

**lek. Maria Maślińska**

**Wpływ limfocytów B na obraz kliniczny pierwotnego zespołu Sjögrena – ocena immunohistochemiczna, serologiczna i profil cytokin regulujących czynność tych komórek**

**Streszczenie w języku polskim**

**Wprowadzenie**

Pierwotny zespół Sjögrena (pZS) jest przewlekłą układową chorobą o podłożu autoimmunologicznym, w której dominuje pobudzenie limfocytów B, z ich nadreaktywnością i produkcją autooprzeciwciał, oraz występowanie nacieków zapalnych z komórek jednojądrowych w gruczołach wydzielania zewnętrznego. U podłoża zjawisk patofizjologicznych w pZS leży uszkodzenie komórek nabłonka, ich apoptoza i uwolnienie antygenów oraz kompleksów RNA. Sprzyjają temu zarówno określone czynniki genetyczne, jak i środowiskowe, a wśród nich przede wszystkim infekcje wirusowe, głównie zakażenie wirusem Epsteina-Barr, promieniowanie ultrafioletowe (UV) i zaburzenia równowagi hormonalnej.

Począwszy od momentu uszkodzenia nabłonka, dochodzi do wydzielania interferonu gamma (IFN- $\gamma$ ) przez takie komórki, jak makrofagi czy komórki dendrytyczne, oraz stymulacji komórek do wydzielania czynnika stymulującego dojrzewanie i różnicowanie komórek B, czyli BAFF (B-cell activating factor), a także innych cytokin stymulujących limfocyty B, w tym zbliżonego w działaniu do BAFF ligandu indukującego proliferację – APRIL (proliferation inducing ligand). Ciągła stymulacja limfocytów B doprowadza do przełamania autotolerancji i produkcji autooprzeciwciał, przede wszystkim przeciwko rybonukleoproteinom SS-A i SS-B. Ponadto mimikra antygenowa, czyli podobieństwo antygenów własnych i obcych (np. wirusa EBV), sprzyja nasileniu procesu autoimmunizacji. Zarówno aktywność cytokin, jak i tropizm wirusa EBV do gruczołów ślinowych, powodują tworzenie się nowej tkanki limfoidalnej, skupisk tkanki limfatycznej (grudki limfatyczne/ośrodki rozmnażania), które stanowią źródło komórek autoreaktywnych miejscowo syntetyzujących przeciwciała.

W obrazie klinicznym pZS dominują objawy suchości błon śluzowych, przede wszystkim oczu i jamy ustnej. Jednak objawy suchości nie są objawami wczesnymi, a ponadto u części chorych nie występuje nasilona suchość, a mimo to obserwuje się zmiany w narządach wewnętrznych, np. śródmiąższowe zmiany w płucach i włóknienie. Pobudzenie limfocytów B może również zwiększać ryzyko rozwoju chorób limfoproliferacyjnych, szczególnie chłoniaków, w tej grupie chorych. Według statystyk ryzyko rozwoju chłoniaka u

chorych z pZS może nawet zwiększyć się czterdziestokrotnie w porównaniu ze zdrową populacją.

## **Cele pracy**

Celem pierwszoplanowym pracy było wykazanie aktywacji limfocytów B i jej wpływu na obraz kliniczny pZS.

Kolejnym celem była ocena wpływu czynników regulujących czynność limfocytów B, takich jak cytokiny: czynnik stymulujący limfocyty B (B-cell activating factor – BAFF), ligand indukujący proliferację (A proliferation-inducing ligand – APRIL), czynnik martwicy nowotworów  $\beta$  (tumor necrosis factor  $\beta$  – TNF- $\beta$ , inaczej limfotoksyna alfa – LT- $\alpha$ ), interleukina 21(IL-21), ligand kinazy tyrozynowej 3 Fms podobny (FMS-like tyrosine kinase-3 – FLT-3L) oraz  $\beta$ 2–makroglobuliny na ( $\beta$ 2M), na aktywność immunologiczną i kliniczną w pZS.

Trzecim celem była ocena wpływu przebycia zakażenia wirusem EBV lub reaktywacji tego zakażenia w grupie chorych z pZS w porównaniu z pacjentami z objawami suchości bez rozpoznanego pZS oraz grupą kontrolną zdrowych ochotników.

## **Material i metody**

Do badań zakwalifikowano 113 pacjentów kierowanych do diagnostyki reumatologicznej z powodu objawów suchości, wcześniej nieleczonych przewlekłe dużymi dawkami glikokortykosteroidów bądź lekami immunosupresyjnymi. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Narodowym Instytucie Geriatrii, Reumatologii i Rehabilitacji (NIGRiR). Pacjenci zostali poinformowani o celu i metodyce badań oraz wyrazili pisemną zgodę na uczestnictwo w badaniu.

Spośród wszystkich pacjentów z objawami suchości u 75 potwierdzono rozpoznanie pierwotnego zespołu Sjögrena zgodnie z kryteriami American-European Consensus Group (AECG) i American College of Rheumatology (ACR 2012). Stanowili oni 66,38% osób kierowanych do diagnostyki (grupa I). U pozostałych 38 pacjentów (33,62%) nie potwierdzono układowej choroby tkanki łącznej, w tym pZS (grupa II pacjentów z objawami suchości bez potwierdzonego pZS). Kryteria ACR 2012 roku i równocześnie kryteria AECG spełniało 55 badanych z grupy I co stanowiło 80 % całej grupy. Tylko kryteria ACR 2012 roku spełniało 15 badanych (20%), w tym zmiany w badaniu histopatologicznym potwierdzono u 11 pacjentów, u 4 nie stwierdzono FS  $\geq$  1, ale obecne były przeciwciała anti-SS-A i potwierdzono cechy suchego oka oceną OSS.

Ponadto w grupie 24 zdrowych ochotników (grupa III) oceniano surowicze stężenia cytokin (BAFF, APRIL, IL-21, FLT-3L) oraz  $\beta$ 2- mikroglobuliny ( $\beta$ 2M) i miano przeciwciał przeciwjądrowych (ANA) w surowicy.

Łącznie przebadano 137 osób (trzy grupy).

We wszystkich grupach pacjentów badano status kontaktu z wirusem EBV na podstawie oceny obecności przeciwciał przeciw poszczególnym antygenom wirusa, takim jak wczesny antygen (early antigen – EA), kapsydowy antygen wirusa (viral capsid antigen – VCA) i antygen jądrowy wirusa Epsteina-Barr (Epstein-Barr virus nuclear antigen – EBNA), wykazując aktywne/świeże zakażenie, reaktywację zakażenia oraz przebyte zakażenie. Badania te wykonywano za pomocą standardowych testów ELISA w Zakładzie Wirusologii Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie.

W grupie I i II przeprowadzono pełną diagnostykę różnicową – laboratoryjną, oceniono histopatologicznie biopsję gruczołów ślinowych mniejszych, a także przeprowadzono diagnostykę ultrasonograficzną ślinianek.

Podstawowa diagnostyka laboratoryjna obejmowała badanie morfologii krwi obwodowej, ze szczególnym uwzględnieniem liczby krwinek białych (WBC), stężenie białka C-reaktywnego (C-reactive protein – CRP), czynnika reumatoidalnego w klasie IgM (RF), ocenę proteinogramu z uwzględnieniem stężenia gammaglobulin, badanie szybkości opadania krwinek czerwonych (OB). Określono również obecność krioglobulin w surowicy i oznaczono stężenie składowych C4 i C3 dopełniacza.

Przeciwciała przeciwjądrowe (ANA) oznaczono metodą immunofluorescencji pośredniej (IF) na linii komórkowej HEp-2 (Human Epithelial cell; HEp-2000). Do celów analizy statystycznej wartości mian ANA zostały zlogarytmowane.

Przeciwciała anty-SS-A, anty-SS-B oznaczono metodą półilościową Immunoblot, oceniającą w skali od 1 do 3 siłę wiązania przeciwciała z antygenem. Wykonano również profil autoprzeciwciał zestawem testowym (ANA Profil 3 EUROLINE) do jakościowego oznaczenia in vitro przeciwciał klasy IgG przeciwko 14 antygenom (przeciwciała antycentromerowe – ACA), dsDNA, RNP, Scl-70, Jo-1, przeciwciała AMA-M2 – metodą Dot-blot. Określano również obecność w surowicy pacjentów (grupa I i II) przeciwciał przeciw cytrulinowanym białkom (anti-citrullinated proteins antibodies – ACPA).

Wymienione badania (podstawowe oraz profil immunologiczny) wykonano w Centralnym Laboratorium NIGRiR.

Oceniano surowicze stężenie cytokin (BAFF, APRIL, FLT-3L, TNF- $\beta$ , IL-21) oraz  $\beta$ 2-mikroglobuliny ( $\beta$ 2M), stosując standardowe testy ELISA, badano również przeciwciała w kierunku oceny statusu zakażenia EBV. Stężenie cytokin i  $\beta$ 2M oznaczano w Zakładzie Patofizjologii i Immunologii oraz Zakładzie Biochemii i Biologii Molekularnej NIGRiR.

Biopsja gruczołów ślinowych mniejszych była wykonywana w toku rutynowej diagnostyki pZS, a w preparatach histopatologicznych oceniano liczbę ognisk zawierających  $\geq 50$  limfocytów/4 mm<sup>2</sup> tkanki sąsiadującej z prawidłowymi gronkami gruczołów. Jedno ognisko odpowiada focus score (FS) -1 i było spełnieniem jednego z kryteriów diagnostycznych pZS. U 41 chorych z pZS wykonano również badanie immunohistochemiczne bioptatu, z oceną obecności komórek CD3+, CD4+, CD19+, CD21+, CD35+ w naciekach w gruczołach ślinowych mniejszych. Przygotowanie oraz badanie materiału biopsyjnego wykonano w Zakładzie Anatomii Patologicznej NIGRiR.

Aktywność choroby oceniano kwestionariuszem Eular Sjögren's syndrome disease activity index (ESSDAI).

Badania ultrasonograficzne gruczołów ślinowych były wykonywane w toku rutynowej diagnostyki pZS w Zakładzie Radiologii NIGRiR.

Badania okulistyczne i ocenę objawu suchości, a także skutków zmniejszenia fazy wodnej łez przeprowadzono w toku diagnostyki pZS z użyciem testu Schirmera oraz barwień oka zielenią lizaminową i fluoresceiną z podaniem ilościowych zmian z zastosowaniem Ocular Staining Score (OSS). Analizę statystyczną przeprowadzono w Zakładzie Gerontologii i Zdrowia Publicznego NIGRiR.

Krótką charakterystyka grup badanych

Grupa I: 65 kobiet [K] (86,7%) i 10 mężczyzn [M] (10,3%), stosunek liczby K/M wynosił 6,5 : 1, średnia wieku  $50 \pm 15,1$  roku.

U chorych z pZS zajęcie płuc (zmiany śródmiąższowe, włóknienie) wykazano u 8%, zajęcie obwodowego układu nerwowego (polineuropatia) u 16%, ośrodkowego układu nerwowego u 15%, zapalenie stawów występowało u 20% chorych, a bóle stawów bez zapalenia aż u 84% chorych.

Grupa II: 35 K (92,1%) i 3 M (3,9%), stosunek liczby K/M wyniósł 11,6 : 1, średnia wieku  $55,11 \pm 12,4$  roku. Zmiany w płucach w tomografii komputerowej wysokiej rozdzielczości (HRCT) stwierdzono u 1 pacjenta (2,6%), zmiany neurologiczne w ośrodkowym układzie nerwowym (przebyty udar, zespoły demielinizacyjne) wykazano u 5 badanych (13,2%), w obwodowym układzie nerwowym (polineuropatia) tylko u 2 badanych (5,3%). Z objawów dotyczących stawów dominowała artralgia (84%), natomiast przejściowy obrzęk stawu stwierdzono u 2 badanych z grupy II (5,4%).

Grupa III: zdrowi ochotnicy; 19 K (79%) i 5 M (21%); stosunek liczby K/M wynosił 3 : 1; średnia wieku to  $43,4 \pm 12,4$  roku. U badanych ochotników nie stwierdzono: chorób układowych tkanki łącznej, objawów suchości, ostrego lub przewlekłego stanu zapalnego i zakażenia, w tym wirusami zapalenia wątroby typu B i C (HBV, HCV), niewydolności krążenia, oddychania, uszkodzenia wątroby, choroby nowotworowej w chwili zakwalifikowania do badania.

## Wyniki

Przeprowadzone badania wykazały, że w grupie chorych z pZS przeciwciała ANA w mianie  $\geq 1:320$  występowały u 88% , u 4 badanych (5,3%) miano było niższe (1: 160), jednak u tych chorych stwierdzono przeciwciała przeciw antygenom SS-A i SS-B i spełniali oni kryteria rozpoznania pZS. W grupie I obserwowano ponadto inne autoprzeciwciała, takie jak RF (61%), ACPA (13,3%), ACA (4,2%), AMA-M2 (9,4%). Krioglobuliny obecne były u 9,4% badanych. Wśród autoprzeciwciał dominowały przeciwciała anty SS-A, które były obecne aż u 88 % badanych z grupy I, w tym u 56% o dużej sile wiązania z antygenem. Przeciwciała anty-SS-B występowały u 49% badanych w grupie I i we wszystkich przypadkach współwystępowały z przeciwciałami anty-SS-A.

Wykazano, że chorzy z pZS i obecnym RF (61%) w porównaniu z chorymi, u których nie stwierdzono RF(39%), mieli znamienne niższą liczbę leukocytów (WBC), mniejszą ilość łez ocenianych testem Schirmera oraz większe OB i wyższe stężenie gammaglobulin w surowicy.

Zapalenie stawów występowało u 20% chorych z grupy I. Wykazano większą częstość występowania zapalenia stawów u chorych z pZS i obecnością przeciwciał przeciwko cytrulinowanym białkom – ACPA(+) – w porównaniu z chorymi ACPA(-) ( $p = 0,003$ ). Nie wykazano zależności pomiędzy obecnością przeciwciał ACPA a wystąpieniem zapalenia stawów u chorych z zespołem suchości bez pZS.

Dzieląc chorych z grupy I na podgrupę młodszą (poniżej 45. roku życia) i starszą (powyżej 45. roku życia), wykazano istotną statystycznie różnicę, pomiędzy tymi podgrupami, ponieważ w przedziale wieku poniżej 45. roku życia częściej obserwowano leukopenię ( $p = 0,007$ ), wyższe stężenia gammaglobulin ( $p = 0,018$ ), niższe stężenie składowej C3 dopełniacza ( $p = 0,018$ ). W grupie powyżej 45 lat stwierdzono natomiast istotnie statystycznie niższe wartości testu Schirmera ( $p = 0,015$ ). W grupie II RF występował u 14% osób ( $N = 5$ ), a przeciwciała ANA w mianach 1: 160 i 1: 320 u 24% ( $N = 9$ ), nie wykazano jednak zależności ich obecności od wieku badanych. Przeciwciała ANA w grupie III stwierdzono w znamionym mianie tylko u jednej osoby (4,1% badanych) bez implikacji klinicznych w chwili badania.

Porównując grupy I i II pod względem podstawowych parametrów laboratoryjnych w diagnostyce pZS, stwierdzono, że istotnie statystycznie różnice dotyczyły OB ( $p = 0,002$ ), RF ( $p < 0,001$ ), składowej C4 dopełniacza ( $p = 0,003$ ) i stężenia gammaglobulin ( $p < 0,001$ ). Za pomocą regresji logistycznej próbowano ustalić parametry różnicujące chorych z pZS od osób z objawami suchości. Potwierdzono, że różnicujące są takie parametry, jak OB, RF, stężenie gammaglobulin. Wykazano również, że autoprzeciwciała anty-SS-A, anty-SS-B i ANA są wyraźnie czynnikami różnicującymi. Najwyższy iloraz szans stwierdzono w przypadku obecności przeciwciał anty-SS-A, anty-SS-B (95% CI odpowiednio: 1,905–4,063 i 1,423–4,179) oraz gammaglobulin 1,747 ( 95% CI: 1,162–2,626). Następnie do modelu włączono BAFF, APRIL, FLT-3L i TNF $\beta$

oraz  $\beta 2M$ , jednak żadna z tych zmiennych nie osiągnęła poziomu istotności  $< 0,05$ . Jeżeli w modelu uwzględniono zmienne, takie jak płeć i wiek, to w analizie wieloczynnikowej IL-21 była najlepszym „kandydatem” wśród cytokin do szacowania prawdopodobieństwa pZS (OR = 1,002; 95% CI: 1,000–1,004,  $p = 0,013$ ).

Analizując podstawowe badania w diagnostyce pZS, stwierdzono dodatnie korelacje szybkości OB, stężenia gammaglobulin z obecnością autoprzeciwciał anty-SS-A, anty-SS-B, ANA i RF, ponadto stężenie RF korelowało ujemnie z liczbą WBC i stężeniem składowej C4 dopełniacza.

Poszukiwano również korelacji pomiędzy obecnością autoprzeciwciał anty-SS-A, anty-SS-B, ANA a obrazem klinicznym pZS –suchość oczu (test Schirmera, OSS), nie wykazano jednak istotnych statystycznie zależności pomiędzy tymi parametrami.

Badano również zależność zmian w gruczołach ślinowych mniejszych (typowanie komórek w naciekach zależnie od cząsteczek CD) oraz FS (ogniska nacieków komórek jednojądrowych) od nasilenia suchości oczu oraz wybranych parametrów immunologicznych i laboratoryjnych. Wykazano, że w naciekach gruczołów ślinowych mniejszych dominowały komórki CD3+, CD4+ oraz CD19+. Wszystkie badane w nacieku komórki wykazywały pomiędzy sobą silne i bardzo silne korelacje dodatnie ( $\rho > 0,6-0,99$ ). Szczególnie zwracała uwagę dodatnia korelacja pomiędzy liczbą komórek CD4+ a CD19+ oraz CD19+ a CD21+. Stwierdzono, że FS zależy od obecności komórek CD3+, CD4+, CD19+. W podgrupie osób poniżej 45. roku życia w porównaniu z podgrupą  $> 45$ . roku życia stwierdzono obecność komórek wczesnej fazy zapalenia (CD3+, CD4+) oraz komórek CD21+ ( $p = 0,042$ ) i CD35+ ( $p = 0,031$ ).

Liczba i obecność komórek CD19+, CD3+, CD4+ umiarkowanie ujemnie korelowały z objawami suchości oczu ocenianymi testem Schirmera. Co jednak zwraca uwagę, z testem Schirmera nie korelowała wartość liczbowa FS. Focus score słabo dodatnio korelował ze stężeniem gammaglobulin, obecnością przeciwciał ANA, anty-SS-A, wynikiem OSS i ESSDAI, a słabo ujemnie ze stężeniem składowej C4 dopełniacza.

Realizując cel 2 pracy, oceniano czynniki regulujące czynność limfocytów B, oznaczono w surowicy cytokiny, takie jak BAFF, APRIL, TNF- $\beta$ , IL-21, FLT-3L oraz  $\beta 2M$ , badano ich ewentualny wpływ na aktywność immunologiczną i kliniczną pZS.

Porównywano wyniki pomiędzy grupą pacjentów z pZS a grupą z objawami suchości i stwierdzono istotną statystycznie różnicę ( $p = 0,027$ ) tylko w zakresie stężenia APRIL. Porównując grupę I (pZS) z grupą zdrowych ochotników, różnice z istotnością statystyczną stwierdzono dla  $\beta 2M$  ( $p < 0,001$ ), FLT-3L ( $p < 0,001$ ), IL-21 ( $p = 0,020$ ), czego nie obserwowano porównując grupę I z grupą II. Jednak, co wydaje się interesujące, stężenia FLT-3L i IL-21 były wyższe w grupie kontrolnej w porównaniu z pozostałymi dwiema grupami.

Stężenie BAFF nie różniło się istotnie w badanych grupach, natomiast w grupie z pZS BAFF dodatnio korelowało z APRIL oraz ze stężeniem CRP, nie korelowało zaś z nasileniem suchości oczu oraz FS. Surowicze stężenie BAFF nie korelowało z przeciwciałami ANA oraz przeciwciałami przeciw antygenom SS-A i SS-B, natomiast surowicze stężenie APRIL korelowało z OB i stężeniem gammaglobulin oraz wykazywało korelację umiarkowanie dodatnią z liczbą ANA ( $\rho = 0,413$ ) i słabo dodatnią z liczbą przeciwciał anti-SS-A ( $\rho = 0,285$ ), anti-SS-B ( $\rho = 0,229$ ).

Analizując stężenia cytokin (IL-21, BAFF, APRIL, TNF- $\beta$ , FLT-3L) u chorych z pZS, badanych podzielono również w zależności od wieku na dwie podgrupy  $\geq 45$  lat i  $< 45$  lat. Różnicę istotną statystycznie stwierdzono pomiędzy podgrupami w stężeniu TNF- $\beta$  (w grupie młodszej było ono wyższe;  $p = 0,049$ ). We krwi obwodowej osób z grupy I wśród oznaczanych cytokin tylko stężenie TNF- $\beta$  wykazywało dodatnią korelację z liczbą komórek CD19+, CD4+ oraz CD21 + (odpowiednio  $\rho = 0,349$ ;  $0,488$ ;  $0,483$ ). Dodatnio również korelowało z surowiczym stężeniem gammaglobulin, APRIL i obecnością przeciwciał anti-SS-A.

Surowicze stężenie IL-21u chorych z pZS słabo ujemnie korelowało z liczbą przeciwciał anti-SS-A .

Stężenie  $\beta 2M$  w surowicy chorych z grupy I i II nie różniło się istotnie. Różnice wykazano pomiędzy grupą I i III ( $p < 0,001$ ); wyraźnie wyższe stężenie  $\beta 2M$  obserwowano w grupie I. Ponadto stężenie  $\beta 2M$  w surowicy chorych z pZS korelowało dodatnio ze stężeniem FLT-3L ( $\rho = 0,640$ ).

Wykazano zależność wartości ESSDAI od ilości przeciwciał anti-SS-A, anti-SS-B, obecnością krioglobulin, wartością FS i obecnością komórek C4+, C3+ w nacieku w gruczołach ślinowych mniejszych ( $p < 0,05$ ). Dzieląc grupę I na dwie podgrupy – z niską aktywnością choroby (ESSDAI  $< 5$ ) oraz z umiarkowaną i wysoką ESSDDAI  $> 5$ , wykazano istotną statystycznie zależność ESSDAI  $\geq 5$  od obecności przeciwciał anti-SS-B ( $p = 0,015$ ), jak również od przeciwciał anti-SS-A ( $p = 0,046$ ).

Ponieważ najistotniejsze dla rokowania co do przeżycia w pZS jest zajęcie ważnych dla życia narządów wewnętrznych, takich jak płuca i układ nerwowy, w badanej grupie chorych z pZS oceniono wpływ RF, gammaglobulin, przeciwciał ANA, anti-SS-A, anti-SS-B, FS i stężenia badanych cytokin na zwiększenie prawdopodobieństwa zajęcia tych narządów. Nie wykazano jednak istotnych statystycznie zależności.

Analizując rolę zakażenia wirusem EBV, porównano grupy pod kątem kontaktu z tym wirusem i oceniono ewentualny status zakażenia. Zarówno w grupie I, jak i II obserwowano przewagę reaktywacji zakażenia, odpowiednio u 70,7% i 76,3% badanych, w porównaniu z grupą III, w której reaktywacja została stwierdzona u 33% badanych. Nie wykazano istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami I i II dotyczących zakażenia EBV. Istotna statystycznie różnica ( $p = 0,008$ ) była widoczna pomiędzy grupą z pZS a grupą osób

zdrowych pod względem obecności przebytego i aktywnego zakażenia (reaktywacja).

Zaobserwowano również, że najbardziej charakterystyczną zmianą w obrazie USG ślinianek u chorych z pZS jest ich niejednorodność ( $p < 0,001$ ). Nie wykazano jednak wpływu aktywnego zakażenia EBV, przebytego czy reaktywacji tego zakażenia, na zmiany w badaniu ultrasonograficznym ślinianek chorych z pZS. Wśród badanych immunohistochemicznie preparatów z biopsji gruczołów ślinowych mniejszych u chorych z pZS ( $N = 38$ ), u których również oceniano status zakażenia EBV, nie wykazano istotnych statystycznie różnic dotyczących liczby w nacieku komórek CD3+, CD4+, CD19+, CD21+, CD35+ w zależności od przebycia zakażenia bądź jego reaktywacji. Reaktywacja zakażenia lub przebycie zakażenia w przeszłości nie wpływały również istotnie na różnice w surowiczym stężeniu cytokin regulujących proliferację, różnicowanie i przeżycie limfocytów B.

## **Wnioski**

Na podstawie otrzymanych wyników i obserwacji wyciągnięto następujące wnioski:

1. Potwierdzeniem roli limfocytów B i zwiększenia ich aktywności w pZS są przede wszystkim podstawowe i znane parametry, takie jak: zwiększenie stężenia gammaglobulin, leukopenia, pojawienie się w surowicy czynnika reumatoidalnego, obecność w istotnym mianie przeciwciał ANA, przeciwciał anty-SS-A i anty-SS-B oraz obniżenie wartości składowej C4 dopełniacza.
2. Przeciwciała przeciwjądrowe (ANA), przeciwciała przeciw antygenom SS-A i SS-B oraz zwiększone stężenie APRIL w surowicy u chorych z pZS mogą mieć związek z rozwojem uogólnionego zapalenia. Dodatnia korelacja przeciwciał ANA i anty-SS-A z FS może natomiast również świadczyć o wpływie tych przeciwciał na miejscową aktywność zapalną w gruczołach ślinowych.
3. Na podstawie analizy zebranych grup stężenie BAFF w surowicy nie wyróżniało istotnie statystycznie chorych z pZS, ale jego dodatnia korelacja z CRP może świadczyć o roli BAFF jako czynnika ostrej fazy i wskaźnika wczesnego zapalenia.
4. Stężenie FLT-3 ligandu nie różnicuje chorych z objawami suchości i pZS, co może być powiązane z uszkodzeniem w obu tych grupach komórek nabłonka.
5. Brak różnic w stężeniu surowiczym  $\beta 2M$  w grupie I i II, a niższe stężenie tej cytokiny w grupie III w porównaniu z I ( $p < 0,001$ ) może wynikać z wpływu reaktywacji wirusa EBV (dominującej w grupie I i II) oraz może być efektem uszkodzenia komórek nabłonka w grupie chorych z pZS jak też w grupie badanych z objawami suchości.
6. Dodatnia korelacja stężenia TNF- $\beta$  (limfotoksyny alfa) – białka wydzielanego głównie przez limfocyty T, z komórkami CD3+ i CD4+, w nacieku gruczołów ślinowych (dominujących w początkowych fazach pZS) potwierdza aktywność



limfocytów T. Dodatkowo korelacje stężenia TNF- $\beta$  ze stężeniem gammaglobulin, obecnością przeciwciał anty-SS-A oraz surowiczym stężeniem APRIL, może świadczyć o wpływie tej cytokiny również na pobudzenie limfocytów B wyrażone produkcją przeciwciał i uogólnieniem procesu.

7. Zmniejszenie stężenia IL-21 w surowicy chorych z pZS oraz w grupie z suchością może świadczyć o redystrybucji tej cytokiny w miejsce największej aktywności komórek docelowych dla tej cytokiny, czyli limfocytów B w gruczołach wydzielania zewnętrznego (przede wszystkim do ślinianek i gruczołów łzowych). Może wynikać to również ze stosunkowo krótkiego czasu trwania choroby i objawów suchości w badanych grupach chorych.

8. Wynik biopsji gruczołów ślinowych opisywany jako FS nie pozwala na ocenę czasu trwania choroby, koreluje jednak z jej aktywnością (ESSDAI).

9. Silna korelacja dodatnia liczby komórek CD19+ z CD3+ i CD4+ w nacieku w gruczołach ślinowych mniejszych potwierdza aktywność limfocytów B oraz silną interakcję pomiędzy limfocytami B (CD19+) i T (CD3+, CD4+) w naciekach w przebiegu pZS. Obecność i zwiększenie liczby tych komórek w gruczołach w ogniskach zapalenia koreluje dodatnio z aktywnością pZS (ESSDAI) oraz z nasileniem objawów suchości (test Schirmera; OSS).

10. Wykazaną reaktywację zakażenia EBV, dominującą zarówno u chorych z potwierdzonym pZS, jak i z objawami suchości bez pZS, można powiązać z wystąpieniem objawów suchości w obu tych grupach.

11. Nie wykazano wpływu zakażenia EBV (reaktywacji oraz przebytego zakażenia) na obraz ultrasonograficzny ślinianek i obraz histopatologiczny gruczołów ślinowych mniejszych (FS, CD3+, CD4+, CD19+, CD21+, CD35+).

Podsumowując uzyskane wyniki, należy podkreślić, że zarówno zgodność z innymi badaczami, jak i przeciwstawne obserwacje, potwierdzić mogą różnorodność obrazu klinicznego i immunologicznego pZS. Uzyskane wyniki zwracają również uwagę na fakt, że w badanej grupie chorych z pZS byli chorzy zarówno na wczesnym, jak i późnym etapie procesu autoimmunizacyjnego, często niezależnie od czasu trwania objawów klinicznych, co wpłynęło na różnice w wynikach i trudności interpretacyjne. Wiek chorych może w pewnym stopniu wpływać na aktywność immunologiczną, lecz potwierdzenie tego wymaga poszerzenia zakresu badań i ram czasowych obserwacji. Wykonane badania i przedstawione wnioski mogą dostarczyć dalszych argumentów do dyskusji nad propozycją kolejnych kryteriów diagnostycznych pZS.