

T lymphocita káliumcsatorna funkció gyermekkori Crohn-betegségben

Doktori értekezés

Orbán Csaba

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Toldi Gergely, PhD, egyetemi tanársegéd
Hivatalos bírálók:

Dr. Filkor Kata, PhD, laborvezető

Dr. Miheller Pál, PhD, egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Domján Gyula, DSc, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Czervenak Judit, PhD, tudományos munkatárs

Dr. Müller Katalin, PhD, egyetemi tanársegéd

Budapest

2017.

1 Bevezetés

A Crohn-betegség (CD) gyermekkori előfordulása az elmúlt 10-15 évben a fejlett országokban megduplázódott. A betegség és a korai manifesztáció okát egyelőre nem ismerjük, bár az ma már evidencia hogy a patogenezis multifaktoriális. Az immunrendszer szerepe vitathatatlan, éppen ezért igen nagyszámú vizsgálat célozta már meg a betegség immunológiai hátterének megismerését, és az esetleges terápiás célpontok azonosítását. Ezen vizsgálatok többsége vagy valamilyen állatmodellt használ (pl.: Knock-out egerek), vagy humán biopsziás mintákkal dolgozik. A genetikai vizsgálómódszerek fejlődésével és térhódításával az immungenetikai háttér is mindinkább ismertté válik. Ugyanakkor kevés olyan tanulmány érhető el, mely az immunsejtek funkcionális vizsgálatával foglalkozna.

Az MTA-SE Gyermekgyógyászati és Nefrológiai Kutatócsoport, melynek munkájába négy éve lehetőségem volt bekapcsolódni, kifejlesztett egy olyan eljárást, mely lehetővé teszi egyszerre több immunsejt szubpopuláció kinetikus folyamatainak valós idejű monitorozását áramlási citométeren. Ehhez egy olyan algoritmust is kidolgozott a csoport, mely lehetővé teszi a kinetikus adatok objektív elemzését a függvényillesztés módszerének segítségével. Ezzel egyedülálló módon kutatjuk a sejtek élettani folyamatait.

Ezen eljárások segítségével már eddig is több patológiás folyamat során (pl. 1-es típusú diabetes, rheumatoid arthritis) vizsgáltuk a bifázisos kalcium jelet, mely a korai T sejt aktiváció során következik be, és amely nélkül az adaptív immunválasz nem jöhetne létre. A megváltozott kalciumjel kóros immunfenotípushoz, illetve -funkcióhoz vezethet.

Munkacsoportunk másik, nagy vizsgálati területe a T sejteken található kálium csatornák szerepének vizsgálata az egyes kórképekben. Szintén több autoimmun eredetű megbetegedésben igazoltuk ezen csatornák részvételét a megváltozott immunfunkcióban. Adataink arra is rávilágítottak, hogy a csatornák

szelektív gátlása megoldható kísérletes körülmények között anélkül, hogy a normál működésű szubpopulációk funkcióját befolyásolnánk. A Crohn-betegség kapcsán szintén zajlottak olyan korábbi vizsgálatok, melyek felhívják a K^+ -csatornák lehetséges terápiás szerepére a figyelmet.

A képet tovább bonyolítja, hogy az immunológia fejlődésével egyre több, kisebb arányban képviselt T sejt szubpopulációt fedeznek fel, melyekről igen kevés adat áll rendelkezésre. Kiemelkednek közülük a Th17 és regulátoros T (Treg) sejtek, melyek a korábbról ismert Th1 és Th2 altípusokkal egyetemben fontos szerepet játszanak a gyulladási folyamatok egyensúlyának szabályozásában. Ezek vizsgálata általában nem a többi altípussal együttesen történik, hanem izolálva. Ez azért probléma, mert a külön-külön, eltérő időben, gyakran más módszerrel vizsgált szubpopulációk eredményeit összevetve, legjobb esetben is csak részben helyes következtetéseket vonhatunk le, és a szubpopulációk sejtjei közötti kölcsönhatást sem látjuk ily módon.

A munkacsoport korábbi, sokéves tapasztalatát felhasználva lehetőségem nyílt, hogy részt vegyek azon vizsgálatokban, melyek jelen értekezés témájául is szolgálnak.

Ezekben a vizsgálatokban célul tűztük ki, hogy leírjuk a korai T sejt aktiváció során bekövetkező kalcium beáramlás kinetikájának gyermekkori Crohn-betegségben történő változásait, a kálium csatornák szerepének megítélésével. Később pedig, miközben ez a vizsgálat zajlott, a tudomány aktuális irányvonalai mentén, az egyszerre négy szubpopuláció vizsgálatának lehetőségét vizsgáló kutatásunkat terveztük meg és hajtottuk végre, mely egyben előretétekintés is jövőbeni vizsgálatokra nézve.

2 Célkitűzések

Vizsgálataink során célunk volt, hogy:

1. Megvizsgáljuk a gyermekkori Crohn-betegségben a korai T sejt aktiváció során végbemenő kalcium beáramlás kinetikát azonos korú, egészséges kontrollokkal összehasonlítva azt. Ezáltal az esetleges eltéréseket szeretnénk volna felmérni.
2. Célunk volt még, hogy a hagyományosan kezelt Crohn-betegek mellett, az infliximab kezelés hatását is megítéljük a kalcium beáramlás kinetikára.
3. Szerettük volna továbbá a fent nevezett vizsgálatokat T sejt szubpopuláció szinten mérni, így nem csupán a lymphociták jelét detektálni, de a Th1, Th2, Tc sejtek jelváltozását szimultán mérni.
4. Szerettük volna tesztelni a korábbi vizsgálatainkban ígéretesnek tűnő kálium csatorna gátló szereket, a margatoxint és a TRAM-34-et az esetleges kalcium beáramlás kinetika módosítása szempontjából.
5. Szerettük volna mérni az egyes szubpopulációk Kv1.3 csatorna expresszióját is.
6. Munkánk második részében arra voltunk kíváncsiak, hogy egyszerre négy szubpopuláció mérése is lehetséges-e úgy, hogy közben a kisebb, szofisztikáltabb változásokat továbbra is nyomon tudjuk követni a kinetikus mérések során. Ennek kapcsán célul tűztük ki, hogy a Th1, Th2, Th17 és Treg sejtek jelölésével, és kalcium szenzorral való feltöltésével, majd a sejtek stimulálásával detektáljuk a kalcium jelváltozást, és megítéljük a köztük esetlegesen fennálló különbségeket egészséges személyek perifériás vérmintáiban. Ezekből a mérésekből nem csak arra szeretnénk volna választ kapni, hogy a mérések lényegi elvesztés nélkül elvégezhetőek-e, hanem arra is, hogy a fent nevezett sejt populációk korai T sejt aktivációja során a kalcium beáramlásban tapasztalható-e különbség,

7. illetve hogy ennek kinetikája módosítható-e a korábbi vizsgálatokban is alkalmazott kálium csatorna gátlószerekkel.
8. Szerettük volna továbbá a négy szubpopuláció Kv1.3 csatorna expresszióját is mérni.

3 Módszerek

3.1 A Crohn-betegséggel kapcsolatos vizsgálat betegei

A vizsgálatba bevont betegek a SE I. számú Gyermekgyógyászati Klinika Gasztroenterológiai osztályáról vagy szakrendeléséről kerültek beválasztásra. A beválogatás során a klasszikus módszerekkel (endoszkópia, hisztopatológia, vérkép) diagnosztizált Crohn-beteg gyermekeket vontunk be. A colitis ulcerosa és egyéb, GIT-et érintő gyulladással/autoimmun eredetű diagnózissal rendelkezőket kizártuk a vizsgálatból. A klasszikusan kezelt Crohn-betegek csoportjába azon gyermekek kerültek, akiket azathioprin, 5-ASA, mesalazine kezelésben részesítettek, ugyanakkor szisztémás szteroidkezelést nem kaptak. A súlyos Crohn-betegek csoportjába azok kerültek, akik nem reagáltak a hagyományos kezelésre, PCDAI értékük >30 volt, és ezért inflixmab (Remicade®) indukció vált indokolttá esetükben. Ezen betegek első kezelés előtti, illetve 4. kezelés utáni mintáit elemeztük. Kontrollmintaként azonos kor és nem megoszlású gyermekeket választottunk, akik aspecifikus panaszokkal jelentkeztek a szakrendelésen, de gyulladással elváltozás nem igazolódott a kivizsgálások során. A beválogatás kritériumainak való megfelelést minden esetben gyermekgasztroenterológus ellenőrizte, csakúgy, mint a perifériás vérminták begyűjtését is.

3.2 A Th17-es vizsgálat alanyai

A 4 T sejt szubpopuláció vizsgálatához 14 egészséges, felnőtt alanyt (6 férfi, 8 nő, átlag életkor: 23,9) válogattunk be, tekintettel arra, hogy újabb gyermekminták beszerzése nem lett volna indokolt, hiszen az adott sejtszoportok felnőtt, perifériás vérmintákban ugyanúgy jelölhetőek és vizsgálhatóak, ugyanakkor a mintavétel jóval kisebb „traumát” jelent a felnőtt alanyoknak. A betegek személyes ismeretségi körből, önkéntes jelentkezés alapján kerültek kiválasztásra. Csak olyan egyénektől gyűjtöttünk mintát, akiknél gyulladással vagy egyéb, immunmediált folyamat nem merült fel.

3.3 A perifériás vérminták begyűjtésének módszertana

A mintavétel során a betegek/alanyok könyök/karvénájából a rutin eljárások szerint 2x 9ml vért gyűjtöttünk Na-heparinos csövekbe (BD Vacutainer, BD Biosciences, San Diego, CA, USA). A minták feldolgozása valamennyi esetben 8 órán belül megtörtént. A feldolgozásig hűtés nem történt. Az alanyok kiválasztásakor, a minták gyűjtésekor és feldolgozásakor a Helsinkii Deklaráció legújabb módosításaiban foglaltak szerint jártunk el.

3.4 A Crohn-betegek kalcium beáramlás kinetikáját mérő protokollja

A perifériás vért Ficoll-ra (Ficoll Paque, Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden) rétegeztük, majd 400 x g-n, 27 percig centrifugáltuk. Ezáltal standard sűrűség grádiens elválasztást alkalmaztunk. Az így szétvált perifériás vér mononukleáris sejtréteget (PBMC) óvatosan leválasztottuk, majd két ismétlésben PBS-el (2 mM KH_2PO_4 , 9.5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 136.7 mM NaCl) 7 percig centrifugálva, kimostuk a sejtek közül a Ficoll maradékát. Ezt követően a pelletet módosított RPMI-1640-es médiummal (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) reszuszpendáltuk. Az RPMI-1640 médium kalcium koncentrációját kristályos CaCl_2 hozzáadásával 2 mM-ra állítottuk, hogy a fiziológias viszonyoknak megfelelő körülményeket biztosítsunk a sejtek számára.

A sejtszuspenziót négy részre osztottuk az alábbiak szerint:

- 650 μl -Kontroll cső, nem tartalmazott gátlószert
- 650 μl -TR cső, 240 nM TRAM-34-et (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) adtunk hozzá később
- 650 μl -MG cső, 4 nM margatoxint (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) adtunk hozzá később, illetve
- 100 μl -VD cső, anti-Kv1.3 FITC-csatorna antitestet adtuk hozzá később.

Valamennyi csőhöz hozzáadtuk az alábbi sejtfelszíni jelöléshez szükséges fluorofórokkal konjugált antitesteket: anti-CD4 PE-Cy7 (BioLegend, San Diego, CA, USA), anti-CD8 APC-Cy7 (BioLegend,

San Diego, CA, USA), anti-CXCR3 APC (BioLegend, San Diego, CA, USA), anti-CCR4 PE (BD Biosciences). A VD csőhöz anti-Kv1.3 FITC poliklonális antitestet (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) adtunk.

Ezt követően a mintákat 30 percig sötétben inkubáltuk 24^oC-on, majd a nem kötődött antitestek eltávolítása céljából 7 percig centrifugáltuk, majd módosított RPMI-1640-es médiumban reszuszpendáltuk a sejteket és hozzáadtuk az i.c. kalcium detektálására szolgáló festékkeveréket. A kalciumjel mérésére 1:2 arányú Fluo-3 AM : Fura Red (Biotium, Hayward, CA, USA) keveréket és 0.02%-os Pluronic F127 szurfaktánt (Molecular Probes, Karlsbad, CA, USA) alkalmaztunk. A két kalcium szenzor egyidejű alkalmazása azért előnyös, mert míg a kalcium kötés hatására a Fluo-3 fluoreszcenciája nő, addig a Fura Red-é csökken, így az aránymérés megvalósítható. Ha a két szenzor jelarányát detektáljuk, akkor pedig az olyan apró különbségek, melyek a sejtek eltérő alap kalciumszintjéből, alap fluoreszcenciaszintjéből vagy a sejtek szenzorral való feltöltésének különbségből adódnak, csökkenthetőek.

A mintákat a keverék hozzáadásától számítva 30^oC-on 20 percig sötétben inkubáltuk.

Ezt követően 7 percig centrifugáltuk a mintákat, majd a sejteket módosított RPMI-1640 médiumban vettük fel, mely egyben a mérési médiumot is jelentette. Az egyes gátlószereket 15 (MgTX) és 10 (TRAM-34) perccel az adott minta mérését megelőzően adtuk hozzá a csövekhez.

A mérések során a 2 perc alapvonalat rögzítettünk, majd 20 µl 1mg/ml es phytohemagglutinin (PHA)-t adtunk a mintához és azonnal folytattuk a jeldetektálást 15 percig. A PHA egy lektin, mely a TCR keresztkötésén keresztül váltja ki a sejtaktivációt.

A kálium csatorna expresszió mérése során nem kinetikus mérést végeztünk. Egységesen 500.000 sejt detektálása történt meg az ehhez szükséges időtől függetlenül.

3.5 A T helper szubpopulációk mérésének protokollja

Ezen protokoll esetében a mononukleáris sejtek izolálása és a sejtuszuspenzióba vitel, szétosztás a fent leírt módon történt.

A sejtfelszíni festés során az alábbi fluorofórokkal konjugált antitesteket alkalmaztuk:

anti-CD4 PE-Cy (BioLegend, San Diego, CA, USA), anti-CD25 APC-Cy7 (BioLegend, San Diego, CA, USA), anti-CXCR3 APC (BioLegend, San Diego, CA, USA), anti-CCR4 PE (BD Biosciences), anti-CCR6 PerCP (BD Biosciences).

A mintákat 30 percig sötétben inkubáltuk 24°C-on, majd a nem kötődött antitestek eltávolítása céljából 7 percig centrifugáltuk a mintákat, ezt követően pedig módosított RPMI-1640-es médiumban reszuspendáltuk a sejteket és hozzáadtuk az i.c. kalcium detektálására szolgáló festéket. Ezen vizsgálat esetében az egyidejűleg alkalmazott nagyszámú fluorofór miatt nem volt lehetőségünk a korábban leírt Fluo3 – Fura Red keveréket alkalmazni, csupán a Fluo-3 AM festéket 0.02% Pluronic F127-jelenlétében.

A kalcium indikátor hozzáadását követően 30°C-on 20 percig sötétben inkubáltuk a mintákat, majd ismét centrifugáltuk azokat 7 percig. Ezt követően a sejteket módosított RPMI-1640 médiumban vettük fel, mely egyben a mérési médiumot is jelentette. Az egyes gátlószereket a korábban már ismertettek szerint, 15 illetve 10 perccel a mérés előtt adtuk hozzá a megfelelő mintákhoz.

3.6 Az adatok értékelése

Az adatok értékelésére a kinetikus mérések során a munkacsoportunk által korábban kidolgozott, és több korábbi vizsgálat során sikeresen alkalmazott algoritmust, a FACSKin software-t alkalmaztuk. Ez az alkalmazás az időt, mint mérési paramétert is figyelembe veszi, és a kiválasztott paraméter (jelen esetben az i.c. kalcium szint) értékeire az idő függvényében illeszt különböző függvényeket. Ezek közül a függvények közül (konstans, logistic+, logistic-, double logistic+, double logistic-) az F-teszt segítségével kiválaszthatjuk azt, amelyik a legjobban illeszkedik a

mérési adatokra. Ezután a kiválasztott függvény paramétereinek felhasználásával, a klasszikus statisztikai próbák segítségével az egyes mintacsoportok objektíven összehasonlíthatók. Az algoritmus egyik előnye, hogy a kinteikus paraméterek esetén is képes eloszlást számolni az egyes mérések esetében. A Crohn-betegek adatainak esetében a double logistic+ függvényt alkalmaztuk az adatelemzésre. A négy T sejt szubpopuláció szimultán vizsgálat esetében a logistic+ függvényt alkalmaztuk. Az eltérő függvényhasználat oka abban rejlik, hogy az F-teszt az egyes vizsgálatok esetén ezeket találta a legjobban illeszkedőnek. Ennek oka lehet a kalcium indikátor(ok) eltérő alkalmazása.

3.7 A statisztikai elemzések módszertana

A statisztikai elemzésekkor az adatok normalitásának vizsgálatára a Kolmogorov-Smirnov tesztet alkalmaztuk. Mivel adataink nem követték a Gaussi eloszlást, így nem paraméteres statisztikai próbákat használtunk. A gyermekkori Crohn-betegség kalcium beáramlás kinetikai vizsgálatának paraméterenkénti eredményeit csoportonként szubpopulációs szinten a Kruskal-Wallis teszttel hasonlítottuk össze. A gátlószerek hatásának megítélésére Wilcoxon próbát alkalmaztuk. A Kv1.3 expresszió eredményeinek összehasonlítására a Mann-Whitney U-próbát alkalmaztuk. A korrelációs vizsgálatokra a Spearman rangkorrelációs tesztet használtuk. A T sejt szubpopulációs vizsgálatok eredményeit paraméterenként, az egyes szubpopulációk között a Mann-Whitney U-próbával hasonlítottuk össze. A gátlószerek hatásának megítélésére Wilcoxon próbát alkalmaztuk. A Kv1.3 expresszió eredményeinek összehasonlítására a Mann-Whitney U-próbát alkalmaztuk. Valamennyi statisztikai elemzést 5%-os szignifikancia szinten elemeztünk a GraphPad Prism 5.0 Software segítségével (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA 92037 USA).

4 Eredmények

4.1 A gyermekkori Crohn-betegséggel kapcsolatos vizsgálatok eredményei

4.1.1 *A vizsgált sejtpopulációk megoszlásával kapcsolatos eredmények*

A vizsgálatok során értékelt adatok alapján a Tc, Th1 és Th2 sejtek limfocitákon belüli %-os megoszlása sem egymáshoz képest, sem az egyes csoportok között nem mutat szignifikáns eltérést. Ugyanakkor az adatok alapján látható, hogy míg az egészséges kontroll és a hagyományosan kezelt csoportok között csak minimális eltérés van, és ugyanez igaz a hagyományosan kezelt és első IFX-kezelés előtti csoportra is, addig az első előtti és a negyedik IFX-kezelés utáni csoportok között a Th1 és Th2 sejtcsoportok százalékos megoszlása jelentősen eltér. Mindkét szubpopuláció esetében a negyedik IFX-kezelés utáni adatok a magasabbak. Ha a Th1/Th2 arányt vizsgáljuk, akkor jól látható, hogy a betegcsoportok az egészséges kontroll alanyokhoz képest jelentősen magasabb értéket mutatnak. Ez döntően a Th1-es sejtek számának emelkedéséből adódik. Érdekes módon az aránypár nem mutat további emelkedést az IFX-kezelés előtti minták esetében, illetve az indukciós kezelés sem mérsékli azt.

4.1.2 *A kalcium beáramlás kinetikával kapcsolatos eredmények*

Eredményeink alapján az egészséges, kontroll alanyok gátlószermentes mintáiban az egyes mérési paraméterek esetében szignifikáns különbség nem mutatható ki a vizsgált T sejt szubpopulációk között. Ez azt jelenti, hogy az aktiválás előtti, nyugvó állapotú sejtek i.c. kalcium szintje azonos a cytotoxikus, Th1 és Th2 sejtekben, ahogyan azt a Starting value értékek is mutatják. Az aktiváció hatására kiváltott kalcium influx által előidézett csúcskoncentráció (Maximum value) szintén nem különbözik lényegesen a 3 szubpopuláció között. Az

időbeni változások minőségére leginkább utaló két paraméter, a Time to reach maximum és a Slope érték sem mutat szignifikáns differenciát, tehát a kalcium beáramlás időbeni lefutása is hasonló az egyes sejtek között. Az AUC érték, mely a mérési idő alatt detektált teljes kalcium mennyiséget reprezentálja, szintén hasonló volt a szubpopulációk között, így a sejtek által, a korai aktiváció során beáramló kalcium mennyiség is egységesnek tekinthető.

A MgTX és TRAM-34 kezelés hatása ezen paraméterekre nem volt jelentős. A cytotoxikus sejtek esetében egyáltalán nem volt szignifikáns különbség kimutatható, míg a MgTX hatására a Th2 sejtek Slope értékei enyhe csökkenést mutattak. A TRAM-34 által történő kálium csatorna gátlás a Th1-es sejtekben a Start- és AUC értékeket csökkentette, míg a Th2-es sejtekben a MgTX-kezeléshez hasonlóan, a Slope értékek csökkentek. Ezek a különbségek azonban a később ismertetésre kerülő, betegcsoportokban kiváltott módosításhoz képest elhanyagolhatóak.

A hagyományosan kezelt Crohn-beteg alanyok gátlószermentes mintáiban jelentős eltérés igazolódott, mind az egyes szubpopulációk között, mind az egészséges, kontroll alanyok értékeihez képest. Bár a Tc és Th1 sejtek értékei nem változtak szignifikánsan, a Th2 sejtek Starting, Maximum és AUC értékei a Tc sejtekhez képest szignifikánsan magasabbnak bizonyultak. A Maximum és AUC értékek a Th1-es sejtekhez képest is szignifikánsan magasabbnak bizonyultak, míg a Starting, Slope és AUC értékek az egészséges, kontroll alanyokhoz képest voltak szignifikánsan magasabbak, ezzel a Th2 funkcionális predominanciát sejtetve. A kálium csatorna gátló kezelések hatására a Th2 sejtekben megfigyelt fokozott kalcium beáramlás jelentősen mérséklődött, az egészséges, kontroll alanyok szintjének közelébe csökkentve az értékeket. A MgTX általi gátlás a Time to reach maximum paramétert leszámítva valamennyi, míg a TRAM-34 kezelés az összes vizsgált paraméter esetében szignifikáns csökkenést eredményezett. A gátlás szelektivitására utal, hogy a betegégtől kevesebbet érintett Tc és Th1 szubpopulációk értékeit nem módosították lényegesen a vizsgált farmakonok.

A hagyományos kezelésre nem reagáló, első IFX-kezelés előtt álló betegek gátlószer mentes mintáiban azt tapasztaltuk, hogy a Tc és Th1 sejtek kalcium beáramlás kinetikai paraméterei továbbra sem változtak lényegesen az egészséges, kontroll alanyokban mért értékekhez képest, illetve a hagyományos kezelésre reagáló betegekben tapasztalt értékekhez képest sem. Ezzel szemben a Th2 sejtek esetében szinte valamennyi paraméter szignifikánsan magasabb értéket mutatott a Tc és Th1 sejtekhez képest. Ezzel gyakorlatilag igazolódott az a fokozott Th2 sejt működés, mely a hagyományosan kezelt betegcsoportra is jellemző volt. A betegség súlyosságának növekedésével azonban a mért értékek itt is magasabbak voltak (hagyományosan kezelt csoport AUC: 338 vs. Első IFX-kezelés előtti csoport AUC: 709).

Ezt a kiugróan magas kalcium beáramlás kinetikát a gátlószeresek – a MgTX és TRAM-34 kezelés egyaránt – szignifikánsan csökkentették. Ennek hatására a szubpopulációk közötti különbség a gátlószeres alkalmazását követően már nem volt igazolható.

A negyedik IFX-kezelést követő minták esetében azt tapasztaltuk, hogy az indukció hatására a korábban emelkedett kalcium beáramlás kinetikai paraméter értékek normalizálódtak, így a továbbiakban a szubpopulációk között szignifikáns különbséget nem tudtunk igazolni. A MgTX és TRAM-34 kezelés ezen minták esetében további lényeges csökkenést nem tudott kiváltani, egyedül a TRAM-34 kezelés csökkentette a Time to reach maximum értékeket a Th1 és Th2 sejtekben, ugyanakkor a különbség a korábban ismertetett változásokhoz képest minimálisnak mondható.

4.1.3 A Kv1.3-csatorna expresszió mérésének eredményei

Mérési eredményeink alapján látható, hogy az egészséges, kontroll alanyok mintáiban a T sejt szubpopulációk között nem volt kimutatható szignifikáns különbség a Kv1.3-csatorna expressziójában. A hagyományosan kezelt Crohn-betegek esetében szignifikánsan magasabb expressziót mértünk a Th2 sejtek felszínén, mely a kálium csatorna fokozott szerepére utal ezen kórképben.

A hagyományos terápiára nem reagáló betegek esetében szintén sokkal magasabb értékeket mértünk a Th2 sejteken, ugyanakkor a mintánkénti nagy variabilitás miatt itt statisztikai különbséget nem tudtunk igazolni. Az azonban látható, hogy a negyedik IFX-kezelés igen jelentősen csökkentette ezen értéket- gyakorlatilag a harmadára mérsékelte a Kv1.3 expressziót.

4.2 A négy fő, T helper szubpopuláció szimultán vizsgálatának lehetőségét vizsgáló kutatás eredményei

4.2.1 *A vizsgált sejtpopulációk megoszlásával kapcsolatos eredmények*

A négy szubpopuláció egészséges alanyokból mért, CD4+ sejteken belüli megoszlása jelentős eltéréseket mutat. A legkisebb, 4.7%-os értéket a Th17-es, míg a legmagasabb, 27.2%-os prevalenciát a Th2 sejtek mutatják. A Th1, Th17 és Treg sejtek is szignifikánsan alacsonyabb mennyiségben vannak jelen, mint a Th2 sejtek.

4.2.2 *A kalcium beáramlás kinetikai paramétereinek eredményei*

A szubpopuláció szintű mérési eredményeink alapján látható, hogy bár az alap kalcium szinteket vizsgálva a négy T sejt típus között szignifikáns különbség nem volt kimutatható, a Th17-es sejtek mutatták a legalacsonyabb értéket. Az AUC értékek esetében a Th1-es sejtekhez képest, a Th2, Th17 és Treg sejtek mind szignifikánsan alacsonyabb össz kalcium értékeket vettek fel a mérések 15 perce során. Az end érték, mely a mérések végén detektált kalcium koncentrációt reprezentálja szintén a Th1-es sejtek esetében a legmagasabb. Érdekes módon a Time to reach 50% value érték azonban nem a Th1-es, hanem a regulátoros T sejtek esetében volt a legmagasabb, így tehát ezen sejteknek tart a legtovább, hogy a maximális kalcium c.c. érték felét elérjék.

A kálium csatorna gátlószerek alkalmazásával jelentős változásokat sikerült elérnünk. A Th1-es sejtekben a MgTX és a TRAM-34 egyaránt szignifikánsan csökkentette az AUC értékeket. A Th2 sejtekben a TRAM-34 kevésbé mutatott erőteljes hatást, ellenben a MgTX az AUC és End értékeket is szignifikánsan csökkentette.

A Th17-es szubpopulációban mindkét káliumcsatorna gátlószer szignifikánsan csökkentette az AUC és End paramétereket a gátlószermentes, kontroll mintákhoz képest. A regulátoros T sejtek esetében egyedül a MgTX volt képes csökkenteni és csak az End értéket.

4.2.3 A Kv1.3-csatorna expresszió mérésének eredményei

Jelentős különbség mutatkozott a 4 szubpopuláció káliumcsatorna expressziójában. A legkisebb mértékben a Th1-es sejtek expresszálták, míg leginkább a Th17-es sejtek felszínén gyakori ez a csatorna. Valamennyi szubpopuláció szignifikánsan magasabb értékeket mutat, mint a Th1-es sejtek.

5 Következtetések

1. A gyermekkori Crohn-betegségben a periférián emelkedett Th1 sejtmennyiség mutatkozik meg.
2. A gyermekkori Crohn-betegségben a perifériás Th2 sejtek korai aktivációja során fokozott kalcium beáramlás figyelhető meg a Tc és Th1 sejtekhez képest.
3. A margatoxin és TRAM-34 káliumcsatorna gátlószerek *in vitro* hatékonyan és szelektíven képesek csökkenteni a Th2 sejtek gyermekkori Crohn-betegségben tapasztalható fokozott aktivitását.
4. Az infliximab kezelés hat a fokozott korai T sejtaktivációt mutató perifériás Th2 sejtekre.
5. Az infliximab által normalizált Th2 kalcium beáramlás kinetikát a margatoxin és a TRAM-34 már nem képes tovább módosítani.
6. A Kv1.3 csatorna megváltozott expressziója legalább részben felelős lehet a gyermekkori Crohn-betegségben kapcsán megfigyelt módosult korai T sejt aktivációért.
7. Egészséges felnőttekben a Th1, Th2, Th17 és Treg sejtek kalcium beáramlás kinetikája jelentősen eltér.
8. Egészséges felnőttek Th1, Th2, Th17 és Treg sejeiben a káliumcsatornák jelentősége eltér.
9. Az általunk beállított módszer segítségével a Th1, Th2, Th17 és Treg sejtek aktivációjának szimultán kinetikus mérése megoldható a köztük lévő kis különbségek kimutatására való képesség elvesztése nélkül.

6 Saját publikációk jegyzéke

Az értekezéshez kapcsolódó közlemények

Összesített impakt faktor: 10.419.

1. Orbán C, Szabó D, Bajnok A, Vásárhelyi B, Tulassay T, Arató A, Veres G, Toldi G. (2016) Altered calcium influx of peripheral Th2 cells in pediatric Crohn's disease: infliximab may normalize activation patterns. *Oncotarget*, 7: 44966-44974. **IF: 5.008**
2. Orbán C, Szabó D, Bajnok A, Vásárhelyi B, Tulassay T, Arató A, Veres G, Toldi G. (2017) Altered activation of peripheral CD8+ T cells in pediatric Crohn's disease. *Immunol Lett*, 185: 48-51. **IF: 2.483**
3. Orbán C, Bajnok A, Vasarhelyi B, Tulassay T, Toldi G. (2014) Different calcium influx characteristics upon Kv1.3 and IKCa1 potassium channel inhibition in T helper subsets. *Cytometry Part A*, 85: 636-641. **IF: 2.928**
4. Orbán C, Biro E, Grozdics E, Bajnok A, Toldi G. (2013) Modulation of T lymphocyte calcium influx patterns via the inhibition of Kv1.3 and IKCa1 potassium channels in autoimmune disorders. *Frontiers In Immunology* 4: 3.

Az értekezéshez nem kapcsolódó közlemények

Összesített impakt faktor: 18.859, első szerzőként: 3.181.

1. Legány N, Toldi G, Orbán C, Megyes N, Bajnok A, Balog A. Calcium influx kinetics, and the features of potassium channels of peripheral lymphocytes in primary Sjögren's syndrome. (2106) *Immunobiology* 221:1266-1272. **IF:2.781**
2. Orban C, Perez-Garcia E, Bajnok A, McBean G, Toldi G, Blanco-Fernandez A. Real time kinetic flow cytometry measurements of cellular parameter changes evoked by nanosecond pulsed electric field. (2016) *Cytometry Part A* 89:472-479. **IF: 3.181**

3. Meszaros G, Orbán C, Kaposi A, Toldi G, Gyarmati B, Tulassay T, Vasarhelyi B. Altered mitochondrial response to activation of T-cells in neonate. (2015) Acta Physiologica Hungarica 102:216-227. **IF:0.734**
4. Toldi G, Vásárhelyi ZE, Rigó J Jr, Orbán C, Tamássy Z, Bajnok A, Shima T, Saito S, Molvarec A. Prevalence of Regulatory T-Cell Subtypes in Preeclampsia. (2015) American Journal Of Reproductive Immunology 74:110-115. **IF:2.916**
5. Csambalik L, Divéky-Ertsey A, Pap Z, Orbán C, Stégerné Máté M, Gere A, Stefanovits-Bányai É, Sipos L. Coherences of Instrumental and Sensory Characteristics: Case Study on Cherry Tomatoes. (2014) Journal Of Food Science 79:C2192-C2202. **IF:1.649**
6. Sipos L, Bernhardt B, Gere A, Komáromi B, Orbán C, Bernáth J, Szabó K. Multicriteria optimization to evaluate the performance of Ocimum basilicum L. varieties. (2016) Industrial Crops and Products 94:514-519 **IF:3.449**
7. Folyovich A, Biro E, Orbán C, Bajnok A, Varga V, Beres-Molnar AK, Vasarhelyi B, Toldi G. Relevance of novel inflammatory markers in stroke-induced immunosuppression. (2014) BMC Neurology 14:41. **IF:1.961**
8. Folyovich A, Biró E, Orbán C, Bajnok A, Vásárhelyi B, Toldi G. Kv1.3 lymphocyte potassium channel inhibition as a potential novel therapeutic target in acute ischemic stroke. (2014) CNS & Neurological Disorders-Drug Targets 13:801-806. **IF:2.188**
9. Orbán C, Füstös Z, Gilinger PM. Changes in the quality of sweet pepper types during the post-harvest ripening. (2011) Journal On Processing And Energy In Agriculture.15:109-112.
10. Orbán C, Gilingerné PM. A C-vitamin tartalom és a peroxidáz enzim aktivitásának változása különböző típusú és érettségi stádiumú paprikákban a tárolás során. (2001-) Új Diéta: A Magyar Dietetikusok Lapja 18:13-15.
11. Orbán C, Csajbókné CÉ, Hegedüs N, Lichthammer A. A fehér káposzta C-vitamin-tartalmának és peroxidáz enzimformáinak aktivitásváltozása a tárolás során (2013) Új Diéta: A Magyar Dietetikusok Lapja 22:25-27.
12. Orbán C, Csajbókné CÉ, Bacsó Á, Dobronszki A. Különböző csíranövények antioxidáns aktivitásának meghatározása (2013) Új Diéta: A Magyar Dietetikusok Lapja 22: 4-5.

13. Bernhardt B, Gilingerné Pankotai M, Komsa L, Ladányi M, Orbán C, Ruttner K, Szabó K, Bernáth J. Különböző eredetű *Ocimum basilicum* L. fajták produkciójának és beltartalmának összehasonlító elemzése. (2013) Kertgazdaság: A Kertészeti És Élelmiszeripari Egyetem A Magyar Kertészeti Tanács És A Magyar Kertészeti Tudományos Társaság Szakfolyóirata 45:66-74.
14. Larnsak L, Káposztás L, Veresné BM, Lichthammer A, Orbán C. Vörösszőlőmag és származékai az egészség szolgálatában. (2014) Új Diéta: A Magyar Dietetikusok Lapja 23:28-31.
15. Csambalik L, Divéky-Ertsey A, Ladányi M, Orbán C. Influence of abiotic disorders on nutritional values of tomato (*solanum lycopersicum*). (2014) Review Of Faculty Of Engineering Analecta Technica Szegedinensia 2014:online.
16. Orbán C, Csajbókné CÉ, Dobronszki A. Az uborka (*Cucumis sativus*) érése során bekövetkező beltartalmi értékváltozások. (2014) Élelmiszervizsgálati Közlemények 60:81-85.
17. Veresné BM, Lichthammer A, Orbán C, Tátrai-Németh K. A szarvashús étrendbe illesztésének új lehetőségei. (2014) Acta Agraria Kaposváriensis 18:87-95.
18. Veresné BM, Lichthammer A, Orbán C, Tátrai-Németh K. Vadhús a közétkeztetésben (2014) Élelmezés 18:26-27.
19. Tőreki K, Koren D, Hatvany Z, Szabó A, Orbán C. Új vizeken. A gomba táplálkozástudományi szerepe. (2015) Élelmezés 12:36-37.
20. Orbán C, Horváth KK, Mák E, Lichthammer A, Veresné BM. Distinct capability of some fats on unsaturated fatty acid and antioxidant enrichment of foods for ketogenic diet purpose. (2016) PharmaNutrition 4:39-44.
21. Orbán C, Horváth KK, Mák E, Lichthammer A, Veresné BM, Tátrai-Németh K. A ketogén diéta hatásmechanizmusa epilepsziában és a további, dietetikai szempontú kutatások lehetséges irányvonalai. (2016) Új Diéta: A Magyar Dietetikusok Lapja 25:31-34.

22. Lichthammer A, Nagy B, Orbán C, Tóth T, Csajbók R, Molnár S, Tátrai-Németh K, Veresné BM. A comparative study of eating habits, calcium and vitamin D intakes in the population of Central-Eastern European Countries. (2015) *New Medicine* 19:66-70.
23. Nagy B, Lichthammer A, Csajbók R, Molnár S, Orbán C, Tátrai-Németh K, Veresné BM. A közép-kelet-európai országok táplálkozási szokásainak, valamint a lakosság kalcium- és D-vitamin-felvételének összehasonlító vizsgálata. (2015) *Új Diéta: A Magyar Dietetikusok Lapja* 24: 27-29.
24. Orbán C, ÉC Csajbók, N Hegedüs, P Borbély. Alteration of peroxidase-activity, chlorophyll content and antioxidant-capacity of corn salad (*Valerianella locusta*) during storage. (2015) *Biotechnology: An Indian Journal* 11: 66-70.
25. Csajbók-Csobod É, Biró B, Hatvany Z, Hegedüs N, Orbán C, Lichthammer A, Tátrai-Németh K. Effects of storage conditions on peroxidase isoenzyme-activities, antioxidant-capacity and chlorophyll-content of white cabbage. (2016) *Biotechnology: An Indian Journal* 12:53-58.