



Budapest, 2019

Köszöntő

Tisztelt Kollégák!

Nagy öröm számunkra, hogy ismét megrendezhetjük az Áramlási Citometria Napot!

Az elmúlt évben megtartott I. Áramlási Citometria Napot nagy érdeklődés övezte. A résztvevők közül sokan jelezték, hogy örülnek annak, hogy ezt a rendezvényt életre hívtuk, mert szükség van egy alkalomra, ahol a szakma ifjabb és tapasztaltabb tagjai találkozhatnak, eszmét cserélhetnek. Már ekkor kérdezték páran, hogy lesz-e folytatás? Mi bízunk benne, hogy igen, megmarad az érdeklődés, és talán ezzel majd egyfajta hagyományt is teremthetünk. Nagy örömünkre, az idei rendezvényünkre is sok előadás és poszter absztrakt érkezett. Ezek a prezentációk gazdagítják a tudásunkat és szélesítik látókörüket. Reméljük, hogy idén is értékes tapasztalatokkal gazdagodva távozik mindenki a rendezvény végén.

Köszönjük a támogató cégek segítségét, akik nélkül ez a találkozó nem jöhetett volna létre!

Minden résztvevőnek élményekben és tapasztalatokban gazdag találkozót kíván a szervezők nevében:

dr. Barna Gábor
tudományos főmunkatárs
SE I.sz. Patológiai és Kísérleti
Rákkutató Intézet

Program

8 ⁴⁵	REGISZTRÁCIÓ
9 ¹⁵	KÖSZÖNTŐ
9 ²⁰ -11 ⁰⁰	HEMATOLÓGIA CITOMETRIÁS SZEMMEL
	E1. Mastocyták detektálása áramlási citometriával. <i>Kárai Bettina</i> (DE, ÁOK, Laboratóriumi Medicina Intézet)
	E2. Immunfenotípus és aneuploiditás együttes vizsgálata áramlási citometriával gyermekkori akut limfoid leukémiák diagnosztikájában. <i>Jáksó Pál</i> (PTE, KK, Patológiai Intézet)
	E3. Plazmasejt alpopulációk vizsgálata plazmasejtes mielómában. <i>Szalóki Gábor</i> (SE, ÁOK, I sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet)
	E4. HLA-B27 meghatározás áramlási citometriai és genetikai tipizálási adatainak összehasonlítása. <i>Baráth Sándor</i> (DE, ÁOK, Laboratóriumi Medicina Intézet)
	E5. Fenotípus változás krónikus lymphocytás leukémia sejtekben célzott kezelések során. <i>Takács Ferenc</i> (SE, ÁOK, I sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet)
11 ⁰⁰ -11 ²⁰	KÁVÉSÜNET
11 ²⁰ -13 ⁰⁰	CITOMETRIA AZ ONKOLÓGIA SZOLGÁLATÁBAN
	E6. Háromdimenziós versus <i>in vivo</i> adenokarcinóma modellek egysejt tömeg citometriás jellemzése. <i>Balog József Ágoston</i> (SZBK, Funkcionális Genomika Laboratórium)
	E7. Intratumor heterogenitás vizsgálata egysejt tömeg citometriával. <i>Neuperger Patricia</i> (SZBK, Funkcionális Genomika Laboratórium)
	E8. Az egér nyirokcsomó stromális összetétel áramlási citometriás meghatározásának validálása. <i>Gábris Fanni</i> (PTE, KK Immunológiai és Biotechnológiai Intézet és SzKK Nyirokszövet Fejlődésbíológiai Munkacsoport)
	E9. A lenalidomide hatása a csontvelői stróma sejtekre krónikus lymphocytás leukémiában. <i>Barna Gábor</i> (SE, ÁOK, I sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet)
	E10. Extracelluláris vezikulák hatásmechanizmusának idő és dózisfüggése a sugárzás szomszédsági hatásában. <i>Kis Dávid</i> (Nemzeti Népegészségügyi Központ, Sugárbiológiai és Sugáregészségügyi Főosztály, Sugárorvostani Osztály)
13 ⁰⁰ -13 ⁴⁵	EBÉD
13 ⁴⁵ -15 ¹⁵	HEMATOLÓGIAI KERÉKASZTAL (GYERMEKKORI LEUKÉMIÁK VIZSGÁLATA)/POSZTER SZEKCIÓ
15 ¹⁵ -16 ⁰⁰	CÉGES BEMUTATÓK
	E11. Sony LE-SH800 kollineáris áramlási citométer és szorter – az első év tapasztalatai. <i>Komlósi Zsolt</i> (SE, ÁOK, Genetikai Intézet)
	E12. Beckman Coulter újdonságok: új generációs multikolor panelek és adatelemzés. <i>Sinkó Emese</i> (Bio-Science Kft.)
	E13. Breaking sensitivity limits in both research and clinical cytometry. <i>Jozef Janda</i> (Charles University in Prague, Czech Republic)
16 ¹⁵	ZÁRSZÓ, POSZTER DÍJAK ÁTADÁSA

Előadás absztraktok

E1. Mastocyták detektálása áramlási citometriával

Bettina Kárai¹, Sarolta Monár², Judit Bedekovics², János Kappelmayer¹, Zsuzsanna Hevessy¹

¹Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Laboratóriumi Medicina Intézet,

² Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Patológia Intézet

Bevezetés: A mastocyták százalékanak emelkedése a csontvelőben hasznos diagnosztikai jel lehet a myeloid malignitások esetében. Ezért egyrészt azt tűztük ki célul, hogy megvizsgáljuk, hogyan lehet a mastocytákat a legnagyobb hatékonysággal detektálni áramlási citometriai módszerrel; másrészt, mivel a mastocyták számos biológiai folyamatban - köztük a fibrosis esetében is - fontos szerepet töltenek be, így egy további célunk volt, hogy megvizsgáljuk a mastocytá százaléka és a fibrosis mértéke közötti összefüggést.

Módszerek: Hét beteg esetében párhuzamosan vizsgáltuk a mastocyták százalékát a K₃-EDTA-val és Na-heparinnal alvadásgátolt aspirációval vett csontvelői mintából mintavételt követően, valamint 24 és 48 óra eltelte után. Továbbá összevetettük 35 beteg esetében a csontvelői aspirációval nyert csontvelői mintából áramlási citometriai módszerrel mért mastocytá százalékot ugyanazon beteg csontvelői biopsziás mintájából immunhisztokémiával meghatározott mastocytá százalékával és ezüst festéssel megállapított fibrosis mértékével.

Eredmények: A mastocyták százaléka szignifikánsan magasabb volt a K₃-EDTA-val alvadásgátolt mintában, nemcsak a mintavételt követő mérés esetén, hanem 24 és 48 óra eltelte utáni meghatározáskor is ($p=0.03$, $p=0.016$, $p=0.047$). A késői mintafeldolgozás nem volt hatással a mastocyták százalékára. A mastocyták CD117 expressziójának intenzitását nem befolyásolta az alvadásgátló típusa. Az ezüst festés alapján a betegeket az alábbi csoportokba lehetett osztani: MF-0 ($n=6$), MF-1 ($n=20$), MF-2 ($n=8$), és MF-3 ($n=1$). A mastocyták triptáz, valamint CD117 immunhisztokémiai módszerrel és áramlási citometriával meghatározott százalékos értéke egymással jól korrelált ($r=0.41$, $p=0.016$ és $r=0.38$, $p=0.028$). Korrelációt lehetett megfigyelni a fibrosis mértéke és a mastocyták áramlási citometriával meghatározott százaléka között is ($r=0.48$, $p=0.04$).

Következtetés: A mastocyták detektálására a K₃-EDTA-val alvadásgátolt csontvelői minta a legalkalmasabb. A Na-heparinnal alvadásgátolt mintában talált alacsonyabb mastocytá arány háttérben nem a mastocyták kapuzásáért felelős marker (CD117) expressziójának változása állt. A mastocyták emelkedettebb százalékát találtuk előrehaladottabb stádiumú fibrotikus állapotoknál, mely felveti annak lehetőségét, hogy a mastocytáknak valamilyen szerepe lehet a fibrosis kialakulásában.

E2. Immunfenotípus és aneuploiditás együttes vizsgálata áramlási citometriával gyermekkori akut limfoid leukémiák diagnosztikájában

Jáksó Pál, Kajtár Béla, Kereskai László, Vida Livia

PTE, KK, Patológiai Intézet

A gyermekkori akut limfoid leukémiák (p-ALL) diagnosztikájának alapvető eszköze a leukémiás sejtek immunfenotípusának megállapítása. Az immunfenotípus segít a leukémia klasszifikációjában, illetve nagyon fontos szerepe van a kezelés során a minimális reziduális betegség (MRD) meghatározásában. Az immunfenotípus mellett a diagnosztikai protokoll része a leukémiás sejtek DNS tartalmának meghatározása, melynek prognosztikai jelentősége van. Mostanáig nem volt olyan, könnyen és rutinszerűen alkalmazható DNS festési eljárás, amely az immunfenotípezálással együtt használható lett volna. Gupta és munkatársai 2019. februárban publikált tanulmányában mutatták be az FxCycle Violet DNS festéket, amellyel egyszerűen tudtak immunfenotípust és aneuploiditást vizsgálni. Ezzel lehetőség nyílt az aneuploiditás MRD vizsgálatokba történő bevonására, ami nagyban megkönnyítheti az MRD sejtek azonosítását és kifejezetten hasznos lehet olyan esetekben, amikor az immunfenotípus nem egyértelmű, vagy jelentős hematogónium háttér van jelen. Az előadásban bemutatjuk, hogy az FxCycle Violet DNS festék segítségével és arra alkalmas áramlási citométerrel rutinszerűen végezhető 8-színű immunfenotípus meghatározás DNS tartalom méréssel párhuzamosan. Továbbá bemutatásra kerülnek olyan p-ALL esetek, amelyek jól demonstrálják, hogy az aneuploid esetekben milyen fontos lehet a DNS tartalom vizsgálata az MRD vizsgálatokban is.

E3. Plazmasejt alpopulációk vizsgálata plazmasejtes mielómában

Szalóki Gábor, Czeti Ágnes, Takács Ferenc, Matolcsy András, Barna Gábor

Semmelweis Egyetem, ÁOK, I sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Budapest

Bevezetés: A plazmasejtes mielóma a B-sejt differenciáció legvégső fázisát reprezentáló plazmasejtek rosszindulatú, gyógyíthatatlan daganatos megbetegedése. A betegség diagnosztikájában, illetve a kezelés során a remisszió-relapszus státusz meghatározásában, a citológiai és molekuláris genetikai vizsgálatok mellett, kulcsfontosságú a beteg csontvelő aspirátumának áramlási citometriai vizsgálata. A módszer alkalmas a kezelés után visszamaradó tumorsejtek (mérhető reziduális betegség, MRD) 10^{-4} érzékenységgű detektálására, viszont a mérést nehezítheti, hogy a kezelés következtében megváltozhat a reziduális tumorsejtek immunfenotípusa, immunterápia során az ellenanyag elfedhet epitópokat. Emiatt fokozott az igény olyan új markerekre, melyek segítenek elkülöníteni a plazmasejteket a többi csontvelői sejttől. A VS38c egy monoklonális ellenanyag, mely az endoplazmatikus retikulum (ER) membránjában lévő CLIMP-63 (CKAP4) fehérjéhez kötődik. Mivel a szakirodalom szerint a CLIMP-63 mennyisége jelentősen magasabb a plazmasejtekben a többi csontvelői sejthez képest, egyéb intracelluláris jelöléssel együtt alkalmazva, a VS38c alkalmas lehet ezek elkülönítésére.

Célkütyzés: Kíváncsiak voltunk arra, hogy a VS38c egységesen jelöli-e a plazmasejteket, kimutatható-e valamilyen különbség a normál és kóros plazmasejtek jelölődése között, illetve vannak-e olyan VS38c-vel detektálható eltérések a kóros plazmasejtek között, melyeknek prognosztikus jelentőségük lehet.

Módszerek: Száztíz plazmasejtes mielómával diagnosztizált beteg csontvelő mintáját jelöltük az általánosan használt plazmasejt markerek mellett VS38c ellenanyaggal, és mértük a jelölődés intenzitását. Emellett vizsgáltuk, hogyan változtatja meg a jelölődő plazmasejtek arányát, illetve a jelölés intenzitását, ha különböző típusú vagy koncentrációjú permeabilizáló ágenszt használunk.

Eredmények: Méréseink során úgy találtuk, hogy a mind a normál plazmasejtek, mind a mielómasejtek heterogénen jelölődnek VS38c ellenanyaggal. Általában elkülöníthető egy granulocitákhoz hasonló intenzitású VS38c^{dim} és egy intenzíven jelölődő VS38c^{br} alpopuláció. Bár a sejtek jelölődése variábilis, a kóros mielómasejtek között a VS38c^{br} alpopuláció mérete csökkent a normál sejtekben találhatóéhoz képest Végstádiumban és néhány plazmasejtes leukémia esetében ez a VS38c^{br} populáció teljesen eltűnt. Ugyanazokat a mintákat magasabb koncentrációjú permeabilizáló ágenssel kezelve nyilvánvalóvá vált, hogy az alpopuláció megjelenése nem expressziós különbség eredménye, hanem az eltérő ER permeabilizálhatóságból fakadt. Ekkor minden mielómasejt intenzíven jelölődött. Ez alól kivételt képezett néhány plazmasejtes leukémias eset, melyeknél valóban csökkent a CLIMP-63 mennyisége.

Következtetések: A betegség progressziója során olyan változások történnek a mielómasejtek membránstruktúrájában, melyek nehezebben permeabilizálhatóvá teszik az ER-t. A VS38c ellenanyaggal elkülöníthetjük ezeket a sejteket, mely a jövőben lehetőséget teremt a tumorevolúció vizsgálatára, és új prognosztikus faktorként azonosítására. Emellett kiderült, hogy nem minden esetben használható a VS38c a plazmasejtek jelölésére, plazmasejtes leukémiában drasztikusan csökkenhet a fehérje mennyisége.

E4. HLA-B27 meghatározás áramlási citometriai és genetikai tipizálási adatainak összehasonlítása

Baráth Sándor, Mezei Zoltán, Szatmári Mónika, Kappelmayer János, Hevessy Zsuzsanna

Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Laboratóriumi Medicina Intézet

Bevezetés: A HLA-B27 molekula jelenléte szoros összefüggést mutat különböző gyulladásos ízületi betegségekkel. Kimutatására az áramlási citometria rendkívül gyors és gazdaságos módszer, azonban bizonyos antitest klónok alkalmazása esetén specifitása jelentősen elmarad a genetikai vizsgálatokétól.

Célkitűzés: Ezért az egyes HLA-B27 antigén meghatározására szolgáló áramlási citometriás módszerek összehasonlítását, valamint az eredmények molekuláris genetikai vizsgálattal történő megerősítését tűztük ki célunknak.

Módszerek: Munkánk során $n=52$, a Debreceni Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézetében HLA-B27 vizsgálatra beküldött személy mintáját vizsgáltuk meg. Az áramlási citometriai vizsgálatok során a DuraClone B27 Reagens Kit eredményeit összevetettük az anti-HLA-B27 (ABCM3 klón) antitesttel, valamint egy alternatív epitóp elleni anti-HLA-B27 antitesttel (FD705 klón) történő jelölés során kapott eredményekkel, majd ezen eredményeket genotipizálással, a GenoVision cég Olerup HLA-B*27 – unit dose kit-jének a felhasználásával ellenőriztük.

Eredmények: Az áramlási citometriai módszerek esetén a szenzitivitás értéke 1,0-nek adódott. Azaz, ha a beteg HLA-B27 pozitív, az áramlási citometriai módszerrel egyértelműen kimutatható. Azonban az egyes módszerek specifitásában jelentős különbségek mutatkoztak. Az ABCM3 klónnal történő kimutatás specifitása csak 0,25, az alternatív epitóppal (FD705) történő jelölés specifitása 0,63, a DuraClone B27 Reagens Kit esetén a specifitás 0,93. Azaz a három módszer közül ez utóbbi esetben kaptuk a legkevesebb fals pozitív eredményt.

Következtetés: A genetikai háttér ismeretében az eredmények alapján elmondható, hogy az áramlási citometriai módszerek esetében a több antitesttel történő szimultán jelölés (DuraClone B27 Reagens Kit), a specifikusabb sejtpopuláción (jelen esetben T sejteken) történő vizsgálat és a kalibrációt segítő kontroll gyöngyök használata megbízhatóbb HLA-B27 eredményeket szolgáltat.

E5. Fenotípus változás krónikus lymphocytás leukémia sejtekben célzott kezelések során

Takács Ferenc¹, Czeti Ágnes¹, Szalóki Gábor¹, Aczél Dóra², Kardos Ilona¹, Masszi András³,
Farkas Péter³, Varga Gergely³, Mikala Gábor⁴, Gaál-Weisinger Júlia⁵, Bődör Csaba², Barna
Gábor¹

¹Áramlási Citometria Labor Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Budapest

²MTA-SE Lendület Molekuláris Onkohematológia Kutatócsoport, I. sz Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Semmelweis Egyetem, Budapest

³Semmelweis Egyetem III. sz. Belgyógyászati Klinika, Budapest

⁴Dél-Pesti Centrumkórház- Országos Hematológiai és Infektológiai Intézet Budapest

⁵Semmelweis Egyetem I. sz. Belgyógyászati Klinika, Budapest

Bevezetés: A krónikus limfoid leukémia (CLL) a leggyakoribb felnőttkori leukémia a fejlett országokban. A CLL egy indolens lefolyású, biológiai heterogén tulajdonságú betegség. A hagyományos kemo-immuno kezelés mellett az elmúlt években új, célzott terápiás készítmények jelentek meg a betegség kezelésében. Ilyen a Bruton-tirozin kináz gátló Ibrutinib, és a Bcl-2 gátló Venetoclax. Ezeknek az új, innovatív gyógyszereknek a hatására a relabált, vagy a kemo-immunoterápiára refrakter betegek túlélése is jelentősen javult.

Céltűzés: Kutatásunk során célul tűztük ki, hogy vizsgáljuk az Ibrutinib és Venetoclax kezelés során hogyan alakul a CLL sejtek fenotípusa, és a kapott eredményt összevesszük nem kezelt és ismerten Ibrutinib rezisztens CLL-es betegek eredményeivel. Ezen kívül párosított mintákban vizsgáljuk, hogy kezelés hatására a főbb jelátviteli útvonalakban történik-e változás.

Anyag és módszer: Kutatásunk során Ibrutinib (n=25) kezelt betegek követéses mintáit hasonlítottuk össze nem kezelt (n=10) és ismerten Ibrutinib rezisztens (n=6) betegek mintáival, továbbá vizsgáltuk Venetoclax kezelt betegek (n=6) esetében létrejövő fenotípus változást. Perifériás vérmintákból határoztuk meg áramlási citometria módszerrel a CLL prognózisa, illetve mikrokörnyezeti interakciójában fontos szerepet játszó sejtfelszíni molekulák (CD49d, CD38, CD69, CD184, CD86, CD27, CD185) expresszióját. A méréseket Navios (Beckman Coulter) áramlási citométeren végeztük. A jelátviteli utak tanulmányozásához protein foszforilációs arrayt alkalmaztunk (R&D Systems) klinikailag rezisztensek tűnő, illetve 6 hónapja vagy 1 éve kezelést kapó betegeken (n=6).

Eredmények: A CD86 molekula expressziója mind a kezelés előtt álló, mind az Ibrutinib rezisztens betegekben szignifikánsan magasabb volt ($p < 0,05$), mint a kontroll minták esetében. Azonban ez a két csoport nem különbözött szignifikánsan egymástól ($p > 0,05$). Ibrutinib kezelés hatására a CD49d expresszió szempontjából jó prognózisú csoportban ennek a molekulának az expressziója növekedett, míg a rossz prognózisú csoportban egyes esetekben csökkent az expresszió, és megjelentek bipopulációs esetek is. A többi vizsgált sejtfelszíni marker közül a CD27-nek csökkent, a CD38-nak nőtt, míg a CD69, CD184 és a CD185 expressziója heterogén módon változott a kezelés hatására. A CD69 esetében azonban több esetben bipopulációs megjelenést tapasztaltunk. A vizsgált fehérjék közül a CREB expressziója a hatból öt esetben jelentősen csökkent, míg egy esetben változatlan maradt. Venetoclax kezelés hatására a CD69, CD184 expressziója csökkent, míg a CD27-é nőtt. A CD49d, CD86, CD38, CD185 expressziója heterogén módon változott. Továbbá, Venetoclax kezelésnél a CD69 mellett a CD49d esetében is több esetben bipopulációs eloszlást tapasztaltunk.

Összefoglalás: Kutatásunk során több általunk vizsgált markernél tapasztaltunk expresszióváltozást, valamint a korábbiál eltérő fenotípusú populációk megjelenését. A követett betegek közül több betegnél progresszió lépett fel a kezelés alatt. Ez azt sugallja, hogy a fenotípus vizsgálata előre jelezheti a betegség kezelésre történő reakcióját.

E6. Háromdimenziós versus *in vivo* adenokarcinóma modellek egysejt tömeg citometriás jellemzése

Balog József Ágoston^{1,2}, Alföldi Róbert^{2,3}, Fehér Liliana⁴, Faragó Nóra^{4,5}, Kotogány Edit¹, Nagy Lajos⁴, Puskás László^{1,4} és Szebeni Gábor János^{1,6}

¹ Funkcionális Genomika Laboratórium, SZBK, Temesvári krt. 62. Szeged

² SZTE Biológia Doktori Iskola, Közép fasor 52., Szeged

³ AstridBio Technologies Kft., Also kikötő sor 11/D, Szeged

⁴ Avicor Kft., Also kikötő sor 11/D, Szeged

⁵ Agykérgei Neuronhálózatok Kutatócsoport, Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék, Szegedi Tudományegyetem, Közép fasor 52, Szeged

⁶ Fiziológiai és GLP Toxikológiai Labor, Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék, Szegedi Tudományegyetem, Közép fasor 52, Szeged

Az innovatív 3-dimenziós (3D) sejtenyésztő módszerekkel kombinált egysejt szintű genomikai és proteomikai vizsgálatok, lehetőséget adnak az intratumor heterogenitás mélyebb szintű megértésére. Egysejt tömeg citometria segítségével, különböző *in vitro* 3D (gyöngy alapú, kollagénbe ágyazott vagy mátrix mentes) sejt kultúrákat és *in vivo* tüdő tumorokat hasonlítottunk a standard sejtenyésztő edényes 2-dimenziós modellhez (2D). Életképesség, proliferáció, és sejtciklus méréseket is végeztünk. Génexpressziós analízis során a 3D tenyészetekben a TMEM45A, SLC16A3, CD66, SLC2A1, CA9 és CD24 gének magasabb expressziót mutattak; míg az EGFR represszálódott a 2D-hez képest. Klinikai relevanciájuk miatt a TRA-1-60, pan-keratin, CD326, Galectin-3 és CD274 markereket is vizsgáltuk egysejt szinten. Az említett 12 marker egyedi mintázatot mutatott a 3D és *in vivo* A549 tüdő tumor mintákon. A multidimenzionális egysejt proteomikai vizsgálatok rávilágítottak, hogy a 3D kultúrák expressziós intenzitást tekintve átmenetet képeznek a 2D kultúrák és az *in vivo* modellek között. Éppen ezért hatóanyag vizsgálatokra a 3D nem kissejtes tüdőrák tenyészetek használata indokolt a hagyományos sejtenyésztő edényes kultúrákkal szemben.

Forrás: 2017-1.3.1-VKE-2017-00028 (Avicor Kft) and GINOP-2.3.2-15-2016-00001 (SZBK). Bolyai János Kutatási Ösztöndíj (BO/00139/17/8, SzGJ) és az Innovációs és Technológiai Minisztérium UNKP-19-4-SZTE-36 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának szakmai támogatásával készült (SzGJ).”

E7. Intratumor heterogenitás vizsgálata egysejt tömeg citometriával

Neuperger Patricia^{1,2}, Balog József Ágoston^{1,2}, Furák József³, Tiszlavicz László⁴, Szalontai Klára⁵, Mán Imola⁶, Kotogány Edit¹, Puskás László^{1,6} és Szebeni Gábor János^{1,7}

¹ Funkcionális Genomika Laboratórium, Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Temesvári krt. 62., Szeged

² SZTE Biológia Doktori Iskola, Közép fasor 52., Szeged

³ SZTE Sebészeti Klinika, Mellkassebészeti Osztály, Semmelweis u. 8., Szeged

⁴ SZTE Patológiai Intézet, Állomás u. 2., Szeged

⁵ Csongrád Megyei Mellkasi Betegek Szakkórháza, Alkotmány u. 36., Deszk

⁶ Avicor Kft. Alsó kikötő sor 11/D., Szeged

⁷ Fiziológiai és GLP Toxikológiai Labor, Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék, Szegedi Tudományegyetem, Közép fasor 52., Szeged

Világszerte az egyik vezető elhalálozási ok a rák, különösképpen a tüdőrák a magas mortalitási rátája miatt. A tüdőrákok nagy hányadát a nem-kissejtes tüdőrák teszi ki, ezen belül az adenokarcinóma. Mivel a tumoros sejtek szubpopulációi más fenotípust mutathatnak, az intratumor heterogenitás a kezeléseket nagymértékben megnehezíti.

Szubletális koncentrációjú hidroxüüreával elvégeztük a humán A549, H1975 és H1650 adenokarcinóma sejtvonalak szinkronizálását, ezzel kizárva a sejtvonalak sejtciklusbeli különbségéből adódó heterogenitást. A heterogén fehérje expressziós mintázatok vizsgálatát egysejt tömeg citométeren végeztük, 14 tumor marker egy mintából történő mérésével. A tömeg citométer fémizotópokkal konjugált antitestek segítségével spektrális átfedések nélküli multiplex analízisre képes egysejt szinten. A jelölő izotópoknak alacsony a természetes abundanciája biológiai rendszerekben, emiatt nem interferál az egysejt analízissel. Az inter- és intratumor heterogenitás ábrázolása sokdimenziós viSNE analízissel történt.

A szinkronizálás ellenére, a vizsgált 14 marker (GLUT1, MCT4, CA9, TMEM45A, CD66, CD274 (PD-L1), CD24, CD326 (EpCAM), Pan-Keratin, TRA-1-60, HLA-A,B,C, Galectin-3, Galectin-1, EGFR) eloszlása egyaránt sejtvonalakon belüli és sejtvonalak közötti heterogén mintázatot mutatott. Humán primer adenokarcinóma és a hozzájuk tartozó egészséges tüdőszöveteken is elvégeztük a vizsgálatot. Egyes markerek expressziója szignifikánsan emelkedett volt a tumorokban külön-külön az egészséges tüdő szövetéhez képest: GLUT1: 53.61% vs 4.84%, MCT4: 67.27% vs 6.08%, CA9: 40.37% vs 3.59%, TMEM45A 61.12% vs 5.57%.

Adataink alátámasztják, hogy a nem-kissejtes tüdő ráksejtek heterogenitása független a különböző sejtciklus fázisoktól. Továbbá egysejt felbontással fehérje szinten kimutattuk, hogy primer adenokarcinómában a GLUT1, MCT4, CA9, TMEM45A magasabb expressziót mutat a normál tüdő szövetéhez képest.

Forrás: 2017-1.3.1-VKE-2017-00028 (Avicor Kft) and GINOP-2.3.2-15-2016-00001 (SZBK). Bolyai János Kutatási Ösztöndíj (BO/00139/17/8, SzGJ) és az Innovációs és Technológiai Minisztérium UNKP-19-4-SZTE-36 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának szakmai támogatásával készült (SzGJ).”

E8. Az egér nyirokcsomó stromális összetétel áramlási citometriás meghatározásának validálása

Gábris Fanni, Jia Xinkai, Kellermayer Zoltán és Balogh Péter

KK Immunológiai és Biotechnológiai Intézet és SzKK Nyirokszövet Fejlesztésbőlógiai Munkacsoport, Pécsi Tudományegyetem

Bevezetés: Bár a stromális sejtek a nyirokcsomó kis részét képviselik, fontos szerepet játszanak az emlősök immunológiai funkcióinak fenntartásában. Ezek mennyiségi analiziséhez szakirodalom szerint a retikuláris fibroblaszt sejteket (FRC) és a limfatikus endotél sejteket (LEC) kötő anti-podoplanin/gp38 antitestet kombináltuk a LEC és vér-endotél (BEC) sejteket felismerő anti-CD31 antitesttel. Célunk ezen jelölés laboratóriumi optimalizálása, valamint eGFP vagy sejtfelszíni antigén-expresszió alapján azonosítható stroma-sejt reaktivitás-mintázat alapján végzett validálása volt. Ehhez eGFP-expresszálo és a CD90/Thy-1 allotípusban különböző állatokkal kialakított csontvelő-kimérákat, illetve LEC-specifikus eGFP kifejeződést mutató transzgenikus egereket használtunk.

Anyag és módszer: Fiatal felnőtt BALB/c egerek nyirokcsomóit liberáz/DNáz emésztésnek vetettük alá, majd az így kapott sejteket anti-gp38/anti-CD31 antitesttel jelöltük. Anti-CD45 antitesttel és 7-AAD-val azonosítottuk a fehérvérsejteket és elpusztult sejteket. A kiméra vizsgálatokhoz besugárzott eGFP Tg BALB/c egerekbe vad típusú BALB/c egerekből származó csontvelőt transzplantáltunk (pán-stróma eGFP), illetve az FRC jelöléséhez Thy-1.1 allotípusú donor csontvelővel rekonstruált Thy-1.2 recipienseket és anti-Thy-1.2 antitestet használtunk. A LEC gp38+/CD31+ fenotípus validálásához Prox1^{eGFP} egereket vizsgáltunk.

Eredmények: A gp38/CD31 jelölést és a CD45/7-AAD kizárást használva reprodukálható módon azonosítottuk a LEC, BEC és FRC sejtcsoportokat vad típusú BALB/c és C57Bl/6J egerekben. A BALB/c → eGFP Tg kiméra mintákban a stróma komponensek hasonló FRC/LEC/BEC alcsoport-összetételt mutattak a recipiens nyirokcsomó eGFP+/CD45- stróma frakciójában is. Azt is kimutattuk, hogy a Thy-1.2 marker a Thy-1.1→Thy-1.2 kimérákban csak a gp38+/CD31- FRC sejteken volt jelen, míg a Prox-1^{eGFP} egerekben csak a gp38+/CD31- LEC frakcióban mértünk eGFP jelet. Alapján sikerült a stróma- A fenti kísérleti elrendezést az egyes alpopulációk sejtfelszíni anti-VCAM-1 és anti-ICAM-1 festésével is ki tudtuk egészíteni.

Összefoglalás: Vizsgálatainkban sikerült az egér nyirokcsomók stroma-komponenseinek kvantitatív analizisére alkalmas eljárást optimalizálnunk, amiben további lehetőség nyílik egyéb stromális markerek meghatározása lévén a nem-hemopoetikus összetevők részletesebb vizsgálatára és alcsoportjaik elkülönítésére.

E9. A lenalidomide hatása a csontvelői stróma sejtekre krónikus lymphocytás leukémiában

Barna Gábor¹, Tolnai-Kriston Csilla¹, Plander Márk², Hernádfői Márk¹, Szalóki Gábor¹, Takács Ferenc¹, Czeti Ágnes¹, Szabó Orsolya¹, Matolcsy András¹

¹I.sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Semmelweis Egyetem, Budapest

²Markusovszky Egyetemi Oktató Kórház, Hematológiai Osztály, Szombathely

Bevezetés: A krónikus lymphocytás leukémiára (CLL) jellemző a CD5+ CD23+ B-sejtek felszaporodása a perifériás vérben, csontvelőben és a másodlagos nyirokszövetekben. A CLL patogenezisében jelentős szerepe van a csontvelői és nyirokcsomói mikrokörnyezetnek, amelyek által termelt faktorok megakadályoz-zák a tumorsejtek apoptózisát és elősegítik azok proliferációját. A mikrokörnyezet ezenfelül részt vesz a drog rezisztencia kialakulásában mind a hagyományos immunoterápiás (pl. fludarabin, rituximab), mind célzott terápiás szerek (pl. ibrutinib, venetoclax) esetén is. A lenalidomide, egy második generációs ImiD, immunmoduláló és antiproliferációs hatással bír CLL esetén. A T- és NK-sejtek aktivitását növeli és az endotéliumra is hatással van. Viszont arról nincs adat, hogy csontvelői stróma sejtekre, melyek számos túlélési faktort termelnek, milyen hatással van.

Célkitűzések: Vizsgálatainkban arra kerestük a választ, hogy a lenalidomide hogyan befolyásolja a csontvelői stróma sejtek védőhatását CLL esetén.

Módszerek: 16 CLL-es beteg perifériás vérmintájából izolált tumorsejteket tenyésztettünk 7 napig önmagukban vagy csontvelői stróma sejtekkel együtt és kezeltük őket különböző koncentrációjú lenalidomide-dal. Ezután mértük az apoptózis mértékét, meghatároztuk a sejtek immunfenotípusát és a stróma sejtek citokin termelését áramlási citometriával.

Eredmények: A lenalidomide kis mértékben növelte a CLL sejtek apoptózisát. A stróma sejtek csökkentették a CLL sejtek apoptózisát, míg a lenalidomide ezt a védő hatást blokkolta koncentrációfüggő módon. Összehasonlítottuk a CD49d pozitív és CD49d negatív CLL esetek apoptózisának mértékét. A CD49d negatív esetek érzékenyebbek voltak a lenalidomide apoptózis indukáló hatására. Kiderült, hogy ezen esetekben a sejtek IRF4 expressziója magasabb, mint a CD49d pozitív mintákban. A CLL sejtek immunfenotípusa lenalidomide hatására megváltozott: a CD5, a CD19, a CD49d és a CD44 expressziója csökkent, míg a CD86 expressziója nőtt. Ezzel a lenalidomide ellensúlyozza a stróma sejtek immunmoduláló hatását. A CD49d negatív esetek ebben az esetben is érzékenyebbek voltak a lenalidomide hatására. A stróma sejtek citokin termelését vizsgálva nem tudtunk változást kimutatni.

Konklúzió: Az eredményeink alapján elmondható, hogy a lenalidomide inkább a CLL sejtekre van hatással, mint a stróma sejtekre. A lenalidomide megváltoztatja a CLL sejtek fenotípusát és valószínűleg a jelátviteli rendszerét is úgy, hogy a stróma sejtek védő hatása kevésbé érvényesül. Kimutattuk, hogy a CD49d negatív CLL-es esetek érzékenyebbek a lenalidomide hatására, ami az emelkedett IRF4 expressziójuk miatt lehetséges.

E10. Extracelluláris vezikulák hatásmechanizmusának idő és dóziszfüggése a sugárzás szomszédsági hatásában

Kis Dávid, Persa Eszter, Szatmári Tünde, Sándor Nikolett, Hargitai Rita, Kis Enikő, Sáfrány Géza, Lumniczky Katalin

Nemzeti Népegészségügyi Központ, Sugárbiológiai és Sugáregészségügyi Főosztály, Sugárorvostani Osztály

A sugárbiológia napjaink egyik legaktívabban kutatott területe a szomszédsági hatások vizsgálata. Szomszédsági (bystander) sugárhatásnak nevezzük, ha olyan sejtekben is megnyilvánul sugárhatás, amelyeket közvetlen sugárzás nem ért. Az utóbbi években több *in vitro* kutatás is tudományosan bizonyította, hogy ez a hatás a sejtek közötti kommunikáció révén valósul meg, azonban az erre irányuló komplexebb *in vivo* kutatások még hiányosak. Az extracelluláris vezikulák (EVk) olyan membránnal határolt struktúrák, amelyeknek a komplex tartalma (nukleinsav, fehérje, lipid) alkalmassá teszi őket a sejtek közötti kommunikációra.

Kísérletünkben *in vivo* modellt alkottunk meg, amelyben besugarazott C57Bl/6 egerekből származó csontvelő eredetű EVk hatásait vizsgáltuk egészséges egerekben. A kis- és nagy dózisu ionizáló sugárzás után 4 órával, 24 órával és 3 hónappal az állatokból EVk-et izoláltunk, majd az EVk analízise után naív egerek farokvénájába oltottuk (őket nevezzük bystander állatoknak). A kizárólag EVk-kel kezelt állatokban bekövetkező változásokat a direkt besugarazott állatokban mért változásokkal hasonlítottuk össze. Az állatok csontvelőjét, lábsontjait, lépét és máját az expozíciót és EVk oltását követően 4 órával, 24 órával és 3 hónappal vizsgáltuk. A szövetekből kinyert egysejtes szuszpenzióban áramlási citométerrel apoptózist, migrációt, sejtfenotípusos és sejtszámbeli változásokat követtünk nyomon. Ezen kísérletben a csont- és csontvelő összejt és progenitor sejtpopulációira fókuszáltunk.

A besugárzás után 4 és 24 órával izolált EVk dóziszfüggően apoptózist indukáltak a csontvelői heamatopoietikus őssejtekben (HSC) (Lin⁻Scal⁺cKit⁺) és limfoid progenitorokban (LP) (CD45⁺CD90.2⁺) az EVk oltása után 4 órával. Csontvelőből migráló HSC-ket detektáltunk a lépben, mezenchimális őssejteket (MSC) (Lin⁻Scal⁺CD44⁺) a csontszövetben és jelentősen csökkent a HSC és MSC populációk sejtszáma a csontvelőben az EVk oltása után 24 órával. A HSC alpopulációi közül a multipotens progenitorok (Lin⁻Scal⁺cKit⁺CD34⁺CD135⁺) aránya szignifikánsan csökkent, mely hatás 3 hónappal később ugyan moderáltabban, de megnyilvánult. Hosszútávú hatásként (3 hónappal az EVk oltása után) a HSC, a LP és a granulocita-monocita progenitorok (Gr1⁺CD11b⁺) sejtszáma szignifikánsan csökkent dóziszfüggően a csontvelőben.

Az előzőekkel ellentétben, a besugárzás után 3 hónappal izolált EVk a vizsgált sejtípusok és végpontok egyikében sem okoztak szignifikáns változást.

Bizonyítottuk, hogy az akut (4 óras és 24 óras) csontvelő eredetű EVk rövid és hosszútávon is képesek a sugárzás szomszédsági hatását közvetíteni. Ez a hatás csak bizonyos sejtpopulációkban nyilvánul meg, mely összefüggésben van egy sejtípus sugárérzékenységeivel és mikro környezetével. A krónikus (3 hónapos) csontvelő eredetű EVk-nek nem volt hatása a vizsgált végpontokban. Ez a vizsgálat segít megérteni a sugárzás közvetlen és szomszédsági hatásainak mechanizmusát a csontvelőben.

Támogatás: Euratom kutatási és oktatási program 2014-2018; 662287 számú pályázat.

Poszter absztraktok

P1. Különböző típusú brachi – és teleterápiás kezelés hatása prosztatata daganatos betegek immunfenotípusára

Balázs Katalin¹, Jurányi Zsolt², Kocsis S. Zsuzsa², Sáfrány Géza¹, Lumniczky Katalin¹

¹Nemzeti Népegészségügyi Központ, Budapest, Magyarország

²Országos Onkológiai Intézet, Budapest, Magyarország

Bevezető: A prosztatata karcinóma az egyik leggyakoribb rosszindulatú daganattípus férfiakban. Nem csak világszerte, hanem Magyarországon is komoly népegészségügyi problémát jelent, hiszen évente körülbelül 3500 új esetet regisztrálnak, és ezek közül több mint 1000 halálos kimenetelű. Ezen daganatok kezelésének egyik legfontosabb eszköze mindmáig a sugárterápia. Jelenleg különböző besugárzási protokollokat alkalmaznak, amelyek között mind hatékonyságban, mind a korai és késői mellékhatások kockázatában különbségek vannak. Ugyan a daganat kiújulás monitorozására a PSA szint nyomon követése megbízható markernek bizonyul, azonban jelenleg nincs olyan biológiai indikátor, amely képes prognosztizálni a késői mellékhatások kockázatát, és a szekunder tumorok kialakulását.

Vizsgálatainkat 4 különböző sugárterápiás protokollal kezelt betegcsoporton végezzük, ezek az alacsony („seed”) és magas dózis teljesítményű (HDR) brachyterápia, a hagyományos teleterápia és a cyber knife terápia. A 4 csoport immunológiai státuszának komplex jellemzését végezzük, amelynek során célunk olyan celluláris és szolubilis immunológiai biomarkerek beazonosítása, amelyek indikátorai lehetnek a terápia okozta késői mellékhatásoknak. Vizsgálati eredményeink reményeink szerint arra is alkalmasak lesznek, hogy segítsenek beazonosítani azokat a betegcsoportokat, akik egy esetleges immunterápiából leginkább profitálhatnak.

Anyag és módszer: Perifériás vér mononukleáris sejtjein belül a különböző limfocita populációkat, ezek funkcionális markereit, aktivációs státuszát vizsgáltuk áramlási citométer segítségével. Vérvétel 8 alkalommal történt: a sugárterápia megkezdése előtt, közvetlenül a terápia vége után, illetve azt követően 3 havonta egy évig, majd évente egy alkalommal, amely körülbelül 3 éves nyomon követést tesz lehetővé.

Eredmények és következtetések: Jelen prezentációban a seed terápiával kezelt betegek (n=19) immunfenotípusában bekövetkező változásokat mutatjuk be. A CD4 populáción belüli regulátor T sejtek és a dendritikus sejtek (DC) szintje a daganat kezelése előtt és közvetlenül a beültetés után az egészséges, korban illesztett kontroll csoporthoz képest szignifikánsan magasabb értéket mutatott, azonban szintjük a későbbi időpontokra visszaállt kontroll szintre. Ez arra utal, hogy ezeknek a markereknek a változása a daganat kinetikájával párhuzamosan változnak, a sugárzás önmagában nem/kevésbé befolyásolja őket. A természetes ölösejtek (NK sejtek), a regulátor T sejtekre jellemző CTLA-4 aktivációs markerek, valamint a mieloid eredetű szuppresszor sejtek (MDSC) mennyisége kontroll közeli volt a kezelés előtt, és közvetlen utána, azonban a későbbi időpontokban (6-9 hónap) szignifikáns változást mutatott, ami arra utal, hogy szintjük összefüggésbe hozható a seed terápia során leadott kumulatív sugárdózissal.

Támogatás: Ez a projekt az OTKA (Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal) keretében valósult meg (azonosító: 124879).

P2. A VS38c immunjelölés szerepe a plazmasejtes mielóma vizsgálatában

Czeti Ágnes¹, Szalóki Gábor¹, Szita Virág², Takács Ferenc¹, Varga Gergely², Barna Gábor¹

¹I.sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Semmelweis Egyetem, ÁOK, Budapest

²III. sz. Belgyógyászati Klinika, Semmelweis Egyetem, ÁOK, Budapest

A plazmasejtes mielóma egy rosszindulatú hematológiai betegség, amit kóros, monoklonális plazmasejt (mielómasejt) szaporulat jellemez. A plazmasejtek kiterjedt endoplazmatikus retikulum (ER) hálózattal rendelkeznek, ezért egy ER transzmembrán fehérjére (CLIMP-63/Cytoskeleton-linking membrane protein 63, CKAP4) irányuló immunjelölés alkalmas lehet a plazmasejtek többi csontvelői sejtől való elkülönítésére. A CLIMP-63 fehérjét egy monoklonális egér antitesttel (VS38c) tudjuk kimutatni.

Vizsgálataink során arra kerestük a választ, hogy milyen az egészséges és kóros plazmasejtek VS38c jelölődési mintázata, valóban minden esetben használható-e a VS38c jelölés a plazmasejtek detektálására és a többi sejtől való elkülönítésére, valamint, hogy miből fakadhatnak a plazmasejtek közötti esetleges VS38c jelölődésbeli különbségek. Továbbá kíváncsiak voltunk, hogy a minta előkészítése, illetve a mintavétel és feldolgozás között eltelt idő hogyan befolyásolja az eredményeket.

Kérdéseink megválaszolására kísérletünk során 134 plazmasejtes mielómával diagnosztizált beteg és 10 egészséges ember csontvelői aspirátumát vizsgáltuk áramlási citométerrel. A plazmasejtekre jellemző sejtfelszíni markereket és a CLIMP-63 fehérjét jelöltük. Az intracelluláris festési eljárás során permeabilizáló ágensként IntraStain kit-et (DAKO) és különböző koncentrációban Triton X-100 detergenst használtunk.

Eddigi eredményeink azt mutatják, hogy VS38c-vel jelölve (IntraStain kit használata mellett), mind az egészséges, mind a kóros plazmasejtek között két populáció jelent meg. Az egyik populáció intenzíven jelölődött (VS38c^{bright}), míg a másik populáció kevésbé festődött (VS38c^{dim}). A Triton X-100 detergens használata során azt tapasztaltuk, hogy a detergens koncentrációjától függően változott a populációk aránya. Hígítási sort készítve, a legmagasabb koncentrációnál minden mielómasejt a VS38c^{bright} populációba került, majd egy meghatározott hígítási foknál megjelent a VS38c^{dim} populáció. Végül a detergens alacsony koncentrációja miatt már egyik sejt sem permeabilizálódott.

Ha az előkészítés során a fixálást megelőzően beiktattunk egy mosási lépést, a VS38c^{dim} populációt alkotó sejtek eltűntek, ami a mintában lévő összes mielómasejt számának csökkenésében is megmutatkozott. Továbbá amikor a mintákat szobahőmérsékleten tároltuk, akkor az idő előrehaladtával a VS38c^{dim} sejtpopuláció fokozatosan csökkent, míg a VS38c^{bright} sejtpopuláció ezzel megegyező mértékben nőtt.

Eddigi eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy a VS38c antitest, más plazmasejt markerek felhasználása mellett, jól használható a plazmasejtek detektálására. A hígítási sor alapján az is elmondható, hogy a VS38c populációk közötti intenzitásbeli eltérést valószínűleg nem expressziós szintű különbség, hanem az ER membrán strukturális különbsége okozhatja. Mindezek mellett megállapítható, hogy a VS38c^{dim} populáció sérülékenyebb, ezt jól mutatja az intracelluláris jelölést megelőző mosási lépés során bekövetkező sejtszám csökkenés. Továbbá a populációk arányának időbeli változása felhívja a figyelmet arra, hogy a minta tárolása során változik a sejtek jelölhetősége, vagyis lényeges, hogy a minta feldolgozása a mintavételt követően a leghamarabb megtörténjen.

Összességében elmondható, hogy a VS38c ellenanyaggal történő jelölés ígéretes lehetőség lehet mind a rutin diagnosztikában, mind a progresszió megítélésében, hiszen amellettt hogy szelektíven jelöli a plazma- és mielómasejteket, megjelenít egy olyan mielóma alpopulációt, amely szerepet játszhat a betegség lefolyásában.

P3. Kelidonin hatása a STAT3 transzkripció faktor tirozin és szerin foszforilációjára humán uveális melanóma sejteken

Csomós István, Szoták Evelin, Filep Csenge, Nizsalóczki Enikő, Mátyus László, Bodnár Andrea

Debreceni Egyetem ÁOK, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet

A STAT3 transzkripció faktor számos, a sejtciklus szabályozásában, a sejtproliferációban, túlélésben és migrációban kritikus gén átíródását váltja ki, így a tumorelles terápia ígertes célpontja. Egyik fontos aktivátora az IL-6, melynek emelkedett szintjét több daganatos kórképben, így uveális melanómában is leírták. A STAT3 aktiválódását tirozin (Y705) oldalláncon történő foszforilációja váltja ki, melyet dimerizáció és magi transzlokáció követ. A STAT3 szerin (S727) oldalláncon is foszforilálódhat, akár stimuláció hiányában is. Ennek pontos funkciója még nem ismert, de feltételezik szerepét a STAT3 működés finomhangolásában.

Kísérleteinkben a benzofenantridin alkaloidok közé tartozó kelidonin hatását vizsgáltuk az IL-6R/STAT3 jelátviteli útvonalra humán uveális melanóma sejteken. Korábban több tumoreredetű sejt esetén kimutatták a kelidonin proliferáció gátló és sejthalál indukáló hatását, emellett gátolja a mikrotubulus polimerizációt, befolyásolja a sejtciklust.

A vizsgált fehérjék expressziós szintjét és lokalizációját immunfluoreszcenciás jelzést követően áramlási citometriával, illetve konfokális mikroszkópiával vizsgáltuk.

Kelidonin hatására a sejtek egy jelentős részében megnőtt az alap pS-STAT3 szint, amelyet az IL-6 stimuláció már nem emelt tovább. A megemelkedett pS-STAT3 szintet a tirozin foszforiláció és magi transzlokáció gátlása kísérte. A kétfajta foszforilációra gyakorolt hatás közötti korreláció időfüggést mutatott: a pY-STAT3 szint csökkenése időben késleltetett volt a pS-STAT3 szint emelkedéséhez képest. Az IL-6Rα és a STAT3 expresszió nem változott, ugyanakkor megjelent egy csökkent gp130 expresszióval rendelkező sejtpopuláció. Adataink alátámasztják az IL-6R/STAT3 útvonal szerepét a kelidonin hatásmechanizmusában. A kelidonin STAT3 aktiválhatóságra gyakorolt hatásához a gp130 expresszió csökkenése, illetve a bazális szerin foszforilációs szint megemelkedése egyaránt hozzájárulhat.

P4. A Dectin-1 receptor szerepének vizsgálata a *Candida parapsilosis* sejtfalának immunológiai felismerésében

Csonka Katalin¹, Bianca Schulze², Christine Dunker², Ilse D. Jacobsen², Gácsér Attila¹

¹Szegedi Tudományegyetem, Mikrobiológiai Tanszék, Szeged, Magyarország,

²Hans Knöll Institute, Jena, Németország

Bevezetés: A mintázatfelismerő receptorok (pathogen recognition receptors, PRR) olyan evolúciósan konzervált receptorok, amelyek képesek a különböző patogén-asszociált molekuláris mintázatok (pathogen associated molecular patterns, PAMPs) felismerésére. A gombák elleni védekezésben esszenciális szerepet játszanak a C-típusú lektin receptorok (CLR-ek), melyek közül a Dectin-1 az egyik legjobban jellemzett CLR, amely a β -1,3-glükán molekula felismerésére képes a sejtfalban. A gazda-patogén interakció során kulcsszerepet játszik a gomba sejtfal szerkezete. Erről a *C. albicans* esetében számos információ áll rendelkezésünkre, azonban keveset tudunk más *Candida* fajok, úgy, mint a *C. parapsilosis* sejtfal összetételének virulenciában betöltött szerepéről. Kutatócsoportunk létrehozta a *C. parapsilosis och1Δ/Δ* (*Cpoch1Δ/Δ*), a sejtfal *N*-mannozilációját katalizáló enzim (α -1,6-mannoziltranszferáz) aktivitására deléciós törzset, amely több mint 60%-os csökkenést mutat a sejtfal mannán tartalmában, emellett emelkedett β -glükán és kitin szinttel rendelkezik. Munkánk során célul tűztük ki a sejtfal *N*-mannán réteg és a Dectin-1 receptor szerepének vizsgálatát a *C. parapsilosis* által kiváltott immunválaszban *in vivo* körülmények között.

Módszerek: A C57BL/6 vad típusú (vt) és Dectin-1^{-/-} egeret $2 \times 10^7/100 \mu\text{l}$ *C. parapsilosis* CLIB 214 (*Cp* vt) és *Cpoch1Δ/Δ* gombasejttel intravénásan fertőztük. A fertőzést követően 1, 3 és 7 nappal vizsgáltuk az egerek érzékenységet a szervekből megfigyelhető gomba kolónia képző egység (colony forming unit, CFU) megadásával. A fertőzött szervekbe történő immunsejt (makrofág, neutrofil granulocita és dendritikus sejt) infiltrációt fluoreszcens áramlási citometriával (FACS) határoztuk meg. A citokin profil felállítását a vese homogenizátumokból MultiPlex ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) alkalmazásával hajtottuk végre.

Eredmények: A vt egér modellben a sejtfal mutáns törzs csökkent fertőzőképességgel rendelkezett, mivel az *Cpoch1Δ/Δ* fertőzött egerek májában, veséjében és lépében szignifikánsan alacsonyabb CFU volt detektálható, mint a *Cp* vt törzzsel történő fertőzés esetében. A deléciós törzs hasonló neutrofil granulocita, de alacsonyabb makrofág és dendritikus sejt toborzást indukált, emellett alacsonyabb gyulladásos citokin (TNF α , IL-1 β , IL-6 és INF- γ) választ váltott ki a *Cp* vt törzshöz képest. A különböző szervekből meghatározott CFU és az immunsejt infiltráció alapján nem találtunk különbséget a vt és a Dectin-1^{-/-} egerek érzékenységeiben a *Cp* vt stimulus hatására. A Dectin-1^{-/-} és a vt egerek hasonló hatékonysággal kontrollálták a *Cpoch1Δ/Δ* sejtek terjedését, emellett nem figyeltünk meg különbséget a vese makrofág és dendritikus sejt akkumulációjában. Azonban a *Cpoch1Δ/Δ* stimuláció utáni 3. napon, a vt egerekhez képest a Dectin-1^{-/-} egerek csökkent neutrofil számát figyeltük meg.

Konklúzió: A szisztémás candidiasis-t modellező egér *in vivo* rendszerben bizonyítottuk, hogy az *N*-mannoziláció hiánya a *C. parapsilosis* sejtfalban szignifikánsan csökkent virulenciát eredményezett. Továbbá, megállapítottuk, hogy a sejtfalban „hozzáférhetőbb” β -glükán és a Dectin-1 receptor interakciója nem járul hozzá a *C. parapsilosis och1Δ/Δ* törzs esetében megfigyelt csökkent fertőzőképességhez és a vad típusú *C. parapsilosis* által kiváltott immunválasz független a Dectin-1 receptortól. Emellett eredményeink azt mutatják, hogy a *C. parapsilosis* sejtek eliminációjáért elsősorban nem a neutrofil granulociták felelősek.

P5. Az ABCG2 konformáció változásainak vizsgálata permeabilizált sejteken

Gyöngy Zsuzsanna¹, Szakács Gergely², Goda Katalin¹

¹ Debreceni Egyetem; Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet

² MTA Természettudományi Kutatóközpont Enzimológiai Intézet, Budapest

Az ABCG2 az ABC kazettás fehérjék családjába tartozó aktív transzporter, amely képes a daganatellenes szereket kipumpálni a sejtekből, ezáltal multidrog rezisztenciát okozni. Számos ABC transzporter kristályszerkezete alapján feltételezhetjük, hogy az ABCG2 egy nukleotid mentes, intracelluláris oldalról nyitott- és egy nukleotid kötött intracelluláris oldalról zárt konformáció között fluktuál. A konformáció érzékeny kötődésű 5D3 antitest segítségével a két konformer elkülöníthető, arányuk meghatározható. Kísérleteink célja olyan az 5D3 antitest alkalmazásán alapuló kísérleti protokollok kidolgozása, melyek segítségével az ABCG2 fehérje katalitikus ciklusa tanulmányozható.

Bakteriális toxinnal permeabilizálva a sejteket a nukleotidok kimoshatóak és a sejtfelszíni ABCG2 fehérjék 5D3-reaktív konformációba kerülnek. ATP adását követően a fehérjék a nukleotid koncentrációjától függő módon átváltak az 5D3 antitestet nem kötő konformációba. Ez a konformáció változás az ATP hidrolízisét kizáró körülmények között pl. Mg^{2+} hiányában vagy ADP adása hatására is megfigyelhető volt. Ezek alapján feltételezhetjük, hogy a fehérje 5D3-reaktív konformációból történő átfordulását 5D3-at nem kötő konformációba, a nukleotidok kötődése és disszociációja befolyásolja. A vanadát gátolja az ABC transzporterek általi ATP hidrolízist, mivel az ATP hidrolízisét követően képes az eltávozó foszfát helyére nagy affinitással bekötődni és az újabb hidrolitikus ciklus bekövetkezését meggátolni. Ezzel összhangban kísérleteinkben vanadát kezelés hatására növekedett az ABCG2 nukleotid kötésének látszólagos affinitása ATP/Mg^{2+} jelenlétében, míg Mg^{2+} hiányában a vanadát kezelés nem befolyásolta a nukleotid kötődés látszólagos affinitását. Kinetikai méréseink alapján elmondhatjuk azt is, hogy az ABCG2 szubsztrát quercetin, fokozta a vanadát által csapdázott poszt-hidrolitikus konformer létrejöttének sebességét. Megfigyeltük azt is, hogy az 5D3 antitest kötődése az ABCG2 fehérjéhez reverzibilis, valamint az antitest disszociációjának sebességét fokozta az ATP/Mg^{2+} és szubsztrát quercetin jelenléte. Eredményeink alátámasztják, hogy a konformáció érzékeny kötődésű 5D3 antitest alkalmas az ABCG2 katalitikus ciklusának vizsgálatára.

Kutatási támogatások: GINOP-2.3.2-15-2016-00044; GINOP-2.2.1-15-2017-00079; OTKA támogatások: K124815, PD75994; Szodoray ösztöndíj (Goda Katalin)

P6. A GLUT-1 membránfehérje expressziós mintázatának genetikai háttere kettes típusú diabéteszben

Kulin Anna, Szabó Edit, Sarkadi Balázs, Várady György

Magyar Tudományos Akadémia Természettudományi Kutatóközpont, Enzimológia Intézet

A kettes típusú diabétesz (2TDM), jelentős szövődményekkel, a világ egyik legelterjedtebb anyagcserebetegsége. Számos tényező közrejátszhat kialakulásában, köztük több már leírt mutáció, polimorfizmus, amelyek többségét a teljes genomasszociációs vizsgálatok (genome wide association studies, GWAs) során találják meg. Ezeknek a vizsgálatoknak nagy hátránya, hogy ugyan kapcsolatot tudnak kimutatni a betegség és egy adott mutáció között, de nem ismerjük meg a kapcsolódó fehérje esetleges mennyiségi vagy funkcionális változásait. Munkánk során olyan áramlási citometria alapú eljárást dolgoztunk ki, amely segítségével fixált vörösvérsejt membránokon (ghost) mért membránfehérjék mennyiségi különbségeit egyéni szinten is ki tudjuk mutatni. Az ilyen eltérő expressziós mintázatok esetében genetikai vizsgálatokkal megtalálhatóak a háttérben húzódó mutációk, polimorfizmusok. A jelen munkában a betegség szempontjából kiemelkedően fontos membránfehérje, a Glükóz transzporter 1 (Glut-1, SLC2A1) vérmintákon végzett fehérjeexpressziós és genetikai vizsgálatait mutatom be, kontroll, illetve 2TDM-ben szenvedő páciensek esetében. A GLUT1 membránfehérje kiemelkedő szerepet tölt be a sejtek facilitált glükóz transzportjában. Legnagyobb mennyiségben a vörösvérsejt membránjában van jelen, de számos más sejttypusban, így az agyi és a vese ereken is megtalálható. Az áramlási citometriás analízis segítségével sikerült két olyan SNP-t (rs841848, rs1385129) azonosítani, amelyek korábbi irodalmi adatok alapján összefüggést mutathatnak a betegséggel vagy annak szövődményeivel (nefropátia, retinopátia). Mindkét polimorfizmus esetében megfigyelhető, hogy a kisebb gyakoriságú allél szignifikáns összefüggést mutat a magasabb vörösvérsejt fehérjeexpressziós szinttel. A két SNP részlegesen kapcsolt ($r^2 \approx 70$), éppen ezért a fehérjeexpresszió tekintetében hasonló eredményt mutatnak.

P7. Egér csontvelői extracelluláris vezikulák áramlások citomeriás elemzése

Persa Eszter, Szatmári Tünde, Kis Dávid, Sáfrány Géza, Lumniczky Katalin

Nemzeti Népegészségügyi Központ, Sugárorvostani Osztály

Bevezetés: Az extracelluláris vezikulák 50-1000 nm-es membránnal körülvett "csomagok", amelyek tartalmuk (RNS-ek, mRNS-ek, fehérjék) révén jelentős szerepet játszhatnak a sejtek közötti kommunikációban, akár a célsejtek jelátviteli útvonalainak megváltoztatásában. A sejtek vezikulákat fiziológiás körülmények között is kibocsátanak, ugyanakkor az utóbbi évtizedben a vezikulák kutatása az orvostudományok középpontjába főképp amiatt került, mert tanulmányok a sejtek vezikulakibocsátásának többszöröződését mutatták ki daganatok, stressz vagy bizonyos környezeti faktorok következtében. A vezikulák kutatását nehezíti a tény, hogy méretüknél és fénytörési tulajdonságaiknál fogva nehezen detektálhatóak, azonosításukra és jellemzésükre viszont diagnosztikai és terápiás megközelítésben is nagy szükség lenne.

Cél: Kutatásaink során a vezikulák sugárzás indukálta leukémia kialakulásában játszott szerepét vizsgáltuk. A vezikulák jellemzésére egy olyan módszert szerettünk volna kidolgozni, mely beadekekhez kötés nélkül azonosítja a felszínükön megjelenő fehérje epitópokat.

Módszer: Az extracelluláris vezikulák izolálásához 10-12 hetes kontroll (0 Gy) vagy besugárzott (0,1 Gy és 3 Gy) hím CBA egerek femur és tibia csontjainak diafiziseiből PBS pufferral kimostuk a csontvelőt, majd a sejtek felülcsúszójából (tenyésztési fázis nélkül) ExoQuick-TC kit segítségével izoláltuk a vezikulákat, végül G-25 sephadex oszlopon tisztítottuk tovább a mintákat. A vezikulákat CD9, CD63 és CD81 fehérjék jelenléte alapján azonosítottuk és a mérettartomány kijelölését Megamix-SSC, Megamix-FSC ill. hollow-organosilica (HOB) beadek segítségével végeztük. A csontvelői sejtpopulációkra jellemző felszíni fehérjék megjelenéséből a vezikulák lehetséges eredetére következtethetünk. Méréseinket CytoFlex áramlási citométerrel végeztük, a vezikulák mérettartományának meghatározásához Violet lézerről szórt fényt használtunk.

Eredmények: A vezikula-specifikus markerek alapján a kijelölt mérettartományokban azonosíthatóak voltak a keresett részecskék. Érdekes módon a kisebb (HOB alapján mért) és a nagyobb (Megamix alapján mért) részecskék fenotipusos eltérést mutattak 3 Gy besugárzás után egyes csontvelői progenitor fehérjékkel jellemezhető csoportokban. A vezikulák arányának változása a nagy dózisu besugárzás okozta sejtpusztulás következtében kialakuló sejtarány változásokat a mezenchimális őssejtek és monocita-granulocita előalakok esetében követte, míg az eritroid progenitorok esetében attól eltért.

Következtetés: Eredményeink alapján elmondható, hogy sikerült specifikus tetraspanninokat tartalmazó vezikulákat azonosítani a mintáinkban citométerrel, melyek felszínén az azokat kibocsátó csontvelői populációk jellemző fehérjéket sikerült kimutatni. A sugárzás után 24 órával a csontvelői sejtek vezikula-kibocsátásának aránya megváltozik, ami nem minden esetben mutat összefüggést a sugárzás okozta sejtpusztulás mértékével.

Támogatás: Euratom kutatási és oktatási program 2014-2018; 662287 számú pályázat.

P8. Fenotípus változás CLL sejteken egy Venetoclax rezisztens betegnél

Takács Ferenc¹, Kardos Ilona¹, Mikala Gábor², Czeti Ágnes¹, Szalóki Gábor¹, Aczél Dóra³, Bödör Csaba³, Barna Gábor¹

¹Áramlási Citometria Labor Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Budapest

²Dél-Pesti Centrumkórház- Országos Hematológiai és Infektológiai Intézet Budapest

³MTA-SE Lendület Molekuláris Onkohematológia Kutatócsoport, Semmelweis Egyetem I. sz Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Budapest

Bevezetés: A krónikus limfoid leukémia (CLL) a leggyakoribb felnőttkori leukémia a fejlett országokban. A CLL egy indolens lefolyású, biológiai heterogén tulajdonságú betegség. A hagyományos kemo-immuno kezelés mellett az elmúlt években új, célzott terápiás készítmények jelentek meg a betegség kezelésében, ilyen a Bcl-2 gátló Venetoclax. Poszter prezentációnkban egy venetoclax rezisztens beteg esetét szeretnénk bemutatni.

Célkitűzés: Kutatásunk során célul tűztük ki, hogy feltárjuk Venetoclax rezisztencia során tapasztalható jelátviteli változásokat, és ennek hatását az általunk vizsgált sejtfelszíni markerekre. Továbbá, hogy van-e különbség a csontvelőben, illetve a perifériás vérben található rezisztens CLL sejtek fenotípusában.

Anyag és módszer: A 76 éves férfi perifériás vérmintáiból áramlási citometria módszerrel határoztuk meg a CLL prognóza, illetve mikro környezeti interakciójában fontos szerepet játszó sejtfelszíni molekulák (CD49d, CD38, CD69, CD184, CD86, CD27, CD185) expresszióját. A méréseket Navios (Beckman Coulter) áramlási citométeren végeztük. A rezisztencia kialakulásakor perifériás és csontvelői minta is rendelkezésünkre állt, ezekből meghatároztuk a CLL sejtek fenotípusát. A nulladik napi, egy éves, illetve a rezisztencia kialakulásakor perifériás vérmintákból protein és apoptózis array vizsgálatokat végeztünk (R&D systems). A protein és apoptózis array vizsgálatokat a csontvelői mintákból is elvégeztük a kompartmentális különbségek feltárására.

Eredmények: A vizsgált markerek közül a kezelés hatására a CD69, CD38 és CD27 expressziója érdemben nem változott, míg a CD49d, CD184 és CD185 expressziója kezdetben csökkent, majd a rezisztencia megjelenésekor megnőtt. A rezisztens minta perifériás vér és csontvelői CLL sejtek fenotípusát összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy a vizsgált markerek közül csak a CD69-ben volt jelentős eltérés, melynek expressziója a csontvelői mintában fokozottabb volt. A protein array során azt tapasztaltuk, hogy kezelés hatására a foszfo-p27 és foszfo-FAK szintje jelentősen csökkent, míg a foszfo-CREB szintje kezdetben nőtt, majd a rezisztencia kialakulásakor drasztikusan csökkent. Az apoptózisban szerepet játszó fehérjék közül az antiapoptotikus Bcl-2 és XIAP fehérjék szintje kezdetben csökkent, míg a rezisztencia kialakulásakor jelentősen nőtt. A perifériás vér és csontvelői rezisztens mintákat összehasonlítva azt találtuk, hogy a csontvelői mintákban fokozottabb volt a survivin és p21 antiapoptotikus fehérje expressziója.

Összefoglalás: Eredményeink alapján megállapítható, hogy Venetoclax rezisztencia esetén mind fenotípusos, mind fehérje expressziós eltérés van a különböző kompartmentek között, valamint a perifériás vérminta esetén rezisztenciára fenotípusos eltérés mellett utalhat a Bcl-2 és XIAP fehérje fokozott expressziója, amelyek monitorozása ajánlott lehet a kezelés során.

P9. Minimális reziduális betegség vizsgálata krónikus limfocitás leukémiában

Kardos Ilona¹, Takács Ferenc¹, Aczél Dóra², Masszi András³, Mikala Gábor⁴, Gaál-Weisinger Júlia⁵, Bödör Csaba², Barna Gábor¹

¹Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Budapest

²MTA-SE Lendület Molekuláris Onkohematológia Kutatócsoport, I. sz Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Semmelweis Egyetem, Budapest

³Semmelweis Egyetem III. sz. Belgyógyászati Klinika, Budapest

⁴Dél-Pesti Centrumkórház- Országos Hematológiai és Infektológiai Intézet Budapest

⁵Semmelweis Egyetem I. sz. Belgyógyászati Klinika, Budapest

Bevezetés: A krónikus limfocitás leukémia (CLL) indolens, biológiailag heterogén viselkedésű, klinikailag változatos megjelenésű betegség. A hagyományos kemoimmunoterápia mellett az elmúlt években megjelentek új támadáspontú, célzott terápiás gyógyszerek, úgymint a Bruton-féle tirozin-kináz gátló ibrutinib vagy a Bcl-2 gátló Venetoclax. A kezelés hatására jelentősen lecsökkenhet a CLL-sejtek száma, így a minimális reziduális betegség (minimal residual disease, MRD) kimutatása jelentőssé vált. A European Research Initiative on CLL (ERIC) ajánlása szerint MRD detektálás szintje 10^{-4} . Irodalmi adatok alapján a nem detektálható MRD hosszabb progresszió mentes- és a teljes túlélést jelent.

Céltűzés: Kutásunkban kibővítettük a CLL MRD panelt egy életképesség festékkel és vizsgáltuk, hogy a kibővített panel betegkövetésre alkalmazható-e.

Anyag és módszer: 22 ibrutinibbel vagy Venetoclaxszal kezelt CLL-es beteg 47 perifériás vérmintáját BD FACSLyric áramlási citométerrel vizsgáltuk az általunk fejlesztett kibővített panellel. Kísérletünkben a CLL-sejtek fenotípusának meghatározásához CD5, CD19, CD20, CD43, CD79b, CD81 és ROR1 sejtfelszíni markerek expresszióját vizsgáltuk. Méreseként 500 ezer – 1 millió sejt került begyűjtésre.

Eredmények: A vizsgált 47 vérmintából 24 darab (51%) bizonyult MRD negatívnak, 23 darab (49%) MRD pozitívnak. Az életképesség festék segített a rossz minőségű minták eredményesebb vizsgálatában. 14 olyan beteget vizsgáltunk, akik több mintával rendelkeztek. 6 betegnél tartósan nem detektálható MRD szint volt mérhető, ők Venetoclax kezelést kaptak. Egy MRD negatív beteg vált MRD pozitívvá. 2 beteg esetén alakult ki MRD negatívitás, míg 5 beteg MRD negatív maradt a vizsgálat során.

Összefoglalás: A kibővített ERIC panel segítségével megfelelő érzékenységgel vizsgálható az MRD szint CLL-es betegek mintáiban. Rendszeres MRD vizsgálattal követhető a kezelés hatékonysága, ezért felmerül rutin alkalmazása a klinikumban.

P10. Ioncsatornák Gaucher-kórban megfigyelhető funkcionális eltéréseinek vizsgálata a betegség in vitro modellrendszerében

Zákány Florina, Székelyhidi Virág, Nagy Péter, Varga Zoltán, Panyi György, Kovács Tamás

Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet

Számos makrofág funkcióban (citokin szekréció, migráció, fagocitózis, NO szintézis) felvetették ioncsatornák (így a Kv1.3, BK, KCa3.1, Hv1, stb.) funkcionális szerepét, illetve ismert, hogy a sejtmembránban található lipidek befolyásolják az ioncsatornák működését. Így feltételezhető, hogy az elsősorban a makrofágok kóros működésével, valamint a lizoszomális béta-glükocerebrozidáz enzim deficienciája révén a glükoszilceramid felhalmozódásával jellemezhető Gaucher-kórban az ioncsatornák eltérései jelentősek lehetnek a betegség patomechanizmusában, amelyet korábban még nem vizsgáltak. Ezért célunk egy olyan modell kialakítása, amellyel a későbbiekben vizsgálni tudjuk, hogy Gaucher-kórban milyen, ioncsatornákkal összefüggésbe hozható makrofág funkciók sérülnek.

Modellünk kialakítása során THP-1 monocitákat, belőlük differenciáltatott M0, illetve klasszikus (M1), alternatív (M2a) és regulatórikus (M2r) útvonalakon aktivált makrofágokat kezeltünk a betegségben deficiens enzim irreverzibilis gátlószerével, konduritol-B-epoxiddal (CBE), amelynek hatására a szubsztrát glükoszilceramid felhalmozódása figyelhető meg előbb a lizoszómák, majd egyéb intracelluláris organellek membránjában, illetve a sejtmembránban. A különböző koncentrációkban alkalmazott CBE hatására kialakuló enzimgátlás mértékét kolorimetriás módszerrel határoztuk meg, majd áramlási citometria és megfelelő antitestek segítségével meghatároztuk a CBE kezelés hatására a sejtmembrán ceramid és glükoszilceramid tartalmában bekövetkező eltérések nagyságát, validálva modellrendszerünket a későbbi funkcionális mérések számára. Differenciációs és aktivációs protokolljaink áramlási citometriával történő tesztelése és optimalizálása után megvizsgáltuk különböző ioncsatorna gátlók (TEA, Vm24, paxilline, TRAM-34, ClGB1 és flufenamat sav) hatását az eltérő útvonalakon aktivált makrofágok életképességére. Kísérleteinket a fenti ioncsatornák szerepének vizsgálatával folytatjuk különféle makrofág funkciók esetén.

Köszönetnyilvánítás: ÚNKP-18-3-IV-DE-54, ÚNKP-19-3-III-DE-92

P11. Ciklodextrinek membránbiofizikai és Kv1.3 ioncsatornára kifejtett direkt hatásainak karakterizálása

Zákány Florina¹, Kovács Tamás¹, Sohajda Tamás², Sente Lajos², Nagy Péter¹, Panyi György¹, Varga Zoltán¹

¹ Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet

² CycloLab Cyclodextrin R & D Laboratory Ltd., Budapest

A ciklodextrinek (CD) hat (α CD), hét (β CD), illetve nyolc (γ CD) alfa-D-glükopiranoz-egységből álló ciklikus oligoszacharidok. Alakjuk belül üreges, hidrofób csanakúp, így képesek gyógyszermolekulákkal és különböző lipidekkel komplexeket képezni. Széles körben alkalmazzák őket gyógyszerekben semleges vívíanyagként, illetve a kutatásban a membrán koleszterintartalmának szelektív csökkentésére (metil- β -ciklodextrin; M β CD). A ciklodextrinek ioncsatornára kifejtett direkt hatásait korábban nem vizsgálták. Mivel a feszültségkapuzott káliumcsatornák (Kv) számos biológiai folyamatot kontrollálnak, a CD-ek ezen csatornákra gyakorolt direkt hatásai révén szerepet játszhatnak számos gyógyszer ismert mellékhatásainak kialakításában (pl. immunszuppresszió).

Célunk az M β CD, valamint három különböző inverz (hat, hét vagy nyolc 3,6,-anhydroglükózból álló, belül hidrophil, kívül hidrophób) ciklodextrin (i α CD; i β CD; i γ CD) direkt ligand hatásainak karakterizálása Kv1.3-on, illetve annak alátámasztása, hogy ez a ligand hatás független a CD-ek koleszterin depletáló és/vagy membránbiofizikai paramétereket módosító képességétől.

A direkt hatások vizsgálatához a patch-clamp méréseket Kv1.3 ioncsatornával es EGFP-vel kotranszfectált CHO sejteken végeztük. A CD-ek 1 és 5 mM-os koncentrációban részben reverzibilisen gátolták a Kv1.3 ionáramot (M β CD < i α CD < i γ CD), kivéve az i β CD, aminek nem volt ilyen hatása. A membránbiofizikai hatások vizsgálata során 1 órás inkubációt követően meghatároztuk a különböző CD-k által okozott membránkoleszterin kivonás mértékét. A CD-k közül egyedül az M β CD-nek volt koleszterin depletáló hatása, az iCD-knek nem. A CD-k által okozott Kv1.3 gátlás biológiai relevanciájának tesztelésére a csatornákat nagy mennyiségben expresszáló Jurkat sejtekben áramlási citometriával meghatároztuk a CD-k sejtek életképességére gyakorolt hatásait. Elektrofiziológiai eredményeinkkel összhangban azt találtuk, hogy az i β CD kivételével a CD-k dóziszfüggően csökkentették az élő sejtek arányát 24 órás kezelés után és a vegyületek toxicitása jó összefüggést mutatott az ionáramra gyakorolt gátló hatás mértékével.

Ezek alapján elmondható, hogy a CD-knek a membrán koleszterintartalom módosításától független, eddig le nem írt direkt gátló hatással is bírnak a Kv1.3 ioncsatornára, amelynek fontos szerepe lehet a belőlük készült gyógyszerek mellékhatásainak kialakításában.

Köszönetnyilvánítás: ÚNKP-19-3-III-DE-92

Névmutató

Aczél Dóra	8, 21, 22	Kovács Tamás	23, 24
Alföldi Róbert	9	Kulin Anna	19
Balázs Katalin	14	Lumniczky Katalin	13, 14, 20
Balog József Ágoston	9, 10	Mán Imola	10
Balogh Péter	11	Masszi András	8, 22
Baráth Sándor	7	Matolcsy András	6, 12
Barna Gábor	6, 8, 12, 15, 21, 22	Mátyus László	16
Bedekovics Judit	4	Mezei Zoltán	7
Bianca Schulze	17	Mikala Gábor	8, 21, 22
Bodnár Andrea	16	Molnár Sarolta	4
Bödör Csaba	8, 21, 22	Nagy Lajos	9
Christine Dunker	17	Nagy Péter	23, 24
Czeti Ágnes	6, 8, 12, 15, 21	Neuperger Patrícia	10
Csomós István	16	Nizsalóczki Enikő	16
Csonka Katalin	17	Panyi György	23, 24
Faragó Nóra	9	Persa Eszter	13, 20
Farkas Péter	8	Plander Márk	12
Fehér Liliana	9	Puskás László	9, 10
Filep Csenge	16	Sáfrány Géza	13, 14, 20
Furák József	10	Sándor Nikolett	13
Gaál-Weisinger Júlia	8, 22	Sarkadi Balázs	19
Gábris Fanni	11	Sohajda Tamás	24
Gácsér Attila	17	Szabó Edit	19
Goda Katalin	18	Szabó Orsolya	12
Gyöngy Zsuzsanna	18	Szakács Gergely	18
Hargitai Rita	13	Szalóki Gábor	6, 8, 12, 15, 21
Hernádfői Márk	12	Szalontai Klára	10
Hevessy Zsuzsanna	4, 7	Szalmári Mónika	7
Ilse D. Jacobsen	17	Szalmári Tünde	13, 20
Jáksó Pál	5	Szebeni Gábor János	9, 10
Jia Xinkai	11	Székelyhidi Virág	23
Jurányi Zsolt	14	Szente Lajos	24
Kajtár Béla	5	Szita Virág	15
Kappelmayer János	4, 7	Szoták Evelin	16
Kárai Bettina	4	Takács Ferenc	6, 8, 12, 15, 21, 22
Kardos Ilona	8, 21, 22	Tiszlavicz László	10
Kellermayer Zoltán	11	Tolnai-Kriston Csilla	12
Kereskai László	5	Várad György	19
Kis Dávid	13, 20	Varga Gergely	8, 15
Kis Enikő	13	Varga Zoltán	23, 24
Kocsis S. Zsuzsa	14	Vida Livia	5
Kotogány Edit	9, 10	Zákány Florina	23, 24

Jegyzetek

Támogatók

