A rövidtávú limfocita aktiváció vizsgálata áramlási citometriával

Doktori tézisek

Dr. Toldi Gergely

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Témavezető:
Dr. Vásárhelyi Barna, PhD, DSc, egyetemi docens

Hivatalos bírálók:
Dr. Andrikovics Hajnalka, PhD, tudományos főmunkatárs
Dr. Cervenak László, PhD, tudományos főmunkatárs

Szigorlati bizottság elnöke:
Dr. Szabó András, PhD, DSc, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:
Dr. Nagy Gyula Richárd, PhD, egyetemi tanársegéd
Dr. Somogyvári Zsolt, PhD, szakmai vezető

Budapest, 2012.

1. BEVEZETÉS

A T limfociták rövidtávú aktivációja döntő jelentőségű az immunválasz hatékonyságának szabályozásában. Ezek a sejtek fontos szerepet játszanak az autoimmun kórképek pathogenezisében is. A rövidtávú limfocita aktiváció kinetikájának vizsgálata ezért nélkülözhetetlen az immunstátusz jellemzésében mind fiziológiás körülmények között, mind autoimmun betegségekben. Az áramlási citometria az egyik legelterjedtebb vizsgálóeljárás az immunológiai kutatások terén. Ez a nagy áteresztőképességű, széles körben használt vizsgálati módszer azonban ezidáig nem volt megbízhatóan alkalmazható kinetikus mérések végzésére, időben változó folyamatok pontos nyomon követésére. A mérések elemzése ugyanis nem volt kellőképpen objektív, ami megnehezítette az eredmények statisztikai értékelését.

Kutatócsoportunk évek óta dolgozik egy olyan eljárás fejlesztésén, mely lehetőséget nyújt a kinetikus áramlási citométeres mérések matematikai alapú, objektív, megbízható értékelésére. Módszerünk lényege, hogy áramlási citométerrel legalább tíz percen keresztül követjük nyomon egy adott folyamat kinetikus változását a vizsgált sejtekben. Ezt követően a folyamatot leíró fluoreszcens jelekre FacsKin elnevezésű szoftverünk (www.facskin.com) előre meghatározott matematikai függvények sorozatát illeszti, melyeknek adott paramétereit is kiszámítja. Az egyes különálló mérések ezen értékei így egymással összehasonlíthatóakká válnak.

Az elmúlt években kidolgozott eljárásunkat sikerrel alkalmaztuk sejtélettani vizsgálatok során, továbbá különböző, a T limfociták aktivációját érintő megfigyeléseink elemzésére újszülöttkorban, terhességben, preeclampsiában, sclerosis multiplexben, valamint 1-es típusú diabetesben. Behatóan tanulmányoztuk továbbá a limfociták kálium csatornáinak a sejtaktiváció folyamatában betöltött szerepét is. Értekezésemben ennek kapcsán nyert eredményeinket ismertetem.

2. CÉLKITŰZÉS

Vizsgálataink során célunk volt, hogy kinetikus áramlási citométeres módszerünket alkalmazva jellemezzük a Th1 és Th2 sejtek kalcium háztartásának szabályozásában fennálló különbségeket. Célul tűztük ki, hogy gátlószerek segítségével vizsgáljuk az endolplazmás retikulum (ER) kalcium ürítésének, a calcium release activated calcium (CRAC) csatornáknak, valamint a mitokondriális kalcium uniporter (MCU), a szarko/endoplazmás retikulum kalcium ATPáz (SERCA) és a plazmamembrán kalcium ATPáz (PMCA) transzport mechanizmusoknak a szerepét a citoplazmatikus szabad kalcium szint ($[Ca^{2+}]_{cyt}$) szabályozásában a limfocita aktiváció korai szakasza (első 10 perce) során Th1 és Th2 limfocitákban.

Ezen túlmenően célul tűztük ki, hogy jellemezzük az aktiváció által kiváltott kalcium beáramlás kinetikáját a főbb limfocita alcsoportokban (így a Th1, Th2, CD4, CD8 sejtekben) újszülöttekben, egészséges várandósokban, preeclampsiában, sclerosis multiplexben, valamint 1-es típusú diabetesben, egészséges, nem terhes felnőttekhezhez hasonlítva. Célunk volt továbbá leírni azokat a változásokat, melyeket a Kv1.3 illetve IKCa1 limfocita kálium csatornák szelektív gátlása hoz létre a limfocita aktiváció kinetikájában.

3. ALANYOK ÉS MÓDSZER

3.1. A VIZSGÁLATOK ALANYAI

A Th1 és Th2 sejtek kalcium háztartásának szabályozását leíró vizsgálatunkhoz 10 egészséges önkéntestől vettünk perifériás vérmintát (5 nőtől és 5 férfitől, életkor: 24 [23–25] év (medián [tartomány])).

Az újszülöttek limfocitáinak aktivációs tulajdonságait jellemző vizsgálatunkhoz 9 egészséges felnőttől (5 nőtől és 4 férfitől, életkor: 27 [24–52] év (medián [tartomány])) vettünk perifériás vérmintát, és 9 érett, egészséges újszülöttől (4 lánytól és 5 fiútól, gesztációs kor: 40 [38–41] hét (medián [tartomány])) gyűjtöttünk köldökzsinórvért közvetlenül per vias naturales szülés után.

Az egészséges várandósok és preeclampsiás (PE) betegek limfocitáinak aktivációs tulajdonságait jellemző vizsgálatunkhoz 9 egészséges nem várandós asszonytól (életkor: 30 [25–33] év (medián [tartomány])), 9 egészséges várandóstól (életkor: 35,5 [34–37] év (medián [tartomány])), valamint 9 PE-s betegől (életkor: 32 [27–35] év (medián [tartomány])) vettünk perifériás vérmintát. A fertilis, nem várandós nők esetében a vérvétel a menstruációs ciklus luteális fázisában történt. A PE-s betegek a kórkép klinikailag enyhe formáját mutatták. A PE diagnozisát nemzetközi standard kritériumok alapján állították fel.

Sclerosis multiplexben (SM) végzett vizsgálatainkhoz 10 egészséges önkéntestől (6 nőtől és 4 férfitől, életkor: 35 [23–44] év (medián [tartomány])), valamint 11 olyan SM-ben szenvedő betegtől (7 nőtől és 4 férfitől, életkor: 44 [24–51] év (medián [tartomány])) vettünk perifériás vérmintát, akik a kórkép relapszáló-remittáló formáját mutatták és csupán tüneti kezelésben részesültek, immunmoduláns terápiát azonban nem kaptak. A vizsgálatban részt vett továbbá 6 olyan, relapszáló-remittáló SM-ben szenvedő beteg (4 nő és 2 férfi, életkor: 39 [32–56] év (medián [tartomány])), aki átlagos dózisú interferon (IFN) béta kezelésben részesül (vagy IFN béta-1a, heti 30 μg im. injekció formájában (Avonex®), vagy IFN béta-1a, heti háromszori 44 μg sc. injekció formájában (Rebif®), vagy IFN béta-1b, másnaponkénti 250 μg sc. injekció formájában (Betaferon®)). A SM diagnózisát nemzetközi standard kritériumok alapján állították fel, és vérvételkor mindannyian remisszióban voltak. A mintagyűjtés előtti

legutolsó IFN béta kezelés óta legalább 24 óra telt el a vérvételig. Az egészséges személyek neurológiai anamnézise negatív volt, és részletes fizikális és neurológiai vizsgálat során státuszukat negatívnak találtuk. A SM-es betegek esetében más betegség nem állt fenn rutin laboratóriumi vizsgálat és fizikális betegvizsgálat alapján.

1-es típusú diabetesben (T1DM) végzett vizsgálatainkhoz 9 egészséges önkéntestől (4 nőtől és 5 férfitől, életkor: 27 [24–52] év (medián [tartomány])) és 9 T1DM-ben szenvedő betegtől (4 nőtől és 5 férfitől, életkor: 35 [27–55] év (medián [tartomány])) gyűjtöttünk perifériás vérmintát. A T1DM diagnózisát nemzetközi standard kritériumok alapján állították fel. Az egészséges személyek cukorháztartással kapcsolatos anamnézise negatív volt, és részletes fizikális vizsgálat során státuszukat negatívnak találtuk. T1DM-re specifikus autoantitestek vérmintáikból nem voltak kimutathatóak. A T1DM-es betegek esetében más betegség nem állt fenn rutin laboratóriumi vizsgálat és fizikális betegvizsgálat alapján. Minden résztvevő BMI és vérnyomás értéke a normál tartományba esett.

A vizsgálatokban résztvevő alanyoktól, illetve újszülöttek esetén a szülőktől a vérminták levétele előtt tájékozott beleegyezést kértünk és kaptunk. A vizsgálatokat a Helsinki Deklaráció előírásaival összhangban végeztük.

3.2. A MONONUKLEÁRIS SEJTEK IZOLÁLÁSA

A mononukleáris sejteket standard sűrűség grádiens centrifugálással (Ficoll Paque, Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden, 27 perc, 400 g, 22 °C) választottuk el 9 ml frissen, lithium heparinos csőbe (BD Vacutainer, BD Biosciences, San Diego, CA, USA) vett perifériás vénás vérből, illetve köldökzsinórvérből. Ezt a sejtszuszpenziót kétszer mostuk PBS-ben (phosphate buffer saline). A sejteket a továbbiakban a fluoreszcens markerekkel való jelölés, a gátlószerekkel való előkezelés és az áramlási citométeres mérés teljes ideje alatt módosított RPMI médiumban (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) tároltuk. A módosított RPMI kalcium koncentrációját kristályos $CaCl_2$ hozzáadásával 2 mM-osra állítottuk be. A Th1 és Th2 sejtek kalcium háztartásának szabályozását leíró vizsgálat esetében a sejtek egy részét a módosított RPMI médium helyett PBS-ben tároltuk.

3.3. A SEJTFELSZÍNI MARKEREK ÉS AZ INTRACELLULÁRIS KALCIUMSZINT MEGHATÁROZÁSA

A limfociták sejtpopulációját a Forward Scatter és a Side Scatter karakterisztika alapján különítettük el a mononukleáris sejtek közül az áramlási citométeres mérések során. A sejtfelszíni markerek festéséhez a mononukleáris sejteket 500 µl módosított RPMI-ben vagy PBS-ben szuszpendáltunk. A sejteket 30 percig, sötétben, szobahőmérsékleten inkubáltuk a következő konjugált anti-humán monoklonális antitestek kombinációjával a gyártó javaslatainak megfelelően: anti-CD4 phycoerythrin-Cy7, anti-CD8 allophycocyanin-Cy7, anti-CXCR3 allophycocyanin (a Th1 alpopuláció elkülönítésére), anti-CCR4 phycoerythrin (a Th2 alpopuláció elkülönítésére) (az összes PharMingen, San Diego, CA, USA), valamint külön mérés során anti-Kv1.3 channel FITC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). A Th1 és Th2 sejtek kalcium háztartásának szabályozását leíró vizsgálat esetében az alábbi sejtfelszíni monoklonális antitesteket használtuk: anti-CD4 allophycocyanin-Cy7 (BioLegend, San Diego, CA, USA), anti-CXCR3 allophycocyanin (PharMingen), and anti-CCR4 PerCP (BioLegend). A sejteket ezután mostuk.

A $[Ca^{2+}]_{cyt}$ monitorozásához Fluo-3 és Fura-Red festékeket tartalmazó keveréket adtunk a sejtszuszpenzióhoz. A Th1 és Th2 sejtek kalcium háztartásának szabályozását leíró vizsgálat esetében csupán Fluo-3 festéket használtunk. A keveréket a gyártó (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) ajánlása szerint készítettük: a festékeket 1:2 arányban Pluronic F-127-ben oldottunk. A sejteket 20 percig, sötétben, 30 °C-on inkubáltuk a keverékkel, majd mosást végeztünk. A sejteket ezután a mérésig szobahőn, sötétben tároltuk. A $[Ca^{2+}]_{cyt}$ szintet a Fluo-3 és Fura-Red fluoreszcenciájának fix hányadosa alapján számítottuk.

3.4. A SEJTEK GÁTLÓSZERES KEZELÉSE

Az egy-egy alanytól származó mononukleáris sejt szuszpenziókat több, megegyező sejtszámú mérési mintára osztottuk. Egy mintát gátlószeres kezelés nélkül (kontrollként), két mintát pedig MGTX, és TRAM-34 gátlószerekkel kezelve mértünk (mindkettő Sigma-Aldrich). A gátlószereket 60 nM-os, telítő koncentrációban

alkalmaztuk. MGTX esetében legalább 15, TRAM-34 esetében legalább 10 percig hatott a gátlószer a mérések megkezdése előtt. A Th1 és Th2 sejtek kalcium háztartásának szabályozását leíró vizsgálat esetében az MCU működését ruthenium red (RR) hozzáadásával, a SERCA csatornát thapsigarginnal (TG), míg a PMCA-t caloxin 2A1 (CLX) segítségével gátoltuk. A RR-et (Sigma-Aldrich, 1,25 mM) legalább 10 perccel a mérés előtt adtuk a mintához, a TG-t (Sigma-Aldrich, 750 nM) közvetlenül a mérés előtt hozzáadva, a CLX-t (AnaSpec, Fremont, CA, USA, 750 μM) pedig legalább 5 perccel a mérés előtt hozzáadva alkalmaztuk. Minden mintához 20 μg PHA-t adtunk közvetlenül a mérés megkezdése előtt aktiválás céljából (Sigma-Aldrich). Az intracelluláris kalciumkötő festékek bazális fluoreszcenciáját (melyet a Fluo-3 és Fura-Red hányadosát alapul véve számítottunk) minden mérés legelején (nulla másodpercnél) állapítottuk meg. Vizsgálatainkhoz BD FACSAria áramlási citométert (BD Biosciences) használtunk. A méréseket kinetikus jelleggel folyamatosan végeztük, 10 percen keresztül.

3.5. ÁRAMLÁSI CITOMETRIA A LIMFOCITA AKTIVÁCIÓ RÖVIDTÁVÚ VIZSGÁLATÁRA

A mérések során nyert adatokat a laboratóriumunkban fejlesztett, FacsKin elnevezésű számítógépes program segítségével értékeltük. Ennek lényege, hogy a mérés során ún. dot-plotban ábrázolódó adathalmazból (ahol minden pont egy-egy sejtnek felel meg), mely önmagában nehezen értékelhető és összehasonlítható, a program olyan görbét számít, melynek paraméterei azután a többi görbével számszerűen is összevethetőek, így lehetőség nyílik az adatok kvantitatív vizsgálatára. Ehhez a művelethez a kulcslépés egy ún. kettős logaritmikus („dlogist+”) függvény illesztése minden egyes mérésre, egy továbbfejlesztett algoritmus alapján.

A limfocita aktiváció mértéke szoros összefüggésben áll a $[Ca^{2+}]_{cyt}$ változásával. A dolgozatban ismertetett méréseink során ezért olyan fluoreszcens festékekkel jelöltük a sejteket, melyeknek intenzitása a $[Ca^{2+}]_{cyt}$ függvényében változik. A limfocita aktiváció során a $[Ca^{2+}]_{cyt}$ először megemelkedik, majd egy csúcsértéket elérve fokozatosan csökken. Ezt a folyamatot legjobban a kettős logaritmikus függvény („dlogist+”) írja le.

Ez a függvény olyan mérések jellemzésére használható, melyeknél az intenzitás az idő előrehaladtával növekszik, majd csökken.

A FacsKin program a függvény következő paramétereit számítja ki: a maximum értékét (Max), a maximum eléréséhez szükséges időt (t_{max}), a görbe felszálló ágának meredekségét a maximum értékének 50%-ánál (Slope), valamint a görbe alatti terület értékét (AUC). Ezek a paraméterek a limfociták kalcium beáramlási kinetikájának különféle jellemzőit írják le. Az AUC érték a kalcium válasz nagyságát írja le. Egy egysége egyenlő az egy másodpercre eső egy relatív intenzitás értékkel. A relatív intenzitás érték megegyezik az aktuális intenzitás érték és a nulla másodpercben mért intenzitás érték hányadosával. Az AUC értékek arányosak a $[Ca^{2+}]_{cyt}$ szintjével, melyek pedig a limfocita aktivácó szintjével állnak arányban.

3.6. STATISZTIKAI ELEMZÉS

A mérési eredmények összehasonlítását Wilcoxon, Mann-Whitney és Kruskal-Wallis tesztek segítségével végeztük, mivel az előzetesen elvégzett Kolmogorov-Smirnoff teszt az adatok nem normál eloszlását tárta fel. A 0,05-nél kisebb *p* értékeket vettük szignifikánsnak. A statisztikai számításokat GraphPad InStat programmal végeztük (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

4. EREDMÉNYEK

4.1. A KALCIUM HÁZTARTÁS SZABÁLYOZÁSA EGÉSZSÉGESEKBEN RÖVID TÁVÚ LIMFOCITA AKTIVÁCIÓ SORÁN

Vizsgálataink során a CD4+ CXCR3+ sejteket tekintettük a Th1 alpopulációnak, a CD4+ CCR4+ sejteket pedig a Th2 alpopulációnak. Először a PHA hatására kialakuló kalcium beáramlás mértékét hasonlítottuk össze Th1 és Th2 sejtekben. Az AUC, Slope és Max értékek mind alacsonyabbak voltak Th2 sejtek esetében, mint Th1 sejteknél. A t_{max} érték esetén nem találtunk különbséget.

Az ER-ból való kalcium felszabadulás és a CRAC csatornán való kalcium beáramlás egyéni hozzájárulását a $[Ca^{2+}]_{cyt}$ emelkedéséhez úgy állapítottuk meg, hogy méréseinket extracelluláris kalciumot nem tartalmazó közegben is elvégeztük. Így az ER hozzájárulását tudtuk meghatározni, hiszen a CRAC csatornán keresztül kalcium nem áramlott be a sejtekbe. A CRAC csatornán keresztüli kalcium beáramlás egyéni mértékét ezután úgy állapítottuk meg, hogy ezen mérések értékeit kivontuk az extracelluláris kalcium jelenlétében végzett mérések eredményeiből. Végül minden vizsgált paraméter esetében meghatároztuk a két tényező arányát (CRAC/ER arány).

Az RR mindkét limfocita altípusban csökkentette az AUC értéket. A Th1 sejtekben ezen felül a Slope és Max értékek is csökkentek, a t_{max} érték pedig emelkedett a Th2 sejtekben. Az RR tehát a kalcium beáramlásnak mind a nagyságát, mind a kinetikáját befolyásolja. Eredményeink alapján a mitokondriális kalcium felvétel Th1 sejtekben a limfocita aktiváció kezdeti és csúcs szakaszában is jelen van (amire a Slope és Max értékek változása utal az MCU gátlásának hatására), míg Th2 sejtekben csupán a kalcium beáramlás csúcsán van szerepe (amit a t_{max} érték változása jelez).

A TG az AUC, Slope és Max értékeket is megnövelte mind a Th1, mind a Th2 sejtekben. A TG tehát mind a kalcium eltávolítás mértékét és kinetikáját befolyásolja Th1 és Th2 sejtekben. A Slope érték kétszer akkora mértékben emelkedett Th2 sejtekben, mint a Th1 alpopulációban a TG hatására. Ez arra utal, hogy az ER kalcium felvétel hamarabb indul meg Th2 sejtekben. A további kalcium felvétel azonban (a kalcium beáramlás csúcsán) már hasonló Th1 és Th2 sejtekben, mivel a TG hatására a Max érték azonos mértékben nő.

CLX hatására a Th1 sejtekben mutattunk ki változást a kalcium háztartásban. Itt a Max érték 24 %-kal emelkedett a gátlószer hatására. A CLX kezelés tehát a kalcium beáramlás csúcsán eredményez változásokat. Érdekes módon a CLX a Th2 sejtekre nem volt hatással.

4.2. A T LIMFOCITÁK AKTIVÁCIÓJA ÉS A LIMFOCITA KÁLIUM CSATORNÁK EGÉSZSÉGESEKBEN

Egészséges önkéntesek mintáin a Kv1.3 és IKCa1 csatornák specifikus gátlószerinek alkalmazása (MGTX és TRAM) jelentős hatással volt a limfociták kalcium beáramlásának AUC, Max és t_{max} értékeire. A TRAM gátlószerrel történő kezelés csökkentette az AUC és Max értékeket minden vizsgált limfocita altípus esetén. A MGTX szintén minden esetben csökkentette az AUC és Max értékeket, kivéve a Th1 sejteket. A t_{max} értékekben nem találtunk szignifikáns eltérést. A vizsgált paraméterek csökkenésének mértéke karakterisztikus volt a vizsgált sejttípusra és a gátolt kálium csatornára.

4.3. A T LIMFOCITÁK AKTIVÁCIÓJA ÉS A LIMFOCITA KÁLIUM CSATORNÁK ÚJSZÜLÖTTKORBAN

Újszülötteknél az AUC értékek kisebbek voltak a teljes limfocita populációban, a Th1 alpopulációban, és a CD8 alpopulációban felnőttekhez viszonyítva. A Max értékek alacsonyabbak voltak újszülöttekben felnőttekhez képest a teljes limfocita populációban, a Th1 és Th2 sejtekben, valamint a CD8 sejtekben. Felnőttekhez képest kisebbek voltak a t_{max} értékek újszülöttek esetén a Th1 és a Th2 alpopulációkban. Újszülöttek CD8 sejtjeiben az AUC és Max értékeket mind a MGTX, mind a TRAM csökkentette. A TRAM csökkentette továbbá a teljes limfocita populáció t_{max} értékét. Újszülöttek esetében a többi vizsgált alpopulációban sem a MGTX, sem a TRAM nem csökkentette a kalcium beáramlást.
Megvizsgáltuk a Kv1.3 csatorna elleni antitest medián fluoreszcencia értékeit újszülöttek limfocitáin felnőttekhez hasonlítva. A Th2, CD4 és CD8 sejtek esetében ezt az értéket magasabbnak találtuk újszülöttek esetén, mint felnőtteknél.

4.4. A T LIMFOCITÁK AKTIVÁCIÓJA ÉS A LIMFOCITA KÁLIUM CSATORNÁK EGÉSZSÉGES TERHESSÉGBEN ÉS PREECLAMPSIÁBAN

Először a kalcium beáramlás AUC, Max és t_{max} paramétereit hasonlítottuk össze a PHA-val aktivált limfocitákban fertilis, nem várandós nők, egészséges várandósok és PE-s betegek esetén. Az AUC értékek alacsonyabbak voltak a Th1, a CD4 és a CD8 sejtek esetén egészséges várandósokban nem terhesekhez hasonlítva. Az egészséges várandósok mintáit PE-s várandósokhoz hasonlítva azt tapasztaltuk, hogy a t_{max} érték alacsonyabb PE-ban a Th2 altípusban.

A teljes limfocita populációban, a Th1, a CD4 és a CD8 alpopulációkban mind a MGTX, mind a TRAM csökkentette az AUC értékeket egészséges terhességben. A nem várandós nőktől vett mintákkal ellentétben azonban a gátlószereknek nem volt hatása a kalcium beáramlásra a Th2 altípusban egészséges terhességben.

PE-ban mindkét gátlószer csökkentette az AUC értékeket a teljes limfocita populációban, valamint a Th2 és a CD4 alpopulációkban, a Th1 és a CD8 sejtek AUC értékeire azonban nem voltak hatással. A Th2 és a CD8 sejtek esetében az MGTX, míg a CD4 sejtek esetén mindkét gátlószer csökkentette a Max értéket PE-ban.

Megvizsgáltuk a Kv1.3 csatorna elleni antitest medián fluoreszcencia értékeit a limfocitákon mindhárom csoport esetében. Nem találtunk szignifikáns eltérést a csoportok között egyik vizsgált limfocita altípus esetében sem.

4.5. A T LIMFOCITÁK AKTIVÁCIÓJA ÉS A LIMFOCITA KÁLIUM CSATORNÁK SCLEROSIS MULTIPLEXBEN

Első lépésben gátlószerek hozzáadása nélkül hasonlítottuk össze a kalcium beáramlás paramétereit (AUC, Max, t_{max} és Slope) a limfociták aktivációját követően az egészséges önkéntesek és a SM-es betegek két csoportja (IFN bétával és anélkül kezelt) között. IFN bétával nem kezelt SM-es betegek esetén egészségesekhez viszonyítva csökkent a t_{max} érték a CD4, a Th1 és a Th2 altípusok esetén. Tehát a kalcium beáramlás csúcsának elérése ezekben az altípusokban hamarabb következik be SM-ben. IFN bétával kezelt betegek esetén a t_{max} érték ismét magasabb volt a Th1 sejtekben, mint IFN béta kezelés nélküli SM-ben. A Slope érték IFN bétával nem kezelt SM-ben

magasabb volt mint egészséges önkénteseknél a CD4, Th1 és Th2 limfocita altípusokat vizsgálva, ami szintén gyorsabb kalcium beáramlásra enged következtetni. Ez az érték ismét csökkent IFN bétával kezelt SM-ben a CD4 és a Th1 sejtekben.

A Kv1.3 és IKCa1 csatornák specifikus gátlószerinek alkalmazása jelentős hatással volt a limfociták kalcium beáramlásának AUC, Max és t_{max} értékeire mindhárom csoportban; a Slope érték azonban nem változott meg. A MGTX és TRAM gátlószerekkel történő kezelés csökkentette az AUC értéket minden vizsgált limfocita altípus esetén, mindhárom csoportban. A Max érték is csökkent egészségesek Th2 sejtjeiben, továbbá a CD4, CD8 és Th1 altípusoknál IFN bétával nem kezelt betegek esetén. A t_{max} érték kizárólag MGTX hatására csökkent a CD8 sejttípus esetén mindkét SM-es csoportban. A vizsgált paraméterek csökkenésének mértéke karakterisztikus volt a vizsgált sejttípusra és a gátolt kálium csatornára.

Megvizsgáltuk a Kv1.3 csatorna elleni antitest medián fluoreszcencia értékeit a limfocitákon mindhárom csoport esetében. Ez az érték csökkent a CD4 és a Th2 sejtek esetén az IFN bétával nem kezelt SM-es csoportban egészségesekhez viszonyítva, a CD8 és Th1 sejtek esetén azonban nem volt szignifikáns különbség.

4.6. A T LIMFOCITÁK AKTIVÁCIÓJA ÉS A LIMFOCITA KÁLIUM CSATORNÁK 1-ES TÍPUSÚ DIABETESBEN

Egészséges személyek limfocitáival összehasonlítva T1DM-ben kisebb t_{max} értékeket mértünk a teljes limfocita populációt, valamint a Th1 sejteket vizsgálva. Ez, SM-hez hasonlóan, a limfociták fokozott reaktivitásával magyarázható az autoimmun reakció fennállása miatt.

Egészséges személyek mintáit vizsgálva Th1 sejtekben az AUC és a Max értékeket csupán a TRAM kezelés csökkentette, míg Th2 sejtekben mind a MGTX, mind a TRAM. A teljes limfocita populációban, valamint CD4 és CD8 sejtekben szintén mindkét gátlószer csökkentette az AUC és a Max értékeket. T1DM-ben szintén mindkét gátlószer csökkentette az AUC és a Max értékeket a teljes limfocita populációban. Th1 sejtekben ezeket az értékeket a TRAM helyett azonban a MGTX csökkentette. Továbbá T1DM-ben a Th2 és CD8 sejtek esetében is csupán a MGTX bizonyult hatásos

gátlószernek. T1DM-ben tehát a vizsgált limfocita altípusok érzékenyebbek a Kv1.3 csatorna gátlására, mint egészséges személyek esetén.

Megvizsgáltuk a Kv1.3 csatorna elleni antitest medián fluoreszcencia értékeit a limfocitákon T1DM-ben egészségesekhez hasonlítva. Ez az érték magasabb volt T1DM-ben a teljes limfocita populáció és a Th1 sejtek esetén.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

1. A T limfocita aktiváció során az extracelluláris térből belépő kalcium nagyobb szerepet játszik a citoplazmatikus kalcium szint emelkedésében, mint az endoplazmás retikulumból felszabaduló kalcium. Az endoplazmás retikulumból felszabaduló kalcium mennyisége megegyezik Th1 és Th2 sejtekben. Az MCU, és részben ennek köszönhetően a CRAC csatornák alacsonyabb szintű működése, valamint a SERCA pumpa fokozott működése áll annak a ténynek a hátterében, hogy a Th2 sejtek azonos aktiváló stimulus hatására alacsonyabb szintű limfocita aktiváción mennek keresztül, mint a Th1 sejtek. A SERCA pumpa működése már a kalcium beáramlás kezdetén hozzájárul a citoplazmatikus kalcium szint csökkentéséhez, és szabályozza a PMCA pumpa működését. A PMCA pumpa az emelkedett kalcium szint csökkentéséhez a kalcium beáramlás csúcsától járul hozzá, és aktívabban működik Th1 sejtekben.

2. Egészséges személyek esetén a TRAM, az IKCa1 csatorna specifikus gátlószere kisebb mértékben csökkentette a kalcium beáramlást a Th2 sejtekben, mint a Th1 sejtekben. Ez részben arra vezethető vissza, hogy a citoplazmatikus kalcium szint, amelynek el kell érnie egy küszöbértéket az IKCa1 csatorna aktiválódásához, gyorsabban növekszik Th1, mint Th2 sejtekben. Az IKCa1 csatornákkal ellentétben a Kv1.3 csatornák gátlása esetén a Th2 sejttípusnál csökkent nagyobb mértékben a kalcium beáramlás a Th1 sejtekhez viszonyítva. A Th1 sejtekben a kalcium beáramlás tehát kevésbé volt érzékeny a Kv1.3 csatornák gátlására.

3. A kalcium beáramlás kinetikája alacsonyabb szintű újszülöttek T limfocitáiban, mint felnőtt T limfocitákban. Ebben fontos szerepet játszhat a limfociták kálium csatornáinak kisebb szintű működése. Az újszülöttek limfocitái kevésbé érzékenyek a kálium csatornák specifikus gátlására felnőttekből izolált limfocitákkal összehasonlítva. A Kv1.3 csatorna expressziója magasabb újszülöttek limfocitáin.

4. Egészséges terhességben csökken a kalcium beáramlás a Th1 és CD8 sejtekben, míg preeclampsiában nem. A Th2 sejtek kalcium beáramlása egészséges várandósokban

érzéketlen volt a kálium csatornák gátlásra, míg preeclampsiások esetén jelentősen csökkent a kalcium beáramlás mértéke a gátlás hatására. Egészséges várandós nőkben a limfociták kalcium beáramlási kinetikája és a kálium csatornák gátlószereire való érzékenysége specifikus mintázattal bír, amely hiányzik preeclampsiában. Ezek a tulajdonságok preeclampsiában a nem terhes állapothoz hasonlóak. A limfociták kalcium válaszának eltérései szerepet játszhatnak az egészséges terhesség során megjelenő immunológiai tolerancia kialakulásában.

5. A vizsgált autoimmun kórképekben és preeclampsiában a limfociták kalcium beáramlása hamarabb éri el csúcsát, mint egészségeseknél. Ez a limfociták fokozott reaktivitásával állhat összefüggésben a fenti megbetegedésekben.

6. SM-ben elérhető a CD8 limfociták szelektív immunmodulációja a Kv1.3 csatornák gátlásával. Azonban a korábbi feltevésekkel ellentétben ez a szelektivitás nem eléggé specifikus az összes limfocita altípust vizsgálva, mivel az anti-inflammatorikus citokineket termelő Th2 sejtekre is hatással van az alkalmazott gátlószer, ami valószínűleg visszaesést jelentene a jelenlegi terápiás törekvésekben. SM-ben az IFN béta kezelés elsősorban a Th1 sejttípus kalcium beáramlási kinetikájában létrejövő kompenzatorikus változásokkal és e sejtek kálium csatornáinak működésével áll összefüggésben, azonban a Th2 sejttípus fokozott működését, és így a gyulladást csökkentő citokinek termelését kevésbé érinti.

7. A limfociták fokozott reaktivitása T1DM-ben összefüggést mutat a Kv1.3 csatornák magasabb expressziójával egészségesekhez képest. T1DM-ben a limfociták érzékenyebbek a Kv1.3 csatornák gátlására, mint egészségesekben. A Kv1.3 csatornák gátlásával befolyásolható a limfocita aktiváció T1DM-ben. E csatornák megnövekedett jelentősége azonban nem kizárólagosan jellemző egy adott limfocita altípusra.

6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

6.1. AZ ÉRTEKEZÉSHEZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

Összesített impakt faktor: 17,978, első szerzőként: 15,278

Nemzetközi közlemények:

- **Toldi G,** Kaposi A, Zsembery Á, Treszl A, Tulassay T, Vásárhelyi B. Human Th1 and Th2 lymphocytes are distinguished by calcium flux regulation during the first ten minutes of lymphocyte activation. Immunobiology. 2011, in press. IF: 4.114
- **Toldi G,** Folyovich A, Simon Z, Zsiga K, Kaposi A, Mészáros G, Tulassay T, Vasarhelyi B. Lymphocyte calcium influx kinetics in multiple sclerosis treated without or with interferon beta. J Neuroimmunol. 2011;237:80-86. IF: 2.901
- **Toldi G,** Stenczer B, Treszl A, Kollar S, Molvarec A, Tulassay T, Rigo J Jr, Vasarhelyi B. Lymphocyte calcium influx characteristics and their modulation by Kv1.3 and IKCa1 channel inhibitors in healthy pregnancy and preeclampsia. Am J Reprod Immunol. 2011;65:154-63. IF: 2.451
- **Toldi G,** Vasarhelyi B, Kaposi AS, Meszaros G, Panczel P, Hosszufalusi N, Tulassay T, Treszl A. Lymphocyte activation in type 1 diabetes mellitus: the increased significance of Kv1.3 potassium channels. Immunol Lett. 2010;133:35-41. IF: 2.511
- **Toldi G,** Treszl A, Pongor V, Gyarmati B, Tulassay T, Vasarhelyi B. T-lymphocyte calcium influx characteristics and their modulation by Kv1.3 and IKCa1 channel inhibitors in the neonate. Int Immunol. 2010;22:769-74. IF: 3.301
- Mészáros G, Szalay B, **Toldi G,** Kaposi A, Vásárhelyi B, Treszl A. Kinetic measurements on flow cytometer: new methods for monitoring intracellular processes. Assay Drug Dev Technol. 2011, in press. IF: 2.700

Könyvfejezetek:

- **Toldi G,** Treszl A, Vásárhelyi B. T Lymphocyte Characteristics and Immune Tolerance during Human Pregnancy. In: Autoimmune Disorder / Book 1 (ed: Mavragani C). Intech, 2011. ISBN 978-953-308-70-9.
- **Toldi G,** Vásárhelyi B. The Contribution of Lymphocyte Potassium Channels to the Perinatal Regulation of the Immune Response in Mother and Newborn. In: Potassium Channels: Types, Structure and Blockers (ed: Fonseca DS). Nova Publishers, 2011. ISBN: 978-1-61324-880-5.

Magyar közlemények:

- **Toldi G,** Vásárhelyi B, Tulassay T. A limfociták kálium csatornáinak funkcionális éretlensége újszülötteknél. Gyermekgyógyászat. 2010;61:204-9.
- Mészáros G, Rónai KZ, **Toldi G**, Kaposi A, Vásárhelyi B, Treszl A. Sejtélettani folyamatok jellemzése valós idejű áramlási citometriás módszerrel. Hun Immunol. 2008;7:22-29.

6.2. AZ ÉRTEKEZÉSHEZ NEM KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

Összesített impakt faktor: 22,808, első szerzőként: 11,236

Nemzetközi közlemények:

- **Toldi G.** Prevention of stillbirths – how students can get involved. Int J Stud Res. 2011;1:171-172.
- **Toldi G,** Molvarec A, Stenczer B, Müller V, Eszes N, Bohács A, Bikov A, Rigó J Jr, Vásárhelyi B, Losonczy G, Tamási L. Peripheral Th1/Th2/Th17/regulatory T-cell balance in asthmatic pregnancy. Int Immunol. 2011;23:669-677. IF: 3.301
- **Toldi G,** Bíró E, Szalay B, Stenczer B, Molvarec A, Rigó J Jr, Vásárhelyi B, Bekő G. Soluble urokinase Plasminogen Activator Receptor (suPAR) levels in healthy pregnancy and preeclampsia. Clin Chem Lab Med. 2011, in press. IF: 2.069
- **Toldi G,** Rigo J Jr, Stenczer B, Vasarhelyi B, Molvarec A. Increased prevalence of IL-17-producing peripheral blood lymphocytes in preeclampsia. Am J Reprod Immunol. 2011;66:223-9. IF: 2.451
- **Toldi G,** Stenczer B, Molvarec A, Takats Z, Beko G, Rigo J Jr, Vasarhelyi B. Hepcidin concentrations and iron homeostasis in preeclampsia. Clin Chem Lab Med. 2010;48:1423-6. IF: 2.069
- **Toldi G**, Svec P, Vásárhelyi B, Mészáros G, Rigó J, Tulassay T, Treszl A. Decreased number of FoxP3+ regulatory T cells in preeclampsia. Acta Obstet Gynecol Scand. 2008;87:1229-33. IF: 1.346
- Molvarec A, Shiozaki A, Ito M, **Toldi G,** Stenczer B, Szarka A, Nakashima A, Vásárhelyi B, Rigó J Jr, Saito S. Increased prevalence of peripheral blood granulysin-producing cytotoxic T lymphocytes in preeclampsia. J Reprod Immunol. 2011;91:56-63. IF: 2.204
- Molvarec A, Ito M, Shima T, Yoneda S, **Toldi G,** Stenczer B, Vásárhelyi B, Rigó J Jr, Saito S. Decreased proportion of peripheral blood vascular endothelial growth factor-expressing T and natural killer cells in preeclampsia. Am J Obstet Gynecol. 2010;203:567.e1-8. IF: 3.313
- Mészáros G, Szalay B, **Toldi G**, Mezei G, Tamási L, Vásárhelyi B, Cserháti E, Treszl A. FoxP3+ regulatory T cells in childhood allergic rhinitis and asthma. J Investig Allergol Clin Immunol. 2009;19:238-40. IF: 1.254
- Gyarmati B, Szabó E, Szalay B, Cseh Á, Czuczy N, **Toldi G,** Vásárhelyi B, Takáts Z. Serum maternal hepcidin levels three days after delivery are higher compared to those measured at parturition. J Obstet Gynaecol Res. 2011;37:1620-1624. IF: 0.869
- Molvarec A, Blois SM, Stenczer B, **Toldi G,** Tirado-Gonzalez I, Ito M, Shima T, Yoneda S, Vásárhelyi B, Rigó J Jr, Saito S. Peripheral blood galectin-1-expressing T and natural killer cells in normal pregnancy and preeclampsia. Clin Immunol. 2011;139:48-56. IF: 3.932

Magyar közlemények:

- Pongor V, **Toldi G,** Szabó M, Vásárhelyi B. A terápiás célú teljestest-hypothermia szisztémás és immunmoduláns hatásai Orv Hetil. 2011;152:575-580.

- Gyarmati B, Szabó E, Szalay B, Cseh Á, Czuczy N, **Toldi G,** Vásárhelyi B, Takáts Z. Emelkedett hepcidinszint nőgyógyászati műtéteket követő harmadik napon Orv Hetil. 2010;151:1790-1794.

Könyvfejezet:

- Treszl A, Mészáros G, **Toldi G**, Vásárhelyi B. Histone Deacetylases and Autoimmunity. In: The Epigenetics of Autoimmune Diseases (ed: Zoulai M). Wiley & Sons, 2009. ISBN: 978-0-470-75861-8.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Több mint öt évvel ezelőtt, másodéves diákkörös hallgatóként kapcsolódtam be az I. számú Gyermekklinikán működő MTA-SE Gyermekgyógyászati és Nefrológiai Kutatócsoport munkájába. Köszönettel tartozom Tulassay Tivadar professzor úrnak nem csupán azért, hogy megteremtette a kutatócsoport munkájához szükséges feltételeket, hanem személyes támogatásáért, bátorításáért is.

Kutatómunkámat a kezdetektől irányítja témavezetőm, Vásárhelyi Barna. Ő tanított meg a tudományos gondolkodás és kritikus szemlélet alapjaira, az eredmények értelmezésére és a tudományos közlés technikájára. Különösen hálás vagyok neki azért, hogy mindig készen állt arra, hogy tanácsokkal segítse utamat.

Mindig nagy örömet jelent inspiráló közösségben dolgozni. Köszönet illeti Treszl Andrást, aki bevezetett az áramlási citométeres mérések és a laboratóriumi munka alapjaiba, és nagy segítségünkre volt az eredmények értékelése során is. Hallgatótársaim, Kaposi Ambrus és Mészáros Gergő munkája nélkül nem jöhetett volna létre a mérések kiértékelésére használt módszer és a FacsKin program. Köszönöm továbbá kutatócsoportunk minden tagjának a hozzájárulást és a biztatást, amellyel munkánkat segítették.

Köszönetemet fejezemi ki Rigó János professzor úrnak, Molvarec Attilának és Stenczer Balázsnak (I. sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika), akik a várandós és preeclampsiás minták gyűjtésben nyújtottak segítséget.

Hálásan köszönöm Zsembery Ákos támogatását (Klinikai Kísérleti Kutató- és Humán Élettani Intézet), aki szakértelmével és tanácsaival segítette eredményeink értékelését.

Gyarmati Béla főrvos úr (Uzsoki utcai Kórház, Szülészeti és Nőgyógyászati Osztály) és Pongor Vince hallgatótársam a köldökzsinórvér gyűjtésében voltak segítségünkre.

A sclerosis multiplexben végzett vizsgálatok elvégzésében Folyovich András főorvos úr (Szent János Kórház, Neurológiai Osztály) nyújtott pótolhatatlan segítséget, aki kollégáival, Simon Zsuzsával és Zsiga Katalinnal a vérminták gyűjtésében is közreműködött. Biró Enikő diákkörös hallgató a minták mérésével és az eredmények értelmezésével segítette munkánkat.

A T1DM-ben végzett vizsgálat során Pánczél Pál és Hosszufalusi Nóra (III. sz. Belgyógyászati Klinika) támogatták munkánkat a vérminták gyűjtésével.