

B.1 Pethő Zoltán Dénes DE-ÁOK, Balajthy András DE-ÁOK
DE OEC Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet

KATIONCSATORNA-GÁTLÓSZEREK HATÁSA MITOGÉNNEL STIMULÁLT T-LIMFOCITÁKRA

Bevezetés: A humán T-limfociták ioncsatornáinak működése nagymértékben befolyásolja ezen sejtek aktivációját, és ezáltal az immunválaszt. A legfontosabb ioncsatornák a feszültségfüggő Kv1.3 és a Ca²⁺-aktivált IKCa1 K⁺-csatornák, illetve a CRAC, vagyis a Ca²⁺-felszabadulás aktiválta Ca²⁺-csatorna. Ezen ioncsatornák gátlhatók specifikus gátlószerekkel, ami különböző mechanizmusokon keresztül a sejtaktiváció és -proliferáció gátlásához vezethet. Vizsgálatainkkal arra kerestük a választ, hogy az egyes ioncsatornák gátlása a különböző koncentrációjú mitogénnel kezelt sejtek proliferációját és aktivációját hogyan befolyásolja.

Anyagok és módszerek: A vizsgálatokhoz humán perifériás vér limfocitákat használtunk fel. A sejteket a T-sejt receptor-CD3-komplexhez és a ko-stimulátor CD28-hoz kötődő antitestekkel (anti-CD3 és anti-CD28) stimuláltuk, ezeket együttesen, különböző koncentrációkban használtuk. A sejtekhez Kv1.3 gátlószert (TEA, Anuroctoxin), IKCa1 gátlószert (TRAM-34) vagy CRAC gátlószert (2-Apb), illetve ezek kombinációját adtuk három koncentrációban: a disszociációs állandónak megfelelő, azaz átlagosan a csatornák felét gátló koncentrációban (K_d), ennek a háromszorosában (3K_d), illetve tízszeresében (10K_d). Ezt követően az ötödik napon áramlási citométerrel vizsgáltuk a sejtosztódás mértékét CFSE (karboxifluorescein szukcinimidil észter) hígítási esszével.

Eredmények: Eredményeink alapján az anti-CD3 és anti-CD28 koncentrációjának emelése fokozta a proliferáció mértékét. Hasonlóképp az alkalmazott gátlószerek is dózisfüggően csökkentették az osztódó sejtek arányát, a 2-Apb kivételével. A 2-Apb viszont késleltette a sejtaktivációt, vagyis amíg a kontrollsejtek mitogénkezelés mellett a többi esetben akár négy osztódási cikluson is végigmentek, addig 2-Apb hatására csak kettőn. A mitogénkoncentráció növelésével ugyanakkor egyre kisebb lett a gátlószerek proliferációt gátló hatása, és a maximális koncentráció mellett még 10K_d koncentrációban alkalmazott gátlószer sem okozott szignifikáns csökkenést az aktivációban.

Következtetés: A proliferáció legnagyobb mértékű gátlását a gátlószerek együttes alkalmazása esetén tapasztaltuk, ami a különböző csatornák szabályozási útvonalainak szinergizmusára utal.

Témavezető: Dr. Varga Zoltán, Dr. Panyi György

K1.12 Balajthy András DE-ÁOK, Pethő Zoltán Dénes DE-ÁOK

DE OEC Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet; DE OEC I. sz. Belgyógyászati Klinika

**LIMFOCITÁK PROLIFERÁCIÓJÁNAK ÉS Kv1.3 KÁLIUM IONCSATORNÁINAK
VIZSGÁLATA HIPERKOLESZTERINÉMIA ÁLLAPOTBAN**

Bevezetés: A hiperkoleszterinémia az ateroszklerózis illetve további kardiovaszkuláris betegségek egyik legfontosabb rizikófaktora. Ismert, hogy az ateroszklerózis egy krónikus gyulladásos folyamat, így kialakulásában a gyulladásos sejtek, mint pl. limfociták, elsődleges szerepet játszhatnak. In vitro kísérletekben a megnövelt membrán koleszterinszint jelentősen befolyásolta a limfociták Kv1.3 ioncsatornáinak biofizikai paramétereit illetve a jelátviteli folyamatokat. Munkánk során azt a hipotézist vizsgáltuk, hogy az in vitro kísérletekhez hasonló változásokat kapunk hiperkoleszterinémias egyedekből izolált limfociták vizsgálatakor.

Anyagok és módszerek: Kísérleteinkben az I. Belklinika Lipid Szakrendelése által gondozott, hiperkoleszterinémias, de egyéb betegségben nem szenvedő donoroktól valamint normál koleszterinszinttel rendelkező (kontroll) személyektől származó mintákat vizsgáltunk. A betegeket három csoportra osztottuk koleszterinszintjük alapján (mmol/l-ben megadva) I.: 3.8-5.2 (kontroll) ; II.: 6.3-9.9 III.: 11.6-13.7. A perifériás vérből CD4+ T-limfocitákat monoklonális antitest adhéziós módszerrel izoláltunk, és a Kv1.3 ioncsatornáinak áramát patch-clamp technikával, teljes-sejt konfigurációban vizsgáltuk. A sejtek osztódását CFSE hígítási esszével áramlási citométeren követtük, anti-CD3 és anti-CD28 stimulációt követően és annak hiányában.

Eredmények: Elektrofiziológiai méréseink azt mutatták, hogy a hiperkoleszterinémias betegek T sejtjeiben a Kv1.3 ioncsatorna biofizikai jellemzői (aktivációs kinetika, inaktivációs kinetika, inaktivációból történő visszatérés kinetikája, valamint az egyensúlyi aktiváció és inaktiváció membránpotenciál függése) nem változtak meg a megnövekedett szérumszint hatására. A proliferációs kísérleteink során a III. csoport T sejtjeinek spontán aktivációs rátája emelkedettnek bizonyult a kontrollhoz képest, viszont a stimuláció hatására az I-II. csoporthoz képest kevesebb sejt osztódott.

Következtetés: Ezek alapján tehát az in vitro kísérletekben talált, Kv1.3 kapuzást érintő eltérések nem jelennek meg in vivo, azonban a proliferációs mérések során talált változások a koleszterinnek in vivo körülmények között is megjelenő, jelátviteli utakat módosító hatását feltételezi.

Témavezető: Dr. Somodi Sándor, Dr. Hajdú Péter