

# 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.

## TARTALOMJEGYZÉK

1	Bevezetés .....	8
2	Irodalmi áttekintés .....	10
2.1	A gyulladáscsökkentő bélbetegségről .....	10
2.2	Az IBD rizikófaktoraival .....	11
2.2.1	Genetikai tényezők, örökletes tényezők.....	11
2.2.2	Életkor és nem.....	13
2.2.3	Rassz és etnikum .....	13
2.2.4	Fertőzések.....	14
2.2.5	Antibiotikumok .....	15
2.2.6	Fizikai aktivitás .....	15
2.2.7	Túlsúly és elhízás .....	16
2.2.8	Appendectomia.....	17
2.2.9	Nem szteroid típusú gyulladáscsökkentő szerek (NSAID-ok).....	18
2.2.10	Isotretinoin.....	18
2.3	A Crohn-betegség és a Colitis Ulcerosa klinikai jellemzői .....	19
2.3.1	A CD és CU besorolása.....	19
2.3.2	A gyermekkori CD és CU klinikai képeinek gyakorlati vonatkozásai 20	
2.4	A gyermekkori IBD kezelésének rövid ismertetése .....	22
2.4.1	A CD kezelésének irányelvei .....	22
2.4.1.1	Anti- TNF- $\alpha$ kezelések helye a gyermekkori CD kezelésében ..	25
2.5	Az IBD kialakulásában és progressziójában szerepet játszó immunológiai faktorkok .....	28
2.5.1	A T sejtek helye a normál működésű immunrendszerben .....	28
2.5.1.1	A T-lymfociták szerepének részletes ismertetése .....	30
2.5.1.2	A mucozális immunrendszer fő komponensei .....	32
2.5.1.3	Az IBD-vel kapcsolatos eddigi adatok .....	35

2.5.1.3.1	Az epithél barrier aberrációi.....	35
2.5.1.3.2	Az immunsejtek diszregulációja .....	35
2.5.1.3.3	A termelt mediátorok rendellenességei .....	37
2.5.1.3.4	A mikrobióta szerepe.....	38
2.5.1.3.5	A genetikai faktorok szerepe .....	41
2.5.1.3.6	A veleszületett immunitás genetikai defektusai .....	41
2.5.1.3.7	Mikróba clearance útvonalak defektusai .....	43
2.5.1.3.8	A Cytokin útvonalak aberrációi .....	44
2.6	A T sejt aktiváció folyamata, különös tekintettel a kalcium jelre .....	46
2.7	A káliumcsatornák szerepével kapcsolatos vizsgálatok eredményei....	49
2.7.1	A kálium csatornák funkciómódosításnak lehetőségei .....	51
2.7.2	A K <sup>+</sup> -csatornák gátlásával kapcsolatos eredmények.....	55
2.7.3	A K <sup>+</sup> -csatornák és a következményes T sejt aktivációs folyamatok szerepe az IBD kialakulásában .....	57
3	Célkitűzések .....	59
4	Módszerek .....	60
4.1	A Crohn-betegséggel kapcsolatos vizsgálat betegei .....	60
4.2	A Th17-es vizsgálat alanyai.....	60
4.3	A perifériás vérminták begyűjtésének módszertana .....	61
4.4	A Crohn-betegek kalcium beáramlás kinetikáját mérő protokollja.....	61
4.5	A T helper szubpopulációk mérésének protokollja .....	62
4.6	Az adatok értékelése .....	63
4.6.1	Az egyes szubpopulációk gateelési stratégiája .....	65
4.7	A statisztikai elemzések módszertana.....	66
5	Eredmények.....	67
5.1	A gyermekkori Crohn-betegséggel kapcsolatos vizsgálatok eredményei	67

5.1.1	A fontosabb háttérinformációk és a rutin laboratóriumi paraméterek adatai	67
5.1.2	A vizsgált sejtpopulációk megoszlásával kapcsolatos eredmények..	69
5.1.3	A kalcium beáramlás kinetikával kapcsolatos eredmények.....	70
5.1.4	A Kv1.3-csatorna expresszió mérésének eredményei.....	76
5.1.5	Az összefüggés vizsgálatok eredményei .....	77
5.2	A négy fő, T helper szubpopuláció szimultán vizsgálatának lehetőségét vizsgáló kutatás eredményei.....	79
5.2.1	A vizsgált sejtpopulációk megoszlásával kapcsolatos eredmények..	79
5.2.2	A kalcium beáramlás kinetikai paramétereinek eredményei .....	79
5.2.3	A Kv1.3-csatorna expresszió mérésének eredményei.....	82
6	Megbeszélés.....	83
6.1	A gyermekkori Crohn-betegséggel kapcsolatos vizsgálatok eredményei	83
6.1.1	A fontosabb háttérinformációk és a rutin laboratóriumi paraméterek adatai	83
6.1.2	A vizsgált sejtpopulációk megoszlásával kapcsolatos eredmények..	84
6.1.3	A kalcium beáramlás kinetikával kapcsolatos eredmények.....	84
6.1.4	A Kv1.3-csatorna expresszió mérésének eredményei.....	86
6.1.5	Az összefüggés vizsgálatok eredményei .....	87
6.2	A négy fő, T helper szubpopuláció szimultán vizsgálatának eredményei	88
6.2.1	A vizsgált sejtpopulációk megoszlásával kapcsolatos eredmények..	88
6.2.2	A kalcium beáramlás kinetikai paramétereinek eredményei .....	88
6.2.3	A Kv1.3-csatorna expresszió mérésének eredményei.....	90
7	Következtetések.....	91
8	Összefoglalás .....	94
9	Summary .....	96
10	Irodalomjegyzék.....	98

11	Saját publikációk jegyzéke.....	131
12	Köszönetnyilvánítás .....	135

## Rövidítések jegyzéke

5ASA	5-aminoszalicilát
ALAT	alanin-amino-transzferáz
anti-OmpC	Anti-Outer membrane protein C
APC	antigénprezentáló sejt
ASAT	aszpartát-amino-transzferáz
ASCA	Sacharomyces cerevisiae elleni antitest
ATG16L1	autophagy Relate 16-like 1
bFGF	basic fibroblast growth factor
BMI	testtömeg index
CCL2	CC-chemokine ligand 2
CD	Crohn-betegség
ChTx	Charybdotoxinról
CI	konfidencia intervallum, az értekezésben mindenhol a 95%-os megbízhatósági tartományt jelenti
COL7A1	Collagen, type VII, alpha 1
COX	cyclooxygenáz
CRAC	calcium-release-activated channels
CRP	C-reaktív protein
CT	Computer tomográfia
CU	Colitis ulcerosa
DAG	diacylglycerol
DC	dentrikus sejt
DC	dentrikus sejt
diTC	C20-29-[3H]dihydrocorreolide
DNBS	2,4-dinitrobenzene szulfonsav
DPO-1	Diphenyl phosphine oxide-1
DR3	death domain receptor
EGFR	epidermal growth factor receptor
ER	endoplazmás retikulum
ESR	erythrocyte sedimentation rate
FOXP3	forkhead box P3
FUT2	Fucosyltransferase 2
Fvs	fehérvérsejt
GALT	Gut associated lymphoid tissue
GATA3	Trans-acting T-cell-specific transcription factor GATA-3
G-CSF	granulocyte-colony stimuláló faktor
GGT	Gamma-glutamil transzpeptidáz
GIT	Gasztrointesztinális traktus
HR	Hazard Ratio
IBD	gyulladásos bélbetegség
IBS	irritábilis bélszindróma
IFN- $\gamma$	interferon gamma
IFX	infliximab
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G

IL	Interleukin
IL-R	IL-receptor
ILC3	Group 3 innate lymphoid cells
InsP3	inozitol-1,4,5-trifoszfát
IRGM	immunity-related GTPase M
ITK	interleukin-2-inducible T-cell kinase
JAK2	Janus kinase 2
K	kálium
karb	karbamid
Kreat	kreatinin
LAT	linker for activation of T cells
LCK	lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
MCU	mitochondrial Ca <sup>2+</sup> uniporter
MgTX	margatoxin
MHC	fő hisztokompatibilitási komplex
MR	Magrezonanciás képalkotás
mRNS	messenger RNS
Na	nátrium
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid foszfát
NFAT	nuclear factor of activated T cells
NF-Kb	nukleáris faktor-kappa B
NK	természetes ölüsejt
NOD2	Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2
NSAID	Nemszteroid típusú gyulladásgátló szerek
OEP	Országos Egészségbiztosítási Pénztár
OR	odds ratio
ORMDL3	Orosomucoid like 3
p-ANCA	Perinuclear Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibodies
PCDAI	Pediatric Crohn's Disease Activity Index
PDAI	Perianal disease Activity Index
PHA	phytohemagglutinin
PKC	foszforiláz-kináz C
PLCγ1	foszfolipáz Cγ1
PMCA	plasma membrane Ca <sup>2+</sup> ATPase
PPARγ	peroxisome proliferator-activated receptor γ
PtdIns(4,5)P2	foszfatidylinositol-4,5-biszfoszfát
PTPN2	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 2
PTPN22	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 22
RA	Rheumatoid Arthritis
RANTES	Chemokine (C-C motif) ligand 5
REGIIIγ	regenerating islet-derived protein IIIγ
RIP2	receptor-interacting protein 2
ROR-α	RAR-related orphan receptor alpha
ROR-γ	RAR-related orphan receptor gamma
RR	relatív kockázat
RTG	röntgen
S100	S100 calcium-binding protein
SERCA	sarco/endoplasmic reticulum Ca <sup>2+</sup> ATPase

SLE	szisztémás lupus erythematosus
SLP76	SRC-homology-2-domain-containing leukocyte protein of 76 kDa
Smad	Mothers against decapentaplegic homolog 2
STAT	Signal transducer and activator of transcription
STIM1	stromal interaction molecule 1
T1DM	egyres típusú diabétesz mellitus
Tbet	T-box transcription factor
Tc	cytotoxikus T sejt
TCR	T sejt receptor
TEC	Tyrosine-protein kinase
TGF- $\beta$	Transforming growth factor beta
Th	T helper sejt
TIMP-1	tissue inhibitor of metalloproteinases □ 1
TL1A	Tumor necrosis factor (TNF)-like cytokine 1A
TNF- $\alpha$	Tumornekrózis faktor $\alpha$
Tr1	1-es típusú regulátoros sejt
Treg	regulátoros T sejt
TYK2	Tyrosine kinase 2
UH	Ultrahang
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1
VEGF	vasculáris endotheliális növekedési faktor
VEO-IBD	nagyon korai megjelenésű IBD
WBC	fehérvérsejt
WE	vörösvértest süllyedés
XBP1	X-box binding protein 1
ZAP70	$\zeta$ -chain-associated protein kinase of 70 kDa



## 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<sup>+</sup>-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 gyulladássos 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 előrettekintés is jövőbeni vizsgálatokra nézve.

## 2 Irodalmi áttekintés

### 2.1 A gyulladássos bélbetegségről

A gyulladássos bélbetegség (IBD) gyakorlatilag gyűjtőfogalom, amelybe idiopátiás, krónikus gyulladássos intesztinális betegségek tartoznak. Két formája a Crohn-betegség (CD), amely az emésztőrendszer transzmurális gyulladása, és a colitis ulcerosa (CU), amely kifejezetten a colon megbetegedése (1). Mindkét betegség az északi országokban, a fehérbőrű, illetve a zsidó populációban a leggyakoribb, a déli országok népességében ritkább (2). A betegek 25%-át életük első 2 évtizedében diagnosztizálják, közülük is a legtöbbet a 13-18 éves korban. Bár a betegség az 1900-as évek elején nem volt gyakori, és főleg az iparosodott területeken, illetve a nagyvárosok lakosságának körében fordult elő leginkább, a II. világháborút követően gyakorisága emelkedő tendenciát mutat. A múlt század közepén a CD prevalenciája fele volt a CU-énak, ez azonban bizonyos területeken kiegyenlítődni látszik napjainkra (3).

A legmagasabb incidencia Európában 24.3/100 e fő/év a CU és 12.7/100e fő/év a CD esetében (4). Észak-Amerikában 19.2/100e fő CU és 20.2/100e fő CD, míg Ázsiában és a Közel-Keleten 6.3/ 100e fő CU és 5.0/100e fő CD diagnózis kerül felállításra. A legmagasabb prevalencia a CU esetében 505/100e fő Európában, míg a CD esetében 249/100e Ffő értékkel Észak-Amerikában van. Az időtrend elemzés szerint a CD-vel kapcsolatos tanulmányok 75%-a, míg az CU-val foglalkozó tanulmányok 60%-a szignifikánsan emelkedő incidenciát mutat (5). További érdekesség, hogy amíg korábban É-D irányú incidencia és prevalencia eltolódásról beszélhettünk, újabb közlemények adatai alapján ma már inkább K-NY tengely jelenik meg.

A gyermek és serdülőkorban előforduló IBD kapcsán szintén Észak-Amerika és Európa a leginkább érintett. Ezekben az életkorokban a teljes IBD-s populáció 20%-a található. Egy USA-ban végzett tanulmány szerint 4.56/100e fő CD és 2.14/100e fő CU incidencia jellemző, ami egyben a Crohn-betegség ebben az életkorban történő predominanciáját is igazolja. Stockholmi populáció esetében 4.9/100e fő CD és 2.2/100e fő CU incidencia igazolódott. Ebben a tanulmányban emelkedő gyakoriságokat nem igazoltak a szerzők (6).

## 2.2 Az IBD rizikófaktorai

Az IBD patogenezise ugyan nem teljesen tisztázott, számos kockázati tényezőt sikerült igazolni (7). Ezek ismertetését az alábbiakban tesszük meg. Bár számtalan kiváló review taglalja a kérdéskört, maximálisan feldolgozva a rendelkezésre álló kutatások eredményeit (8), a legtöbb szakirodalmi forrás vegyesen kezeli a felnőtt és gyermekkori korforma kapcsán felmerülő rizikótényezőket. Azon faktorok esetében, ahol a gyermekkori kórformára külön adatok is rendelkezésre állnak, a kutatások eredményeit konkrétan is kiemeljük. Ugyanakkor fontosnak tartjuk valamennyi faktor ismertetését, tekintve, hogy közülük többel kapcsolatban nem egyértelmű a tudomány álláspontja.

A gyermekkori IBD kapcsán jelentős tényezőnek tűnik a genetikai háttér, az anyatejes táplálás, az étrend, az életkor, a nem, a rassz/ etnikum, az egyes fertőzések, és az antibiotikumok gyakori alkalmazása. Ezen faktorokról több, meggyőző forrás áll a rendelkezésünkre.

A fizikai aktivitás, a túlsúly/ elhízás, appendectomia, pszichoszociális faktorok és az alvás valószínűleg szintén jelentősek, ugyanakkor a gyermekkori forma esetében kevesebb az adat.

A nem szteroid gyulladásgátló szerek, az orális fogamzásgátlók vagy az isotretotin használata, és a dohányzás, pedig az életkori sajátosságok miatt jóval kisebb valószínűséggel tehető felelőssé a betegség kialakulásáért/ progressziójáért, lévén a betegek ezen csoportja csak kis valószínűséggel van kitéve a felsorolt faktoroknak.

### 2.2.1 *Genetikai faktorok, örökletes tényezők*

Az IBD-s betegek 10-25%-ának van elsőfokú rokona, akinél CD vagy CU áll fenn (9). Egy 1996-ban publikált tanulmány az érintett szülő-gyermek párosok esetében a betegség típusa kapcsán 75,3%-os konkordancia igazolódott. Ráadásul a szülők esetében a diagnóziskor betöltött életkor szignifikánsan magasabb volt, mint a gyermekek esetében. 40 szülő-gyermek páros esetében 60,6% legalább 10 évvel idősebb korban került diagnosztizálásra (10). Az öröklődés szerepére az ikerkutatások adják a legmeggyőzőbb bizonyítékokat, amelyekből az derül ki, hogy a CD esetében nagyobb a genetikai faktorok szerepe, mint a CU kapcsán. Egy vizsgálatban, amely során 80 iker vizsgálata zajlott le, az egypetűjű ikrek esetében a konkordancia a CD esetében 50,0%

volt, míg a CU esetében csak 18,8%. A betegség fenotípusa is hasonló volt az ikerpárok esetében (11).

Egy tanulmányból az is kiderül, hogy azoknak, akiknek a szülei közül valakinél IBD áll fenn, 33%-os esélye van, hogy 28 éves koráig nála is kialakul a betegség (12). Egy 554 CD-s beteget vizsgáló tanulmány leírta, hogy annak a 17%-nak, akiknek a családjában másnál is CD iránydiagnózis áll fenn, a betegség klinikai típusa 82%-os, míg a betegség oldala 86%-os konkordanciával bír. Az a 72 család bevonásával készült vizsgálat, amely 2 (n=55), 3 (n=8), 4 (n=6) és 5 vagy több (n=3) elsőfokú rokonnál is igazolt CD-t vizsgált, azt találta, hogy akiknél 2 rokon esetében áll fenn CD, ott a betegség lokalizációja 56%-os, a típusa pedig 49%-os konkordanciát mutat, szemben a 83% és 76%-os konkordanciával, amelyet a kettőnél több családtagban fennálló CD-s páciensek esetében igazoltak (13).

Egyes szerzők igazolták, hogy a gyermekkori megjelenésű CD-ben a genetikai faktoroknak még nagyobb szerepe van. A NOD2 vagy más néven CARD15 gén 3020insC polimorfizmusa, illetve az SLC22A4/5 rs3792876 single nucleotid polimorfizmusa (SNP) szignifikánsan nagyobb arányban fordul elő a gyermekkori CD-ben a felnőttkorban kialakuló CD-s betegek mintáihoz képest (14). Ezt a megfigyelést más szerzők is megerősítik (15).

Az örökletes genetikai faktorok szerepe talán az úgynevezett very early onset IBD (VEO-IBD) esetében a legmeggyőzőbb, hiszen ezen betegeknél (6 évnél fiatalabbak) nem érvényesülhet olyan erősen a környezeti faktorok szerepe és az akkumulációs jelenség. Egyes génmutációk meglétekor a kezelések hatékonysága is romlik, így a pontos genotípus ismerete hozzásegíthet a megfelelő kezelés kiválasztásához (16). Egy 2014-es cikk, amely 40 gyermek genetikai vizsgálatát végezte el, akiknél 10 éves kor alatt állapították meg az IBD-diagnózist, a VEO-IBD-t egyenesen az IL-10 receptor génmutáció egy fajtájának nevezi (17). Természetesen több tucat (~50) gén szerepét felvetették már ennek az igen súlyos formának a patogenezise kapcsán. Ezek szerepe az epithél barrier (COL7A1) és fagocita funkciótól (CYBB) kezdve a T- és B sejtek kontrollálásán (CD3 $\gamma$ , IL-21) át az immunregulációig (FOXP3, IL-10R) terjed, amelyek mindegyikének részletezése területi okok miatt nem képezi az értekezés részét, ugyanakkor a legfontosabbokról a későbbiekben részletesebben említést teszünk (16).

### 2.2.2 *Életkor és nem*

A diagnózis felállításának átlagéletkora a CD és CU esetében 15 és 40 év közötti, habár egy svéd kutatás, amelyben 2509 CU-s és 1469 CD-ben szenvedő páciens adatait elemezték, bimodális koreloszlást feltételez, amely esetében a második „csúc” 50 és 80 év közé tevődik (30). Más kutatók szintén leírták ezt a megfigyelést (31). Ennek a kései incidenciacsúcsnak számos oka lehet, például a környezeti faktoroknak való kitettség későbbi manifesztációja, vagy esetleg az ischaemiás colitis klasszikus IBD-ként való félrediaosztizálása. A nemek között drasztikus különbség nincs az IBD előfordulását illetően, ugyanakkor a CD a nők körében enyhén magasabb (32), míg a CU a férfiak körében kicsit gyakoribb (33). Ezen különbségek azonban kis mintaszámú vizsgálatokban manifesztálódnak. A késő serdülőkori, fiatal felnőttkori női predominancia a CD esetében hormonális faktorra engedhet következtetni. Fontos megjegyezni, hogy az egyes tanulmányok az életkor és nem szerinti megoszlás kapcsán eltérő eredményeket hozhatnak. A gyermekkori kórformában a genetikai faktorok szerepe a dominánsabb, hiszen a számos környezeti faktornak való kitettség ezen betegek esetében nem áll fenn.

### 2.2.3 *Rassz és etnikum*

A legszembeötlőbb megoszlás a zsidóság szempontjából jelentkezik. Már a korai tanulmányok is igazolják, hogy a CD és a CU sokkal gyakoribb a zsidók körében, mint a nem zsidó populációban (34, 35). A fekete bőrű és spanyol populáció esetében pedig jóval alacsonyabb az incidenciája a két formának, mint a fehér bőrű lakosság esetében (36). Fontos azonban megjegyezni, hogy ezek a különbségek az eltérő geno- és fenotípuson kívül származhatnak az eltérő környezeti tényezőknek való kitettségből és életmódbeli szokásokból is. Erre amerikai szerzők a légszennyezettségen és az életmódbeli különbségeken túl, az eltérő UV sugárzást hozzák példának, amely a plazma D-vitamin szintjén keresztül hathat az IBD kialakulásában fontos immunológiai faktorokra (37). Szintén jó példa a környezeti faktorok szerepére, hogy Izraelben az IBD incidenciájának emelkedése magasabb az Ázsiában és Afrikában született kibbutzi zsidók körében, mint az Amerikában vagy az Európában született zsidó populáció esetében (38). Ezt erősíti meg az a három, 1960-1979 között Baltimore-ban lezajlott tanulmányokat összefoglaló cikk is, amely leírja, hogy az IBD előfordulása emelkedik

az urbanizálódó nem fehér rasszok körében olyannyira, hogy eléri, vagy akár meg is haladja a fehér bőrű populáció körében tapasztalt értéket (36).

#### 2.2.4 Fertőzések

Dysbiózis, vagy a bél mikrobiótájának egyensúlyzavara hozzájárulhat az IBD kialakulásához (39). Egyes mikróbafajok, illetve az akut gasztroenteritisz és az IBD között a kutatóknak sikerült korrelációt igazolniuk (40, 41). Ezen kívül a kanyaróvírus (42), a *Mycobacterium paratuberculosis* (43) és a *paramyxovirus* (44) kapcsán is felmerült az infekció és az IBD kialakulásának összefüggése, ugyanakkor ezek bizonyítása még várat magára. Több tanulmány is igazolta ugyanakkor, hogy az akut gasztroenteritisz és az IBD kialakulása között összefüggés van. Egy spanyol eset-kontroll vizsgálatban a gyermekkori gasztroenteritisz a CD-vel (OR: 0.55, CI: 0.36-0.85) és a CU-val (OR: 0.6, CI: 0.42-0.86) kapcsolatban is védő tényezőnek bizonyult (45). Egy másik eset-kontroll vizsgálat, amelybe 3019 IBD-s beteget és 11600 kontroll egyént válogattak be, azok kizárása után akiknek az IBD diagnózisától számított 6 hónapon belül gasztroenteritise volt, illetve a komorbiditási tényezőkkel való korrekció után, azt az eredményt hozta, hogy az akut gasztroenteritiszen átesettek körében szignifikánsan magasabb az IBD kialakulásának valószínűsége (OR:1.40, CI:1.19-1.66) (46). Egy másik tanulmányból az is kiderül, hogy irritábilis bélszindróma (IBS) ötszörösére növeli az IBD kialakulásának rizikóját. Az azonban kérdéses hogy ebben mekkora szerepe lehet az IBS, mint téves iránydiagnózis felállításának az egyébként IBD-s betegek körében. Az a lehetőség is fennáll, hogy az IBS az IBD kialakulása során tapasztalt pre-epizódként van jelen. Abban az esetben, ha a szerzők a megelőzően IBS-diagnózissal rendelkezőket kizárták a vizsgálatból, az akut enterális fertőzés és az IBD közötti összefüggés nem állt fenn (47).

Emelkedett rizikó mutatkozott a korban egyező kontroll csoporthoz képest abban a populáció szintű dán vizsgálatban is, melyben 13,324 olyan beteget vontak be, akiknél *Salmonella* vagy *Campylobacter* okozta gastroenteritis zajlott le. Az IBD-kialakulásának esélye jóval magasabb volt a kontroll mintához képest (HR: 2.9, CI: 2.2-3.9 a teljes 15 éves utánkövetésre, HR:1.9, CI:1.4-2.6 az első év kizárását követően). Ezek alapján a megemelkedett kockázat a gastroenteritis utáni első évben volt a legnagyobb, de az utánkövetés 15 éve alatt végig emelkedett maradt. Az emelkedett

kockázat a *Salmonella* (n = 6463) és *Campylobacter* (n = 6685) fertőzés esetében azonos volt, csakúgy, mint a CD (n = 47) és CU (n = 133) diagnosztizálásának ideje a fertőzést követően (48).

### 2.2.5 *Antibiotikumok*

Feltételezik, hogy az antibiotikumok a bél mikrobiotájának módosításán keresztül növelik az IBD-kialakulásának valószínűségét. Bár az összefüggés az antibiotikum kezelések és az IBD-rizikónövekedése között bizonyítottnak tűnik, de a kauzális összefüggés koránt sem evidencia (49).

Egy 587 CD-s és 1460 kontroll egyént vizsgáló tanulmány azt találta, hogy antibiotikum használat a CD-s csoport 71%-ban történt a diagnózist megelőző 2-5 évben, míg a kontroll csoport esetében ez csupán 58% volt (50).

Egy 11 megfigyeléses vizsgálatot kielemező metaanalízisben az összesen 7208 beteg adatai alapján, az antibiotikum kezelés szignifikánsan növelte a CD kialakulásának valószínűségét (OR: 1.74, CI:1.35-2.23), de a CU esetében ez nem igazolódott (OR:1.08, CI: 0.91-1.27) (51). Több antibiotikumcsalád alkalmazása (a penicillineket leszámítva) összefüggésbe hozható az újonnan diagnosztizált IBD-s esetekkel. A rizikó leginkább a metronidazol és fluoroquinolok esetében jellemző (OR:5.01, CI: 1.65-15.25; OR:1.79, CI:1.03-3.12). A metaanalízisben feldolgozott study-k ugyanakkor igen heterogének voltak, illetve a legtöbbjük retrospektív vizsgálat volt (51).

### 2.2.6 *Fizikai aktivitás*

A fizikai aktivitás és a CD között negatív korreláció áll fenn. A Nurse's Health Study I és II vizsgálat, amelyekre korábban már hivatkoztunk, 194 711 női alanyának adatai alapján a fizikai aktivitás és a CD között ellentétes irányú összefüggést igazolt. A fizikailag legaktívabb 5% CD incidenciája 6-8/100e fő szemben a legkevésbé aktív 5% 16-11/100e fő értékével (52). A fizikai aktivitásnak a meglévő CD aktivitására gyakorolt hatásáról azonban csak kevés információnk van. Az intervenciós vizsgálatok sokszor inkonzisztensek.

Az 1308 CD-s és 549 CU-s páciens vizsgálatával foglalkozó tanulmány arra az eredményre jutott, hogy a remisszióban lévő betegek fizikailag aktívabb részében a CD-



s (RR: 0.72, CI: 0.55-0.94) és CU/IC-s (RR: 0.78, CI: 0.54-1.13) betegekben kisebb arányban következett be relapszus, bár az eredmény nem szignifikáns (53).

Egy kis létszámú (6 CD és 6 CU-s férfi) vizsgálat, amelyben a résztvevőknek kerékpározni kellett, sem a gasztrointesztinális paraméterekben, sem az aktivitásindexben nem mutatott ki változást a vizsgálatokkor, illetve hat hónappal később sem (54). Egy nagyobb, 175 fővel lezajló vizsgálat szintén nem talált szignifikáns változást a mozgás hatására a betegség aktivitásindexében (55). Egy 30 CD-s és 30 CU-s páciens bevonásával készült study, amelyben teljes életmódváltáshoz támogatást nyújtó, összesen 60 órás kurzust tartottak az alanyoknak (étrendtől a fizikai aktivitásig, több szempontos előadássorozat), a stressz faktorban ugyan jelentős csökkenést igazolt, de az aktivitás indexet itt sem sikerült szignifikánsan csökkenteni (56). A vizsgálatok részben arra is felhívják a figyelmet, hogy az aktív fázisban lévő IBD-s betegek esetében limitált a mozgásformák végrehajtásának képessége, hiszen sokszor komoly abdominális fájdalmaik vannak. Látható továbbá, hogy igen eltérő a vizsgálatok módszertana, illetve kis elemszámmal zajlanak, amely további, nagy elemszámú vizsgálatok elvégzését indokolja (57).

### 2.2.7 Túlsúly és elhízás

Meggyőző, populáció szintű adatok nem állnak rendelkezésre az obezitás és az IBD-incidencia közötti összefüggés igazolására, ugyanakkor tudjuk, hogy az intraabdominális zsírfelhalmozódás hozzájárulhat a mucosa gyulladásának kialakulásához (58). Szintén felmerül a túlsúly szerepe a mikrobióta megváltoztatásában. A legtöbb tanulmány a *Bifidobacterium* genus és a *Lactobacillus casei/paracasei* csökkenését, a *Clostridium* fajok telepszámának emelkedését írja le obez IBD-s betegekben (59). A mikróbák szerepéről a későbbiekben részletesebben értekezünk. A mezenterialis zsírmennyiség növekedése a peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) működése révén következik be, és a nagyobb mennyiségű zsírszövet a tumor nekrozis faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) fokozott szintézise révén hozzájárul a gyulladós folyamat propagációjához (60, 61).

A meglévő IBD klinikai képét szintén befolyásolhatja a hasi elhízás. Megfigyelések szerint, minden ötödik CD-s és minden harmadik CU-s gyermek obez kategóriába tartozik (62). Az IBD-s gyermekek esetében megfigyelték, hogy a

betegséghez kapcsolódó sebészeti beavatkozások gyakrabban szükségesek, mint a normál testsúlyú IBD-sek esetében (OR: 1.73, CI: 1.07-2.82) (62).

Egy 581 IBD-s beteggel zajló vizsgálat azt az eredményt hozta, hogy az obezitás (BMI  $\geq$  30) a CD-s betegek 30.3%-ában, míg a CU-s betegek 35.2%-ában van jelen. Érdekes megfigyelés volt, hogy az obez betegek körében kisebb volt az esélye annak, hogy anti-TNF kezelés, sebészeti beavatkozás vagy hospitalizáció váljon szükségessé a nem-obez kontrollokhoz képest (55.8 vs. 72.1 %) (63). Fontos megjegyezni, hogy a túlsúly és az elhízás országonként eltérő prevalenciával bír. A legtöbb irodalmi adat az USA-ból származik, ugyanakkor az Egyesült Államok a világ egyik leg „elhízottabb” országa, így az itt leírt adatok nem extrapolálhatók a magyar lakosságra. Szintén fontos megjegyezni, hogy a body mass indexet (BMI) egyes szerzők nem tartják megfelelő paraméternek a túlsúly/obezitás mérésére és annak mértékének korreláltatására IBD-s egyéneknél, hanem alternatív mérőszámok kidolgozását javasolják (64). A gyermekkori CD kapcsán a túlsúly és az elhízás azért lehet fontos rizikótényező, mert előfordulásuk pandémiásszerű terjedést mutat, tehát szerepük a kisebb korosztályokban egyre nagyobbá válik.

#### 2.2.8 Appendectomy

Több tanulmány is felvetette annak a lehetőségét, hogy az appendectomy védő hatású lehet a CU kialakulásával szemben (OR:0.173, CI: 0.06-0.52), míg a CD esetében emelkedett rizikót írtak le (RR:1.61, CI:1.28–2.02) de ennek a pontos mechanizmusa nem ismert, bár feltételezik, hogy a még nem diagnosztizált CD alakíthatta ki azokat a tüneteket, melyek az appendectomiát szükségessé tették (45, 65-67). Az egyik hipotézis szerint a mucozális immunválasz megváltozása vezet az appendicitishez, és az appendectomy ezt a változást küszöböli ki (68). Egy kohort vizsgálatban 212 963 olyan alanyt vizsgáltak, akik 1964 és 1993 között estek át appendectomián. Azon alanyok esetében 55%-al kisebb volt a CU kialakulásának kockázata akik 20 éves korukat megelőzően estek át a műtéten gyulladáisos állapot, de nem aspecifikus hasi panaszok miatt (HR:1.06; CI: 0.74-1.52) (69).

### 2.2.9 *Nem szteroid típusú gyulladásgátló szerek (NSAID-ok)*

A cyclooxygenáz (COX) mediálta intesztinális epithél barrier károsodás az aszpirin és egyéb nem szteroid gyulladásgátlók fogyasztása során az immunrendszer és a bélmikrobióta interakciójának megváltozása révén következhet be (75). Ezen kívül az NSAID és az aszpirin megváltoztatja a trombocita aggregációt és a gyulladással mediátorok felszabadulását, illetve a stressz hatására bekövetkező mikrovaszkularizációt, melyek mindegyike kulcstényező az IBD patogenezisében (76). Bár számos tanulmány felhívja az NSAID-ok IBD rizikó növelő hatására a figyelmet, az abszolút kockázat valójában kicsinek tűnik.

A meglévő IBD-s esetekben az NSAID-használat az esetek 17-28%-ában súlyosbítja a betegséget az alkalmazást követő 9 napon belül, bár a betegek egy része jól tolerálja ezen farmakonokat, ha alacsony dózisban kerülnek alkalmazásra (77, 78). A korábban már említett Nurses' Health Study adatai alapján a legalább 15 nap/hónap ideig tartó NSAID használat (az aszpirin nem), megemeli az IBD kialakulásának rizikóját (CU HR:1,87 CI: 1.16-2.99; CD HR: 1.59, CI: 0.99-2.56). Ugyanakkor ez abszolút rizikóban kifejezve kis emelkedést jelent. 7 eset/100 eFő CU és 6 eset/100 eFő CD esetében a különbség a kontroll alanyokhoz viszonyítva (76).

A szelektív COX-2 gátlókkal kapcsolatban kevés adat áll rendelkezésre. Bár voltak olyan tanulmányok, melyek a meglévő IBD súlyosbodásának fokozott esélyét írták le ezen szerek alkalmazásakor, de a randomizált kontroll vizsgálatok nem igazolták összefüggést a COX-2 gátlók és a betegség aktivitás illetve a relapszusok előfordulása között (79).

### 2.2.10 *Isotretionin*

Az isotretionin (13-cis retinoic acid) hatóanyagú készítményeket az acne vulgaris kezelésében alkalmazzák, és esettanulmányok vetették fel az IBD-kialakulásában betöltött esetleges szerepét (88). Ez a feltevés a szer biológiai funkcióját ismerve logikus is lehet, hiszen pleiotrop hatása van az intesztinális adaptív és humorális immunválaszra. Az ezt vizsgáló tanulmányok ugyanakkor eltérő eredményekre jutottak (89, 90). A zavaró tényezők között magának az acne-nak a jelenléte (gyulladásos

folyamat, mely kihathat a mucosára is) illetve az isotretotin sok esetben tetraciklinekkel történő szimultán alkalmazása is felmerül (91).

## 2.3 A Crohn-betegség és a Colitis Ulcerosa klinikai jellemzői

### 2.3.1 *A CD és CU besorolása*

Mivel a CD és a CU eltérő patomechanizmusú, klinikai megjelenésű és terápiás vonzatú betegség (97, 98), így fontos, hogy röviden ismertessük ezt a két immunmediált állapotot.

A CU a vastagbél mucosa rétegét érintő gyulladással megbetegedés, melyre relapszusos és remissziós fázisok váltakozása jellemző. Szinte mindig érintett a rectum, illetve folyamatos terjedéssel szövi át a vastagbél további területeit. Fontos azonban leszögezni, hogy csak a mucosa réteg, illetve csak a vastagbél érintett, tehát a gasztrointesztinális traktus (GIT) többi szakaszára nem terjed ki a folyamat (99). A kiterjedés mértékének leírására többféle kifejezést is használnak a gastroenterológusok. Ulcerativ proctitis a rectumra lokalizálódó állapotot jelenti. Ulcerative proctosigmoiditis esetében a rectum és sigmabél érintett, de a colon leszálló ága nem. Bal oldali, vagy disztális CU esetében a rectumtól a colon baloldali görbületéig tartó lokalizációról beszélünk. Extensive colitis esetében a proximális szakasz is érintett, de a cecum nem. Pancolitis kifejezést használunk akkor, ha a colonon keresztül a cecum is érintett a gyulladással (100, 101).

A Crohn-betegség egy transzmurális gyulladás, melyre a CU-val ellentétben nem igaz az, hogy folyamatos terjedési mintát mutat. Ez azt jelenti, hogy a gyulladt szakaszok között épp részek is megtalálhatóak. Ezen kívül nem csak a vastagbelet érinti, hanem a GIT bármely szakaszán manifesztálódhat a szájüregtől a perianális régióig. Leggyakrabban azonban a proximális colon és az ileum érintett. Mivel a gyulladással a folyamat által mélyebb szöveti rétegek is érintettek, így hegesedés és szűkületek is kialakulnak a betegség előrehaladtával. Jellemző továbbá a mikroperforációk és fistulák megjelenése (100).

Mindkét betegség esetében alcsoportok kerültek kialakításra a klinikai megjelenés, betegség súlyossága, fenotípus, lokalizáció és kiterjedés alapján. Ezek közül csak a dolgozat témájához kapcsolódó Crohn-betegség klasszifikációját ismertetjük. A legfontosabb a Montreali kritériumrendszer, mely a felnőtt CD

besorolására alkalmas. Mivel a tapasztalat az, hogy a gyermekkori Crohn-betegség sok szempontból eltérő, mint a felnőttkori forma (betegség lokalizációjának változása, betegség viselkedése az idő múlásával), így 2011-ben publikáltak egy módosítást, melyet Párizsi klasszifikációnak neveznek (**I. Táblázat**), és kifejezetten a gyermekkori manifesztációt írja le (102).

**I. Táblázat:** A Montreáli- és Párizsi kalsszifikáció.

	<b>Montreali klasszifikáció</b>	<b>Párizsi klasszifikáció</b>
Életkor a diagnózis idején	A1:17 év alatt A2: 17-40 év A3: 40 év felett	A1a: 10 év alatt A1b: 10-<17 év A2: 17-40 év A3: 40 év felett
Lokalizáció	L1: terminális ileum +/- cecum érintettség L2: colon érintettség L3: ileocolonicus érintettség L4: izolált felső gasztrointesztinális érintettség	L1: ileum disztális 1/3 +/- cecum érintettség L2: colon érintettség L3: ileocolonicus érintettség L4a: felső gasztrointesztinális érintettség a Treitz szalagtól proximálisan L4b: felső gasztrointesztinális érintettség a Treitz szalagtól disztálisan az ileum disztális harmadától proximálisan
Viselkedés	B1: nem stricturáló- nem penetráló B2: stricturáló B3: penetráló p: perianális betegség	B1: nem stricturáló- nem penetráló B2: stricturáló B3: penetráló B2B3: penetráló és stricturáló betegség egyszerre vagy eltérő időpontban p: perianális betegség (módosító tényező)
Növekedésmaradás		G0: Nincs növekedésmaradás G1: Növekedésmaradás fennáll

*2.3.2 A gyermekkori CD és CU klinikai képének gyakorlati vonatkozásai*

A CD esetében a tünetek sokszor nem specifikusak, megnehezítve a diagnózis felállítását (103). Abdominális fájdalom, rossz közérzet, étvágytalanság, fogyás és esetleg láz. Sokszor a növekedésbeli elmaradás, és a pubertás késése utal a betegség fennállására. A véres széklet, perianális fekélyek, fissurák, fistulák már a CD-re egyértelműbben utalnak (104). A laboratóriumi paraméterek közül a süllyedés, fehérvérsejtszám (WBC), C-reaktív fehérje (CRP) magas szintje jellemző. Az alacsony vas, B12 és B9 szintek jellemzőek lehetnek, és a felszívódás zavarára, esetleg vérzésre

utalnak (105). Az ezek következményeként kialakuló anémia is gyakori. Az extraintesztinális tünetek közül az arthritisz, erythema nodosum és az uveitis a gyakoriak. Ezek a tünetek és paraméterek egyértelmű diagnózis felállítására nem alkalmasak, ehhez képzővizsgálatok, endoszkópia és szövettani megerősítés is szükséges.

A CU általános tünetei a CD-hez hasonlóan a hasmenés, véres, gennyes széklet, és a tenezmus. Egyes esetekben fulmináns tünetekkel és toxikus megacolonnal jelentkezik. Ezekben a drasztikus formákban a haspuffadás jellemző, a bélhangok nem hallhatóak és elektroliteltérések igazolódnak a laboratóriumi paraméterekben. Akár masszív vérzés és Gram-negatív szepszis is jelentkezhet, illetve könnyen alakul ki colonperforáció. Az extraintesztinális tünetek közül CU-ban Bechterew-kór, primer szklerotizáló cholangitis, krónikus aktív hepatitis, uveitis, erythema nodosum, pyoderma gangrenosum és psoriasis a jellemző (104, 108). Mivel a GIT-ből csak a colon érintett, így a felszívódási zavarok és a következményes aberrációk ritkábbak, mint a CD esetében.

A vizsgáló eljárások részben hasonlóak, mint a CD esetében ismertettek. A colonoszkópia itt is perdöntő, kettős irigoszkópia pedig csak akkor kerül elvégzésre, ha a colonoszkópia technikai okok miatt nem végezhető el a colon teljes hosszán. A differenciáldiagnózis során a kórokozók által okozott colitisek kimutatása széklettenyésztés során kulcsfontosságú. Csecsemő és kisgyermekkorban a tejallergia okozta allergiás colitis kizárása is szükséges (109).

A szövettani eredmény egyértelműen tisztázhatja (90%-ban) hogy CD, vagy CU a lezajló folyamat. A CU esetében megfigyelhető az akut (neutrofil és eozinofil sejtek) és krónikus (lymfociták, plazmasejtek, monocyták, makrofágok) gyulladással sejtinfiltrátum a vastagbél és rectum nyálkahártya lamina propriájában. Jellemzően a cryptákban abszcesszusok láthatók és a kehelysejtek száma csökken. A gyulladással a folyamat soha nem terjed a submucosára, a muszkuláris rétegre, vagy a serosára, ez alól csak a toxikus megacolon ritka esete a kivétel. A CD esetében a krónikus gyulladással infiltrátum a jellemző, mely a mucosán túlterjed, transzmurális jelleget mutatva. Jellemző lehet a granulomaképződés, de ennek hiánya nem zárja ki a CD-t (110).

## 2.4 A gyermekkori IBD kezelésének rövid ismertetése

Az IBD két formája a részben eltérő patogenezis és klinikai képnek megfelelően a kezelés szempontjából közös és eltérő elemeket is tartalmaz. Éppen ezért a két forma kezelését külön ismertetjük, a nagyobb hangsúlyt a dolgozat témáját alkotó CD-re helyezve. Fontos megjegyezni, hogy terjedelmi okokból csak a gyermekkori formák kezelésének ismertetésére szorítkozunk, mely azonban eltérő lehet a felnőtt formák eljárásrendjéhez képest. Szintén fontos azt is megemlíteni, hogy az OEP eljárásrendje alapján ismertetjük a kezelés fő vonulatait, de az egyes betegek kezelésénél több szempont is felülírhatja ezt a sémát, illetve több hazai és nemzetközi ajánlás ettől a sémától eltérő pontokat is tartalmaz.

A két forma közös jellemzője, hogy a betegség súlyossága nem konstans, azaz vannak nyugalmi időszakok (remissziós fázisok) illetve súlyosbodó, fellángoló időszakok (relapszus) (111). Sem a CU, sem pedig a CD nem gyógyítható betegség, így a kezelés célja a remisszió elérése és fenntartása, illetve a műtétek elkerülése, a betegek életminőségének a javítása (112). Szintén közös, hogy a hagyományos farmakonokkal hosszú távú, megfelelő hatásfokú eredményt sok esetben nem tudunk elérni, és előbb-utóbb a betegség progrediál. A betegek egy jelentős részében csak nagy dózisú, szteroid kezelés vált ki érdemi hatást, mely a súlyos mellékhatások miatt semmiképp nem kívánatos. A javulás időtartama is időleges csupán, és a betegek körülbelül 1/3-a már a kezdetektől rezisztens a szteroidkezelésre, vagy később alakul ki a szteroid dependencia (113).

### 2.4.1 *A CD kezelésének irányelvei*

A CD kapcsán ismét fontos megjegyezni, hogy a CU-val ellentétben a GIT bármely szakaszát érintheti, és nem folytonos a terjedése, ezekből pedig az következik, hogy a tünetek, és főleg a betegség következményeinek a súlyossága is nagyobb (117). A betegség természetes lefolyása a klasszikus kezelések során alkalmazott gyógyszerekkel sokszor nem befolyásolható. Az idő múlásával a betegek 70-80%-ban szűkület, tályog fisztula alakul ki, melynek következményeképp végső soron műtéti beavatkozás válik szükségessé. Ez azért különösen nagy probléma, mert amíg a CU-s esetekben alkalmazott műtét csak a vastagbél csonkolását jelenti, addig a CD esetében a

tápanyagok felszívásában kulcsfontosságú vékonybélszakaszok excisioja is szükségessé válhat, mely felszívódási zavarokhoz vezethet (118).

A kezelést alapvetően a CD esetében is a súlyosság határozza meg. Erre a Pediatric Crohn's Disease Activity Index (PCDAI)-score rendszer szolgál (119). Ennek részletes szempontjait a **I. Melléklet** tartalmazza. A kezelések hatékonyságának megítélésére is a PCDAI score-ban bekövetkező változást használjuk. Ha 10 pontos vagy nagyobb csökkenés történik, akkor hatékony a kezelés, míg ha 10 pont alá csökken a beteg PCDAI score-ja, akkor remissziós fázis áll be.

Összességében a PCDAI<10 értékeknél inaktív CD, 10<PCDAI<30 közepesen súlyos CD, míg a 30 <PCDAI<100 értéktartományban súlyos CD-ről beszélünk.,

A perianális sipolyokkal járó formák klasszifikációjára a Perianal Disease Activity Index (PDAI) szolgál (120), ám ez a gyermekkori CD-esetében nem alkalmazható, mert a score-ok kialakításánál olyan tényezőket is figyelembe vesz, mint a szexuális aktivitás. Ez pedig gyermekkorban nem validált paraméter.

A CD-kezelésének sémáját a **II. Melléklet** ábrázolja.

A közepesen súlyos esetekben a vékonybél érintettsége esetében 5-ASA, míg a vastagbél érintettsége esetében szulfasalazin/ 5-ASA kezelés indul. Amennyiben ez nem hoz lényeges javulást, akkor orális/lokális/parenterális szteroid, parenterális táplálás, és szükség esetén antibiotikum kezelés a következő lépés. A kezelés hatékonysága esetén a szteroid leépítés, hatástalanság esetében pedig immunszupresszáns/ immunmoduláns terápia történik. Fontos megjegyezni, hogy a kizárólagos enterális táplálás, mely tulajdonképpen alternatívája a szteroidkezelésnek, a azzal egyenértékű hatást mutat, ugyanakkor a szteroidkezelés mellékhatásai ezen a módon kivédhetőek (121). Talán ez az a kezelési mód mely a leginkább kíméli a betegek szervezetét. A súlyos, és súlyos fisztulázó formák esetében orális/lokális/parenterális szteroid, parenterális táplálás, míg fisztula meglétekor antibiotikum és immunszupresszáns adása történik. Ha ezek hatékonyak, akkor a szteroid leépítést követően 5-ASA terápiára állítják át a beteget. Hatástalanság esetében immunszupresszáns/ immunmoduláns terápia történik. Ha legalább 50%-al esik a PCDAI érték, vagy 30 pont alá csökken, fisztulázó forma esetében pedig a fisztula záródása megtörténik, akkor immunszupresszáns/moduláns terápia marad. Amennyiben ilyen fokú javulás nem következik be, úgy TNF- $\alpha$ -gátló kezelés indukció történik. Ha



ennek hatására legalább 50%-al esik a PCDAI érték, vagy 30 pont alá csökken, fistulázó forma esetében pedig a fistula záródása megtörténik, akkor a terápiát folytatják, összesen 1 év intervallumig. Ha nem éri el a válasz ezeket az értékeket, akkor a TNF- $\alpha$  gátló kezelés leáll, és vagy konvencionális terápiát és/vagy sebészeti kezelést próbálnak a beteg állapotjavítása érdekében.

A kezelési séma legérdekesebb pontja a biológiai terápia, mely a TNF- $\alpha$  gátlót jelenti. Magyarországon elsősorban az infliximab (IFX) (Remicade<sup>®</sup>) kerül alkalmazásra. A fentiekből kiderül, hogy indikációja fennál bármely lokalizációjú, súlyos gyermekkori CD-ben, ahol a PCDAI>30, szteroidrefrakter vagy immunszuppresszáns melletti szteroid dependencia alakult ki, esetleg az immunszuppresszánsra intoleráns a beteg. Ezen kívül olyan fistulázó forma esetében, ahol a fistula/fistulák nem javulnak a hagyományos farmakonok alkalmazása ellenére.

Az IFX esetében 5mg/ ttkg a standard dózis intravénás infúzió formájában a 0., 2., és 6. héten. A 12. hétig nem reagáló betegek esetében a további IFX-kezelés nem indokolt, nem várható érdemi hatás. Akkor tekintjük hatékonynak az IFX-kezelést, ha lumenális forma esetében az indukciós kezelést követő 6. héten legalább 50%-os PCDAI score csökkenés, fistulázó forma esetén a drenáló fistulák számának és a váladékozás mennyiségének legalább 50%-os csökkenése, szteroid dependens kórforma esetén pedig a szteroid mennyiségének legalább 50%-os csökkentés lehetősége következik be. Ha ezek megtörténnek, akkor fenntartó kezelés indokolt, önmagában vagy immunszuppresszánsokkal együtt. Jelenleg maximum egy évet finanszíroz az Országos Egészségbiztosítási Pénztár (OEP). A kezelés alatt végig figyelni kell a szövődményként fellépő opportunistá fertőzések, malignus kórfolyamatok és neurológiai eltérések esetleges kialakulását. Az infliximab kezelés kontraindikációinak kizárása céljából vizsgálni kell az esetleges a TBC jelenlétét, fertőzéseket, demyelinizációs betegségeket, lupust (SLE-t), kardiológiai eltéréseket, és kardiológiai aberrációkat. 3 havonta laborvizsgálat szükséges a WE, Fvs, CRP, ASAT, ALAT, GGT, Karb, Kreat, Na, K szintek vizsgálatával, valamint a PCDAI score meghatározásával együtt. 6 havonta mellkas RTG vizsgálat elvégzése indokolt (122).

Mivel a CD jelentősen ronthatja a táplálékok emésztését, és a tápanyagok felszívódási hatékonyságát, így a növekedés elmaradásának és az egyes vitaminhiányok elkerülésének érdekében a táplálkozásra/ táplálásra különösen nagy hangsúlyt kell

fektetni (123). Bár a disszertációnak szorosan nem tárgya, fontosnak tartjuk ismertetni, hogy egyes felmérések alapján a CD-ben szenvedő gyermekek 46%-a magasságbeli növekedés-visszamaradást, míg 85%-uk az ideális testsúly alatti értéket mutat (124).

A nagy területre kiterjedő, súlyos esetekben enterális tápszerekkel oldható meg a szükséges tápanyagbevitel (125, 126). Ezek általában fehérjeizolátumot és közepes lánchosszúságú zsírsavakat tartalmaznak. Régebben feltételezték, hogy az úgynevezett monomer tápszerek, melyekben elemi formában vannak jelen az energiát adó tápanyagok, előnyösebbek, hiszen az emésztőfunkció károsodásakor is jól hasznosulnak, ugyanakkor ez a feltevés megdőlni látszik (127). Ha a tápszerek segítségével sem biztosítható a megfelelő energia- és tápanyagbevitel, akkor nazogasztrikus szondán keresztül tudjuk a betegeket táplálni. Az energiabevitel kiszámítására többféle képlet létezik, melyek a jelenlegi és az ideális testsúlyt is figyelembe veszik. Az egyes források az életkori szükséglet ~120%-át jelölik meg beviteli célértékként (124).

#### *2.4.1.1 Anti- TNF- $\alpha$ kezelések helye a gyermekkori CD kezelésében*

Mivel a disszertáció vizsgálatának tárgya részben az IFX, így fontosnak tartjuk a biológiai terápiák rövid ismertetését.

Magyarországon az infliximab (Remicade<sup>®</sup>) az engedélyezett anti-TNF- $\alpha$  szer, mely a fentebb ismertetett esetekben adható. Ezt a kiméra ellenanyagot Junming Le és Jan Vilcek fejlesztette ki a New York University-n, 1993-ban (128). A rekombináns DNS technológiával előállított fehérje humán-egér IgG monoklonális ellenanyag, mely egér nehéz és könnyű lánc variábilis régiók humán nehéz és könnyű lánc konstans régiók fúziójából áll. A szérumban mért felezési ideje 9.5 nap, de 8 héttel a beadást követően még kimutatható. Az indukció során a szérumban átlagosan 17.6  $\mu\text{g/ml}$ , míg fenntartó kezelés esetén 3.55  $\mu\text{g/ml}$  c.c.- detektálható (129). Hatásmechanizmusa összetett (130). Egyrészt hozzákötődik a TNF- $\alpha$ -hoz, mely a sejtek membránjához kötve fordul elő, és ezen sejtek apoptózisát váltja ki. Ez a lamina propria monocyta és T sejteit érintheti (131). Ez az apoptózis a kaszpáz-8, -9, és -3 segítségével, de a CD95/Fas útvonaltól függetlenül történik (132). A perifériás sejteket ez a hatás nem érinti, a betegekben a sejtízis mellékhatásai nem jelentkeznek. Ezek mellett az IFX az IFN- $\gamma$  termelést gátolja, és a sejt felszíni CD40L expressziót is csökkenti (133). Érdekes

módon az epithél barrier funkciót is képes helyreállítani, ahogyan azt  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA kiválasztásos teszttel is igazolták (134). Az epithél sejtek apoptózisát szintén gátolja a hatóanyag (135). Ugyanez a helyzet a mucosa endothel sejteinek VCAM-1 és CD40 expresszióját illetően (136). Mindezekkel a T sejt mucosa kölcsönhatásokat módosítja, mely a T sejtek fokozott kötődését gátolja. Az intesztinális sebgyógyulásra kifejtett hatása kapcsán a fibroblasztok TIMP-1 termelésének, p-38 úton keresztül történő módosítását okozza, mely végső soron a regenerációs folyamatok beindulásához vezet (137). Ezen kívül több faktor is ismert, mely révén antiinflamatorikus hatást vált ki: redukálja a basic fibroblast growth factor (bFGF) és vasculáris endotheliális növekedési faktor (VEGF) keringésben lévő szintjét. Ez a két anyag a fibrozis és angiogenezis markerei, és a CD-s betegekben tipikusan túltermelődnek (138). Ezen kívül az IL-6 szintjét csökkenti, illetve a koleszterin és leptinszintet növeli (130, 139).

Fontos kiemelni, hogy az infliximab mind a szolubilis, mind a membránhoz kötött TNF- $\alpha$ -t felismeri és kötődik hozzájuk. Ezzel szemben például az Etanercept, egy másik TNF- $\alpha$  gátló, melyről később írunk, csak a szolubilis formát köti meg, és nem képes sejt-líziót kiváltani (140).

Az IFX-terápia során 5mg/ttkg a standard dózis, melyet intravénásan, fiziológiás sóoldatban oldva, infúzió formájában kell beadni. A dózis felső határa 10 mg/ttkg. A kezelés klinikai hatásosságáról több tanulmány értekezik. Az egyik vizsgálatban 59%-os remissziót értek el (141). Más vizsgálatban 66%-os választ sikerült elérni, ugyanakkor egy év után ez csak 10%-v volt (142). Egy harmadik tanulmányban 100%-os válasz, és 48%-os klinikai remissziót igazoltak. A PCDAI, CRP és ESR értékek minden esetben csökkentek (143). Bár a lehetséges mellékhatások között vírusfertőzések, lymphómák, neutropénia, anémia, allergiás tünetek, depresszió, hasi fájdalom, conjunctivitis, májeltérések stb. szerepel, de egyik vizsgálatban sem számoltak be ezek fokozott gyakoriságáról.

Az IFX-hez hasonlóan az Adalimumab (Humira<sup>®</sup>) is igen ígéretes eredményeket produkál a gyermekkori CD kezelésében. Ez a szer ellentétben az IFX-el kizárólag humán eredetű részekből álló fehérje, tehát nem kiméra antitest (144). Döntően azon betegek kezelésében jön szóba, akiknél az IFX-terápia nem folytatható válaszhiány, vagy súlyos mellékhatások jelentkezése miatt. Egy 115 beteget vizsgáló tanulmányban 70%-os klinikai választ mértek, míg a szteroidmentes remisszió hossza a 3. 6. és 12.

hónapban 22-, 33- és 42%-váltak. Az adalimumabbal kapcsolatban sem jelentkeztek súlyos mellékhatások a vizsgálatban (145). A számos vizsgálat közül az IMAGINE 1 vizsgálat eredményei érdemelnek külön említést. Ebben a vizsgálatban azokat a gyerekeket kezelték, akik a glükokortikoid vagy immunmoduláns (metothrexat, thiopurin) kezelésekre nem reagáltak, és reakciót mutattak az adalimumab indukció során. A vizsgálatba vont betegek 40%-a IFX-kezelést kapott, de vagy nem reagált a szerre, vagy a súlyos mellékhatások miatt kellett megszakítani a kezelést. A vizsgálatban a standard dózis-csoport (n=93) 40 mg/ttkg dózist kapott, ha a testtömegük  $\geq 40$  kg, míg 20 mg/ttkg dózist, amennyiben a testtömegük  $< 40$  kg volt. Az alacsony dózisú csoport (n=95) 20 mg/ttkg dózist kapott, ha a testtömegük  $\geq 40$  kg, míg 10 mg/ttkg dózist amennyiben a testtömegük  $< 40$  kg volt. A 26 hetes fenntartó kezelés során 2 hetente kaptak adalimumabot. A betegek 33.5%-a volt továbbra is klinikai remisszióban. A két dóziscsoport között különbség nem volt. A legfontosabb azonban hogy azok akik IFX-naivak voltak, kb. 50%-os remissziós rátát mutattak, míg akik előzőleg IFX-kezelésben részesültek csak 20%-os remissziós rátával rendelkeztek (146).

Az IFX-en és adalimumab-on kívül több hasonló hatásmechanizmusú szer is létezik, melyeket kipróbáltak a fenti szerekre nem reagáló betegek esetében, de ezek a tesztek döntően felnőtt CD-sek esetében történtek, és a gyermekkori CD-kapcsán eseti elbírálást kíván a használatuk.

A thalidomidot az 1950-es '60-as években terhesek hányingerének kezelésére használták, de születési rendellenességet okozott, így felhagytak a használatával. Hatásmechanizmusára jellemző, hogy a TNF- $\alpha$  termelés gátlásán kívül egyéb cytokinek (IL-6, IL-10, IL-12 és IFN- $\gamma$ ) termelését, valamint az angiogenezist is gátolja, illetve serkenti az IL-2, IL-4 és IL-5 termelést (147, 148). Egy kutatásban, melyben kettős vak vizsgálatot alkalmaztak, az 56 CD-s gyerek 63%-a mutatott klinikai remissziót és 75%-uk mutatott valamilyen választ a kezelésre. Az átlagos klinikai remissziós idő 181 hét volt, míg a placebo csoport esetében ez 6.3 hét volt. A mellékhatások száma 2.1/1000 beteg-hét volt. A leggyakoribb mellékhatás perifériás neuropátia volt (149).

A Golimumab, Certolizumab pegol és az Etanercept szintén a TNF- $\alpha$  gátlásán keresztül ható szerek, de hatásukról a gyermekkori CD-kapcsán kevés az információ.

A Golimumab kezelés egy hat fős vizsgálatban eredménytelennek bizonyult a CD-kezelésében (150). A certolizumab pegol indukcióra a 6. héten a betegek 64%-a reagált, és 43%-uk ért el remissziót. Más vizsgálatok eltérő számokat mutatnak, de a szer eredményes kezelési alternatíva lehet (151). Az Etanercept ellenben nem hozott ígéretes eredményeket a CD kezelésében (152).

## 2.5 Az IBD kialakulásban és progressziójában szerepet játszó immunológiai faktorok

Bár az immunrendszerben jelentkező aberrációk csupán egy faktort jelentenek az IBD patogenezise szempontjából, mégis külön tárgyaljuk. Ez két okból történik így: egyrészt a disszertáció saját munka része a gyermekkori CD immunológiai vonatkozását tárgyalja, így arányaiban ezt tartjuk szükségesnek hangsúlyozni, másrészt pedig az immunrendszer bizonyos tagjai azok, melyek a betegség tényleges manifesztációjához vezetnek, tehát a többi faktor ezen sejteken keresztül alakítja ki magát a gyulladós betegséget.

### 2.5.1 *A T sejtek helye a normál működésű immunrendszerben*

Az immunrendszer felosztása (bár többféleképpen is lehetséges) a legegyszerűbben veleszületett és szerzett csoportokra történhet. A veleszületett immunitás jellemzője, hogy nem specifikus, és működése nem igényli az adott patogénnel történő előzetes találkozást. Olyan egyszerű tényezők is ide tartoznak, mint a gyomor sósavtermelése, a bőr, nyálkahártyák barrierfunkciója, a nyálban lévő lizozim enzim. A sejt elemek közül a neutrophill granulociták, monociták, dextrikus sejtek, és makrofágok tartoznak, melyeket összefoglalóan myeloid eredetű sejteknek is szokás nevezni. Ezeken kívül a natural killer sejtek (NK), és az éretlen lymfoid sejtek is ennek a rendszernek a tagját képezik. Működésükre jellemző, hogy mintázatfelismerő képességük van, és a baktériumok által termelt egyes molekulaszármazékokat ismerik fel. Egy patogén ellen indított immunreakció során ezek a sejtek kezdik meg először a védekezést (153).

Az adaptív immunválasz során a korábban már az immunrendszer által eliminált patogének felismerése és specifikus semlegesítése történik, mely azonban a veleszületett immunitás nélkül elképzelhetetlen lenne. A specifikus antigén felismerésnek ugyanis

elengedhetetlen feltétele a memória megléte, melyet az antigénprezentáló sejtek (APC) működése tesz lehetővé. Az adaptív immunválasz fő sejtjei a T- és B-lymfociták (154).

A normál immunműködés során, amikor is egy kórokozó átjut a fizikai és kémiai barrieréken, azonnal szembetalálja magát a veleszületett immunrendszer tagjaival, melyek a mintázatfelismerő képességüknek hála aktiválódnak és semlegesítik azt. Működésüket a citokinek segítik és modulálják. A bekebelezett és elpusztított kórokozó maradványaiból antigén keletkezik (intracelluláris degradációt követően, fragmentumok), melyet az APC-k, közülük is főképp a dendritikus sejtek (DC) a fő hisztokompatibilitási komplex (MHC)-molekulák segítségével, azokhoz kötve, a nyirokcsomókban bemutatnak, prezentálnak a CD4+ T-lymfocitáknak, melyek az immunrendszer karmestereinek is tekinthetők. Fontos, hogy a T sejt receptor (TCR) csak az MHC-hez kötött T sejt epitópot ismeri fel. A B sejtek feldolgozás nélkül is felismerik az antigén determinánsokat, és plazmasejteké alakulva antigénspecifikus ellenanyagot termelnek. Ezek a komplementrendszer aktiválásán és a fagociták Fc receptorához való kötődésük révén az antigén semlegesítést facilitálják. Igazán hatékony ellenanyagválasz akkor tud létrejönni, ha ugyanazt az antigént a B- és a Th sejtek is felismerik. A Th sejtek által szintetizált citokinek egyidejűleg több sejtre is hatnak. Aktiválják a B-lymfocitákat, és a CD8+ cytotoxikus T sejtek (Tc) effektor sejtekké transzformálását is segítik. Az APC-k egyébként a Tc sejtek felé is prezentálják az antigént. Ezen kívül a makrofágok működését is segítik. Valamennyi aktivált sejtől az effektor klónok mellett memóriasejtek is képződnek, így  $B_{\text{mem}}$ ,  $Th_{\text{mem}}$  és  $Tc_{\text{mem}}$  sejtek is keletkeznek (155).

Az APC-k és a T sejtek között a TCR-MHC-antigén komplexen kívül egyéb, adhéziós molekulák is biztosítják a kellő ideig fennálló kapcsolatot, mely az aktivációhoz szükséges. Ezt a fázist hívjuk celluláris (sejtközvetített) immunválasznak.

A plazmasejtté differenciálódott B-lymfociták fehérjetermészetű ellenanyagokat, immunglobulinokat termelnek, melyek bár közvetlenül nem tudják eliminálni a patogént, de az antigénnel komplexet alkotva (immunkomplex) a fagocitózis útján történő eliminációt gyorsítják. Ez az immunkomplex képes aktiválni a komplementrendszert is. Ezt a folyamatot hívjuk humorális immunválasznak. Azt, hogy az adaptív immunválasz mely irányba billen, az dönti el, hogy milyen kórokozóról van szó, és az milyen APC-vel lép először kölcsönhatásba. Ennek a kölcsönhatásnak a

típusa és a termelődő cytokinek ugyanis meghatározzák, hogy mely T-lymfocita szubpopuláció aktiválódik: a celluláris immunválaszt indukáló Th1, vagy a humorális immunválaszt aktiváló Th2 sejtcsoport (156).

A fenti folyamat jól tükrözi az immunrendszer kényes működését, mely igen precíz összehangolást igényel a megfelelő funkció ellátásához. Ugyanakkor emellett, hogy a patogéneket és a tumorosan transzformálódott sejteket el kell pusztítani, fontos, hogy a szervezet saját anyagai és a veszélytelen külső antigének (pl. ételmolekulák, pollen) ellen ne indítson immunreakciót. Az autoimmun, és allergiás reakciók során hasonló molekuláris, és sejtes reakciók történnek, mint a normál immunműködés során, csak az autoimmun folyamat során a saját szöveti és sejtes struktúra ellen irányul az immunreakció, míg allergiás megbetegedésekkor a fokozott immunreakció egy egyébként ártalmatlan anyag, az allergén ellen irányul (157).

#### *2.5.1.1 A T-lymfociták szerepének részletes ismertetése*

Az immunrendszer működésének általános ismertetésekor a T sejteket két nagy csoportra osztottuk, a CD8+ Tc és a CD4+ Th sejtekre. Ezen sejtekre jellemző, hogy a Th sejtek az MHC II, míg a Tc sejtek az MHC I molekulákhoz kötött antigéneket képesek felismerni, melynek hatására az adott antigént felismerni képes sejt klonális expanziója megtörténik (158).

Sokáig csak a CD4+CD8- és CD4-CD8+ sejtekre osztották fel a T-lymfocitákat, az intenzív kutatásoknak hála viszont ma már sokkal részletesebb kép áll a rendelkezésünkre (159).

A CD4+ sejtek közül a Th1 sejtek az intracelluláris patogének és protozoák elleni védekezésben fontosak és főként interferon gammát (IFN- $\gamma$ ), tumor nekrozis faktor alfát (TNF- $\alpha$ ), és interleukin 2-t (IL-2) termelnek. A Th1 mediálta immunválasz fő effektor sejtjei a makrofágok, CD8+ T sejtek, IgG B sejtek, és IFN- $\gamma$  CD4+ T sejtek. Az APC-k által termelt interleukin-12 (IL-12) kulcsfontosságú a Th1 sejté történő éréshez, a kulcs transzkripciós faktorok a STAT4 és a Tbet (160). Ezen sejtcsoport túlműködése 4-es típusú késleltetett hyperszenzitivitáshoz, és az autoimmun kórképek közül pl. egyes típusú diabéteszhez (T1DM) vezethet (161).

A Th2 sejtek az extracelluláris paraziták és férgek ellen indított immunitásért felelősek. IL-4, IL-5 és IL-13 termelésük jelentős. A Th2 mediálta immunválasz

effektor sejtjei az eozinofilek, bazofilek, hízósejtek és B sejtek. Működésüket facilitálja az IL-4 és gátolja az IL-12. A fő transzkripciós faktor, mely a differenciálódásukhoz kulcsfontosságú, a STAT6 és GATA3 (162). A sejtek túlműködése 1-es típusú IgE mediálta allergiát és hyperszenzitivitást okozhat. Allergiás rhinitis, atopiás dermatitis és asthma kialakulásában van kulcsszerepük (163).

A Th17 sejtek kulcsfontosságúak a gyulladásos válasz kialakításában a mucosa felszínén, és az autoimmunitásban is kulcsszerepük van. IL-17, IL-21, IL-22 valamint granulocyte-colony stimuláló faktor (G-CSF) termelésük jelentős. Differenciálódásuk során a transforming growth factor béta (TGF- $\beta$ ), IL-6, IL-21 és IL-23 játszik kulcsszerepet, a kulcs transzkripciós faktorok a ROR $\alpha$  és ROR $\gamma$  (164). A Th17 egy heterogén sejtcsoport, ugyanis bizonyos sejtek képesek IFN- $\gamma$  és TNF- $\alpha$  vagy IL-10 termelésre is (165). Az IL-12-höz köthető IL-23-nak (p19/p40 heterodimer) kulcsszerepe van a Th17 sejtek fennmaradásában, ugyanis az IL-23 receptor hibája feltételezhetően összefügg az IBD-kialakulásával (166). Ez egyben terápiás célpontot is jelent, ugyanis a p19 alegység (IL-23 specifikus) és p40 alegység (közös az IL-12 és IL-23-ban) egyidejű blokkolása hatékonynak tűnik a CD kezelésében klinikai vizsgálatok alapján (167). Ezzel ellentétben az IL-17 blokkolására tett kísérletek nem hoztak hasonlóan pozitív eredményeket a CD kezelése kapcsán, sőt egyesekben a betegség súlyosbodott is (168). A kutatások feltételezik, hogy az IL-17-nek a pro-inflammatorikus hatás mellett az intesztinális barrier funkció fenntartásában is szerepe van, és az anti-IL-17 szerek gátolták ezt a barrier fenntartó funkciót (169).

A regulátoros T sejtek elsősorban IL-10 és TGF- $\beta$  termelésük révén szupresszálják a Th1, Th2 és Th17-es sejteket (170). Differenciálódásukkor a FoxP3 transzkripciós faktor a jelentős (171), melyet sokáig azonosításukra is használtak, ugyanakkor ma már tudjuk, hogy nem minden Treg sejt expresszál FoxP3-proteint, viszont a nemrég aktivált „hagyományos” T sejtekben jelen lehet, így aspecifikus (172). Ezen sejtek mennyisége magasabb az IBD-sek mucosa-mintáiban, illetve alacsonyabb a perifériás vérmintákban (173). Összességében tehát transzlokáció figyelhető meg (174). A funkcionális eltérésekről is számos publikáció született. A genetikai, mikrobióta eredetű és nem genetikai környezeti hatások mindegyike hathat a Treg-ek funkciójára (175).



Ha a bélrendszerben lokalizálódnak az immunsejtek, akkor szokás őket gut-associated lymphoid tissue (GALT) néven is illetni. Ezek a sejtek a lamina propria-ban az epithél sejtek között helyezkednek el, illetve diszkrét lymphoid struktúrákban. Az epithél sejtek, APC-k, és egyéb leukociták a GALT-ban, a perifériás vérben és nyirokrendszerben lévő társaikhoz hasonlóan szintén termelnek citokineket, melyek az antigénnel szembeni viselkedést alapvetően meghatározzák. Ezen felül az intesztinális mikrocirkuláció, szállító molekulák, neuronális afferensek mind képesek módosítani az effektor funkciót a GALT immun és nem-immun sejtjeiben (176).

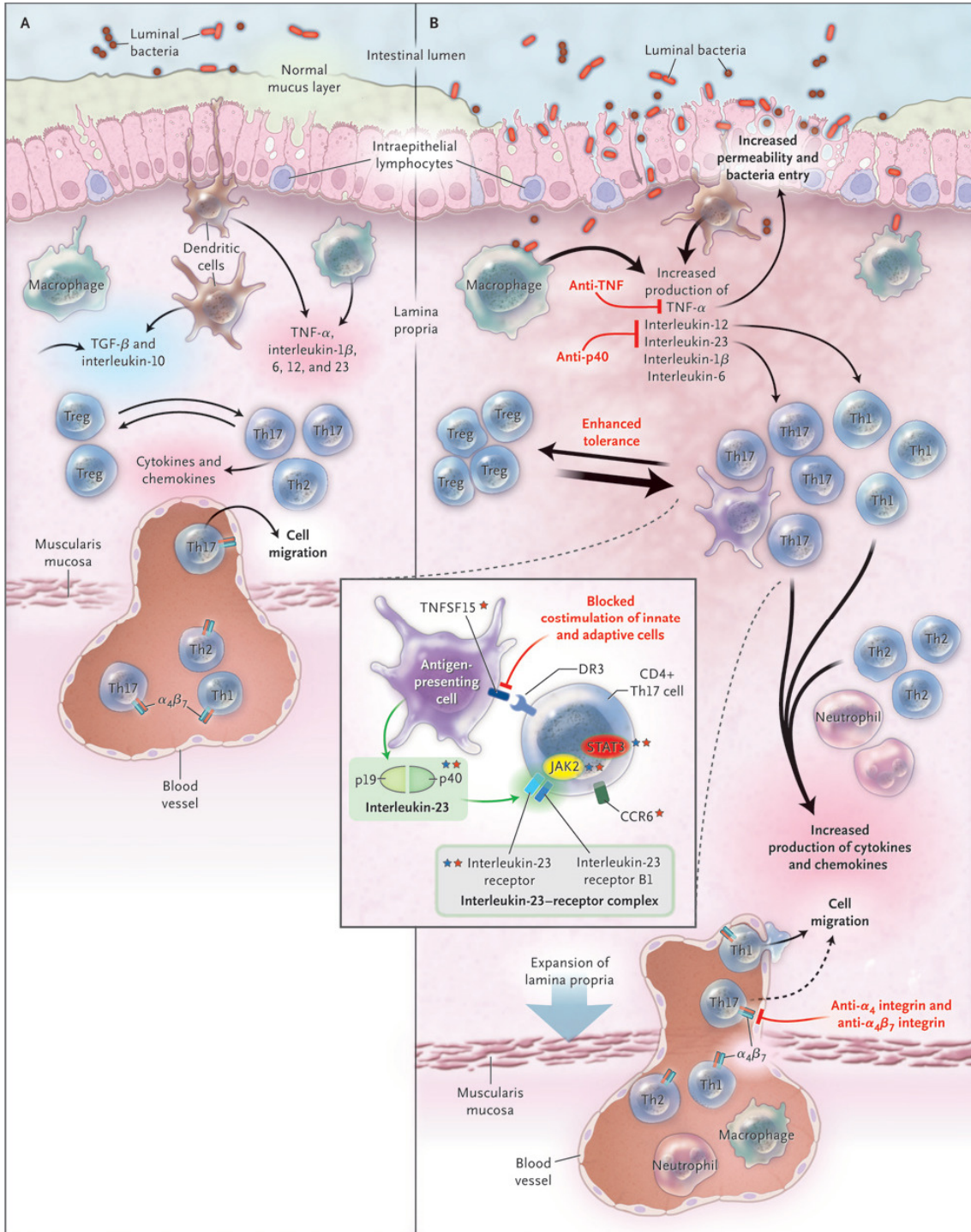
#### 2.5.1.2 *A mucozális immunrendszer fő komponensei*

Az immunválasznak megfelelően egyensúlyban kell lennie, mivel a túl erős és a túl gyenge immunválasz a mikrobákra egyaránt az intesztinális gyulladást determinálja. Az intesztinális immunválasz különböző rétegei/szintjei kooperációval védekeznek azon mikrobák ellen melyek az intesztinális szövetek közé kerültek (**1. ábra**). A bélumenben lévő nagy mennyiségű mikrobákkal szemben indított túlzott mértékű immunválasz megelőzése érdekében, a mucosa immunsejtjei egyedi karakterisztikájúak, melyek alkalmazkodtak a lokális környezeti viszonyokhoz. Ezekre jó példa, hogy a perifériás immunrendszerben lévő társaikhoz képest, a lamina propria-ban lévő makrofágok nem termelnek olyan nagy mennyiségű pro-inflammatorikus citokint (IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, RANTES, TGF- $\beta$  és TNF- $\alpha$ ) a mikrobiális komponenseknek való kitettség hatására, de a baktériumelimináló képességük hatékonyabb. Ennek hátterében a stroma sejt eredetű termékek monocita receptor expresszió és a (TGF- $\beta$  úton keresztül történő) citokin termelés alulszabályozása áll, mely azonban nem jár együtt a fagocitáló és baktericid képességek csökkentésével (177). Ez hozzájárul a megfelelő baktérium eliminációhoz a szöveti károsodás minimalizálásával párhuzamosan. Az intesztinális makrofágoknak ráadásul antiinflammatorikus karakterisztikájuk is van (178). Az intesztinális DC-k nagy mennyiségű retinolsav metabolizáló enzimet termelnek. A retinolsav pedig a T sejtek intesztinális szövetekbe történő vándorlását, és a regulátoros T sejt funkciót támogatja (179). Ezen kívül a kommenzális baktérium-reaktív T sejtek apoptózist indukáló mechanizmusok is működnek a mucosában, melyek a nagy tömegben jelenlévő, nem patogén baktériumokra specifikus T sejtek negatív szelektálásával védik ki a túlzott mértékű immunreakciót (180). IBD-s betegekben ez az

MHC II group 3 innate lymphoid cell (ILC3)-intrinsic expresszióhoz köthető mechanizmus sérül, és feltehetőleg ezáltal a patogenezis egyik faktorát is jelenti.

Bár több jól elkülöníthető, differenciált sejt került azonosításra a mucosában, ezen sejtekre egyben a plaszticitás is jellemző. Például a Th1 és Th17-es sejtek átalakulhatnak IL-4 termelő Th2 sejtekké (181) vagy Treg sejtekké (182). A Th1-es sejtek Th2 sejtekké, míg a Treg sejtek IL-17 és IFN- $\gamma$  termelő T sejtekké alakulhatnak. Ez két szempontból is lényeges az IBD-kapcsán. Egyrészt felveti annak lehetőségét hogy Treg transzfúzió során a betegbe juttatott Treg sejtek átalakulnak patológiás sejtpopulációvá, ahelyett, hogy a tervezett antiinflamatorikus szerepüket betöltenék, másrészt viszont ez a plaszticitás biológiai támadáspontot jelent, hiszen olyan szerekekkel, melyek a proinflammatorikus populációkat képesek transzformálni antiinflamatorikus sejtekké, megoldhatóvá válhat az IBD-kezelése (183).

Az intesztinális környezet képes befolyásolni, hogy a GALT sejtjei hogyan differenciálódnak. A gyulladás, termelt mediátorok, mikrobióta minőség, étrendi faktorok és megelőző fertőzések mind befolyásolják a differenciálódás irányát. Ezek hatása lehet az az emelkedett rizikó, melyet az IBD kialakulásának rizikótényezőinél ismertettünk (184).



1. ábra: A mucozális immunrendszer működésének sematikus ábrája A: normál, egészséges körülmények között B: IBD-ben (185).

### 2.5.1.3 Az IBD-vel kapcsolatos eddigi adatok

Számtalan kutatás erősítette már meg azt a feltevést, hogy az IBD a mucozális immunválasz bélmikrobiótára adott abnormális válaszreakciójának következménye. Ez egyrészt bizonyos sejtek túlműködésének és más sejtek alulműködésének tudható be, kiemelve az egyensúly kulcsszerepét (8).

#### 2.5.1.3.1 Az epithél barrier aberrációi

Az IBD-kialakulása kapcsán az emelkedett intesztinális permeabilitás, magasabb baktériumszám a mucusban, és magának a mucosának az eltérései is felmerülnek, mint tényezők. Egér modellben igazolták, hogy az epithél barrier funkciózavara spontán colitis kialakulásához vezethet. Az epithél sejtek expresszálnak bizonyos receptorokat, melyeket az immunsejtek felszínén is megtalálunk, és amelyek az antigén prezentálásában játszanak szerepet. Tanulmányok igazolták, hogy az epithél sejtek általi abnormális antigén prezentáció vagy az intraepitheliális lymfocitákkal való interakció az IBD kialakulásával összefügg (186, 187). Az epithél sejtek (pontosabban a nagy szekretoros aktivitást mutató, pl.: Paneth sejtek) nem-feltekeredett intracelluláris fehérje kezelési képessége, mely az endoplazmás retikulum (ER) stressz hatására bekövetkező folyamata, szintén összefüggésben áll az IBD-vel (188). A Paneth sejtek egyéb abnormalitásai is ismertek a CD-ben. Például a különböző immunjelátviteli útvonalak zavarai, melyek egyes esetekben az antimikrobiális proteinek termelésének rendellenességéhez vezetnek (189).

#### 2.5.1.3.2 Az immunsejtek diszregulációja

Fokozott immunsejt felszaporodás és aktiváció szintén jellemző a különböző immunsejtek esetében. Myeloid sejtek gyulladósos fenotípussal (proinflammatorikus cytokintermelés) vannak jelen a CD-s betegek lamina propria rétegében (190). CD-s betegek esetében szintén megfigyelték, hogy a NKp44(+)/NKp46(+) NK egyensúly megbomlott a mucosa rétegben és az NKp46(+) NK sejtek IFN- $\gamma$  termelés révén szerepet játszhatnak a patogenezisben (191). CD-s és CU-s betegek perifériás vérmintáiban az IL-2, és IL-2 receptor alfa (IL-2R- $\alpha$ ) és IL-2 receptor béta (IL-2R- $\beta$ ) mRNS szintek szignifikánsan magasabbak voltak, mint a mucosalis sejtekben. Az mRNS szintek jól korreláltak a fehérjeszintekkel, és az IL-2R- $\beta$  mRNS szintek

magasabbak voltak a mucosalis sejtekben, mely azok IL-2-re vonatkozó nagyobb affinitására utal. Ez adhat magyarázatot arra, hogy az intesztinális sejtek miért proliferálnak nagyobb ütemben, expresszálnak több IL-2 transzkriptumot és szekretálnak több IL-2-t a perifériás sejtekhez képest. Az IBD-s mintákban a sejtek több IL-2R- $\alpha$  és IL-2R- $\beta$  mRNS-t termelnek, ugyanakkor az IL-2 mRNS szintjük alacsonyabb, ezzel a CU- és CD-ben tapasztalható IL-2 aktivitás defektus az IL-2 transzkripció csökkenésre vezethető vissza. A CD-s betegek intesztinális sejtjeiben mérték a legmagasabb IL-2R géntermék mennyiséget, mely igazolja ezen sejtek fokozott válaszát az IL-2-re és egyben megerősíti, hogy a szérumból mérhető IL-2R- $\alpha$  a bél T sejt hiperaktivitását tükrözi (192).

A T sejt proliferáció is emelkedett bizonyos kísérleti elrendezésekben CD-sek mintáinak *Staphylococcus aureus*al történő inkubációja során (193). Ugyanakkor a proliferációs vizsgálatok ellentmondásosak, nem mindegyik erősíti meg a kommenzalista bélbaktériumok jelenlétében történő fokozott osztódást az IBD-s betegek körében.

A mucozális és perifériás B- és plazmasejtek emelkedett száma, valamint az autoantitestek, és a mikrobiális komponensek elleni antitestek magasabb mennyisége utal arra, hogy az abnormális B sejt szabályozás szintén fontos szerepet játszik az IBD-kialakulásában (194, 195). A feltételezett colon autoantigének mint a p40 (196), atipusos perinukleáris anti-neutrofil cytoplazma antitest (P-ANCA) (197) és egyéb autoantitestek, valamint a mikrobiális termékek antitestjei mind igazolásra kerültek IBD-s betegekből, és egyes esetekben a rokonaikból is. Ugyanakkor a kutatások mindeddig nem találtak olyan antigént, amely direkt módon részt venne az IBD-patogenezisében.

Néhány gyulladássos sejt, mint például a neutrofilek megtalálhatók a mucozában IBD fennállásakor, ugyanakkor ezek a lamina propriaiban nem találhatók meg normál körülmények között, ez utal arra, hogy vérerekből történő kivándorlás zajlik le. Ezt a folyamatot „homing”-nak hívja a szakirodalom, és több koordinált lépést igényel. A leukocyta „roll” történik az endothéliumon keresztül, és a szövet által termelt chemokinek adhéziós molekula termelést idéznek elő, mely végső soron a stabil adhéziót alakítja ki. Ha a leukociták adherensé válnak, a „diapedesis”-nek nevezett folyamat során áthaladnak az endothél rétegen (198). A leukocyták és endothél sejtek

felszínén történő fokozott adhéziós molekula expresszió (integrin  $\alpha 4\beta 7$ ), emelkedett chemokin termelés és a leukocyták vaszkuláris endothéliumhoz történő kötődése mind igazolt jelenségek az IBD-s betegek esetében. Ez a jelenség egyben terápiás célpontot is jelent, és kifejlesztésre valamint tesztelésre kerültek olyan farmakonok, melyek ezen jelenség módosításán keresztül hatnak (199). Az a két antitest mely az  $\alpha 4\beta 7$  integrin heterodimer támadásán keresztül hat a lymfociták lamina propria-ba történő vándorlásában, külföldön már elfogadásra került terápiás célra. A natalizumab, mely  $\alpha 4$  integrin ellenes antitest, a CD kezelésében külföldön engedélyezett. Ez a szer az  $\alpha 4\beta 7$  és az  $\alpha 4\beta 1$  integrineket egyaránt blokkolja, a közös  $\alpha 4$  alegységre kifejtett hatása révén (200). A vedolizumab nevű antitest CD-ben és CU-ban történő alkalmazását külföldön szintén jóváhagyták, ez a szer az  $\alpha 4\beta 7$  integrin blokádon keresztül hat (201).

#### 2.5.1.3.3 *A termelt mediátorok rendellenességei*

A módosult sejtpopulációkon kívül az immunregulátoros, és inflammatorikus cytokinek szintje is módosul az IBD-ben, melyek közül némely szintje jól korrelál a betegség aktivitásával (202). Maguk a cytokinek, ahogyan azt már ismertettük, az immunreakció finomhangolásában játszanak szerepet, ezért szokás őket az immunrendszer karmestereinek is nevezni.

A CD4+ lymfociták CD-betegekben igen nagy mennyiségű IFN- $\gamma$  és TNF- $\alpha$  cytokint termelnek, melyeknek proinflammatorikus hatása van (203). Mivel ezeket a cytokineket elsősorban a Th1 sejtek termelik, sokáig úgy gondolták, hogy a CD kizárólag a Th1 sejtek diszregulációjának következménye. Ezeket a megfigyeléseket és a feltételezést több egérmódelLEN végzett kísérlet is megerősítette CU kapcsán (204). Számos vizsgálat vezetett oda, hogy 1995-től kezdve a TNF- $\alpha$  antitest terápiák kidolgozásra kerültek (205). Árnyalja azonban a képet, hogy az IL-4, IL-5 és IL-23 szintek szintén változnak egyes esetekben. Ezeket a mediátorokat a Th2 sejtek termelik, és a Th1 funkció korlátozás, mérséklése a céljuk (206). Ugyanakkor az eozinofilek infiltrációjához is vezetnek, melyek a gyulladás kialakulását propagálják (207). Ezen cytokinek emelkedett szintjét főleg CU esetében igazolták egér, és humán minták esetében is. A Th17 sejtekhez köthető cytokinek eltérései szintén jelen vannak a mucozában IBD-s betegek esetében (208). Az IL-23-függő jelátvitel és cytokin szekréció ezen sejtekben hozzájárul a Th1 sejtek fokozott cytokintermelése miatt

létrejövő proinflammatorikus állapothoz. Újabb kutatások, melyek az IL-12/IL-23 tengely támadásával kapcsolatosak, igazolják ezen faktorok kritikus szerepét a patogenezisben (209).

Az egér és humán vizsgálatok egyaránt rámutattak arra, hogy a CD4+ T sejtek egy csoportja képes szupresszorként fellépni. Ezen sejtcsoport tagjai a már említett CD4+CDR25+Treg-ek (FOXP3 expresszálók), Th3 sejtek és Tr1-es sejtek. Ezek valószínűleg az IL-10 és TGF- $\beta$  citokintermelésükön keresztül fejtik ki hatásukat. A regulátoros sejtek egy része a thymusban keletkezik, míg más indukált vagy adaptív regulátoros sejtek a GALT-ban, *in situ* keletkeznek (210). A CD8+ sejtek szintén termelnek IL-10 és TGF- $\beta$  citokineket, melyek az inflammatorikus jelválaszt blokkolják. Bár a Treg-ek IBD-ben betöltött szerepével kapcsolatban viszonylag kevés koherens adat áll rendelkezésre, de a Treg indukációs és erősítő terápiák esetleges alkalmazásának lehetőségét igen aktívan vizsgálják. Szintén érdekesek azon vizsgálatok, melyek a TGF- $\beta$  szupresszív funkciójának erősítését vizsgálják (211).

A TL1A, mely egy TNF-szerű citokin, a CD-ben a death domain receptor (DR3)-al lép kapcsolatba, szintén lényeges lehet a patogenezis folyamatában. A TL1A a Th1, Th2, Th17, NK, myeloid, és éretlen lymfoid sejtek citokintermelésének módosítása révén hat (212).

A citokineken kívül az arachidonsav és metabolitjai, a reaktív oxigén gyökök, és nitrogén termékek szerepe is felmerül, ugyanakkor ezek szerepére a disszertáció témájából fakadóan nem térünk ki részletesen.

#### 2.5.1.3.4 A mikrobióta szerepe

A disztális ileum és a colon nagy mennyiségű baktériumot tartalmaz. A gazda-mikróba kölcsönhatások előnyösek lehetnek, de káros hatások is felléphetnek, melyek végeredményeképp intesztinális gyulladás alakul ki. A megfelelő mikroba kolonizáció elengedhetetlen a megfelelő tápanyag-, energiametabolizmushoz valamint a perifériás és intesztinális immunrendszer működéséhez. Ugyanakkor az intesztinális lumen tartalmazhat olyan mikrobákat és mikróba eredetű faktorokat, melyek hozzájárulnak az IBD kialakulásához, amennyiben ennek genetikai háttere szintén adott az egyénben (213).

Az intesztinális mikrobiótára a szülés során „tesz szert” az újszülött, ugyanakkor az első életévben igen gyorsan változik. Felnőttekben egyénre jellemző mikrobióta van jelen, mely viszonylag stabilnak mondható, bár ingadozások előfordulnak a környezeti és fejlődési faktorok hatására (214). Szintén fontos, hogy a mikrobióta hogyan modulálja a mikrobiális funkciókat, úgymint az energia metabolizmus. Egérmodellekben igazolták, hogy a mikrobiótának, és a gazda mikrobafelismerő, és arra reagáló képességének fontos szerepe van az optimális antimikrobás protein funkcióban, epithél sejt, éretlen limfoid sejt, NK, makrofág, IL-17 termelő T sejt, intesztinális és perifériás Treg és immunglobulin működésben és termelésben (215). Jó példa erre, hogy egérmodellben igazolódott, a Th17 sejt differenciálódás korrelál a *Cytophaga-Flavobacter-Bacteroides* fajok jelenlétével. Ezen Th17 induktor baktériumok hiánya a lamina propria-ban a FoxP3+ Treg-ek emelkedett számával járt együtt. Mindezek tehát az IBD patogenezise szempontjából kulcsfontosságú Th17:Treg tengely egyensúlyának intesztinális baktériumflóra általi szabályozását igazolják (216).

Ugyanakkor a kölcsönhatás kétirányú, hiszen számos tényező, mely a gazdaszervezet részéről áll fenn (pl.:obezitás) befolyásolja a mikrobióta összetételét és funkcióját (217). Ezek a módosító faktorok aztán gyulladással irányba tolhatják el az egyébként kiegyensúlyozott intesztinális mikrobiota-gazda mutualizmust.

A környezeti faktorok, melyek tulajdonképpen a gazdaszervezeten keresztül hatnak, szintén jelentős hatást gyakorolnak. A táplálkozási faktorok, férgesség, gyakoribb antibiotikum használat mind növelik az IBD-prevalenciáját, ahogyan arról a rizikófaktorok részben értekeztünk (51, 218). A XX. századi növekvő prevalencia mögött valószínűleg leginkább ezen faktorok állnak. Ezek közül is leginkább a gyermekkori antibiotikum használat tűnik a legmegalapozottabb rizikótényezőnek, ahogyan arról már írtunk.

IBD-s betegek esetében a bélflóra mikrobiótájának diverzitása és denzitása egyaránt megváltozik, többek között azon baktérium speciesteké is, melyek a mucozával direkt módon kapcsolatban állnak. A funkciómódosulás többek között az oxidatív stressz és tápanyag regulációban nyilvánulhat meg (219, 220). Ezek a változások már a gyermekkori forma kezdeti diagnózisánál is megfigyelhetők. Az hogy a mikrobióta változásai okai az IBD-nek, vagy a propagáló folyamat következményei, nem tisztázottak. Eddig nem sikerült egy konkrét faktort azonosítani, mely a változásokért



önmagában is felelős lenne, ezért ma úgy fogalmazhatjuk meg, hogy a baktérium közösségekben bekövetkező változások szerepet játszhatnak az IBD-kialakulásának kezdeti lépéseiben, illetve a gyulladás súlyosbodásában. Ezzel összhangban áll az a megfigyelés, mely bizonyos bakteriális komponensek ellen irányuló immunválaszt igazolt. Például a CD-sek 54%-ban mutatható ki flagellin DNS szegment ellenes antitest, míg a kontroll alanyoknak csupán 4-10%-ban (221, 222). A mikrobiális antigénnel szembeni immunreaktivitás (ASCA, anti-OmpC CD-ben; pANCA, anti-OmpC CU-ban) összefüggésbe hozható az IBD agresszívabb fajtájával (223). Szintén nem tudjuk azonban, hogy ez az emelkedett antitest szint egy válasz-e a növekvő baktériumoknak való kitettségnek, mely az epithél barrier perturbációja miatt következik be, a már meglévő intesztinális gyulladás következménye, vagy az antitestek a patogenezisben magában is aktívan részt vesznek-e.

Bár a humán IBD vizsgálatokból a mikrobióta jelentősége a betegség elleni védelemben, indukcióban, és manifesztációban nem tisztázott, az egér modellek sokkal koherensebb képet nyújtanak. Például a CU-hoz társuló gyulladás a legkülönbözőbb egérmodellekben kialakul normál mikróbaflóra mellett, ugyanakkor féregmentes bélközegben nem (224). A CU-s egerekből történő baktérium transzfer egészséges állatokba bizonyos esetekben indukálja az intesztinális gyulladást (225). Más tanulmányokban specifikus baktériumtörzsekkel sikerült gyulladást kiváltani, ha adott genetikai defektusok jelen voltak az állatban (226). A probiotikus baktériumtörzsek megfelelő kombinációja viszont képes mediálni a gyulladással szembeni védelmet a növekedési faktorokon keresztül, melyek az epithél sejtek újraképződéséhez szükségesek. Erre jó példa, a *Lactobacillus rhamnosus* által termelt p40 fehérje EGFR aktiváló hatása (227). Érdeemes megjegyezni egy mondattal, hogy ez a moduláló hatás nem csak colitisre igaz, hanem más betegségekre is, mint például a metabolikus szindróma (228).

További kutatások azt is tisztázták, hogy melyek azok a specifikus mikrobiális komponensek (mint a polysacharide A, melyet a normál flóra baktériumai közül a *Bacterioides fragilis* termel (229), és a mikrobiális anyagcseretermékek, mint a rövid szénláncú zsírsavak), melyek az intesztinális gyulladás szabályozására képesek (230).

Természetesen nem csak a baktériumfajok játszanak szerepet a megváltozott mikrobióta által okozott hatásokért. A vírusokkal kapcsolatban is rendelkezünk

adatokkal. A *Caudovirales* bakteriofágok emelkedett mennyisége például igazolódott az IBD-s betegekben (231). Egér vizsgálatokban a génmutáció meglehetősen a *norovirus* kolonizáció vezethet az elváltozásokhoz (232). A gombákkal kapcsolatban még viszonylag kevés információ áll rendelkezésre, de a kutatások intenzíven vizsgálják a szerepüket az IBD patogenezisében (233).

#### 2.5.1.3.5 A genetikai faktorok szerepe

Eddig több mint 200 olyan lókuszt azonosítottak, mely az IBD kialakulásban szerepet játszhat. Ezek közül vannak olyanok, melyek mind a CU, mind a CD kialakulását facilitálják, míg vannak olyanok, melyek csak az egyik kórforma kialakulásában játszanak szerepet (234). Körülbelül 70%-a ezen géneknek közös a CD és CU esetében, mely a jelentős genetikai átlapolást igazolja (235). Sok variáns a gének intron régiójában található, és nem az általuk kódolt fehérje aminosav sorrendjét módosítják mutációjukkor, hanem sokkal inkább az expressziót befolyásolják. Ez az expresszió módosítás enyhe fokú, ami egybevág azzal a megfigyeléssel, hogy minden egyes lókuszt hibája csupán kismértékű IBD kialakulási gyakoriságnövekedést produkál. Az útvonalak egy csoportja, amennyiben a súlyosabb genetikai defektusok együttesen jelentkeznek, összefüggésbe hozható azonban a VEO-IBD-vel, mely igen fiatal korban kialakuló kórforma (236). Ez utal arra, hogy a genetikai szerep is meghatározó, hiszen a környezeti faktorok többségének ráhatása az ennyire fiatal betegekben elhanyagolható. Az IBD-hez köthető sérült jelátviteli útvonalak és genetikai hibák más immunmedált betegségekkel és a *mycobacterium* által kiváltott betegségekre való nagyobb fogékonysággal is összefüggésbe hozható (235). A kutatások több olyan genetikai hibához köthető jelátviteli út módosítást is leírtak, melyek a patogenezisben fontosak lehetnek. Jelenleg is több kutatás zajlik a pontos gének és géntermékek azonosítására, melyek terápia-célpontot jelenthetnek.

#### 2.5.1.3.6 A veleszületett immunitás genetikai defektusai

A legelső gén, amelyet a CD patogenezise kapcsán azonosítottak a NOD2, másik nevén CARD15 volt (237). A mai napig az összes azonosított génvariáns közül ez növeli meg leginkább a CD kialakulásának valószínűségét. A vad típusú NOD2 fehérje a baktériumok proteoglikánjára reagál, és a receptor-interacting protein 2 (RIP2)-n

keresztül az NF- $\kappa$ B aktivációját váltja ki. Ez a folyamat IL-22 cytokin felszabadulást eredményez, mely a Th17 sejteken keresztüli korai T sejt választ indítja be. Ezen kívül a regenerating islet-derived protein III $\gamma$  (REGIII $\gamma$ ), és a CC-chemokine ligand 2 (CCL2)-felszabadulás révén a LY6C<sup>hi</sup> monociták barrier erősítő funkciója is megindul, végső soron pedig a baktérium eliminációjához vezet. A variáns meglétekor ez a funkció nem működik. Egér vizsgálatokban ilyen esetekben az enterális patogénekre való fogékonyság nő, és a lumen baktériumösszetétele is megváltozik (238). Maga a NOD2 többféle sejtben is expresszálódik, ide értve az epithél sejteket, makrofágokat, dentrikus sejteket, endothél sejteket és a stroma sejteket is, ezzel is hangsúlyozva a fehérje többrétű szerepét (239). Az örökölt NOD2 allél mutáció 1,5-3,7 szerez növekedést jelent az adott egyén CD kialakulási rizikójában. A vad típus esetében a CD rizikója 0.18%, egy hibás NOD2 allél esetében 0.54%, míg mindkét allél mutációja esetében már 5.4% (240). Érdekes módon ezeket az értékeket az európai őslakos populációban igazolták, az ázsiai populációnál nem sikerült összefüggést kimutatni a gyakori NOD2 variáns és a CD között (241). A NOD2 variáns a CD korábbi életkorban történő manifesztációjának, az ileális és fibrostenotikus forma kialakulásának esélyét növeli, illetve CU-ban a műtétet követő állapotjavulás értékét csökkenti (242, 243). Egy meta-analízis, mely 49 tanulmány összesen 8893 alanyának adatait elemezte, azt az eredményt hozta, hogy a NOD2 mutáció a komplikált CD esélyét (RR:1.17, CI: 1.10-1.24) és a műtétet szükségességét (RR 1.58, CI: 1.38-1.80) növeli a vad típussal rendelkező betegekhez képest. (244)

A NOD2-n kívül több IBD-asszociált génmódosulat is módosíthatja a veleszületett immunrendszert. Egészséges embereknél a veleszületett immunitás sejtjei igen változóan reagálnak a mikrobáknak való kitettségre. Ez az egyének közötti variancia részben genetikailag kódolt, és hozzájárul a fertőző megbetegedésekre való hajlam és az immunmediált betegségekre való fogékonyság közötti kényes egyensúlyhoz. Több tanulmány is vizsgálta a veleszületett immunitás sejtjeit azon egyénekben, akik hordozzák az IBD kialakulásában fontos rizikó variánsokat. Néhány esetben igazolták, hogy fokozott jelválasz van a veleszületett immunitás részéről. Az IRF5, TNFSF15, TPL2 faktorok szerepe igazolódott, mely a mikroorganizmusok jelenlétekor fokozott cytokintermelést eredményez (245). Más esetekben a variáns csökkenti a jelválaszt, ilyen például az ICOSLG, mely faktor a

baktérium clearance mechanizmusok hatékonyságát határozza meg (246). Mindezek szintén a megfelelő baktérium clearance és a szorosan kontrollált immunválasz egyensúlyának fontosságát hangsúlyozzák.

#### 2.5.1.3.7 *Mikróba clearance útvonalak defektusai*

Az autophagy-related 16-like 1 (ATG16L1) és immunity-related GTPase M (IRGM) fehérjék bizonyítottan részt vesznek a CD kialakulásában. Ezen proteinek az autofágia stimulusának kialakításában vesznek részt, mely az intracelluláris patogénekkal szembeni rezisztencia létrejöttében fontosak (247). Az ATG16L1 mutációja összefüggésbe hozható a Paneth- és goblet sejtek CD-ben megfigyelt váltoásaival, a csökkent baktérium elimináló képességgel és fokozott adipocytokin (leptin, adiponectin) valamint emelkedett IL-1 $\beta$  termeléssel egerekben és humán mintákban egyaránt (248, 249). A funkcióvesztéssel járó variáns megléte az autofágiát facilitáló proteinekben, az MTMR3 mutációja gátolja az autofágiát és a CD-s minták jelentős részében kimutatható (250).

A nikotinamid adenin dinukleotid foszfát (NADPH)-oxidáz génmutációja, a reaktív oxigén gyökök termelésének módosításán keresztül szintén fontos szerepet játszik a patogenezisben a mikrobiális clearance befolyásolásán keresztül. Ez a mutáció a VEO-IBD és a felnőtt forma esetében is megfigyelhető (251).

A nagyszámú egérvizsgálat eredményeként, mely a gazdaszervezet immunrendszere általi mikrobióta modulációt igazolta, sok kutatás indult, melyek a különböző IBD rizikó variánsok intesztinális mikrobiótára gyakorolt hatásmechanizmusát vizsgálják (252).

Jó példa a mikrobióta funkcionális és kompozícióbeli megváltozására a Fucosyltransferase 2 (FUT2) mutációja által kiváltott hatás. A FUT2 a H antigének testfolyadékokban, és intesztinális mucozában történő szintéziséért felelős enzim. A H antigén egy oligoszacharid, mely egyszerre szolgál kapcsolódási pontként és széndonorként az intesztinális baktériumok számára. Azok, akik homozygotaként hordozzák a FUT2 gén funkcióvesztéssel társuló allélvariánsát, emelkedett CD rizikóval jellemezhetőek. Ennek oka a mikrobiomban tapasztalható fokozott szénhidrát és lipid valamint a csökkent aminosav szintézis. A mikrobiota ezen egyénekben funkcionálisan és összetételileg is megváltozik (253).

### 2.5.1.3.8 A Cytokin útvonalak aberrációi

A cytokinek IBD-ben betöltött kulcsfontosságú szerepével összhangban eddig több olyan jelátviteli út genetikai defektusát is leírták, melyek a mediátor proteinszarmazékok szintézisének módosulását eredményezik. Ez azért fontos immunológiai szempontból, mert az immunválasz minőségét és intenzitását befolyásoló cytokinekből bekövetkező „hiba” a gyulladás kialakulásának kulcsmomentumát jelenti.

A Th17/IL-23 tengely kapcsán az IL-23 receptor kódoló variánsát a CD és az CU kapcsán is kimutatták. Az 1-es kromoszóma rs11209026, c.1142G>A, p.Arg381Gln SNP-je, mely a proinflammatorikus IL-23 cytokin receptorának egy alegységét kódolja, szintén jelentős változásokat okoz. Megléte képes 2-3-szoros védettség kialakítására az IBD-vel szemben (254). Maga az IL-23 a Th17-es sejtek kialakulásában játszik fontos szerepet, és az IL-23R rizikó variánst hordozó egyéneknél a keringő Th17-es sejtek mennyisége alacsonyabb, illetve az IL-23-ra adott T sejt jelátviteli folyamatok is kevésbé érélyesek (255).

Érdekes, hogy a STAT3, JAK2 és TYK2 (olyan szignálmolekulák, melyek az IL-23 dependens jel alul regulálásáért felelősek), az IL12B (az IL-12 és IL-23-ban közös, p40-es alegység) és a RORC (a Th17-es sejtekhez köthető transzkripciós faktor) mind összefüggésbe hozhatók a CD-vel (256, 257). Ezzel több gén azonos útvonalra kifejtett hatásának konvergenciája látszik igazolódni. A STAT3 „A” rizikó variáns CD-s colon szövetében az IL-6, IL-8, és a neutrofilek által termelt S100A8, S100A9, S100A12 szintek magasabbak. Az IL-8 receptort expresszáló neutrofilek száma is magasabb a CD-s biopsziás mintákban (258). A perifériás vérmintákból nyert szérumból az IL-17 szintek érdekes módon nem magasabbak, mint az egészséges kontroll egyéneké (259).

Az IL-10-el kapcsolatos eredmények is igen jelentősnek tűnnek. Ez a cytokin a gyulladásos választ gátolja (260). Kimutatták, hogy az intakt IL-10 receptor közvetítette válasz nélkül a Treg sejtek nem képesek a Th17-es sejtek mucosa komponensek elleni reakcióját gátolni (261). Egyes ritka IL-10 funkcióvesztésével és IL-10 receptor mutációjával járó variánsok a VEO-IBD-vel hozhatók összefüggésbe (262). Az IL-10 és IL-10 receptor deficiens egerekben spontán colitis fejlődik ki (263). A szérumból mért IL-10 értékek az aktív CD és CU-esetében emelkedettek, míg remisszióban az

egészséges kontrollok szintjéhez hasonlóak (264). Mindezek a gyakori és ritka variánsok, valamint az egér és humán eredmények konvergálására jó bizonyítékok.

A TGF- $\beta$  szerepe döntően a Treg sejtek aktiválása, ezáltal az antiinflammatorikus jelválasz beindítása. A TGF- $\beta$  receptor szubsztrátjaiként szolgáló Smad protein család funkcióhibái szintén köthetők az IBD kialakulásához. A TGF- $\beta$  jelátvitelt gátló Smad7 emelkedett szintű jelenléte igazolódott az IBD-sek mucozájában, és a mucozából tisztított T sejtekben (265). Ezzel szinkronban, CD-s betegek lamina propriajából izolált mononukleáris sejtek TGF- $\beta$ 1 termelése alacsonyabb volt, mint a kontroll minták esetében mért érték (266). A Smad7 gátlását tesztelő trialok ígéretes eredményeket hoztak (72%-os válasz szemben a placebo 17%-val), mely további vizsgálatok elindulását eredményezte (211). A szérumból mért TGF- $\beta$ 1 koncentráció értékek a kezelésre reagáló betegek esetében emelkednek, míg a rezisztens esetekben ez nem figyelhető meg (267).

A TNFSF15 (TL1A) egy TNF-szerű fehérje, melyet endothél sejtek termelnek (268), és amely a T sejtekben kostimuláló faktorként működik, és az IL-2 hatását erősíti fel, végső soron tehát a gyulladásos cytokin (pl.: TNF- $\alpha$ ) termelést facilitálja (269). Emelkedett expressziója IBD-ben a veleszületett immunitás baktériumokra adott felerősített válaszát váltja ki (270). Az európai bennszülött populációban megfigyelt TNFSF15 variáns az ázsiai populációban is jelen van IBD-fennállásakor, ezzel populációkon átívelő, a patogenezis szempontjából kulcsfontosságú genetikai faktornak tűnik (271).

Egy genetikai variáns, mely olyan régiót érint, amely cytokin receptorok (IL-1 és IL-18) egy csoportját kódolja, megjelenik a CD és CU esetében is (235). Ez a mutáció az IL18RAP, IL18R1 és IL1R1 csökkent expresszióját eredményezi a veleszületett immunitás sejtjeiben. A receptorok alacsonyabb expressziója pedig az IL-18 és IL-1 $\beta$  cytokinekre adott válasz mértékét csökkenti, melyek mikrobiális termékeknek való kitettség esetében szabadulnak fel (272).

Mivel a veleszületett immunrendszer folyamatosan kapcsolatban áll az adaptív immunrendszer működésével, így számos génvariáns, mely IBD-ben a veleszületett immunrendszer tagjait érinti, az adaptív immunrendszer tagjaira is befolyást gyakorol.

Az adaptív immunrendszerre direkt módon is ható genetikai faktorokra jó példa PTPN2 és a PTPN22. Azon CD-s betegek, akik PTPN2 variánst hordoznak, emelkedett

Th1 és Th17 illetve csökkent Treg marker szinteket mutatnak az intesztinális szövetállományban, és a szérumban egyaránt (273).

Az epitheliális sejtfunciót befolyásoló génekkel kapcsolatban az X-box binding protein 1 (XBP1) és ORMDL3 mutációi tűnnek a legjelentősebbnek, melyek a selejtfehérje válaszban fontosak. Ez a folyamat főképp az ER-stresszben fontos, de az autofágiában is jelentős szerepe van (8, 274).

## 2.6 A T sejt aktiváció folyamata, különös tekintettel a kalcium jelre

Ahhoz, hogy az immunrendszer megfelelően tudjon működni, és az adaptív immunválasz során az antigént felismerni képes T sejtek klonális expansiója megtörténjen, az adott sejtnek aktiválódnia kell. Ennek legjellegzetesebb korai momentuma a TCR antigénkötését követő foszforilációs kaszkád és a következményes kalcium influx. Enélkül a folyamat nélkül sem az adott sejt nem tud osztódni, sem a cytokintermelése nem indul be.

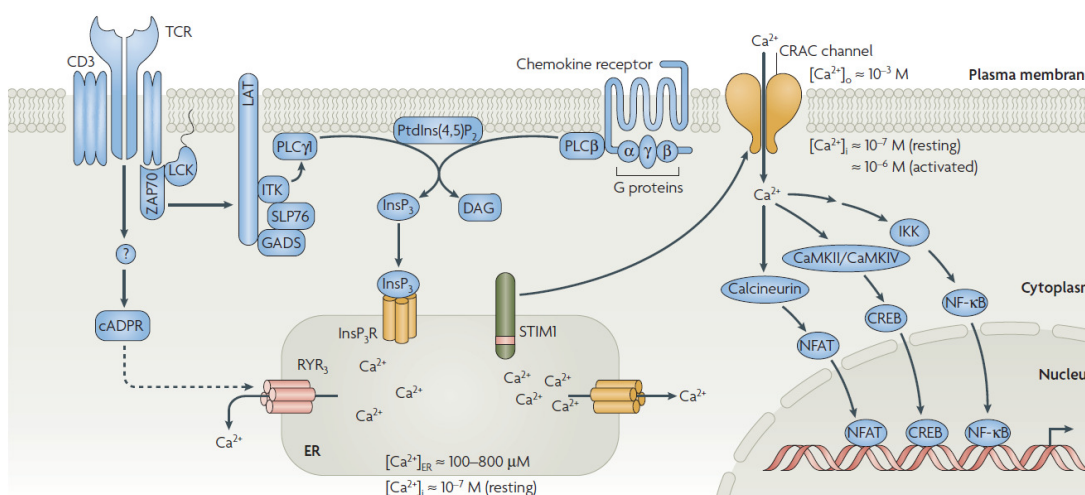
A nyugvó T sejtekben a citoszolban lévő kalcium koncentráció viszonylag alacsony, és igen precízen szabályozott. Körülbelül 100 nM értéket vesz fel, mely az aktivációt követően 1  $\mu$ M-ra emelkedik. A folyamat (**2. ábra**), mely ehhez az emelkedéshez vezet, a TCR-hez kötött (275). A receptor monovalens, és ellentétben a B-sejtek receptorával, mely intakt antigén felismerésével aktiválódik, a TCR egyetlen antigén kötő helye a saját APC-k MHC molekulájához kötött antigént ismeri fel, köti meg.

A kötődés hatására indulnak meg azok a jelátviteli folyamatok, melyek végső soron a T sejt aktivációjáért felelősek. Első lépésként olyan tirozin-kináz fehérjék aktiválódnak, mint az LCK és a ZAP70 ( $\zeta$ -chain-associated protein kinase of 70 kDa), melyek az SLP76 (SRC-homology-2-domain-containing leukocyte protein of 76 kDa) és LAT (linker for activation of T cells) foszforilációját váltják ki.

Ez a foszforiláció az ITK (interleukin-2-inducible T-cell kinase) TEC kináz, illetve a foszfolipáz C $\gamma$ 1 (PLC $\gamma$ 1) aktivációját váltja ki. Ehhez hasonlóan, a G-fehérje kapcsolt kemokin receptorhoz történő kötődés a PLC $\beta$  aktivációjához vezet. A PLC $\gamma$ 1 és PLC $\beta$  a membrán foszfolipidek közül a PtdIns(4,5)P2 (foszfátidylinositol-4,5-biszfoszfát) hidrolíziséhez vezet, melyből InsP3 (inozitol-1,4,5-trifoszfát) és DAG (diacylglycerol) keletkezik.

Az InsP3 kötődik az ER (endoplazmás retikulum) felszínén lévő receptoraihoz (InsP3Rs), mely az intracelluláris raktárból történő, citoszolba irányuló kalcium kiáramláshoz vezet (276). A jelátvitel ezen fázisa tehát a kalcium jel első fázisának tekinthető. Az ER kalcium szintjének csökkenése a STIM1 (stromal interaction molecule 1) molekula dimerizációjához vezet, mely a plazma membránhoz vándorolva kiváltja a CRAC (calcium-release-activated calcium) csatornák megnyílását, mely az extracelluláris médiumból történő kalcium beáramláshoz vezet (277).

Ez a sejten kívülről történő kalcium influx a kalciumjel második, fenntartó fázisa. A magas kalcium szint a calcineurin aktiválódását váltja ki a kalmodulin A és B konjugálásán keresztül, mely végső soron az NFAT (nuclear factor of activated T cells) defoszforilációját indukálja. A defoszforilált NFAT a nucleuszba penetrál és kötődik bizonyos gének (pl.: IL-2) promóter régiójához, mely beindítja az adott sejt aktivációjának további fázisait (278).



**2. ábra:** A T sejtek aktivációja során bekövetkező foszforilációs és kalcium jel kaskádorsor (275).

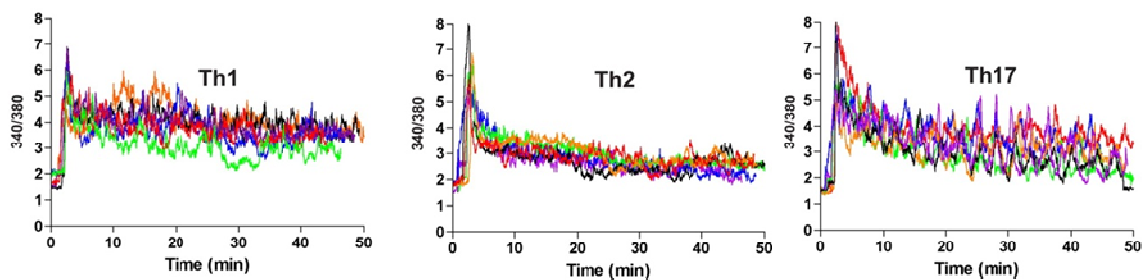
A kalcium jel finomhangolása (hossz, lefutás, nagyság) több ponton keresztül történik a lymphocitákban. Ez elengedhetetlen ahhoz, hogy a kation mennyisége kellő ideig magas maradjon ahhoz, hogy transzkripciós szintű változást indukáljon, ugyanakkor a sejtek negatív membránpotenciálját (kb.  $-60$ -  $-70$  mV) ne borítsa fel.

Az intracelluláris raktárak közül az ER képes jelentős mennyiségű kalciumot kivonni a citoszolból a SERCA (sarco/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase) csatornán



keresztül. A mitokondrium szintén képes az MCU (mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uniporter) csatornák segítségével viszonylag nagyobb kation mennyiséget felvenni (279). A citoszolból az extracelluláris médiumba a PMCA (plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase) nevű kation csatorna transzlokálja a kalciumot annak szükségtelenül magas mennyisége esetén. Egyébként a kalcium magas koncentrációja a CRAC csatornák működésére is negatívan hat, megelőzve a felesleges influxot (280). A fentiekén kívül, a sejtmembránban található az az kálium csatornák, melyek jelen értekezés témáját is szolgáltatják. Ezek közül kettő az, amely a legnagyobb szereppel rendelkezik. Ezek közül az egyik a feszültség kapuzott  $\text{Kv}1.3$  csatorna, a másik a kalcium koncentráció által szabályozott  $\text{IKCa}1$ -es csatorna. Feladatuk, hogy a beáramló kalcium ionok által jelentett pozitív iontöbbletet a szintén pozitív töltésű kálium ionok sejtéből történő effluxával ellensúlyozzák (275). Ezek részletes ismertetésére külön alfejezetben kerül sor.

Fontos megjegyezni, hogy az egyes szubpopulációk eltérő kalcium beáramlás kinetikával jellemezhetőek (**3. ábra**). A Th1-es sejtekre egy magas kiindulási csúcs jellemző, melyet egy fenntartó fázis követ, amelyet több oszcilláció jellemez. A Th2 sejteket szintén magas kiindulási csúcs jellemzi, de ezután gyors csökkenő fázis következik. A Th17-es sejtekre pedig a kezdeti magas csúcs után egy Th1 és Th2 sejtek közé tehető, fenntartó fázis jellemző (281).



**3. ábra:** Az egyes T sejt szubpopulációk kalcium beáramlás kinetikája (281). Az ábrán a Fura-2 kalcium szenzitív fluoreszcens sonda MFI értékei az idő függvényében vannak ábrázolva. A kalciumjelet ionomycinnel indukálták.

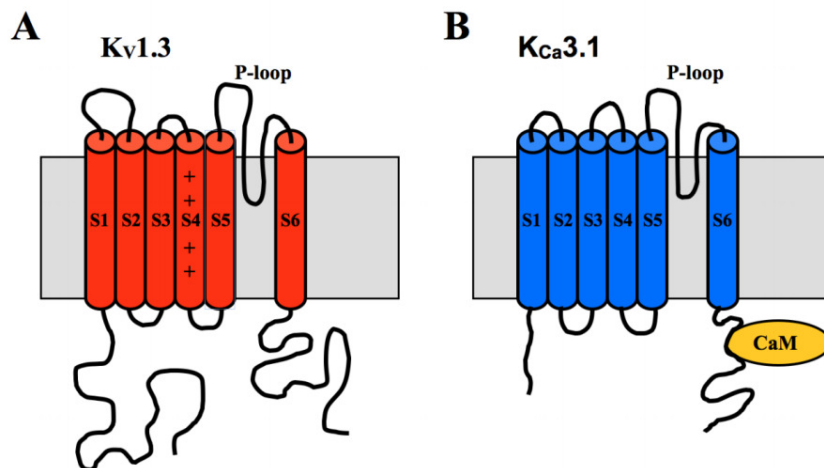
## 2.7 A káliumcsatornák szerepével kapcsolatos vizsgálatok eredményei

Mivel a kálium csatornák T sejt aktivációban betöltött funkciójukkal kapcsolatos első vizsgálatok igen régen történtek, így az elmúlt évtizedekben számtalan kutatás zajlott le az egyes patológiás állapotokban betöltött esetleges szerepük tisztázásának érdekében.

Az IKCa1-es kalcium koncentráció mediált csatornát először 1958-ban írták le humán erithrocitákon (282), majd 1997-ben Naomi és munkatársai azonosították a hKCa4 gént, mely a közepes ellenállású, kalcium aktiválta kálium csatornát kódolja (283). A génről transzlálódott fehérje 427 aminosavból áll és 6 transzmembrán szegmenst formál, illetve az 5-ös és 6-os domén között magát a pórust, melyen keresztül az ionáramlás történik (**4. ábra**). A csatornafehérje C-terminális vége a kalmodulinhoz kötődik. Mikor az i.c. kalcium koncentráció emelkedik, a  $\text{Ca}^{2+}$  ionok a kalmodulin EF karjához kötődnek, és végső soron a csatorna nyitását váltják ki (284). A csatorna konduktanciája 12pS. A csatorna megnyílása az intracelluláris kalcium koncentráció  $K_d = 270 \pm 8$  nM értékénél következik be. Gyakorlatilag a nyugalomban lévő T sejtek  $\sim 100$  nM i.c. kalcium c.c.-jénél a csatornák zárva vannak, míg a maximális aktivitás során a kb. 10x-re emelkedő c.c.-nél már az összes csatorna megnyílik (285). Ionszelektivitása a  $\text{K}^+$  ionhoz viszonyítva az alábbiak szerint változik:  $\text{K}^+ (1.0) > \text{Rb}^+ (0.96) > \text{NH}_4^+ (0.17) > \text{Cs}^+ (0.07)$ . Grissmer és munkatársainak adatai szerint a csatornák működése feszültség független a  $-100-0$  mV tartományban (286). T sejt aktiváció hatására 10-25x mennyiségre növekszik meg a sejtfelszíni IKCa1-es csatorna mennyisége. A nyugvó T sejtek felszínén  $\sim 20$  csatorna található, az aktivált (mitogén stimulált) blasztokon viszont  $> 500$  expresszálódik (286). Mások nyugvó sejteken  $\sim 8$ , míg aktivált sejteken  $\sim 800$  csatornát mértek (287).

A feszültség függő kálium csatornák a legnagyobb, 70 lókuszt magába foglaló humán kálium csatorna csoportot képviselik (288). Először ideg és izomsejtekben írták le őket. Bár a T sejtek felszínén több képviselőjük is expresszálódik, a Kv1.3-as, feszültségfüggő káliumcsatorna funkciója a legfontosabb. Nyugvó T sejtekben  $\sim 300$  Kv1.3 csatorna expresszálódik. Aktiváció hatására egyes adatok szerint 600, míg más adatok szerint 1500 csatorna is lehet sejtenként. (289). Az IKCa1-es csatornához képest tehát kisebb mértékű csatornaszám növekedésről beszélhetünk az aktiváció hatására. Ennek a csatornának a szerepe először szintén nem a lymfociták, hanem a neuronok és

izomsejtek kapcsán merült fel. DeCoursey és munkatársai 1984-es közleményében vetette fel azt, hogy ezen ioncsatornáknak a T sejt mitogenezis folyamatában is szerepe lehet (290). Ugyanebben az évben, szintén a Nature-ben Matteson és munkatársai is közöltek egy Patch-clamp technikát a lymphociták  $K^+$ -csatornáinak mérésére (291). Ettől kezdve több vizsgálat is zajlott a csatornákkal kapcsolatban. A csatornát kódoló génről átíródott mRNS T sejtekben történő jelenlétét, illetve a gén 12-es és 13-as kromoszómán történő lokalizációját Grissmer kutatása tisztázta. Ez a kálium csatorna 6 transzmembrán domént tartalmaz, a negyedik doménon egy kevert típusú ismétlődéssel. A transzlálódott fehérje 63 842 Da súlyú, és 6 transzmembrán szegmensből áll. Az S4 szegmens szolgál feszültségszenzorként, míg a P-hurok és az S6 szegmens a csatorna pórusát alkotják (292). A csatorna konduktanciája 14pS, -26mV-os  $V_{1/2}$ -ed aktivációs értékkel és 39msec (-60mV-on) deaktivációs értékkel rendelkezik (293).



**4. ábra:** A Kv1.3 (A) és az IKCa1 (B) csatorna felépítése. CaM: kalmodulin (294).

Fontos megjegyezni, hogy a T sejt szubpopulációk a differenciálódásuk során eltérő Kv1.3 expressziós mintázatra tesznek szert. Míg a naív CD4<sup>+</sup> T sejtek egyformán tartalmazzák a Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3 és Kv1.6 csatornákat, az effektor CD4<sup>+</sup> sejtek már csak a Kv1.3 csatornákat expresszálják, ezeket azonban 6x nagyobb mennyiségben. Az anergiába kerülő T sejteken újra megjelenik a Kv1.1 és Kv1.2, illetve esetleg a Kv1.6, ugyanakkor a Kv1.3 csatorna mennyisége csupán 3x-os a naív CD4<sup>+</sup> T sejtek felszínén mérhető mennyiséghez képest (295).

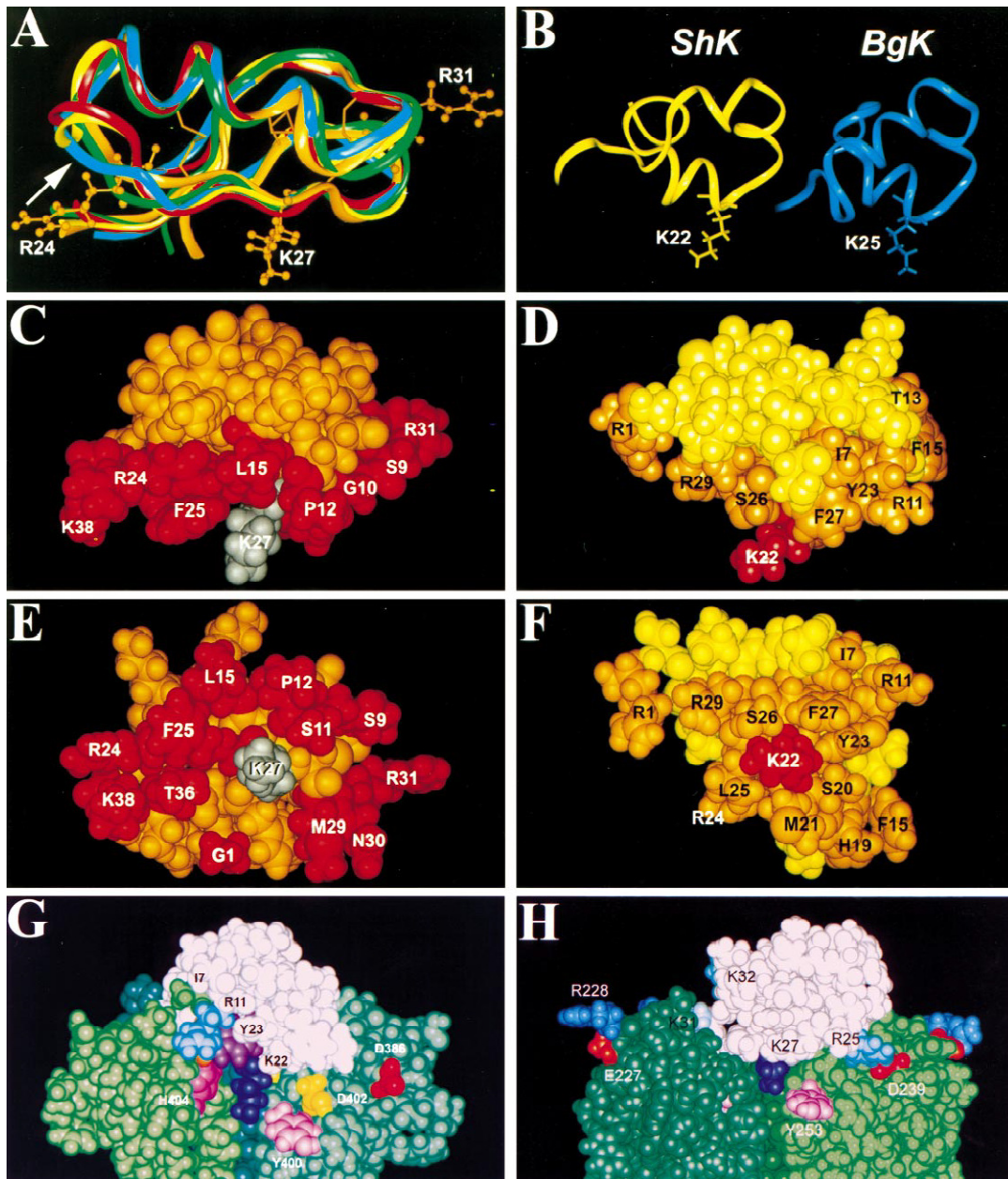
### 2.7.1 A kálium csatornák funkciómódosításnak lehetőségei

Mivel a fent ismertetett káliumcsatornák szerepe kulcsfontosságú a T sejtek működésében, így már viszonylag korán felmerült módosításuk esetleges haszna különböző kórállapotokban (296).

A csatornákra eleve több fiziológiás tényező is hat (természetesen a már ismertetett kalcium és feszültség értékeken kívül). A foszforiláz-kináz C (PKC) például bizonyítottan stimulálja a Kv1.3 csatornát. A PKC gátlása a Kv1.3 funkció megváltozását is eredményezi (297). Ez a hatás az IKCa1 esetében is megjelenik (287). A hypoxia akut esetekben (20 mmHg, 2 perc) 20%-al, hosszabb kitétség esetében (1% O<sub>2</sub>, 24 h) 47%-al csökkenti a Kv1.3 csatorna fehérje szintjét Jurkat sejtekben (298). Érdekes módon az IKCa1-es csatornára a hypoxia nem hat (299). A csatornafehérje tirozin-foszforilációja szintén jelentős gátlást idéz elő a működésben (300). A sphingosine-1-foszfát és a lysofoszfátid sav az IKCa1-es csatornát képes aktiválni (301). A hőmérséklettel kapcsolatban a Kv 1.3 csatornákról kimutatták, hogy bár az aktivációs küszöb, és a steady-state inaktiváció értéke azonos 22°C-on és 37°C-on, de az aktivációs idő-konstans, inaktiváció, deaktiváció, és az inaktiváció alóli felszabadulás hőmérsékletfüggő. Összességében magasabb hőmérsékleten erőteljesebb aktiváció figyelhető meg (302). A pH hatása szintén figyelemreméltó. A csökkenő pH az aktivációs küszöböt magasabb értékek felé tolja el (303). Ezek a faktorok azonban, ahogyan említettük is, fiziológiás változások. Az esetleges terápiás célként való alkalmazáshoz specifikusabb gátlószereket kerestek a kutatók.

A legérdekesebb gátlószerek a skorpióméregből izolált peptidmolekulák. Sok potenciális skorpióvenomból kinyerhető polypeptidről derült ki, hogy van IKCa1 gátló hatása (296, 304, 305). A Charybdotoxinról (ChTx), (melyet a *Leiurus quinquestriatus* méregéből izoláltak) igazolódott először, hogy blokkolja valamennyi IKCa csatorna működését, illetve a Kv1.3-as csatornára is hat, nanomólos koncentrációban. További skorpióméregből izolált toxinok a noxiustoxin, kaliotoxin, a dolgozat tárgyát képező margatoxin (MgTX), agitoxin-2, hongotoxin, HsTx1, maurotoxin, Pi1, Pi2 és Pi3. A tengeri rózsafajok közül például a *Stichodactyla heliantus*-ból az ShK-t, a *Bunodosoma granulifera*-ból a BgK-t izolálták (306, 307). A kis molekulájú inhibitorok közé is több, eltérő szelektivitású és K<sub>d</sub> értékű vegyület tartozik.

A ChTx, kaliotoxin, MgTX, noxiustoxin és agitoxin-2 szerkezetében közös, hogy konzervált háromdimenziós szerkezettel rendelkeznek. Ezt a struktúrát három diszulfidhíd stabilizálja, kivéve a HsTx, maurotoxin és Pi1 esetét, ahol négy diszulfidhíd található szerkezetstabilizálóként (308-314). A szerkezetekre jellemző, hogy 3 szálú anti-paralell  $\beta$ -sheet és egy  $\alpha$ -hélix alkotja, mely hélix a 2-es és 3-as szál között helyezkedik el. A kaliotoxinban ez a szerkezet a hélix Cys14 és Cys18 közötti diszulfid híddal, valamint a  $\beta$ -sheet 3. szálában a Cys33 és Cys35 közötti diszulfid híddal stabilizálódik. A MgTX-ben az  $\alpha$ -hélix és  $\beta$ -sheet 2. szálát összekötő hurok 2 további molekula liganddal több, mint a kaliotoxinban és az agitoxin-2-ben, illetve ennek a huroknak a helyzete szintén eltérő a ChTx-hez képest. (**5. ábra A**, nyilakkal jelölve) Ezek a különbségek lehetnek a felelősek az eltérő csatorna gátlás specifitásért az egyes szerek között. A kaliotoxin csatornakötő felszíne a molekula horizontális síkja alatt elhelyezkedő Leu15 és Arg31 aminosavaknak tudható be (**5. ábra C & E** (310, 315)). Az ShK (**5. ábra B**, baloldalt) 2 rövid  $\alpha$ -hélixet tartalmaz, mely a 14-19-es részt (**5. ábra B** teteje), a 21-24 részt (alul) és egy N-terminális véget (mely egy kibővített részt tartalmaz, a 8-as molekularészig ér, és amelyet egy pár összekapcsoló csavar követ, mely a 3<sub>10</sub>-es hélixre emlékeztet) fogja közre. A BgK szintén tartalmaz két  $\alpha$ -hélixet, melyek az ShK-hélixétől hosszra és helyzetre kicsit különböznek (az ShK hélice 14-19 hosszúságával hosszabb, mint a BgK 9-16-os hélice), de összességében a két molekula hasonló. Az ShK csatornakötő felszíne a molekula horizontális síkja alá lóg, és egy Arg1 és Phe15 kíséri (**5. ábra D és F**) (306, 316). A skorpió toxinokhoz hasonlóan, az ShK egy centrális lizint tartalmaz (Lys22), és hasonlóan a kaliotoxin Arg24-éhez, az ShK egy második, töltött molekularészt (Arg11) is tartalmaz, mely a toxin csatornával való kölcsönhatásához szükséges (316, 317).



**5. ábra:** Toxin struktúrák és kapcsolódás (296).

A: 5 skorpiotoxin struktúrájának összehasonlítása. Kék:ChTx, sárga: NTx, piros: MgTX, narancssárga: KTx, zöld: AgTx2.

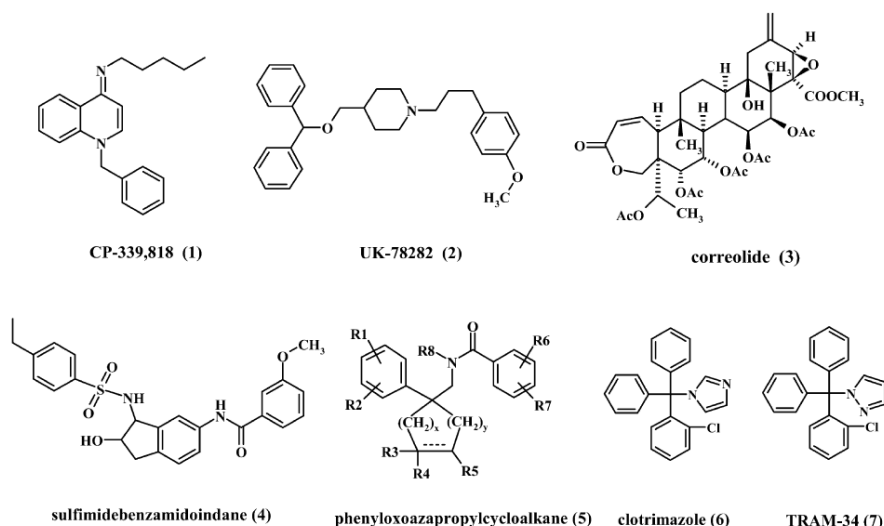
B: A BgK és ShK szerkezete. Az ShK Lys22 és BgK Lys25 jelölve.

C: A KTx csatornakötő felszíne (piros) és a szembeni oldala (sárga). A Lys27 szürkével jelölve. D: Az ShK csatorna-kötő felszíne (narancssárga) és szembeni oldala (sárga). E: A KTx csatorna-kötő felszíne. A Lys27 szürkével jelölve. F: Az ShK csatorna-kötő felszíne. A Lys22 pirossal jelölve. G: Az ShK (fehér) kötődési konfigurációja a Kv1.3 külső tubulusával (zöld). A nézet felőli molekulárszkezet a szerzők eltávolították a képről, a többi alegység más zöld árnyalattal lett jelölve az átláthatóság miatt. A Lys22 (sötétkék) benyúlik a Kv1.3 pólusába. A többi alegység színekódjai: ShK: Ile7 (világos zöld), Arg11 (világos kék), Ser20 (narancssárga), Tyr23 (lila). Kv1.3: Asp386 (sárga),

Asp402 (piros), His404 (magenta). H: A ChTx (fehér) kötődési konfigurációja az IKCa1 (zöld) csatornához. A nézet felüli molekularészeket eltávolították a képről a láthatóság miatt. Az oldalláncok színkódjai: ChTx: Arg25 és Lys32 (cián kék), Lys27 (sötétkék), Lys31 (világos kék) IKCa1: Arg228 (kék), Glu227 (narancssárga), Tyr253 (lila), Asp239 (piros) (27).

Mindezek alapján a szerkezetben meglévő eltérések ellenére, a tengeri rózsza és skorpió toxinok csatornakötő felszínei hasonló dimenziókkal rendelkeznek (25Å széles és 8Å mély), és hasonló ligandokat tartalmaznak a csatornával való interakcióhoz.

Azok a tanulmányok, melyek high-throughput toxin eltávolítás,  $^{86}\text{Rb}$  efflux monitorozás, vagy membrán potenciál assay segítségével vizsgáldtak, új generációs, nanomoláros Kv1.3 csatornagátlók azonosításához vezettek. Ilyenek az 1-benzyl-4-pentylimino-1,4-dihydroquinoline (318), a piperidin UK78282 (319), a C20-29-[3H]dihydrocorreolide (diTC) (320), phenyloxoazapropylcycloalkánok (321), és a sulfimidebenzamidoindánok (322) (6. ábra).



**6. ábra:** Néhány kismolekulájú K<sup>+</sup>-csatorna gátlószer (296).

Még újabb kutatások az IKCa1-re nagy szelektivitású, nanomólos koncentrációban is gátló, triarylmetán komponens, a TRAM-34 megalkotásához vezettek (323). Ezen kívül a csatorna-toxin interakciók pontos ismerete lehetővé tette, hogy kisebb módosításokkal jelentősen szelektívebb gátlószereket állítsanak elő. Az ShK, mely a Kv1.3, Kv1.1., Kv1.4 és Kv1.6 egyaránt gátolja, módosítása során például megalkották az ShK-Dap<sup>22</sup> nevű analógot, melyben a Lys<sup>22</sup>-t lecserélték a mesterséges, rövidebb, pozitív töltésű diaminopropionsavra (317). Ez a származék viszonylag

szelektív a Kv1.3 csatornára, és pikomólos koncentrációban is effektív. Ehhez hasonlóan alkották meg a ChTx-Glu<sup>32</sup>-t, mely a ChTx analógja, és amelynek 30x nagyobb affinitása van az IKCa1-re mint a Kv1.3 csatornára (316). Ehhez szükség volt annak felismerésére, hogy a ChTx Lys<sup>32</sup>-je a Kv1.3 csatorna külső részének negatív töltésű részeivel reagált, mely negatív részek az IKCa1-ben nincsenek jelen. Így a toxin 32-es helyzetébe történő glutamát beépítése megszüntette ezt az affinitást, mely a Kv1.3-hoz való kötődéshez ugyan szükséges, de az IKCa1-hez való kapcsolódáshoz nem. Ezáltal úgy tudták csökkenteni a feszültségfüggő csatornához való affinitást, hogy közben az IKCa1-hez való kapcsolódási hajlam nem csökkent (296). Az IKCa1 és a Kv1.3 csatorna gátlószereit azok Kd értékével a **III. Melléklet** tartalmazza.

### 2.7.2 A K<sup>+</sup>-csatornák gátlásával kapcsolatos eredmények

Ahogy azt korábban már ismertettük, a humán nyugvó T sejtek felszínén ~300 Kv1.3 és ~8 IKCa1 csatorna található. A mitogén stimuláció hatására pedig döntően az IKCa1-es csatorna expressziója nő meg. Ezekből az következik, hogy a nyugvó T sejtekben a Kv1.3 csatornák membrán potenciál fenntartó szerepe jelentősebb, míg az aktivált sejtekben mindkét csatorna egyformán fontos.

Egy már idézett kutatásban a mitogén stimuláció az IKCa1 csatorna expresszióját a sejtenkénti 8-ról 300-800 közé emelte. Ugyanebben a kutatásban a TRAM-34 és a clotrimazole ~5µM koncentrációban már eredményesen blokkolta a T sejt aktivációt (287). Egy másik vizsgálatban a *Sanguis draxonis*, vagy közismertebb nevén a Sárkányvér hatóanyagát, a Loureirin B-t vizsgálták Jurkat sejteken, és azt az eredményt kapták, hogy mind az intakt növénykivonat, mind a tisztított hatóanyag gátolta a Kv1.3 expressziót, a kalcium beáramlást, illetve a phytohemagglutinin (PHA) indukálta IL-2 termelődést (324). Egérvizsgálatokban Kv1.3 KO egerekben kisebb encephalomyelitis előfordulást találtak (325). A cytokintermelésre kifejtett vizsgálatok szerint, a 18β-glycirretinsav 10-100µM c.c. között gátolja a Jurkat sejtek Kv1.3 csatornáit, illetve annak expresszióját is. Emellett a kalcium beáramlást is blokkolta, valamint a sejtproliferációt és az IL-2 termelést is (326). Mások a Diphenyl phosphine oxide-1 (DPO-1) alkalmazásával szintén Kv1.3 blokkolást értek el, illetve a Jurkat sejtek gátlószerekkel történő inkubációja az IL-2 szekréció koncentrációfüggő gátlását és a kalcium beáramlást is csökkentették. Ugyanebben a kísérletben a MgTX és a ChTx is



hasonló hatást ért el (327). Az IKCa1-es csatorna gátlásáról is állnak rendelkezésre eredmények. A TRAM-34 1 $\mu$ M c.c.-ben gátolta a lymphociták mitogén stimulációt követő IL-2 produkcióját (16.6% IL-2+ sejt vs. 7.9% IL-2+ sejt TRAM-34 kezelés mellett), illetve az IFN- $\gamma$  termelő képességét (17.6% IFN- $\gamma$ + sejt vs. 9.5%+ sejt TRAM-34 kezelés mellett). Ugyanez a vizsgálat az IKCa1-es csatorna predomináns szerepére hívja fel a figyelmet a Kv1.3 csatornával szemben a cytokin termelést illetően (287). A munkacsoportunk által korábban rheumatoid arthritises (RA) és spondylarthritis ankylopoieticában szenvedő betegektől nyert vérmintákon végzett kísérlet eredményei szerint a MgTX nem befolyásolta lényegesen a lymphociták IL-1b, IL-5, TNF- $\alpha$ , IL-1RA és IL-6 szintjét. A TRAM-34 kezelés a TNF- $\alpha$ , és IL-1RA esetben jelentős csökkenést ért el, míg az RA-s mintákban emelte az IL-1b és IL-5 szintet, az egészségesekben pedig csökkentette azokat (328).

Az immunszuppresszív hatás jelentősége talán a transzplantáció kapcsán a legszembeötlőbb, hiszen a graft versus host jelenség elkerülésében minden olyan szer érdekes és értékes, mely a lehető legkevesebb mellékhatás mellett képes meggátolni a kilökődést. Fontos azonban tudni, hogy a legtöbb gátlószer *in vitro* kísérletek során kerül tesztelésre. Az *in vivo* alkalmazhatóságról kevés információ áll rendelkezésre, holott a gyakorlati alkalmazhatóság csak ezen tesztek alapján lenne megítélhető.

Ennek kapcsán több K<sup>+</sup>-csatorna gátlószert is teszteltek *in vivo*. Ezek közül a CP-339818 nem kellően szelektív, emiatt pedig igen toxikus. Blokkolja ugyanis a neuronok nátrium ioncsatornáit (329). Az UK-78282 a szív és agy Kv1.4 csatornáit gátolja (319). A phenyloxoazapropylcycloalkánok és a sulfimidebenzamidoindánok a szív Kv1.5 csatornáit gátolják (321, 322). A Correolide a Kv1.3 mellett a Kv1.2, Kv1.4 és Kv1.5 csatornákat is gátolja, nem elég jó az orális biohasznosulása, illetve a tengeri malac kísérletekben az ileumban bélszakaszok görcsös összehúzódását váltotta ki az enterális idegrendszer stimulálásán keresztül (330). Az újabb generációs correolide analógok orális biohasznosulása megfelelő, és az *in vivo* Kv1.3 csatorna gátlás eredményesen szuppresszálta a IV-es típusú hiperszenzitivitást (331). A MgTX általi immunszuppresszió szintén képes volt erre a hatásra, bár az ileumra kiterjedő görcsös összehúzódások ennél a peptidnél is megjelennek. A kaliotoxin kapcsán igazolódott, hogy képes csökkenteni a klinikai súlyosságot autoimmun encephalomyelitisben, mely a sclerosis multiplex egyik modellje. A kísérlet során a T sejtek kalcium beáramlása, IL-2, és TNF termelése is

jelentősen csökkent. Ugyanakkor, mivel a toxin a Kv1.3 mellett a Kv1.1 csatornákat is blokkolja, így azt nem tudjuk, hogy a megfigyelt hatás az immunszuppresszív (Kv1.3 blokádnak) vagy a megerősödő neurotranszmisszió (Kv1.1 blokádnak) hatásának köszönhető (332).

### 2.7.3 *A $K^+$ -csatornák és a következményes T sejt aktivációs folyamatok szerepe az IBD kialakulásában*

Ahogy az a korábbi alfejezetekben ismertettük, az IBD immunrendszer diszregulációhoz köthető állapot, melyben a T sejt szubpopulációk közötti egyensúly felbomlása kulcsfontosságú. Ebben a folyamatban a citokineknek, és az azok termelődését befolyásoló tényezőknek, így a kálium csatornáknak is kulcsszerepe van. Éppen ezért több vizsgálat is történt a konkrét összefüggések feltárására.

Érdekes megfigyelés például, hogy a humán lamina propria T sejtek csak minimális proliferációval reagálnak az antigén-receptoron keresztül történő stimulációra azonos egyén perifériás lymphocitáihoz képest. Ez a hyporeaktivitás az IBD során valószínűleg felborul. A kalcium beáramlás az ép bélszövetből izolált T sejtekben sokkal kisebb mértékű, mint a perifériás T sejtek esetében mért jel. Ehhez képest a gyulladt mucozából izolált T sejtek esetében fokozott kalcium influx jellemző, olyannyira, hogy majdnem eléri a perifériás T sejtekben mért értéket. Ugyanezen tanumány azt is igazolta, hogy a kalcium influx a proliferációval szoros összefüggésben áll (333).

A CRAC-csatornák gátlása 0.1-10 $\mu$ M Synta 66-al koncentrációfüggő módon csökkentette az IBD-s (CD és CU minták egyaránt) lamina propria mononukleális sejtek IL-2, IL-17 és IFN- $\gamma$  termelését, de az IL-8 mennyisége nem változott (334). KCa3.1<sup>-/-</sup> egerekben végzett kísérletek kimutatták, hogy az IKCa1-es csatorna működésének hiányában, a TCR stimulust követő kalcium influx és a következményes IL-2 felszabadulás csökkent. Ilyen esetekben a CD4+ lymphociták differenciálódása ugyan nem változik, de a Th1 és Th2 sejtek kalcium beáramlása és citokin termelése csökken, míg a Th17 és Treg sejtek esetében nem tapasztalható változás. Ugyanezen sejtek esetében az ShK gátolta az IL-17 termelést, míg a TRAM-34 nem. A rag2<sup>-/-</sup> egerekbe (képtelenek érett T- és B sejt képzésre) történő T sejt transzfúzió során megfigyelték, hogy a normál T sejt átvitel esetében gyakrabban alakult ki colitis mint a KCa3.1<sup>-/-</sup>

egerekből izolált, IKCa1 funkcióvesztett T sejt átvitel esetében (335). Egy patkánymodell kísérletben, ahol 2,4-dinitrobenzene szulfonsav (DNBS) indukálta colitises állatokat vizsgáltak, az NS6180 IKCa1 gátló hatására jelentősen csökkentek az IL-2 és IFN- $\gamma$  szintek, enyhén a TNF- $\alpha$  és IL-4 koncentrációk, illetve nem változtak az IL-17 értékek. A csatornagátlás hatására a colon gyulladása csökkent, illetve testtömeg gyarapodás indult meg (336). Az IKCa1 csatorna szerepét hangsúlyozza, hogy az azt kódoló, KCNN4 gén rs2306801 SNP-je egyértelműen összefügg a humán populáció CD-kialakulásával (337).

A Kv1.3 csatornával kapcsolatos vizsgálatokból úgy tűnik, hogy ez a csatorna a CU-s betegek esetében magasabb expressziónövekedést mutat, mint az IKCa1-es csatorna. Jelentőségét a patogenezisben több cikk is taglalja (338). Az expressziós szint jól korrelál az IL-17A és TNF- $\alpha$  koncentrációkkal. A Kv1.3 és az IKCa1-csatornák blokádjá egyaránt jelentős hatást mutat (339). CD-s betegek esetében szintén a Kv1.3 csatorna emelkedett expressziója igazolódott, míg az IKCa1-es csatorna esetében lényegi változás nem mutatkozott meg. A Kv1.3 csatorna expressziója szignifikáns korrelációt mutat az endoszkópos és hisztológiai súlyossággal (340).

### 3 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 limfociták 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 jelvesztés nélkül elvégezhetőek-e, hanem arra is, hogy a fent nevezett sejtpopulációk 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.

## 4 Módszerek

### 4.1 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 gyulladásos/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 infliximab (Remicade®) indukció vált indokoltá 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 gyulladásos elváltozás nem igazolódott a kivizsgálások során. A beválogatás kritériumainak való megfelelést minden esetben gyermekgasztroenterológus ellenőrizte, csakúgy, mint a perifériás vérminták begyűjtését is.

Az egyes csoportok fontosabb adatait a rutin laboratóriumi eredményekkel a **II. Táblázat** tartalmazza.

### 4.2 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 sejtcsoportok 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 gyulladásos vagy egyéb, immunmediált folyamat nem merült fel.

#### 4.3 A perifériás vérminták begyűjtésének módszertana

A mintavétel során a betegek/alanyok könyök/karvénájából a rutineljárások 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 Helsinki Deklaráció legújabb módosításaiban foglaltak szerint jártunk el (341).

#### 4.4 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 gradiens elválasztást alkalmaztunk. Az így szétvált perifériás vér mononukleáris sejtréteget (PBMC) óvatosan leválasztottuk, majd két ismétlésben PBS-el (2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 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  $\text{CaCl}_2$  hozzáadásával 2 mM-ra állítottuk, hogy a fiziológiás viszonyoknak megfelelő körülményeket biztosítsunk a sejtek számára.

A sejtuszpenziót négy részre osztottuk az alábbiak szerint:

- 650 $\mu$ l-Kontroll cső, nem tartalmazott gátlószert
- 650 $\mu$ l-TR cső, 240 nM TRAM-34-et (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) adtunk hozzá később
- 650 $\mu$ l-MG cső, 4 nM margatoxint (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) adtunk hozzá később, illetve
- 100 $\mu$ l-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<sup>o</sup>C-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 szurfaktánst (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 (342).

A mintákat a keverék hozzáadásától számítva 30<sup>o</sup>C-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.

#### 4.5 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<sup>o</sup>C-on, majd a nem kötődött antitestek eltávolítása céljából 7 percig centrifugáltuk a mintákat, ezt követően pedig

módosított RPMI-1640-es médiumban reszuszpendáltuk 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.

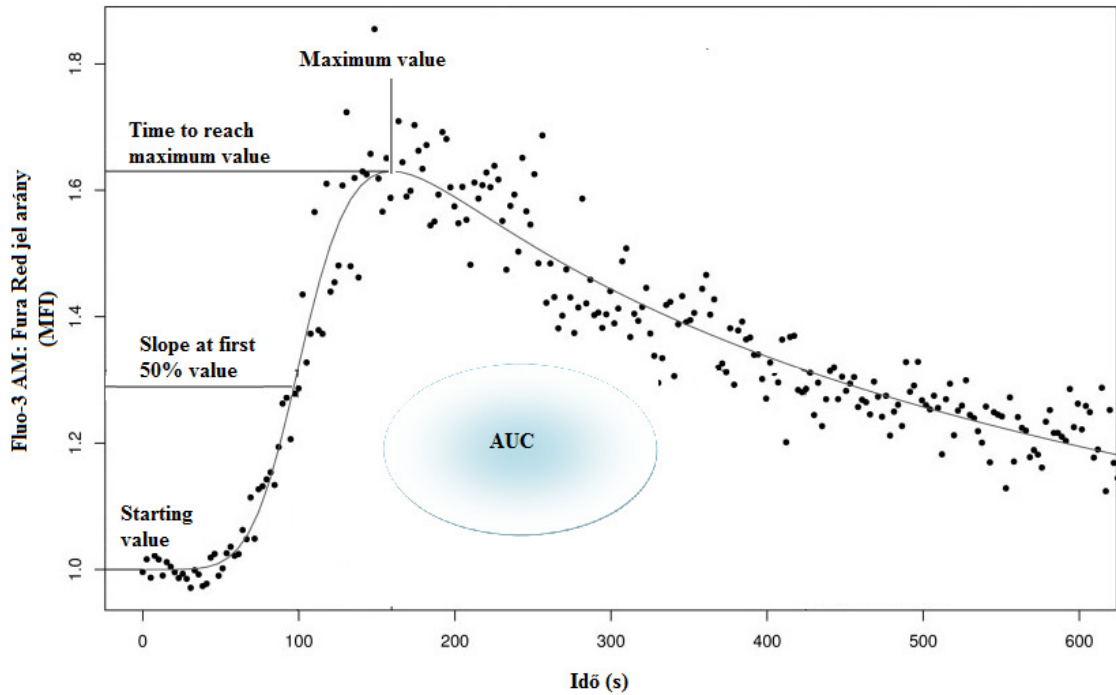
A kalcium indikátor hozzáadását követően 30°C-on 20 percig sötétben inkubáltuk a mintákat, majd ismét centrifugáltuk azokat 7 percig. Ezt követően a sejteket módosított RPMI-1640 médiumban vettük fel, mely egyben a mérési médiumot is jelentette. Az egyes gátlószereket a korábban már ismertettek szerint,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

#### 4.6 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 (343). Az algoritmus egyik előnye, hogy a kinetikus paraméterek esetén is képes eloszlást számolni az egyes mérések esetében. A Crohn-betegek adatainak esetében a double logistic+ függvényt alkalmaztuk az adatelemzésre (**7. ábra**).

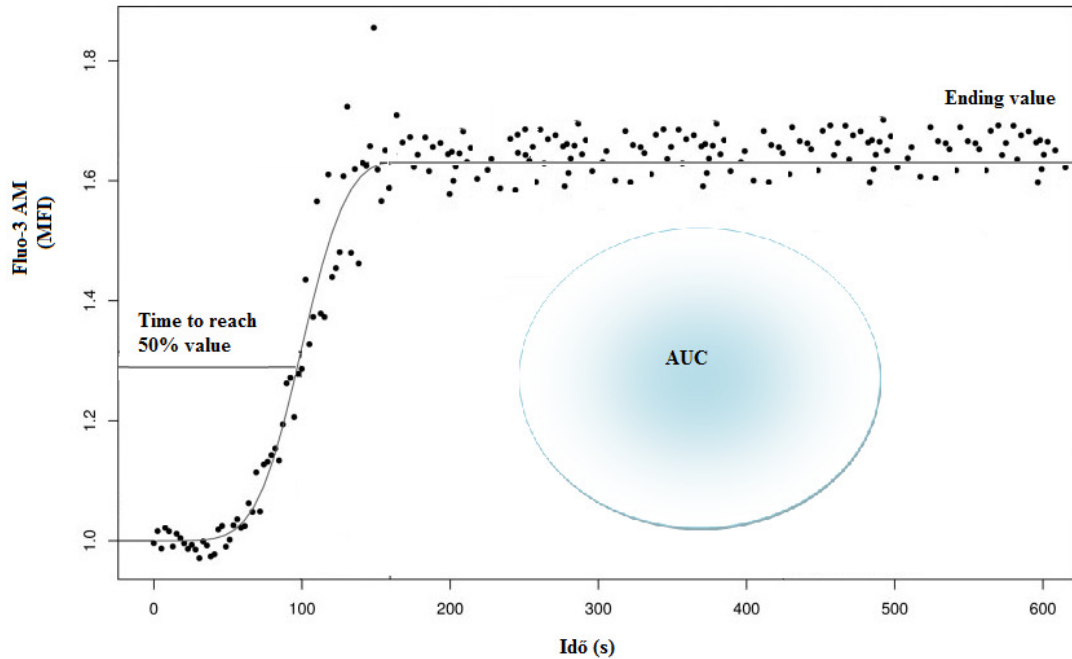
Ezen függvény esetében, a Starting value a kiindulási kalcium c.c. értékével áll összefüggésben. A Slope at first 50% value a görbe meredekségét adja meg a maximális érték felénél. A Time to reach maximum value azt az időt jelenti, amely a maximális érték eléréséhez szükséges, a Maximum value a csúcs kalcium c.c.-nek feleltethető meg, míg az AUC érték a mérés ideje alatt mért teljes kalcium mennyiség függvényében változik.





**7. ábra:** A Double logistic+ függvény jelen vizsgálatban elemzett paramétereit.

A négy T sejt szubpopuláció szimultán vizsgálat esetében a logistic+ függvényt alkalmaztuk (**8. ábra**). Ezen függvény esetében a Time to reach 50% values annak az időnek feleltethető meg, mely a maximális érték felének eléréséhez szükséges. Az ending value a mérési idő végén mért kalcium c.c.-nek a függvényében változik (egyben a legnagyobb elért kalcium c.c.-t is jelzi), míg az AUC érték ezen függvény esetében is a mérés teljes ideje alatt detektált kalcium jelnek tudható be. Az eredmények részről ismertetésre kerül az alap kalcium jel is, mely gyakorlatilag a Starting value. Ezt csak a gátlószeres kezelést nem kapott minták esetében adjuk meg.



**8. ábra:** A logistic+ függvény jelen vizsgálatban elemzett paramétereit.

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.

#### 4.6.1 Az egyes szubpopulációk gateelési stratégiája

A fent részletezett függvényeket mindig az előzetesen kigatelt szubpopulációk kiválasztott paraméterére (jelen esetben kalcium jelére) illeszti az algoritmus, éppen ezért fontos a megfelelő, körültekintő gateelés.

A Crohn-beteg vizsgálat során az alábbiak szerint történt a szubpopulációk elkülönítése:

A sejtek Forward (FSC) és Side (SSC) Scatter karakterisztikája alapján, azaz gyakorlatilag a morfológiai tulajdonságuk alapján kijelöltük a lymfocitákat. Ezen a csoporton belül aztán a sejtfelszíni festés során alkalmazott, fluorofórokkal konjugált ellenanyagok sejtfelszíni kötődésének mértéke alapján különítettük el a szubpopulációkat.

A Tc sejteknek a CD4-CD8+ sejteket tekintettük. Th1 sejteknek a CD8-CD4+CXCR3+CCR4-, míg Th2 sejteknek a CD8-CD4+CXCR3-CCR4+ sejteket

tekintettük. Az egyes sejtcsoportok kiválasztásánál hisztogramokat és dotplotokat alkalmaztunk.

A négy T sejt szubpopuláció egyidejű mérésekor Th1sejteknek a CD4+CXCR3+CCR4-, Th2 sejteknek a CD4+CXCR3-CCR4+, Th17 sejteknek a CD4+CXCR3-CCR4+CCR6+, míg Treg sejteknek a CD4+CD25<sup>hi</sup> sejteket tekintettük. Ezen populációk kijelölésénél szintén hisztogramokat és dotplotokat alkalmaztunk.

#### 4.7 A statisztikai elemzések módszertana

A statisztikai elemzések során 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 alkalmaztunk. 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 alkalmaztunk. 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).

## 5 Eredmények

### 5.1 A gyermekkori Crohn-betegséggel kapcsolatos vizsgálatok eredményei

#### 5.1.1 *A fontosabb háttérinformációk és a rutin laboratóriumi paraméterek adatai*

A vizsgálatba vont gyermekek esetében a kort illetően szignifikáns különbség nem igazolódott, így valamennyi csoportra azonos átlagéletkor volt a jellemző. A nemek megoszlásában ugyan vannak különbségek, különösen a hagyományosan kezelt betegcsoportban, ugyanakkor ez döntően a rendelkezésre álló beteganyagnak tudható be. A nemek közti megoszlás másodlagos szempont volt a kutatásban, a már elégséges lány résztvevők számára hivatkozva nem zártunk ki további alanyokat.

Eredményeink alapján látható, hogy a vizsgálatba vont egészséges, kontroll gyerekekhez képest a hagyományos kezelésben részesülő betegcsoport CRP értékei ugyan enyhén emelkedettek, ugyanakkor szignifikáns különbség nem igazolódott. A súlyos, hagyományos kezelésre nem reagáló, első IFX-kezelés előtt álló betegek csoportjában a 31 mg/L medián érték igazolja a betegség progresszióját/akut fázisát, melyet a negyedik kezelés után vett minták esetében szignifikánsan alacsonyabbnak találtunk (medián: 1,5 mg/L).

Jelentős különbség volt megfigyelhető a neutrofil granulocita és lymfocitaszám esetében is. Ezen paraméterek esetében az egészséges, kontroll gyerekekhez képest szignifikánsan magasabb értékeket tapasztaltunk valamennyi betegcsoport esetében. A különbség ugyanakkor a hagyományosan kezelt illetve a hagyományos kezelésre nem reagáló, első IFX-kezelés előtt álló betegek között nem volt statisztikailag igazolható, így a betegség súlyosságával ezen paraméterek nem változnak arányosan. Az IFX kezelés szintén nem volt képes jelentősen csökkenteni ezen paraméterek emelkedett értékeit. A betegség aktivitását jelző származtatott paraméter (PCDAI) értékei igazolták a csoportba sorolás validitását, hiszen a hagyományos kezelésben részesülők 10-es medián értékéhez képest a terápia rezisztensek 36-os medián értéke szignifikánsan magasabbnak bizonyult. Az IFX-kezelés hatásosságát jelzi, hogy a negyedik IFX-kezelés utáni minták esetében az egészséges, kontroll csoport esetében mért szintre csökkent az érték, jelezve hogy sikerült remisszióba vinni a betegeket. A fehérvérsejtszám és a trombocitaszám esetében nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget.

**II. Táblázat:** A gyermekkori Crohn-betegség vizsgálat csoportjainak fontosabb adatai és a releváns rutin laboratóriumi paraméterei.

	<b>Egészséges kontroll</b> n=12	<b>Hagyományos kezelés</b> n=23	<b>Első IFX-kezelés előtt</b> n=6	<b>Negyedik IFX-kezelés után</b> n=6
<b>Életkor (év)</b>	13 [10-16]	15 [9-17]	16 [14-17]	16 [14-17]
<b>Nem (fiú/lány)</b>	5/7	9/14	3/3	3/3
<b>C-reaktív fehérje (mg/L)</b>	2 [1-3]	6 [0-24]	31 [8.75-41.25]	1.50 <sup>c</sup> [0.25-5.75]
<b>Fehérvérsejtszám (G/L)</b>	6.50 [5.53-7.15]	6.70 [5.90-9.20]	9.70 [6.28-12.38]	6.00 [4.80-9.60]
<b>Neutrofil granulocita (Fehérvérsejtszám %-a)</b>	49.90 [47.50-57.20]	61.40 <sup>a</sup> [58.60-66.60]	73.60 <sup>a</sup> [66.40-79.23]	69.30 <sup>a</sup> [65.18-74.63]
<b>Lymfocita szám (Fehérvérsejtszám %-a)</b>	38.50 [34.70-43.70]	21.30 <sup>a</sup> [18.20-28.90]	18.60 <sup>a</sup> [13.85-20.88]	20.25 <sup>a</sup> [16.65-26.10]
<b>Trombocita szám (G/L)</b>	374 [325-396]	401 [294-565]	465 [429-584]	342 [287-378]
<b>Pediatrics Crohn's Disease Activity Index</b>	-	10 [5-35]	36 <sup>b</sup> [35-39]	0 <sup>c</sup> [0-7.5]

Az adatok medián [IQR] formátumban szerepelnek. a: p < 0.05 vs. Egészséges kontroll, b: p < 0.05 vs.

Hagyományos kezelés, c p < 0.05 vs. Első IFX-kezelés előtt

### 5.1.2 A vizsgált sejtpopulációk megoszlásával kapcsolatos eredmények

A vizsgálatok során értékelt adatok alapján a Tc, Th1 és Th2 sejtek lymphocitákon belüli %-os megoszlása sem egymáshoz képest, sem az egyes csoportok között nem mutat szignifikáns eltérést (**III. Táblázat**). 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.

**III. Táblázat:** A Tc, Th1, Th2 szubpopulációk lymphocitákon belüli százalékos megoszlása. Az adatok medián [minimum-maximum] formátumban.

	<b>Egészséges kontroll</b>	<b>Hagyományosan kezelt</b>	<b>Első IFX-kezelés előtt</b>	<b>Negyedik IFX-kezelés után</b>
Tc%/lymfocita	17,6 [0,5-29,9]	17,3 [0,2-38,6]	17,5 [3,5-23,3]	20,7 [3,2-31,6]
Th1%/lymfocita	10,7 [0,5-30,8]	17,9 [0,3-49,3]	21,8 [2,1-39,3]	33,1 [2,0-43,9]
Th2%/lymfocita	14,00 [0,9-31,6]	9,1 [0,4-49,4]	13,7 [1,2-23,7]	19,5 [3,2-44,5]
Th1%/Th2%	0,77	1,97	1,59	1,69

### 5.1.3 A kalcium beáramlás kinetikával kapcsolatos eredmények

Eredményeink alapján az egészséges, kontroll alanyok gátlószer mentes mintáiban az egyes mérési paraméterek esetében szignifikáns különbség nem mutatható ki a vizsgált T sejt szubpopulációk között (**IV.A Táblázat**). 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 betegég által kevésbé érintett Tc és Th1 szubpopulációk értékeit nem módosították lényegesen a vizsgált farmakonok.



**IV.A Táblázat:** Az egészséges és hagyományosan kezelt Crohn-beteg alanyok kalcium beáramlás kinetikai eredményei.

			Starting value MFI/10 <sup>2</sup>	Maximum value MFI/10 <sup>2</sup>	Time to reach maximum	Slope at first 50% value	AUC MFI/10 <sup>5</sup>	
Egészséges kontroll	Ø gátlószer	Tc	220 [163-285]	235 [176-320]	400 [339-830]	41 [11-119]	136 [103-187]	
		Th1	226 [136-332]	234 [139-364]	397 [54-837]	301 [1-10321]	140 [95-201]	
		Th2	194 [125-281]	391 [134-2919]	645 [131-2865]	3258 [105-175245]	168 [77-563]	
	MgTX (4nM)	Tc	185 [107-297]	195 [110-327]	609 [0-982]	351 [3-24268]	110 [65-169]	
		Th1	192 [106-299]	225 [115-384]	534 [264-964]	24 [10-1726]	128 [66-183]	
		Th2	181 [108-301]	214 [118-397]	525 [263-982]	20 <sup>c</sup> [4-479]	118 [68-186]	
	TRAM-34 (240 nM)	Tc	165 [144-209]	204 [182-231]	548 [490-859]	18 [10-62]	114 [103-132]	
		Th1	152 <sup>c</sup> [133-194]	196 [171-241]	480 [344-840]	26 [22-37]	102 <sup>c</sup> [97-130]	
		Th2	158 [137-197]	261 [193-265]	417 [379-864]	39 <sup>c</sup> [14-57]	126 [106-140]	
	Hagyományos kezelés	Ø gátlószer	Tc	252 [169-377]	325 [181-822]	400 [0-1481]	106 [6-25345]	157 [106-391]
			Th1	293 [120-854]	340 [171-1099]	531 [0-1864]	69 [2-10262]	178 [102-411]
			Th2	394 <sup>a,d</sup> [145-1413]	1094 <sup>a,b</sup> [148-2588]	804 [10-4393]	123 <sup>d</sup> [5-19105]	338 <sup>a,b,d</sup> [132-1054]
Mgtx (4nM)		Tc	223 [116-628]	260 [136-744]	457 [16-1040]	577 [0-33111]	145 [70-435]	
		Th1	193 [108-552]	229 [115-663]	415 [10-839]	97 [1-3126]	127 [66-374]	
		Th2	216 <sup>c</sup> [107-689]	246 <sup>c</sup> [113-815]	442 [42-895]	31 <sup>c</sup> [1-5402]	135 <sup>c</sup> [65-413]	
TRAM-34 (240 nM)		Tc	247 [11-678]	377 [31-931]	516 [5-1246]	522 [464-7403]	188 [104-525]	
		Th1	232 [15-619]	289 [31-754]	560 [23-761]	174 [1-2491]	170 [9-414]	
		Th2	223 <sup>c</sup> [146-570]	307 <sup>c</sup> [191-782]	405 [28-1698]	170 <sup>c</sup> [13-30706]	169 <sup>c</sup> [97-431]	

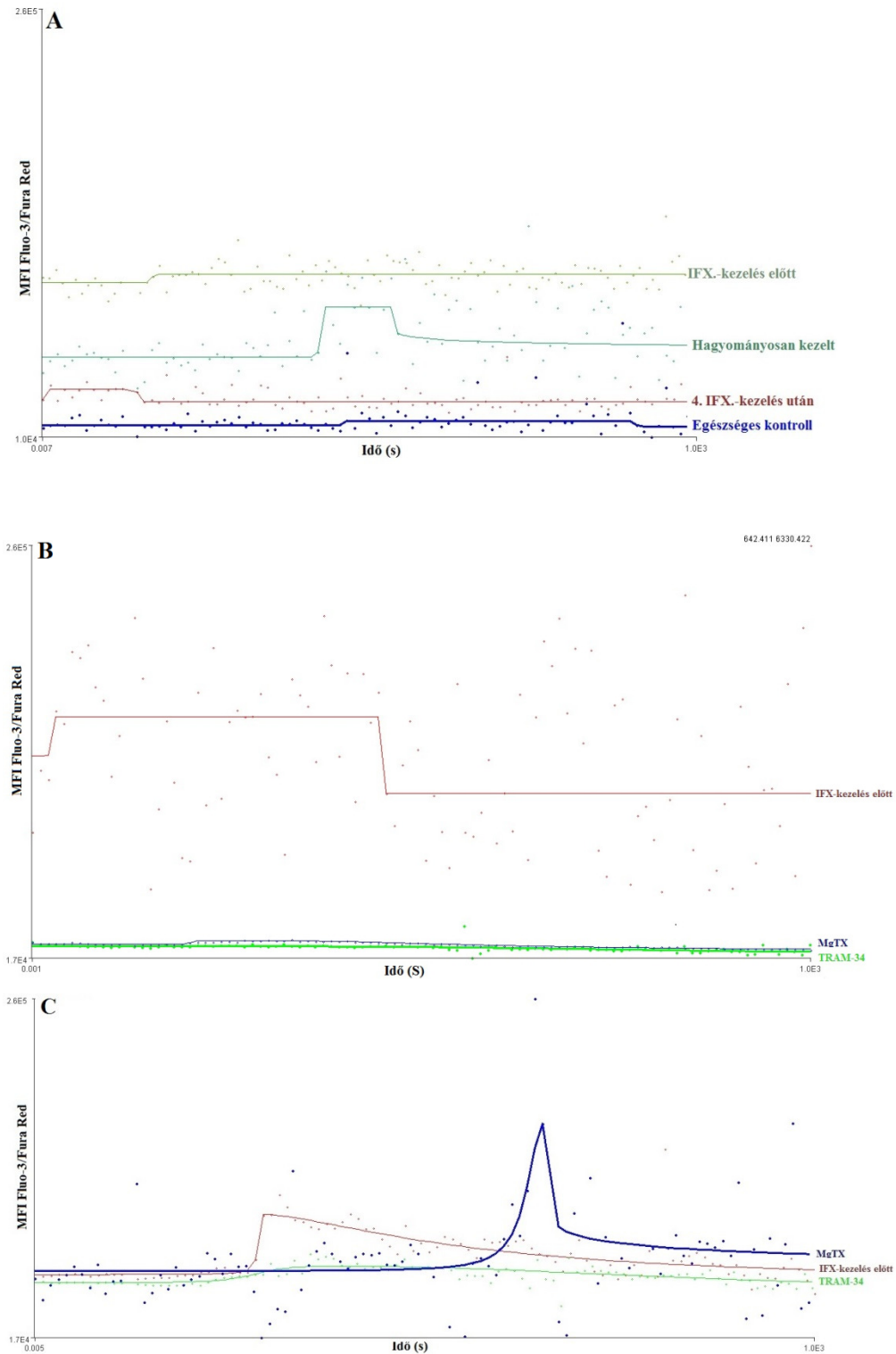
Az adatok medián [IQR] formátumban. <sup>a</sup>:p<0,05 vs. azonos sejttípus, azonos csoport, azonos csatorna gátlószeres kezelés Tc sejtek értékei; <sup>b</sup>: p<0,05 vs. azonos sejttípus, azonos csoport, azonos csatorna gátlószeres kezelés Th1 sejtek értékei; <sup>c</sup>:p<0,05 vs. azonos csoport eltérő csatorna gátlószeres kezelés kontroll mintáinak, azonos sejtpopulációjának értékei; <sup>d</sup>: p<0,05 vs. Beteg csoport csatorna gátlószeres kezelés mentes mintáinak, azonos sejtpopulációinak értékei vs. kontroll csoport csatorna gátlószeres kezelés mentes mintáiban, azonos sejtpopulációban mért értékei

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 (**IV.B Táblázat**). 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 (**9.A ábra**). 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 gátlószerek – a MgTX és TRAM-34 kezelés egyaránt – szignifikánsan csökkentették. Ennek hatására a szubpopulációk közötti különbség a gátlószerek alkalmazását követően már nem volt igazolható (**9.B ábra**).

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 tudunk igazolni. A MgTX és TRAM-34 kezelés ezen minták esetében további lényeges csökkenést nem tudott kiváltani (**9.C ábra**), egyedül a TRAM-34 kezelés csökkentette a Time to reach maximum értéket a Th1 és Th2 sejtekben, ugyanakkor a különbség a korábban ismertetett változásokhoz képest minimálisnak mondható.



**9. ábra:** Az egyes betegcsoportok és  $K^+$ -csatorna gátlószeres kezelésen átesett Th2 sejtek kalcium beáramlás kinetikája. Az ábrák 1-1 reprezentatív alany mintáinak értékeit mutatják.

**IV. B Táblázat:** Az első IFX-kezelés előtt és negyedik IFX-kezelés után mért kalcium beáramlás kinetikai eredményei .

			Starting value MFI/10 <sup>2</sup>	Maximum value MFI/10 <sup>2</sup>	Time to reach maximum	Slope at first 50% value	AUC MFI/10 <sup>5</sup>	
Infliximab kezelés előtti minták	Ø gátlószer	Tc	359 [296-509]	473 [347-552]	1181 [173-9754]	2912 [83-84815]	216 [201-322]	
		Th1	400 [330-566]	436 [393-583]	475 [268-792]	2665 [81-21390]	236 [199-283]	
		Th2	1023 <sup>a,b</sup> [100-2597]	2233 <sup>a,b</sup> [1176-2621]	721 [165-4863]	8531 <sup>b</sup> [156-129330]	709 <sup>a,b</sup> [279-1572]	
	MgTX (4nM)	Tc	384 [286-576]	434 [384-1020]	3052 [970-5166]	1973 [17-19542]	248 [204-346]	
		Th1	329 [257-493]	393 [361-550]	583 [328-5114]	90 [30-4543]	203 [157-296]	
		Th2	340 <sup>c</sup> [272-614]	387 <sup>c</sup> [364-798]	1063 [136-2005]	59 <sup>c</sup> [25-10837]	213 <sup>c</sup> [169-328]	
	TRAM-34 (240 nM)	Tc	466 [1-641]	499 [2-690]	962 [540-6084]	404 [5-13650]	258 [1-385]	
		Th1	399 [2-669]	407 [2-805]	1004 [405-2049]	710 [23-4167]	241 [1-513]	
		Th2	432 <sup>c</sup> [1-617]	455 <sup>c</sup> [10-794]	947 [717-1197]	3187 <sup>c</sup> [1-7725]	263 <sup>c</sup> [5-375]	
	4. IFX.-kezelés utáni minták	Ø gátlószer	Tc	264 [71-545]	304 [117-367]	456 [309-3979]	423 [4-1425]	174 [63-600]
			Th1	260 [127-495]	276 [154-315]	524 [0-1632]	81 [2-10178]	155 [83-187]
			Th2	546 [216-1136]	904 <sup>d</sup> [306-1813]	509 [393-670]	195 <sup>d</sup> [21-1146]	293 <sup>d</sup> [170-894]
MgTX (4nM)		Tc	247 [87-606]	201 [94-668]	572 [441-726]	2797 [294-19249]	147 [56-421]	
		Th1	237 [162-402]	213 [88-320]	364 [271-428]	30 [8-63]	153 [105-280]	
		Th2	247 [162-390]	244 [88-551]	401 [0-2100]	31 [6-81]	146 [50-298]	
TRAM-34 (240 nM)		Tc	258 [92-433]	340 [97-1488]	588 [0-984]	1493 [38-6093]	145 [58-264]	
		Th1	254 [74-496]	259 [91-512]	382 <sup>a</sup> [268-15344]	1276 [32-3517]	155 [51-298]	
		Th2	266 [77-712]	292 [90-2312]	359 <sup>b</sup> [287-1233]	908 [21-17080]	159 [51-242]	

Az adatok medián [IQR] formátumban. <sup>a</sup>:p<0,05 vs. azonos sejttípus, azonos csoport, azonos csatorna gátlószeres kezelés Tc sejtek értékei; <sup>b</sup>: p<0,05 vs. azonos sejttípus, azonos csoport, azonos csatorna gátlószeres kezelés Th1 sejtek értékei; <sup>c</sup>:p<0,05 vs. azonos csoport eltérő csatorna gátlószeres kezelés kontroll mintáinak, azonos sejtpopulációjának értékei; <sup>d</sup>: p<0,05 vs. Beteg csoport csatorna gátlószeres kezelés mentes mintáinak, azonos sejtpopulációinak értékei vs. kontroll csoport csatorna gátlószeres kezelés mentes mintáiban, azonos sejtpopulációban mért értékei

#### 5.1.4 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 (**V. Táblázat**). A hagyományosan kezelt Crohn-betegek esetében szignifikánsan magasabb expressziót mértünk a Th2 sejtek felszínén, mely a kálium csatorna fokozott szerepére utal ezen körképben.

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.

**V. Táblázat:** Az egyes vizsgálati csoportok Kv1.3 csatorna expressziója.

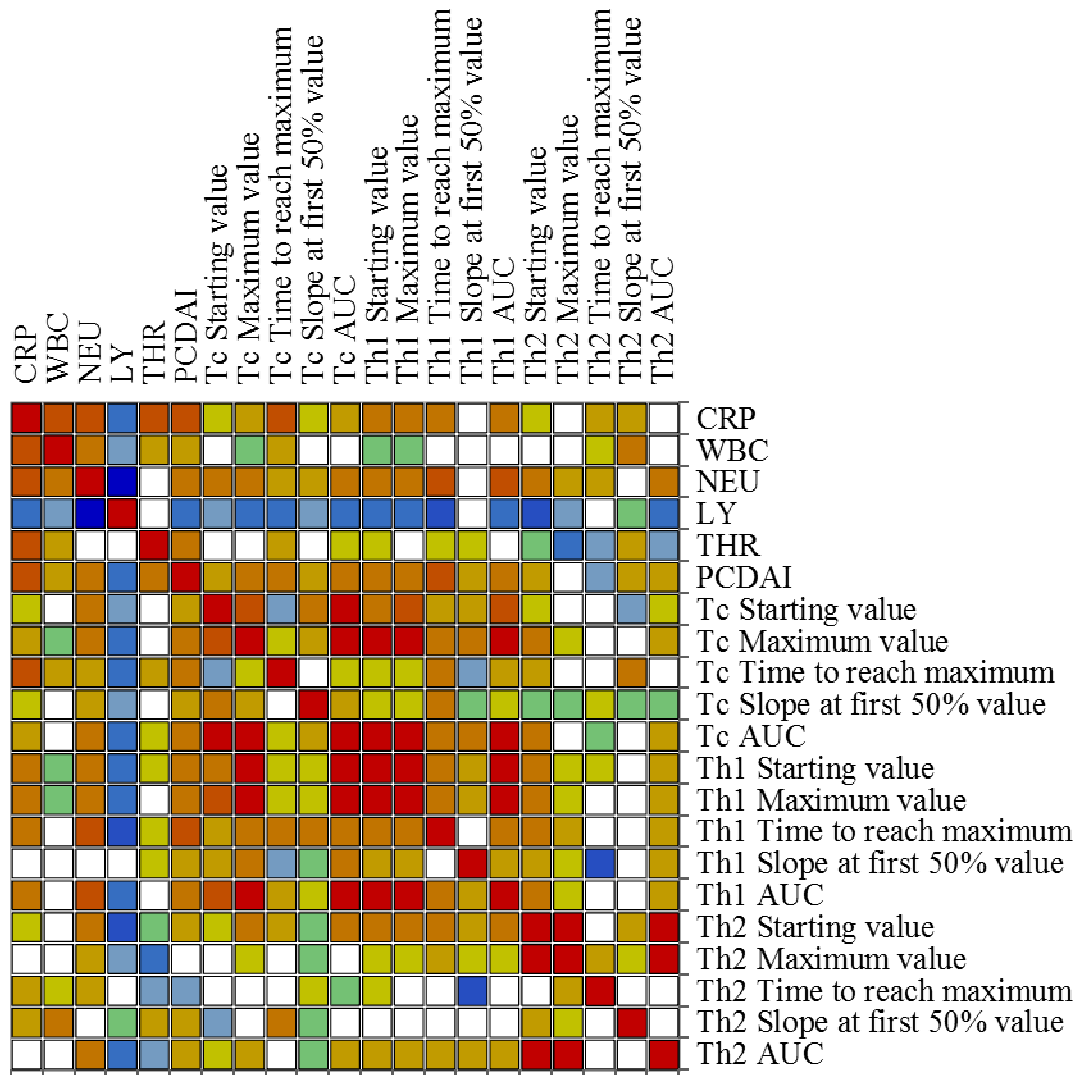
Egészséges, kontroll			Hagyományosan kezelt		
Tc	Th1	Th2	Tc	Th1	Th2
152 [37-326]	91 [15-669]	160 [10-1194]	154 [52-683]	179 [52-1191]	358 <sup>a,b</sup> [67-1315]
Első IFX-kezelés előtt			Negyedik IFX-kezelés után		
Tc	Th1	Th2	Tc	Th1	Th2
235 [184-584]	165 [87-1230]	327 [86-413]	129 [87-1007]	122 [49-983]	99 [48-178]

Az adatok anti-KV1.3 MFI dimenzióban, medián [IQR] formátumban. a: p<0,05 vs. azonos sejttípus, azonos csoport, Tc sejtek értékei; b: p<0,05 vs. azonos sejttípus, azonos csoport, Th1 sejtek értékei

### 5.1.5 Az összefüggés vizsgálatok eredményei

A Spearman rangkorreláció eredményei alapján, az egyes rutin laboratóriumi paraméterek és a kalcium beáramlás kinetikai paraméterei között jelentős összefüggés mutatható ki. A korrelációs térkép (**10. ábra**) színekkel jelzi azt, hogy mely paraméterek között milyen irányú és mennyire erős összefüggés mutatható ki. A fehér szín arra utal, hogy nincs összefüggés. Minél sötétebb kék két paraméter metszésénél lévő négyzet, annál erősebb, negatív összefüggés áll fenn köztük, minél sötétebb vörös két paraméter metszéspontjában lévő négyzet, annál erősebb pozitív összefüggés áll fenn.

A C-reaktív protein szignifikáns, erős összefüggést mutat a fehérvérsejtszámmal, neutrofil granulocitaszámmal, trombocitaszámmal, és PCDAI értékkel. A kalcium beáramlás kinetikai paraméterei közül a Tc és Th1-es sejtek Time to reach maximum paramétereivel mutatható ki összefüggés. A neutrofil granulociták mennyisége a C-reaktív protein értékén kívül a lymfocitaszámmal és a Tc AUC, Th1 Starting és a Th1 Time to reach maximum értékekkel korrelált. A lymfocitaszám a Th1 sejtek Time to reach maximum értékével és a Th2 sejtek Starting values és AUC paramétereivel mutatott szignifikáns összefüggést. A PCDAI érték, mely talán a legérdekesebb az összefüggésvizsgálatok szempontjából, hiszen a betegség aktivitásának objektív mérőszáma, egyedül a Th1 sejtek Time to reach maximum értékével mutatott összefüggést. Ezek alapján csak esetlegesen fennálló összefüggéseket találtunk, tendenciát az egyes rutin laboratóriumi paraméterek kalcium influx kinetikai értékeivel nem tudtunk igazolni. A kalcium beáramlás kinetikai paramétereinek összefüggésvizsgálatai kapcsán az egyes szubpopulációk Starting value, Maximum value és AUC értékei között erős, pozitív összefüggés igazolódott. Ez azt jelenti, hogy ahol magas a kiindulási citoplazma kalcium koncentráció, ott a maximális kalcium csúcs, illetve a mérés ideje alatt detektált teljes kalcium mennyiség is nagyobb.



**10. ábra:** A rutin laboratóriumi paraméterek és kalcium beáramlás kinetikai értékeinek korrelációs térképe.

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

### 5.2.1 *A vizsgált sejtpopulációk megoszlásával kapcsolatos eredmények*

A négy szubpopuláció egészséges alanyokból mért, CD4+ sejteken belüli megoszlása jelentős eltéréseket mutat (**VI. Táblázat**). 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.

**VI. Táblázat:** A vizsgált szubpopulációk CD4+ sejteken belüli prevalenciája.

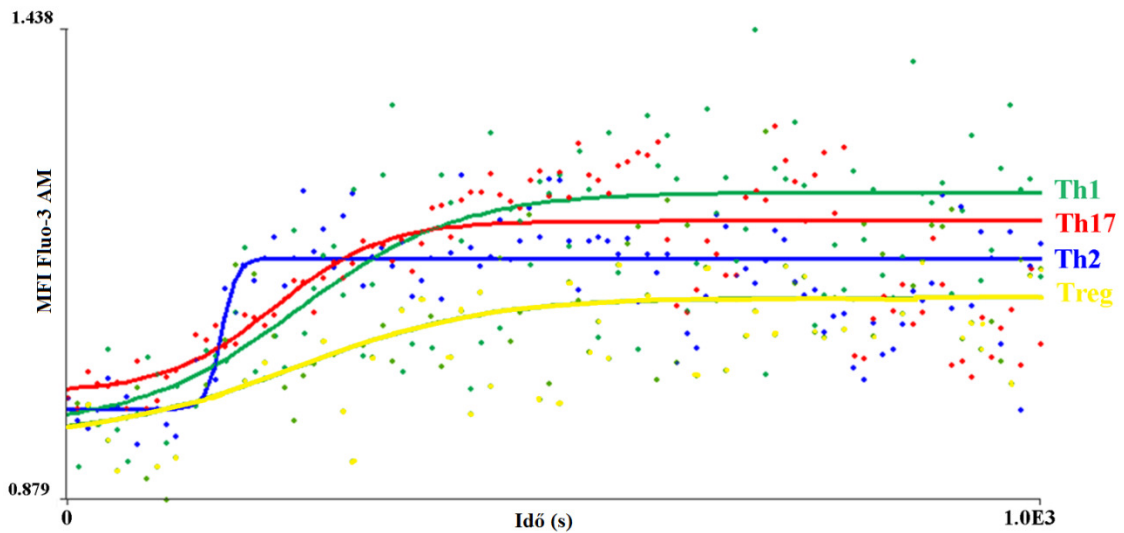
Th1%/CD4+	Th2%/CD4+	Th17%/CD4+	Treg%/CD4+
11,5 <sup>a</sup> [2,8-34,7]	27,2 [11,1-70,2]	4,7 <sup>a</sup> [1,4-34,8]	8,1 <sup>a</sup> [2,1-45,1]

Az adatok medián [minimum-maximum] formátumban. a: p<0.05 vs. Th2 sejtek értéke

### 5.2.2 *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 (**11.ábra**). 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.





**11. ábra:** A kalcium beáramlás kinetika a vizsgált szubpopulációkban (egy reprezentatív minta eredménye).

A kálium csatorna gátlószer alkalmazásával jelentős változásokat sikerült elérnünk (**VII. Táblázat**). A Th1-es sejtekben a MgTX és a TRAM-34 egyaránt szignifikánsan csökkentette az AUC értéket. A Th2 sejtekben a TRAM-34 kevésbé mutatott erőteljes hatást, ellenben a MgTX az AUC és End értéket 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.

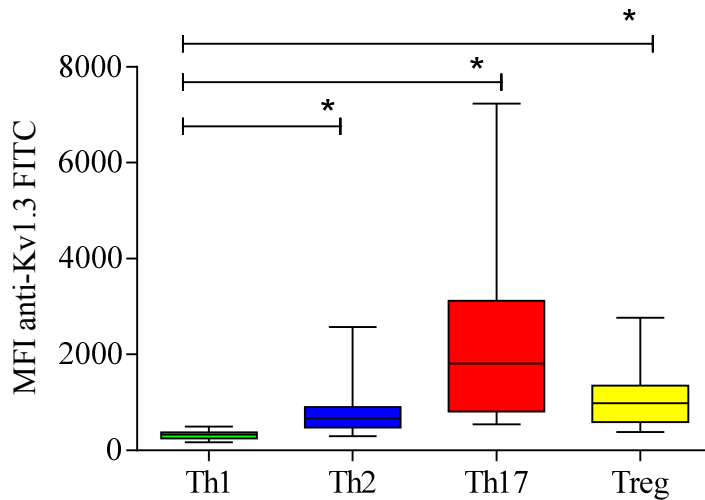
**VII. Táblázat:** A helper és regulátoros T sejtek kalcium beáramlás kinetikája

		Start value MFI/10 <sup>2</sup>	Time to reach 50% (rpv)	End value (rpv)	AUC (rpv/10 <sup>1</sup> )
<b>Th1</b>	<b>Ø gátlószer</b>	160 [59-269]	500 [221-526]	1.46 [1.33-1.80]	280 [248-301]
	<b>MgTX (4 nM)</b>		362 [146-506]	128 [1.07-1.38]	238 <sup>b</sup> [201-246]
	<b>TRAM-34 (240 nM)</b>		465 [294-885]	126 [1.12-1.44]	243 <sup>b</sup> [208-257]
<b>Th2</b>	<b>Ø gátlószer</b>	159 [107-193]	324 [208-964]	138 [1.07-1.62]	231 <sup>a</sup> [192-277]
	<b>MgTX (4 nM)</b>		652 [192-904]	1.05 <sup>b</sup> [0.84-1.12]	208 <sup>b</sup> [160-220]
	<b>TRAM-34 (240 nM)</b>		299 [201-696]	1.19 [1.03-1.61]	205 [183-251]
<b>Th17</b>	<b>Ø gátlószer</b>	116 [47-189]	448 [347-532]	1.29 [1.15-1.83]	243 <sup>a</sup> [224-256]
	<b>MgTX (4 nM)</b>		774 [320-817]	1.11 <sup>b</sup> [1.04-1.23]	210 <sup>b</sup> [200-241]
	<b>TRAM-34 (240 nM)</b>		508 [157-977]	1.26 <sup>b</sup> [1.04-1.30]	221 <sup>b</sup> [217-249]
<b>Treg</b>	<b>Ø gátlószer</b>	161 [85-249]	657 [281-806]	1.25 [1.09-2.11]	226 <sup>a</sup> [215-282]
	<b>MgTX (4 nM)</b>		392 [219-638]	1.12 <sup>b</sup> [1.04-1.17]	218 [205-228]
	<b>TRAM-34 (240 nM)</b>		616 [349-819]	1.30 [1.15-1.43]	244 [225-249]

Az adatok mediám [IQR] formátumban szerepelnek. <sup>a</sup>: p<0,05 vs. Th1 sejtek értékei; <sup>b</sup>: p<0,05 vs. kontroll minták értékei. rpv: relative parameter value

### 5.2.3 A Kv1.3-csatorna expresszió mérésének eredményei

Ahogy az a **12. ábrán** is látható, 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.



**12. ábra:** A vizsgált T sejt szubpopulációk Kv1.3 csatorna expressziója.

## 6 Megbeszélés

### 6.1 A gyermekkori Crohn-betegséggel kapcsolatos vizsgálatok eredményei

A doktori értekezéshez kapcsolódó vizsgálataink során 23 fő 9-17 év közötti hagyományosan kezelt Crohn-beteg, valamint 6 fő 14-17 év közötti IFX-kezelésben részesülő CD-s beteg mintáit vizsgáltuk az első IFX-kezelés előtt, illetve a 4. IFX-kezelés után. Egészséges kontrollként 12 fő 10-16 év közötti gyermeket választottunk ki.

#### 6.1.1 *A fontosabb háttérinformációk és a rutin laboratóriumi paraméterek adatai*

A nemi megoszlás alapján a Hagyományosan kezelt csoportban lány túlsúly volt a jellemző, az IFX-es betegek esetében a nemi arány egyenlő volt. Ez megegyezik azokkal a forrásokkal, melyek az enyhe női predominanciát írják le (32).

A rutin laboratóriumi paraméterek közül a CRP jelentősen magasabb értéket csak az első IFX-kezelés előtti csoportban mutatott, mely érték a negyedik kezelés utánra szignifikánsan csökken. Ez igazolja a CRP indikátor szerepét, ugyanakkor érdekes, hogy a hagyományos kezelésben részesülő CD-s betegek esetében nem szignifikánsan magasabb az érték az egészséges kontroll egyének értékeihez képest (105).

A fehérvérsejtszám esetében nem találtunk jelentős különbséget a vizsgálati csoportok között, bár az első IFX-kezelés előtti csoport némileg magasabb értékeket mutatott. A trombocita szám esetében ugyanezt láthatjuk.

A neutrofil granulocita- és a lymfocitaszám esetében az egészséges kontroll egyének értékeihez képest valamennyi esetben szignifikánsan magasabb értékeket mértünk, ugyanakkor a betegcsoportok között jelentős eltérést nem tapasztaltunk.

A betegség aktivitását jelző PCDAI score jól tükrözi a betegség súlyosságát, valamint az IFX-kezelésre adott hatékony terápiás választ, és a csoportjaink kialakításának szempontja is részben ez a paraméter volt. Ezen megfigyeléseink szintén összhangban vannak mások adataival (119, 122, 146).

Összességében ezen rutin laboratóriumi paraméterek, valamint a kidolgozott és validált PCDAI score rendszer a szövettani és endoszkópos kép mellett jól jellemzi a betegség súlyosságát, illetve az alkalmazott kezelések hatékonyságának megítélésére is alkalmasak.

### 6.1.2 *A vizsgált sejtpopulációk megoszlásával kapcsolatos eredmények*

Az általunk vizsgált Tc, Th1 és Th2 sejtek a 4 vizsgálati csoportban szignifikánsan sehol nem tértek el. Ugyanakkor a Tc sejtek viszonylagos stabilitásához képest, a Th1 sejtek jelentősen emelkedettek voltak a betegcsoportokban, ehhez képest a Th2 sejtek száma nem változott. A Th1%/Th2% arány is jól jelzi, hogy a betegcsoportokra perifériás immunfenotípus szempontjából a Th1 sejtek túlsúlya a jellemző. Ez az adatunk egybevág azokkal a tanulmányokkal, melyek a Th1 predominanciát igazolják (98, 204). Fontosnak tartom azonban megjegyezni, hogy ezen adataink perifériás vérmintákból mért értékek, a gyulladt szövetben lévő szubpopuláció arányok akár el is térhetnek. Érdekes figyelembe vennünk az adatok kapcsán, hogy az IFX-el kapcsolatban igazolták, hogy a lamina propria területén lévő aktivált immunsejtekben apoptózist indukál (131). Ez a hatás a perifériás immunsejtekre ugyan nem terjed ki (132), de a szer hatására a lamina propriában bekövetkező szubpopuláció szintű változások közvetve módosíthatják (pl. migráció a perifériáról a bél szövetekbe) a perifériás keringés lymfocita összetételét.

### 6.1.3 *A kalcium beáramlás kinetikával kapcsolatos eredmények*

A kalcium beáramlás kinetika mérésére jelenlegi vizsgálatunkban áramlási cytometriás módszert alkalmaztunk. Ez az adatok értékelése szempontjából kulcsfontosságú. Igen eltérő ugyanis az egyes szerzők által alkalmazott módszertan. Egyes szerzők fluoreszcens vagy konfokális mikroszkóp segítségével monitorozzák a kalciumjelet (327, 333), míg mások mikroplate-reader segítségével (326) és vannak akik Patch-clamp vagy egyéb technikákat alkalmaznak. Az alkalmazott fluoreszcens festékek sem azonosak. A Fluo-3, -4-en kívül a Fura-2 és Indo-1 kalcium szenzorok is széleskörben elterjedtek (344). Mindezek az adatok összehasonlíthatóságát nehezítik meg, ahogyan az is, hogy egyes szerzők abszolút értékben adják meg a kalcium c.c. értékeket, míg mások (ahogyan mi is) fluoreszcens értékeket közölnek.

Az általunk mért adatok szerint az egészséges kontroll alanyok perifériás Tc, Th1 és Th2 sejtei között jelentős különbség nem tapasztalható a lektin aktivációt követő kalcium beáramlás kinetikában. Ezen a MgTX kezelés sem változtat lényegesen, ugyanakkor a TRAM-34 kezelés csökkentette a nyugvó Th1 sejtek i.c. kalcium szintjét. Ez a megfigyelésünk ellentmond annak a ténynek, hogy a nyugvó T sejtek felszínén az IKCa1-es csatorna kisebb mennyiségben van jelen, mint a Kv1.3-as, így azt várnánk, hogy gátlásának hatása is kevésbé érélyes változásokat indukál (287). Ugyanakkor arra is vannak irodalmi

adatok, hogy a cytokin termelés gátlására a TRAM-34 kifejezetten alkalmas, míg a Kv1.3 csatornák, és gátlószerek szerepe kisebb ebben a folyamatban (287).

A hagyományosan kezelt CD-s betegminták esetében azt tapasztaltuk, hogy a Tc és Th1 sejtek kalcium beáramlás kinetikája nem változott meg lényegesen, de a Th2 sejtek kiindulási-, és maximális kalcium szintje, az emelkedés mértékét jelző Slope-paraméter és az AUC értékek szignifikánsan magasabbak voltak a Tc és Th1 sejtekhez képest. Összességében tehát emelkedett Th2 aktivitást figyeltünk meg a korai T sejt aktivációt illetően. Ez ellentmond azon tanulmányoknak, melyek a CD-t Th1 dominanciájú betegségnek tekintik (98, 204). Fontos azonban leszögezünk, hogy a vizsgálatok többsége immunfenotípust, és nem funkciót vizsgál. Ugyanakkor olyan cikkek is publikálásra kerültek, melyek a Th1/Th2 arány életkorfüggését említik, és a korai megjelenésű CD-ben a Th1 sejtek csökkent IFN- $\gamma$  termelését igazolták (345). Részben hasonló eredményre jutottak Cseh és munkatársai is, akik ugyanazon gasztroenterológiai szakrendelés beteganyagán vizsgáldtak, mint amelyen mi is végeztük a kutatást (346). Ez azért fontos, mert a két vizsgálat beteganyaga szocio-ökonómiai és egyéb epidemiológiai háttere, így a beválogatott betegek klinikai adatai feltételezhetően legalább részben megegyeznek. A TRAM-34 és MgTX kezelés szignifikánsan csökkenteni tudta az emelkedett értékeket, úgy, hogy a normál működésű Tc és Th1 szubpopulációkat nem befolyásolta lényegesen. Ha ehhez hozzávesszük ezen betegcsoport Th2 sejtjeinek emelkedett Kv1.3 expresszióját, melyről a későbbiekben értekezünk részletesebben, akkor levonhatjuk a következtetést, hogy a káliumcsatornák gátlása jelen vizsgálataink alapján jó terápiás célpontnak tűnnek, hiszen a megváltozott kalcium beáramlás kinetika legalább részben a kálium csatorna expressziójának megváltozásához köthető (347). Ha pedig a kalcium beáramlást a normál karakterisztikájúra tudjuk visszaállítani, akkor a következményes cytokin termelést is normalizálhatjuk, ahogyan arra számos publikáció is utal (326, 328).

A 6 súlyos CD-s beteg első IFX-kezelés előtti mintái kapcsán szintén a Th2 sejtek fokozott kalcium beáramlását mértük, szinte valamennyi paraméter kapcsán, míg a Tc és Th1 sejtek ezen mintákban sem mutattak eltérő beáramlás kinetikát az egészséges kontrollokhoz képest. A TRAM-34 és MgTX gátlószeres kezelés ezen minták esetében is szignifikáns csökkentést ért el, mely azok hatékonyságára utal. A TRAM-34 esetében annak Kd értékének (520nM) csak 46%-át alkalmaztuk, ennek ellenére is eredményes hatást tudtunk kimutatni, míg a margatoxin Kd értékénél (110 pM) jóval magasabb koncentrációt adtunk a sejszuspenzióinkhoz, így a hatás nem meglepő (296). A 4. IFX-kezelés utáni minták esetében a Th2 funkcionális túlsúly megszűnését tapasztaltuk, azaz a kalcium beáramlás kinetika az egészséges kontroll alanyok esetében mért értékek szintjére csökkent. Ezzel a

jelenséggel kapcsolatban irodalmi forrást nem sikerült fellelni. Az IFX azonban egy nagy méretű molekula, így a közvetlen intracelluláris hatást kizárhatjuk, hiszen nem tud átjutni a sejtmembránra, tehát sem a calmodulinnal, sem az NFAT-al nem képes közvetlenül kapcsolódni. Az IKCa1 vagy Kv1.3 hoz való direkt kötődése pedig valószínűtlennek tűnik, tekintve hogy a kiméra antitest szerkezete jelentősen eltér a peptid gátlószerektől (296). A megfigyelt hatás tehát további vizsgálatot igényel, különös tekintettel arra, hogy ebben a vizsgálatban csupán 6 beteg mintáit vizsgáltuk.

Külön érdekes és értékes eredmény, hogy az IFX-kezelés utáni minták normalizált Th2 kalcium influx értékeit a MgTX nem módosította, míg a TRAM-34 kezelés is csak a maximális érték eléréséhez szükséges időt csökkentette némileg. Összességében tehát a gátlószerek ezen minták esetében lényegi hatást már nem fejtenek ki.

Ha minden adatot együttesen vesszük figyelembe, akkor a MgTX és TRAM-34 szerek a különböző súlyosságú gyermekkori CD-s betegek esetében vagy önállóan, vagy az IFX-kezeléssel kombinálva esetleg hatékonyak lehetnek a megváltozott T sejt funkció normalizálására. Ez a feltevésünk egybevág azon cikkekkel, melyek a  $K^+$ -csatornákat potenciális terápiás célpontnak nevezik (348, 349). Munkacsoportunk más, hasonló metodikával végzett vizsgálatai kapcsán a gátlószerek hasonlóan eredményesnek bizonyultak. A MgTX kezelés például a CD4+ populáció és a Th2 sejtek esetében szignifikánsan csökkentette a kalcium beáramlást mind RA, mind AS esetében. A TRAM-34 ellenben egészségesekben a Th1, míg RA-s betegekben a Th2 és Tc sejtek kalcium influxát csökkentette (328). Akut ischémiás stroke esetében a Tc és Th2 sejtek emelkedett kalcium influxát tapasztaltuk, melyet a MgTX sikeresen és szelektíven normalizált (350). Ezzel ellentétben azonban sclerosis multiplexben a MgTx bár hatásosnak bizonyult, de a szelektivitása nem kellő mértékű, hiszen az antiinflammatorikus Th2 sejtekre is kiterjedt a gátló hatás (351).

#### 6.1.4 A Kv1.3-csatorna expresszió mérésének eredményei

A feszültségfüggő  $K^+$ -csatorna expresszió mérésének adatai alapján a Tc, Th1 és Th2 sejtek egészséges, kontroll gyermekek esetében közel azonos mennyiségű ioncsatornával rendelkeznek, és a CD-s gyerekek esetében a Th2 sejtekben nő meg a csatorna expresszió szignifikánsan. Ha ezt összevetjük az előző alfejezetben ismertetett kalcium influx módosulással, akkor feltételezhetjük, hogy ennek a negatív membránpotenciál fenntartásáért felelős ioncsatornának a mennyiség-növekedése teszi lehetővé a fokozott kalcium beáramlást is. Mások IBD-kapcsán szintén igazolták már a csatorna lehetséges szerepét a patogenezisben

(335, 339, 340). A legérdekesebb megfigyelésünk, hogy az IFX-kezelés jelentősen csökkentette a Th2 sejtek Kv1.3-csatorna expresszióját. Ahogyan a kalcium beáramlás kinetikának, úgy ennek a jelenségnek a magyarázatára sincs fellelhető irodalmi forrás. Direkt kölcsönhatás az IFX-szerkezetének ismeretében nehezen képzelhető el, ugyanakkor a TNF- $\alpha$  megkötésén keresztül elképzelhető, hogy a gyulladásos triggermechanizmusok gátlása révén csökkenti a csatorna expressziót, mely végső soron a fokozott kalcium influx és a sejtaktiváció folyamataihoz szükséges. Ezen kívül az is elképzelhető, hogy a fokozottan aktív, és magasabb Kv1.3 expressziót mutató sejtek apoptózisa, melyet szintén indukálhat az IFX, egyszerűen negatív szelekcióval, eliminálja ezeket a sejteket a lamina propriaiban, mely a perifériás keringésben lévő T sejt klónok fenotípusos összetételének megváltozását is előidézi (131). Ezen feltételezéseink igazolása azonban további, nagy esetszámú vizsgálatok elvégzését teszi szükségessé, melyek a konkrét hatásmechanizmust vizsgálják, hiszen jelenlegi adatainkból csak feltételezéseket tudunk levonni.

#### *6.1.5 Az összefüggés vizsgálatok eredményei*

Az összefüggésvizsgálataink során a CRP a többi laboratóriumi paraméterrel (WBC, NEU, THR) és a PCDAI score-al mutatott összefüggést. Az aktivitásindex a CRP-n kívül pedig a trombocita számmal korrelált szignifikánsan. Mindezek a jelen vizsgálat szempontjából azt igazolják, hogy a betegek csoportokba történő beválogatása megfelelően történt, hiszen ezt a PCDAI érték alapján végeztük el (a hisztológiai és endoszkópos kép mellett), ami pedig a gyulladásos folyamatot jelző laboratóriumi paraméterrel jól korrelál ( $p=0.02$ ,  $r=0.619$ ). Ez a tény várható volt, hiszen a PCDAI score kiszámításának egyik szempontja a CRP érték (119).

A rutin laborparaméterek és a kalcium beáramlás kinetikai paraméterei között tendenciózus összefüggéseket nem tudtunk kimutatni. Ennek oka lehet, hogy mi a perifériás vérmintákat elemeztük, míg a gyulladás a bélszövetekben zajlik. Ezen kívül a kezelések hatása az immunsejteket illetően döntően a bélben fejt ki hatását, így bár a rutin laborparaméterekben ki tudjuk mutatni a hatást, de az immunsejtek esetében kompartmentalizációs különbség is megjelenik. Azaz a periférián kisebb mértékű a változás, mint a mucozában lévő T sejtek esetében. Ez azonban az összefüggésvizsgálatok során negatív tényező.



## 6.2 A négy fő, T helper szubpopuláció szimultán vizsgálatának eredményei

Mivel a kutatások autoimmun folyamatokban a Tc, Th1, és Th2 sejteken kívül a Th17 és Treg szubpopulációk szerepét is egyértelműen igazolják (164), munkánk második részében azt vizsgáltuk, hogy a Th1, Th2, Th17 és Treg sejtek szimultán kinetikus vizsgálata lehetséges-e úgy, hogy közben a kis különbségek kimutatására való érzékenység nem csökken jelentősen. Ehhez az általunk beállított módszerben igazodnunk kellett a rendelkezésre álló 2 lézerrel felszerelt, összesen 7 fluoreszcens csatornával rendelkező műszerhez, illetve a sejtek fenotipizálásához és a kalcium jel detektálásához rendelkezésre álló antitest-fluorofór és kalcium festékek excitációs és emissziós tulajdonságaihoz. Ennek során a CD-s vizsgálathoz képest a legfontosabb változás, hogy Fluo-3/Fura Red kalcium szondákhoz képest ebben a vizsgálatban egyedül a Fluo-3-at használtuk a mérések során. Emiatt a mérések kiértékeléséhez használt függvény is eltérő volt (double logistic+ helyett logistic+).

### 6.2.1 *A vizsgált sejt populációk megoszlásával kapcsolatos eredmények*

Az egészséges, felnőtt alanyok vizsgálata során a CD4+ sejteken belüli arányokat illetően a Th2 sejtek predominanciája jellemző. Az összes többi szubpopuláció szignifikánsan alacsonyabb arányban található meg. A CD-s vizsgálathoz képest ez eltérő adat, hiszen ott nem tapasztaltunk az egészséges kontrolloknál ilyen jellegű eltérést. Ez a különbség az eltérő életkorból is adódhat, hiszen tudjuk, hogy az életkor előrehaladtával változik a szubpopulációk egymáshoz viszonyított aránya (352), illetve saját munkacsoportunk adatai alapján a kalcium influx karakterisztikája is (353). Ezen kívül a CD-s vizsgálatnál a limfocita populációra vonatkoztatott %-os értékeket adtuk meg, hiszen a Tc sejtek nem a CD4+ populációba tartoznak, míg jelen vizsgálatban minden sejtípust a CD4+ sejtek %-ában fejeztünk ki.

### 6.2.2 *A kalcium beáramlás kinetikai paramétereinek eredményei*

A mért, nyers adatokra a logistic+ függvény illesztése bizonyult a legeredményesebbnek, mely a CD-s vizsgálatához képest részben eltérő függvényparaméterek összehasonlítását teszi lehetővé (343).

A kiindulási i.c. kalcium szint a Th17 sejtek esetében volt a legalacsonyabb, bár a többi sejtípushoz képest szignifikáns eltérést nem tudtunk igazolni. Az AUC értékek a Th1-es sejtek esetében voltak a legmagasabbak, míg a Treg sejtekben a legalacsonyabbak, ráadásul a regulátoros sejteknek tart a legtovább, míg elérik a maximális értéküket, így ezekre kismértékű, és lassú kalcium influx jellemző. A Th2 sejtek bár alacsony AUC értéket

mutatnak, de a beáramlás sebessége gyorsabb, ahogyan az a maximum eléréséhez szükséges időből is kitűnik (354). A Th17-es sejtek a kezdeti alacsony kalcium szint ellenére magas értéket értek el, viszonylag rövid idő alatt. Ezek a különbségek részben megfelelnek mások adatainak (281), akik a Th17-es sejteket egyértelműen elkülönítik a Th1 és Th2 sejtektől. Mivel szintén magas alapi kalcium szintet mértünk a Th1-es és Th2-es sejtek esetében. További összehasonlítást nehéz végezni az eltérő mérés technikai háttér miatt.

A gátlószerek eltérő hatást mutattak az egyes szubpopulációk között. A MgTX a Th1, Th2 és Th17-es sejtek AUC értékére hatott, míg a TRAM-34 a Th1 és Th17 sejtek AUC értékeit csökkentette szignifikánsan. A kalcium végkoncentrációját a MgTX a Th2, Th17 és Treg sejtek esetében csökkentette, míg a TRAM-34 csak a Th17-es sejtek esetében.

Ezáltal egészséges alanyokban nem csak a lektin aktivációt követő eltérő kalcium beáramlás kinetikát sikerült igazolnunk, hanem az egyes szubpopulációk eltérő érzékenységét is a kálium csatorna gátlószerekre. Korábbi méréseink során, ahol az egészséges kontrollcsoport átlagosan 50 éves volt, a MgTX a Th2 sejtek, míg a TRAM-34 a Th1 és Th2 sejtek AUC értékeit csökkentette szignifikánsan. Így a korábbi méréseinknek szintén részben megfelelő eredményeket kaptunk (328). Más vizsgálatunkban, ahol az egészséges kontrollcsoport korban megegyezett az ebben a vizsgálatban mért egyének korával, azt tapasztaltuk, hogy a MgTX csak a Th2 sejtek esetében okozott jelentős kalcium beáramlás kinetika változást azok AUC és maximum értékeiben, míg a TRAM-34 ugyanzen paramétereket mind a Th1, mind a Th2 sejtekben szignifikánsan csökkentette (355). A különbségek az eltérő gátlási stratégiának és az eltérő kalcium festékeknek is köszönhetőek valószínűleg.

Mindezek alapján jelen vizsgálatunkban a TRAM-34 a proinflammatorikus szubpopulációkra szelektívebbnek tűnik, bár azt fontos ismét megjegyeznünk, hogy egészséges alanyokat vizsgáltunk, így ezen sejtek nem hiperaktívak, mint az egyes autoimmun egyénekből izolált sejtek.

A beállított módszer adataink alapján alkalmas a 4 szubpopuláció szimultán vizsgálatára, kis különbségeket is eredményesen ki tudunk mutatni. Természetesen további fejlesztéseket érdemes elvégezni. Érdekes lehet például a Fluo-3AM fluoreszcens molekulát helyettesíteni a nagyobb abszorpciós és emissziós Fluo-4-el, mely szélesebb kalcium c.c.-tartományban ad lineáris jelet (356). Ezek a finom beállítások további vizsgálatokat igényelnek.

### 6.2.3 *A Kv1.3-csatorna expresszió mérésének eredményei*

A Kv1.3 csatorna expresszió mérését elvégeztük ebben a vizsgálatban is, ugyanis ilyen részletességű expressziós adatok nem állnak rendelkezésre a szakirodalomban. Adataink alapján a Th17 és Treg sejtek igen magas expressziót mutatnak. Ha ezeket az adatokat összevetjük a kalcium beáramlás kinetikai adataival, azt tapasztaljuk, hogy a legalacsonyabb expressziót mutató Th1-es sejteknek a legintenzívebb a kalcium beáramlása, míg a viszonylag magas expressziót mutató Treg sejteknek a legmérsékeltőbb az aktivációt követő influxa. Ez arra utal, hogy az IKCa1-es csatorna szerepe elengedhetetlen az egészségesek vizsgált szubpopulációjának aktiválódásához (284). A CD-s vizsgálat eredményeivel annyiban egyeznek meg ezen vizsgálatunk adatai, hogy a Th1-es sejtek enyhén bár, de ezen méréseinkben is kisebb mennyiségben expresszálják a feszültségfüggő  $K^+$ -csatornát.

## 7 Következtetések

Vizsgálataink eredményei alapján az alábbi következtetéseket vontuk le:

1. **A gyermekkori CD-ben a periférián emelkedett Th1 sejtmennyiség mutatkozik meg.** Ez a megfigyelésünk mások adataival is összhangban áll, és feltehetőleg a gyulladásért felelős szubpopuláció autoreaktivvá válása során bekövetkező klonális expanszió a felelős érte. Ezen kívül a periféria-mucosa közötti szubpopuláció szintű szelektív transzlokáció is szerepet játszhat a folyamatban.
2. **A gyermekkori CD-ben a perifériás Th2 sejtek korai aktivációja során fokozott kalcium beáramlás figyelhető meg a Tc és Th1 sejtekhez képest.** Míg egészséges gyermekekben a Tc, Th1 és Th2 sejtek kalcium beáramlás kinetikája szignifikánsan nem tér el egymástól, addig CD-ben a kiindulási (nyugalmi) kalcium szint a Th2 sejtekben statisztikailag is igazolható módon magasabb, csakúgy, mint a maximális kalcium szint, a beáramlás során tapasztalható emelkedés meredeksége (slope érték) illetve az aktivációt követő 15 perc AUC értéke. Ez a Th2 sejtek eleve fokozott aktivitására, illetve a megváltozott funkciójára és korai aktivitására utal.
3. **A MgTX, és TRAM-34 K<sup>+</sup>-csatorna gátlószerek *in vitro* hatékonyan és szelektíven képesek csökkenteni a Th2 sejtek CD-ben tapasztalható fokozott aktivitását.** Ennek során úgy csökkentik a kiindulási és maximum kalcium szinteket, a slope és AUC értékeket szignifikáns mértékben, hogy közben a Tc és Th1 sejtek értékeit lényegesen nem befolyásolják. Ez a hatás a súlyos, PCDAI > 30 értékű betegek első IFX-kezelés előtti mintáiban szintén megfigyelhető.
4. **Az IFX-kezelés hat a fokozott korai T sejtaktivációt mutató perifériás Th2 sejtekre.** Ennek során a maximum, slope és AUC értékek csökkentek. A jelenség háttérmagyarázatára irodalmi forrást nem sikerült fellelnünk, de elképzelhető, hogy az IFX által a fokozott aktivitású T sejtek apoptózis negatív szelekcióval eltávolította a keringésből a fokozott kalcium beáramlású sejteket, vagy egyéb, eddig le nem írt folyamat áll a jelenség hátterében. Ennek része

lehet a normalizálódott Kv1.3 expresszió is, melyet a 4. IFX-kezelés után detektáltunk a Th2 sejtek felszínén.

5. **Az IFX-által normalizált Th2 kalcium beáramlás kinetikát a MgTx és a TRAM-34 már nem képes tovább módosítani.** A 4nM MgTX és 240 nM TRAM-34 kezelés esetében a MgTX egy paraméter esetében sem okozott szignifikáns változást, míg a TRAM-34 csupán a maximális kalcium szint eléréséhez szükséges időt csökkentette jelentősen.
6. **A Kv1.3 csatorna megváltozott expressziója legalább részben felelős lehet a gyermekkori CD kapcsán megfigyelt módosult korai T sejt aktivációért.** Az egészséges kontrollokhoz képest mind a hagyományosan kezelt, mind a súlyos CD-s gyermekek Th2 sejtjeinek felszínén emelkedett Kv1.3 expressziót mértünk. A MgTX hatékony kalcium beáramlás kinetika módosító hatása is a csatorna jelentős szerepére utal. Valószínűleg a csatorna működése nélkül a fokozott kalcium beáramlás nem történhetne meg a negatív membránpotenciál megszűnésének kockázata nélkül. Így tehát a fokozott aktivációhoz szükséges a kálium csatorna működésének/expressziójának fokozódása is. Valószínűleg az IKCa1-es csatorna is hasonló szereppel bír, a TRAM-34 hatása alapján, ugyanakkor ennek expresszióját közvetlenül nem mértük.
7. **Egészséges felnőttekben a Th1, Th2, Th17 és Treg sejtek kalcium beáramlás kinetikája jelentősen eltér.** Adatainkban a Th1 sejtek mutatták a legintenzívebb, míg a Treg sejtek a legmértékletesebb kalcium beáramlást a lektinaktivációt követően. A leggyorsabb változást a proinflammatorikus Th17 sejtek esetében tapasztaltuk.
8. **Egészséges felnőttek Th1, Th2, Th17 és Treg-sejeiben a K<sup>+</sup>-csatornák jelentősége eltér.** Adataink alapján a legkisebb mértékben a Th1-es, míg legnagyobb mértékben a Th17 sejtek expresszálják a feszültségfüggő K<sup>+</sup>-csatornát. Az expresszió és a kalcium beáramlás karakterisztika között csak bizonyos esetekben látunk hasonlóságokat. A gátlószerek szubpopulációnkénti eltérő hatása is arra utal, hogy a Kv1.3 és az IKCa1-es csatorna egymáshoz viszonyított aránya eltérhet ezen sejtek között.

9. **Az általunk beállított módszer segítségével a Th1, Th2, Th17 és Treg sejtek szimultán kinetikus mérése megoldható a köztük lévő kis különbségek kimutatására való képesség elvesztése nélkül.** Méréseink alapján ki tudtuk mutatni a 4 szubpopuláció közötti különbségeket, illetve a gátlószerek eltérő hatását is, tehát feltételezhetjük, hogy patológiás állapotokban (mint pl. autoimmun kórképek) szintén eredményesen mutathatjuk ki ilyen módon a korai T sejt aktiváció során bekövetkező kalcium beáramlás kinetikus eltéréseit.

## 8 Összefoglalás

*Háttér:* A gyermekkori Crohn-betegség (CD) előfordulás folyamatosan emelkedik. Patogenezisének és progressziójának hátterében több környezeti, genetikai és immunológiai faktort azonosítottak a kutatók. Ezek kapcsán az egyes T sejt szubpopulációk megváltozott fenotípusa és funkciója igazolódott. Munkacsoportunk már régóta vizsgálja a korai T sejt aktiváció során bekövetkező kalcium beáramlást, és annak autoimmun kórképekben történő aberrációit kinetikus, flow-cytometriás módszerekkel. A Kv1.3 és az IKCa1 kálium csatornák gátlása több esetben bizonyult már ígéretes terápiás célpontnak.

*Célkitűzés:* Célunk volt a különböző súlyosságú gyermekkori CD-ben szenvedő betegek perifériás vérmintáiból izolált Tc, Th1 és Th2 sejtek kalcium beáramlás kinetikáját, azok esetleges eltéréseit vizsgálni egészséges kontrollokhoz hasonlítva. Ezen kívül célunk volt a hagyományosan és infliximabbal (IFX) kezelt betegek közötti különbségeket detektálni. Vizsgáltuk továbbá a Kv1.3 és IKCa1 kálium csatornák szerepét, azok gátlásának hatását. Ehhez kapcsolódóan munkánk második fázisában egy olyan módszert volt célunk beállítani és tesztelni, mely alkalmas a Th1 és Th2 sejtek mellett a Th17 és Treg szubpopulációk szimultán kinetikus monitorozására egészséges alanyok vérmintáiban, anélkül, hogy a kis különbségek kimutatására való képesség jelentősen romlana.

*Módszerek:* A gyermekkori CD vizsgálatokor 23 hagyományosan kezelt, 6 IFX-kezelésben részesülő és 12 egészséges kontroll gyermek perifériás vérmintáiból izoláltuk a mononukleális sejteket, majd CD4, CD8, CXCR3 és CCR4 konjugált antitestekkel jelöltük az egyes szubpopulációkat. A kalcium jel detektálására FLUO-3AM és Fura Red festékeket, míg a sejtaktiválásra fitohemagglutinint alkalmaztunk. A jelváltozást összesen 15 percig detektáltuk áramlási cytóméter segítségével. A 4 szubpopuláció szimultán vizsgálatának mérésekor 14 egészséges felnőtt perifériás vérből izolált mononukleáris sejteket jelöltünk CD4, CXCR3, CCR4, CCR6 és CD25 konjugált antitestekkel. A kalcium jel detektálására FLUO-3AM festéket alkalmaztunk, a sejtaktiválás fitohemagglutininnel történt. A jelváltozást ebben az esetben is 15 percig mértük. Mindkét vizsgálatban a Kv1.3 csatorna expressziót is vizsgáltuk FITC-vel konjugált poliklonális antitest segítségével. Méréseinkhez BD FACSAria áramlási cytómétert, míg adatelemzéseinkhez a saját fejlesztésű FACSKin softwaret alkalmaztuk.

*Eredmények:* Sikerült kimutatnunk, hogy egészséges, korban azonos kontroll csoporthoz képest a CD-s gyermekek perifériás Th2 sejtei fokozott kalcium beáramlás kinetikát mutatnak a lektinaktiváció hatására. A Tc és Th1 sejtekre ez a megváltozott funkció nem jellemző. A 4nM MgTX és 240nM TRAM-34-el történő kezelés egyaránt szignifikáns

csökkentést ért el a Th2 sejtek kalcium beáramlásában, anélkül, hogy a Tc és Th1 sejteket ez a hatás érintette volna. Érdekes módon az IFX-kezelést követően hasonló jelenséget tapasztaltunk. Az IFX-kezelésen átesett gyermekek mintáiban a Th2 sejtek normalizált kalcium influx-át a kálium csatorna gátlószerek tovább már nem módosították. A Kv1.3 csatorna expressziója, mely a betegek Th2 sejtjein magas értéket mutatott, az IFX-kezelés hatására szintén jelentősen csökkent. A munkánk második fázisában beállított kinetikus flow-cytometriás módszer segítségével egészséges felnőttek perifériás vérmintáiból izolált Th1, Th2, Th17 és Treg sejtekben eltérő kalcium beáramlás kinetikát igazoltunk, melyekre a MgTX és a TRAM-34 kezelés eltérően hatott.

*Konklúzió:* A gyermekkori CD-ben fokozott perifériás Th2 sejt aktiváció figyelhető meg, melyet a kálium csatornagátló szerek szelektíven és hatásosan képesek csökkenteni. Az IFX-kezelés nem várt módon jelentősen befolyásolja ezen sejtek kalcium beáramlás kinetikáját, és Kv1.3 csatorna expreszióját. A munkánk második részében kidolgozott módszer alkalmas a Th1, Th2, Th17 és Treg sejtek szimultán, kinetikus vizsgálatára úgy, hogy a köztük lévő különbségek kimutatása is hatékony.

1. Orbán C, Szabó D, Bajnok A, Vásárhelyi B, Tulassay T, Arató A, Veres G, **Toldi G.** Altered activation of peripheral CD8+ T cells in pediatric Crohn's disease. *Immunol Lett.* 2017;185:48-51. *IF:* 2.483
2. Orbán C, Szabó D, Bajnok A, Vásárhelyi B, Tulassay T, Arató A, Veres G, **Toldi G.** Altered activation of peripheral CD8+ T cells in pediatric Crohn's disease. *Immunol Lett.* 2017;185:48-51. *IF:* 2.483



## 9 Summary

*Background:* The incidence of childhood-onset Crohn's disease (CD) is continuously increasing. Researchers identified environmental, genetic and immunological factors behind its pathogenesis and progression. Altered phenotype and function of T cell subpopulations proved to be relevant in these processes. Our research group has been investigating the calcium influx of T cells upon activation and their aberrations in autoimmune disorders with kinetic flow cytometric methods. Inhibition of Kv1.3 and IKCa1 potassium channels proved to be potential therapeutic targets in several cases.

*Aims:* Our aim was to characterise the calcium influx kinetics and the potential alterations of Tc, Th1 and Th2 cells isolated from peripheral blood of patients with different severity of childhood CD compared to age-matched healthy controls. Furthermore, we sought to detect the differences between the conventionally treated patients and patients enrolled on infliximab induction therapy. We also assessed the role of Kv1.3 and IKCa1 potassium channels and the effects of their specific inhibition. Related to this, in the second phase of our study, we aimed to develop and test a method which is suitable for the simultaneous kinetic monitoring of the Th17 and Treg cells beside the Th1 and Th2 subpopulations in peripheral blood samples of healthy adults without the loss of ability to detect small differences.

*Methods:* In the study of childhood CD, 23 conventionally treated, 6 IFX treated and 12 healthy controls were involved. Peripheral blood samples were obtained and mononuclear cells were isolated. Subpopulations were labelled with CD4, CD8, CXCR3 and CCR4 antibodies conjugated to different fluorophores. To detect calcium signal, Fluo-3 and Fura Red dyes, while to induce activation phytohemagglutinin was applied. Signal changes were detected for 15 minutes with a flow cytometer. In order to study of the 4 subpopulation, 14 healthy adults were enrolled. Mononuclear cells, isolated from peripheral blood samples, were labelled fuorophore conjugated CD4, CXCR3, CCR4, CCR6 and CD25 antibodies. To detect calcium signal Fluo-3 dye was applied and cells were activated with phytohemagglutinin. Signal changes were recorded for 15 minutes. In both studies Kv1.3 channel expression was measured with FITC conjugated polyclonal antibody. For our measurements BD FACS Aria flow cytometer and for our data analysis the proprietary FACSKin software was applied.

*Results:* We could detect that patients with childhood CD possess augmented lectin activation, therefore, peripheral Th2 cells show an increase in calcium influx kinetics compared to age-matched healthy controls. This phenomenon does not apply to Tc and Th1 cells. Both 4nM MgTX and 240nM TRAM-34 could significantly decrease the calcium influx parameter values of the Th2 cells without affecting the Tc or the Th1 subsets. Interestingly,

following IFX therapy a similar phenomenon was observed. In samples obtained from children who received the fourth IFX therapy, the normalized Th2 calcium influx could not be further modified by the potassium channel inhibitors. The expression of the Kv1.3 channel, whose value was high in patients' Th2 cells, decreased significantly upon IFX therapy. In the second phase of our study, different calcium influx characteristics were confirmed between Th1, Th2, Th17 and Treg cells with the help of the kinetic flow cytometric method. On these cells the MgTx and TRAM-34 had different effects.

*Conclusion:* In patients with childhood CD, elevated peripheral Th2 cell activation can be observed, which can be decreased selectively and effectively by potassium channel inhibitors. Unexpectedly, the IFX therapy affected the calcium influx kinetics and the Kv1.3 channel expression of these cells. The developed method is suitable for the simultaneous kinetic measurement of Th1, Th2, Th17 and Treg cells in such a way that the detection of small differences between them is also effective.

**10 Irodalomjegyzék**

1. Bernstein CN, M Fried, J Krabshuis, H Cohen, R Eliakim, S Fedail, R Gearry, K Goh, S HamidAG Khan. (2010) World Gastroenterology Organization Practice Guidelines for the diagnosis and management of IBD in 2010. *Inflammatory bowel diseases*, 1: 112-124.
2. Karlinger K, T Györke, E Makö, Á MesterZ Tarján. (2000) The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *European Journal of Radiology*, 3: 154-167.
3. Lakatos PL. (2006) Recent trends in the epidemiology of inflammatory bowel diseases: up or down? *World Journal of Gastroenterology*, 38: 6102-6108.
4. Hensley AILP Beales. (2015) Use of Cyclo-Oxygenase Inhibitors Is Not Associated with Clinical Relapse in Inflammatory Bowel Disease: A Case-Control Study. *Pharmaceuticals*, 3: 512-524.
5. Molodecky NA, IS Soon, DM Rabi, WA Ghali, M Ferris, G Chernoff, EI Benchimol, R Panaccione, S Ghosh, HW BarkemaGG Kaplan. (2012) Increasing Incidence and Prevalence of the Inflammatory Bowel Diseases With Time, Based on Systematic Review. *Gastroenterology*, 1: 46-54.e42.
6. Cuffari C. (2009) Diagnostic Considerations in Pediatric Inflammatory Bowel Disease Management. *Gastroenterology & Hepatology*, 11: 775-783.
7. Bernstein CN, P Rawsthorne, M CheangJF Blanchard. (2006) A population-based case control study of potential risk factors for IBD. *The American journal of gastroenterology*, 5: 993-1002.
8. Mark A Peppercorn ASC. (2016) Definition, epidemiology, and risk factors in inflammatory bowel disease. *UpToDate*,
9. Orholm M, P Munkholm, E Langholz, OH Nielsen, TI SorensenV Binder. (1991) Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *The New England journal of medicine*, 2: 84-8.
10. Satsangi J, C Grootsholten, H HoltDP Jewell. (1996) Clinical patterns of familial inflammatory bowel disease. *Gut*, 5: 738-41.
11. Halfvarson J, L Bodin, C Tysk, E LindbergG Jarnerot. (2003) Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics. *Gastroenterology*, 7: 1767-73.
12. Laharie D, S Debeugny, M Peeters, A Van Gossum, C Gower-Rousseau, J Belaiche, R Fiasse, JL Dupas, E Lerebours, S Piotte, A Cortot, S Vermeire, B GrandbastienJF Colombel. (2001) Inflammatory bowel disease in spouses and their offspring. *Gastroenterology*, 4: 816-9.

13. Colombel JF, B Grandbastien, C Gower-Rousseau, S Plegat, JP Evrard, JL Dupas, JP Gendre, R Modigliani, J Belaiche, J Hostein, JP Hugot, H van KruiningenA Cortot. (1996) Clinical characteristics of Crohn's disease in 72 families. *Gastroenterology*, 3: 604-7.
14. de Ridder L, RK Weersma, G Dijkstra, G van der Steege, MA Benninga, IM Nolte, JA Taminau, DW HommesPC Stokkers. (2007) Genetic susceptibility has a more important role in pediatric□onset Crohn's disease than in adult□onset Crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases*, 9: 1083-1092.
15. Sun L, J Roesler, A Rösen-Wolff, U Winkler, R Koch, A ThürigenJ Henker. (2003) CARD15 genotype and phenotype analysis in 55 pediatric patients with Crohn disease from Saxony, Germany. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 4: 492-497.
16. Uhlig HH, T Schwerd, S Koletzko, N Shah, J Kammermeier, A Elkadri, J Ouahed, DC Wilson, SP TravisD Turner. (2014) The diagnostic approach to monogenic very early onset inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 5: 990-1007. e3.
17. Shim JOJK Seo. (2014) Very early-onset inflammatory bowel disease (IBD) in infancy is a different disease entity from adult-onset IBD; one form of interleukin-10 receptor mutations. *Journal of human genetics*, 6: 337-341.
18. Ekblom A, C Helmick, M ZackHO Adami. (1991) The epidemiology of inflammatory bowel disease: a large, population-based study in Sweden. *Gastroenterology*, 2: 350-8.
19. Kyle J. (1992) Crohn's disease in the northeastern and northern Isles of Scotland: an epidemiological review. *Gastroenterology*, 2: 392-9.
32. Munkholm P, E Langholz, OH Nielsen, S KreinerV Binder. (1992) Incidence and prevalence of Crohn's disease in the county of Copenhagen, 1962-87: a sixfold increase in incidence. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 7: 609-14.
33. Loftus EV, Jr., MD Silverstein, WJ Sandborn, WJ Tremaine, WS HarmsenAR Zinsmeister. (2000) Ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940-1993: incidence, prevalence, and survival. *Gut*, 3: 336-43.
34. Acheson ED. (1960) The distribution of ulcerative colitis and regional enteritis in United States veterans with particular reference to the Jewish religion. *Gut*, 291-3.
35. Mayberry JF, D Judd, H Smart, J Rhodes, B CalcraftJS Morris. (1986) Crohn's disease in Jewish people--an epidemiological study in south-east Wales. *Digestion*, 4: 237-40.
36. Calkins BM, AM Lilienfeld, CF GarlandAI Mendeloff. (1984) Trends in incidence rates of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Digestive diseases and sciences*, 10: 913-20.

37. Khalili H, ES Huang, AN Ananthakrishnan, L Higuchi, JM Richter, CS FuchsAT Chan. (2012) Geographical variation and incidence of inflammatory bowel disease among US women. *Gut*, 12: 1686-92.
38. Niv YG Abukasis. (1991) Prevalence of ulcerative colitis in the Israeli kibbutz population. *Journal of clinical gastroenterology*, 1: 98-101.
39. Tamboli CP, C Neut, P DesreumauxJF Colombel. (2004) Dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut*, 1: 1-4.
40. Ohkusa T, N Sato, T Ogihara, K Morita, M OgawaI Okayasu. (2002) *Fusobacterium varium* localized in the colonic mucosa of patients with ulcerative colitis stimulates species-specific antibody. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 8: 849-53.
41. Keighley MR, Y Arabi, F Dimock, DW Burdon, RN AllanJ Alexander-Williams. (1978) Influence of inflammatory bowel disease on intestinal microflora. *Gut*, 12: 1099-104.
42. Thompson NP, SM Montgomery, RE PounderAJ Wakefield. (1995) Is measles vaccination a risk factor for inflammatory bowel disease? *Lancet (London, England)*, 8957: 1071-4.
43. Lisby G, J Andersen, K EngbaekV Binder. (1994) *Mycobacterium paratuberculosis* in intestinal tissue from patients with Crohn's disease demonstrated by a nested primer polymerase chain reaction. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 10: 923-9.
44. Montgomery SM, DL Morris, RE PounderAJ Wakefield. (1999) Paramyxovirus infections in childhood and subsequent inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 4: 796-803.
45. Lopez-Serrano P, JL Perez-Calle, MT Perez-Fernandez, JM Fernandez-Font, D Boixeda de MiguelCM Fernandez-Rodriguez. (2010) Environmental risk factors in inflammatory bowel diseases. Investigating the hygiene hypothesis: a Spanish case-control study. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 12: 1464-71.
46. Porter CK, DR Tribble, PA Aliaga, HA HalvorsonMS Riddle. (2008) Infectious gastroenteritis and risk of developing inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 3: 781-6.
47. Porter CK, BD Cash, M Pimentel, A AkinseyeMS Riddle. (2012) Risk of inflammatory bowel disease following a diagnosis of irritable bowel syndrome. *BMC gastroenterology*, 55.
48. Gradel KO, HL Nielsen, HC Schonheyder, T Ejlersen, B KristensenH Nielsen. (2009) Increased short- and long-term risk of inflammatory bowel disease after salmonella or campylobacter gastroenteritis. *Gastroenterology*, 2: 495-501.

49. Gilat T, D Hacoheh, P LilosMJ Langman. (1987) Childhood factors in ulcerative colitis and Crohn's disease. An international cooperative study. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 8: 1009-24.
50. Card T, RF Logan, LC RodriguesJG Wheeler. (2004) Antibiotic use and the development of Crohn's disease. *Gut*, 2: 246-50.
51. Ungaro R, CN Bernstein, R Geary, A Hviid, KL Kolho, MP Kronman, S Shaw, H Van Kruiningen, JF ColombelA Atreja. (2014) Antibiotics associated with increased risk of new-onset Crohn's disease but not ulcerative colitis: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol*, 11: 1728-38.
52. Khalili H, AN Ananthakrishnan, GG Konijeti, X Liao, LM Higuchi, CS Fuchs, D Spiegelman, JM Richter, JR KorzenikAT Chan. (2013) Physical activity and risk of inflammatory bowel disease: prospective study from the Nurses' Health Study cohorts. *BMJ (Clinical research ed.)*, f6633.
53. Jones PD, MD Kappelman, CF Martin, W Chen, RS SandlerMD Long. (2015) Exercise decreases risk of future active disease in patients with inflammatory bowel disease in remission. *Inflamm Bowel Dis*, 5: 1063-71.
54. D'Inca R, M Varnier, C Mestriner, D Martines, A D'OdoricoGC Sturniolo. (1999) Effect of moderate exercise on Crohn's disease patients in remission. *Italian journal of gastroenterology and hepatology*, 3: 205-10.
55. Gupta N, S Khera, RP Vempati, R SharmaRL Bijlani. (2006) Effect of yoga based lifestyle intervention on state and trait anxiety. *Indian journal of physiology and pharmacology*, 1: 41-7.
56. Elsenbruch S, J Langhorst, K Popkirowa, T Muller, R Luedtke, U Franken, A Paul, G Spahn, A Michalsen, OE Janssen, M SchedlowskiGJ Dobos. (2005) Effects of mind-body therapy on quality of life and neuroendocrine and cellular immune functions in patients with ulcerative colitis. *Psychotherapy and psychosomatics*, 5: 277-87.
57. Narula NRN Fedorak. (2008) Exercise and inflammatory bowel disease. *Canadian Journal of Gastroenterology*, 5: 497-504.
58. Drouet M, L Dubuquoy, P DesreumauxB Bertin. (2012) Visceral fat and gut inflammation. *Nutrition*, 2: 113-117.
59. Walters WA, Z XuR Knight. (2014) Meta-analyses of human gut microbes associated with obesity and IBD. *FEBS Letters*, 22: 4223-4233.

60. Kern PA, M Saghizadeh, JM Ong, RJ Bosch, R DeemRB Simsolo. (1995) The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *Journal of Clinical Investigation*, 5: 2111.
61. Desreumaux P, O Ernst, K Geboes, L Gambiez, D Berrebi, H Müller-Alouf, S Hafraoui, D Emilie, N Ectors, M Peuchmaur, A Cortot, M Capron, J AuwerxJ-F Colombel. (1999) Inflammatory alterations in mesenteric adipose tissue in Crohn's disease. *Gastroenterology*, 1: 73-81.
62. Long MD, WV Crandall, IH Leibowitz, L Duffy, F del Rosario, SC Kim, MJ Integlia, J Berman, J Grunow, RB Colletti, BT Schoen, AS Patel, H Baron, E Israel, G Russell, S Ali, HH Herfarth, C MartinMD Kappelman. (2011) Prevalence and epidemiology of overweight and obesity in children with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 10: 2162-8.
63. Flores A, E Burstein, DJ CIPHERLA Feagins. (2015) Obesity in Inflammatory Bowel Disease: A Marker of Less Severe Disease. *Digestive diseases and sciences*, 8: 2436-45.
64. Chan SS, R Luben, A Olsen, A Tjonneland, R Kaaks, B Teucher, S Lindgren, O Grip, T Key, FL Crowe, MM Bergmann, H Boeing, G Hallmans, P Karling, K Overvad, D Palli, G Masala, H Kennedy, F vanSchaik, B Bueno-de-Mesquita, B Oldenburg, KT Khaw, E RiboliAR Hart. (2013) Body mass index and the risk for Crohn's disease and ulcerative colitis: data from a European Prospective Cohort Study (The IBD in EPIC Study). *Am J Gastroenterol*, 4: 575-82.
65. Radford-Smith G. (2008) What is the importance of appendectomy in the natural history of IBD? *Inflammatory bowel diseases*, S72-S74.
66. Kaplan GG, T Jackson, BE Sands, M Frisch, RE AnderssonJ Korzenik. (2008) The risk of developing Crohn's disease after an appendectomy: a meta-analysis. *The American journal of gastroenterology*, 11: 2925-2931.
67. Andersson RE, G Olaison, C TyskA Ekbom. (2003) Appendectomy is followed by increased risk of Crohn's disease. *Gastroenterology*, 1: 40-46.
68. Koutroubakis IE, IG VlachonikolisEA Kouroumalis. (2002) Role of appendicitis and appendectomy in the pathogenesis of ulcerative colitis: a critical review. *Inflammatory bowel diseases*, 4: 277-286.
69. Andersson RE, G Olaison, C TyskA Ekbom. (2001) Appendectomy and protection against ulcerative colitis. *New England Journal of Medicine*, 11: 808-814.

75. Tanner ARAS Raghunath. (1988) Colonic inflammation and nonsteroidal anti-inflammatory drug administration. An assessment of the frequency of the problem. *Digestion*, 2: 116-20.
76. Ananthkrishnan AN, LM Higuchi, ES Huang, H Khalili, JM Richter, CS FuchsAT Chan. (2012) Aspirin, nonsteroidal anti-inflammatory drug use, and risk for Crohn disease and ulcerative colitis: a cohort study. *Annals of internal medicine*, 5: 350-9.
77. Felder JB, BI Korelitz, R Rajapakse, S Schwarz, AP HoratagisG Gleim. (2000) Effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs on inflammatory bowel disease: a case-control study. *Am J Gastroenterol*, 8: 1949-54.
78. Takeuchi K, S Smale, P Premchand, L Maiden, R Sherwood, B Thjodleifsson, E BjornssonI Bjarnason. (2006) Prevalence and mechanism of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced clinical relapse in patients with inflammatory bowel disease. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*, 2: 196-202.
79. Mahadevan U, EV Loftus, Jr., WJ TremaineWJ Sandborn. (2002) Safety of selective cyclooxygenase-2 inhibitors in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*, 4: 910-4.
88. Bankar RN, CO Dafe, A KohnkePS Babu. (2006) Ulcerative colitis probably associated with isotretinoin. *Indian journal of gastroenterology : official journal of the Indian Society of Gastroenterology*, 3: 171-2.
89. Alhusayen RO, DN Juurlink, MM Mamdani, RL Morrow, NH ShearCR Dormuth. (2013) Isotretinoin use and the risk of inflammatory bowel disease: a population-based cohort study. *The Journal of investigative dermatology*, 4: 907-12.
90. Crockett SD, CQ Porter, CF Martin, RS SandlerMD Kappelman. (2010) Isotretinoin use and the risk of inflammatory bowel disease: a case-control study. *Am J Gastroenterol*, 9: 1986-93.
91. Margolis DJ, M Fanelli, O HoffstadJD Lewis. (2010) Potential association between the oral tetracycline class of antimicrobials used to treat acne and inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*, 12: 2610-6.
97. Colitis–Pathophysiology U. (2003) Inflammatory bowel disease part I: ulcerative colitis–pathophysiology and conventional and alternative treatment options. *Alternative medicine review*, 3: 247-283.
98. Head KJ Jurenka. (2004) Inflammatory bowel disease part II: Crohn's disease--pathophysiology and conventional and alternative treatment options. *Alternative medicine review*, 4: 360-402.



99. Baumgart DCWJ Sandborn. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *The Lancet*, 9573: 1641-1657.
100. Silverberg MS, J Satsangi, T Ahmad, ID Arnott, CN Bernstein, SR Brant, R Caprilli, JF Colombel, C Gasche, K Geboes, DP Jewell, A Karban, EV Loftus, Jr., AS Pena, RH Riddell, DB Sachar, S Schreiber, AH Steinhart, SR Targan, S VermeireBF Warren. (2005) Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Canadian journal of gastroenterology = Journal canadien de gastroenterologie*, 5a-36a.
101. Satsangi J, MS Silverberg, S VermeireJF Colombel. (2006) The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut*, 6: 749-753.
102. Levine A, A Griffiths, J Markowitz, DC Wilson, D Turner, RK Russell, J Fell, FM Rummel, T Walters, M Sherlock, M DubinskyJS Hyams. (2011) Pediatric modification of the Montreal classification for inflammatory bowel disease: the Paris classification. *Inflamm Bowel Dis*, 6: 1314-21.
103. Lennard-Jones J. (1989) Classification of inflammatory bowel disease. *Scandinavian journal of gastroenterology*, sup170: 2-6.
104. Bousvaros A, D Antonioli, R Colletti, M Dubinsky, J Glickman, B Gold, A Griffiths, G Jevon, L HiguchiJ Hyams. (2007) Differentiating ulcerative colitis from Crohn disease in children and young adults: report of a working group of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition and the Crohn's and Colitis Foundation of America. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 5: 653-674.
105. Dignass AU, C Gasche, D Bettenworth, G Birgegård, S Danese, JP Gisbert, F Gomollon, T Iqbal, K KatsanosI Koutroubakis. (2015) European consensus on the diagnosis and management of iron deficiency and anaemia in inflammatory bowel diseases. *Journal of Crohn's and Colitis*, 3: 211-222.
106. Koh D, Y Miao, R Chinn, Z Amin, R Zeegen, D WestabyJ Healy. (2001) MR imaging evaluation of the activity of Crohn's disease. *American Journal of Roentgenology*, 6: 1325-1332.
107. Stange EF, SPL Travis, S Vermeire, C Beglinger, L Kupcinkas, K Geboes, A Barakauskiene, V Villanacci, A Von Herbay, BF Warren, C Gasche, H Tilg, SW Schreiber, J SchölmerichW Reinisch. (2006) European evidence based consensus on the

- diagnosis and management of Crohn's disease: definitions and diagnosis. *Gut*, Suppl 1: i1-i15.
108. Both H, K Torp-Pedersen, S Kreiner, C HendriksenV Binder. (1983) Clinical appearance at diagnosis of ulcerative colitis and Crohn's disease in a regional patient group. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 7: 987-991.
109. Machida HM, SA Catto, DG Gall, C TrevenenRB Scott. (1994) Allergic colitis in infancy: clinical and pathologic aspects. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 1: 22-26.
110. Odze RD. (2013) IBD: role of the pathologist in the diagnosis and management of IBD. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 11: 625-626.
111. Denmark VKL Mayer, *Chapter 60 - Inflammatory Bowel Diseases A2 - Rose, Noel R*, in *The Autoimmune Diseases (Fifth Edition)*, I R Mackay, Editor. 2014, Academic Press: Boston. p. 873-888.
112. Steinhart AH, K Ewe, AM Griffiths, R ModiglianiOO Thomsen. (2003) Corticosteroids for maintenance of remission in Crohn's disease. *The Cochrane database of systematic reviews*, 4: Cd000301.
113. Faubion WA, Jr., EV Loftus, Jr., WS Harmsen, AR ZinsmeisterWJ Sandborn. (2001) The natural history of corticosteroid therapy for inflammatory bowel disease: a population-based study. *Gastroenterology*, 2: 255-60.
114. Hirata A, M Uchino, T Bando, K Hirose, T Chohno, H Sasaki, Y Horio, S Nakamura, N Hida, K Hori, N Tomita, Y Takahashi, Y TakesueH Ikeuchi. (2016) Long-term outcomes and sex differences after restorative proctocolectomy in pediatric patients with ulcerative colitis. *Journal of Pediatric Surgery*, 3: 454-460.
115. Schroeder KW, WJ TremaineDM Ilstrup. (1987) Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis. A randomized study. *The New England journal of medicine*, 26: 1625-9.
116. (OEP) OEP, *A colitis ulcerosa diagnosztikájának és kezelésének finanszírozási protokollja (eljárásrend)*. 2013.
117. Mazza M, MG CilluffoM Cappello, *Clinical Presentation of Crohn's Disease*, in *Crohn's Disease*. 2016, Springer. p. 7-14.
118. Filipsson S, L HulténG Lindstedt. (1978) Malabsorption of fat and vitamin B12 before and after intestinal resection for Crohn's disease. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 5: 529-536.

119. Hyams JS, GD Ferry, FS Mandel, JD Gryboski, PM Kibort, BS Kirschner, AM Griffiths, AJ Katz, RJ GrandJT Boyle. (1991) Development and validation of a pediatric Crohn's disease activity index. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 4: 449.
120. Irvine EJ. (1995) Usual therapy improves perianal Crohn's disease as measured by a new disease activity index. McMaster IBD Study Group. *Journal of clinical gastroenterology*, 1: 27-32.
121. Ruemmele F, G Veres, K-L Kolho, A Griffiths, A Levine, J Escher, JA Dias, A Barabino, C BraeggerJ Bronsky. (2014) Consensus guidelines of ECCO/ESPGHAN on the medical management of pediatric Crohn's disease. *Journal of Crohn's and Colitis*, 10: 1179-1207.
122. (OEP) OEP. (2013) A gyermekkori Crohn-betegség diagnosztikájának és kezelésének finanszírozási protokollja.
123. Donnellan CF, LH YannS Lal. (2013) Nutritional management of Crohn's disease. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 3: 231-242.
124. Critch J, AS Day, A Otley, C King-Moore, JE TeitelbaumH Shashidhar. (2012) Use of enteral nutrition for the control of intestinal inflammation in pediatric Crohn disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2: 298-305.
125. Johnson T, S Macdonald, SM Hill, A ThomasMS Murphy. (2006) Treatment of active Crohn's disease in children using partial enteral nutrition with liquid formula: a randomised controlled trial. *Gut*, 3: 356-361.
126. Alexander DD, LC Bylsma, L ElkayamDL Nguyen. (2016) Nutritional and health benefits of semi-elemental diets: A comprehensive summary of the literature. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*, 2: 306-319.
127. Makola D. (2005) Elemental and Semi-Elemental Formulas: Are They Superior to Polymeric Formulas? *Practical Gastroenterology*, 12: 59.
128. Knight DM, H Trinh, J Le, S Siegel, D Shealy, M McDonough, B Scallon, MA Moore, J Vilcek, P Daddonaet al. (1993) Construction and initial characterization of a mouse-human chimeric anti-TNF antibody. *Molecular immunology*, 16: 1443-53.
129. Hämäläinen A, T SipponenK-L Kolho. (2013) Serum infliximab concentrations in pediatric inflammatory bowel disease. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 1: 35-41.
130. Danese S. (2008) Mechanisms of action of infliximab in inflammatory bowel disease: an anti-inflammatory multitasker. *Digestive and Liver Disease*, S225-S228.

131. Lügering A, M Schmidt, N Lügering, H-G Pauels, W Domschke, T Kucharzik. (2001) Infliximab induces apoptosis in monocytes from patients with chronic active Crohn's disease by using a caspase-dependent pathway. *Gastroenterology*, 5: 1145-1157.
132. Ten Hove T, C Van Montfrans, M Peppelenbosch, S Van Deventer. (2002) Infliximab treatment induces apoptosis of lamina propria T lymphocytes in Crohn's disease. *Gut*, 2: 206-211.
133. Agnholt JK, Kaltoft. (2001) Infliximab downregulates interferon- $\gamma$  production in activated gut T-lymphocytes from patients with Crohn's disease. *Cytokine*, 4: 212-222.
134. Suenart P, V Bulteel, L Lemmens, M Noman, B Geypens, G Van Assche, K Geboes, JL Ceuppens, P Rutgeerts. (2002) Anti-tumor necrosis factor treatment restores the gut barrier in Crohn's disease. *The American journal of gastroenterology*, 8: 2000-2004.
135. Marini M, G Bamias, J Rivera-Nieves, CA Moskaluk, SB Hoang, WG Ross, TT Pizarro, F Cominelli. (2003) TNF- $\alpha$  neutralization ameliorates the severity of murine Crohn's-like ileitis by abrogation of intestinal epithelial cell apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 14: 8366-8371.
136. Danese S, M Sans, F Scaldaferrri, A Sgambato, S Rutella, A Cittadini, JM Piqué, J Panes, JA Katz, A Gasbarrini. (2006) TNF- $\alpha$  blockade down-regulates the CD40/CD40L pathway in the mucosal microcirculation: a novel anti-inflammatory mechanism of infliximab in Crohn's disease. *The Journal of Immunology*, 4: 2617-2624.
137. Di Sabatino A, SL Pender, CL Jackson, JD Prothero, JN Gordon, L Picariello, L Rovedatti, G Docena, G Monteleone, DS Rampton. (2007) Functional modulation of Crohn's disease myofibroblasts by anti-tumor necrosis factor antibodies. *Gastroenterology*, 1: 137-149.
138. Di Sabatino A, R Ciccocioppo, E Armellini, R Morera, L Ricevuti, P Cazzola, I Fulle, GR Corazza. (2004) Serum bFGF and VEGF correlate respectively with bowel wall thickness and intramural blood flow in Crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases*, 5: 573-577.
139. Franchimont D, S Roland, T Gustot, E Quertinmont, Y Toubouti, M-C Gervy, J Deviere, A Van Gossum. (2005) Impact of infliximab on serum leptin levels in patients with Crohn's disease. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 6: 3510-3516.
140. Choy EH, GS Panayi. (2001) Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *The New England journal of medicine*, 12: 907-16.
141. Kolho K-LT, Sipponen. (2014) The long-term outcome of anti-tumor necrosis factor- $\alpha$  therapy related to fecal calprotectin values during induction therapy in pediatric inflammatory bowel disease. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 4: 434-441.

142. Kelsen JR, AB Grossman, H Pauly-Hubbard, K Gupta, RN Baldassano P Mamula. (2014) Infliximab therapy in pediatric patients 7 years of age and younger. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 6: 758-762.
143. Baldassano R, CP Braegger, JC Escher, K DeWoody, DF Hendricks, GF Keenan HS Winter. (2003) Infliximab (REMICADE) therapy in the treatment of pediatric Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*, 4: 833-8.
144. Kempeni J. (1999) Preliminary results of early clinical trials with the fully human anti-TNF $\alpha$  monoclonal antibody D2E7. *Annals of the Rheumatic Diseases*, Suppl 1: I70-I72.
145. Rosh JR, T Lerer, J Markowitz, SR Goli, P Mamula, JD Noe, MD Pfefferkorn, KT Kelleher, AM Griffiths, S Kugathasan, D Keljo, M Oliva-Hemker, W Crandall, RS Carvalho, DR Mack JS Hyams. (2009) Retrospective Evaluation of the Safety and Effect of Adalimumab Therapy (RESEAT) in pediatric Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*, 12: 3042-9.
146. Hyams JS, A Griffiths, J Markowitz, RN Baldassano, WA Faubion, Jr., RB Colletti, M Dubinsky, J Kierkus, J Rosh, Y Wang, B Huang, B Bittle, M Marshall A Lazar. (2012) Safety and efficacy of adalimumab for moderate to severe Crohn's disease in children. *Gastroenterology*, 2: 365-74.e2.
147. Kim JH AR Scialli. (2011) Thalidomide: the tragedy of birth defects and the effective treatment of disease. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 1: 1-6.
148. Singhal SJ Mehta. (2002) Thalidomide in cancer. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 1: 4-12.
149. Lazzerini M, S Martelossi, G Magazzu, S Pellegrino, MC Lucanto, A Barabino, A Calvi, S Arrigo, P Lionetti, M Lorusso, F Mangiantini, M Fontana, G Zuin, G Palla, G Maggiore, M Bramuzzo, MC Pellegrin, M Maschio, V Villanacci, S Manenti, G Decorti, S De Iudicibus, R Paparazzo, M Montico A Ventura. (2013) Effect of thalidomide on clinical remission in children and adolescents with refractory Crohn disease: a randomized clinical trial. *Jama*, 20: 2164-73.
150. Merras-Salmio LKL Kolho. (2016) Golimumab Therapy in Six Patients With Severe Pediatric Onset Crohn Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 3: 344-7.
151. Schreiber S. (2011) Certolizumab pegol for the treatment of Crohn's disease. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 6: 375-389.
152. Targan SR, F Shanahan LC Karp. *Inflammatory bowel disease: from bench to bedside*. Springer Science & Business Media, 2007:

153. Janeway CA, P Travers, M WalportMJ Shlomchik. Immunobiology: the immune system in health and disease. Current Biology, 1997:
154. Flajnik MFM Kasahara. (2010) Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. Nature Reviews Genetics, 1: 47-59.
155. Iwasaki AR Medzhitov. (2004) Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. Nature immunology, 10: 987-995.
156. Mosmann TRS Sad. (1996) The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. Immunology today, 3: 138-146.
157. Erdei A. Immunología. Medicina, 2012:
158. Mueller DL, MK JenkinsRH Schwartz. (1989) Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. Annual review of immunology, 1: 445-480.
159. Dolff S, M Bijl, MG Huitema, PC Limburg, CG KallenbergWH Abdulahad. (2011) Disturbed Th1, Th2, Th17 and T reg balance in patients with systemic lupus erythematosus. Clinical Immunology, 2: 197-204.
160. Romagnani S. (1991) Type 1 T helper and type 2 T helper cells: functions, regulation and role in protection and disease. International journal of clinical & laboratory research, 2: 152-8.
161. Azar ST, H Tamim, HN Beyhum, MZ HabbalWY Almawi. (1999) Type I (Insulin-Dependent) Diabetes Is a Th1- and Th2-Mediated Autoimmune Disease. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 3: 306-310.
162. Wan YY. (2014) GATA3: a master of many trades in immune regulation. Trends in immunology, 6: 233-42.
163. Deo SS, KJ Mistry, AM KakadePV Niphadkar. (2010) Role played by Th2 type cytokines in IgE mediated allergy and asthma. Lung India : Official Organ of Indian Chest Society, 2: 66-71.
164. Zambrano-Zaragoza JF, EJ Romo-Martinez, J Duran-Avelar Mde, N Garcia-MagallanesN Vibanco-Perez. (2014) Th17 cells in autoimmune and infectious diseases. International journal of inflammation, 651503.
165. Ghoreschi K, A Laurence, X-P Yang, K HiraharaJJ O'Shea. (2011) T helper 17 cell heterogeneity and pathogenicity in autoimmune disease. Trends in immunology, 9: 395-401.

166. Kim SW, ES Kim, CM Moon, JJ Park, TI Kim, WH Kim, JH Cheon. (2011) Genetic polymorphisms of IL-23R and IL-17A and novel insights into their associations with inflammatory bowel disease. *Gut*, 11: 1527-1536.
167. Sandborn WJ, BG Feagan, RN Fedorak, E Scherl, MR Fleisher, S Katz, J Johanns, M Blank, P Rutgeerts. (2008) A Randomized Trial of Ustekinumab, a Human Interleukin-12/23 Monoclonal Antibody, in Patients With Moderate-to-Severe Crohn's Disease. *Gastroenterology*, 4: 1130-1141.
168. Hueber W, BE Sands, S Lewitzky, M Vandemeulebroecke, W Reinisch, PD Higgins, J Wehkamp, BG Feagan, MD Yao, M Karczewski, J Karczewski, N Pezous, S Bek, G Bruin, B Mellgard, C Berger, M Londei, AP Bertolino, G Tougas, SP Travis. (2012) Secukinumab, a human anti-IL-17A monoclonal antibody, for moderate to severe Crohn's disease: unexpected results of a randomised, double-blind placebo-controlled trial. *Gut*, 12: 1693-700.
169. Whibley NS, L Gaffen. (2015) Gut-busters -- IL-17 Ain't Afraid Of No IL-23. *Immunity*, 4: 620-622.
170. Sakaguchi S, T Yamaguchi, T Nomura, M Ono. (2008) Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell*, 5: 775-787.
171. Hori S, T Nomura, S Sakaguchi. (2003) Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 5609: 1057-1061.
172. Ziegler SF. (2007) FOXP3: not just for regulatory T cells anymore. *European journal of immunology*, 1: 21-3.
173. Holmen N, A Lundgren, S Lundin, AM Bergin, A Rudin, H Sjoval, L Ohman. (2006) Functional CD4+CD25high regulatory T cells are enriched in the colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis and increase with disease activity. *Inflamm Bowel Dis*, 6: 447-56.
174. Takahashi M, K Nakamura, K Honda, Y Kitamura, T Mizutani, Y Araki, T Kabemura, Y Chijiwa, N Harada, H Nawata. (2006) An inverse correlation of human peripheral blood regulatory T cell frequency with the disease activity of ulcerative colitis. *Digestive diseases and sciences*, 4: 677-86.
175. Uhlig HH, J Coombes, C Mottet, A Izcue, C Thompson, A Fanger, A Tannapfel, JD Fontenot, F Ramsdell, F Powrie. (2006) Characterization of Foxp3+CD4+CD25+ and IL-10-secreting CD4+CD25+ T cells during cure of colitis. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 9: 5852-60.

176. McGhee JR, J Mestecky, MT Dertzbaugh, JH Eldridge, M HirasawaH Kiyono. (1992) The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. *Vaccine*, 2: 75-88.
177. Smythies LE, M Sellers, RH Clements, M Mosteller-Barnum, G Meng, WH Benjamin, JM OrensteinPD Smith. (2005) Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *The Journal of clinical investigation*, 1: 66-75.
178. Denning TL, YC Wang, SR Patel, IR WilliamsB Pulendran. (2007) Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses. *Nat Immunol*, 10: 1086-94.
179. Iwata M, A Hirakiyama, Y Eshima, H Kagechika, C KatoSY Song. (2004) Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity*, 4: 527-38.
180. Hepworth MR, LA Monticelli, TC Fung, CG Ziegler, S Grunberg, R Sinha, AR Mantegazza, HL Ma, A Crawford, JM Angelosanto, EJ Wherry, PA Koni, FD Bushman, CO Elson, G Eberl, D ArtisGF Sonnenberg. (2013) Innate lymphoid cells regulate CD4+ T-cell responses to intestinal commensal bacteria. *Nature*, 7452: 113-7.
181. Panzer M, S Sitte, S Wirth, I Drexler, T SparwasserD Voehringer. (2012) Rapid in vivo conversion of effector T cells into Th2 cells during helminth infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 2: 615-23.
182. Gagliani N, MC Amezcua Vesely, A Iseppon, L Brockmann, H Xu, NW Palm, MR de Zoete, P Licona-Limon, RS Paiva, T Ching, C Weaver, X Zi, X Pan, R Fan, LX Garmire, MJ Cotton, Y Drier, B Bernstein, J Geginat, B Stockinger, E Esplugues, S HuberRA Flavell. (2015) Th17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation. *Nature*, 7559: 221-5.
183. Himmel ME, Y Yao, PC Orban, TS SteinerMK Levings. (2012) Regulatory T-cell therapy for inflammatory bowel disease: more questions than answers. *Immunology*, 2: 115-122.
184. Maloy KJF Powrie. (2011) Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature*, 7351: 298-306.
185. Abraham CJH Cho. (2009) Inflammatory bowel disease. *The New England journal of medicine*, 21: 2066-78.
186. Sun J, X Shen, Y Li, Z Guo, W Zhu, L Zuo, J Zhao, L Gu, J GongJ Li. (2016) Therapeutic Potential to Modify the Mucus Barrier in Inflammatory Bowel Disease. *Nutrients*, 1: 44.



187. Mayer LR Shlien. (1987) Evidence for function of Ia molecules on gut epithelial cells in man. *The Journal of experimental medicine*, 5: 1471-83.
188. Kaser A, E Martínez-NavesRS Blumberg. (2010) Endoplasmic reticulum stress: implications for inflammatory bowel disease pathogenesis. *Current opinion in gastroenterology*, 4: 318-326.
189. VanDussen KL, TC Liu, D Li, F Towfic, N Modiano, R Winter, T Haritunians, KD Taylor, D Dhall, SR Targan, RJ Xavier, DP McGovernTS Stappenbeck. (2014) Genetic variants synthesize to produce paneth cell phenotypes that define subtypes of Crohn's disease. *Gastroenterology*, 1: 200-9.
190. Reinecker HC, M Steffen, T Witthoef, I Pflueger, S Schreiber, RP MacDermottA Raedler. (1993) Enhanced secretion of tumour necrosis factor-alpha, IL-6, and IL-1 beta by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clinical and experimental immunology*, 1: 174-81.
191. Takayama T, N Kamada, H Chinen, S Okamoto, MT Kitazume, J Chang, Y Matuzaki, S Suzuki, A Sugita, K Koganei, T Hisamatsu, T KanaiT Hibi. (2010) Imbalance of NKp44(+)NKp46(-) and NKp44(-)NKp46(+) natural killer cells in the intestinal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*, 3: 882-92, 892.e1-3.
192. Matsuura T, GA West, KR Youngman, JS KleinC Fiocchi. (1993) Immune activation genes in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 2: 448-58.
193. Fiocchi C, JR BattistoRG Farmer. (1981) Studies on isolated gut mucosal lymphocytes in inflammatory bowel disease. Detection of activated T cells and enhanced proliferation to *Staphylococcus aureus* and lipopolysaccharides. *Digestive diseases and sciences*, 8: 728-36.
194. Uo M, T Hisamatsu, J Miyoshi, D Kaito, K Yoneno, MT Kitazume, M Mori, A Sugita, K Koganei, K Matsuoka, T KanaiT Hibi. (2013) Mucosal CXCR4+ IgG plasma cells contribute to the pathogenesis of human ulcerative colitis through Fcγ-mediated CD14 macrophage activation. *Gut*, 12: 1734-44.
195. Hosomi S, N Oshitani, N Kamata, M Sogawa, H Okazaki, T Tanigawa, H Yamagami, K Watanabe, K Tominaga, T Watanabe, Y Fujiwara, K Maeda, K HirakawaT Arakawa. (2011) Increased numbers of immature plasma cells in peripheral blood specifically overexpress chemokine receptor CXCR3 and CXCR4 in patients with ulcerative colitis. *Clinical and experimental immunology*, 2: 215-24.

196. Das KM, A Dasgupta, A Mandal X Geng. (1993) Autoimmunity to cytoskeletal protein tropomyosin. A clue to the pathogenetic mechanism for ulcerative colitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 6: 2487-93.
197. Rummel FM, SR Targan, G Levy, M Dubinsky, J Braun EG Seidman. (1998) Diagnostic accuracy of serological assays in pediatric inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 4: 822-9.
198. Butcher EC, Picker LJ. (1996) Lymphocyte homing and homeostasis. *Science*, 272: 60-6.
199. Villablanca EJ, B Cassani, UH von Andrian JR Mora. (2011) Blocking lymphocyte localization to the gastrointestinal mucosa as a therapeutic strategy for inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 6: 1776-84.
200. Honey K. (2008) The comeback kid: TYSABRI now FDA approved for Crohn disease. *The Journal of clinical investigation*, 3: 825-6.
201. Sands BE, BG Feagan, P Rutgeerts, JF Colombel, WJ Sandborn, R Sy, G D'Haens, S Ben-Horin, J Xu, M Rosario, I Fox, A Parikh, C Milch S Hanauer. (2014) Effects of vedolizumab induction therapy for patients with Crohn's disease in whom tumor necrosis factor antagonist treatment failed. *Gastroenterology*, 3: 618-627.e3.
202. Sanchez-Muñoz F, A Dominguez-Lopez JK Yamamoto-Furusho. (2008) Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 27: 4280-4288.
203. Strober W, J Fuss. (2011) Pro-Inflammatory Cytokines in the Pathogenesis of IBD. *Gastroenterology*, 6: 1756-1767.
204. Powrie F, MW Leach, S Mauze, S Menon, LB Caddle RL Coffman. (1994) Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells. *Immunity*, 7: 553-62.
205. van Dullemen HM, SJ van Deventer, DW Hommes, HA Bijl, J Jansen, GN Tytgat J Woody. (1995) Treatment of Crohn's disease with anti-tumor necrosis factor chimeric monoclonal antibody (cA2). *Gastroenterology*, 1: 129-35.
206. Griseri T, IC Arnold, C Pearson, T Krausgruber, C Schiering, F Franchini, J Schulthess, BS McKenzie, PR Crocker F Powrie. (2015) Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor-Activated Eosinophils Promote Interleukin-23 Driven Chronic Colitis. *Immunity*, 1: 187-99.

207. Forbes E, T Murase, M Yang, KI Matthaei, JJ Lee, NA Lee, PS FosterSP Hogan. (2004) Immunopathogenesis of experimental ulcerative colitis is mediated by eosinophil peroxidase. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 9: 5664-75.
208. Fujino S, A Andoh, S Bamba, A Ogawa, K Hata, Y Araki, T BambaY Fujiyama. (2003) Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut*, 1: 65-70.
209. Elson CO, Y Cong, CT Weaver, TR Schoeb, TK McClanahan, RB FickRA Kastelein. (2007) Monoclonal anti-interleukin 23 reverses active colitis in a T cell-mediated model in mice. *Gastroenterology*, 7: 2359-70.
210. Boden EKSB Snapper. (2008) Regulatory T cells in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol*, 6: 733-41.
211. Monteleone G, MF Neurath, S Ardizzone, A Di Sabatino, MC Fantini, F Castiglione, ML Scribano, A Armuzzi, F Caprioli, GC Sturniolo, F Rogai, M Vecchi, R Atreya, F Bossa, S Onali, M Fichera, GR Corazza, L Biancone, V Savarino, R Pica, A OrlandoF Pallone. (2015) Mongersen, an oral SMAD7 antisense oligonucleotide, and Crohn's disease. *The New England journal of medicine*, 12: 1104-13.
212. Bamias G, M Mishina, M Nyce, WG Ross, G Kollias, J Rivera-Nieves, TT PizarroF Cominelli. (2006) Role of TL1A and its receptor DR3 in two models of chronic murine ileitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 22: 8441-6.
213. Hold GL, M Smith, C Grange, ER Watt, EM El-OmarI Mukhopadhyia. (2014) Role of the gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: What have we learnt in the past 10 years? *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 5: 1192-1210.
214. Lozupone CA, JI Stombaugh, JI Gordon, JK JanssonR Knight. (2012) Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*, 7415: 220-230.
215. Olszak T, D An, S Zeissig, MP Vera, J Richter, A Franke, JN Glickman, R Siebert, RM Baron, DL KasperRS Blumberg. (2012) Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science*, 6080: 489-93.
216. Ivanov, II, K Atarashi, N Manel, EL Brodie, T Shima, U Karaoz, D Wei, KC Goldfarb, CA Santee, SV Lynch, T Tanoue, A Imaoka, K Itoh, K Takeda, Y Umesaki, K HondaDR Littman. (2009) Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell*, 3: 485-98.
217. Wu GD, J Chen, C Hoffmann, K Bittinger, Y-Y Chen, SA Keilbaugh, M Bewtra, D Knights, WA Walters, R Knight, R Sinha, E Gilroy, K Gupta, R Baldassano, L Nessel, H

- Li, FD BushmanJD Lewis. (2011) Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes. *Science* (New York, N.y.), 6052: 105-108.
218. Weinstock JVDE Elliott. (2009) Helminths and the IBD hygiene hypothesis. *Inflamm Bowel Dis*, 1: 128-33.
219. Haberman Y, TL Tickle, PJ Dexheimer, M-O Kim, D Tang, R Karns, RN Baldassano, JD Noe, J Rosh, J Markowitz, MB Heyman, AM Griffiths, WV Crandall, DR Mack, SS Baker, C Huttenhower, DJ Keljo, JS Hyams, S Kugathasan, TD Walters, B Aronow, RJ Xavier, D GeversLA Denson. (2014) Pediatric Crohn disease patients exhibit specific ileal transcriptome and microbiome signature. *The Journal of clinical investigation*, 8: 3617-3633.
220. Sartor RB. (2008) Microbial Influences in Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*, 2: 577-594.
221. Sutton CL, J Kim, A Yamane, H Dalwadi, B Wei, C Landers, SR TarganJ Braun. (2000) Identification of a novel bacterial sequence associated with Crohn's disease. *Gastroenterology*, 1: 23-31.
222. Lodes MJ, Y Cong, CO Elson, R Mohamath, CJ Landers, SR Targan, M FortRM Hershberg. (2004) Bacterial flagellin is a dominant antigen in Crohn disease. *The Journal of clinical investigation*, 9: 1296-306.
223. Elkadri AA, JM Stempak, TD Walters, S Lal, AM Griffiths, AH SteinhartMS Silverberg. (2013) Serum antibodies associated with complex inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 7: 1499-505.
224. Taurog JD, JA Richardson, JT Croft, WA Simmons, M Zhou, JL Fernandez-Sueiro, E BalishRE Hammer. (1994) The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *The Journal of experimental medicine*, 6: 2359-64.
225. Elinav E, T Strowig, AL Kau, J Henao-Mejia, CA Thaiss, CJ Booth, DR Peaper, J Bertin, SC Eisenbarth, JI GordonRA Flavell. (2011) NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. *Cell*, 5: 745-57.
226. Bloom SM, VN Bijanki, GM Nava, L Sun, NP Malvin, DL Donermeyer, WM Dunne, Jr., PM AllenTS Stappenbeck. (2011) Commensal *Bacteroides* species induce colitis in host-genotype-specific fashion in a mouse model of inflammatory bowel disease. *Cell host & microbe*, 5: 390-403.
227. Yan F, H Cao, TL Cover, MK Washington, Y Shi, L Liu, R Chaturvedi, RM Peek, Jr., KT WilsonDB Polk. (2011) Colon-specific delivery of a probiotic-derived soluble protein

- ameliorates intestinal inflammation in mice through an EGFR-dependent mechanism. *The Journal of clinical investigation*, 6: 2242-53.
228. Vijay-Kumar M, JD Aitken, FA Carvalho, TC Cullender, S Mwangi, S Srinivasan, SV Sitaraman, R Knight, RE Ley, AT Gewirtz. (2010) Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5. *Science*, 307: 228-31.
229. Mazmanian SK, JL Round, DL Kasper. (2008) A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature*, 451: 620-5.
230. Maslowski KM, AT Vieira, A Ng, J Kranich, F Sierro, D Yu, HC Schilter, MS Rolph, F Mackay, D Artis, RJ Xavier, MM Teixeira, CR Mackay. (2009) Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature*, 461: 1282-6.
231. Norman JM, SA Handley, MT Baldrige, L Droit, CY Liu, BC Keller, A Kambal, CL Monaco, G Zhao, P Fleshner, TS Stappenbeck, DPB McGovern, A Keshavarzian, EA Mutlu, J Sauk, D Gevers, RJ Xavier, D Wang, M Parkes, HW Virgin. (2015) Disease-specific Alterations in the Enteric Virome in Inflammatory Bowel Disease. *Cell*, 161: 447-460.
232. Cadwell K, KK Patel, NS Maloney, T-C Liu, ACY Ng, CE Storer, RD Head, R Xavier, TS Stappenbeck, HW Virgin. (2010) Virus-Plus-Susceptibility Gene Interaction Determines Crohn's Disease Gene Atg16L1 Phenotypes in Intestine. *Cell*, 141: 1135-1145.
233. Chehoud C, LG Albenberg, C Judge, C Hoffmann, S Grunberg, K Bittinger, RN Baldassano, JD Lewis, FD Bushman, GD Wu. (2015) Fungal Signature in the Gut Microbiota of Pediatric Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis*, 21: 1948-56.
234. Ye BDDP McGovern. (2016) Genetic variation in IBD: progress, clues to pathogenesis and possible clinical utility. *Expert review of clinical immunology*, 10: 1091-107.
235. Jostins L, S Ripke, RK Weersma, RH Duerr, DP McGovern, KY Hui, JC Lee, LP Schumm, Y Sharma, CA Anderson, J Essers, M Mitrovic, K Ning, I Cleynen, E Theate, SL Spain, S Raychaudhuri, P Goyette, Z Wei, C Abraham, JP Achkar, T Ahmad, L Amininejad, AN Ananthakrishnan, V Andersen, JM Andrews, L Baidoo, T Balschun, PA Bampton, A Bitton, G Boucher, S Brand, C Buning, A Cohain, S Cichon, M D'Amato, D De Jong, KL Devaney, M Dubinsky, C Edwards, D Ellinghaus, LR Ferguson, D Franchimont, K Fransen, R Geary, M Georges, C Gieger, J Glas, T Haritunians, A Hart, C Hawkey, M Hedl, X Hu, TH Karlsen, L Kupcinskis, S Kugathasan, A Latiano, D Laukens, IC Lawrance, CW Lees, E Louis, G Mahy, J Mansfield, AR Morgan, C Mowat, W Newman, O Palmieri, CY Ponsioen, U Potocnik, NJ Prescott, M Regueiro, JI Rotter, RK

- Russell, JD Sanderson, M Sans, J Satsangi, S Schreiber, LA Simms, J Sventoraityte, SR Targan, KD Taylor, M Tremelling, HW Verspaget, M De Vos, C Wijmenga, DC Wilson, J Winkelmann, RJ Xavier, S Zeissig, B Zhang, CK Zhang, H Zhao, MS Silverberg, V Annese, H Hakonarson, SR Brant, G Radford-Smith, CG Mathew, JD Rioux, EE Schadt, MJ Daly, A Franke, M Parkes, S Vermeire, JC BarrettJH Cho. (2012) Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature*, 7422: 119-24.
236. Moran CJ, C Klein, AM MuiseSB Snapper. (2015) Very early-onset inflammatory bowel disease: gaining insight through focused discovery. *Inflamm Bowel Dis*, 5: 1166-75.
237. Ogura Y, DK Bonen, N Inohara, DL Nicolae, FF Chen, R Ramos, H Britton, T Moran, R Karaliuskas, RH Duerr, JP Achkar, SR Brant, TM Bayless, BS Kirschner, SB Hanauer, G NunezJH Cho. (2001) A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, 6837: 603-6.
238. Philpott DJ, MT Sorbara, SJ Robertson, K CroitoruSE Girardin. (2014) NOD proteins: regulators of inflammation in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 1: 9-23.
239. Abraham CR Medzhitov. (2011) Interactions between the host innate immune system and microbes in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 6: 1729-37.
240. Hampe J, A Cuthbert, PJ Croucher, MM Mirza, S Mascheretti, S Fisher, H Frenzel, K King, A Hasselmeier, AJ MacPherson, S Bridger, S van Deventer, A Forbes, S Nikolaus, JE Lennard-Jones, UR Foelsch, M Krawczak, C Lewis, S SchreiberCG Mathew. (2001) Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet (London, England)*, 9272: 1925-8.
241. Inoue N, K Tamura, Y Kinouchi, Y Fukuda, S Takahashi, Y Ogura, N Inohara, G Nunez, Y Kishi, Y Koike, T Shimosegawa, T ShimoyamaT Hibi. (2002) Lack of common NOD2 variants in Japanese patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*, 1: 86-91.
242. Ahmad T, A Armuzzi, M Bunce, K Mulcahy-Hawes, SE Marshall, TR Orchard, J Crawshaw, O Large, A De Silva, JT Cook, M Barnardo, S Cullen, KI WelshDP Jewell. (2002) The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn's disease. *Gastroenterology*, 4: 854-866.
243. Cuthbert AP, SA Fisher, MM Mirza, K King, J Hampe, PJP Croucher, S Mascheretti, J Sanderson, A Forbes, J Mansfield, S Schreiber, CM LewisCG Mathew. (2002) The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 4: 867-874.

244. Adler J, SC Rangwalla, BA Dwamena, PD Higgins. (2011) The prognostic power of the NOD2 genotype for complicated Crohn's disease: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol*, 4: 699-712.
245. Hedl MC, Abraham. (2014) A TNFSF15 disease-risk polymorphism increases pattern-recognition receptor-induced signaling through caspase-8-induced IL-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 37: 13451-13456.
246. Hedl M, A Lahiri, K Ning, JH Cho, C Abraham. (2014) Pattern recognition receptor signaling in human dendritic cells is enhanced by ICOS ligand and modulated by the Crohn's disease ICOSLG risk allele. *Immunity*, 5: 734-46.
247. Fisher SA, M Tremelling, CA Anderson, R Gwilliam, S Bumpstead, NJ Prescott, ER Nimmo, D Massey, C Berzuini, C Johnson, JC Barrett, FR Cummings, H Drummond, CW Lees, CM Onnie, CE Hanson, K Blaszczyk, M Inouye, P Ewels, R Ravindrarajah, A Keniry, S Hunt, M Carter, N Watkins, W Ouwehand, CM Lewis, L Cardon, C the Wellcome Trust Case Control, A Lobo, A Forbes, J Sanderson, DP Jewell, JC Mansfield, P Deloukas, CG Mathew, M Parkes, J Satsangi. (2008) Genetic determinants of ulcerative colitis include the ECM1 locus and five loci implicated in Crohn's disease. *Nature genetics*, 6: 710-712.
248. Cadwell K, JY Liu, SL Brown, H Miyoshi, J Loh, JK Lennerz, C Kishi, W Kc, JA Carrero, S Hunt, CD Stone, EM Brunt, RJ Xavier, BP Sleckman, E Li, N Mizushima, TS Stappenbeck, HW Virgin. (2008) A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16L1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature*, 7219: 259-63.
249. Lassen KG, P Kuballa, KL Conway, KK Patel, CE Becker, JM Peloquin, EJ Villablanca, JM Norman, TC Liu, RJ Heath, ML Becker, L Fagbami, H Horn, J Mercer, OH Yilmaz, JD Jaffe, AF Shamji, AK Bhan, SA Carr, MJ Daly, HW Virgin, SL Schreiber, TS Stappenbeck, RJ Xavier. (2014) Atg16L1 T300A variant decreases selective autophagy resulting in altered cytokine signaling and decreased antibacterial defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 21: 7741-6.
250. Franke A, DP McGovern, JC Barrett, K Wang, GL Radford-Smith, T Ahmad, CW Lees, T Balschun, J Lee, R Roberts, CA Anderson, JC Bis, S Bumpstead, D Ellinghaus, EM Festen, M Georges, T Green, T Haritunians, L Jostins, A Latiano, CG Mathew, GW Montgomery, NJ Prescott, S Raychaudhuri, JI Rotter, P Schumm, Y Sharma, LA Simms, KD Taylor, D Whiteman, C Wijmenga, RN Baldassano, M Barclay, TM Bayless, S Brand, C Buning, A Cohen, JF Colombel, M Cottone, L Stronati, T Denson, M De Vos, R D'Inca, M Dubinsky, C Edwards, T Florin, D Franchimont, R Geary, J Glas, A Van Gossum, SL

- Guthery, J Halfvarson, HW Verspaget, JP Hugot, A Karban, D Laukens, I Lawrance, M Lemann, A Levine, C Libioulle, E Louis, C Mowat, W Newman, J Panes, A Phillips, DD Proctor, M Regueiro, R Russell, P Rutgeerts, J Sanderson, M Sans, F Seibold, AH Steinhart, PC Stokkers, L Torkvist, G Kullak-Ublick, D Wilson, T Walters, SR Targan, SR Brant, JD Rioux, M D'Amato, RK Weersma, S Kugathasan, AM Griffiths, JC Mansfield, S Vermeire, RH Duerr, MS Silverberg, J Satsangi, S Schreiber, JH Cho, V Annese, H Hakonarson, MJ DalyM Parkes. (2010) Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat Genet*, 12: 1118-25.
251. Muise AM, W Xu, CH Guo, TD Walters, VM Wolters, R Fattouh, GY Lam, P Hu, R Murchie, M Sherlock, JC Gana, RK Russell, M Glogauer, RH Duerr, JH Cho, CW Lees, J Satsangi, DC Wilson, AD Paterson, AM Griffiths, MS SilverbergJH Brumell. (2012) NADPH oxidase complex and IBD candidate gene studies: identification of a rare variant in NCF2 that results in reduced binding to RAC2. *Gut*, 7: 1028-35.
252. Knights D, MS Silverberg, RK Weersma, D Gevers, G Dijkstra, H Huang, AD Tyler, S van Sommeren, F Imhann, JM Stempak, H Huang, P Vangay, GA Al-Ghalith, C Russell, J Sauk, J Knight, MJ Daly, C HuttenhowerRJ Xavier. (2014) Complex host genetics influence the microbiome in inflammatory bowel disease. *Genome medicine*, 12: 107.
253. Tong M, I McHardy, P Ruegger, M Goudarzi, PC Kashyap, T Haritunians, X Li, TG Graeber, E Schwager, C Huttenhower, AJ Fornace, Jr., JL Sonnenburg, DP McGovern, J BornemanJ Braun. (2014) Reprograming of gut microbiome energy metabolism by the FUT2 Crohn's disease risk polymorphism. *The ISME journal*, 11: 2193-206.
254. Duerr RH, KD Taylor, SR Brant, JD Rioux, MS Silverberg, MJ Daly, AH Steinhart, C Abraham, M Regueiro, A Griffiths, T Dassopoulos, A Bitton, H Yang, S Targan, LW Datta, EO Kistner, LP Schumm, AT Lee, PK Gregersen, MM Barmada, JI Rotter, DL NicolaeJH Cho. (2006) A Genome-Wide Association Study Identifies IL23R as an Inflammatory Bowel Disease Gene. *Science (New York, N.Y.)*, 5804: 1461-1463.
255. Sarin R, X WuC Abraham. (2011) Inflammatory disease protective R381Q IL23 receptor polymorphism results in decreased primary CD4+ and CD8+ human T-cell functional responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 23: 9560-5.
256. Barrett JC, S Hansoul, DL Nicolae, JH Cho, RH Duerr, JD Rioux, SR Brant, MS Silverberg, KD Taylor, MM Barmada, A Bitton, T Dassopoulos, LW Datta, T Green, AM Griffiths, EO Kistner, MT Murtha, MD Regueiro, JI Rotter, LP Schumm, AH Steinhart, SR Targan, RJ Xavier, C Libioulle, C Sandor, M Lathrop, J Belaiche, O Dewit, I Gut, S



- Heath, D Laukens, M Mni, P Rutgeerts, A Van Gossum, D Zelenika, D Franchimont, JP Hugot, M de Vos, S Vermeire, E Louis, LR Cardon, CA Anderson, H Drummond, E Nimmo, T Ahmad, NJ Prescott, CM Onnie, SA Fisher, J Marchini, J Ghori, S Bumpstead, R Gwilliam, M Tremelling, P Deloukas, J Mansfield, D Jewell, J Satsangi, CG Mathew, M Parkes, M GeorgesMJ Daly. (2008) Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat Genet*, 8: 955-62.
257. Jostins L, S Ripke, RK Weersma, RH Duerr, DP McGovern, KY Hui, JC Lee, LP Schumm, Y Sharma, CA Anderson, J Essers, M Mitrovic, K Ning, I Cleynen, E Theatre, SL Spain, S Raychaudhuri, P Goyette, Z Wei, C Abraham, J-P Achkar, T Ahmad, L Amininejad, AN Ananthakrishnan, V Andersen, JM Andrews, L Baidoo, T Balschun, PA Bampton, A Bitton, G Boucher, S Brand, C Büning, A Cohain, S Cichon, M D'Amato, D De Jong, KL Devaney, M Dubinsky, C Edwards, D Ellinghaus, LR Ferguson, D Franchimont, K Fransen, R Geary, M Georges, C Gieger, J Glas, T Haritunians, A Hart, C Hawkey, M Hedl, X Hu, TH Karlsen, L Kupcinskis, S Kugathasan, A Latiano, D Laukens, IC Lawrance, CW Lees, E Louis, G Mahy, J Mansfield, AR Morgan, C Mowat, W Newman, O Palmieri, CY Ponsioen, U Potocnik, NJ Prescott, M Regueiro, JI Rotter, RK Russell, JD Sanderson, M Sans, J Satsangi, S Schreiber, LA Simms, J Sventoraityte, SR Targan, KD Taylor, M Tremelling, HW Verspaget, M De Vos, C Wijmenga, DC Wilson, J Winkelmann, RJ Xavier, S Zeissig, B Zhang, CK Zhang, H Zhao, IBDGC The International, MS Silverberg, V Annese, H Hakonarson, SR Brant, G Radford-Smith, CG Mathew, JD Rioux, EE Schadt, MJ Daly, A Franke, M Parkes, S Vermeire, JC BarrettJH Cho. (2012) Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature*, 7422: 119-124.
258. Willson TA, BR Kuhn, I Jurickova, S Gerad, D Moon, E Bonkowski, R Carey, MH Collins, H Xu, AG Jegga, SL GutheryLA Denson. (2012) STAT3 genotypic variation and cellular STAT3 activation and colon leukocyte recruitment in pediatric Crohn disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 1: 32-43.
259. Sahin A, T Calhan, M Cengiz, R Kahraman, K Aydin, K Ozdil, M KorachiHM Sokmen. (2014) Serum Interleukin 17 Levels in Patients with Crohn's Disease: Real Life Data. *Disease Markers*, 690853.
260. Shouval DS, A Biswas, JA Goettel, K McCann, E Conaway, NS Redhu, ID Mascanfroni, ZA Adham, S Lavoie, M Ibourk, DD Nguyen, JN Samsom, JC Escher, R Somech, B Weiss, R Beier, L Conklin, CL Ebens, FGMS Santos, AR Ferreira, M Sherlock, AK Bhan, W Müller, JR Mora, FJ Quintana, C Klein, AM Muise, BH HorwitzSB Snapper. (2014)

- Interleukin-10 Receptor Signaling in Innate Immune Cells Regulates Mucosal Immune Tolerance and Anti-Inflammatory Macrophage Function. *Immunity*, 5: 706-719.
261. Chaudhry A, RM Samstein, P Treuting, Y Liang, MC Pils, J-M Heinrich, RS Jack, FT Wunderlich, JC Brüning, W MüllerAY Rudensky. (2011) Interleukin-10 signaling in regulatory T cells is required for suppression of Th17 cell-mediated inflammation. *Immunity*, 4: 566-578.
262. Kotlarz D, R Beier, D Murugan, J Diestelhorst, O Jensen, K Boztug, D Pfeifer, H Kreipe, ED Pfister, U Baumann, J Puchalka, J Bohne, O Egritas, B Dalgic, KL Kolho, A Sauerbrey, S Buderus, T Gungor, A Enninger, YK Koda, G Guariso, B Weiss, S Corbacioglu, P Socha, N Uslu, A Metin, GT Wahbeh, K Husain, D Ramadan, W Al-Herz, B Grimbacher, M Sauer, KW Sykora, S KoletzkoC Klein. (2012) Loss of interleukin-10 signaling and infantile inflammatory bowel disease: implications for diagnosis and therapy. *Gastroenterology*, 2: 347-55.
263. Berg DJ, N Davidson, R Kuhn, W Muller, S Menon, G Holland, L Thompson-Snipes, MW LeachD Rennick. (1996) Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses. *The Journal of clinical investigation*, 4: 1010-20.
264. Kucharzik T, R Stoll, N LügeringW Domschke. (1995) Circulating antiinflammatory cytokine IL-10 in patients with inflammatory bowel disease (IBD). *Clinical and experimental immunology*, 3: 452-456.
265. Monteleone G, A Kumberova, NM Croft, C McKenzie, HW SteerTT MacDonald. (2001) Blocking Smad7 restores TGF-beta1 signaling in chronic inflammatory bowel disease. *The Journal of clinical investigation*, 4: 601-9.
266. Del Zotto B, G Mumolo, AM Pronio, C Montesani, R TersigniM Boirivant. (2003) TGF- $\beta$ 1 production in inflammatory bowel disease: differing production patterns in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Clinical and experimental immunology*, 1: 120-126.
267. Di Sabatino A, P Biancheri, S Piconese, MM Rosado, S Ardizzone, L Rovedatti, C Ubezio, A Massari, GM Sampietro, D Foschi, GB Porro, MP Colombo, R Carsetti, TT MacDonaldGR Corazza. (2010) Peripheral regulatory T cells and serum transforming growth factor-beta: relationship with clinical response to infliximab in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*, 11: 1891-7.
268. Aiba YM Nakamura. (2013) The role of TL1A and DR3 in autoimmune and inflammatory diseases. *Mediators of inflammation*,

269. Migone TS, J Zhang, X Luo, L Zhuang, C Chen, B Hu, JS Hong, JW Perry, SF Chen, JX Zhou, YH Cho, S Ullrich, P Kanakaraj, J Carrell, E Boyd, HS Olsen, G Hu, L Pukac, D Liu, J Ni, S Kim, R Gentz, P Feng, PA Moore, SM RubenP Wei. (2002) TL1A is a TNF-like ligand for DR3 and TR6/DcR3 and functions as a T cell costimulator. *Immunity*, 3: 479-92.
270. Hedl MC Abraham. (2014) A TNFSF15 disease-risk polymorphism increases pattern-recognition receptor-induced signaling through caspase-8-induced IL-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 37: 13451-6.
271. Yamazaki K, D McGovern, J Ragoussis, M Paolucci, H Butler, D Jewell, L Cardon, M Takazoe, T Tanaka, T Ichimori, S Saito, A Sekine, A Iida, A Takahashi, T Tsunoda, M LathropY Nakamura. (2005) Single nucleotide polymorphisms in TNFSF15 confer susceptibility to Crohn's disease. *Human molecular genetics*, 22: 3499-506.
272. Hedl M, S ZhengC Abraham. (2014) The IL18RAP region disease polymorphism decreases IL-18RAP/IL-18R1/IL-1R1 expression and signaling through innate receptor-initiated pathways. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 12: 5924-32.
273. Spalinger MR, S Kasper, C Chassard, T Raselli, I Frey-Wagner, C Gottier, S Lang, K Atrott, SR Vavricka, F Mair, B Becher, C Lacroix, M Fried, G RoglerM Scharl. (2015) PTPN2 controls differentiation of CD4(+) T cells and limits intestinal inflammation and intestinal dysbiosis. *Mucosal immunology*, 4: 918-29.
274. Kaser A, E Martinez-NavasRS Blumberg. (2010) Endoplasmic reticulum stress: implications for inflammatory bowel disease pathogenesis. *Curr Opin Gastroenterol*, 4: 318-26.
275. Feske S. (2007) Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nature reviews. Immunology*, 9: 690-702.
276. Leconte J, S Bagherzadeh Yazdchi, V PannetonWK Suh. (2016) Inducible costimulator (ICOS) potentiates TCR-induced calcium flux by augmenting PLCgamma1 activation and actin remodeling. *Molecular immunology*, 38-46.
277. Lewis RS. (2001) Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annu Rev Immunol*, 497-521.
278. Gabriel CH, F Gross, M Karl, H Stephanowitz, AF Hennig, M Weber, S Gryzik, I Bachmann, K Hecklau, J Wienands, J Schuchhardt, H Herzelt, A Radbruch, E KrauseR Baumgrass. (2016) Identification of Novel Nuclear Factor of Activated T Cells (NFAT)-Associated Proteins in T cells. *The Journal of biological chemistry*,

279. Gilabert JAAB Parekh. (2000) Respiring mitochondria determine the pattern of activation and inactivation of the store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  current I(CRAC). *The EMBO journal*, 23: 6401-7.
280. Cali T, M Frizzarin, L Luoni, F Zonta, S Pantano, C Cruz, MC Bonza, I Bertipaglia, M Ruzzene, MI De Michelis, N Damiano, O Marin, G Zanni, G Zanotti, M Brini, R LopreiatoE Carafoli. (2016) The ataxia related G1107D mutation of the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase isoform 3 affects its interplay with calmodulin and the autoinhibition process. *Biochimica et biophysica acta*,
281. Weber KS, MJ MillerPM Allen. (2008) Th17 cells exhibit a distinct calcium profile from Th1 and Th2 cells and have Th1-like motility and NF-AT nuclear localization. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 3: 1442-50.
282. Gardos G. (1958) The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. *Biochimica et biophysica acta*, 3: 653-4.
283. Logsdon NJ, J Kang, JA Togo, EP ChristianJ Aiyar. (1997) A novel gene, hKCa4, encodes the calcium-activated potassium channel in human T lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 52: 32723-32726.
284. Fanger CM, S Ghanshani, NJ Logsdon, H Rauer, K Kalman, J Zhou, K Beckingham, KG Chandy, MD CahalanJ Aiyar. (1999) Calmodulin mediates calcium-dependent activation of the intermediate conductance KCa channel, IKCa1. *Journal of Biological Chemistry*, 9: 5746-5754.
285. Cahalan MD, H WulffKG Chandy. (2001) Molecular properties and physiological roles of ion channels in the immune system. *Journal of clinical immunology*, 4: 235-252.
286. Grissmer S, AN NguyenMD Cahalan. (1993) Calcium-activated potassium channels in resting and activated human T lymphocytes. Expression levels, calcium dependence, ion selectivity, and pharmacology. *The Journal of general physiology*, 4: 601-30.
287. Ghanshani S, H Wulff, MJ Miller, H Rohm, A Neben, GA Gutman, MD CahalanKG Chandy. (2000) Up-regulation of the IKCa1 potassium channel during T-cell activation Molecular mechanism and functional consequences. *Journal of Biological Chemistry*, 47: 37137-37149.
288. Gutman GA, KG Chandy, S Grissmer, M Lazdunski, D McKinnon, LA Pardo, GA Robertson, B Rudy, MC Sanguinetti, W StuhmerX Wang. (2005) International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacological reviews*, 4: 473-508.

289. Beeton C, H Wulff, S Singh, S Botsko, G Crossley, GA Gutman, MD Cahalan, M Pennington, KG Chandy. (2003) A novel fluorescent toxin to detect and investigate Kv1.3 channel up-regulation in chronically activated T lymphocytes. *The Journal of biological chemistry*, 11: 9928-37.
290. DeCoursey TE, KG Chandy, S Gupta, MD Cahalan. (1984) Voltage-gated K<sup>+</sup> channels in human T lymphocytes: a role in mitogenesis?
291. Matteson DC, Deutsch. (1984) K channels in T lymphocytes: a patch clamp study using monoclonal antibody adhesion.
292. Aiyar J, AN Nguyen, KG Chandy, S Grissmer. (1994) The P-region and S6 of Kv3.1 contribute to the formation of the ion conduction pathway. *Biophysical Journal*, 6: 2261-2264.
293. Grissmer S, AN Nguyen, J Aiyar, DC Hanson, RJ Mather, GA Gutman, MJ Karmilowicz, DD Auperin, KG Chandy. (1994) Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K<sup>+</sup> channels, types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines. *Molecular pharmacology*, 6: 1227-1234.
294. Wulff H, C Beeton, KG Chandy. (2003) Potassium channels as therapeutic targets for autoimmune disorders. *Current Opinion in Drug Discovery and Development*, 5: 640-647.
295. Liu Q-H, BK Fleischmann, B Hondowicz, CC Maier, LA Turka, K Yui, MI Kotlikoff, AD Wells, BD Freedman. (2002) Modulation of Kv channel expression and function by TCR and costimulatory signals during peripheral CD4<sup>+</sup> lymphocyte differentiation. *The Journal of experimental medicine*, 7: 897-909.
296. Chandy KG, M Cahalan, M Pennington, RS Norton, H Wulff, GA Gutman. (2001) Potassium channels in T lymphocytes: toxins to therapeutic immunosuppressants. *Toxicology* : official journal of the International Society on Toxinology, 9: 1269-76.
297. Chung IL, Schlichter. (1997) Native Kv1.3 channels are upregulated by protein kinase C. *The Journal of membrane biology*, 1: 73-85.
298. Conforti L, M Petrovic, D Mohammad, S Lee, Q Ma, S Barone, AH Filipovich. (2003) Hypoxia regulates expression and activity of Kv1.3 channels in T lymphocytes: a possible role in T cell proliferation. *The Journal of Immunology*, 2: 695-702.
299. Robbins JR, SM Lee, AH Filipovich, P Szigligeti, L Neumeier, M Petrovic, L Conforti. (2005) Hypoxia modulates early events in T cell receptor-mediated activation in human T lymphocytes via Kv1.3 channels. *The Journal of physiology*, 1: 131-143.

300. Bowlby MR, DA Fadool, TC Holmes, IB Levitan. (1997) Modulation of the Kv1.3 potassium channel by receptor tyrosine kinases. *The Journal of general physiology*, 5: 601-610.
301. Schilling T, H Repp, H Richter, A Koschinski, U Heinemann, F Dreyer, C Eder. (2002) Lysophospholipids induce membrane hyperpolarization in microglia by activation of IKCa1 Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels. *Neuroscience*, 4: 827-835.
302. Lee SCC, Deutsch. (1990) Temperature dependence of K<sup>(+)</sup>-channel properties in human T lymphocytes. *Biophysical Journal*, 1: 49-62.
303. Deutsch CS, Lee. (1989) Modulation of K<sup>+</sup> currents in human lymphocytes by pH. *The Journal of physiology*, 399.
304. Price M, SC Lee, C Deutsch. (1989) Charybdotoxin inhibits proliferation and interleukin 2 production in human peripheral blood lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 24: 10171-5.
305. Garcia ML, M Garcia-Calvo, P Hidalgo, A Lee, R MacKinnon. (1994) Purification and characterization of three inhibitors of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels from *Leiurus quinquestriatus* var. *hebraeus* venom. *Biochemistry*, 22: 6834-9.
306. Pennington MW, VM Mahnir, I Khaytin, I Zaydenberg, ME Byrnes, WR Kem. (1996) An essential binding surface for ShK toxin interaction with rat brain potassium channels. *Biochemistry*, 51: 16407-11.
307. Cotton J, M Crest, F Bouet, N Alessandri, M Gola, E Forest, E Karlsson, O Castaneda, AL Harvey, C Vita, A Menez. (1997) A potassium-channel toxin from the sea anemone *Bunodosoma granulifera*, an inhibitor for Kv1 channels. Revision of the amino acid sequence, disulfide-bridge assignment, chemical synthesis, and biological activity. *European journal of biochemistry*, 1: 192-202.
308. Johnson BA, SP Stevens, JM Williamson. (1994) Determination of the three-dimensional structure of margatoxin by <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N triple-resonance nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry*, 50: 15061-70.
309. Aiyar J, JM Withka, JP Rizzi, DH Singleton, GC Andrews, W Lin, J Boyd, DC Hanson, M Simon, B Dethlefsen et al. (1995) Topology of the pore-region of a K<sup>+</sup> channel revealed by the NMR-derived structures of scorpion toxins. *Neuron*, 5: 1169-81.
310. Dauplais M, A Lecoq, J Song, J Cotton, N Jamin, B Gilquin, C Roumestand, C Vita, CL de Medeiros, EG Rowan, AL Harvey, A Menez. (1997) On the convergent evolution of animal toxins. Conservation of a diad of functional residues in potassium channel-blocking toxins with unrelated structures. *The Journal of biological chemistry*, 7: 4302-9.

311. Krezel AM, C Kasibhatla, P Hidalgo, R MacKinnonG Wagner. (1995) Solution structure of the potassium channel inhibitor agitoxin 2: caliper for probing channel geometry. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 8: 1478-89.
312. Blanc E, JM Sabatier, R Kharrat, S Meunier, M el Ayeb, J Van RietschotenH Darbon. (1997) Solution structure of maurotoxin, a scorpion toxin from *Scorpio maurus*, with high affinity for voltage-gated potassium channels. *Proteins*, 3: 321-33.
313. Delepierre M, A Prochnicka-ChalufourLD Possani. (1997) A novel potassium channel blocking toxin from the scorpion *Pandinus imperator*: A <sup>1</sup>H NMR analysis using a nano-NMR probe. *Biochemistry*, 9: 2649-58.
314. Savarin P, R Romi-Lebrun, S Zinn-Justin, B Lebrun, T Nakajima, B GilquinA Menez. (1999) Structural and functional consequences of the presence of a fourth disulfide bridge in the scorpion short toxins: solution structure of the potassium channel inhibitor HsTX1. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 12: 2672-85.
315. Tudor JE, PK Pallaghy, MW PenningtonRS Norton. (1996) Solution structure of ShK toxin, a novel potassium channel inhibitor from a sea anemone. *Nature structural biology*, 4: 317-20.
316. Rauer H, MD Lanigan, MW Pennington, J Aiyar, S Ghanshani, MD Cahalan, RS NortonKG Chandy. (2000) Structure-guided transformation of charybdotoxin yields an analog that selectively targets Ca(2+)-activated over voltage-gated K(+) channels. *The Journal of biological chemistry*, 2: 1201-8.
317. Kalman K, MW Pennington, MD Lanigan, A Nguyen, H Rauer, V Mahnir, K Paschetto, WR Kem, S Grissmer, GA Gutman, EP Christian, MD Cahalan, RS NortonKG Chandy. (1998) ShK-Dap22, a potent Kv1.3-specific immunosuppressive polypeptide. *The Journal of biological chemistry*, 49: 32697-707.
318. Nguyen A, JC Kath, DC Hanson, MS Biggers, PC Canniff, CB Donovan, RJ Mather, MJ Bruns, H Rauer, J Aiyar, A Lepple-Wienhues, GA Gutman, S Grissmer, MD CahalanKG Chandy. (1996) Novel nonpeptide agents potently block the C-type inactivated conformation of Kv1.3 and suppress T cell activation. *Molecular pharmacology*, 6: 1672-9.
319. Hanson DC, A Nguyen, RJ Mather, H Rauer, K Koch, LE Burgess, JP Rizzi, CB Donovan, MJ Bruns, PC Canniff, AC Cunningham, KA Verdries, E Mena, JC Kath, GA Gutman, MD Cahalan, S GrissmerKG Chandy. (1999) UK-78,282, a novel piperidine compound that potently blocks the Kv1.3 voltage-gated potassium channel and inhibits human T cell activation. *British journal of pharmacology*, 8: 1707-16.

320. Felix JP, RM Bugianesi, WA Schmalhofer, R Borris, MA Goetz, OD Hensens, JM Bao, F Kayser, WH Parsons, K Rupprecht, ML Garcia, GJ Kaczorowski, RS Slaughter. (1999) Identification and biochemical characterization of a novel nortriterpene inhibitor of the human lymphocyte voltage-gated potassium channel, Kv1.3. *Biochemistry*, 16: 4922-30.
321. Baker RK, J Bao, J Chee, ML Garcia, GJ Kaczorowski, F Kayser, A Kotliar, CJ Liu, S Miao, WH Parsons, *Carbocyclic potassium channel inhibitors*. 2003, Google Patents.
322. Castle NA, SP Hollinshead, PF Hughes, JS Mendoza, JW Wilson, GS Amato, S Beaudoin, M Gross, G McNaughton-Smith, *Potassium channel inhibitors*. 2000, Google Patents.
323. Wulff H, MJ Miller, W Hänsel, S Grissmer, MD Cahalan, KG Chandy. (2000) Design of a potent and selective inhibitor of the intermediate-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel, IKCa1: a potential immunosuppressant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 14: 8151-8156.
324. Yin S, Q Hu, J Luo, Y Li, C Lu, X Chen, H Hu. (2014) Loureirin B, an essential component of Sanguis Draxonis, inhibits Kv1.3 channel and suppresses cytokine release from Jurkat T cells. *Cell & Bioscience*, 78.
325. Gocke AR, LA Lebson, IV Grishkan, L Hu, HM Nguyen, KA Whartenby, KG Chandy, PA Calabresi. (2012) Kv1.3 deletion biases T cells towards an immuno-regulatory phenotype and renders mice resistant to autoimmune encephalomyelitis(). *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 12: 5877-5886.
326. Fu XX, LL Du, N Zhao, Q Dong, YH Liao, YM Du. (2013) 18beta-Glycyrrhetic acid potently inhibits Kv1.3 potassium channels and T cell activation in human Jurkat T cells. *Journal of ethnopharmacology*, 2: 647-54.
327. Zhao N, Q Dong, L-L Du, X-X Fu, Y-M Du, Y-H Liao. (2013) Potent Suppression of Kv1.3 Potassium Channel and IL-2 Secretion by Diphenyl Phosphine Oxide-1 in Human T Cells. *PLoS ONE*, 5: e64629.
328. Toldi G, L Munoz, M Herrmann, G Schett, A Balog. (2016) The effects of Kv1.3 and IKCa1 channel inhibition on cytokine production and calcium influx of T lymphocytes in rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. *Immunologic research*, 2: 627-31.
329. Wanner SG, H Glossmann, HG Knaus, R Baker, W Parsons, KM Rupprecht, R Brochu, CJ Cohen, W Schmalhofer, M Smith, V Warren, ML Garcia, GJ Kaczorowski. (1999) WIN 17317-3, a new high-affinity probe for voltage-gated sodium channels. *Biochemistry*, 34: 11137-46.



330. Vianna-Jorge R, CF Oliveira, ML Garcia, GJ Kaczorowski, G Suarez-Kurtz. (2000) Correolide, a nor-triterpenoid blocker of Shaker-type Kv1 channels elicits twitches in guinea-pig ileum by stimulating the enteric nervous system and enhancing neurotransmitter release. *British journal of pharmacology*, 4: 772-8.
331. Koo GC, JT Blake, K Shah, MJ Staruch, F Dumont, D Wunderler, M Sanchez, OB McManus, A Sirotnina-Meisher, P Fischer, RC Boltz, MA Goetz, R Baker, J Bao, F Kayser, KM Rupprecht, WH Parsons, X-C Tong, IE Ita, J Pivnichny, S Vincent, P Cunningham, D Hora, W Feeney, G Kaczorowski, MS Springer. (1999) Correolide and Derivatives Are Novel Immunosuppressants Blocking the Lymphocyte Kv1.3 Potassium Channels. *Cellular Immunology*, 2: 99-107.
332. Beeton C, J Barbaria, P Giraud, J Devaux, AM Benoliel, M Gola, JM Sabatier, D Bernard, M Creste, E Beraud. (2001) Selective blocking of voltage-gated K<sup>+</sup> channels improves experimental autoimmune encephalomyelitis and inhibits T cell activation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 2: 936-44.
333. Schwarz A, E Tutsch, B Ludwig, EC Schwarz, A Stallmach, M Hoth. (2004) Ca<sup>2+</sup> signaling in identified T-lymphocytes from human intestinal mucosa. Relation to hyporeactivity, proliferation, and inflammatory bowel disease. *The Journal of biological chemistry*, 7: 5641-7.
334. Di Sabatino A, L Rovedatti, R Kaur, JP Spencer, JT Brown, VD Morisset, P Biancheri, NA Leakey, JI Wilde, L Scott. (2009) Targeting gut T cell Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> channels inhibits T cell cytokine production and T-box transcription factor T-bet in inflammatory bowel disease. *The Journal of Immunology*, 5: 3454-3462.
335. Di L, S Srivastava, O Zhdanova, Y Ding, Z Li, H Wulff, M Lafaille, EY Skolnik. (2010) Inhibition of the K<sup>+</sup> channel KCa3.1 ameliorates T cell-mediated colitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 4: 1541-6.
336. Strøbæk D, D Brown, D Jenkins, YJ Chen, N Coleman, Y Ando, P Chiu, S Jørgensen, J Demnitz, H Wulff. (2013) NS6180, a new KCa3.1 channel inhibitor prevents T<sub>H</sub>1 cell activation and inflammation in a rat model of inflammatory bowel disease. *British journal of pharmacology*, 2: 432-444.
337. Simms LA, JD Doecke, RL Roberts, EV Fowler, ZZ Zhao, MA McGuckin, N Huang, NK Hayward, PM Webb, DC Whiteman, JA Cavanaugh, R McCallum, TH Florin, ML Barclay, RB Geary, TR Merriman, GW Montgomery, GL Radford-Smith. (2010) KCNN4 gene variant is associated with ileal Crohn's Disease in the Australian and New Zealand population. *Am J Gastroenterol*, 10: 2209-17.

338. Kazama I. (2015) Roles of lymphocyte Kv1.3-channels in gut mucosal immune system: Novel therapeutic implications for inflammatory bowel disease. *Medical hypotheses*, 1: 61-3.
339. Hansen LK, L Sevelsted-Møller, M Rabjerg, D Larsen, TP Hansen, L Klinge, H Wulff, T Knudsen, J Kjeldsen R Köhler. (2014) Expression of T-cell K(V) 1.3 potassium channel correlates with pro-inflammatory cytokines and disease activity in ulcerative colitis. *Journal of Crohn's & colitis*, 11: 1378-1391.
340. Hansen LK. (2014) The role of T cell potassium channels, KV1.3 and KCa3.1, in the inflammatory cascade in ulcerative colitis. *Danish medical journal*, 11: B4946.
341. Association GAotWM. (2014) World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *The Journal of the American College of Dentists*, 3: 14.
342. Bailey SPJ Macardle. (2006) A flow cytometric comparison of Indo-1 to fluo-3 and Fura Red excited with low power lasers for detecting Ca<sup>2+</sup> flux. *Journal of Immunological Methods*, 1–2: 220-225.
343. Kaposi AS, G Veress, B Vasarhelyi, P Macardle, S Bailey, T Tulassay A Treszl. (2008) Cytometry-acquired calcium-flux data analysis in activated lymphocytes. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 3: 246-53.
344. Jackson AP, MP Timmerman, CR Bagshaw CC Ashley. (1987) The kinetics of calcium binding to fura-2 and indo-1. *FEBS Lett*, 1: 35-9.
345. Holland N, J Dong, E Garnett, N Shaikh, K Huen, P Harmatz, A Olive, HS Winter, BD Gold SA Cohen. (2008) Reduced intracellular T-helper 1 interferon-gamma in blood of newly diagnosed children with Crohn's disease and age-related changes in Th1/Th2 cytokine profiles. *Pediatric research*, 3: 257-262.
346. Cseh A, B Vasarhelyi, K Molnar, B Szaly, P Svec, A Treszl, A Dezsőfi, LP Lakatos, A Arato T Tulassay. (2010) Immune phenotype in children with therapy-naïve remitted and relapsed Crohn's disease. *World journal of gastroenterology*, 47: 6001-6009.
347. Orbán C, D Szabó, A Bajnok, B Vásárhelyi, T Tulassay, A Arató, G Veres G Toldi. (2016) Altered calcium influx of peripheral Th2 cells in pediatric Crohn's disease: infliximab may normalize activation patterns. *Oncotarget*, 29: 44966-44974.
348. Wulff H, C Beeton KG Chandy. (2003) Potassium channels as therapeutic targets for autoimmune disorders. *Current opinion in drug discovery & development*, 5: 640-647.

349. Orbán C, E Bíró, E Grozdics, A BajnokG Toldi. (2013) Modulation of T lymphocyte calcium influx patterns via the inhibition of Kv1.3 and IKCa1 potassium channels in autoimmune disorders. *Frontiers in immunology*, 234.
350. Folyovich A, E Biro, C Orban, A Bajnok, B VasarhelyiG Toldi. (2014) Kv1.3 lymphocyte potassium channel inhibition as a potential novel therapeutic target in acute ischemic stroke. *CNS & neurological disorders drug targets*, 5: 801-6.
351. Toldi G, A Folyovich, Z Simon, K Zsiga, A Kaposi, G Meszaros, T TulassayB Vasarhelyi. (2011) Lymphocyte calcium influx kinetics in multiple sclerosis treated without or with interferon beta. *Journal of neuroimmunology*, 1-2: 80-6.
352. Gasparoni A, L Ciardelli, A Avanzini, AM Castellazzi, R Carini, G RondiniG Chirico. (2003) Age-related changes in intracellular TH1/TH2 cytokine production, immunoproliferative T lymphocyte response and natural killer cell activity in newborns, children and adults. *Biology of the neonate*, 4: 297-303.
353. Kollár S, L Berta, ZE Vásárhelyi, A Balog, B Vásárhelyi, J RigóG Toldi. (2015) Impact of aging on calcium influx and potassium channel characteristics of T lymphocytes. *Oncotarget*, 15: 13750-13756.
354. Orban C, A Bajnok, B Vasarhelyi, T TulassayG Toldi. (2014) Different calcium influx characteristics upon Kv1.3 and IKCa1 potassium channel inhibition in T helper subsets. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 7: 636-41.
355. Toldi G, A Treszl, V Pongor, B Gyarmati, T TulassayB Vasarhelyi. (2010) T-lymphocyte calcium influx characteristics and their modulation by Kv1.3 and IKCa1 channel inhibitors in the neonate. *International immunology*, 9: 769-74.
356. Gee KR, KA Brown, WNU Chen, J Bishop-Stewart, D GrayI Johnson. (2000) Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca<sup>2+</sup>-indicator dyes. *Cell Calcium*, 2: 97-106.

## 11 Saját publikációk jegyzéke

### Az értekezéshez kapcsolódó közlemények

Összesített impakt faktor: 10.419.

1. Orbán C, D Szabó, A Bajnok, B Vásárhelyi, T Tulassay, A Arató, G Veres, G Toldi. (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, D Szabó, A Bajnok, B Vásárhelyi, T Tulassay, A Arató, G Veres, G Toldi. (2017) Altered activation of peripheral CD8+ T cells in pediatric Crohn's disease. *Immunol Lett*, 185: 48-51. **IF: 2.483**
3. Orbán C, A Bajnok, B Vasarhelyi, T Tulassay, G Toldi. (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, E Biro, E Grozdics, A Bajnok, G Toldi. (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, G Toldi, C Orbán, N Megyes, A Bajnok, A Balog. Calcium influx kinetics, and the features of potassium channels of peripheral lymphocytes in primary Sjögren's syndrome *Immunobiology* 221:(11) pp. 1266-1272. (2016) **IF:2.781**
2. Orban C, E Perez-Garcia, A Bajnok, G McBean, G Toldi, A Blanco-Fernandez. Real time kinetic flow cytometry measurements of cellular parameter changes evoked by nanosecond pulsed electric field. *Cytometry Part A* 89:(5) pp. 472-479. (2016) **IF: 3.181**

3. Meszaros G, C Orban, A Kaposi, G Toldi, B Gyarmati, T Tulassay, B Vasarhelyi. Altered mitochondrial response to activation of T-cells in neonate Acta Physiologica Hungarica 102:(2) pp. 216-227. (2015) **IF:0.734**
4. Toldi G, ZE Vásárhelyi, J Rigó Jr, C Orbán, Z Tamássy, A Bajnok, T Shima, S Saito, A Molvarec. Prevalence of Regulatory T-Cell Subtypes in Preeclampsia. American Journal Of Reproductive Immunology 74:(2) pp. 110-115. (2015) **IF:2.916**
5. Csambalik L, Divéky-Ertsey A, Pap Z, Orbán Cs, Stégerné Máté M, Gere A, Stefanovits-Bányai É, Sipos L. Coherences of Instrumental and Sensory Characteristics: Case Study on Cherry Tomatoes. Journal Of Food Science 79:(11) pp. C2192-C2202. (2014) **IF:1.649**
6. Sipos L, B Bernhardt, A Gere, B Komáromi, C Orbán, J Bernáth, K Szabó. Multicriteria optimization to evaluate the performance of Ocimum basilicum L. varieties, Industrial Crops and Products, Volume 94, 30 2016, Pages 514-519, ISSN 0926-6690, **IF:3.449**
7. Folyovich A, Biro E, Orban C, Bajnok A, Varga V, Beres-Molnar AK, Vasarhelyi B, Toldi G. Relevance of novel inflammatory markers in stroke-induced immunosuppression BMC Neurology 14:(1) Paper 41. 7 p. (2014) **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 CNS & Neurological Disorders-Drug Targets 13:(5) pp. 801-806. (2014) **IF:2.188**
9. Orbán C, Füstös Z, Gilinger PM. Changes in the quality of sweet pepper types during the post-harvest ripening Journal On Processing And Energy In Agriculture 15:(2) pp. 109-112. (2011)
10. Orbán C, Gilingerné PM. A C-vitamin tartalom és a peroxidáz enzim aktivitásának változása különböző típusú és érettségi stádiumú paprikákban a tárolás során Új Diéta: A Magyar Dietetikusok Lapja (2001-) 18:(6) pp. 13-15. (2011)

11. Orbán C, Csajbókné CÉ, Hegedüs N, Lichthammer A. A fehér káposzta C-vitamin-tartalmának és peroxidáz enzimformáinak aktivitásváltozása a tárolás során Új Diéta: A Magyar Dietetikusok Lapja (2001-) 22:(2-3) pp. 25-27. (2013)
12. Orbán C, Csajbókné CÉ, Bacsó Á, Dobronszki A. Különböző csíranövények antioxidáns aktivitásának meghatározása Új Diéta: A Magyar Dietetikusok Lapja (2001-) 22:(5) pp. 4-5. (2013)
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. Kertgazdaság: A Kertészeti És Élelmiszeripari Egyetem A Magyar Kertészeti Tanács És A Magyar Kertészeti Tudományos Társaság Szakfolyóirata 45:(2) pp. 66-74. (2013)
14. Larnsak L, Káposztás L, Veresné BM, Lichthammer A, Orbán C. Vörösszőlő-mag és származékai az egészség szolgálatában Új Diéta: A Magyar Dietetikusok Lapja (2001-) 23:(1) pp. 28-31. (2014)
15. Csambalik L, Divéky-Ertsey A, Ladányi M, Orbán C. Influence of abiotic disorders on nutritional values of tomato (*solanum lycopersicum*) Review Of Faculty Of Engineering Analecta Technica Szegedinensia 2014:(1) p. online. (2014)
16. Orbán C, Csajbókné CÉ, Dobronszki A. Az uborka (*Cucumis sativus*) érése során bekövetkező beltartalmi értékváltozások Élelmiszervizsgálati Közlemények 60:(1) pp. 81-85. (2014)
17. Veresné BM, Lichthammer A, Orbán C, Tátrai-Németh K. A szarvashús étrendbe illesztésének új lehetőségei Acta Agraria Kaposváriensis 18:(1) pp. 87-95. (2014)
18. Veresné BM, Lichthammer A, Orbán C, Tátrai-Németh K. Vadhús a közétkeztetésben Élelmezés 18:(7-8) pp. 26-27. (2014)
19. Tőreki K, Koren D, Hatvany Z, Szabó A, Orbán C. Új vizeken. A gomba táplálkozástudományi szerepe Élelmezés 12:(10) pp. 36-37. (2015)

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 *PharmaNutrition* 4:(2) pp. 39-44. (2016)
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 *Új Diéta: A Magyar Dietetikusok Lapja* (2001-) 25:(2-3) pp. 31-34. (2016)
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 *New Medicine* 19:(2) pp. 66-70. (2015)
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 *Új Diéta: A Magyar Dietetikusok Lapja* (2001-) 24:(1) pp. 27-29. (2015)
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 *Biotechnology : An Indian Journal* 11:(2) pp. 66-70. (2015)
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. *Biotechnology : An Indian Journal* 12:(1) pp. 53-58. (2016)

## 12 Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt köszönöm dr. Toldi Gergelynek, hogy a doktori értekezésemhez, és a többi kutatáshoz, melyben részt vettem, az együtt végzett munka során szakmailag és emberileg mindig támogatott. A tőle látott mentalitást igyekeztem a témavezetésemre bízott TDK-sok és szakdolgozók számára továbbadni, és az oktatómunkám során alkalmazni.

Köszönetet mondok még dr. Mészáros Gergőnek, hogy megismertetett a flow-citometriával és a T sejtekhez kapcsolódó kutatások alapjait átadta.

Köszönettel tartozom prof. Dr. Vásárhelyi Barnának, aki 6 évvel ezelőtt, még egyetemista koromban megelőlegezte a bizalmat, munkacsoportjába fogadott, és számomra a tárgyi és anyagi feltételek mellett az emberi példát is biztosította.

Köszönöm Tulassay Tivadar professzor úrnak, hogy az általa vezetett MTA-SE Gyermekgyógyászati és Nefrológiai Kutatócsoportban dolgozhattam, lehetőséget adott munkatervem és kísérleteim megvalósítására.

Hálás vagyok azért, hogy olyan csapatban dolgozhattam ahol a közös munka során baráti kapcsolatok is kialakultak. Vásárhelyi Zsófia, Bíró Enikő, Bajnok Anna, Berta László nélkül az én doktori értekezésem sem készülhetett volna el.

Ezúton köszönöm meg a családomnak és barátaimnak az elmúlt évek folyamatos támogatását.

Végül a vizsgálatokban részt vevő gyermekeknek, szüleiknek és az önkénteseknek a vérmintákért szeretném kifejezni hálámat.



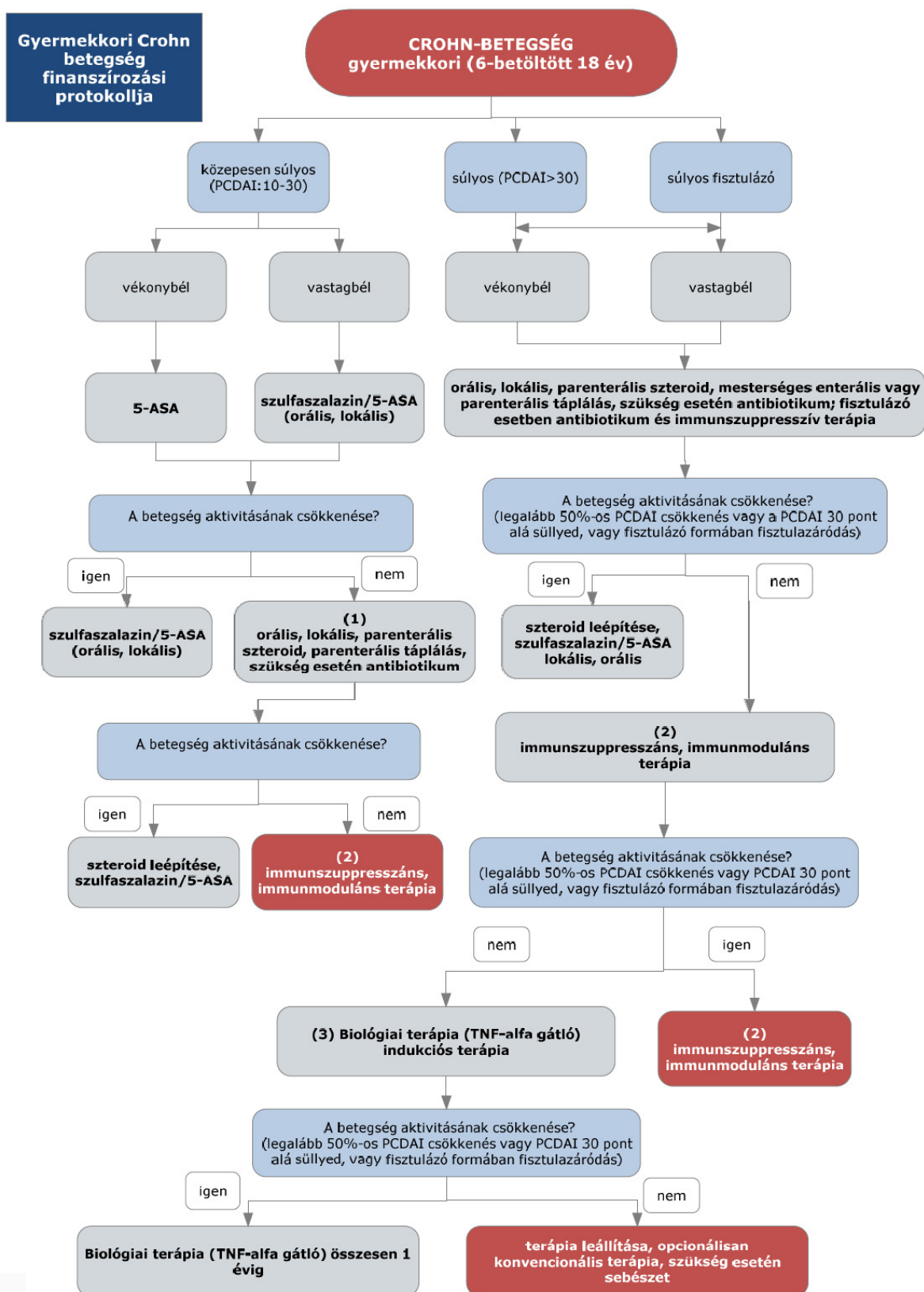
**Mellékletek****I. Melléklet: A PCDAI-score kialakításának szempontjai (119).**

<b>1.ANAMNÉZIS</b>	
a. Hasfájás	
i. Nincs	0 pont
ii. Enyhe, aktivitást nem zavar	5 pont
iii. Súlyosabb, aktivitást zavar	10 pont
b. Székletszám	
i. naponta 0-1x, nem véres	0 pont
ii. 1-2x, kissé véres vagy 2-5x, híg	5 pont
iii. Nagyobb vér, vagy 6-nál több híg, vagy éjjeli hasmenés	10 pont
c. Gyermekek általános állapota („well-being”)	
i. Jól van, aktív	0 pont
ii. Időnként rosszul van, aktivitás csökken	5 pont
iii. Gyengén van, kifejezett aktivitás csökkenés	10 pont
<b>2.LABORATÓRIUMI VIZSGÁLATOK</b>	
d. Hematokrit (%)	
i. 34 felett	0 pont
ii. 30-33 között	2,5pont;
iii. 29 alatt	5 pont
e. We*(mm/ó)/CRP (mg/l)	
i. 20 alatt	0 pont
ii. 20-50 között	2,5pont;
iii. 50 felett	5 pont
f. Albumin (g/l):	
i. 35 felett	0 pont
ii. 31-34 között	5 pont
iii. 30 alatt	10 pont
<b>3.FIZIKÁLIS VIZSGÁLAT</b>	
g. Súlyfejlődés	
i. Megfelelő gyarapodás	0 pont
ii. Súlyállás, 1-9% súlycsökkenés	5 pont
iii. Súlycsökkenés 10% vagy több	10 pont
h. Hossznövekedés elmaradása	
i. 1 SD-nél kisebb	0 pont
ii. 1-2 SD között	5 pont
iii. 2 SD-nél nagyobb	10 pont
i. Has tapintása	
i. Nem érzékeny, terime nincs	0 pont
ii. Érzékenység; vagy terime, hasfájás nélkül	5 pont
iii. Érzékenység/ hasfájás, tapintható terime	10 pont
j. Perirectalis elváltozás	
i. Nincs	0 pont
ii. 1-2 alig váladékozó fistula	5 pont
iii. Aktív fistula, tályog	10 pont
k. Extraintesztinális manifesztáció	
i. ** Nincs	0 pont
ii. Egy	5 pont
iii. Kettő vagy több	10 pont

\*We: vörösvértest süllyedés

\*\*38,5 feletti láz min. 3 nap, arthritis, uveitis, erythema nodosum, pyoderma gangrenosum

## II. Melléklet: A gyermekkori Crohn-betegség kezelésének protokollja (122).



**III. Melléklet:** A Kv1.3 és IKCa1-es csatornák gátlószereinek Kd értékei (296).

<b>Kv1.3</b>		<b>IKCa1</b>	
Farmakon neve	Kd érték	Farmakon neve	Kd érték
Skorpió			
ChTx	3 nM	ChTx	5 nM
NTx	1 nM	ChTx-glu	33 nM
MgTx	110 pM	MTx	1 nM
KTx	650 pM		
AgTx2	200 pM		
Pi1	11 nM		
MTx	150 nM		
HsTx1	12 pM		
Pi2	50 pM		
Pi3	500 pM		
tengeri anemóniák			
ShK	16 pM	ShK	30 nM
BgK	39 nM	BgK	172 nM
ShK-Dap	52 pM	ShK-Dap	2.6 uM
kis molekulák			
TEA	10 mM	TEA	24 mM
4-AP	190 uM	ketoconazole	30 uM
quinine	14 uM	econazole	12 uM
diltiazem	60 uM	nifedipin	4 uM
verapamil	6 uM	nimodipine	1 uM
CP-339,818	150 nM	nitrendipine	900 nM
UK-78282	200 nM	TRAM-3	520 nM
Correolide	90 nM	clotrimazole	70 nM
sulfamidbenzamidoindane	100 nM	TRAM-34	20 nM