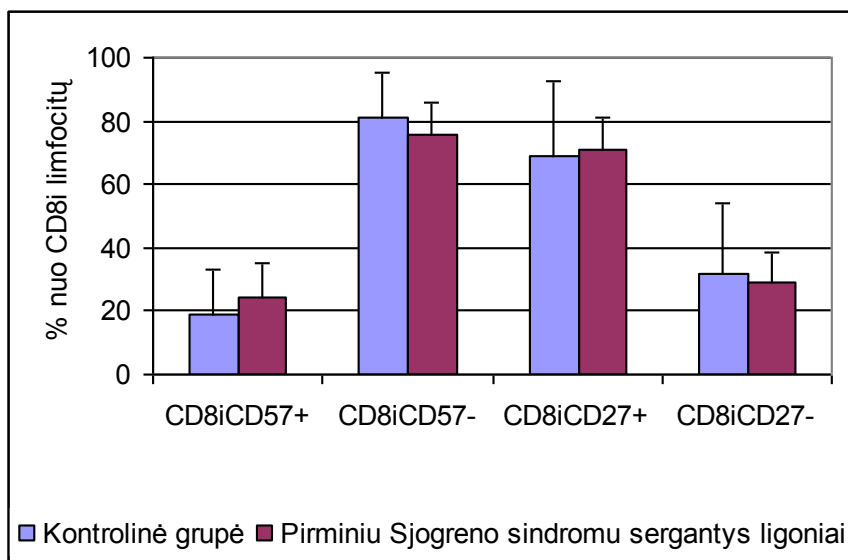
21 pav. Pirminiu Sjogreno sindromu sergančių ligonių ir kontrolinės grupės žmonių T (CD3<sup>+</sup>), B (CD19<sup>+</sup>) limfocitų ir NK (CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) ląstelių procento limfocitų populiacijoje palyginimas. Skirtumai statistiškai nereikšmingi ( $p > 0,05$ ).

T helperių (CD4<sup>+</sup>) ir citotoksinių T limfocitų (CD8<sup>+</sup>) procentai CD3<sup>+</sup> limfocitų populiacijoje sergančių pirminiu Sjogreno sindromu periferiniame kraujyje šiek tiek mažesni nei kontrolinės grupės žmonių, tačiau reikia paminėti, kad nustatyti skirtumai statistiškai nereikšmingi (22 pav.).



22 pav. Pirminiu Sjogreno sindromu sergančių ligonių ir kontrolinės grupės žmonių T helperių (CD4<sup>+</sup>) ir citotoksinių T limfocitų (CD8<sup>+</sup>) procento CD3<sup>+</sup> populiacijoje palyginimas. Skirtumai statistiškai nereikšmingi ( $p > 0,05$ ).

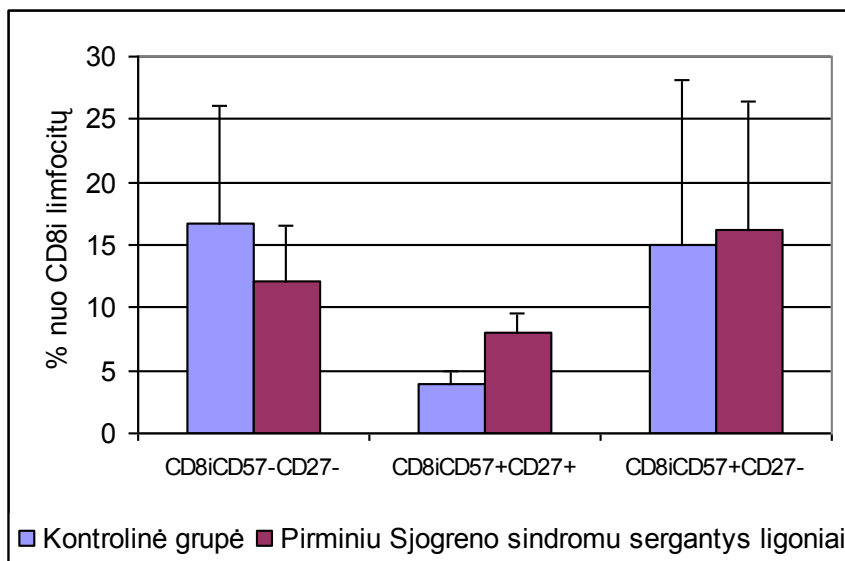
Analizuojant CD8<sup>i</sup> T limfocitus pagal CD57 žymens raišką, stebimas CD8<sup>i</sup>CD57<sup>+</sup> T limfocitų procento CD8<sup>i</sup> limfocitų populiacijoje padidėjimas (5,58%) lyginant su kontroline grupe ir analogiškas CD8<sup>i</sup>CD57<sup>-</sup> T limfocitų procento sumažėjimas sergančiųjų pirminiu Sjogreno sindromu ligonių grupėje. Taip pat Sjogreno sindromo atveju, CD8<sup>i</sup> T limfocitų pokytis pagal CD27 žymens raišką yra toks: CD8<sup>i</sup>CD27<sup>+</sup> procentai linkę padidėti, o CD8<sup>i</sup>CD27<sup>-</sup> – mažėti (23 pav).



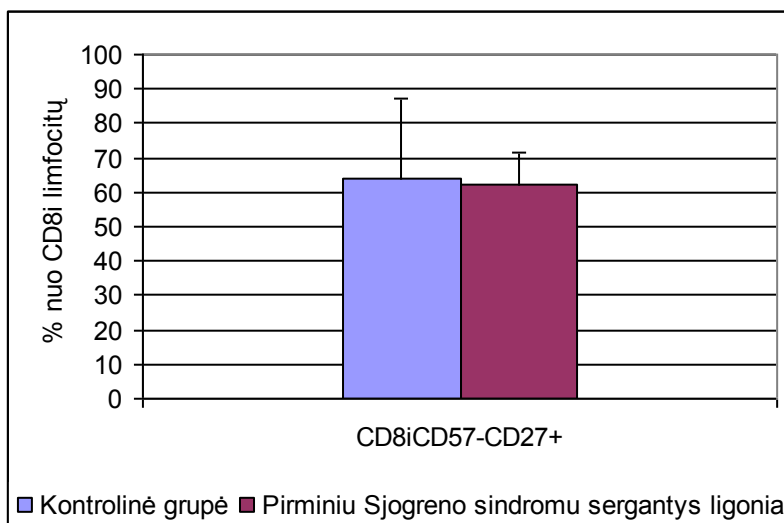
23 pav. Pirminiu Sjogreno sindromu sergančių ligonių ir kontrolinės grupės žmonių CD8<sup>i</sup>CD57<sup>+</sup>, CD8<sup>i</sup>CD57<sup>-</sup>, CD8<sup>i</sup>CD27<sup>+</sup>, CD8<sup>i</sup>CD27<sup>-</sup> limfocitų procento CD8<sup>i</sup> populiacijoje palyginimas. Skirtumai statistiškai nereikšmingi ( $p > 0,05$ ).



Lyginant  $CD8^+CD57^-CD27^-$ ,  $CD8^+CD57^+CD27^+$  bei  $CD8^+CD57^+CD27^-$   $CD8^+$  limfocitų subpopuliacijas matyti, jog skirtumai išryškėja  $CD8^+CD57^-CD27^-$  ir  $CD8^+CD57^+CD27^+$  limfocitų populiacijose atskirose tiriamųjų grupėse (24 pav.) Sergančiųjų pirminių Sjogreno sindromu ligonių grupėje stebimas  $CD8^+CD57^-CD27^-$  limfocitų procento  $CD8^+$  limfocitų populiacijoje sumažėjimas (4,53%) bei  $CD8^+CD57^+CD27^+$  limfocitų procento padidėjimas (4,12%) lyginant su kontroline grupe (24 pav.).  $CD8^+CD57^+CD27^-$  limfocitų vidurkiai tarp grupių yra statistiškai reikšmingi ( $p=0,016$ ). Skirtumai grupėse pagal  $CD8^+CD57^+CD27^-$  (24 pav.) ir  $CD8^+CD57^-CD27^+$  (25 pav.) limfocitų procentus yra nežymūs.

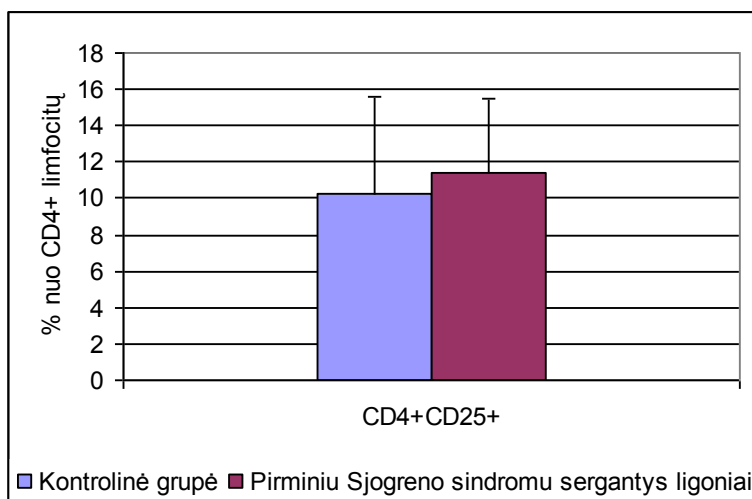


24 pav. Pirminių Sjogreno sindromu sergančių ligonių ir kontrolinės grupės žmonių  $CD8^+CD57^-CD27^-$ ,  $*CD8^+CD57^+CD27^+$  bei  $CD8^+CD57^+CD27^-$  limfocitų procento  $CD8^+$  populiacijoje palyginimas. Skirtumai statistiškai nereikšmingi ( $p>0,05$ ). \*Statistiškai reikšmingai skiriasi  $CD8^+CD57^+CD27^+$  limfocitų populiacija,  $p=0,016$ .

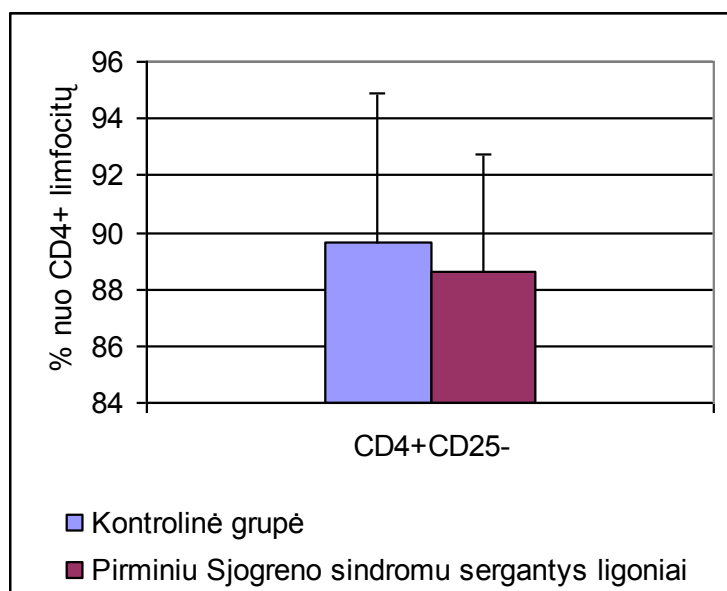


25 pav. Pirminių Sjogreno sindromu sergančių ligonių ir kontrolinės grupės žmonių  $CD8^+CD57^-CD27^+$  limfocitų procento  $CD8^+$  populiacijoje palyginimas. Skirtumai statistiškai nereikšmingi ( $p > 0,05$ ).

Analizuojant T reguliacinius limfocitus ( $CD4^+CD25^+$ ) bei T limfocitus ( $CD4^+CD25^-$ ), kurie dar nepasižymi reguliacinių T limfocitų savybėmis, matoma, kad sergantiems pirminiu Sjogreno sindromu pacientams  $CD4^+CD25^+$  procentas  $CD4^+$  populiacijoje yra nežymiai padidėjęs (1,09%) (26 pav.), o  $CD4^+CD25^-$  analogiškai (1,03%) sumažėjęs (27 pav) lyginant su kontroline grupe.

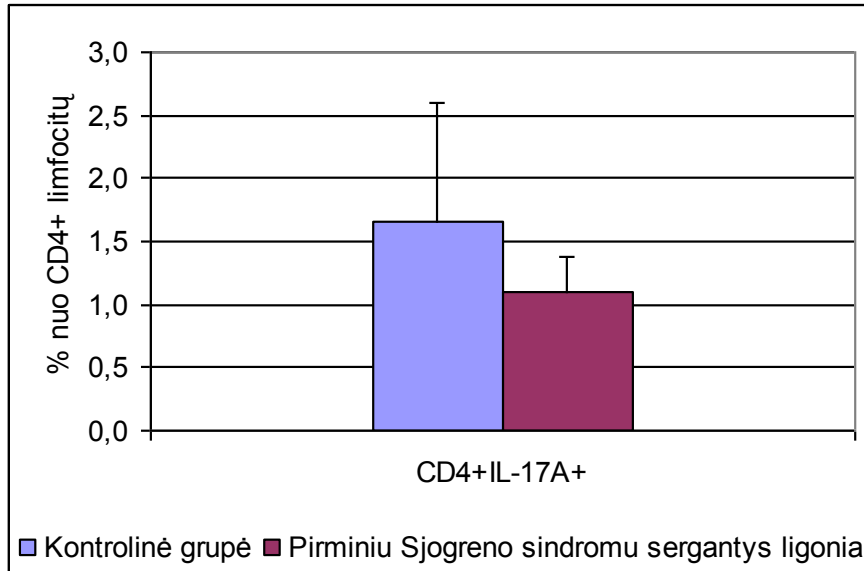


26 pav. Pirminiu Sjogreno sindromu sergančių ligonių ir kontrolinės grupės žmonių  $CD4^+CD25^+$  limfocitų procento  $CD4^+$  populiacijoje palyginimas. Skirtumai statistiškai nereikšmingi ( $p > 0,05$ ).



27 pav. Pirminiu Sjogreno sindromu sergančių ligonių ir kontrolinės grupės žmonių  $CD4^+CD25^-$  limfocitų procento  $CD4^+$  populiacijoje palyginimas. Skirtumai statistiškai nereikšmingi ( $p > 0,05$ ).

Lyginant T helperius 17 pagal žymens IL-17A<sup>+</sup> raišką, stebimas CD4<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup> limfocitų procento CD4<sup>+</sup> limfocitų populiacijoje sumažėjimas 0,57% pirminiu Sjogreno sindromu sergančių ligonių grupėje lyginant su kontroline grupe (28 pav.).



28 pav. Pirminiu Sjogreno sindromu sergančių ligonių ir kontrolinės grupės žmonių CD4<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup> limfocitų procento CD4<sup>+</sup> populiacijoje palyginimas. Skirtumai statistiškai nereikšmingi ( $p > 0,05$ ).

Palyginus duomenis pagal Mann'o ir Whitney U testą tarp pirminiu Sjogreno sindromu sergančių ligonių ir kontrolinės grupės gauta, kad limfocitų santykiniai kiekiai skaičiuojant nuo visų limfocitų ar nuo CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD8<sup>i</sup>, CD4<sup>+</sup> limfocitų populiacijų, išskyrus CD8<sup>i</sup>CD57<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> limfocitų populiaciją ( $p=0,016$ ), statistiškai reikšmingai nesiskyrė ( $p > 0,05$ ).

Toliau buvo apskaičiuoti ir absoliutūs limfocitų populiacijų ląstelių skaičiai grupėse. Kiekvieno paciento bendras limfocitų skaičius priklauso nuo esamo leukocitų skaičiaus, todėl po vienoda atskirų pacientų limfocitų populiacijų procentine išraiška gali būti skirtinga ląstelių koncentracija. Į tolesnę analizę įtrauktos septynios pacientės su žinomais absoliučiais limfocitų kiekiais. Atliktas šių ligonių limfocitų populiacijų bei subpopuliacijų koncentracijų vidurkių palyginimas (3 lentelė).

Palyginus abiejų grupių duomenis absoliučiais skaičiais pagal Mann'o ir Whitney U testą gauta, kad limfocitų koncentracijų vidurkiai statistiškai reikšmingai nesiskyrė ( $p>0,05$ ).

Numanoma to priežastis – maža tiriamųjų imtis, mat statistinių skaičiavimų galimybės yra ribotos mažų imčių atvejais.

3 lentelė. Pirminiu Sjogreno sindromu ir neautoimuninės kilmės sausumo sindromu sergančių ligojų limfocitų populiacijų koncentracijų vidurkių palyginimas.

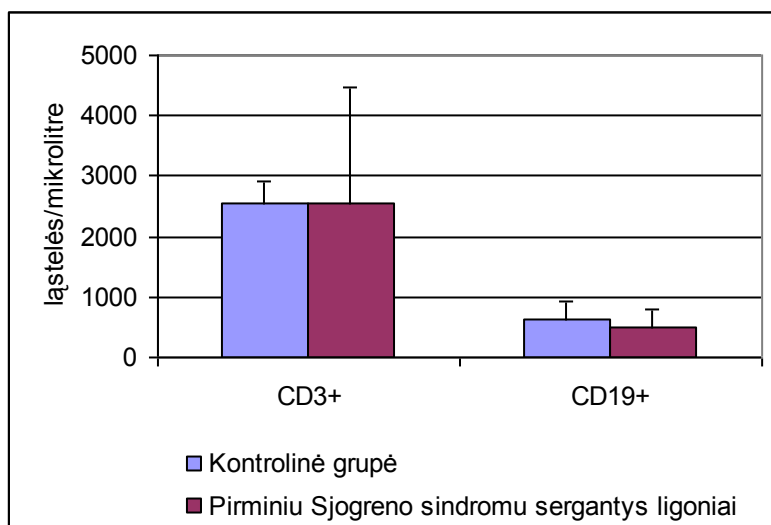
Žymuo	Vidurkis ± vid.st.nuokrypis		Abs.ribos (min – max)	
	Kontrolinė grupė, ląst./μl (n=3)	Pirminiu Sjogreno sindromu sergantys ligojai, ląst./μl (n=4)	Kontrolinė grupė, ląst./μl (n=3)	Pirminiu Sjogreno sindromu sergantys ligojai, ląst./μl (n=4)
CD3 <sup>+</sup>	2555 ± 358	2536 ± 1922	2251 ± 2950	1160 ± 5290
CD19 <sup>+</sup>	627 ± 304	484 ± 300	427 ± 977	276 ± 921
CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	572 ± 210	335 ± 334	330 ± 707	80 ± 819
CD4 <sup>+</sup>	1344 ± 262	1207 ± 906	1061 ± 1578	319 ± 2373
CD8 <sup>+</sup>	1201 ± 156	1021 ± 800	1021 ± 1306	532 ± 2210
CD8 <sup>I</sup>	693 ± 300	736 ± 600	391 ± 991	363 ± 1622
CD8 <sup>I</sup> CD57 <sup>+</sup>	135 ± 122	167 ± 169	17 ± 262	46 ± 418
CD8 <sup>I</sup> CD57 <sup>-</sup>	558 ± 268	569 ± 432	374 ± 865	279 ± 1205
CD8 <sup>I</sup> CD27 <sup>+</sup>	463 ± 235	524 ± 369	280 ± 727	278 ± 1063
CD8 <sup>I</sup> CD27 <sup>-</sup>	235 ± 198	213 ± 232	24 ± 417	79 ± 560
CD8 <sup>I</sup> CD57 <sup>-</sup> CD27 <sup>-</sup>	125 ± 94	99 ± 96	17 ± 189	19 ± 239
CD8 <sup>I</sup> CD57 <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup>	26 ± 14	56 ± 37	10 ± 35	24 ± 107
CD8 <sup>I</sup> CD57 <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup>	108 ± 111	110 ± 136	8 ± 227	21 ± 313
CD8 <sup>I</sup> CD57 <sup>-</sup> CD27 <sup>+</sup>	429 ± 229	463 ± 334	245 ± 686	250 ± 954
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	162 ± 97	115 ± 56	50 ± 218	53 ± 182
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup>	1181 ± 175	1091 ± 866	1010 ± 1359	266 ± 2235
CD4 <sup>+</sup> IL-17A <sup>+</sup>	26 ± 17	13 ± 10	7 ± 39	4 ± 22

Lyginant pirminiu Sjogreno sindromu sergančių ligojų ir kontrolinės grupės žmonių koncentracijos minimalias ir maksimalias reikšmes, buvo stebima, kad pirminio Sjogreno sindromo grupėje daugumos rodiklių, išskyrus CD19<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup>, koncentracijų maksimalios reikšmės yra didesnės nei kontrolinėje grupėje (3 lentelė).

Analizuojant absoliučius ląstelių kiekius grupėse stebimos panašios limfocitų populiacijų koncentracijų pasiskirstymo tendencijos kaip ir procentine išraiška, išskyrus keletos populiacijų.

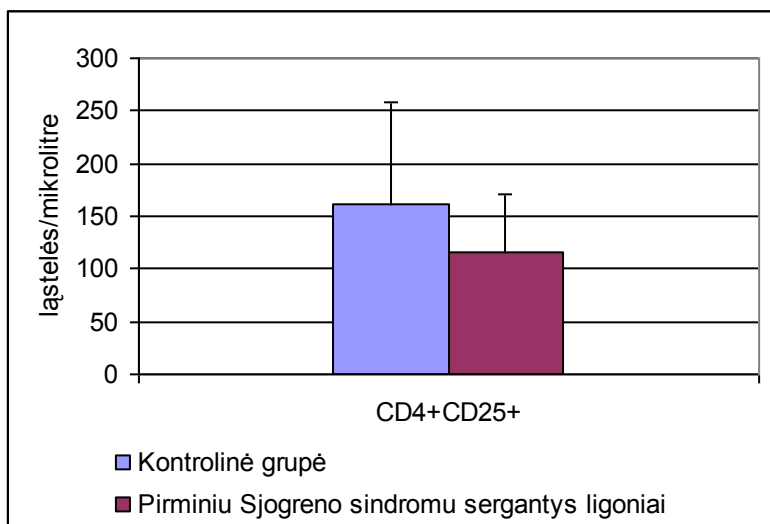
Išsiskiria  $CD3^+$ ,  $CD19^+$ ,  $CD4^+CD25^+$  limfocitai, kurių koncentracijos mažesnės, bei  $CD8^+CD57^-$  ir  $CD8^+CD57^-CD27^+$  limfocitai, kurių koncentracijos didesnės pirminių Sjogreno sindromu sergančių ligonių grupėje lyginant su kontroline grupe.

Tiesa,  $CD3^+$  pokytis yra nežymus, sergančiųjų pirminių Sjogreno sindromu ligonių grupėje, šių limfocitų skaičius mažesnis tik 19 ląst./ $\mu$ l, lyginat su kontroline grupe, todėl diagrama nėra informatyvi (29 pav.).  $CD19^+$  limfocitų koncentracija 143 ląst./ $\mu$ l yra mažesnė Sjogreno sindromo ligonių grupėje (29 pav.).



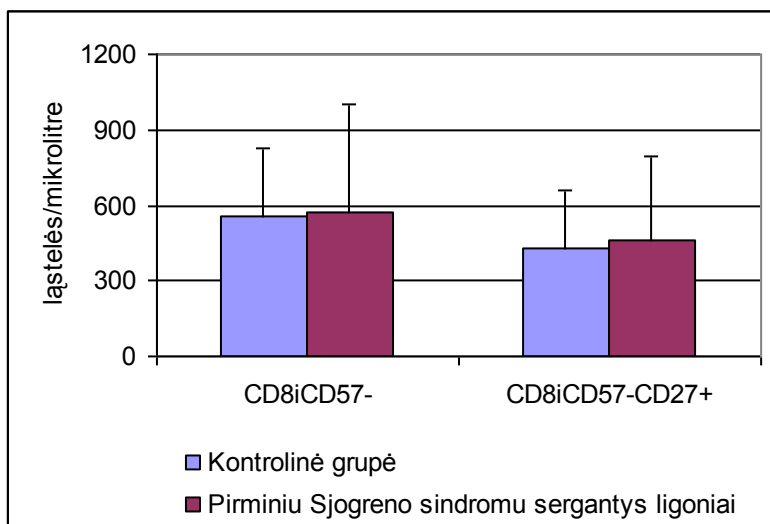
29 pav. Pirminių Sjogreno sindromu sergančių ligonių ir kontrolinės grupės žmonių  $CD3^+$ ,  $CD19^+$  limfocitų koncentracijų vidurkių palyginimas. Skirtumai statistiškai nereikšmingi ( $p > 0,05$ ).

Lyginant  $CD4^+CD25^+$  limfocitų koncentracijos vidurkius tarp pirminių Sjogreno sindromu sergančių ligonių ir kontrolinės grupės žmonių stebima 46 ląst./ $\mu$ l mažesnė koncentracija Sjogreno sindromo ligonių grupėje (30 pav.).



30 pav. Pirminiu Sjogreno sindromu sergančių ligonių ir kontrolinės grupės žmonių  $CD4^+CD25^+$  limfocitų koncentracijų vidurkių palyginimas. Skirtumai statistiškai nereikšmingi ( $p > 0,05$ ).

$CD8^iCD57^-$  ir  $CD8^iCD57^-CD27^+$  limfocitų koncentracijų vidurkiai šiek tiek didesni sergančiųjų pirminiu Sjogreno sindromo ligonių grupėje. Pavyzdžiui,  $CD8^iCD57^-$  limfocitų koncentracijos vidurkis sergančiųjų pirminiu Sjogreno sindromu buvo 569 ląst./ $\mu$ l, o kontrolinės grupės žmonių 374 ląst./ $\mu$ l (31 pav.).

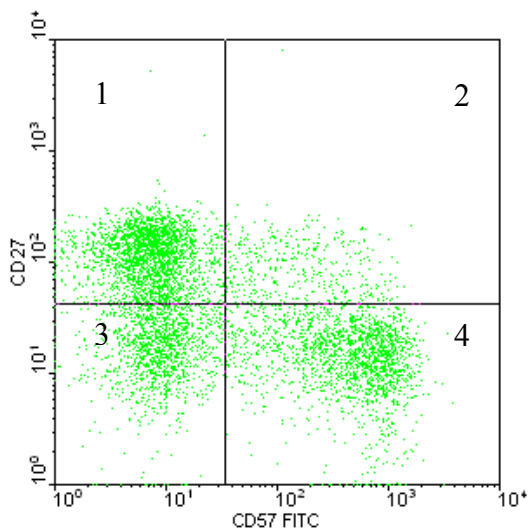


31 pav. Pirminiu Sjogreno sindromu sergančių ligonių ir kontrolinės grupės žmonių  $CD8^iCD57^-$  ir  $CD8^iCD57^-CD27^+$  limfocitų koncentracijų vidurkių palyginimas. Skirtumai statistiškai nereikšmingi ( $p > 0,05$ ).

### 3.3. Priklausomybė tarp $CD8^iCD57^+$ ir $CD8^iCD27^+$ limfocitų populiacijų

Analizuojant tėkmės citometru taškines diagramas buvo pastebėta, kad galima priklausomybė tarp  $CD8^iCD57^+$  ir  $CD8^iCD27^+$  limfocitų populiacijų (32 pav.). Todėl buvo paskaičiuota  $CD8^iCD57^+$  koreliacija su  $CD8^iCD27^+$  pirminio Sjogreno sindromo ir kontrolinėje grupėse. Šią koreliaciją tyrėme, nes literatūros duomenimis CD57 ir CD27 žymenys atspindi priešingas  $CD8^+$  limfocitų savybes: CD57 – senėjimą, proliferacijos galimybių sumažėjimą, o CD27 – didelę reakcijos į antigenus ir proliferacijos potencialą [134, 138, 139]. Tarp kitų limfocitų populiacijų žymenų tokio tarpusavio ryšio ieškoti nebuvo pagrindo.

Diagramoje matomi  $CD8^i$  limfocitai, turintys CD57 ir CD27 žymenis (32 pav., 2 kvadrantas). Tai ląstelės, kurių statistiškai reikšmingas padidėjimas nustatytas pirminiu Sjogreno sindromu sergantiems ligoniams.

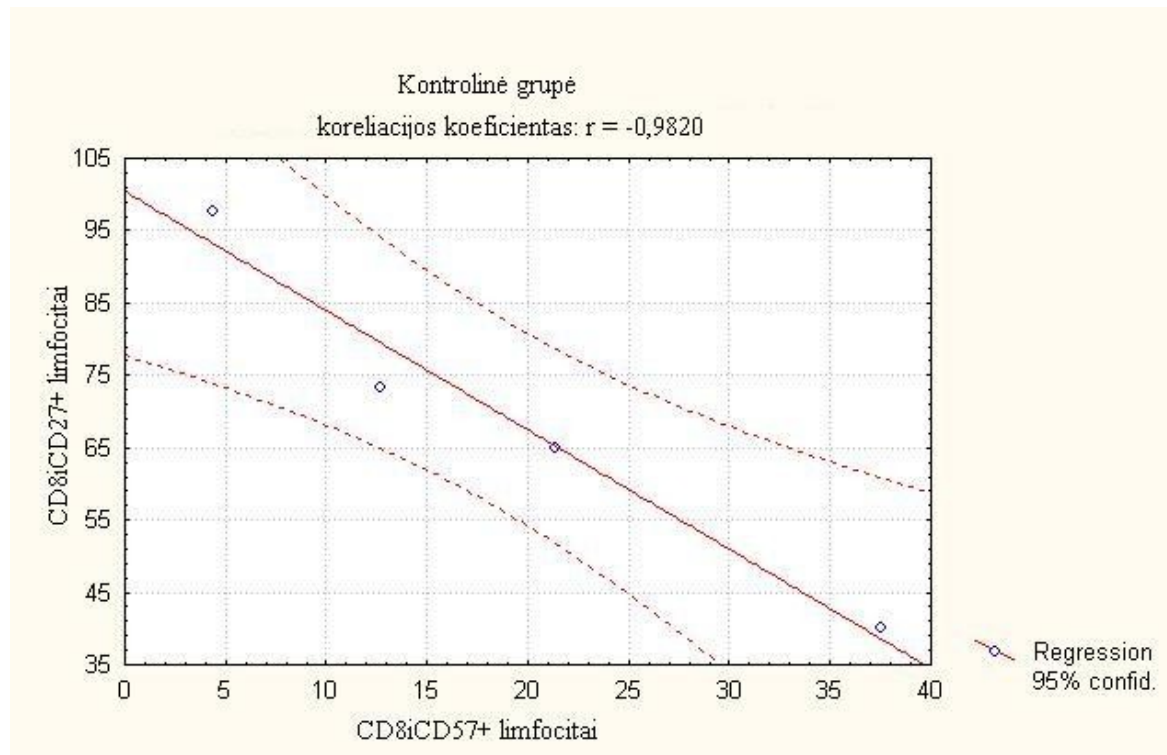


32 pav.  $CD8^i$  T limfocitų subpopuliacijų identifikavimas naudojant anti-CD57FITC ir anti-CD27APC monokloninius antikūnus. 1 kvadrante matomi  $CD8^i$  T limfocitai, ekspresuojantys CD27 žymenį, 2 kvadrante -  $CD8^i$  T limfocitai, ekspresuojantys CD27 ir CD57 žymenis, 4 kvadrante –  $CD8^i$  T limfocitai, ekspresuojantys CD57 žymenį.

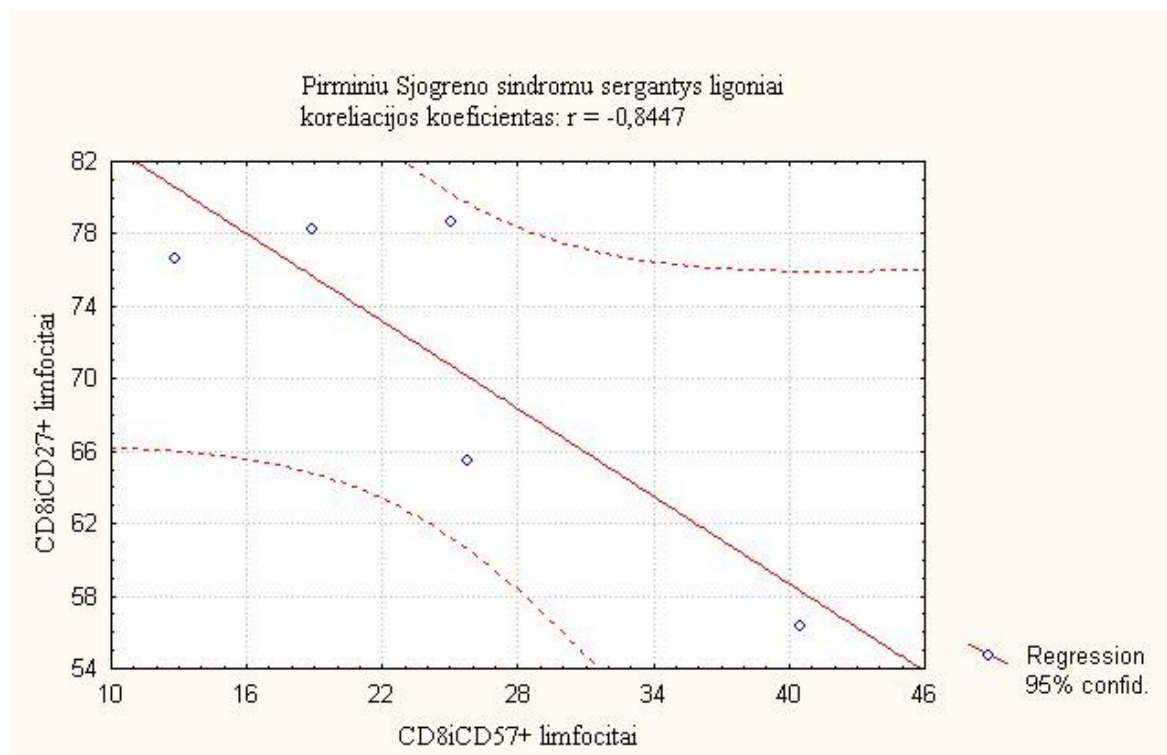
Atlikus Pearson'o koreliacinę analizę gauta, kad koreliacijos koeficiento  $r$  reikšmė kontrolinėje grupėje yra -0,982 (33 pav.). Tai labai stiprus tarpusavio ryšys (yra intervale nuo 0,90 iki 1,00). Neigiamas koreliacijos koeficientas rodo, kad priklausomybė tarp  $CD8^iCD57^+$  ir  $CD8^iCD27^+$  limfocitų populiacijų yra atvirkštinė.

Sergančiųjų pirminiu Sjogreno sindromo grupėje koreliacijos koeficiento  $r$  reikšmė tarp  $CD8^iCD57^+$  ir  $CD8^iCD27^+$  limfocitų populiacijų yra -0,8447 (34 pav.). Tai stiprus tarpusavio ryšys (yra intervale nuo 0,70 iki 0,89). Koreliacija taip pat atvirkštinė.

Išanalizavus priklausomybę tarp  $CD8^+CD57^+$  ir  $CD8^+CD27^+$  limfocitų populiacijų, nustatytos reikšmingos koreliacijos, t.y.  $CD8^+CD57^+$  limfocitų koncentracijos atvirkščiai priklauso nuo  $CD8^+CD27^+$  limfocitų koncentracijos. Taip pat matoma tendencija, kad sergančiųjų pirminiu Sjogreno sindromu ligonių grupėje ši priklausomybė linkusi mažėti.



33 pav.  $CD8^+CD57^+$  ir  $CD8^+CD27^+$  limfocitų populiacijų koreliacija kontrolinėje grupėje ( $r = -0,9820$ ,  $p = 0,004$ ).



34 pav.  $CD8^+CD57^+$  ir  $CD8^+CD27^+$  limfocitų populiacijų koreliacija pirminiu Sjogreno sindromu sergančių ligonių grupėje ( $r = -0,8447$ ,  $p = 0,001$ ).



#### 4. REZULTATŲ APTARIMAS

Moksliniuose darbuose daug dėmesio skiriama įvairių limfocitų populiacijų reikšmei tiek sveikame organizme, tiek patologijų atveju. Vienas iš imuninės sistemos būklės įvertinimo būdų yra kiekybinė periferinio kraujo limfocitų populiacijų analizė. Paskelbta mokslinių darbų apie periferinio kraujo limfocitų populiacijų ir jų subpopuliacijų fenotipinius ypatumus sergant Sjogreno sindromu. Nustatyta, kad Sjogreno sindromui būdingas B limfocitų hiperreaktyvumas [81]. Tokiu atveju B limfocitai infiltruoja seilių ir ašarų liaukų epitelines ląsteles ir sukelia vietinę antikūnų gamybą [132]. B limfocitai sudaro apie 20 – 30% infiltrato ląstelių [105], o monokloninė B limfocitų ekspansija būdinga lifoproliferacinei eigai [81]. Sjogreno sindromui taip pat, kaip ir kitoms autoimuninėms ligoms (pvz., išsėtinei sklerozei, sunkiajai miastenijai, reumatoidiniam artritui, sisteminei raudonajai vilkligei), būdingas NK ląstelių skaičiaus sumažėjimas [9, 59]. Be to, Sjogreno sindromo atveju, periferiniame kraujyje pasikeičia  $CD8^+$  ir  $CD4^+$  T limfocitų populiacijų sudėtis, manoma, kad sumažėja  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  T reguliacinių limfocitų [27, 29, 35, 51, 52, 133], tačiau  $CD8^+$  ir  $CD4^+$  T limfocitų subpopuliacijos detalčiau neištirtos sergantiems Sjogreno sindromu. Iki šiol nenustatyta, kokios limfocitų populiacijos dalyvauja Sjogreno sindromo patogenezėje. Todėl šiame darbe tyrėme T, B limfocitų, NK ląstelių,  $CD8^+$  ir  $CD4^+$  T limfocitų subpopuliacijų pokyčius pirminiu Sjogreno sindromu sergančių ligonių periferiniame kraujyje.

Mūsų darbe buvo nustatyti pirminiu Sjogreno sindromu sergančių ligonių periferinio kraujo T, B limfocitų ir natūralių kilių kiekliai, išanalizuoti  $CD8^+$  ir  $CD4^+$  T limfocitų populiacijų ir jų subpopuliacijų pokyčiai, kurie buvo palyginti su kontrolinės grupės žmonių gautais duomenimis.

Lyginant pirminiu Sjogreno sindromu sergančių pacientų ir kontrolinės grupės žmonių periferinio kraujo NK ląstelių populiacijas nustatyta, kad NK ląstelių koncentracija bei procentas visuose limfocituose sumažėja sergant Sjogreno sindromu. Bendras T limfocitų procentas visuose limfocituose, kaip ir B limfocitų, yra nežymiai didesnis sergantiems pirminiu Sjogreno sindromo ligoniams nei kontrolinės grupės žmonėms, tačiau, priešingai, analizuojant šių ląstelių absoliučius skaičius matoma, kad T, B ir NK ląstelių skaičiai iš tikrųjų sumažėja sergantiems pirminiu Sjogreno sindromu. T, B limfocitų procento padidėjimas yra tik santykinis, priklausantis nuo didesnio NK ląstelių skaičiaus sumažėjimo. Taigi, nustatyta tendencija, kad Sjogreno sindromo metu mažėja NK ląstelių populiacija.

$CD8^+$  T limfocitai yra vieni iš pagrindinių ląstelinio imuniteto specifiniu citotoksiškumu pasižyminčių limfocitų, kurie sukelia imuninės sistemos atsaką į konkretų antigeną [1]. Sergančiųjų pirminiu Sjogreno sindromu  $CD8^+$  T limfocitų procentas  $CD3^+$  limfocitų populiacijoje buvo nežymiai mažesnis (0,83%) nei kontrolinės grupės žmonių. Tačiau yra

stebimas CD8<sup>i</sup> limfocitų procento CD3<sup>+</sup> limfocitų populiacijoje ir absoliutaus skaičiaus padidėjimas lyginant su kontroline grupe. Kaip jau buvo minėta, CD8<sup>+</sup> limfocitų subpopuliacija pagal CD8 ekspresiją ir galimas funkcijas skirstoma į CD8<sup>i</sup>CD57<sup>+</sup> – citotoksinius T limfocitus ir CD8<sup>s</sup>CD57<sup>+</sup> – natūralių kilių savybėmis pasižymintys limfocitus [43, 44]. CD8<sup>s</sup> – tai nespecifiniu kontaktiniu citotoksiškumu pasižymintys limfocitai [1]. CD8<sup>i</sup> limfocitų procento ir absoliutaus skaičiaus padidėjimas rodo išaugusią citotoksinių T limfocitų populiaciją.

CD8<sup>i</sup>CD57<sup>+</sup> limfocitų procentas CD8<sup>i</sup> limfocitų populiacijoje pirminiu Sjogreno sindromu sergantiems ligoniams buvo didesnis už kontrolinės grupės žmonių. Sveiko žmogaus periferiniame kraujyje CD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> limfocitų populiacija sudaro vidutiniškai 16,4% visų CD8<sup>+</sup> limfocitų [134], o CD8<sup>i</sup>CD57<sup>+</sup> limfocitų populiacija – dar mažesnė, nes neįskaičiuojami CD8<sup>s</sup>CD57<sup>+</sup>. Pastovi didelė šių CD8<sup>i</sup>CD57<sup>+</sup> limfocitų koncentracija periferiniame kraujyje rodo lėtinę antigeninę stimuliaciją organizme [135]. Nežinoma, ar jų kiekio periferiniame kraujyje padidėjimas yra normalaus imuninio atsako dalis, ar neadekvatus patologinis organizmo atsakas į lėtinę stimuliaciją.

Yra paskelbta darbų, kad CD8<sup>i</sup>CD57<sup>+</sup> limfocitų subpopuliacija išauga vyresniame amžiuje [46-48, 136], esant lėtinei virusinei infekcijai [49, 50, 137] ir sergant autoimuninėmis ligomis [51, 52].

Palyginus CD8<sup>i</sup> T limfocitų subpopuliacijas pagal CD57 ir CD27 žymenų raišką, nustatyti statistiškai reikšmingi skirtumai CD8<sup>i</sup>CD57<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> limfocitų populiacijoje, t.y. sergančiųjų pirminiu Sjogreno sindromu CD8<sup>i</sup>CD57<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> limfocitų procentas, CD8<sup>i</sup> limfocitų populiacijoje, statistiškai reikšmingai skiriasi nuo kontrolinės grupės ( $p=0,016$ ). Apskritai analizuojant gautus duomenis, matoma tendencija, kad sergant pirminiu Sjogreno sindromu išauga CD8<sup>i</sup>CD27<sup>+</sup> limfocitų populiacija, pasižyminti ir nepasižyminti CD57 žymens raiška. Taip pat analizuojant CD8<sup>i</sup> T limfocitų subpopuliacijas nustatyta atvirkštinė priklausomybė tarp CD57 ir CD27 žymenų raiškos.

CD8<sup>i</sup> limfocitai, turintys CD57 molekulę (CD8<sup>i</sup>CD57<sup>+</sup>), yra kaip atsakas į nuolatinę antigeninę stimuliaciją organizme, t.y. rodo, kad citotoksiniai T limfocitai jau buvo susidūrę su antigenais ir toliau proliferuoti nebegali. Priešingai, CD8<sup>i</sup> limfocitai, nepasižymintys CD57 molekulės raiška (CD8<sup>i</sup>CD57<sup>-</sup>), lemia specifinių citotoksinių reakcijų aktyvumą [134]. CD27 žymuo rodo limfocitų diferenciacijos lygį [138]. CD27 molekulės raiška CD8<sup>+</sup> limfocituose susijusi su jų atsparumu apoptozei, IL-2 gamyba ir sugebėjimu proliferuoti, o autoimuninėms ligoms kaip tik yra būdinga padidėjusi limfocitų proliferacija [139].

T reguliaciniai limfocitai šiame darbe nustatyti pagal CD4 ir CD25 žymenis. Tiesa, yra mokslinių darbų, teigiančių, kad būtina nustatyti ir Foxp3<sup>+</sup>, tiksliai T reguliacinių limfocitų

identifikavimui. Mūsų darbe, dėl techninių nesklaidumų nepavyko išryškinti Foxp3<sup>+</sup> žymens, todėl buvo pasiremta moksliniais darbais, kurie teigia, kad T reguliacinius limfocitus galima identifikuoti ir be Foxp3 žymens nustatymo [140]. CD4<sup>+</sup> limfocitai, pasižymintys CD25 žymens raiška, sudaro 5 – 10% periferinio kraujo CD4<sup>+</sup> limfocitų (0,5 – 1% bendro limfocitų skaičiaus) [37, 141]. Šios ląstelės, Foxp3 baltymo atliekamomis funkcijomis, išskiriamais TGF-β, IL-10 citokinais, svarbios slopinant autoimunines reakcijas [142]. T reguliacinių limfocitų sumažėjimas periferiniame kraujyje Sjogreno sindromo metu siejamas su egzokrininių liaukų infiltracija [129]. Tai suprantama kaip neigiama atsakomoji reakcija, dėl kurios yra slopinami autoreaktyvūs T limfocitai pažeistame audinyje [141]. Ar limfocitai lieka audinyje priklauso nuo audinio ir limfocitų adhezijos [128]. Iškelta hipotezė, kuri sako, kad kai T reguliacinių limfocitų skaičius periferiniame kraujyje nesiskiria nuo kontrolinės grupės tai, dėl aukšto laipsnio uždegimo liaukoje ir progresuojančios liaukos fibrozės, sumažėja T reguliacinių limfocitų ir audinio adhezija ir šie išeina iš liaukos į periferinį kraują [141].

Šiame darbe pastebėta, kad sergančiųjų Sjogreno sindromu pacientų periferiniame kraujyje yra rasta mažiau CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> limfocitų lyginant su kontroline grupe. Tikėtina, kad dėl egzokrininių liaukų infiltracijos [129]. Tiesa, yra iškelta hipotezė, kad T reguliaciniai limfocitai uždegiminių citokinų fone gali virsti T<sub>H</sub>17 [143]. Tai paaiškintų T reguliacinių limfocitų periferiniame kraujyje sumažėjimą bei dar didesnę liaukos pažeidimą.

Autoimuninių reakcijų metu T<sub>H</sub>17 gali patekti į audinius ir sukelti autoimuninį pažeidimą [14, 23]. Pirminiu Sjogreno sindromu sergantiems ligoniams nustatyta T<sub>H</sub>17 (CD4<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup>) mažesnė koncentracija periferiniame kraujyje nei kontrolinės grupės žmonių. Tai gali būti siejama su tuo, kad dalis T<sub>H</sub>17 jau yra infiltravę egzokrinines liaukas.

Apibendrinant šio darbo rezultatus, galima paminėti, kad Sjogreno sindromu sergančių ligonių T, B, CD8<sup>+</sup>CD57<sup>-</sup>, CD8<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>, CD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup>27<sup>-</sup> limfocitų santykiniai kiekiai ryškiau nesiskyrė nuo kontrolinės grupės atitinkamų rodiklių. Reikia pripažinti, kad galimų skirtumų neleido aptikti palyginti maža tiriamųjų imtis. Kita vertus, atlikti tyrimai parodė statistiškai reikšmingą CD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> limfocitų populiacijos padidėjimą Sjogreno sindromu sergantiems ligoniams. Galbūt tolesni tyrimai padėtų atsakyti į klausimą, ar šiame darbe nustatyti imunologiniai skirtumai gali būti svarbūs Sjogreno sindromo patogenezei, imunoterapijos tyrimams.

## IŠVADOS

1. Nustatyta tendencija, kad sergančiųjų pirminiu Sjogreno sindromu periferiniame kraujyje mažėja NK ląstelių populiacija. T ir B limfocitų pokyčiai nežymūs.
2. Atlikus detalią kiekybinę  $CD8^+$  T limfocitų subpopuliacijų analizę nustatyta, kad  $CD8^iCD57^+CD27^+$  limfocitų populiacija statistiškai reikšmingai padidėja sergančiųjų pirminiu Sjogreno sindromu periferiniame kraujyje.
3. Atlikus detalią kiekybinę  $CD4^+$  T limfocitų subpopuliacijų analizę pastebėta T reguliacinių limfocitų ir T helperių 17 tendencija mažėti sergant pirminiu Sjogreno sindromu.

## SANTRAUKA (SUMMARY)

### **Study of T Lymphocyte Subsets in Patients with Sjögren's Syndrome**

Sjögren's syndrome is a chronic autoimmune disease associated with variable degree of lymphocytic infiltration of salivary and lacrimal glands, broad clinical manifestations and approximately 5% of patients developing lymphoma. The most prevalent symptom in patients with Sjögren's syndrome is diminished lacrimal and salivary gland function, xerostomia, keratoconjunctivitis sicca and parotid gland enlargement.

Changes in blood lymphocyte subsets not only mirror alterations in other tissues and organs, but might also provide information about involvement of the immune system in the pathogenesis of Sjögren's syndrome. Evaluation of phenotypic changes of peripheral blood lymphocytes can be useful in monitoring and treatment of the disease.

The aim of this study was to evaluate the quantitative changes in peripheral blood T lymphocyte subsets in patients with Sjögren's syndrome.

**Patients and Methods:** T lymphocyte subsets in peripheral blood of 5 patients with Sjögren's syndrome were determined using flow cytometry and compared with the group of 4 control subjects. All patients and control subjects were female.

The mean age of patients with Sjögren's syndrome was 45,2 years, range 20 – 61 years. The mean age of subjects of the control was 51,8 years, range 25 – 67 years.

A trend for the decrease in percentage of NK cells in peripheral blood was determined in patients with primary Sjögren's syndrome. Little change was found in percentages of T and B lymphocytes. The detailed quantitative analysis of CD8<sup>+</sup> T lymphocyte subpopulation showed that the percentage of CD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> cells increased significantly in patients with primary Sjögren's syndrome. The detailed quantitative analysis of CD4<sup>+</sup> T lymphocyte subset showed a trend for decrease of regulatory T lymphocytes and T helper 17 cells in patients with primary Sjögren's syndrome.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Adomaitienė D., Janulevičiūtė N., Kazakevičius R., Vaičiuvėnas V. Klinikinės imunologijos įvadas. – Kaunas „Šviesa“, 2001. – 40-42, 138, 253, 256-258 p.
2. King C., Ilic A., Koelsch K., Sarvetnick N. Homeostatic Expansion of T Cells during Immune Insufficiency Generates Autoimmunity. – *Cell*, Vol. 117, 2004. – 265-277 p.
3. Helmick C.G., Felson D.T., Lawrence R.C., Gabriel S., Hirsch R., Kwoh C.K., Liang M.H., Kremers H.M., Mayes M.D., Merkel P.A., Pillemer S.R., Reveille J.D., Stone J.H. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part I. – *Arthritis and Rheumatism* Vol. 58, No. 1, 2008. – 15-25 p.
4. Steinfeld S., Simonart T. New approaches to the treatment of Sjögren's syndrome: soon beyond symptomatic relief? – *Dermatology* Vol. 207, No. 1, 2003. – 6-9 p.
5. Decker R.T., Sirois D., Mobley C.C. Nutrition and oral medicine. – Humana press, 2005. – 256-257 p.
6. Mieliauskaitė D., Venalis P., Dumalakienė I., Gražienė V., Kirdaitė G., Venalis A. Serum levels of transforming growth factor  $\beta 1$  (TGF-  $\beta 1$ ) in patients with rheumatoid arthritis and Sjogren's syndrome. – *Acta Medicina Lituanica* Vol. 15, No. 4, 2008. – 211-215 p.
7. Keogan M. T., Wallace E. M., O'Leary P. Concise Clinical Immunology for Healthcare Professionals. – Taylor and Francis e-Library, 2006. – 111-114, 176-178 p.
8. Molina V., Shoenfeld Y. Infection, vaccines and other environmental triggers of autoimmunity. – *Autoimmunity* Vol. 38, No. 3, 2005. – 235-245 p.
9. Flodstrom M., Shi F.D., Sarvetnick N., Ljunggren H.G. The natural killer cell – friend or foe in autoimmune disease? – *Scandinavian journal of immunology* Vol. 55, No. 5, 2002. – 432-441 p.
10. Friedman J., Klepfish A., Miller E.B., Ognenovski V., Ike R.W., Schattner A. Agranulocytosis in Sjögren's syndrome: two case reports and analysis of 11 additional reported cases. – *Seminars in arthritis and rheumatism* Vol. 31., No. 5, 2002. – 338-345 p.
11. Friedman J., Schattner A., Shvidel L., Berrebi A. Characterization of T-Cell Large Granular Lymphocyte Leukemia Associated with Sjogren's Syndrome – An Important but Underrecognized Association. – *Seminars in arthritis and rheumatism* Vol. 35, 2006. – 306-311 p.
12. Nguyen K.H.T., Brayer J., Cha S., Diggs S., Yasunari U., Hilal G., Peck A.B., Beher M.G.H. Evidence for antimuscarinic acetylcholine receptor antibody-mediated

- secretory dysfunction in NOD mice. – *Arthritis and rheumatism* Vol. 43, No. 10, 2000. – 2297-2306 p.
13. <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/T/Treg.html>
  14. Steinman L. A brief history of TH17, the first major revision in the TH1/TH2 hypothesis of T cell– mediated tissue damage. – *Nature medicine* Vol. 13, No. 2, 2007. – 139-145 p.
  15. Yamamura T. Interleukin 17–producing T-helper Cells and Autoimmune Diseases: Time for a Paradigm Shift? – *Current rheumatology reports*, Vol. 9, 2007. – 93-95 p.
  16. Matuževičienė R. Tėkmės citometrija ir jos taikymas klinikinėje praktikoje. Mokomoji knygelė. – *Laboratorinė medicina*, 2010. – 44, 58 p.
  17. Carrier Y., Yuan J., Kuchroo V.K., Weine H.L. Th3 Cells in Peripheral Tolerance. I. Induction of Foxp3-Positive Regulatory T Cells by Th3 Cells Derived from TGF- $\beta$  T Cell-Transgenic mice. – *The Journal of Immunology* Vol. 178, 2007. – 179-185 p.
  18. Neil D.R., McKenzie A.N.J. TH9: the latest addition to the expanding repertoire of IL-25 targets. – *Immunology and Cell Biology* Vol. 88, 2010. – 502–504 p.
  19. Crotty S. Follicular Helper CD4 T Cells (T<sub>FH</sub>). *Annual Review of Immunology* Vol. 29, 2011. – 621-663 p.
  20. Moser B., Schaerli P., Loetscher P. CXCR5+ T cells: follicular homing takes center stage in T-helper-cell Responses. – *Trends in Immunology* Vol. 23, No.5, 2002. – 250-255 p.
  21. Weaver C.T., Hatton R.D., Mangan P.R., Harrington L.E. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. – *Annual review of immunology* Vol. 25, 2007. – 821-852 p.
  22. Kolls J.K., Linde A. Interleukin-17 Family Members and Inflammation. – *Immunity* Vol. 21, 2004. – 467-476 p.
  23. Stockinger B., Veldhoen M. Differentiation and function of Th17 T cell. – *Current opinion in immunology* Vol. 19, 2007. – 281-286 p.
  24. Korn T., Bettelli E., Oukka M., Kuchroo V.K. IL-17 and Th17 Cells. – *Annual Review of Immunology* Vol. 27, 2009. – 485–517 p.
  25. Harrington L.E., Hatton R.D., Mangan P.R., Turner H., Murphy T.L., Murphy K.M., Weaver C.T. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. – *Nature immunology*, Vol. 6., No. 11, 2005. – 1123-1132 p.

26. Veldhoen M., Hocking R.J., Atkins C.J., Locksley R.M., Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. – *Immunity*, Vol. 24, No. 2, 2006. – 179-189 p.
27. Sakaguchi S. Naturally arising CD4<sup>+</sup> regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. – *Annual review of immunology* Vol. 22, 2004. – 531-562 p.
28. Schramm C., Huber S., Protschka M., Czochra P., Burg J., Schmitt E., Lohse A.W., Galle P.R., Blessing M. TGFb regulates the CD41CD251 T-cell pool and the expression of Foxp3 in vivo. – *International Immunology* Vol. 16, No. 9, 2004. – 1241-1249 p.
29. Peng Y., Laouar Y., Li M.O., Green E.A., Flavell R.A. TGF-β regulates in vivo expansion Foxp3<sup>+</sup> expressing CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells responsible for protection against diabetes. – *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* Vol. 101, No. 13, 2004. – 4572-4577 p.
30. Moustakas A., Pardali K., Gaal A., Heldin C.H. Mechanisms of TGF-β signaling in regulation of cell growth and differentiation. – *Immunology letters* Vol. 82, 2002. – 85-91 p.
31. <http://www.ms-fund.keio.ac.jp/prize/winner/prize2008.html>
32. Li Y., Liu S., Margolin K., Hwu P. Summary of the primer on tumor immunology and the biological therapy of cancer. – *Journal of translational medicine* Vol. 7, No. 11, 2009. – 1-5 p.
33. Sakaguchi S., Sakaguchi N., Asano M., Itoh M., Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. – *Journal of immunology* Vol. 155, No. 3, 1995. – 1151-1164 p.
34. Pacholczyk R., Ignatowicz H., Kraj P., Ignatowicz L. Origin and T Cell Receptor Diversity of Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T Cells. – *Immunity* Vol. 25, 2006. – 249-259 p.
35. Golgher D., Jones E., Powrie F., Elliott T., Gallimore A. Depletion of CD25<sup>+</sup> regulatory cells uncovers immune responses to shared murine tumor rejection antigens. – *European Journal of Immunology* Vol. 32, No. 11, 2002. – 3267-3275 p.
36. Woo E.Y., Chu C.S., Goletz T.J., Schlienger K., Yeh H., Coukos G., Rubin S.C., Kaiser L.R., June C.H. Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. – *Cancer reseach* Vol. 61, No. 12, 2001. – 4766-4772 p.



37. Almeida A.R.M., Rocha B., Freitas A.A., Tanchot C. Homeostasis of T cell numbers: from thymus production to peripheral compartmentalization and the indexation of regulatory T cells. – *Seminars in Immunology* Vol. 17, 2005. – 239–249 p.
38. <http://www.copewithcytokines.org/cope.cgi?key=CD57>
39. [http://www.txcell.com/index.php?option=com\\_content&task=view&id=61&Itemid=17](http://www.txcell.com/index.php?option=com_content&task=view&id=61&Itemid=17)
40. Martinez-Forero I., Garcia-Munoz R., Martinez-Pasamar S., Inoges S., Cerio A.L.D., Palacios R., et al. IL-10 suppressor activity and ex vivo Tr1 cell function are impaired in multiple sclerosis. – *European journal of immunology* Vol. 38, 2008. – 576-586 p.
41. Battaglia M., Gregori S., Bacchetta R., Roncarolo M.G. Tr1 cells: From discovery to their clinical application. – *Seminars in Immunology* Vol. 18, 2006. – 120–127 p.
42. Blaščiuk J., Matuzevičienė R. Reguliacinių T ląstelių formavimosi ir apoptozės ypatumai sergant lėtine B limfocitų limfoleukemija. – *Laboratorinė medicina* t. 12, Nr. 4 (48), 2010. – 219-228 p.
43. Wang E.C., Lehner P.J., Graham S., Borysiewicz L.K. CD8<sup>high</sup> (CD57<sup>+</sup>) T cells in normal, healthy individuals specifically suppress the generation of cytotoxic T lymphocytes to Epstein-Barr virus-transformed B cell lines. – *European journal of immunology* Vol. 24, No. 11, 1994. – 2903-2909 p
44. Kern F., Ode-Hakim S., Vogt K., Hoflich C., Reinke P., Volk H.D. The enigma of CD57<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T cell expansion – anergy or activation? – *Clinical and experimental immunology* Vol. 104, No. 1, 1996. – 180-184 p.
45. Focosi D., Petrini M. CD57 Expression on Lymphoma Microenvironment As a New Prognostic Marker Related to Immune Dysfunction. – *Journal of clinical oncology*, 2007. – 1289 - 1291 p.
46. Schwab R., Szabo P., Manavalan J.S., Weksler M.E., Posnett D.N., Pannetier C., Kourilsky P., Even J. Expanded CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell clones in elderly humans. – *Journal of immunology* Vol. 158, No. 9, 1997. – 4493-4499 p.
47. Fagnoni F.F., Vescovini R., Passeri G., Bologna G., Pedrazzoni M., Lavagetto G., Casti A., Franceschi C., Passeri M., Sansoni P. Shortage of circulating naive CD8<sup>(+)</sup>T cells provides new insights on immunodeficiency in aging. – *Blood* Vol. 95, No. 9, 2000. – 2860-2868 p.
48. Chamberlain W.D., Falta M.T., Kotzin B.L. Functional Subsets within Clonally Expanded CD8<sup>+</sup> Memory T Cells in Elderly Humans. – *Clinical Immunology* Vol. 94, No. 3, 2000. – 160-172 p.

49. Saukkonen J.J., Kornfeld H., Berman J.S. Expansion of a CD8+CD28- cell population in the blood and lung of HIV-positive patients. – *Journal of acquired immune deficiency syndromes* Vol. 6, No. 11, 1993. – 1194-1204 p.
50. Hamann D., Roos M.T., Van Lier R.A. Faces and phases of human CD8 T-cell development. – *Immunology today* Vol. 20, No. 4, 1999. – 177-180 p.
51. Sfikakis P.P., Zografou A., Viglis V., Iniotaki-Theodoraki A., Piskontaki I., Tsokos G.C., Sfikakis P., Choremis-Papadopoulou H. CD28 expression on T cell subsets in vivo and CD28-mediated T cell response in vitro in patients with rheumatoid arthritis. – *Arthritis and rheumatism* Vol. 38, No. 5, 1995. – 649-654 p.
52. Wang E.C., Lawson T.M., Vedhara K., Moss P.E., Lehner P.J., Borysiewicz L.K. CD8high+ (CD57+) T cells in patients with rheumatoid arthritis. – *Arthritis and rheumatism* Vol. 40, No. 2, 1997. – 237-248 p.
53. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. *Molecular biology of the cell*, 4th edition. – Garland science: New York, 2002.
54. Rodriguez E.M., Dorshkind K. New perspectives in B-1 B cell development and function. – *Trends in immunology* Vol. 27, No. 9, 2006. – 428-433 p.
55. Tung J.W., Herzenberg L.A. Unraveling B-1 progenitors. – *Current opinion in immunology* Vol. 19, No. 2, 2007. – 150-155 p.
56. Wiegering V., Girschick H.J., Morbach H. B-Cell Pathology in Juvenile Idiopathic Arthritis. – *Arthritis* Vol. 210, 2010. – 1-6 p.
57. Sellam J., Miceli-Richard C., Gottenberg J.E., Ittah M., Lavie F., Lacabaratz C., Gestermann N., Proust A., Lambotte O., Mariette X. Decreased B cell activating factor receptor expression on peripheral lymphocytes associated with increased disease activity in primary Sjögren's syndrome and systemic lupus erythematosus. – *Annals of the rheumatic diseases* Vol. 66, No. 6, 2007. – 790-797 p.
58. Perricone R., Perricone C., Carolis C.D., Shoenfeld Y. NK cells in autoimmunity: A two-edged weapon of the immune system. – *Autoimmunity Reviews* Vol. 7, 2008. – 384–390 p.
59. French A.R., Yokoyama W.M. Natural killer cells and autoimmunity. – *Arthritis Research & Therapy* Vol. 6, No. 1, 2004. – 8-14 p.
60. Cooper M.A., Fehniger T.A., Caligiuri M.A. The biology of human natural killer-cell subsets. – *Trends in immunology* Vol. 22, No. 11, 2001. – 633-640 p.
61. Bubnoff D.V., Andres E., Hentges F., Bieber T., Michel T., Zimmer J. Natural killer cells in atopic and autoimmune diseases of the skin. – *Journal of Allergy and Clinical Immunology* Vol. 125, 2010. – 60-68 p.

62. Anderson S. Biology of Natural Killer Cells: What Is the Relationship between Natural Killer Cells and Cancer? Will an Increased Number and/or Function of Natural Killer Cells Result in Lower Cancer Incidence? – *The Journal of nutrition* Vol. 135, 2005. – 2910 p.
63. Wilson S.B., Delovitch T.L. Janus-like role of regulatory iNKT cells in autoimmune disease and tumour immunity. – *Nature reviews. Immunology* Vol. 3, No. 3, 2003. – 211-222 p.
64. Baxter A.G. The cells that knew too much. – *The Journal of Clinical Investigation* Vol. 105, No. 12, 2000. – 1675-1677 p.
65. Kovacs L., Marczinovits I., György A., Toth G.K., Dorgai L., Pal J., Molnar J., Pokorny G. Clinical associations of autoantibodies to human muscarinic acetylcholine receptor 3<sup>213-228</sup> in primary Sjögren's Syndrome. – *Rheumatology* Vol. 44, No. 8, 2005. – 1021-1025 p.
66. Ramos – Casals M., Tzioufas A.G., Font J. Primary Sjögren's syndrome: new clinical and therapeutic concepts. – *Annals of the rheumatic diseases* Vol. 64, No. 3, 2005. – 347-354 p.
67. Salliot C., Mouthon L., Ardizzone M., Sibilia J., Guillevin L., Gottenberg J.E., Mariette X. Sjögren's syndrome is associated with and not secondary to systemic sclerosis. – *Rheumatology* Vol. 46, No. 2, 2007. – 321-326 p.
68. Sisto M., Lisi S., Lofrumento D., D'Amore M., Scagliusi P., Mitolo V. Autoantibodies from Sjögren's Syndrome Trigger Apoptosis in Salivary Gland Cell Line. – *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1108, 2007. – 418-425 p.
69. Ohlsson M., Skarstein K., Bolstad A.I., Johannessen A.C., Jonsson R. Fas-Induced Apoptosis Is a Rare Event in Sjögren's Syndrome. – *Laboratory investigation* Vol. 81, No. 1, 2001. – 95-105 p.
70. Fox R.I., Michelson P. Approaches to the treatment of Sjögren's syndrome. – *Journal of Rheumatology. Supplement* 61, 2000. – 15-21 p.
71. Moutsopoulos H.M., Webber B.L., Vlagopoulos T.P., Chused T.M., Decker J.L. Differences in the clinical manifestations of sicca syndrome in the presence and absence of rheumatoid arthritis. – *American journal of medicine* Vol. 66, No. 5, 1979. – 733-736 p.
72. Wahren M., Solomin L., Pettersson I., Isenberg D. Autoantibody repertoire to Ro/SSA and La/SSB antigens in patients with primary and secondary Sjögren's syndrome. – *Journal of autoimmunity* Vol. 9, No. 4, 1996. – 537-544 p.

73. Bagdonaitė L. Autoantikūnų klinikinė reikšmė ir nustatymo metodai. – Mokomoji knygelė, 2008. – 10-14 p.
74. [www.riversideonline.com/source/images/image\\_popup/mcdc7\\_salivary.jpg&imgrefurl](http://www.riversideonline.com/source/images/image_popup/mcdc7_salivary.jpg&imgrefurl)  
1
75. [www.oramd.com/images/sjogrens3w.jpg&imgrefurl](http://www.oramd.com/images/sjogrens3w.jpg&imgrefurl)
76. Mieliauskaitė D., Dumalakienė I., Bumblauskaitė J., Rugienė R., Venalis P., Venalis A., Mackevič Z. Sergančiųjų pirminiu Sjogreno sindromu amžiaus ir klinikinių žymenų ryšys. – Gerontologija t. 10, Nr. 2, 2009. – 92-95 p.
77. Mieliauskaitė D. Sjogreno sindromas ir sisteminė sklerozė: sausojo sindromo raiška. – Reumatologija, t. 2, 2008. – 18-19 p.
78. Sisto M., Lisi S., Castellana D., D'Amore M., Scagliusi P., Caprio S., Scagliusi A., Acquafredda A., Panaro M.A., Mitolo V. Autoantibodies from Sjögren's Syndrome induce activation of both the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways in human salivary gland cell line A-253. – Journal of Autoimmunity 27, 2006. – 38-49 p.
79. Anderson L.G., Talal N. The spectrum of benign to malignant lymphoproliferation in Sjögren's syndrome. – Clinical and Experimental Immunology 9, 1971. – 199-221 p.
80. Kong L., Ogawa N., McGuff H.S., Nakabayashi T., Sakata K., Masago R., Vela-Roch N., Talal N., Dang H. Bcl-2 Family Expression in Salivary Glands from Patients with Primary Sjögren's syndrome: Involvement of Bax in Salivary Gland Destruction. – Clinical Immunology and Immunopathology Vol. 88, No. 2, 1998. – 133-141 p.
81. Ramos-Casals M., Trejo O., García-Carrasco M., Cervera R., De La Red G., Gil V., López-Guillermo A., Ingelmo M., Font J. Triple association between hepatitis C virus infection, systemic autoimmune diseases, and B cell lymphoma. – The journal of rheumatology Vol. 31, No. 3., 2004. – 495-499 p.
82. De Vita S., Boiocchi M., Sorrentino D., Carbone A., Avellini C., Dolcetti R., Marzotto A., Gloghini A., Bartoli E., Beltrami C.A., Ferraccioli G. Characterization of prelymphomatous stages of B cell lymphoproliferation in Sjögren's syndrome. – Arthritis and Rheumatism Vol.40, No. 2, 1997. – 318-331 p.
83. Kumar V. Robbins and Cotran pathologic basis of disease, professional edition. – An imprint of Elsevier 8th ed, 2009.
84. Li H., Dai M., Zhuang Y. A T cell intrinsic role of Id3 in a mouse model for primary Sjögren's Syndrome. – Immunity Vol. 21, No. 4, 2004. – 551-560 p.
85. Nguyen C.Q., Peck A.B. Unraveling the pathophysiology of Sjögren's syndrome – associated dry eye disease. – Ocular Surface Vol. 7, No. 1, 2009. – 11-27 p.

86. Sullivan D.A., Edwards J.A. Androgen stimulation of lacrimal gland function in mouse models of Sjögren's syndrome. – *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* Vol. 60, 1997. – 237-247 p.
87. Sullivan D.A., Bélanger A., Cermak J.M., Bérubé R., Papas A.S., Sullivan R.M., Yamagami H., Dana M.R., Labrie F. Are women with Sjögren's syndrome androgen – deficient? – *Journal of Rheumatology* Vol. 30, No. 11, 2003. – 2413-2419 p.
88. Bacman S., Berra A., Sterin-Borda L., Borda E. Muscarinic Acetylcholine Receptor Antibodies a New Marker of Dry Eye Sjögren Syndrome. – *Investigative ophthalmology and visaul science* Vol. 42, No. 2, 2001. – 321-327 p.
89. Bowman S.J., Ibrahim G.H., Holmes G., Hamburger J., Ainsworth J.R. Estimating the prevalence among Caucasian women of primary Sjögren's syndrome in two general practices in Birmingham, UK. – *Scandinavian journal of rheumatology* Vol. 33, No. 1, 2004. – 39-43 p.
90. Cimaz R., Casadei A., Rose C., Bartunkova J., Sediva A., Falcini F., Picco P., Taglietti M., Zulian F., Cate R.T., et al. Primary Sjögren syndrome in the paediatric age: a multicentre survey. – *European journal of pediatrics* Vol. 162, No. 10, 2003. – 661-665 p.
91. Fox R.I. Sjögren's syndrome. – *Lacent* Vol. 366, 2005. – 321-331 p.
92. Sullivan D.A., Sullivan B.D., Evans J.E., Schirra F., Yamagami H., Liu M., Richards S.M., Suzuki T., Schaumberg D.A., Sullivan R.M., Dana M.R. Androgen deficiency, Meibomian gland dysfunction, and evaporative dry eye. – *Annals of the New York Academy of Sciences* Vol. 966, 2002. – 211-222 p.
93. Shimazaki J., Goto E., Ono M., Shimmura S., Tsubota K. Meibomian gland dysfunction in patients with Sjögren syndrome. – *Ophthalmology* Vol. 105, No. 8, 1998. – 1485-1488 p.
94. Fox R.I., Tornwall J., Michelson P. Current issues in the diagnosis and treatment of Sjögren's syndrome. – *Current opinion in rheumatology* Vol. 11, No. 5, 1999. – 364-371 p.
95. Mariette X. Lymphomas complicating Sjögren's syndrome and hepatitis C virus infection may share a common pathogenesis: chronic stimulation of rheumatoid factor B cells. – *Annals of the rheumatic diseases* Vol. 60, 2001. – 1007-1011 p.
96. Bolstad A.I., Jonsson R. Genetic aspects of Sjögren's syndrome. – *Arthritis research* Vol. 4, No. 6, 2002. – 353-359 p.

97. Mieliauskaitė D., Venalis A., Redaitienė E., Dadonienė J., Gražienė V., Kirdaitė G. Identification of primary Sjogren's syndrome family cases. – *Acta Medicina Lituanica* Vol. 11, No. 4, 2004. – 55-58 p.
98. Vitali C., Bombardieri S., Jonsson R., Moutsopoulos H.M., Alexander E.L., Carsons, Daniels T.E., Fox P.C., Fox R.I., Kassan S.S., Pillemer S.R., Talal N., Weisman M.H. Classification criteria for Sjögren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American – European Consensus Group. – *Annals of the rheumatic diseases* Vol. 61, 2002. – 554-558 p.
99. Ivanov I.I., McKenzie B.S., Zhou L., Tadokoro C.E., Lepelley A., Lafaille J.J., Cua D.J., Littman D.R. The Orphan Nuclear Receptor ROR $\gamma$ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17+ T Helper Cells. – *Cell* Vol. 126, No. 6, 2006. – 1121-1133 p.
100. Waterman S.A., Gordon T.P., Rischmueller M. Inhibitory effects of muscarinic receptor autoantibodies on parasympathetic neurotransmission in Sjögren's syndrome. – *Arthritis and Rheumatism* Vol. 43, No. 7, 2000. – 1647-1654 p.
101. Cavill D., Waterman S.A., Gordon T.P. Antibodies raised against the second extracellular loop of the human muscarinic M3 receptor mimic functional autoantibodies in Sjögren's syndrome. – *Scandinavian journal of immunology* 59, 2004. – 261-266 p.
102. Cha S., Singson E., Cornelius J., Yagna J.Y., Knot H.J., Peck A.B. Muscarinic acetylcholine type-3 receptor desensitization due to chronic exposure to Sjögren's syndrome – associated autoantibodies. – *Journal of rheumatology* Vol. 33, No. 2, 2006. – 296-306 p.
103. Ulbricht K.U., Schmidt R.E., Witte T. Antibodies against alpha-fodrin in Sjögren's syndrome. – *Autoimmunity Reviews* Vol. 2, 2003. – 109-113 p.
104. García C.M., Fuentes A.S., Escárcega R.O., Salgado G., Riebeling C., Cervera R. Pathophysiology of Sjögren's syndrome. – *Archives of medical research* Vol. 37, No. 8, 2006. – 921-932 p.
105. Mitsias D.I., Tzioufas A.G., Veiopoulou C., Zintzaras E., Tassios I.K., Kogopoulou O., Moutsopoulos H.M., Thyphronitis G. Th1/Th2 cytokine balance changes with the progress of the immunopathological lesion of Sjogren's syndrome. – *Clinical and experimental immunology* Vol. 128, No. 3, 2002. – 562–568 p.
106. Yanagi K., Ishimaru N., Haneji N., Saegusa K., Saito I., Hayashi Y. Anti-120-kDa alpha-fodrin immune response with Th1 – cytokine profile in the NOD mouse

- model of Sjögren's syndrome. – *European journal of immunology* Vol. 28, No. 10, 1998. – 3336-3345 p.
107. Witte T., Matthias T., Arnett F.C., Peter H.H., Hartung K., Sachse C., Wigand R., Braner A., Kalden J.R., Lakomek H.J., Schmidt R.E. IgA and IgG autoantibodies against alpha-fodrin as markers for Sjögren's syndrome. Systemic lupus erythematosus. – *Journal of Rheumatology* Vol. 27, No. 11, 2000. – 2417-2420 p.
108. Venalis A., Kirdaitė G., Baranauskaitė A., Kasiulevičius V. Reumatologija I. Klinikinė, laboratorinė, biofizikinė diagnostika. Bendrieji gydymo principai. – *Baltijos kopija*, 2008. – 148-155p.
109. Dartt D.A. Dysfunctional neural regulation of lacrimal gland secretion and its role in the pathogenesis of dry eye syndromes. – *The ocular surface* Vol. 2, No. 2, 2004. – 76-96 p.
110. Dawson L.J., Fox P.C., Smith P.M. Sjögren's Syndrome – the non-apoptotic model of glandular hypofunction. – *Rheumatology* Vol. 45, 2006. – 792-798 p.
111. Kovacs L., Torok T., Bari F., Keri Z., Kovacs A., Makula E, Pokorny G. Impaired microvascular response to cholinergic stimuli in primary Sjögren's syndrome. – *Annals of the rheumatic diseases* Vol. 59, No. 1, 2000. – 48-53 p.
112. Jabs D.A., Lee B., Whittum-Hudson J., Prendergast R.A. The role of Fas-Fas ligand-mediated apoptosis in autoimmune lacrimal gland disease in MRL/MpJ mice. – *Investigative ophthalmology and visual science* Vol. 42, No. 2, 2001. – 399-401 p.
113. Westhoff G, Zink A. Epidemiology of primary Sjögren's syndrome. – *Zeitschrift für Rheumatologie* Vol. 69, No. 1, 2010. – 41-49 p.
114. [www.protocol-online.org/pro/cellbiology/flowcytometryFCM/](http://www.protocol-online.org/pro/cellbiology/flowcytometryFCM/)
115. Till J.E., McCulloch E.A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. – *Radiation research* Vol. 14, No. 2, 1961. – 213-222 p.
116. Givan A.L. Flow cytometry first principles. – Wiley-Liss, 1992. – 2-3, 15-29 p.
117. Matuzevičienė R., Kučinskienė Z. Ūminių leukemijų imunofenotipavimas tėkmės citometru. – *Laboratorinė medicina* t. 4, Nr. 2 (14), 2002. – 35-42 p.
118. Radbruch A. Flow cytometry and cell sorting. – Springer laboratory, 1992. – 7-14 p.
119. Darzynkiewicz Z., Crissman H.A., Robinson J.P. Cytometry. Third edition Vol. 63, 2001. – 19-44 p.
120. [www.probes.invitrogen.com/resources/education/tutorials/4intro\\_flow/player.html](http://www.probes.invitrogen.com/resources/education/tutorials/4intro_flow/player.html)

121. Carter N.P., Ormerod M.G. Flow cytometry. Third edition. – Oxford university press, 2000. – 1-33 p.
122. Matuzevičienė R. Žmogaus ūminių ir lėtinių leukemijų ląstelių imunofenotipai: diferenciacijos žymenų ekspresijos tyrimai. Daktaro disertacija. – VU Biomedicinos mokslai, 2003. – 33-36 p.
123. Abbas A.K., Lichtman A.H., Pillai S. Cellular and molecular immunology. – 6th edition, 2009. – 75-97 p.
124. [www.biology.berkeley.edu/crl/flowcytometrybasic.html](http://www.biology.berkeley.edu/crl/flowcytometrybasic.html)
125. [http://probes.invitrogen.com/resources/education/tutorials/4Intro\\_Flow/player.html](http://probes.invitrogen.com/resources/education/tutorials/4Intro_Flow/player.html)
126. Pukėnas K. Sportinių tyrimų duomenų analizė SPSS programa. Mokomoji knyga. – Kaunas, 2005. – 124-126 p.
127. Čekanavičius V., Murauskas G. Statistika ir jos taikymai II. – Vilnius, 2004. – 20-25 p.
128. Tsubota K., Fujita H., Tsuzaka K., Takeuchi T. Mikulicz's disease and Sjögren's syndrome. – Investigative Ophthalmology & Visual Science Vol. 41, No. 7, 2000. – 1666-1673 p.
129. Li X., Qian L., Wang G., Zhang H., Wang X., Chen K., Zhai Z., Li Q., Wang Y., Harris D.C. T regulatory cells are markedly diminished in diseased salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome. – The journal of rheumatology Vol. 34, No. 12, 2007. – 2438-2445 p.
130. Liu M.F., Lin L.H., Weng C.T., Weng M.Y. Decreased CD4+CD25+bright T cells in peripheral blood of patients with primary Sjogren's syndrome. – Lupus Vol. 17, No. 1, 2008. – 34-39 p.
131. Christodoulou M.I., Kapsogeorgou E.K., Moutsopoulos H.M. Characteristics of the minor salivary gland infiltrates in Sjögren's syndrome. – Journal of autoimmunity Vol. 34, No. 4, 2010. – 400-407 p.
132. Seror R., Sordet C., Guillevin L., Hachulla E., Masson C., Ittah M., et al. Tolerance and efficacy of rituximab and changes in serum B cell biomarkers in patients with systemic complications of primary Sjögren's syndrome. – Annals of the rheumatic diseases Vol. 66, No. 3, 2007. – 351–357 p.
133. Ferraccioli G.F., Tonutti E., Casatta L., Pegoraro I., De Vita S., Sala P., Ravaioli T., Bartoli E. CD4 cytopenia and occasional expansion of CD4+CD8+lymphocytes in Sjögren's syndrome. – Clinical and experimental rheumatology Vol. 14, No. 2, 1996. – 125-130 p.



134. Morley J.K., Batliwalla F.M., Hingorani R., Gregersen P.K. Oligoclonal CD8+ T cells are preferentially expanded in the CD57+ subset. – *Journal of immunology* Vol. 154, No. 11, 1995. – 6182-6190 p.
135. Ou R., Zhou S., Huang L., Moskophidis D. Critical role for alpha/beta and gamma interferons in persistence of lymphocytic choriomeningitis virus by clonal exhaustion of cytotoxic T cells. – *Journal of virology* Vol. 75, No. 18, 2001. – 8407-8423 p.
136. Heaton P.R., Blount D.G., Mann S.J., Devlin P., Koelsch S., Smith B.H., Stevenson J., Harper E.J., Rawlings J.M. Assessing Age-Related Changes in Peripheral Blood Leukocyte Phenotypes in Domestic Shorthaired Cats Using Flow Cytometry. – *The journal of nutrition* Vol. 132, 2002. – 1607-1609 p.
137. Wang E.C., Moss P.A., Frodsham P., Lehner P.J., Bell J.I., Borysiewicz L.K. CD8<sup>high</sup>CD57<sup>+</sup> T lymphocytes in normal, healthy individuals are oligoclonal and respond to human cytomegalovirus. – *Journal of immunology* Vol. 155, No. 10, 1995. – 5046-5056 p.
138. Rosenberg S.A., Dudley M.E. Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma. – *Current opinion in immunology* Vol. 21, No. 2, 2009. – 233-240 p.
139. Ochsenbein A.F., Riddell S.R., Brown M., Corey L., Baerlocher G.M., Lansdorp P.M., Greenberg P.D. CD27 expression promotes long-term survival of functional effector-memory CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes in HIV-infected patients. – *The journal of experimental medicine* Vol. 200, 2004. – 1407-1417 p.
140. Balandina A., Lécart S., Dartevelle P., Saoudi A., Berrih-Aknin S. Functional defect of regulatory CD4(+)CD25<sup>+</sup> T cells in the thymus of patients with autoimmune myasthenia gravis. – *Blood* Vol. 105, No. 2, 2005. – 735-741 p.
141. Sarigul M., Yazisiz V., Bassorgun C.I., Ulker M., Avci A.B., Erbasan F., Gelen T., Gorczynski R.M., Terzioglu E. The numbers of Foxp3 + Treg cells are positively correlated with higher grade of infiltration at the salivary glands in primary Sjogren's syndrome. – *Lupus* Vol. 19, No. 2, 2010. – 138-145 p.
142. Krupica Jr.T, Fry T. J., Mackall C. L. Autoimmunity during lymphopenia: A two-hit model. – *Clinical Immunology* Vol. 120, 2006. – 121-128 p.
143. Abdulahad W.H., Boots A.M., Kallenberg C.G. FoxP3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells in systemic autoimmune diseases: the delicate balance between true regulatory T cells and effector Th-17 cells. – *Rheumatology (Oxford)* Vol. 50, No. 4, 2011. – 646-656 p.

## PRIEDAI

Nr. 1: Amerikos ir Europos bendro sutarimo Sjogreno sindromo klasifikacijos kriterijai ir taisyklės.

### **Sjogreno 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 nei 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?
3. Ar reikia gerti skysčius, kad lengviau būtų nuryti maistą?

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

Širmerio 1 testas, atliekamas be nuskausminimo ( $\leq 5$  mm/5 min.).

Bengal rožinio testas ( $\geq 4$ , pagal van Bijsterved'o vertinimo sistemą).

IV. Histologinis mažųjų seilių liaukų biopsijos medžiagos tyrimas:

Židinių skaičius  $\geq 1$  ( $>50$  limfocitų /  $4 \text{ mm}^2$  liaukinio audinio). 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).

### **Sjogreno sindromo klasifikacijos taisyklės**

Pirminiam Sjogreno sindromui diagnozuoti (kai nėra kitos autoimuninės ligos):

- a) Iš 6 klasifikacijos kriterijų požymių patvirtinami 4 teigiami požymiai, tarp kurių yra teigiamas IV (histopatologija) arba VI (autoantikūnai);
- b) Iš 4 objektyvių klasifikacijos kriterijų požymių (III, IV, V, VI) 3 požymiai yra teigiami.

Antriniam Sjogreno sindromui diagnozuoti:

Diagnozavus kitą autoimuninę ligą ir esant I arba II klasifikacijos požymiams ir bent dviems teigiamiems požymiams iš III, IV ir V požymių.

Sjogreno sindromo atmetimo kriterijai: galvos ir/arba kaklo radiologinis gydymas, hepatitas C, AIDS, anksčiau diagnozuota limfoma, sarkoidozė, transplantato prieš šeimininką reakcija, anticholonerinių vaistų vartojimas.