

**Ph.D. TÉZIS**

**HASMENÉSEL JÁRÓ BETEGSÉGEK PATHOMECHANIZMUSÁNAK  
VIZSGÁLATA**

**PALLAGI ÉVA**

Témavezetők: Prof. Dr. Hegyi Péter

Prof. Dr. Molnár Tamás



**I.sz. Belgyógyászati Klinika**

**Szegedi Tudományegyetem**

**Szeged**

**2015**

## TARTALOMJEGYZÉK

A TÉZIS TÉMÁJÁT ALKOTÓ KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA .....	3
A TÉZIS TÉMÁJÁHOZ NEM KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNY .....	3
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	4
BEVEZETÉS.....	5
1. A humán vastagbél epithél sejtek iontranszportereinek az epesav-indukálta hasmenésben betöltött szerepe.....	5
2. Az anti-tumor nekrozis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) infliximabbal (IFX) való biológiai terápia jelentősége a gyulladásos bélbetegségek (IBD) kezelésében.....	6
CÉLKITŰZÉSEK.....	7
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	7
1. A humán vastagbél epithél sejtek iontranszportereinek epesav-indukálta hasmenésben játszott szerepe .....	7
1.1. Betegek beválasztása .....	7
1.2. Kolon kripták izolálása.....	7
1.3. Az $\text{pH}_i$ , $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , $(\text{ATP})_i$ és $(\Delta\Psi)_m$ mérése.....	7
1.4. Az NHE aktivitások meghatározása .....	7
1.5. A CBE-aktivitás mérése.....	8
1.6. A pufferekapacitás meghatározása .....	8
1.7. Electronmikroszkópia .....	8
1.8. Statisztikai analízis.....	8
2. Az anti-TNF- $\alpha$ IFX-bal való biológiai terápia jelentősége IBD kezelésében .....	8
2.1. Betegek I.....	8
2.2. Betegek II.....	9
2.3. Vakcinálás.....	9
2.4. Szérum TNF- $\alpha$ , IFX, ATI, IFN- $\gamma$ és IL-2 szintek meghatározása .....	9
2.5. Statisztika.....	9
EREDMÉNYEK.....	10
1. A humán vastagbél epithél sejtek iontranszportereinek az epesav-indukálta hasmenésben betöltött szerepe.....	10
1.1. A krónikus epesavterhelés károsítja a kolon epithél sejtek NHE és CBE aktivitását 10	
1.2. Akut epesavterhelés hatása izolált humán kolon epithél sejtek $\text{pH}_i$ -jára .....	10
1.3. Akut epesavterhelés hatása az izolált kolon epithél sejtek NHE és CBE aktivitására 10	
1.4. Epesavak hatása a humán kolon epithél sejtek sejtalkotóinak morfológiájára .....	10
1.5. CDC hatása az izolált human kolon epithél sejtekben vizsgált $\text{ATP}_i$ és $(\Delta\Psi)_m$ -ra .....	11
1.6. A CDC koncentrációfüggően emeli az izolált kolon epithél sejtek $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -jét .....	11

1.7. A CDC az ATP <sub>i</sub> csökkentésén keresztül gátolja az NHE-aktivitást és Ca <sup>2+</sup> -függő CBE-funkciócsökkenést vált ki izolált humán kolon epithél sejtekben .....	11
2. Az anti-TNF- $\alpha$ IFX-bal való biológiai terápia jelentősége IBD kezelésében .....	11
2.1. A szérum TNF- $\alpha$ , az IFX és az IFX elleni antitest titer gyakorlati jelentősége IBD-ben .....	11
2.2. Az influenza elleni védőoltás hatása anti-TNF- $\alpha$ és/vagy immunszuppresszív terápiát kapó IBD-s betegek sejtes immunválaszára.....	12
DISZKUSSZIÓ .....	13
1. A humán vastagbél epithél sejtek iontranszportereinek az epesav-indukálta hasmenésben betöltött szerepe.....	13
2. Az anti-TNF- $\alpha$ IFX-bal való biológiai terápia jelentősége IBD kezelésében .....	15
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....	17

## A TÉZIS TÉMÁJÁT ALKOTÓ KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

**I.** A. Bálint\*, K. Farkas\*, **É. Pallagi-Kunstár**, G. Terhes, E. Urbán, M. Szűcs, T. Nyári, Zs. Bata, F. Nagy, Z. Szepes, P. Miheller, K. Lőrinczy, P.L. Lakatos, B. Lovász, T. Szamosi, A. Kulcsár, A. Berényi, D. Törőcsik, T. Daróczi, Z. Saródi, T. Wittmann, T. Molnár. Antibody and cell-mediated immune response to whole virion and split virion influenza vaccine in patients with inflammatory bowel disease on maintenance immunosuppressive and biological therapy. *Scand J Gastroenterol* 2015 Feb;50(2):174-81

**II. É. Pallagi-Kunstár**, K. Farkas, J. Maléth, Z. Rakonczay Jr, F. Nagy, T. Molnár, Z. Szepes, V. Venglovecz, J. Lonovics, Z. Rázga, T. Wittmann, P. Hegyi Bile acids inhibit  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger and  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  exchanger activities via cellular energy breakdown and  $\text{Ca}^{2+}$  overload in human colonic crypts. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 2014 Jul 13. [Epub ahead of print]

**III. É. Pallagi-Kunstár**, K. Farkas, Z. Szepes, F. Nagy, M. Szűcs, R. Kui, R. Gyulai, A. Bálint, T. Wittmann, T. Molnár. Utility of serum TNF- $\alpha$ , infliximab trough level, and antibody titers in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2014 May 7;20(17):5031-5:5031-5.

**IV. É. Kunstár**, P. Hegyi, Z. Rakonczay Jr, K. Farkas, F. Nagy, T. Wittmann, T. Molnár. Is Bile Acid Malabsorption Really a Common Feature of Crohn's Disease or is It Simply a Consequence of Ileal Resection? *Front Physiol.* 2011;2:28

## A TÉZIS TÉMÁJÁHOZ NEM KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNY

**I.** K. Farkas, P.L. Lakatos, M. Szűcs, **É. Pallagi-Kunstár**, A. Bálint, F. Nagy, Z. Szepes, N. Vass, L. S Kiss, T. Wittmann, T. Molnár. Frequency and prognostic role of mucosal healing in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis after one-year of biological therapy. *World J Gastroenterol* 2014 Mar 21;20(11):2995-3001

Publikációk száma:	<b>5</b>
Kumulatív impakt faktor:	<b>10,268</b>

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

**( $\Delta\psi$ )<sub>m</sub>**: mitokondriális transzmembrán potenciál

**[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>**: intracelluláris Ca<sup>2+</sup>-koncentráció

**ATI**: infliximab ellen termelt antitest

**ATP<sub>i</sub>**: intracelluláris ATP-koncentráció

**BAPTA-AM**: 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N9,N9-tetraacetic acid

**BCECF-AM**: 2',7'-biscarboxyethyl-5(6)-carboxyfluorescein-acetoxymethylester

**CBE**: Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-cserélő

**CD**: Crohn-betegség

**CDAI**: Crohn-betegség aktivitás index

**CDC**: nem-konjugált epesav kenodezoxikólsav

**D**: ileum-rezekált/kolecisztektomizált hasmenéses betegcsoport

**DOG/IAA**: glikolízis gátló deoxyglucose és idoacetamide

**DRA**: Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-cserélő "downregulated in adenoma"

**FURA-2-AM**: 2-(6-(bis(carboxymethyl)amino)-5-(2-(2-(bis(carboxymethyl)amino)-5-methylphenoxy)-ethoxy)-2-benzofuranyl)-5-oxazolecarboxylic acetoxymethyl ester

**GCDC**: glycine-conjugated bile acid glycochenodeoxycholic acid

**IBD**: gyulladássos bélbetegség

**IFX**: infliximab

**IP<sub>3</sub>R**: inozitol trifoszfát receptor

**IQR**: interquartilis tartomány

**NHE**: Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-cserélő

**NON-D**: ileum-rezekált/kolecisztektomizált nem hasmenéses betegcsoport

**pH<sub>i</sub>**: intracelluláris pH

**RR**: ruthenium red

**RyR**: ryanodin receptor

**SERCA**: sarkoplazmás/endoplazás retikulum kalcium ATPáz

**TEM**: transzmissziós elektronmikroszkópia

**Tg**: thapsigargin

**TMRM**: tetramethylrhodamine methyl ester

**TNF- $\alpha$** : tumor nekrozis faktor alfa

**UC**: colitis ulcerosa

## BEVEZETÉS

### **1. A humán vastagbél epithél sejtek iontranszportereinek az epesav-indukálta hasmenésben betöltött szerepe**

A vastagbél alapvető szerepet játszik a szervezet vízháztartásának fenntartásában azzal, hogy naponta 1,5-1,9 liter elektrolitban gazdag folyadékot szív vissza. A polarizált kolon epithél sejtek felszíni membránján helyet foglaló ion transzporterek megfelelő működése elengedhetetlen a szekréció és az abszorpció közötti egyensúly fenntartásához. Nagy valószínűséggel két, egymással funkcionális egységet alkotó ion transzporter, a  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -cserélő 3 (NHE3) és a  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -cserélő (CBE) „downregulated in adenoma” (DRA), felelősek a kolonban zajló elektroneutrális NaCl-felszívás legnagyobb hányadáért. Habár a kolon epithél sejtek egyéb sejt felszíni NHE-izoformákkal is rendelkeznek, a  $\text{Na}^+$ -visszaszívásban eddig csak az NHE3 kulcsfontosságú szerepét sikerült bizonyítani. Ezt a megfigyelést alátámasztja, hogy az NHE3-génkiütött egerek krónikus hasmenésben szenvednek. A  $\text{Cl}^-$ -visszaszívásban a  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -cserélő DRA hasonló fontos szerepet tölt be. A transzporter funkcióvesztéses mutációja embereknél veleszületett „kloridvesztéses” hasmenéshez vezet, de hasonló jelenség figyelhető meg DRA-hiányos egereknél. Emellett a  $\text{Na}^+$  és  $\text{Cl}^-$  transzport zavara bizonyítottan hozzájárul a colitis ulcerosa-t (UC) kísérő és az ún. szekretoros hasmenés kialakulásához.

Az epesavak a táplálékkal elfogyasztott zsírok emulgeálását és felszívódását segítő természetes detergensnek. Az enterohepatikus körforgás zavara epesav-malabszorpciót eredményez, ekkor az epesavak nagyobb koncentrációban érik el a vastagbelet és ismeretlen mechanizmusokon keresztül hasmenést okoznak. Az ileum-eltávolítás vagy a cholecystectomy jól ismert kísérője az epesav-malabszorpció: az ileum-rezekált Crohn-betegek 97%-ánál, a cholecystectomy átesettek 58%-ánál fordul elő. Mivel a diagnosztikai módszerek nem mindenhol kivitelezhetőek, a betegséget ritkán lehet azonosítani, ezért az epesav-okozta hasmenés kezelése igen komplikált. Az epesav-származék kolesztiraminnal való terápia nem mindig hatékony, de a páciensek élethosszig-tartó gyógyszeres kezelése sem lehet perspektíva. Kimutatták, hogy a felszívódás/szekréció károsodása a kolonban, beleértve a  $\text{Na}^+$  és a  $\text{Cl}^-$  transzportot, kritikus szerepet játszhat az epesav-malabszorpciót kísérő hasmenés létrejöttében. Az epesavak ugyanis *in vivo* szekréciót serkentő, valamint abszorpciót gátló hatást fejtenek ki a humán vastagbéltre. Ezt a megfigyelést *in vitro* kísérletek is alátámasztják. Az epesav-okozta hasmenés hátterében álló mechanizmus azonban még mindig nem ismert, a folyamat megértése viszont nagy jelentőséggel bírna új terápiás lehetőségek kifejlesztésében.

## **2. Az anti-tumor nekrozis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) infliximabbal (IFX) való biológiai terápia jelentősége a gyulladásos bélbetegségek (IBD) kezelésében**

A Crohn betegség (CD) és a colitis ulcerosa (UC) a krónikus, ismeretlen eredetű gyulladásos bélbetegségek (IBD) két megjelenési formája, melyek lefolyását relapszusok és remissziók váltakozása jellemzi. Az anti tumor nekrozis faktor (TNF)- $\alpha$  infliximab (IFX) bevezetése drámai változást jelentett a kezelésre refrakter IBD-ben szenvedő betegek ellátásában. Számos tanulmány igazolta az IFX hatékonyságát CD, valamint UC remissziójának indukciójában és fenntartásában. A TNF- $\alpha$  antagonistá terápiaira kezdetben reagáló betegek közel 40%-ában alakul ki azonban dózis intenzifikációt vagy készítményváltást igénylő hatásvesztés. A TNF- $\alpha$  blokkolók ellen termelt antitestek jelenléte, a gyógyszer alacsony szérumszintje kedvezőtlen terápiás választ előrejelző tényezők. A dózis intenzifikáció megoldást jelenthet a kezelésre nem reagáló esetekre alacsony anti TNF- $\alpha$  szérumszint esetén, míg a gyógyszer ellenes antitestek jelenlétekor a készítményváltás eredményezhet nagyobb sikert. A hatásvesztés és adverz események kialakulásának legfőbb oka az immunogenitás, vagyis a biológiai szer ellen termelt antitestek megjelenése. A fenntartó kezelés, a konkomittáló immunomoduláns terápia és a nagy dózisú kortikoszteroid premedikáció csökkentheti az immunogenitást.

A TNF- $\alpha$  gátló kezelés rövidebb ideig tartó terápiás válaszában kezdetben az anti TNF- $\alpha$  ellen termelt ellenanyagok szerepét gyanították ugyan, de utóbb publikált tanulmányok alapján inkább a vérben mérhető szubterápiás IFX szint van hatással a klinikai válaszra és az endoszkópos javulásra a gyógyszer ellen termelt antitestek jelenlététől függetlenül. A TNF- $\alpha$ , a TNF- $\alpha$  blokkoló, és az ellene termelt antitest szint együttes meghatározásának szerepét a napi gyakorlatban, a terápiás döntéshozatalban idáig nem vizsgálták, sőt, az IFX farmakokinetikai paramétereinek monitorozása az IBD aktivitásának ellenőrzése és a terápia optimalizálása céljából sem standardizált a gyakorlatban. Jelen vizsgálatunk célja a TNF- $\alpha$ , az IFX és az ellene termelt antitest szint meghatározása olyan IBD-s betegekben, akiknél hatásvesztés alakult ki, mellékhatások vagy allergiás reakció jelent meg a kezelés során.

Habár nem törvényszerű, hogy az IBD-s betegek immunkompetenciája megváltozzon, jelenleg nincs rendelkezésre álló módszer az immunszuppressziók immunrendszerre gyakorolt hatásának meghatározására. A biológiai és/vagy immunomoduláns terápiaiban részesülő IBD-betegek nagyobb kockázatnak vannak kitéve a fertőzéseket illetően, beleértve az opportunista fertőzésekre való esély extrém emelkedését: már egy immunomodulátor szedése háromszoros kockázatot jelent. A fertőzések egyes típusai immunizációval kivédhetők. Mivel az influenza a leggyakoribb védőoltással kivédhető betegség, az influenza elleni vakcináció javallott biológiai és/vagy immunomoduláns terápiaiban részesülő IBD-s betegeknek. Úgy tűnik, az immunszuppresszív és a biológiai terápia befolyásolja a vakcinára adott immunválaszt, az azonban nem tisztázott, hogy a vakcinálás hatással van-e az IBD-s betegek citokin-profiljára és ezzel együtt a betegség lefolyására.

## CÉLKITŰZÉSEK

1. Az epesavak hatásának vizsgálata humán vastagbél epithél sejtek ion transzportereinek működésére, valamint az epesav-okozta hasmenés pathomechanizmusának sejtszintű karakterizálása.

2.1. A TNF- $\alpha$ , az IFX és az ellene termelt antitest szint meghatározása olyan IBD-s betegekben, akiknél hatásvesztés alakult ki, mellékhatások vagy allergiás reakció jelent meg a kezelés során.

2.2. A celluláris immunválasz meghatározása influenza elleni oltásban részesült anti-TNF-  $\alpha$  és/vagy immunszuppresszív terápiával kezelt IBD-s betegeknél.

## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 1. A humán vastagbél epithél sejtek iontranszportereinek az epesav-indukálta hasmenésben betöltött szerepe

#### 1.1. Betegek beválasztása

Kontroll páciensek mellett krónikus hasmenésben szenvedő vagy nem szenvedő ileum-rezekált/kolecisztektomizált betegek lettek bevonva a tanulmányba. Egyik betegnél sem volt IBD kimutatható. A vizsgálatot a Szegedi Tudományegyetem Humán Orvosbiológiai Intézményi és Regionális Kutatásetikai Bizottsága engedélyével végeztük. A betegek kolonoszkópiás vizsgálaton estek ét, mely során hat biopsziás mintát vettünk.

#### 1.2. Kolon kripták izolálása

A kolon kriptákat biopsziás mintákból izoláltuk. 2x30 perc kollagenázos (0,38 mg/ml) emésztést követően a kriptákat mikropipetta segítségével Petricsészébe helyeztük.

#### 1.3. Az $\text{pH}_i$ , $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , $(\text{ATP})_i$ és $(\Delta\Psi)_m$ mérése

Az izolált human kolon kriptákat a vizsgálatnak megfelelően különböző fluoreszcens festéket (BCECF-AM (1.5 $\mu\text{mol/L}$ ), Fura2-AM (2.5 $\mu\text{mol/L}$ ), MgGreen-AM (5 $\mu\text{mol/L}$ ), vagy TMRM (100nmol/L)) tartalmazó HEPES-oldatban 30 percig 37 °C-on inkubáltuk. A kriptákat folyamatos perfúzió mellett az adott fluoreszcens festéket gerjesztő hullámhosszú fényel világítottuk meg. Az emissziót adott hullámhosszon detektáltuk.

#### 1.4. Az NHE aktivitások meghatározása

A kolon epithél sejtek NHE-aktivitását  $\text{NH}_4^+$ -pulzus technikával  $\text{Na}^+$ -mentes oldatban vizsgáltuk. A  $\text{Na}^+$ -tartalmú oldat visszaadásakor működésbe lépnek a különböző NHE-izomformák.



A savas  $\text{pH}_i$ -ből való regeneráció mértékéből következtethetünk az NHE-aktivitásra. A különböző NHE izoformák aktivitásának elkülönítésére a szelektív NHE-gátló HOE642-t használtuk. 1  $\mu\text{M}$  HOE642 gátolja az NHE1 működését, míg 50  $\mu\text{M}$  HOE642 az NHE1 és 2-t, de nem az NHE3-t.

### 1.5. A CBE-aktivitás mérése

A humán kolon epithél sejtek CBE-aktivitását a  $\text{Cl}^-$ -elvonás technikával vizsgáltuk. A  $\text{Cl}^-$  kivonása a sztenderd  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ -oldatból a sejtek alkalizációjához vezet, mivel a CBE fordított irányú működésbe kezd. A transzporter aktivitását az alkalizációs ráta első 30 mp-e adja meg.

### 1.6. A pufferkapacitás meghatározása

A humán kolon epithél sejtek totál pufferkapacitását ( $\beta_{\text{total}}$ ) az  $\text{NH}_4^+$ -pulzus-technikával határoztuk meg. A sejteket különböző koncentrációjú  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -nak tettük ki  $\text{Na}^+$ - és  $\text{HCO}_3^-$ -mentes oldatban. A  $\beta_i$  (a pufferkapacitás intrinszik komponense) a Henderson-Hasselbach egyenlet segítségével lett meghatározva. A  $\beta_{\text{total}}$ -t a következőképpen kalkuláltuk:  $\beta_{\text{total}} = \beta_i + \beta_{\text{HCO}_3^-} = \beta_i + 2.3 \times [\text{HCO}_3^-]_i$ , ahol a  $\beta_{\text{HCO}_3^-}$  a  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ -rendszer pufferkapacitása. A kalkulált  $\text{pH}_i$ -változás mértékét a  $J(\text{B}^-) = \text{dpH}/\text{dtx}$   $\beta_{\text{total}}$  egyenlet segítségével bázis fluxussá konvertáltuk.

### 1.7. Electronmikroszkópia

A biopsziákat 2%-os glutáraldehid-oldatban inkubáltuk. A mintákat 1x1mm nagyságú darabokat vágunk, 2%-os zselatinnal infiltráltuk, majd Embed 812-be (EMS, USA) ágyasztuk. 70 nm-es metszetek készültek a transzmissziós elektronmikroszkópiához (TEM).

### 1.8. Statisztikai analízis

Az értékek átlag $\pm$  SE-ként vannak megadva. A statisztikai analízist varianciaanalízissel (ANOVA) végeztük, Dunnett vagy Bonferroni post-hoc tesztekkel kombinálva.  $P \leq 0,05$  értéket fogadtunk el szignifikánsként.

## **2. Az anti-TNF- $\alpha$ IFX-bal való biológiai terápia jelentősége IBD kezelésében**

### **2.1. Betegek I.**

A vizsgálat első részénél 67-IFX kezelésben részesülő CD és UC beteget vontunk be prospektív megfigyeléses tanulmányunkba és osztottuk őket két csoportra. Harminchat betegnél lépett fel hatásvesztés vagy alakult ki mellékhatás, illetve allergiás reakció (I csoport), míg 31 beteg teljes klinikai remisszióba került (II csoport) - ők képezték a vizsgálat kontroll csoportját. Minden betegtől vért vettünk a szérum TNF- $\alpha$ , IFX és az IFX ellen termelt antitest (ATI) meghatározásának céljából. A vizsgálatot a Szegedi Tudományegyetem Humán Orvosbiológiai

Intézményi és *Regionális Kutatásetikai Bizottsága* engedélyével végeztük. Vizsgáltuk a hatásvesztés, a mellékhatások, illetve allergiás reakciók kialakulása és a szérum TNF- $\alpha$ , IFX és ATI koncentrációk közötti összefüggést.

## **2.2. Betegek II.**

A vizsgálat második része egy többcentrumú prospektív kohort tanulmány volt, négy magyarországi IBD-központ részvételével. A beválogatási feltétel 18 év feletti életkor, 3 hónapnál hosszabb ideje fennálló stabil IBD-diagnózis, inaktív periódus valamint nem módosított terápia. Az influenza elleni védőoltás minden betegnek fel lett ajánlva. A betegek az alapján lettek két csoportra osztva, hogy elfogadták-e a védőoltást. A tanulmányba bevontakat 4 hónapig követtük. A védőoltást kapott betegeket további két csoportra osztottuk: aminoszalicilát kezelésben részesülők immunoszuppresszív terápia nélkül és immunomoduláns és/vagy biológiai terápiában részesülők. A kontrollok fenntartó biológiai terápiát és/vagy immunomoduláns kezelést kaptak.

A vakcinákat (teljes virion vagy split virion) véletlenszerű kiválasztás alapján kapták a betegek. A vizsgálatot a Szegedi Tudományegyetem Humán Orvosbiológiai Intézményi és *Regionális Kutatásetikai Bizottsága* engedélyével végeztük.

## **2.3. Vakcinálás**

Két vakcinát alkalmaztunk a szezonális influenza vírus A/California/7/2009 (H1N1), A/Victoria/361/2011 (H3N2), B/Wisconsin/1/2010–szerű B/Hubei-Wujiagang/158/2009 ellen.

Az inaktivált split-virionot tartalmazó vakcinát (IDFlu9), valamint az inaktivált teljes virionot tartalmazó vakcinát (Fluval AB) véletlenszerű kiválasztás alapján kapták a betegek.

## **2.4. Szérum TNF- $\alpha$ , IFX, ATI, IFN- $\gamma$ és IL-2 szintek meghatározása**

A TNF- $\alpha$ , IFX és ATI szinteket enzimmal kötött immunszorbens (ELISA) technikával mértük. A vérmintát az első betegpopulációtól a soron következő IFX kezelés előtt vettük le.

A vizsgálat második részében résztvevő betegektől a vérmintákat a vakcinálás előtt, valamint 5-6 héttel utána gyűjtöttük. A TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  és IL-2 szinteket a vakcinálást követően ELISA-val határoztuk meg és összehasonlítottuk az immunoszuppresszáns kezelésben részesülő és nem részesülő betegek adatait is.

## **2.5. Statisztika**

A vizsgálat első részében a *folytonos változókat medián és interkvartilis tartományok* formájában fejeztük ki. A két csoport kategorikus változóit *Pearson-féle chi-négyzet* segítségével értékeltük. Az IFX és ATI szintek csoportonkénti összehasonlítását Mann-Whitney és Fisher teszttel végeztük. A laborparaméterek, IFX és ATI szintek közötti összefüggés elemzésére

szintén *Mann-Whitney* próbát alkalmaztunk. A 0,05 feletti *p* értékeket tekintettük szignifikánsnak.

A vizsgálat második részében a statisztikai analízishez *Pearson*-féle *chi*-négyzet tesztet, *Fisher*-féle *egzakt* tesztet, *multivariáns varianciaanalízist* (MANOVA) használtunk. A 0,05 feletti *p* értékeket tekintettük szignifikánsnak. A *p*-értékeket *Holm-Sidak módszerrel* korrigáltuk.

## **EREDMÉNYEK**

### **1. A humán vastagbél epithél sejtek iontranszportereinek az epesav-indukálta hasmenésben betöltött szerepe**

#### **1.1. A krónikus epesav terhelés károsítja a kolon epithél sejtek NHE és CBE aktivitását**

Ileum-rezekált/cholecystectomizált hasmenéses betegekből izolált kolon kriptáknál csökkent NHE- és CBE-aktivitást találtunk a kontroll páciensekhez képest. Ileum-rezekált/cholecystectomizált betegeknél, akik nem szenvedtek krónikus hasmenéstől, nem mutatkozott a kontroll páciensekhez képest eltérés a vizsgált ion transzporterek aktivitásában. Ez a megfigyelés alátámasztja az ion transzporterek epesav-indukálta hasmenésben betöltött kulcsfontosságú szerepét.

#### **1.2. Akut epesav terhelés hatása izolált humán kolon epithél sejtek pH<sub>i</sub>-jára**

A nem-konjugált epesav kenodezoxikólsav (CDC) és a konjugált glikokenodezoxikólsav (GCDC) koncentrációfüggően csökkentette a kontroll páciensekből izolált kolon epithél sejtek pH<sub>i</sub>-ját. Az acidózis mértéke jelentősebb volt a CDC esetén. Ez valószínűleg a nem-konjugált epesav lipofilitásának tudható be, ami lehetővé teszi annak sejtmembránon való átjutását.

#### **1.3. Akut epesav terhelés hatása az izolált kolon epithél sejtek NHE és CBE aktivitására**

10 perces kezelés 0,1 mM CDC-vel vagy GCDC-vel nem volt hatással a sejtek NHE-aktivitására. 0,3 mM CDC azonban jelentős gátlást fejtett ki minden vizsgált NHE-izoforma funkciójára. 0,3 mM CDC 10 percig adva szignifikánsan gátolta a kolon epithél sejtek CBE-aktivitását is. Sem alacsonyabb koncentrációjú CDC (0,1 mM) sem pedig GCDC (0,1 vagy 0,3 mM) nem befolyásolta a CBE működését.

#### **1.4. Epesavak hatása a humán kolon epithél sejtek sejtalkotóinak morfológiájára**

Sem 0,1 vagy 0,3 mM CDC, sem pedig 1 mM GCDC-vel történő inkubáció nem okozott elváltozást a kolon epithél sejtek intracelluláris organelleiben. Magas koncentrációjú CDC (1 mM) azonban súlyosan károsította a mitokondriumokat. A többi sejtalkotó morfológiájában nem mutatkozott eltérés.

### **1.5. CDC hatása az izolált human kolon epithél sejtekben vizsgált ATP<sub>i</sub> és (Δψ)<sub>m</sub>-ra**

0,3 mM CDC jelentős, de visszafordítható csökkenést idézett elő a kolon epithél sejtekben mért ATP<sub>i</sub>-ban. Mind a glikolitikus, mind pedig a mitokondriális ATP-termelés károsodott. 0,1 és 0,3 mM CDC emellett reverzibilisen csökkentette a mért (Δψ)<sub>m</sub>-t.

### **1.6. A CDC koncentrációfüggően emeli az izolált kolon epithél sejtek [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-ját**

A CDC koncentrációjától függő mértékben elnyújtott, platófázisos pathológiás kalciumszignált váltott ki izolált humán kolon epithél sejtekben. Ez a jelenség szignifikánsan csökkenthető volt koffeinnel, ami az endoplazmás retikulum (ER) inozitol-trifoszfát receptorának (IP<sub>3</sub>R) antagonistája. A plazmamembrán kalciumcsatornáinak blokkolására gadolíniumot (Gd<sup>3+</sup>) használtunk. A Gd<sup>3+</sup> önmagában alkalmazva nem volt képes kivédeni a 0,3 mM CDC-okozta pathológiás kalciumszignált.

Ca<sup>2+</sup>-mentes oldatban a SERCA-gátló thapsigargin (Tg) az ER Ca<sup>2+</sup>-készletének csökkenését váltotta ki, ami citoszólikus [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-emelkedésben nyilvánult meg. Amennyiben a Tg-kezelést 0,3 mM CDC-t követően alkalmaztuk, hatása jelentősen lecsökkent. 0,3 mM CDC-vel egyidejűleg adva kismértékben tovább emelte a sejtplazma [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-ját. Ez a megfigyelés arra enged következtetni, hogy a CDC [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-ra kifejtett hatását az extracelluláris térből való Ca<sup>2+</sup>-beáramlás előidézése mellett IP<sub>3</sub>R-on keresztül feje ki.

### **1.7. A CDC az ATP<sub>i</sub> csökkentésén keresztül gátolja az NHE-aktivitást és Ca<sup>2+</sup>-függő CBE-funkció csökkenést vált ki izolált humán kolon epithél sejtekben**

Megvizsgáltuk, hogy van-e összefüggés a CDC intracelluláris hatásai (ATP<sub>i</sub>-csökkenés, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-emelkedés) és az ion transzporterekre kifejtett gátló hatása között. A glikolízis-gátló DOG+IAA alkalmazásakor ugyanolyan mértékű NHE-funkció csökkenést figyeltünk meg, mint amit a 0,3 mM CDC-kezelést követően detektáltunk. Ebből arra következtethetünk, hogy a CDC az ATP<sub>i</sub> csökkentésén keresztül gátolja a kolon epithél sejtek NHE-aktivitását. Az intracelluláris Ca<sup>2+</sup>-kelátor BAPTA-AM teljesen kivédte a 0,3 mM CDC-okozta CBE-aktivitás csökkenést, ami a transzporter erős Ca<sup>2+</sup>-függésére utal.

## **2. Az anti-TNF-α IFX-bal való biológiai terápia jelentősége IBD kezelésében**

### **2.1. A szérum TNF-α, az IFX és az IFX elleni antitest titer gyakorlati jelentősége IBD-ben**

A CDAI medián értékei 138 (IQR 68-186) és 50 (IQR 34-70) voltak az I és II csoportban. A medián pMayo értékek a két csoportban 5 (IQR 3-6) és 1 (IQR 0-1) voltak. A szérum TNF-α medián értéke az I és II csoportban 10,5 pg/ml-nek (IQR 3,2-18-9) és 6,3 pg/ml-nek (IQR 1,5-15,7) bizonyult. A szérum IFX medián értékei a két csoportban 3,1 (IQR 2,6-5,04) és 3,5 (IQR 2,6-4,7) μg/ml voltak. ATI 14 betegben volt kimutatható, a medián értéke 933 μg/ml (IQR 328-

3306) volt. A ROC analízis alapján az ATI kimutatásához szükséges IFX szérumszint elválasztó értéke 3,01 µg/ml-nek adódott. A szérum TNF- $\alpha$  szint szignifikánsan magasabbnak bizonyult mérhető ATI szintek esetében ( $p=0,005$ ). Az ATI pozitivitás és az alacsony IFX szérumszint szintén szignifikáns korrelációt mutatott ( $p=0,015$ ). Nem találtunk különbséget az IFX szérumszint és az antitest pozitivitás között. A mérhető antitest szinttel rendelkező betegek közül 2 betegben mellékhatások, 5 betegben hatásvesztés, 3 betegben allergiás reakció lépett fel. Megelőző biológiai terápiában 37 beteg részesült. Az antitestképződés szignifikánsan gyakoribb volt a korábban biológiai kezelésem már átesett betegekben ( $p=0,048$ ). Dózis intenzifikációra 9 beteg szorult. A dózis intenzifikáció és az antitestképződés között nem találtunk összefüggést. A konkomittáló immunszuppresszív kezelés nem befolyásolta az IFX és ATI szinteket. Alacsonyabb szérum IFX szintek esetében szignifikánsan magasabb süllyedés és CRP értékeket észleltünk ( $p=0,04$  and  $p=0,002$ ). A szérum TNF- $\alpha$  szint a szteroiddal kezelt betegekben magasabbnak bizonyult a szteroidot nem szedőkkel szemben ( $p=0,038$ ).

## **2.2. Az influenza elleni védőoltás hatása anti-TNF- $\alpha$ és/vagy immunszuppresszív terápiát kapó IBD-s betegek sejtes immunválaszára**

209 IBD-s beteget (127 CD, 82 UC) vontunk be a vizsgálatba. Influenza elleni védőoltást 156 beteg (98 CD, 58 UC) kapott, míg 56-an (29 CD, 24 UC) ezt visszautasították (kontroll csoport). 57-en kaptak teljes viriont és 99-en split viriont tartalmazó védőoltást.

A 156 vakcinált betegből 115 részesült immunszuppresszív kezelésben. Az immunszuppresszív terápiát nem kapó csoport 41 betegből állt. A kontrollcsoportot alkotó 53 betegből 32 kapott immunszuppresszív kezelést.

A leukocita és limfocita szintekben nem találtunk jelentős eltérést a vakcinálás után. Sem a TNF- $\alpha$ , sem az INF- $\gamma$  szintek nem változtak meg jelentős mértékben a védőoltást követően. Jelentős csökkenést figyeltünk meg az IL-2 szintjében a split és a teljes viriont kapó csoport között ( $p=0,004$ ) a védőoltás beadását követően.

## DISZKUSSZIÓ

### **1. A humán vastagbél epithél sejtek iontranszportereinek az epesav-indukálta hasmenésben betöltött szerepe**

Jelen tanulmányban bizonyítjuk, hogy az epesavak károsítják a humán kolon epithél sejtek sav/bázis transzportereinek (NHE és CBE) működését. Az NHE és CBE gátolt aktivitása a vastagbélben csökkent folyadék- és elektrolit visszaszívást, valamint hasmenés kialakulását eredményezi.

A víz és ionok (főképp a  $\text{Na}^+$  és a  $\text{Cl}^-$ ) abszorpciója a kolon epithél sejtek egyik fontos feladata. Az elektroneutrális  $\text{NaCl}$  felszívásért a NHE és a CBE együttes működése felelős. E két transzporter károsodott aktivitása már bizonyított egyes hasmenéssel járó kórfolyamatokban.

Az epesavak is képesek hasmenést kiváltani, ami az epesav-malabszorpció velejárója. Epesav-malabszorpció alakulhat ki az ileum eltávolítását vagy cholecystectomiát követően. Az epesavak befolyása a vastagbél epithélium szekréciós és abszorptív folyamataira valószínűleg kritikus szerepet tölt be az epesav-okozta hasmenés kialakulásában. A jelenség pontos mechanizmusa azonban nem ismert.

Kísérletsorozatunk első részében bemutattuk, hogy a sav/bázis transzporterek csökkent aktivitása a kolonban részt vesz az epesav-okozta hasmenés kialakításában. Ileum-rezekción vagy cholecystectomián átesett betegek biopsziás mintáiból izoláltunk kolon epithél sejteket, akiknek a vastagbele valószínűleg folyamatos magas epesav terhelésnek van kitéve. A betegeket két csoportra osztottuk az alapján, hogy az operációt követően volt-e krónikus hasmenésük (Diarrhoea – D) vagy nem (Non-Diarrhoea – NON-D). A D-csoportban minden vizsgált NHE-izofoma aktivitása és a CBE funkciója is jelentős csökkenést mutatott a kontroll csoporthoz képest. Fontos megjegyezni, hogy a NON-D csoportnál a kontrollhoz képest nem találtunk eltérést a vizsgált transzporterek aktivitásában. Ezek az adatok arra engednek következtetni, hogy a csökkent abszorpció a kolonban valószínűleg a nem-fiziológiás epesav terhelésnek tudható be.

Ez után vizsgáltuk, hogy az epesavak hogyan hatnak egészséges kolon epithél sejtekre. Kontroll páciensekből izolált kolon kriptákat kezeltünk a nem konjugált epesav kenodezoxikólsavval (CDC) és a konjugált glikokenodezoxikólsavval (GCDC). A CDC gyenge sav lévén passzív diffúzióval átjut a sejtmembránon, míg a konjugált epesavakat aktív transzportmechanizmus juttatja a sejtekbe. Az epesavakat három koncentrációban alkalmaztuk (0,1, 0,3 és 1mM), a fiziológiás és nem-fiziológiás körülmények imitálása céljából. A CDC és a GCDC koncentrációfüggő, reverzibilis  $\text{pH}_i$ -csökkenést eredményezett az izolált kolon epithél sejtekben. Az acidózis a CDC esetében nagyobb mértékű volt. Ennek oka a CDC lipofil karaktere.

A következő lépésben vizsgáltuk az epesavak által kifejtett akut hatást az egészséges humán kolon epithél sejtek sav/bázis transzportereire. Relatív magas koncentrációjú CDC (0,3 mM) jelentősen gátolta a sejtek NHE és CBE aktivitását, ami az emelkedett koncentrációban jelen lévő nem konjugált epesavak toxikus hatását mutatja. Jelen kísérletsorozatban nem vizsgáltuk, hogyan befolyásolják az epesavak a  $\text{Na}^+$  és  $\text{Cl}^-$ -szekréción, de korábbi tanulmányokból tudjuk, hogy az epesavak stimulálják a kolon epithél sejtek elektrolit- és folyadékszekréción. Az szekréción mértékének növekedése és az abszorpción csökkenése együttesen felelős lehet az epesav-malabszorpción során fellépő hasmenésért.

Felmerült a kérdés, milyen intracelluláris folyamatokon keresztül gátolják az epesavak a kolon epithél sejtek sav/bázis transzporterek aktivitását. Először a sejtalkotók morfológiáját vizsgáltuk. Csak 1 mM CDC-vel való inkubáción követően figyeltünk meg súlyos mitokondriális károsodást, a mitokondriumok felhízta, belső membránstruktúrájuk tönkrement. A többi sejtalkotó szerkezetében nem fedeztünk fel eltérést. Mértük a sejtek CDC-kezelés hatására bekövetkező  $\text{ATP}_i$ -ban bekövetkező eltérést és a mitokondriális transzmembrán potenciál-változását ( $\Delta\psi_m$ ), mivel ez az oxidatív ATP-szintézis hajtóereje. 0,1 és 0,3 mM reverzibilisen csökkentette a kolon epithél sejtek ( $\Delta\psi_m$ )-ját. Habár 0,3 mM CDC nem okozott strukturális károsodást a kolon epithél sejtek sejtalkotóiban, de elég volt az  $\text{ATP}_i$  csökkentéséhez és a ( $\Delta\psi_m$ ) időszakos megszüntetéséhez, amivel képes megzavarni a sejtek energiatermelő folyamatait. Ennek a jelenségnek pedig szerepe lehet az elektrolit visszaszívás károsodásában.

Az epesavak másik, potenciális intracelluláris célpontja a  $\text{Ca}^{2+}$ -szignalizáción lehet. Korábban kimutatták, hogy a patológiás mértékű  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -emelkedés gátolja a CBE és az NHE aktivitását. A mi kísérleteinkben a CDC koncentrációjától függően elnyújtott, plató-fázisos, nem-fiziológiás  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -növekedést okozott az izolált humán kolon epithél sejtekben. Az  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  emelkedésekor a  $\text{Ca}^{2+}$  érkezik az endoplazmás retikulumból (ER) inozitol-trifoszfát ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) és/vagy rianodin receptoron (RyR) keresztül, vagy pedig az extracelluláris térből  $\text{Ca}^{2+}$ -csatornákon át. Hogy azonosítsuk, CDC-kezelés hatására milyen forrásból emelkedik az  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , a sejteket a CDC-vel egyidejűleg az  $\text{IP}_3\text{R}$ -antagonista koffeinnel, a RyR-inhibitor ruthenium reddel (RR) és a  $\text{Ca}^{2+}$ -csatorna blokkoló gadolíniummal ( $\text{Gd}^{3+}$ ) perfundáltuk. A koffein szignifikánsan csökkentette izolált humán kolon epithél sejtekben a 0,3 mM CDC által kiváltott  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -emelkedést. Erre sem a RR, sem pedig a  $\text{Gd}^{3+}$  nem volt képes. Az  $\text{IP}_3\text{R}$  gátlása azonban nem tudta teljesen kivédeni a 0,3 mM CDC-okozta  $\text{Ca}^{2+}$ -szignált, ami  $\text{Gd}^{3+}$ -inszenzitív  $\text{Ca}^{2+}$ -csatornák jelenlétére utal. A SERCA gátlása a CDC-kezelés után/közben további  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -emelkedést eredményezett, tehát a CDC valószínűleg nem üríti ki teljesen az ER  $\text{Ca}^{2+}$ -készletét. Ezekből a megfigyelésekből arra következtethetünk, hogy a CDC nemcsak az ER-ban tárolt  $\text{Ca}^{2+}$ -ot szabadítja fel, hanem az extracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlását is előidézi.

Utolsó lépésben vizsgáltuk, hogy van-e kapcsolat a 0,3 mM CDC-okozta NHE- és CBE-aktivitás csökkenés és a CDC  $\text{ATP}_i$ -re és  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -ra kifejtett hatása között. Az  $\text{ATP}_i$  glikolízis-

gátlókkal való csökkentése hasonló mértékben gátolta a humán kolon epithél sejtek NHE-aktivitását, mint ahogy az a 0,3 mM CDC-kezelésnél történt. A toxikus  $[Ca^{2+}]_i$ -emelkedés kivédése azonban nem befolyásolta a 0,3 mM CDC NHE-gátló hatását. Ez az NHE-k ATP-függésére utal, ami egybevág korábbi tanulmányok adataival, miszerint az NHE-k másodlagosan aktív transzporterek és működésükhöz ATP szükséges. Ezzel szemben az ATP<sub>i</sub> csökkentésének nem volt hatása a kolon epithél sejtek CBE-aktivitására. A 0,3 mM CDC-által okozott CBE funkciósökkenés azonban helyreállítható volt, mikor a nem-fiziológiás  $[Ca^{2+}]_i$ -emelkedést BAPTA-AM-mel megszüntettük. Ez a megfigyelés összhangban van azzal a hipotézissel, miszerint a CBE működését gátolja a toxikus  $[Ca^{2+}]_i$ -emelkedés. A CDC tehát feltehetőleg az ATP<sub>i</sub> csökkentésén keresztül gátolja a humán kolon epithél sejtek NHE-aktivitását, és toxikus  $[Ca^{2+}]_i$ -emelkedést előidézve idéz zavart a CBE funkciójában.

Eredményeink hozzájárulhatnak új, epesav-okozta hasmenés kezelésére alkalmas terápia kidolgozásához.

## **2. Az anti-TNF- $\alpha$ IFX-bal való biológiai terápia jelentősége IBD kezelésében**

Habár a biológiai terápia forradalmasította az IBD elleni harcot, az IFX kezelés során kialakuló kedvezőtlen terápiás válasz nagy kihívás a klinikusok számára. A hatásvesztés egyik leggyakoribb oka az immunogenitás következtében létrejövő antitestképződés. Az immunogenitást az IFX, az ATI és a TNF- $\alpha$  szintjének mérésével mutathatjuk ki. Konkromittáló immunmodulátor, illetve epizodikus helyett fenntartó IFX kezelés igazoltan csökkenti az antitestképződés esélyét. Bizonyított, hogy az ATI-ek csökkentik a szérum IFX szintet, fokozva ezzel az infúziós reakciók és a hatásvesztés gyakoriságát. Jelen tanulmányunkban a magasabb TNF- $\alpha$  és az alacsonyabb IFX szint is korrelált az antitest pozitivitással, bár sem az ATI, sem a szérum IFX szint nem volt hatással a kezelés kimenetelére. Ezen logikus összefüggések ellenére a klinikai tapasztalatok ellentmondóak. Chaparro és mtsai szoros összefüggést mutattak ki az anti TNF- $\alpha$  szérumszintek és a klinikai válasz hossza között. Maser és mtsai nem találtak különbséget a klinikai válasz hossza és a mérhető IFX szintek között ATI-ek jelenlététől vagy hiányától függetlenül. Néhány korábbi tanulmányban magasabb szérum IFX szint mellett hosszabb ideig tartó terápiás választ és tartósabb remissziót igazoltak. Egy japán tanulmányban azonban az IFX szérumszint nem különbözött a tartósan remisszióban levő és a hatásvesztésen átesett betegek között, felételezve a gyógyszer gyorsabb kiürülését azoknál, akiknél hatásvesztés alakul ki. Az ellentmondó eredmények miatt a szérumszintek és az antitest koncentrációk meghatározása a terápiás döntéshozatal során megkérdőjelezhető. Saját eredményeink nem támasztják alá ezek diagnosztikus szerepét a “problémás” vagyis hatásvesztő, illetve adverz reakciót mutató betegek és azok elkülönítésében, akik várhatóan jól reagálnak majd a biológiai kezelésre.



Egy friss tanulmányban az IFX szérumszint szignifikánsan magasabb, az antitest szint szignifikánsan alacsonyabb volt a konkomittáló tiopurin kezelésben részesülő betegekben. Eredményeink szerint a megelőző biológiai terápia fontosabb szerepet játszott az IFX kezelés kimenetelében, mint a konkomittáló tiopurin kezelés. Afif és mtsai tanulmányában a dózis eszkaláció jobb klinikai választ eredményezett azokban a betegekben, akiknél szubterápiás IFX szintet mutattak ki antitestképződés nélkül, míg az ATI pozitív betegekben más TNF- $\alpha$  gátlóra való váltás eredményezett jobb hatékonyságot. Korábbi vizsgálatok alapján feltételezhető, hogy a konkomittáló, illetve megelőző szteroid kezelés csökkenti a TNF- $\alpha$  antagonistá hatékonyaságát, mely megfigyelést megerősíti az is, hogy jelen tanulmányunk során magasabb szérumszint TNF- $\alpha$  szintet észleltünk a szteroid kezelésben részesülő betegekben.

Vizsgálatunkban szignifikáns összefüggést találtunk a szérumszint TNF- $\alpha$  szint, az alacsony IFX szérumszint és az ATI pozitívitás között. Az antitest pozitívitás és az alacsony szérumszint IFX szint azonban nem mutatott kapcsolatot a hatásvesztéssel, a mellékhatások, illetve allergiás reakciók kialakulásával. A megelőző IFX kezelés mellett gyakoribb volt az ATI képződés. Eredményeink alapján további prospektív tanulmányok szükségessége merül fel annak vizsgálatára, hogy a szérumszint TNF- $\alpha$ , anti TNF- $\alpha$  és az ellene termelt antitestek együttes meghatározása segíthet-e a gyulladásos bélbetegségek kritikus helyzeteinek terápiai döntéshozatalában, hiszen ezeknek a markereknek a meghatározása hozzájárulhatna a kezelés személyre szabásában és optimalizálásában.

Immunszuppresszív és/vagy biológiai terápiaiban részesülő IBD-betegek nagyobb kockázattal vannak kitéve a fertőzéseknek, így influenzának is, mivel az immunmoduláns terápia elsősorban a celluláris immunválaszt érinti, többé-kevésbé érintetlenül hagyva a humorális folyamatokat. Az ilyen kezelést kapó betegeknek ezért javasolt az influenza elleni védőoltás. A tanulmányunk második felében vizsgáltuk, hogy az influenza elleni vakcinációnak milyen hatása van a sejtszintű immunválaszra. Mértük a fenti kezelést kapott IBD-s betegek szérumszint INF- $\gamma$ , IL-2 és TNF- $\alpha$  szintjeit influenza elleni védőoltás előtt és után. Meglepő módon az IL-2 szérumszint jelentős csökkenést mutatott a vakcinálást követően. Holvast és mtsai is kimutatták, hogy a TNF- $\alpha$ - és IL-2-termelő CD4+ T sejtek előfordulása a kontrollokhöz képest alacsonyabb az influenza elleni vakcinációban részesült betegeknél. Úgy találták, az immunszuppresszív kezelés velejárója a csökkent sejtszintű immunválasz. A mi eredményeink szerint az immunszuppresszív terápia kapó betegeknek ajánlott az influenza elleni vakcináció. Egy részletesebb és nagyobb vizsgálat szükséges azonban az immunmoduláns gyógyszereket szedő betegek sejtes immunválaszának pontosabb meghatározásához és az influenza-elleni védőoltás hatékonyságának felméréséhez.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani a PhD dolgozatomhoz szükséges munkában közreműködő és segítséget nyújtó személyeknek.

Hálával tartozom **Prof. Dr. Ábrahám Györgynek** és **Prof. Dr. Wittmann Tibornak**, az I.sz. Belgyógyászati Klinika jelenlegi és korábbi tanszékvezetőinek, valamint **Prof. Dr. Varró Andrásnak**, a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet vezetőjének, hogy lehetőséget kaptam arra, hogy az általuk igazgatott intézetekben dolgozhassak.

Köszönöm témavezetőim, **Prof. Dr. Hegyi Péter** és **Prof. Dr. Molnár Tamás** folyamatos támogatását és értékes javaslatait, melyek alapvető mértékben hozzájárultak a dolgozat, illetve a tudományos közlemények megszületéséhez. Hálámat fejezem ki továbbá **Prof. Dr. Nagy Ferencnek** és **ifj. Dr. Rakonczay Zoltánnak**, iránymutató tanácsaikért, és hogy a munkám során felmerülő kérdéseimmel hozzájuk is mindig fordulhattam.

Külön köszönet illeti **Dr. Farkas Klaudiát** és **Dr. Maléth Józsefet**, hogy értékes idejükből gyakran áldoztak rám. A segítségnyújtás fogalmát maximálisan kimerítve, végtelen türelemmel, földrajzi távolsággal és időeltolódással nem törődve nélkülözhetetlen tanácsokkal láttak el, doktori értekezésem megszületéséhez szakmai útmutatást és lelki támogatást nyújtottak. Nélkülük ez a disszertáció sosem jöhetett volna létre.

Szeretném kifejezni hálámat továbbá az I.sz. Belgyógyászati Klinika **gasztroenterológusainak** és **endoszkópos asszisztenseinek**, hogy a kutatáshoz nélkülözhetetlen biopsziás mintákat szolgáltatottak nekem.

Köszönettel tartozom a **sejtélettani kutatólaboratórium** minden munkatársának, hogy technikai segítséget és baráti támogatást nyújtottak PhD-hallgató éveim alatt. Önzetlen segítségüket sosem fogom elfelejteni.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm családom odaadó szeretetét és folyamatos támogatását.