

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D) ÉRTEKEZÉS

**A CYPD-HIÁNY VÉDŐ HATÁSA ENDOTOXÉMIA ÁLTAL
KIVÁLTOTT AKUT TÜDŐKÁROSODÁSBAN**

Dr. Fónai Fruzsina

Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

Molekuláris és Celluláris Biokémia Program

Témavezető: Dr. Veres Balázs

Doktori Iskola vezetője és Programvezető: Dr. Gallyas Ferenc



**Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet**

OGYDHT

PÉCS

2020

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések listája	4
1. Bevezetés	6
1.1 A szepszis definíciója, epidemiológiája	6
1.2 A szepszis során aktiválódó immunrendszer és a szervkárosodás kapcsolata	9
1.3 Az ARDS és az ALI	10
1.4 A Gram-negatív szepszis és a lipopoliszacharid indukálta tüdőkárosodás patomechanizmusa	12
1.5 A Gram-negatív baktériumok fegyvere, az LPS	15
1.6 A TLR4 mediált jelátvitel és az NF- κ B aktiváció	17
1.7 MAPK-k és az Akt szerepe az NF- κ B aktivációban	20
1.8 Reaktív oxigén és nitrogén származékok	24
1.9 Az mPTP és a ciklofilinD	27
2. Célkitűzés	31
3. Anyag és módszer	32
3.1 Etikai engedély	32
3.2 Kísérleti állatok	32
3.3 Anyagok és vegyszerek	32
3.4 Akut tüdőkárosodás modellezése és túlélés vizsgálat	33
3.5 Western blot analízis	33
3.6 Citokin-meghatározás tüdőszövetből ELISA felhasználásával	34
3.7 mRNS-izolálás tüdőszövetből és kvantitatív RealTime-PCR	34
3.8 Szövettani vizsgálat és kvantitatív értékelés	35
3.9 Immunhisztokémia	36
3.10 Fibrinfestés	36
3.11 Elektronmikroszkópia	37
3.12 Statisztikai módszerek	37
4. Eredmények	38
4.1 A CypD <i>knock-out</i> állatok túlélnek a letális LPS kezelést	38
4.2 A CypD hiánya megvédi a tüdőszövetet az LPS hatására kialakuló hisztopatológiai változásokkal szemben	38

4.3 A CypD ^{-/-} egerek tüdejében nem észlelhető fibrin tartalmú exsudatum felsza- porodása LPS adását követően	40
4.4 A CypD hiányában az LPS indukálta finomszerkezeti károsodás elmarad a tüdőszövetben	42
4.5 Védő hatás CypD-hiány esetén LPS kezelést követő oxidatív szövetkároso- dással szemben	44
4.6 Endotoxémiában a CypD-hiány csökkenti a proinflammatorikus citokinterme- lést, nem hat az antiinflammatorikus citokinek mennyiségére a tüdőben	46
4.7 LPS kezelést követően CypD hiányában mérséklődik az Akt és MKP-1-n keresztül a MAPK-k aktivitása	47
4.8 CypD <i>knock-out</i> állatok tüdejében elmarad a kifejezett NF-κB aktiváció LPS kezelést követően	49
4.9 Jelentős különbség az NF-κB által irányított génexpresszióban a CypD jelen- létének függvényében	50
5. Diskusszió	53
6. Eredmények összefoglalása	68
7. Irodalomjegyzék	69
8. A Ph.D értekezés alapjául szolgáló és egyéb közlemények, poszterek, előadások közlemények	94
9. Köszönetnyilvánítás	98

Rövidítések listája

ALI: acute lung injury / heveny tüdőkárosodás

ANT: adenin nucleotid translocase / adenin nukleotid transzlokáz

ARDS: acute respiratory distress syndrome / heveny respirációs distressz szindróma

CD14: cluster of differentiation 14

CsA: cyclosporin A

Cxcl2: chemokine (C-X-C motif) ligand 2

CypD: cyclophilinD

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

ERK: extracellular signal regulated kinase

GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase / glicerin aldehid-3-foszfát-dehidrogenáz

IFN: interferon

IKK: I κ B kinase

I κ B: inhibitor of kappa B

IL: interleukin

iNOS: inducible nitric oxide synthase

IRAK: interleukin-1 receptor-associated kinase

IRF: interferon regulatory factor

JNK: c-Jun N-terminal kinase

LBP: LPS binding protein / lipopoliszacharid-kötő fehérje

LPS: lipopolysaccharide / lipopoliszacharid

MAPK: mitogen-activated protein kinase

MAPKK: MAPK kinase

MAPKKK: MAPKK kinase

MD2: myeloid differentiation factor-2

MEK: MAPK/ERK kinase

MEKK: MAPK/ERK kinase kinase

MIP: macrophage inflammatory protein

MKP: MAPK phosphatase

mPTP: mitochondrial permeability transition pore

MyD88: myeloid differentiation primary response protein 88

NEMO: NF-kappaB essential modulator
NF-κB: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NLR: NOD-like receptor
NOD: nucleotide-binding and oligomerization domain
PAF: platelet-activating factor
PAMP: pathogen associated molecular pattern
PBS: phosphate buffered saline / foszfáttal puffereelt sóoldat
PRR: pattern recognition receptor / mintázatfelismerő receptor
PTEN: phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10
RIP: receptor interacting protein
ROS: reactive oxygen species / reaktív oxigén származékok
RNS: reactive nitrogen species / reaktív nitrogén származékok
SDS: sodium dodecyl sulfate / nátrium-dodecil-szulfát
SIRS: systemic inflammatory response syndrome / szisztémás gyulladási válasz szindróma
SOD: superoxide dismutase / szuperoxid-dizmutáz
TAB: TAK binding protein
TAK1: TGF-beta-activated kinase 1
TBK: TANK-binding kinase
TIR: Toll/interleukin-1 receptor
TIRAP: TIR domain-containing adapter protein
TLR: Toll like receptor
TNFα: tumor necrosis factor alpha
Tpl2: tumor progression locus 2
TRAF6: tumor necrosis factor-receptor associated factor 6
TRAM: TRIF-related adaptor molecule
TRIF: TIR-related adaptor protein inducing interferon
VDAC: voltage-dependent anion channel / feszültségfüggő anion csatorna
4HNE: 4-hidroxi-2-nonenal

1. BEVEZETÉS

1.1 A szepszis definíciója, epidemiológiája

A szepszis egy súlyos, magas mortalitási rátával járó, intenzív terápiát igénylő kórfolyamat, mely a mai napig komoly kihívás elé állítja a gyógyító személyzetet. A szepszis és szeptikus sokk kifejezések egy olyan infekcióhoz társuló, akár többszervi érintettséggel járó kórformát takarnak, mely mind a betegpopuláció, mind az etiológia és súlyosság szempontjából igen heterogén. A több évtizedes klinikai tapasztalat és kutatások ellenére a mai napig nem létezik egységes, elfogadott definíció, sem egyértelmű diagnosztikus és kezelési útmutatás (Bone és mtsai, 1992; Levy és mtsai, 2003; Singer és mtsai, 2016). Már az ókor óta ismert az a fertőzéshez társuló jelenség, melyet Hippokratész találóan "sepsis"-nek nevezett el a „sipis”-rothadás és „pepsis”-jő emésztés kifejezések összevonásával. Évszázadok megfigyelései, úttörő kutatásai vezettek el a felismerésig, hogy a fertőzések kiváltói különböző kórokozók és a szervezet válaszreakciói, a gyulladás folyamata igen hasonló az érintettekben. A 80-as években, a modern orvostudomány korszakában Roger Bone és munkatársai állították fel a „szepszis szindróma” kritériumait, melynek klasszikus jelei közé tartoznak a láz vagy hipotermia, a leukocitózis vagy leukopénia, a tachycardia és a hipotenzió (Bone és mtsai, 1989). Ezek az elváltozások azonban számos más, nem infekciós eredetű kórállapotban is felléphetnek, ezért szükség volt a definíció újragondolására és pontosítására. A 90-es évek elején a Bone és munkatársai által lefektetett irányelvek mentén megszületett egy a mai napig használatos definíció, a „SIRS” (systemic inflammatory response syndrome), mely különböző infekciós vagy nem infekciós eredetű behatásokra adott szisztémás gyulladással válaszreakciót takar (Bone és mtsai, 1992). Ezt az egész szervezetre kiterjedő, több élettani paraméter kóros irányú és/vagy mértékű megváltozását magába foglaló állapotot fertőzésen kívül olyan behatások is kiválthatják, mint súlyos trauma, égés, pancreatitis vagy kardiopulmonalis bypass/ischemia (Binkowska és mtsai, 2015; Huang és mtsai, 1998; Mofidi és mtsai, 2006; Whitlock és mtsai, 2015). Kritériumai megegyeznek a szepszis kritériumaival, azonban fontos kiemelni, hogy nem feltétele az infekció jelenléte. A SIRS kialakulásában etiológiától függetlenül meghatározó szerepet játszik a gazdaszervezet proinflammatorikus és antiinflammatorikus működésének diszkrepanciája (Bone, 1996). Az 1991-es konszenzus konferencia a fertőzéshez társuló szisztémás

gyulladásos válaszreakciót/a szepszis szindrómát a súlyosság illetve szervi diszfunkció alapján három csoportba osztotta fel, melyek a szepszis, a súlyos szepszis és a szeptikus sokk (Bone és mtsai, 1992). Ezen kifejezések pontos definícióját és kritériumait az 1. táblázat tartalmazza.

Bakterémia	Baktériumok jelenléte a véráramban
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome – szisztémás gyulladásos válaszreakció nem infekciós, vagy infekciós eredetű inzultusra kialakuló, egész szervezetet érintő reakció, mely során az alábbi kritériumokból legalább kettő teljesül: - testhőmérséklet > 38°C vagy < 36°C - szívfrekvencia > 90/perc - légzési frekvencia > 20/perc vagy PaCO ₂ < 32 Hgmm - fehérvérsejt szám > 12 000/mm ³ vagy < 4 000/mm ³ vagy > 10% éretlen alak
Szepszis	Infekció következtében kialakuló SIRS
Súlyos szepszis	Szervi elégtelenséggel, hipotenzióval vagy hipoperfúzióval társuló szepszis
Szeptikus sokk	Megfelelő folyadék/volumenpótlás ellenére fennálló, szepszis által kiváltott hipotenzió, melyhez hipoperfúziós abnormalitások társulnak (pl. laktát-acidózis, oliguria, tudatzavar). Szepszis-indukálta hipotenzió: szisztolés RR < 90 Hgmm, vagy az alapértékhez képest > 40 Hgmm csökkenés Inotróp illetve vazopresszor terápia mellett észlelt, normotenzió ellenére fennálló perfúziós zavar is sokknak tekinthető.

1. táblázat Definíciók az 1991-es konszenzus konferencia alapján

Alig egy évtizeddel később, egy nemzetközi konferencia során az 1991-ben megfogalmazott diagnosztikus kritériumokat olyan tünetekkel egészítették ki, mint a koagulopátia vagy hiperglikémia, melyek segítik a diagnózis felállítását (Levy és mtsai, 2003). 2016-ban a klinikai megfigyelések és statisztikai vizsgálatok alapján a definíciókat és diagnosztikus kritériumokat ismét újragondolták. A szepszist jelenleg olyan életet veszélyeztető szervi működési zavarnak értelmezik, melynek a kialakulásáért a szervezet fertőzésre adott kóros mértékű és irányú válaszreakciója a felelős. A súlyos szepszis besorolást eltörölték, a szeptikus sokkot pedig olyan keringési és sejttanyagcsere zavarként definiálták, mely elég súlyos ahhoz, hogy jelentősen megnövelje a beteg mortalitását (Singer és mtsai, 2016; Shankar-Hari és mtsai, 2016).

A szepszis incidenciájának pontos meghatározása a betegpopuláció heterogenitása és vizsgálati kritériumok eltérése miatt nehéz. Ennek ellenére a vizsgálatokból kitűnik, hogy a súlyos szepszis előfordulása az elmúlt évtizedekben (30 év alatt (1979-2009)) komoly emelkedést mutat, mely jelenségnek több oka is van. 1979 és 1987 között az Amerikai Egyesült Államokban a szepszis előfordulása 76/100 000 főről 176-ra emelkedett, amit a HIV/AIDS megjelenésével és a betegségből adódó immunszuppresszióval magyaráztak (CDC, 1990). Ez a trend tovább folytatódott, ugyanis Angus és munkatársai azt mutatták ki, hogy 1995-ben 100 000 lakosra 300 súlyos szepszis eset jutott (Angus és mtsai, 2001). Hasonló eredményeket kapott Martin és munkacsoportja, akik azt találták, hogy 1979 és 2000 között a szepszis 100 000 főre jutó incidenciája 83-ról 240-re emelkedett (Martin és mtsai, 2003). Ez a jelenség többek között az invazív diagnosztikus és terápiás beavatkozások elterjedésével, a növekvő életkorral, az érintettek komorbiditásával és antibiotikum rezisztencia fokozódásával magyarázható (Angus és mtsai, 2001; Balk, 2014). Egy globális előfordulást vizsgáló metaanalízis során a szepszis előfordulása fejlett országokban 288/100 000 lakos, míg a súlyos szepszis gyakorisága 148/100 000 fő volt 1979 és 2015 között, és az incidencia adataik szerint is folyamatosan növekszik (Fleischmann és mtsai, 2016). A mortalitási adatok ezzel szemben más irányú változást mutatnak, annak ellenére, hogy a szepszis mortalitása 20% körüli, míg a szeptikus sokk halálozási rátája az 50%-t is meghaladhatja. A halálozási gyakoriságot a diagnosztikus módszerek fejlődése, szélesebb spektrumú antibiotikumok megjelenése és erőteljes szupportív terápia alkalmazása csökkenteni tudta (Levy és mtsai, 2010). Az USA-ban a halálozási arány 27,8%-ról 17,9%-ra mérséklődött 1979 és 2000 között (Martin és mtsai, 2003). Hasonlóan kedvező eredményeket értek el az európai és ausztrál intenzív terápiás osztályokon a mortalitási ráta közel 20%-s csökkentésével (Brun-Buisson és mtsai, 2004; Kaukonen és mtsai, 2014). Változott a szepszis kórokozó-spektruma is. Míg korábban a Gram-negatív patogének álltak első helyen a szepszis kiváltásáért felelős kórokozók listáján, a Gram-pozitív baktériumok egyre inkább előtérbe kerülnek. Egy, az Amerikai Egyesült Államokban végzett retrospektív vizsgálat szerint az esetek 52,1%-ért Gram-pozitív, 37,6%-ért Gram-negatív baktériumok voltak felelősek. 4,7%-ban több kórokozó, 1,0%-ban anaerob baktérium, míg 4,6%-ban gomba volt a kiváltó. Hasonló eredményeket kaptak egy ausztrál felmérés során, ahol súlyos szepszisben szintén a Gram-pozitív kórokozók voltak túlsúlyban 48,5%-os incidenciával a Gram-negatív patogének 38,5%-os előfordulásával szemben (Finfer és mtsai, 2004). Ugyanakkor egy 2009-ben publikált nemzetközi prospektív tanulmány azt mutatta, hogy az intenzív terápiás ellátást igénylő

fertőzések kapcsán elvégzett bakteriológiai vizsgálatok során továbbra is a Gram-negatív kórokozók dominálnak (Vincent és mtsai, 2009). A leggyakoribb kórokozó baktériumok a Gram-pozitív csoportban a *Staphylococcus aureus* és a *Streptococcus pneumoniae*, míg a Gram-negatívak között, az *Escherichia coli*, különböző *Klebsiella* fajok és a *Pseudomonas aeruginosa* voltak (Suarez de la Rica és mtsai, 2016).

1.2 A szepszis során aktiválódó immunrendszer és a szervkárosodás kapcsolata

A szervezet homeosztázisának fenntartásához szükséges a fertőzések kivédése, legyőzése, fertőző ágensek eliminálása és a szervezet integritásának helyreállítása. Ehhez három rendszer összehangolt, kiegyensúlyozott működésére van szükség. Az első a megfelelő barrier funkció, mely megakadályozza a patogének behatolását (ide tartozik minden szervezetben található membránrendszer, endoteliális és epiteliális réteg, mely szervek, sejtek és sejtorganellumok elválasztásában vesz részt). A második rendszert a veleszületett immunrendszer sejtekből és különböző funkciójú makromolekulákból álló hálózata alkotja, mely a kórokozók felismeréséért, gyors eliminálásáért felelős elsősorban. A harmadikba pedig az adaptív immunrendszer szintén sejtes és molekuláris elemei tartoznak, melyeknek feladata a patogének eliminálásának további elősegítése antitesttermelés útján és az immunológiai memória kialakítása (László és mtsai, 2015). A szepszis kezdeti fázisában a veleszületett immunrendszer révén egy kontrollálatlan proinflammatorikus válaszreakció alakul ki, melyet az egy időben szintén aktiválódó antiinflammatorikus folyamatok nem képesek kompenzálni. Egy kis latenciával, részben a veleszületett immunrendszer által stimulálva, működésbe lép az adaptív immunrendszer is. A proinflammatorikus citokinek, valamint hatásukra különböző leukocitákból és egyéb sejtekből felszabaduló toxikus enzimek és oxidatív ágensek által mediálva, endotél- és szövetkárosodás alakul ki. Ezek következtében felborul a szervezet homeosztázisa. A gazdaszervezet válaszreakciója során apoptózis is indukálódik, főleg limfocitákban és immunsejtekben, valamint különböző szervekben is. A szepszis késői fázisában észlelt fokozott kompenzatorikus antiinflammatorikus válaszreakció (compensatory anti-inflammatory response syndrome-CARS) és az apoptózis következtében létrejön a szepszisben észlelt immunszuppresszív állapot, az immunparalízis. Ezt az állapotot alacsony limfocitaszám, továbbá a mono- és polimorfonukleáris sejtek *in vitro* anergiája jellemzi. Ennek következtében fokozott infekciójajlam alakul ki az érintettekben és könnyen válnak másodlagos, akár opportunistá fertőzések áldozataivá (Boomer és mtsai,

2014). Másrészt a szepszist jellemző kaotikus, túlzó gyulladáshoz és immunfolyamatok súlyos következménye lehet szervek vagy szervrendszerek elégtelen működése, károsodása. Ezt az állapotot többszervi elégtelenségnek vagy többszervi diszfunkciós szindrómának (multiple organ failure-MOF vagy multiple organ dysfunction syndrome-MODS) nevezik (Wiersinga és mtsai, 2014; Sriskandan és Altmann, 2008). Az első, 1991-es meghatározás szerint ez két vagy több szerv akutan fellépő, megelőzően fennálló alapbetegséggel nem magyarázható, súlyos működészavarát jelöli, mely során a szerv a homeosztázis fenntartását nem képes biztosítani külső beavatkozás nélkül (Bone és mtsai, 1992). Károsodhat a kardiovaszkuláris rendszer, a vese, a máj, a bélnyálkahártya, a központi idegrendszer, zavarok léphetnek fel a hormonális, metabolikus rendszerben és a hemosztázisban. Leggyakrabban és szinte elsőként a tüdő károsodik, részben abból adódóan, hogy a nagy vérátáramlás miatt elsőként találkozik a vérben található patogénekkal és immunmediátorokkal (Bilevicius és mtsai, 2001; Brun-Buisson és mtsai, 2004).

1.3 Az ARDS és ALI

A szepszis során kialakuló tüdőkárosodásnak súlyosság és klinikai paraméterek szerint klasszikusan két formája különíthető el: az akut tüdőkárosodás (acute lung injury-ALI) és az akut respirációs distressz szindróma (acute respiratory distress syndrome-ARDS). Mindkettő akutan fellépő, kétoldali diffúz tüdőinfiltrációval járó folyamat, melyre jellemző a nem kardiogén tüdőödéma következményes tüdő légtelenséggel és elégtelen gázcserevel. Az 1994-es Észak-Amerikai-Európai ARDS Konszenzus Konferencia szerint a különbség a kettő között az arteriális oxigén parciális nyomásának (PaO_2) és a belélegzett oxigén frakciónak (FiO_2) a hányadosában van, mely a folyamat súlyosságát, a hipoxia mértékét tükrözi: ALI-nál $200 \text{ Hgmm} < PaO_2 / FiO_2 < 300 \text{ Hgmm}$, míg ARDS-nél $PaO_2 / FiO_2 < 200 \text{ Hgmm}$ (Bernard és mtsai, 1994). Az ARDS legújabb, 2012-ben megfogalmazott úgynevezett berlini definíciója már elveti az akut tüdőkárosodás fogalmát, és súlyosság szerinti beosztást is tartalmaz (2. táblázat) (Ranieri és mtsai, 2012). Az előfordulása igen nagy eltéréseket mutat. Az ezredfordulón az incidencia 79/100 000 fő volt az Amerikai Egyesült Államokban és a mortalitása elérte a 38,5%-t, míg Európában jóval kevesebb embert érint (~20/100 000 fő) közel 40%-s kórházi halálozással (Rubenfeld és mtsai, 2005; Rezoagli és mtsai, 2017).

Időtartam	Egy héten belül fellépő sérülés/inzultus vagy a légzési tünetek romlása
Képzalkotó vizsgálat	Kétoldali opacitás, amelyet más tüdőbetegség nem magyaráz (pl. folyadékgyülem, atelektázia)
Az ödéma eredete	A légzési elégtelenség, melyet nem magyaráz szívelégtelenség vagy folyadék túlterhelés (szívultrahanggal történő objektív meghatározás)
Oxygenizációs zavar	
<i>enyhe</i>	PaO ₂ / FiO ₂ 200 és 300 Hgmm között, PEEP 5 vízcmm felett
<i>közepes</i>	PaO ₂ / FiO ₂ 200 Hgmm alatt, PEEP 5 vízcmm felett
<i>súlyos</i>	PaO ₂ / FiO ₂ 100 Hgmm alatt, PEEP 10 vízcmm felett

2. táblázat Az ARDS 2012-es berlini definíciója (Ranieri és mtsai, 2012)

A tüdőkárosodás hátterében leggyakrabban, az esetek kb. 25%-ban szepszis áll és a szeptikus betegek közel felénél alakul ki tüdőérintettség (Perl és mtsai, 2011; Iscimen és mtsai, 2008). Létrejöttében a szepszis mellett olyan más, extrapulmonalis kórállapotok játszanak szerepet, mint a trauma, égés, pancreatitis, vagy direkt hatások, mint aspiráció, pulmonális kontúzió és bleomycinkezelés (Ware, 2006). Az indirekt tüdőkárosodás kialakulásához hozzájárul az endotél illetve az I és II típusú epitelsejtek integritásának károsodása, leukociták infiltrációja és a surfactans inaktiválása. Indirekt ALI alapja, hogy károsodik a tüdő alveolo-kapilláris egysége. Az endotelsejtek között rések alakulnak ki, az epitelsejtek is elveszítik integritásukat. Ez lehetővé teszi fehérjében gazdag exsudatum beáramlását a tüdő interstíciumba és az alveolusokba. Ezt tovább rontja, hogy károsodik az epitelsejtek működése, és nem képesek eltávolítani a felesleges tüdőfolyadékot. A nagy számban beáramló neutrofil granulocitákból felszabaduló gyulladásos mediátorok, enzimek és reaktív oxigén származékok tovább súlyosbítják a helyzetet. Továbbá az epitelsejtek surfactans termelése is csökken, és a már szekretált surfactant is inaktiválni fogják a különféle enzimek és az exsudatumban található fehérjék. Ezen folyamatok hatására hyalinmembrán, tüdőödéma és sejtes infiltrátum alakul ki, melynek következtében súlyosan csökken a tüdőcompliance, a gázcsere, és hipoxia lesz a következménye (Perl és mtsai, 2011; Han és Mallampalli, 2015; Grommes és Soehnlein, 2011). Bár már számos ponton próbáltak a tüdőkárosodás patogenezisébe beavatkozni, kezelésében továbbra is a hipoxiát csökkentő oxigénterápiának és a kíméletes lélegeztetési stratégiának van kiemelkedő, bizonyított szerepe. Ugyanakkor a magas koncentrációjú oxigén belélegeztetése, az alveolusok összeesése vagy túlfeszülése nem megfelelő

lélegeztetési stratégia következtében, tovább ronthatják az endoteliális és epiteliális sejtkárosodást, valamint tovább fokozzák proinflammatorikus útvonalak aktivitását (Han és Mallampalli, 2015; Manicone, 2009; Amato és mtsai, 1998).

1.4 A Gram-negatív szepszis és a lipopoliszacharid indukálta tüdőkárosodás patomechanizmusa

A behatoló kórokozók a mintázatfelismerő receptorokon (pattern recognition receptor-PRR) keresztül indítják el a veleszületett immunválaszt. Ezek konzervált, patogénekre jellemző makromolekuláris szerkezeteket, úgynevezett patogén-asszociált molekuláris mintázatokat (pathogen associated molecular pattern-PAMP) ismernek fel, mint a Gram-negatív baktériumok külső sejtfa komponense, a lipopoliszacharid (LPS), a bakteriális peptidoglikán, a Gram-pozitív baktériumok sejtfalában termelődő teikolsav, a baktériumok mozgásáért felelős flagellin vagy a bakteriális DNS metilálatlan CpG-motívuma illetve egyes vírusok duplaszálú RNS-e (Wiersinga és mtsai, 2014). Ugyanakkor ezek a receptorok képesek olyan endogén molekulák felismerésére is, melyeket alarminoknak, vagy veszély-asszociált molekuláris mintázatoknak (danger associated molecular pattern-DAMP) is neveznek. Ezek normális esetben elkülönülve, intracellulárisan, meghatározott sejt-kompartimentumban helyezkednek el, és szabaddá válásuk sejt és szövetkárosodásra utal, függetlenül a kiváltó inzultustól (Chan és mtsai, 2012; Krysko és mtsai, 2011). A mintázat felismerő receptorok az alábbiak: a Toll-szerű receptorok (Toll-like receptors-TLR), a C-típusú lektinek, a scavenger-receptorok, valamint a NOD-like (Nucleotide-binding oligomerization domain-NOD) receptorok (Erdei és mtsai, 2012). A TLR-k főként az extracelluláris eredetű ligandok, míg a NOD-like receptorok az intracelluláris kórokozók és a saját szervezet proinflammatorikus molekuláinak felismerésében vesznek részt. A TLR4 lipopoliszacharid általi aktivációja a receptort hordozó sejtek citokintermelését váltja ki. A két legfontosabb proinflammatorikus citokin szepszisben a TNF α (tumor necrosis factor α) és az IL-1 (interleukin), melyekkel egy időben vagy a hatásukra számos más citokin, kemokin és gyulladáshoz vezető mediátor is megjelenik: IL-6, IL-12, IFN- γ (interferon), IL-8 és az antiinflammatorikus IL-10, TGF- β (transforming growth factor β) (Wiersinga és mtsai, 2014). Ezeknek a citokineknek klinikailag is igazolt szerepe van az akut tüdőkárosodás kialakításában, mivel ARDS-ben szenvedő betegek bronchoalveoláris mosófolyadékában szintjük jól korrelál a betegek kimenetelével (Meduri és mtsai, 1995). A TNF α és IL-1 β hatására fokozódik a kemokinek, mint IL-8,

MIP-1 és 2 (macrophage inflammatory protein) termelődése, melyeknek tüdőben az alveoláris makrofágok a fő forrásai (Sriskandan és Altmann, 2008; Goodman és mtsai, 2003). Ezek és más, a szepszis során felszabaduló gyulladáshoz vezető mediátorok, mint a PAF (platelet-activating factor), LTB₄ (leukotrién B₄) vagy a C5a komplementfehérje, a tüdőbe vonzzák a veleszületett immunrendszer sejtjei közé tartozó neutrofil granulocitákat (Grommes és Soehnlein, 2011; Brown és mtsai, 2006). A humán neutrofilekben a kemokinek hatását kétféle receptor mediálja, a CXCR1 és CXCR2 (C-X-C chemokine receptor). Ugyanakkor klinikai vizsgálatokban kimutatták, hogy súlyos szisztémás gyulladásban, így a szepszis által indukált ALI-ban is a CXCR1-nek van jelentősége (Cummings és mtsai, 1999; Goodman és mtsai, 2003). A neutrofil granulociták keringésből a tüdőszövetbe történő infiltrációja fontos eleme a tüdőkárosodás kialakulásának (Brown és mtsai, 2006; Grommes és Soehnlein, 2011). A neutrofil granulociták általában a posztkapilláris vénulák szintjén hagyják el a keringést, de kivételt képez a tüdő, ahol ez a kapillárisokban történik (Brown és mtsai, 2006). Ennek magyarázata, hogy ezen kis átmérőjű erekben a neutrofil granulocitáknak több ideje van az endotéllel való kölcsönhatás kialakítására, és ezt elősegíti az a jelenség is, hogy az aktivált sejtek sokkal rigidebbé válnak (Sriskandan és Altmann, 2008; Grommes és Soehnlein, 2011). Ahhoz, hogy a neutrofil granulociták a transzmigrációnak nevezett folyamat során elhagyhassák a keringést, különböző adhéziós sejt felszíni molekulákra van szükség a saját és az aktivált endotélsejtek membránjában. A transzmigrációhoz szükséges molekulák megjelenéséért többek között a TNF α , IL-1 β és az IFN γ felelős együttesen, valamint szerepet játszanak benne reaktív oxigén származékok is (Commins és mtsai, 2010; Chow és mtsai, 2003). Az első lépés a margináció és a gördülés, mely során a leukocita közel kerül az endotélhez, gyenge kölcsönhatásokon keresztül kapcsolatba lép azzal és annak mentén lassan mozog (gördül). Ezeket a folyamatokat transzmembrán molekulák, úgynevezett szelektinek segítik elő: L-szelektin és a PSGL1 (P-selectin glycoprotein binding ligand-1) a leukocitákon, E- és P-szelektin az aktivált endotéliumon. Ezt követi az adhézió, a szoros kötődés folyamata, mely a leukociták felszínén található heterodimer szerkezetű polipeptid molekuláknak, úgynevezett integrineknek és az endotélsejtek sejt adhéziós molekuláinak (ICAM-1-intercellular adhesion molecule 1, VCAM-1-vascular cell adhesion molecule 1) kölcsönhatásán keresztül valósul meg (Reddy és Standiford, 2010; Brown és mtsai, 2006). Az utolsó lépés a diapedézis, mely során a leukociták áthaladnak az endotélsejtek között, felbontva azok szoros kapcsolatait. Az endotélsejtek egymás helyett a fehérvérsejtek felszínén található hasonló molekulákkal

(JAM-junctional adhesion molecule, PECAM-1-Platelet Endothel Cell Adhesion Molecule-1 stb.) fognak átmeneti kötődést kialakítani (Erdei és mtsai, 2012).

A neutrofil granulociták feladata a patogének eliminálása fagocitózis, reaktív oxigén és nitrogén származékok, antimikrobiális peptidek illetve lítikus enzimek termelése útján. Ezen védekező mechanizmusok szepszisben és akut tüdőkárosodásban azonban már nemcsak a patogéneket, hanem a saját szervezetet is megtámadják. A neutrofilekből felszabaduló szerin-proteázok (pl. elasztáz) és antimikrobiális hatású kationos polipeptidek (laktoferrin vagy különféle defenzinek) fokozni képesek proinflammatorikus citokinek termelését, az elasztáz lebontja a surfactans fehérjéket, valamint egyes fajtáik proapoptotikus hatást gyakorolnak a tüdő endotél- és epitelsejtjeire. Káros hatásukat ALI-ban jól alátámasztja az a tény, hogy emelkedett szintjük ARDS-ben szenvedő betegek bronchoalveoláris mosófolyadékában jól korrelál a betegség súlyosságával illetve hátrányos kimenetelével. A szintén neutrofil granulocitákból származó cink-függő endopeptidázoknak, a mátrix-metalloproteinázoknak szintén igazolták a szerepét ALI patogenezisében (Grommes és Soehnlein, 2011). A polimorfonukleáris sejtek káros következményeihez hozzájárulnak a gyulladással stimulált felszabaduló neutrofil extracelluláris csapdák (neutrophil extracellular trap-NET). Ezek az előbb említett antimikrobiális peptideken kívül granulocita kromatint, DNS-t és hisztonfehérjéket tartalmaznak és hálós szerkezetet hoznak létre a kórokozók körül. Eredeti funkciójuk a patogének immobilizálása és elpusztítása, ALI-ban viszont az endotél- és epitelsejtek apoptózisát váltják ki (Kaplan és Radic, 2012; Han és Mallampalli, 2015). A NET a TLR és az NLRP3 inflammaszóma (NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3) rendszeren keresztül fokozza a gyulladással citokinek megjelenését, melyek ugyanakkor a NET felszabadulását képesek indukálni. Ezek a csapdák DAMP-ként a steril gyulladás fenntartásában játszanak szerepet (Allam és mtsai, 2014). Kiemelendő, hogy a tüdőbe szekvesztrálódott aktivált neutrofil granulocitákra a különböző proinflammatorikus mediátorok, mint LPS, IL-1 vagy TNF α antiapoptotikus stimulust is gyakorolnak, ezáltal ezek a sejtek tovább képesek ártalmas hatásukat kifejteni a szövetekben (Perl és mtsai, 2011). Endotoxémia kiváltotta ALI-ban, a neutrofil granulocitákkal ellentétben, a tüdő epitél- és endotélsejtjeiben több mediátor is apoptózist vált ki. Ennek egyik fő mechanizmusa a neutrofil granulocitákból és más immunsejtekből felszabaduló FasL (Fas ligand) által indukált receptor-mediált sejthalál, melyet ARDS-ben szenvedő betegek bronchoalveoláris mintáinak magas FasL koncentrációja és az ezzel

arányos kedvezőtlen kimenetel is alátámaszt (Hashimoto és mtsai, 2000; Matute-Bello és mtsai, 1999).

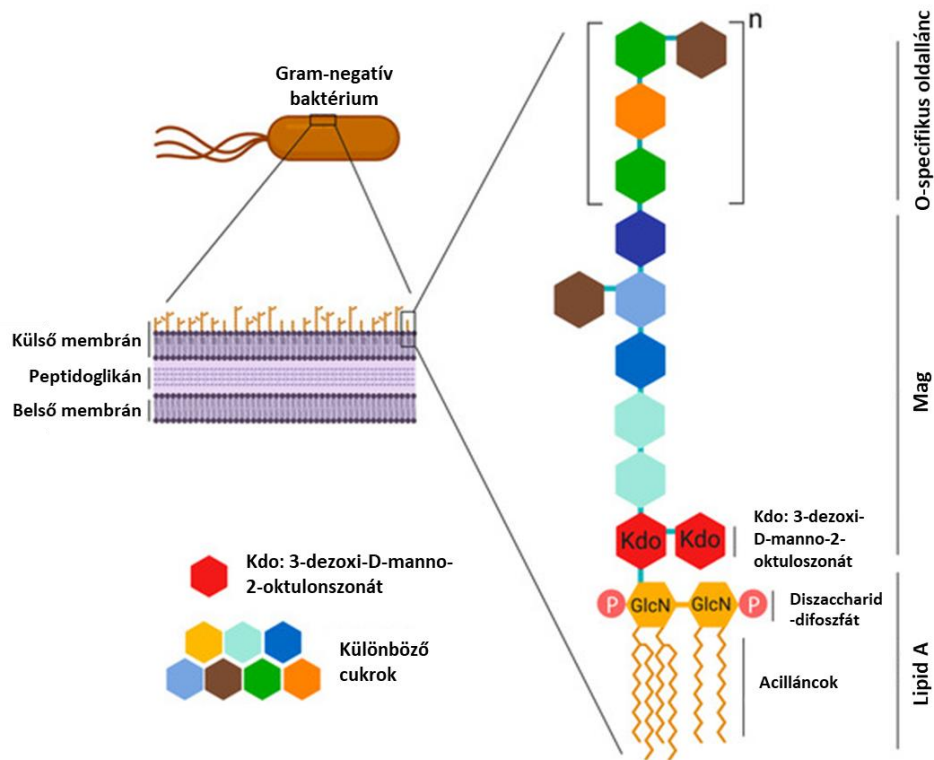
Nem csupán a sejtek elhalása révén károsodik a szervek funkciója. A szepszis egyik markáns jelensége az endotél-diszfunkció, melyet a gazdaszervezet inflammatorikus reakciója során felszabaduló ágensek hoznak létre. Az endotélsejtek aktiválódása és károsodása nagymértékben hozzájárul az ARDS kialakulásához is. A tüdőben található erek endotélsejtjei lokális vagy szisztémás stimulus hatására, mint LPS, citokinek, maguk is képesek gyulladáshoz vezető mediátorok (citokinek, kemokinek, leukotriének, prosztaglandinok, trombocita stimuláló faktorok) és reaktív oxigénradikálok termelésére. Részt vesznek a saját termékeik, de legfőképp a neutrofil granulocitákból felszabaduló gyulladáshoz vezető mediátorok, lítikus enzimek, ROS és RNS molekulák károsítják az endotélsejtek szerkezetét, funkcióját és fokozzák a permeabilitásukat (Chow és mtsai, 2003; Orfanos és mtsai, 2004). Az endotélsejtek által termelt TXA₂ (tromboxánA₂), vWF (von Willebrand faktor) vagy PAF elősegíti a vérlemezék aggregációját a kis erekben, mely a szepszisben jellemző prokoaguláns állapottal együtt trombusképződéshez vezet a szervekben, így a tüdőben is (Orfanos és mtsai, 2004; Zarbock és Ley, 2009). Az endotélsejtek fontos szerepet játszanak szepszisben a prokoaguláns állapot létrejöttében. (Glas és mtsai, 2013; Wiersinga és mtsai, 2014). Ezenfelül a véralvadási kaskád egyes komponensei és a trombocita-aggregáció markerei, mint a thrombin, PAF és tromboxánA₂ szintén fokozni tudják az endotélsejtek permeabilitását (Orfanos és mtsai, 2004). A véralvadási kaskád fokozott működéséből adódó fibrin képződés és az endotélsejtek megnövekedett permeabilitása hozzájárulnak az intersticiális és alveoláris fibrindepózitumok keletkezéséhez. A fibrin tartalmú hyalinmembrán inaktiválja a surfactantot, gátolva így a megfelelő gázcsere és kóros szöveti regeneráció során a fibrózis alapját képezheti (Glas és mtsai, 2013).

Mindezen autodestruktív gyulladáshoz vezető folyamatokban kiemelkedő szerepe van a különböző sejtek és mechanizmusok által termelt reaktív oxigén és nitrogén származékoknak.

1.5 A Gram-negatív baktériumok fegyvere, az LPS

A Gram-negatív baktériumok külső membránjában található lipopoliszacharid által generált eltúlzott gyulladáshoz vezető válaszreakció felelős szepszisben betegek ezreinek haláláért. A baktériumok sejt falának különböző komponensei kiemelkedően fontosak a sejt élete illetve a gazdaszervezet válaszreakciója szempontjából. A Gram-negatív baktériumok külső burka három jól elkülöníthető rétegből áll. A legbelső a foszfolipid kettősréteg által

felépített belső membrán, ami az eukarióták sejtmembránjának megfelelője. Ennek külső felszínén található egy, a Gram-pozitív kórokozókhoz képest jóval vékonyabb peptidoglikánréteg, amelyet mind külső, mind belső felszínén zselés anyag, a periplazma vesz körül. Legkívül az úgynevezett külső membrán helyezkedik el. Ez foszfolipidekből, különböző fehérjékből és lipopoliszacharidból áll. A lipid alkotórészek eloszlása azonban nem egyenletes, a külső felszínen szinte kizárólag a lipopoliszacharidok találhatók, míg a belső felszín foszfolipidek alkotják (Beveridge, 1999). A lipopoliszacharid szintén három fő részből áll, ezek a belső hidrofób lipid A rész, a középső mag és a külső hidrophil O-specifikus oldallánc. Utóbbi különböző számú identikus alegységekből épül fel, melyet 1-8 közönséges hexóz illetve hexózamin alkot. A cukrok sokfélesége és az ismétlődések száma a különböző baktériumoknál eltérő. Ez a változatosság felelős az LPS antigén hatásáért, illetve az O-specifikus oldallánc alapján történik a kórokozók szerológiai csoportosítása. A mag (core) felosztható külső (outer core) és belső magra (inner core). A külső mag variábilis, közönséges hat szénatomos cukrokból épül fel. A konzervált belső magot azonban ritkább előfordulású szacharidok alkotják, ezek közül is kiemelendő a Kdo (3-dezoxi-D-manno-2-oktuloszonát), ami szinte minden Gram-negatív baktériumban megtalálható, azok létszükséges eleme. Az endotoxin hatásért a külső membránrétegbe süllyedő lipid A komponens a felelős. Ennek vázát egy diszacharid alkotja, a β -D-GlcN-(1-6)- α -D-GlcN, amihez két foszfátcsoporthoz és négy zsírsav kapcsolódik. Mind a foszfát, mind a zsírsavak további módosításokon mehetnek keresztül, a foszfátcsoporthoz például cukrok, aminoalkoholok, míg az acilcsoportokhoz további zsírsavak kötődhetnek. Az endotoxikus hatás mértékét a zsírsavak száma és hossza, valamint a szénhidrátváz foszforiláltsági állapota befolyásolja. Ez teszi lehetővé, hogy a különböző baktériumfajok LPS szerkezete eltérő és máshogy hat a szervezetre (Rietschel és mtsai, 1994; Erridge és mtsai, 2002; Mazgaen és Gurung, 2020). Az LPS vázlatos szerkezetét és elhelyezkedését az 1. ábra mutatja be.



1. ábra Az LPS vázlatos szerkezete és elhelyezkedése (Mazgaen és Gurung, 2020)

1.6 A TLR4 mediált jelátvitel és az NF- κ B aktiváció

Az LPS hatását a TLR4 receptoron keresztül fejti ki. A TLR receptorcsalád a mintázat felismerő receptorok közé tartozik, melynek eddig 10 humán típusa ismert (Yamamoto és Takeda, 2010). Szerkezete és működése nagyban megegyezik az IL-1 receptorcsaláddal (O'Neill, 2008). A TLR receptorok transzmembrán proteinek, melyek felépítésében három domén vesz részt: a leucinban gazdag extracelluláris aleggység (LRR-leucin rich repeat domén), a transzmembrán rész és a citoplazmatikus TIR domén (Toll-IL-1-resistance). A receptoroknak eltérő a sejten belüli lokalizációja és más-más patogén- illetve veszély-asszociált molekuláris mintázat felismeréséért felelősek, melyeket a 3. táblázat foglal össze.

Humán Toll-szerű receptorok	Exogén ligand	Lokalizáció
TLR1	Triacil-lipopeptidek	sejtfelszín
TLR2	Lipoproteinek, peptidoglikán, lipoteikolsav	sejtfelszín
TLR3	duplaszálú RNS	intracelluláris
TLR4	LPS	sejtfelszín
TLR5	Flagellin	sejtfelszín
TLR6	Diacil-lipopeptid	sejtfelszín
TLR7	egyesszálú virális RNS	intracelluláris
TLR8	egyesszálú virális RNS	intracelluláris
TLR9	metilálatlan CpG tartalmú DNS	intracelluláris
TLR10	ismeretlen	sejtfelszín

3. táblázat A humán Toll-szerű receptorok (Yamamoto és Takeda, 2010; Erdei és mtsai, 2012)

Közös jellemzőjük, hogy hetero- vagy homodimer formában aktívak, és a jelátviteli folyamatok elindításához a TIR doménnel kapcsolatba lépő adaptorfehérjékre van szükségük, melyek a MyD88 (myeloid differentiation factor 88), a TRAM ((TRIF)-related adaptor molecule), a MAL (MyD88 adaptor like) vagy másnéven TIRAP (TIR domain containing adaptor protein), a TRIF (TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN β) és a SARM (sterile α - and armadillo-motif-containing protein) (O'Neill és Bowie, 2007). Először a 90-es évek végén, egy mutáns sejtvonalon, majd valamivel később TLR4 génhányos egereken mutatták ki, hogy a TLR4-nek az LPS a ligandja (Poltorak és mtsai, 1998; Hoshino és mtsai, 1999). Az LPS és TLR4 interakciója a CD14 és a MD2 koreceptorok közreműködésével történik. A CD14 fehérje, melyet glikozilfoszfatidilinozitol lánc rögzít a membránba, a lipopoliszacharid kötő fehérjétől (LPS binding protein-LBP) átveszi az LPS-t és a TLR4/MD-2 komplexnek adja át. A CD14 elengedhetetlen a receptor aktivációjához, amit az is bizonyít, hogy hiányában az egerek ellenállóak az endotoxin kiváltotta szepszissel szemben, ugyanakkor, mivel nem rendelkezik intracelluláris doménnel, a jelátvitelben nem vesz részt (Haziót és mtsai, 1996). Az LPS megkötéséért elsősorban a TLR4-hez asszociált, extracelluláris, szolubilis

koreceptor, a MD-2 felelős, mivel a lipid A acilcsoportjainak jelentős hányadával ez a molekula lép kapcsolatba. Az LPS kötődése a TLR4/MD-2 komplexhez annak dimerizációját okozza mind az extra-, mind az intracelluláris doménekben. Ennek következtében aktiválódnak a dimerizált, TIR domént tartalmazó intracelluláris alegyének, melyekhez hasonló TIR domént tartalmazó adapter molekulák fognak kötődni. Ez lehetővé teszi további kapcsoló fehérjék és különböző kinázok aktivációját, ami elvezet a proinflammatorikus gének expressziójához az NF- κ B által (Park és Lee, 2013). Az NF- κ B proinflammatorikus transzkripció faktort a TLR4 receptor ligandkötése kétféle módon aktiválhatja. Az egyik útvonal esetében egy TIR domént tartalmazó közvetítő fehérje, a TIRAP vagy MAL rögzíti a MyD88 proteint a TLR4-hez (Fitzgerald és mtsai, 2001). A receptor-ligand kapcsolódást követően a MyD88 homológ halál-domének kölcsönhatásán keresztül heterodimert alkot az IRAK4-vel (IL-1 receptor kináz 4), majd az IRAK1-vel és IRAK2-vel. Az IRAK1 foszforilációja lehetővé teszi interakcióját a TRAF6 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 6) fehérjével, ami így aktiválódni fog (Janssens és Beyaert, 2003; Lin és mtsai, 2010; Roy és mtsai, 2016).

A másik jelátviteli kaskád, mely a TLR4 receptorból indul ki, az úgynevezett MyD88-független útvonal. Itt a TRAM nevű adapter segítségével alakul ki kölcsönhatás a LPS-t kötő TLR4 homodimer intracelluláris alegységei és a TIR domént tartalmazó TRIF között. A TRIF egyrészt az IKK ϵ (I κ B kinase) és a TBK1 (TANK-binding kinase) részvételével az IRF-3 és IRF-7 (interferon regulatory factor) transzkripció faktorok aktivációját idézi elő, melynek hatására fokozódik az I-es típusú interferonok termelése (Fitzgerald és mtsai, 2003). Másrészt a TRIF a RIP1 (receptor interacting protein 1) fehérjén keresztül kölcsönhatásba lép a TRAF6-val (Jakus és mtsai, 2013).

A TRAF6 funkciója mindkét útvonal működése során kulcsfontosságú az NF- κ B aktivációja szempontjából (Roy és mtsai, 2016). A TRAF6 E3 ubikvitin ligáz aktivitással rendelkezik, és egy ubikvitinációs komplex részeként, a 63-as lizinen keresztül poliubikvitin láncot alakít ki a vele kapcsolatba lépő proteineken, a RIP1-n, az IRAK1-n illetve saját magán is. A poliubikvitin láncok felületet biztosítanak egy fehérjekomplex kialakulásához. Ezeket a poliubikvitin láncokat felismerő TAB2 és 3 (TAK1 binding protein 2/3) molekulákhoz fog kötődni a TAK1 (transforming growth factor- β activated kinase-1), mely a szintén ubikvitin felismerésre képes NEMO-t (NF- κ B essential modulator) tartalmazó IKK-komplexet (I κ B-kinase complex) aktiválja foszforiláció útján, ami az NF- κ B -útvonal tagja (Takaesu és mtsai, 2000; Wang és mtsai, 2001; Rahighi és mtsai, 2009).

Az NF- κ B kulcsfontosságú transzkripciós faktora a veleszületett immunrendszernek. Az NF- κ B fehérjecsaldnak emlősökben öt tagja ismert (p65/RelA, RelB, cRel, p50, és p52), melyek nyugalmi állapotban homo- illetve heterodimer formában (relA, relB vagy relC), az I κ B (inhibitor- κ B) regulátoros fehérjéhez kötve vannak jelen a citoplazmában. A TLR4 jelátvitel során az IKK-komplex TAK1 általi foszforilációja annak aktivációjához vezet. Az IKK-komplexnek katalitikus aktivitással rendelkező alkotói az IKK α (I κ B-kinase) és az IKK β , míg a NEMO regulátoros funkcióval bír. Az IKK-k szerinen történő foszforiláció útján válnak aktívvá. IKK-kináz funkcióval többek között a TAK1, a MEKK3 (MAPK/ERK kinase kinase) rendelkezik. Az I κ B-kinázok foszforilálják az I κ B-t a 32. és a 36. szerin oldalláncokon, mely ezt követően ubikvitinálódik, majd proteaszómáisan lebontásra kerül. Az így felszabaduló NF- κ B ezután transzlokálódik a nukleuszba és elindítja a célgének expresszióját (Vermeulen és mtsai, 2002; Israél, 2010; Roy és mtsai, 2016). A transzlokáció mellett a p65 alegység foszforilációja is befolyásolja a transzkripciós faktor aktivitását. A p65 alegységet különböző kinázok többféle szerin alegységen foszforilálják, ami szükséges a megfelelő DNS kötő kapacitás és transzaktivációs potenciál kialakulásához. Az egyik ilyen kiemelt jelentőségű szerin oldallánc, az 536., melyet többek között az IKK-komplex katalitikus tagjai foszforilálnak (Sakurai és mtsai, 1999; Madrid és mtsai, 2001; Viatour és mtsai, 2005). Emellett intranukleárisan számos más módosítás is éri az NF- κ B alegységeit.

1.7 MAPK-k és az Akt szerepe az NF- κ B aktivációban

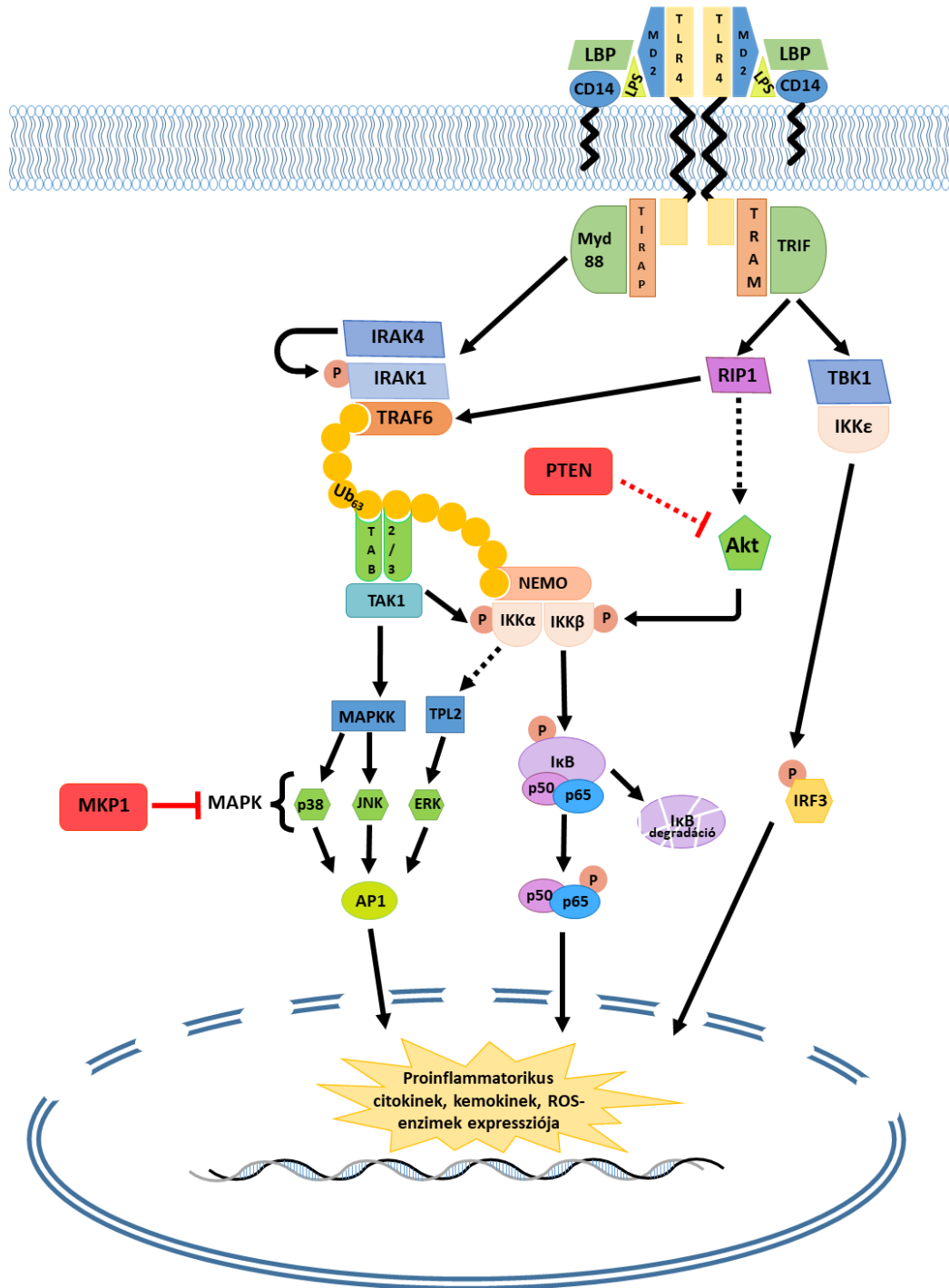
A gyulladási folyamatokban részt vevő gének és transzkripciós faktorok - mint az NF- κ B - regulációjában számos intracelluláris protein-kináz is részt vesz. A mitogén aktivált protein-kinázok (mitogen-activated protein kinase-MAPK) szerin/treonin kinázok, melyek emlősökben előforduló három képviselője az ERK (extracellular signal-regulated kinase), a p38 és a JNK (c-Jun NH₂-terminal kinase). A MAPK-jelátvitel több fiziológiás és patológiás folyamatban is szerepet játszik, mint a proliferáció, differenciáció, sejthalál/túlélés vagy különféle noxákra adott stresszválaszok. Utóbbiak közé tartoznak az LPS, az inflammatorikus citokinek vagy az oxidatív stressz (Kim és Choi, 2010; Yu és mtsai, 2015; Roy és mtsai, 2016). A MAPK-szignáltranszdukció klasszikusan legalább három komponensből épül fel: adott stimulus hatására a MAPKKK (MAPKK kinase) foszforiláció útján aktiválja az alatta lévő MAPKK-t (MAPK kinase), ami ennek hatására foszforilálja a MAPK-t. Az aktivált MAPK-k ezt követően transzlokálódnak a sejtmagba

és többféle transzkripciós faktort foszforilálnak, valamint szerepet játszanak az NF- κ B transzaktivációs potenciáljának fokozásában (Van den Berghe és mtsai, 1998; Vermeulen és mtsai, 2002). Régóta ismert tény, hogy az LPS aktiválja a MAPK-kat és ebben szerepet játszanak a TLR4 jelátvitel szereplői is (Rao, 2001; Guha és Mackman, 2001; Roy és mtsai, 2016). A TLR4 szignáltranszdukcióban résztvevő TAK1 nemcsak az IKK-komplex aktiválásáért felelős, hanem MAPKKK funkcióval is bír, így a JNK és p38 MAPK-k foszforilációját végző MEKK6-t is aktiválja (Wang és mtsai, 2001). Az ERK aktivációja ugyanakkor az IKK-komplex és a Cot/Tpl-2 nevű kináz interakciója révén valósul meg, utóbbi a MAPKK szerepet betöltő MEK1/2-t foszforilálja (Beinke és mtsai, 2004; Bandow és mtsai, 2012; Gantke és mtsai, 2011). Számos vizsgálat igazolta, hogy a MAPK-k a TLR4 és egyéb jelátviteli útvonalakon keresztül részt vesznek az LPS indukált tüdőkárosodás kialakulásában, patogenezisének fontos lépéseiben. Elengedhetetlenek a tüdőben az alveoláris makrofágok aktiválásához, a proinflammatorikus citokin és kemokin termeléshez, szerepet játszanak a neutrofil granulociták toborzásában, az endotélsejteken az adhéziós molekulák megjelenésében és a bronchokonstriktióban (Tamura és mtsai, 1998; Jarrar és mtsai, 2002; Schnyder-Candrian és mtsai, 2005; Thorley és mtsai, 2011). A MAPK-k inaktiválása defoszforiláció útján történik, melyet duálspecifikus fehérjefoszfatazok, az úgynevezett mitogén aktivált protein-kináz foszfatazok (MAPK phosphatase-MKP) hajtanak végre. Az MKP-k a MAPK-k tirozin és treonin oldalláncain található foszfátcsoportokat hasítják le. Emlős sejtekben 11 fajtájuk ismert, léteznek csak nukleárisan, csak citoplazmatikusan illetve mindkét kompartmentben aktív képviselőik. Különböző szubsztrátspecificitásuk is, egyes tagjaik csak egy, míg mások mind a három MAPK-t képesek inaktiválni (Owens és Keyse, 2007; Patterson és mtsai, 2009). Regulációjuk több síkon valósul meg. Egyrésztől számos, a MAPK szignáltranszdukciót elindító stimulus egyidőben kiváltja az MKP-k fokozott transzkripcióját, negatív feedback mechanizmust létrehozva, ami csillapítja a MAPK-kaszkádot. Másrésztől a MKP-k poszttranszlációs módosuláson is átesnek, egyes típusaikat a célfehérjéik foszforilálni képesek, ami megakadályozza ubikvitinációjukat és következményes degradációjukat. A hiszton acetiláció elősegíti az MKP-1 expresszióját, míg a molekula acetilációja a szubsztrátkötőképességet növeli (Brondello és mtsai, 1999; Chi és Flavell, 2008).

A nukleáris lokalizációjú MKP-1 mindhárom MAPK-t képes inaktiválni (Owens és Keyse, 2007; Slack és mtsai, 2001). Szerepét az inflammatorikus folyamatok negatív szabályozásában számos vizsgálat alátámasztja. Hiányában magasabb a mortalitás állatokban endotoxémiát követően, elhúzódóbb a MAPK-k aktivitása és fokozottabb a

citokin és kemokin termelés (Hammer és mtsai, 2006; Zhao és mtsai, 2006). Feltételezhetően szerepe lehet a tüdőben is az LPS hatására létrejövő károsodás enyhítésében. Különböző tüdő eredetű sejttenyészetben elvégzett vizsgálatok igazolták, hogy ezekben a sejtekben is szerepe van a gyulladási folyamatok mérséklésében (Yadav és Chandra, 2017; Keränen és mtsai, 2017).

Az NF- κ B aktivációjához és a gyulladási folyamatok kialakulásához az Akt nevű szerin/treonin kináz is hozzájárul. Az Akt vagy más néven PKB (protein-kináz B) a PI-3K (foszfatidilinozitol-3-kináz) útvonal egyik célfehérjéje. Az útvonal főleg a metabolizmus, a proliferáció és apoptózis szabályozásában vesz részt. Különböző extracelluláris stimulusokat közvetítő, tirozinkináz aktivitással rendelkező illetve G-protein asszociált receptorok a PI-3K család I. altípusait aktiválják, mely enzimek a sejtmembránban található foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát (PIP₂) molekulákat foszforilálják. A keletkező PIP₃ (foszfatidilinozitol-3,4,5-triszfoszfát) a szintén szerin/treonin kináz aktivitással rendelkező PDK1-t (foszfatidilinozitol dependens kináz 1) stimulálja, ami az Akt foszforilációjáért felelős (Nicholson és Anderson, 2002). A PI3K/Akt útvonal negatív szabályozásában a PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) nevű, foszfatáz aktivitással rendelkező tumor szuppresszor fehérje vesz részt a PIP₃ degradációja által (Kim és mtsai, 2018). A PI3K/Akt és a TLR4 jelátvitel kapcsolódását számos vizsgálat alátámasztja, ugyanakkor a hatás iránya sejtspecifikus (Hazeki és mtsai, 2007; Lee és mtsai, 2003; Zhao és mtsai, 2014; Kim és mtsai, 2009). Egyes eredmények alapján az Akt aktivációja a MyD88 függő módon történik, míg más vizsgálatok szerint a TLR4 jelátvitel MyD88 független ágához tartozó RIP1 képes a PI3K-t és ezáltal az Akt-t is aktiválni (Lee és mtsai, 2003; Roy és mtsai, 2016). LPS indukálta gyulladási tüdőfolyamatokban, akut tüdőkárosodásban kimutatták, hogy az Akt hozzájárul az NF- κ B aktiválásához, gyulladási citokinek termeléséhez, fibroblasztok proliferációjához (Yum és mtsai, 2001; Meng és mtsai, 2018; He és mtsai 2012; Lee és Yang 2012). Igazolták, hogy a PI3K és az Akt szerepet játszik a p53 alegység 536. szerin oldalláncának foszforilációjában és transzaktivációs potenciál fokozásában, melyhez szükséges a MAPK-k és IKK-k közreműködése (Madrid és mtsai, 2001; Bozinovski és mtsai, 2002; Viatour és mtsai, 2005).



2. ábra TLR4 jelátvitel, a kanonikus NF- κ B-aktiváció és a kapcsolódó kinázok szerepének bemutatása. (A folytonos vonalak direkt hatást vagy foszforilációt jelölnek, míg a szaggatott vonal indirekt kapcsolatra utal.)

1.8 Reaktív oxigén és nitrogén származékok

Az inflammatorikus állapotok, mint a szepszis és az endotoxémia indukált akut tüdőkárosodás patogenezisében fontos szerepe van a különböző sejtek és mechanizmusok által termelt reaktív oxigén és nitrogén származékoknak (Victor és mtsai, 2004; Lang és mtsai, 2002). Az aerob sejtek reaktív oxigén származékok (ROS) termelésére képesek, melyekben az oxigénatom eltérő redukáltsági állapotban található meg, ezért magasabb a reaktivitásuk. A ROS-k mind célzottan, mind melléktermékként keletkezhetnek a szervezetben (Genestra, 2007). Az egyik legnagyobb mennyiségben termelődő ROS a szuperoxid anion ($O_2^{\cdot-}$), mely az oxigén egy elektronos redukciójával képződik. Célzottan a NADPH oxidáz enzim termeli, mely aktív formában egy öt alegységből álló, membránhoz kötött enzim. Megtalálható különböző fagocita sejtekben (neutrofil granulociták, monociták) és a sejt-mediált immunválaszban, a kórokozók leküzdésében van szerepe (Babior, 1999). Aktivitása felelős a régóta ismert "légzési robbanás" jelenségéért, mely folyamat során fokozódik a leukociták oxigénfelhasználása a ROS-termelés céljából (Johnston és mtsai, 1978). A fagocita NADPH oxidáz az NF- κ B regulációja alatt áll (Anrather és mtsai, 2006). Ugyanakkor nem-fagocitasejtek, mint endotélsejtek, fibroblasztok is rendelkeznek NADPH oxidázzal (Zweier és mtsai, 1994; Griendling és mtsai, 2000). Az akcidentális szuperoxidanion képződés helye többek között a mitokondriális légzési lánc I és III komplexe, és számos ágens, így a proinflammatorikus TNF α képes a mitokondriális ROS produkció fokozására (Richter és mtsai, 1995; Bulua és mtsai, 2011). A szuperoxidanion dizmutációja során, mely enzimatikusan vagy alacsony pH-n spontán történik, hidrogénperoxid képződik (Fridovich, 1989). A hidrogénperoxidból fémionok jelenlétében a Fenton-reakció vagy a Haber-Weiss reakció során hidroxilgyök (OH^{\cdot}) keletkezik. Ez a legreaktívabb oxigénszabadgyök, igen rövid féléletidővel rendelkezik és mindennemű molekulával képes reakcióba lépni (Mello Filho és Meneghini, 1984; Halliwell és Gutteridge, 1992). Neutrofil granulocitákban a hidrogénperoxidot (H_2O_2) a myeloperoxidáz enzim hipoklórsavvá (HOCl) alakítja, ami a fagoszómákon belül mikrobicid hatást fejt ki (Kato, 2016). Hidrogénperoxid és szuperoxidanion melléktermékként létrejön a metabolizmus során a ciklooxigenáz enzim, a lipoxigenáz, a xantin oxidáz vagy a citokróm p450 rendszer hatására is. A proinflammatorikus transzkripciós faktor, az NF- κ B képes ezen enzimeknek az expresszióját befolyásolni (Victor és mtsai, 2004; Morgan és Liu, 2011; Maia és mtsai, 2005; Kotake és mtsai, 1998; Arakawa és mtsai, 1995). Ezt részben az magyarázza, hogy

a leukotriének és prosztaglandinok számos gyulladási folyamatban, az immunválaszban is részt vesznek. Ezenfelül a környező sejteken található receptoraikon hatva további reaktív oxigén származékok termelését is fokozni képesek (Cho és mtsai, 2011). A szervezetben reaktív oxigén származékok mellett egy másik potenciális gyök, NO is termelődik, mely L-argininből NADPH felhasználásával, citrullin keletkezése mellett szintetizálódik. Fiziológiai folyamatokban szintéziséért a konstitutívan aktív endoteliális és neuronális NO-szintáz (eNOS/nNOS) felelős. Élettani hatásai az erek tónusának, a trombocita aggregációnak szabályozása, tanulás, memória kialakítása (Moncada és Higgs, 1991). Patológiai folyamatokban, így szepszisben is kialakuló, nagyobb mennyiségű NO termelésért az indukálható izoforma (iNOS) felelős, melynek fokozott aktivitását LPS és számos citokin (IFN γ , TNF α , IL-1 β) kiválthatja szintén az NF- κ B transzkripciós faktoron keresztül. Az NO és a szuperoxid anion reakciója során az igen reaktív peroxinitrit (ONOO \cdot) keletkezik, de az NO más oxigén származékokkal reakcióba lépve egyéb reaktív nitrogén származékokat (RNS) is létrehozhat (Bian és Murad, 2001; Kristof és mtsai, 1998; Victor és mtsai, 2004).

A szervezetben számos lehetőség létezik a ROS-k eliminációjára, közömbösítésére antioxidatív mechanizmusok révén. Ide tartoznak olyan molekulák, melyek redukálni képesek a szabadgyököket: a C-vitamin, az E-vitamin, az urát, a lipoát, a β -karotén vagy a glutation (Genestra, 2007). Utóbbi szabad tiolsocporttal rendelkező tripeptid, mely diszulfidkötés létrehozása mellett képes reaktív származékokat, fehérjékben oxidált cisztein-oldalláncokat redukálni, és a glutation-S-transzferáz által elektrofil anyagokat konjugálni (Aggarwal és mtsai, 2012). Az antioxidáns enzimek közé tartoznak a citoszolikus (CuZn-SOD) és a mitokondriális (Mn-SOD) szuperoxid-dizmutáz, melyek H₂O₂-vé redukálják a O₂ \cdot -t (Fridovich, 1989). A H₂O₂ eliminálásáért a glutation-peroxidáz és a peroxiredoxinok, valamint a kataláz felelősek. Előbbiek cisztein oldalláncaik segítségével vízzé redukálják a hidrogénperoxidot, majd oxidált oldalláncaikat cisztein tartalmú kis molekulák, a glutation és tioredoxin regenerálják. A kataláz hem tartalmú, peroxisómális enzim (Winterbourn, 2013).

A reaktív oxigén és nitrogén származékok kontrollált mennyiségben jelátviteli és számos egyéb fiziológiai funkcióval bírnak, és elengedhetetlenek a kórokozók elleni védekezésben. Ezt bizonyítja, hogy ROS képzésre képtelen KO állatokban csökken a baktériumok eliminációja (Dröge, 2002; Gao és mtsai, 2002). Ha azonban felborul az egyensúly a ROS/RNS termelés és az antioxidatív folyamatok között, oxidatív stressz jön létre, melynek számos kórkép, így a szepszis és az ARDS kialakulásában is vezető szerepe

van. Az LPS és a hatására felszabaduló citokinek fokozzák a tüdőben az alveoláris és intersticiális makrofágok, szekvesztrált neutrofil granulociták, epitel- és endotélsejtek ROS és RNS termelését. Ezek a molekulák károsítják a DNS-t, pontmutációt és lánctörést okoznak. Lipidperoxidációt létrehozva módosítják a membránok fluiditását, hatásukra fokozódik a sejtek illetve erek permabilitása. Fehérjék oldalláncait, a szulfhidril csoportokat oxidálják, az NO-ból származó peroxinitrit nitrozilálja a tirozinláncokat, ennek következtében megváltozik a fehérjék konformációja és aktivitása. Mindezen folyamatok végül sejthalálhoz vezetnek. (Victor és mtsai, 2004; Chow és mtsai, 2003; Lang és mtsai, 2002; Aggarwal és mtsai, 2012).

Az inflammatorikus jelátvitel résztvevői és a reaktív oxigén és nitrogén származékok odavissza hatást gyakorolnak egymásra. A ROS-k és RNS-k képesek a proinflammatorikus citokinek, sejtadhéziós molekulák és a saját képződésükért felelős enzimek expresszióját fokozni a redoxszenzitív transzkripció faktorokon, így az NF κ -B-n (és az AP-1-n) keresztül (Lee és Yang, 2012). A H₂O₂ fokozza az NF- κ B DNS-kötő kapacitását, az IKK γ /NEMO dimerizációt és az IKK-k foszforiláltsági állapotát (Meyer és mtsai, 1993; Herscovitch és mtsai, 2008; Kamata és mtsai, 2002). Számos vizsgálat igazolta, hogy az oxidatív stressz növelni képes a MAPK-k aktivitását (Park és mtsai, 2015; Haddad és Land, 2002). Ez a hatás magyarázható részben a MAPK szerkezetének módosulásával, MAPKK-k és MAPKKK-k redoxérzékenységgel, mely elősegíti a foszforilációt, másrészt a MAPK-k inaktiválásáért felelős foszfatázok gátlásával (Son és mtsai, 2013; Kamata és mtsai, 2005; Kim és mtsai, 2012). Ugyanakkor az LPS hatására bekövetkező ROS és RNS termelés MAPK függő és MKP-1 által gátolható (Huo és mtsai, 2011; Singh és mtsai, 2016). A PI3K/Akt út vonal is elengedhetetlen az LPS indukálta ROS szintézishez, míg az Akt defoszforilációját végző PTEN duál-foszfatázt a H₂O₂ gátolja (Kim és mtsai, 2012 b; Lee és mtsai, 2002).

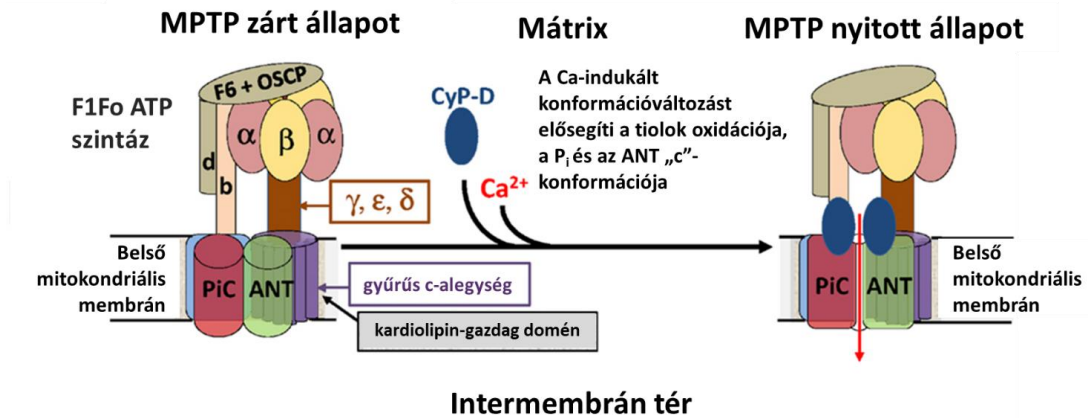
A mitokondriális ROS termelésnek egyre nagyobb szerepet tulajdonítanak inflammatorikus folyamatokban, a szepszis és ARDS patogenezisében (Bulua és mtsai, 2011; Prauchner, 2017; Liu és Chen, 2017; Liu és mtsai, 2018; Zmijewski és mtsai 2009). Az endotoxémia során termelődő reaktív származékok, mint az NO képesek a légzési lánc komplexeinek megfelelő működését gátolni, oxidálják az organelum különböző alkotóit, fokozzák a mitokondriális ROS-k képződését (Boczkowski és mtsai, 1999; Zapelini és mtsai, 2008; Victor és mtsai, 2004). Azt a folyamatot, mely során a reaktív ágensek elősegítik a mitokondriális ROS termelést, az angol irodalom RIRR-ként emlegeti (ROS induced ROS release). A mitokondriális reaktív oxigén és nitrogén származékok maguk is

képesek a gyulladást elősegíteni, mivel fokozzák proinflammatorikus citokinek megjelenését, valamint serkentő hatást gyakorolnak a MAPK és NF- κ B jelátviteli utakra (Bulua és mtsai, 2011; Park és mtsai, 2015).

1.9 Az mPTP és a ciklofilinD

A mitokondriális ROS termelésért számos enzimszisztéma felelős, így a monoaminoxidáz, a citokróm b5 reduktáz, a TCA ciklus egyes enzimeit, de a legjelentősebb mechanizmus a nem megfelelő elektrontranszfer a légzési lánc elemei között. A mitokondriális permeabilitás tranzíciós pórus (mPTP) kinyílásának hatására, mely egy több komponensű, nem-specifikus membráncsatorna, fokozódik a mitokondriumokban a ROS-k képződése. Az mPTP a külső és belső membránt hidalja át és lehetővé teszi 1,5 kDa-nál kisebb oldott anyagok és molekulák szabad áramlását a mitokondriális mátrix és az extramitokondriális tér között az impermeabilis belső membránon keresztül. A belső membrán megnövekedett permeabilitásának következtében összeomlik a mitokondriális membránpotenciál, csökken az ATP termelés és tovább fokozódik a ROS-k képződése (Zorov és mtsai, 2014; Camara és mtsai, 2010; Zorov és mtsai, 2000; Odagiri és mtsai, 2009). A mitokondrium ozmotikusan megduzzad, (a nagyobb felületű belső membrán ellenáll a tágulásnak, de közben belülről szétfeszíti a külső membránt) külső membránja károsodik és ezáltal szabaddá válnak az intermembrán térben található proapoptotikus fehérjék, mint a citokróm c, Smac/Diablo, Omi/Htr, EndoG, AIF, melyek sejthalálhoz vezetnek (Sun és mtsai, 2009; Shalbuyeva és mtsai, 2006). A pórus kinyílását számos anyag és körülmény indukálja, így a mitokondriális Ca^{2+} koncentráció növekedése, az oxidatív stressz és az anorganikus foszfát (Crompton és Costi, 1988). Az mPTP gátolható alacsony pH-val, kétértékű pozitív ionokkal, adeninnukleotidokkal és számos inhibitorral, mint a ciklosporinA (CsA), a bongkreát vagy a sangliferinA (Bernardi és mtsai, 1992; Novgorodov és mtsai 1991; Halestrap and Richardson, 2015). Az mPT-t (mitokondriális permeabilitás tranzíció), mint jelenséget közel 40 éve Hunter és Haworth írta le elsőként, akik azt figyelték meg, hogy Ca^{2+} hatására fokozódik a mitokondriális belső membrán permeabilitása, majd Crompton igazolta, hogy ennek hátterében egy pórus kialakulása áll (Hunter és Haworth, 1979; Crompton és Costi, 1988). Annak ellenére, hogy rengeteg információ felhalmozódott már az mPTP működésével kapcsolatban, pontos felépítése a mai napig vitatott. A klasszikus modell szerint kialakításában az adenin-nukleotid

transzlokáz (ANT), a feszültség-függő anion csatorna (VDAC) és a ciklofilinD (CypD) vesznek részt. Ezenkívül felvetették számos más fehérje regulátoros szerepét is, mint a benzodiazepin-receptor, a hexokináz, a kreatinkináz, a glicerolkináz vagy Bax, de jelentőségük kétséges (Crompton, 1999; Halestrap és Richardson, 2015). A külső mitokondriális membránban található, nonspecifikus csatornát, a VDAC-t, mint az mPTP szükséges alkotóját később azonban elvetették, az mPTP nyílása ugyanis zavartalanul bekövetkezett olyan mitokondriumokban is, melyekben a VDAC mindhárom izoformája hiányzott (Baines és mtsai, 2007). A felvetést, miszerint a belső mitokondriális membránban található ATP/ADP antiporterként funkcionáló ANT elengedhetetlen része a pórusnak, számos vizsgálat alátámasztotta. Az ANT képes a pórus kialakulását elősegítő konformációt felvenni, illetve inhibitorai és aktivátorai, valamint ligandjai befolyásolják az mPTP működését. Szerepe mégis megkérdőjeleződött, ugyanis ANT1 és ANT2 génhányos egér mitokondriumokon továbbra is észlelhető volt az mPTP jelensége (Pebay-Peyroula és mtsai, 2003; Halestrap és Davidson, 1990; Kokoszka és mtsai, 2004). Ezt az eredményt később az ANT4 izoforma felfedezésével magyarázták (Da Cruz és mtsai, 2005). Lehetséges alkotóként felmerült a belső mitokondriális membránban lokalizálódó foszfátranzporter (PiC) is, mivel mind a ciklofilinD-vel, mind az mPTP-t szabályozó anorganikus foszfáttal kölcsönhatásba lép, de genetikai vizsgálatok megcáfolni látszottak ezt a hipotézist (Leung és mtsai, 2008; Gutiérrez-Aguilar és mtsai, 2014). A legfrissebb modellben a F_0F_1 ATP-szintáznak tulajdonítanak kiemelt jelentőséget, mivel mind funkcionális, mind strukturális és immunoprecipitációs vizsgálatok alátámasztják potenciális pórusformáló szerepét az mPTP-ben (Azarashvili és mtsai, 2002; Giorgio és mtsai, 2009). A pontos mechanizmus azonban még felderítésre vár. Bernardi munkacsoportja szerint az F_0F_1 ATP szintáz által kialakított dimerek alkotják a pórust, míg Alavian és munkatársai a gyűrűs c-alegységnek tulajdonítanak pórusalkotó szerepet más elemekkel kölcsönhatásban (Giorgio és mtsai, 2013; Alavian és mtsai, 2014). Az is lehetségesnek tűnik, hogy az ATP szintáz a belső membránban található szupramolekuláris komplexum, az ATP-szintaszóma elemeként vesz részt az mPTP felépítésében, melyben megtalálható többek között az ANT, a PiC és más enzimek, melyeknek korábban pórusalkotó szerepet tulajdonítottak (Halestrap és Richardson, 2015; Biasutto és mtsai, 2016). A pórus jelenleg elfogadott, potenciális felépítését és működését a 3. ábra szemlélteti.



3. ábra Az mPTP jelenleg feltételezett szerkezete (Halestrap és Richardson, 2015)

A CypD azonban a mai napig tartja a helyét a pórus működéséhez szükséges, elengedhetetlen alkotórészek között (Halestrap és Davidson, 1990; Halestrap és Richardson, 2015). A ciklofileinek prolin cisz-transz izomeráz aktivitással rendelkező, az evolúció során konzervált fehérjék, melyek különböző lokalizációban fordulnak elő. A humán genomban 17 tagja ismert. Nem univerzális chaperonokként funkcionálnak, mivel csak bizonyos fehérjék megfelelő konformációjának kialakítását segítik elő, de szerepük lehet más celluláris funkcióban is. A CypD az egyetlen jelenleg ismert mitokondriális izoforma, melyet a *Ppif* gén kódol a nukleáris genomban. A citoplazmában szintetizálódik, majd a lokalizációs szignál lehasítását követően transzportálódik a 18,9 kDa nagyságú érett fehérje a mitokondriumba. Az izomeráz aktivitásban a prolin megkötéséért felelős S1-zsebnek illetve a más aminosavakkal kölcsönhatásba lépő S2 doménnek van szerepe. Ezen kívül rendelkezik olyan felülettel, mely a más proteinekkel történő kapcsolódást segíti elő, és megtalálható benne is a ciklosporinA (CsA) megkötéséért felelős jellegzetes domén (Davis és mtsai, 2010; Gutiérrez-Aguilar és Baines, 2015).

Azt, hogy a CypD szerepet játszik az mPTP megnyílásában már a kezdeti vizsgálatok felvetették, melyek során a CsA-val a pórus kinyílását sikerült megakadályozni. Igazolták, hogy ez a hatás egy a mátrixban található kisméretű prolin cisz-transz izomeráz aktivitásának gátlása révén valósul meg, melyről később kiderült, hogy ez a ciklofilinD (Griffiths és Halestrap, 1991; Connern és Halestrap, 1992). KO egereken végzett kísérletek szolgáltatották a végső bizonyítékot arra vonatkozóan, hogy a CypD tényleg elengedhetetlen regulátoros eleme az mPTP-nek. Ezen állatokban a CypD hiányában elmaradt a „normális” kinyílása a pórusnak, illetve csak extrém magas Ca^{2+} koncentráció alkalmazásával lehetett azt indukálni, ami megfelel annak, ami vad típusú mitokondriumok esetén CsA mellett

nyitja a pórust (Baines és mtsai, 2005; Basso és mtsai, 2005). Bár kimutatták, hogy a CsA a CypD izomeráz aktivitásának gátlása révén hat az mPTP-re, a pontos mechanizmus, ami alapján a CypD kifejti regulátoros hatását az mPTP-re továbbra is vita tárgyát képezi. Mivel a CypD képes kapcsolódni az mPTP potenciális alkotóihoz, elképzelhető, hogy ezen interakciók stabilizálják a pórust (Crompton és mtsai, 1998; Leung és mtsai, 2008; Giorgio és mtsai, 2009). Ezt látszik igazolni az a vizsgálat is, miszerint a CsA hatására a CypD és az ANT között nem alakul ki kötődés mPTP-t indukáló stimulusra (McStay és mtsai, 2002). Ezzel ellentétben egy másik vizsgálat során az mPTP megnyílását a sanglifherinA úgy gátolta, hogy közben a CypD nem vált le az ANT-ről (Clarke és mtsai, 2002).

Az mPTP fiziológiás szerepe még nem teljesen tisztázott, valószínűleg a celluláris Ca^{2+} -homeosztázisban játszik szerepet. Rövid kinyílása, más csatornák és transzporterek mellett, elősegíti a mitokondriális mátrixban a Ca^{2+} -koncentráció csökkentését (Bernardi és mtsai, 2012). Számos kórképben igazolták azonban patogenetikai jelentőségét. Több évtizedes kutatás támasztja alá szerepét a szív ischémias/reperfúziós károsodásában, hatással van neurodegeneratív betegségekre, mint Alzheimer kór, Parkinson kór, és izomdisztrófiák kialakulására, továbbá elégtelen működése szerepet játszhat a tumorképződés során (Halestrap és Richardson, 2015; Rao és mtsai, 2014; Bernardi és Bonaldo, 2008; Bonora és Pinton, 2014). Mivel a CypD elengedhetetlen regulátoros eleme az mPTP-nek, előszeretettel alkalmaznak olyan kísérletes modelleket egyes kórképek és az mPTP kapcsolatának vizsgálatára, melyekben a CypD-t genetikai úton vagy különféle inhibitorokkal gátolják (Millay és mtsai, 2008; Du és mtsai, 2008; Norman és mtsai, 2010; Ramachandran és mtsai, 2011; Zalewski és mtsai, 2015). Az mPTP illetve a CypD szerepét endotoxémiában és az annak következtében kialakuló különböző szervkárosodásban eddig csak kevesen vizsgálták, és ezek a vizsgálatok is ciklosporinA alkalmazásával történtek (Crouser és mtsai, 2002; Crouser és mtsai, 2004; Joshi és mtsai, 2006; Zhuge és Cederbaum, 2009; Hu és mtsai, 2011). A ciklosporinA azonban nem csak a CypD-re, hanem egyéb izoformákra is hat (Naoumov, 2014; Nigro és mtsai, 2013; Jeong és mtsai, 2014). Immunszuppresszáns hatással rendelkezik, melyet a Ca^{2+} /calmodulin szenzitív foszfatáz, a calcineurin gátlásán keresztül fejt ki, valamint egyéb proinflammatorikus folyamatokban is szerepet játszik (Williams és Gooch, 2012; Karpurapu és mtsai, 2018).

2. CÉLKITŰZÉSEK

A reaktív oxigén származékok jelentős szerepet töltenek be az LPS illetve endotoxémia indukálta akut tüdőkárosodás kialakulásában. A mitokondriális eredetű ROS-kat, így az mPTP kinyílásából adódó fokozott keletkezésüket számos kórállapotban felelősnek tartják. Bár az mPTP pontos összetétele a mai napig vita tárgyát képezi, a CypD elengedhetetlen, regulátoros szerepe bizonyított. Ezen ismeretek alapján célunk az volt, hogy megvizsgáljuk az mPTP hatását CypD génhányos egerek segítségével endotoxémia kiváltotta akut tüdőkárosodásban.

1. Elsőként a túlélésre gyakorolt hatást vizsgáltuk meg letális dózisú i.p. LPS adást követően.
2. Az akut tüdőkárosodás súlyosságának megítélésére a klasszikus hisztológiai elváltozások felmérése volt a cél.
3. A pro- és antiinflammatorikus folyamatok egyensúlyának felderítése céljából az efektormolekulaként funkcionáló citokinek meghatározását végeztük el ELISA módszerrel.
4. Az akut tüdőkárosodást jellemző endoteliális diszfunkció igazolását fibrin-specifikus festési eljárással és az ultrastrukturális károsodás elektronmikroszkópos vizualizálásával végeztük.
5. A reaktív oxigén és nitrogén származékok által okozott károsodás helyét és mértékét stabil ROS-végtermékek immunhisztokémiai vizsgálatával szemléltettük.
6. A TLR4 jelátvitellel szorosan kapcsolódó MAPK-k és Akt foszforilációjára gyakorolt hatást Western blottal ellenőriztük.
7. A TLR4 jelátvitel végén álló és az akut tüdőkárosodás szempontjából kiemelkedő jelentőségű transzkripciós faktor, az NF- κ B kanonikus aktivációjának eseményeit a komponensek foszforilációjának meghatározásával végeztük Western blot segítségével. A génexpresszióra gyakorolt tényleges hatást Real Time-PCR segítségével támasztottuk alá.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1 Etikai engedély

Vizsgálatainkat a Kormány 40/2013. (II. 14.) „Korm. Rendelete az állatkísérletekről” alapján, az 2010/63/EU európai parlamenti és tanácsi irányelvvel összhangban végeztük a PTE Munkahelyi Állatkísérleti Bizottságának előírásai szerint. Az engedélyt a Megyei Kormányhivatal adta ki az alábbi számon (No. BA02/2000-20/2011), mely öt évig érvényes.

3.2 Kísérleti állatok

Vizsgálataink során a kontroll csoportban hím, C57BL/6 típusú egereket használtunk, melyeket a Charles River Laboratories Magyarország Kft-től szereztünk be. Őket hasonló törzsből származtatott, a CypD-fehérjét kódoló *Ppif*-gén homozigóta kiütésével előállított hím egerekkel hasonlítottuk össze. A KO-egerekhez Prof. Dr. Tretter László (Semmelweis Egyetem, Orvosi Biokémiai Intézet) szívességéből jutottunk hozzá. Az állatok kora 16-20 hét volt, standard körülmények között, szabad víz- és táphozzáféréssel tartottuk őket a Pécsi Tudományegyetem Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézetének Állatházában.

3.3 Anyagok és vegyszerek

Az *Escherichia coli* 0127:B8 törzsből származó LPS-t és a kísérletekhez szükséges általános vegyszereket, amennyiben azt külön nem tüntettük fel, a Sigma-Aldrich magyarországi képviselőjétől szereztük be.

A Western blot illetve immunhisztokémia során használt antitestek az alábbiak voltak: anti-foszfo-p44/42 Thr202/Tyr204, anti-p44/42, anti-foszfo-Akt Ser473, anti-Akt, anti-foszfo-p38 Thr180/Tyr182, anti-p38, anti-foszfo-JNK Thr183/Tyr185, anti-JNK, anti-foszfo-NF- κ B p65 Ser536, anti-NF- κ B p65, anti-foszfo-I κ B α Ser32 és anti- I κ B α elsődleges antitestek, melyek a Cell Signaling Tehnology-tól származtak; míg az anti-MKP-1, anti-GAPDH, anti-nitrotirozin és az anti-4-hidroxi-2-nonenal Michael addukt specifikus antitestek a Millipore termékei.

3.4 Akut tüdőkárosodás modellezése és túlélés vizsgálat

Vizsgálataink során az állatokat négy csoportra osztottuk: egy vad típusú illetve egy CypD *knock-out* kontroll csoport, valamint egy LPS-kezelt vad típusú és egy LPS-kezelt CypD *knock-out* csoport. Az egereket endotoxémia kiváltása céljából intraperitonealisan letális, 40 mg/testtömeg kg dózisé, PBS-ben feloldott LPS-sel kezeltük, míg a kontroll állatok 10 µl/testtömeg gramm PBS adásában részesültek. Első lépésként korban egyeztetett egyedek felhasználásával túlélés vizsgálatot végeztünk a kezelést követően 8-8 vad típusú illetve CypD *knock-out* egér bevonásával. Az első 96 órában óránként, ezt követően pedig naponta három alkalommal követtük őket az első hét végéig. Késői elhalálozást nem tapasztaltunk a túlélők között. A további kísérletekben 24 órával az oltást követően izoflurán anesztéziát végeztünk és az egereket kivéztettük a bal oldali arteria axillaris átvágása révén, majd eltávolítottuk szerveiket. A tüdőt jéghideg PBS-ben történő gyors öblítés és szárazra törlés után, az alábbi módon hasznosítottuk: a jobb tüdő felső lebenyét 10% paraformaldehidben (pH=7,2) fixáltuk egy kb. 1 mm³ darab kivételével, melyet elektronmikroszkópos vizsgálathoz használt fixáló oldatba (2% paraformaldehid / 2% glutáraldehid, pH=7,4) helyeztünk. A jobb alsó lebenyt folyékony nitrogénben hirtelen lefagyasztottuk Western blot minta készítése céljából. A bal felső lebenyt RNAlater RNA stabilizáló reagensben (Invitrogen) tároltuk RNS-izolálásig, a bal alsó lebenyből pedig szövethomogenátumot készítettünk.

3.5 Western blot analízis

A Western blothoz 10 mg fagyasztott szövetet 150 µl lízispufferben (50 mM TRIS, 50 mM EDTA, 50 mM nátrium-metavanadát, 0,5% proteáz inhibitor cocktail és 0,5% foszfátáz inhibitor cocktail, pH=7,4) homogenizáltunk először ultra turrax, utána Potter-homogenizátor segítségével, majd 3x8 másodpercig szonikáltuk. A fehérjekoncentrációt módosított Lowry-módszeren alapuló DC™ Protein Assay kittel (Bio-Rad) határoztuk meg a gyártó előírása szerint. A lizátumot Laemmli-pufferben azonos koncentrációjúra hígítottuk, 5 percig forraltuk, majd lecentrifugáltuk (13 300 rpm, 7 perc) és a felülúszót használtuk a továbbiakban. A mintafehérjéket SDS poliakrilamid gélelektroforézissel választottuk el 12%-os gél felhasználásával, melyre sávonként 20 µg fehérjét vittünk fel. A szeparált fehérjéket a gélből nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A membránt blottolást követően 30 percig blokkoltuk 5%-os zsírszegény tejporból, TBS-ből és 0,1%

Tweenből előállított oldatban. Ezt követően a membránokat egy éjszakán át 4°C-n inkubáltuk az elsődleges antitestben 1:1000 hígításban. TBS-ben történő mosás után tormagyökér peroxidázzal konjugált másodlagos antitesttel (1:2000 hígításban), kecske anti-nyúl IgG-vel kezeltük a membránokat. A peroxidázzal jelölt kötött antitesteket Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific) kemilumineszcens detektáló rendszer és röntgenfilm felhasználásával tettük láthatóvá. A röntgenfilmeket scanneltük, majd a sávok intenzitását ImageJ szoftverrel határoztuk meg. Az egyes foszforilált fehérjék denzitását a GAPDH denzitására illetve az adott fehérje teljes mennyiségére korrigáltuk.

3.6 Citokin-meghatározás tüdőszövetből ELISA felhasználásával

A bal tüdőlebeny eltávolítását követően, azt jéghideg PBS-ben leöblítettük, majd erre a célra összeállított pufferben (0,25 M szacharóz, 1 mM EGTA, 5 mM TRIS, 0,5% proteáz inhibitor cocktail és 0,5% foszfatáz inhibitor cocktail) ultra turraxszal homogenizáltuk. A minták fehérjetartalmát centrifugálást követően (17 000 rpm, 15 min) módosított Lowry módszeren alapuló DCTM Protein Assay kittel (Bio-Rad) határoztuk meg a gyártó előírása alapján. A tüdőszövet TNF α , IL-1 β és IL-10 koncentrációját Ready-SET-Go! ELISA kittel (eBioscience) vizsgáltuk az előállító leirata alapján külön-külön. Az egyes mintákból 200 μ g fehérjét vittünk fel és a citokinek mennyiségét a 450 nm-n detektált relatív optikai denzitás értékében adtuk meg.

3.7 mRNS-izolálás tüdőszövetből és kvantitatív Real Time-PCR

Az RNALater (Invitrogen) gyári oldatban tárolt tüdődarabokat cseppfolyós nitrogén és dörzsmozsár használatával porítottuk, majd Trizol (Invitrogen) reagenssel kezeltük az előírtak szerint. A mintákat a Trizol reagens hozzáadása és rövid szobahőn történő inkubálást követően kloroformmal egészítettük ki (0,2 ml / 1 ml Trizol arányban) és összeráztuk, majd ismét szobahőmérsékleten inkubáltuk. Centrifugálás (12 000 g, 15 min, 4°C) után a felső vizes fázishoz 100%-os isopropanolt (0,5 ml / 1 ml Trizol arány) adtunk, majd szobahőmérsékleten történő inkubációt követően centrifugáltuk (12 000 g, 10 min, 4°C). Az RNS tartalmú üledéket 75%-s etanolban mostuk, majd ismételt centrifugálás (7500 g, 5 min, 4°C) történt és a mosott üledéket levegőn beszáritottuk. A következő lépésben RNáz-mentes vízben vettük fel az üledéket és 15 percig 60°C-n inkubáltuk termosztátban. A minták teljes RNS-koncentrációját spektrofotometriával (IMPLEN

NanoPhotometer™) mértük meg, majd 1 µg totál RNS-t MMLV RT (RevertAid™ first-strand cDNA synthesis kit, Fermentas) reverz-transzkriptázzal cDNS-sé írtuk át oligo(dT)-primer segítségével. Real Time-PCR-t végeztünk 1µl cDNS-ből kiindulva Bio-Rad MiniOpticon MJ Mini Thermal Cycler-ben SYBR® Green Supermix kit (Bio-Rad) felhasználásával.

Az általunk használt szekvencia-specifikus primerek az alábbiak voltak: *CD14* forward - TGT CTG ACA ATC CTG AAT TGG G, reverse - GGT CTA GTC CTT GCA GCT GTA CC; *IL-1α* forward - GAA GGA GTT GCC AGA AAC ACC, reverse - TCT GTC ATA GAG GGC AGT CCC; *Cxcl2* forward - GCT GTC AAT GCC TGA AGA CC, reverse - GGA TGA TTT TCT GAA CCA GGG; *IFN-γ* forward - GCT ACA CAC TGC ATC TTG GC, reverse - TGC AGG ATT TTC ATG TCA CC; *iNOS* forward - AAG TCT GAA GCA CTA GCC AGG, reverse - CAG AGA TTT CTT CAG AGT CTG CC, *TNFα* forward - ATG AGC ACA GAA AGC ATG ATC, reverse - TCA CAG AGC AAT GAC TCC AA, *actin* forward - CCA TGA AGA TCA AGA TCA TTG CT, reverse - AAG AAA GGG TGT AAA ACG CAG. A génexpresszió mértékét ΔΔCt módszerrel számoltuk ki BIO-RAD CFX Manager szoftver segítségével, referenciagénnek a β-aktint használtuk.

3.8 Szövetteni vizsgálat és kvantitatív értékelés

A 10% paraformaldehidben (pH=7,2) fixált tüdőlebenyekből dehidrációt és parafinba történő beágyazást követően 5 µm-s metszeteket készítettünk. Hematoxilin-eozin (HE) festést végeztünk standard protokollt alkalmazva. A metszeteket xilolban és leszálló koncentrációjú alkoholsorban deparafiniáltuk, majd rehidrációt. Először hematoxilinnal festettük, csapvízzel kékítettük, majd eozinnal festettük. Végül felszálló koncentrációjú alkoholsorral és xilollal ismét dehidrációt és pertex-szel lefedtük. Nikon Eclipse E200 mikroszkóppal 10x, 20x és 40x nagyítású felvételeket készítettünk.

Az eredmények kvantifikálása érdekében egy független vizsgálatot felkérve, kettős vak módon szövetteni kiértékelés történt az “American Thoracic Society” ajánlása alapján. Minden csoportban öt-öt metszeten nagy nagyítású látótérrel (*high power field*) vizsgáltunk intraalveoláris és intersticiális neutrofil granulocita akkumulációt, szövettörmelék, hyalinmembrán és alveoláris falmegevastagodás kialakulása szempontjából.

3.9 Immunhisztokémia

Az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz polimer alapú HRP-detektáló rendszert használtunk Dako Autostainer Plus automata segítségével. A tüdőmetszeteket 4-hidroxi-2-nonenal Michael addukt és nitrotirozin specifikus antitestekkel jelöltük. A fixált, beágyazott 4 µm vastagságú szövetmetszeteket deparafinálást és rehidrációt követően 20 percig 97°C-nak tettük ki epitóp feltárás céljából 3 in 1 Dako TRS oldatban (pH=9). A blokkolást gyári oldattal végeztük (10 perc, 3% H₂O₂ és 2% lószérum keveréke). A jelöléshez a metszeteket az elsődleges antitestben 1:200 hígításban egy éjszakán át inkubáltuk 4°C-n. Ezt követte 3x5 perc mosás, melyhez szintén gyári TRIS puffert (pH=7,2) használtunk. A detektálást Dako EnVision™ FLEX gyári 2. antitesttel végeztük (anit-egér és anti-nyúl keveréke, 30 perc, szobahőmérséklet), melyet ismét 3x5 perc mosás követett. Az előhívás DAB (diaminobenzidin) használatával történt 10 perces kezelést végezve, majd a reakciót desztillált vízzel állítottuk le. Pertex-szel történő fedés előtt minden metszeten az eljárást hematoxin festéssel egészítettük ki a sejtmagok láthatóvá tétele érdekében.

3.10 Fibrinfestés

A fibrin tartalmú exsudatum és a fibrózis kimutatása céljából Mallory-féle foszfor-volfrámsavas hematoxin festést végeztünk. 10%-os paraformaldehidben (pH=7,2) fixált tüdőszövetből dehidrációt és parafinba történő beágyazást követően 5 µm-s metszeteket készítettünk. Ezeket xilolban és leszálló koncentrációjú alkoholsorban deparafináltuk, majd mosást követően 30 percig utókrómozást végeztünk 3% vizes K₂Cr₂O₇ és 10% HCl 3:1 arányú oldatában. Bő vizes kimosás után differenciálás történt savas 0,5% káliumpermanganátban (KMnO₄) 1 percig. Bő csapvízes mosás után 1% oxálsavba helyeztük színtelenedésig (kb. 5-10 perc), majd ismét mosás következett. Végül egy éjszakán keresztül foszfor-volfrámsavas hematoxin oldatban inkubáltuk szobahőmérsékleten, melyet 96%-os és abszolút alkoholban, majd xilolban történő dehidrációt és fedés követett.

3.11 Elektronmikroszkópia

A szövetmintákat 0,1 M foszfát-pufferben öblítettük, majd szobahőmérsékleten 3 óráig fixáltuk 2% glutáraldehid / 2% paraformaldehid keverékében. Kiegészítő fixációs lépésként előkontrasztosítást végeztünk 1%-os ozmium-tetroxiddal (1% ozmium-tetroxid 0.1 M foszfát-pufferben oldva). Felszálló alkoholsorban és propilén-oxidban történő dehidráció után a mintákat Epoxi-Durcupan gyantába ágyasztuk. Ultramikrotómmal sorozatmetszeteket készítettünk, azokat rézhálóra vettük fel, majd kontrasztosítást végeztünk urán-acetát és ólom-citrát cseppekre helyezve a gridet. Desztillált vizes öblítés és szárítás után a metszeteket JEOL 1200 transzmissziós elektronmikroszkóppal vizsgáltuk és dokumentáltuk.

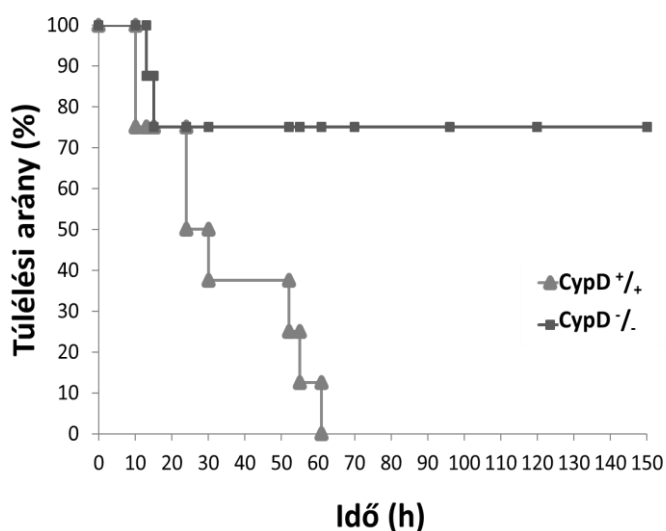
3.12 Statisztikai módszerek

A kísérleti csoportok közötti statisztikai összehasonlítást ANOVA és post-hoc test segítségével végeztük. Az eredményeket átlag \pm SEM formában adtuk meg. A $p < 0.05$ értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

4. EREDMÉNYEK

4.1 A CypD knock-out állatok túlélnek a letális LPS kezelést

CypD knock-out állatok lényegesen jobb túlélést mutattak letális dózisú (40mg/testtömeg kg) intraperitonealis LPS kezelést követően összehasonlítva a vad típusú egerekkel. Nyolc CypD hiányos állatból az első 30 órában elhullott két egyed (25%), azonban ezt követően halálozás már nem következett be ebben a csoportban. Ugyanakkor a vad típusú nyolc állat közül az első 60 órában minden egyed elpusztult. Ezen eredmények azt mutatják, hogy a CypD fehérje hiánya masszívan csökkenteni képes a mortalitást endotoxémia esetén.



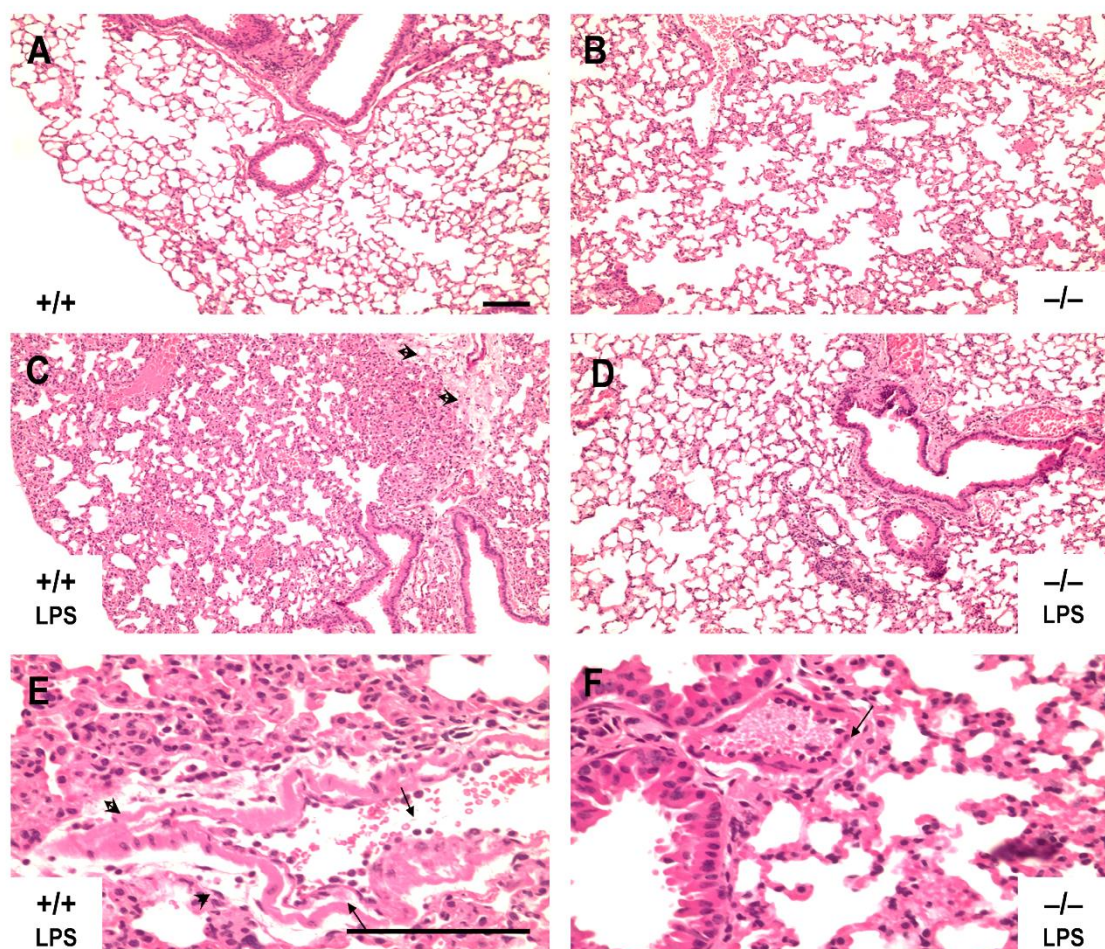
4. ábra Túlélési görbe

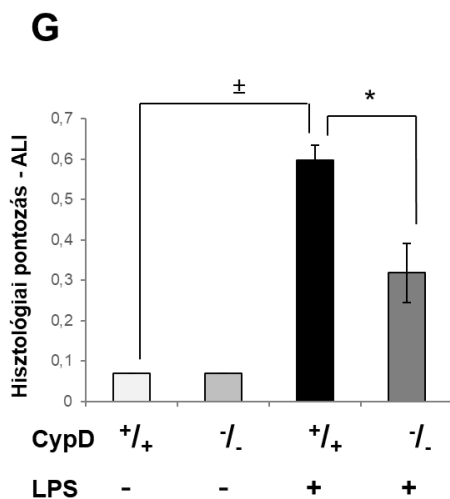
Túlélés vizsgálatot végeztünk korban egyeztetett, hím vad típusú ($n=8$) és CypD knock-out ($n=8$) állatok bevonásával letális dózisú (40mg/ testtömeg kg) intraperitonealis LPS adást követően. Az állatok túlélését 7 napig monitorizáltuk az LPS beadása után.

4.2 A CypD hiánya megvédi a tüdőszövetet az LPS hatására kialakuló hisztopatológiai változásokkal szemben

A szövettani vizsgálat súlyos károsodást igazolt az LPS-sel kezelt vad típusú állatok tüdejében. A hematoxin-eozinnal festett metszeteken az alveoláris fal kiszélesedését, a vérerek pangását illetve bennük helyenként trombus jelenlétét, és perivaszkuláris ödémát, kiszélesedést észleltünk. Az előbbi elváltozások a sérült szöveti struktúra és funkció jellegzetességei, míg a masszív intersticiális neutrofil granulocita felszaporodás az akután zajló immunválasz következménye (5. ábra/C, E). CypD^{-/-} egerekben ezzel szemben jóval kisebb mértékű volt a neutrofil granulociták megjelenése LPS kezelés hatására (5. ábra/D, F). A korábban vázolt patológiai eltérések, mint alveoláris megvastagodás és erek körüli

kiszélesedés is enyhébb fokú volt a *knock-out* állatok tüdejében, illetve minimális pangáson kívül a véredényekben trombusképződés nem volt megfigyelhető (5. ábra/D). A kontroll állatok tüdeje mindkét csoportban normális szerkezetű volt vékony alveoláris fallal, helyenként előforduló alveoláris makrofágokkal és elszórtan egy-egy neutrofil granulocita jelenlétével (5. ábra/A, B). A szövettani vizsgálat számszerűsítése céljából végzett pontozás is megerősítette, hogy az LPS-sel kezelt vad típusú egerek tüdejében szignifikánsan súlyosabbak az akut tüdőkárosodásra jellemző elváltozások a *CypD knock-out* állatokkal szemben. Ez a kifejezett különbség elsősorban az intersticiális neutrofil felszaporodás és az alveoláris falmegevastagodás mértékében mutatkozott meg, melyek irodalmi adatok szerint is az endotoxémia kiváltott károsodás legfőbb jellemzői (Matute-Bello és mtsai, 2011).





5. ábra Endotoxémia hatására kialakuló hisztopatológiai elváltozások a tüdőben.

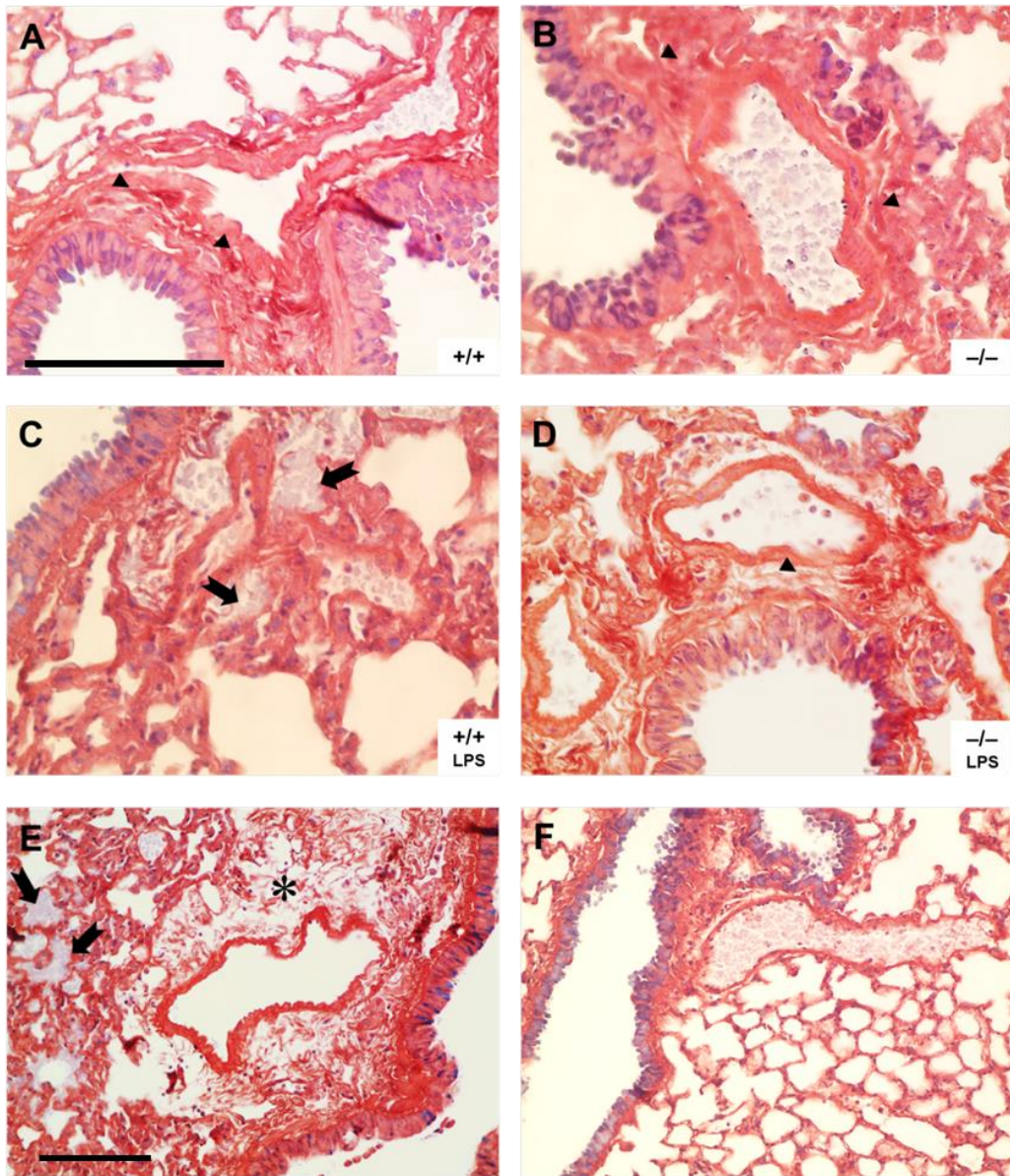
Az ábrák hematoxin-eozin festett, reprezentatív tüdőmetszeteket mutatnak kezeletlen (A) és LPS-kezelt (C) vad típusú, valamint kezeletlen (B) és LPS-sel oltott (D) CypD knock-out egerekből. A nagyított felvételek kihangsúlyozzák az LPS kezelés következtében kialakuló vaszkuláris folyamatokat a vad típusú (E) és CypD knock-out (F) állatokban. A nyílak marginálódó és az érfalon át közlekedő fehérvérsejtekre mutatnak, míg a nyílhegyek az endotélkárosodás következtében kialakuló, erek körüli/perivaszkuláris ödémát jelölik. A felvételek 10x (A, B, C, D) illetve 40x (E, F) nagyítással készültek. A lépték 100 μm -nek felel meg. Az "American Thoracic Society" által ajánlott hisztológiai pontrendszer segítségével, kettős vak módon kiértékelt metszetek eredményei (G) is láthatók. Az oszlopok a hisztológiai pontszámokat jelölik: átlag \pm SEM, $n = 5$. \pm : szignifikáns különbséget jelöl kontroll és LPS-sel kezelt vad típusú egerek értékei között ($p < 0.001$), * : szignifikáns különbséget jelöl az LPS-sel kezelt vad és CypD knock-out állatok értékei között ($P < 0.05$).

Az oszlopok a hisztológiai pontszámokat jelölik: átlag \pm SEM, $n = 5$. \pm : szignifikáns különbséget jelöl kontroll és LPS-sel kezelt vad típusú egerek értékei között ($p < 0.001$), * : szignifikáns különbséget jelöl az LPS-sel kezelt vad és CypD knock-out állatok értékei között ($P < 0.05$).

4.3 A CypD^{-/-} egerek tüdejében nem észlelhető fibrin tartalmú exsudatum felszaporodása LPS adását követően

A fibrin tartalmú exsudatum szövetközi megjelenésének igazolására Mallory-féle foszfor-volfrámsavas hematoxin festett metszeteket vizsgáltunk meg. Ezen festés során a sejtmagvak, a vörövértetek, az izom harántcsíkolat illetve a friss fibrin kéken, míg a kollagén rostok vörösen festődnek. A kezeletlen állatokban, mind a vad, mind a *knock-out* csoportban normális szerkezetű tüdőképet találtunk. A bronchovaszkuláris köteget körülvevő illetve a perivaszkulárisan elhelyezkedő kötőszöveti réteg kompakt, párhuzamos, sűrű szerkezetet mutatott, élénk vörös festődéssel (6. ábra/A, B). LPS-sel kezelt kontroll állatokban azonban az ereket körülvevő kötőszövet súlyos fokú ödémáját, fellazulását/felrostozódását észleltük és az erek közelében helyenként kéken festődő, fibrin tartalmú exsudatum volt megfigyelhető (6. ábra/C, E), mely az endotél integritásának megszűnésére és az érpermeabilitás fokozódására utal. Ugyanakkor masszív, egységes hyalinmembrán képződést - a hematoxin-eozin festéshez hasonlóan - ezzel a módszerrel sem észleltünk. Ezzel szemben a *knock-out* állatokban a HE hisztológiai vizsgálat során észleltéknek megfelelő képet kaptunk, és kiemelendő, hogy enyhe kiszélesedést leszámítva

a perivaszkuláris kötőszöveti állományban sehol sem észleltünk fibrin tartalmú exsudatumot (6. ábra/D, F).

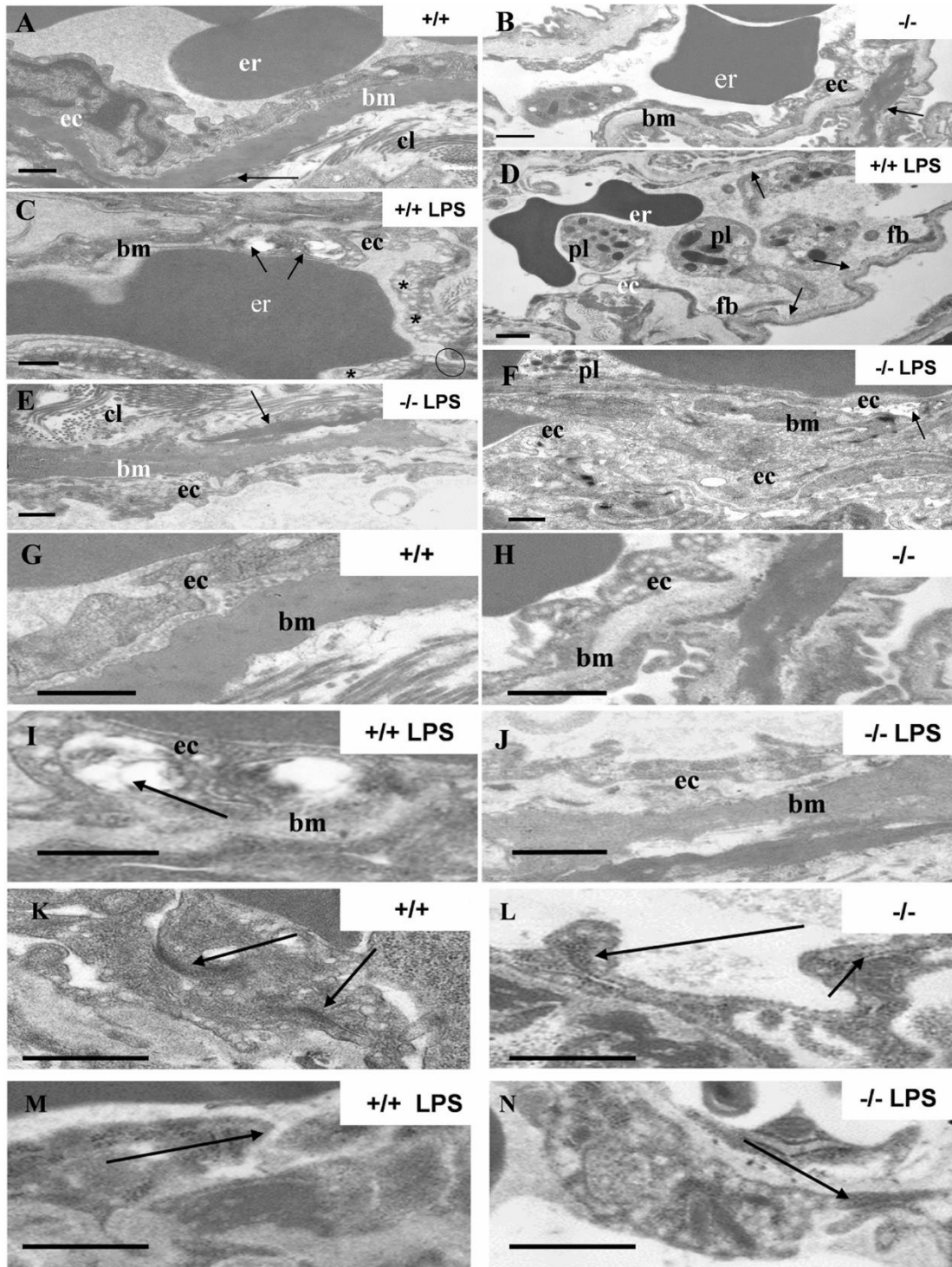


6. ábra Fibrin tartalmú exsudatum (és hyalinmembrán) kimutatása tüdőszövetben

Tüdőszövet fibrintartalmának vizsgálata Mallory-féle foszfor-volfrámsavas hematoxin festés alkalmazásával történt. Az ábrák reprezentatív metszeteket mutatnak vad típusú kontroll (A) és LPS-kezelt állatok (C, E) mintáiból, valamint CypD knock-out állatok kezeletlen (B) és endotoxémián átesett egyedeiből (D, F). A nyílhegyek a perivaszkulárisan elhelyezkedő illetve a bronchovaszkuláris köteget körülvevő összefüggő, tömör rétegekben elhelyezkedő kollagénrostokat mutatják. A nyilak az erek közelében, a fellazult kötőszövet közé és egyes alveolusok területére beszűrődő, kék festődést mutató fibrin tartalmú exsudatumot emelik ki. A csillag egy kifejezetten fellazult kötőszöveti szerkezettel rendelkező, ödémás perivaszkuláris területet jelöl (E). A felvételek 40x (A, B, C, D) illetve 20x (E, F) nagyítással készültek. A lépték 100 μ m-nek felel meg.

4.4 A CypD hiányában az LPS indukálta finomszerkezeti károsodás elmarad a tüdőszövetben

Elektronmikroszkópos vizsgálat során is azt találtuk, hogy az endotoxémia súlyosan károsítja a vad típusú egerek tüdejének szerkezetét. LPS hatására az endotélsejtek megduzzadtak és citoplazmájukban nagy vakuolumok és megnövekedett számú pinocitotikus vezikulumok voltak láthatók (7. ábra/C, I). Károsodtak vagy kifejezetten kiszélesedtek az endotélsejtek közötti kapcsolóstruktúrák is (7. ábra./M) Az elégtelen, fokozott átteresztőképességet mutató, sérült szerkezetű és funkciójú érendotél következtében az intravaszkuláris folyadék extravazációja révén szöveti ödéma alakult ki. A nem megfelelő érfunkció egy másik jele a tüdőerek bazális membránjának elválása illetve a fibroelasztikus réteg fellazulása volt az alveoláris szeptumban (7. ábra/D). A membrán elvált, szabad felületei megfelelő célpontjai a fibrin megtapadásának és a hyalinmembrán képződésnek. A sejttörmelék jelentős megjelenését a fibrindegradációs-termékek és az immunsejtekből felszabaduló ágensek proinflammatorikus, szövetkárosító hatásával lehet magyarázni. Az alveoláris szeptum kiszélesedése a kötőszövet felszaporodása által a kialakuló fibrózis indikátora (7.ábra/D). LPS kezelés ellenére a CypD^{-/-} egerek tüdőszövetének finomszerkezete szinte teljesen azonos volt a kezeletlen kontroll állatokban találtakkal (7. ábra/A, B, E, F, G, J, K, L, N). A kezelt *knock-out* állatokban a szeptum kiszélesedésének mértéke nem összehasonlítható az endotoxémiás vad típusú egerekben talált megvastagodással (7. ábra/D, E). Ezen megfigyeléseink vagy abból adódnak, hogy a CypD^{-/-} állatok tüdejében az LPS által kiváltott sérülés jóval enyhébb, vagy hogy ezen állatokban az elváltozások gyorsabban gyógyulnak.



7. ábra LPS indukálta finomszerkezeti károsodás a tüdőszövetben

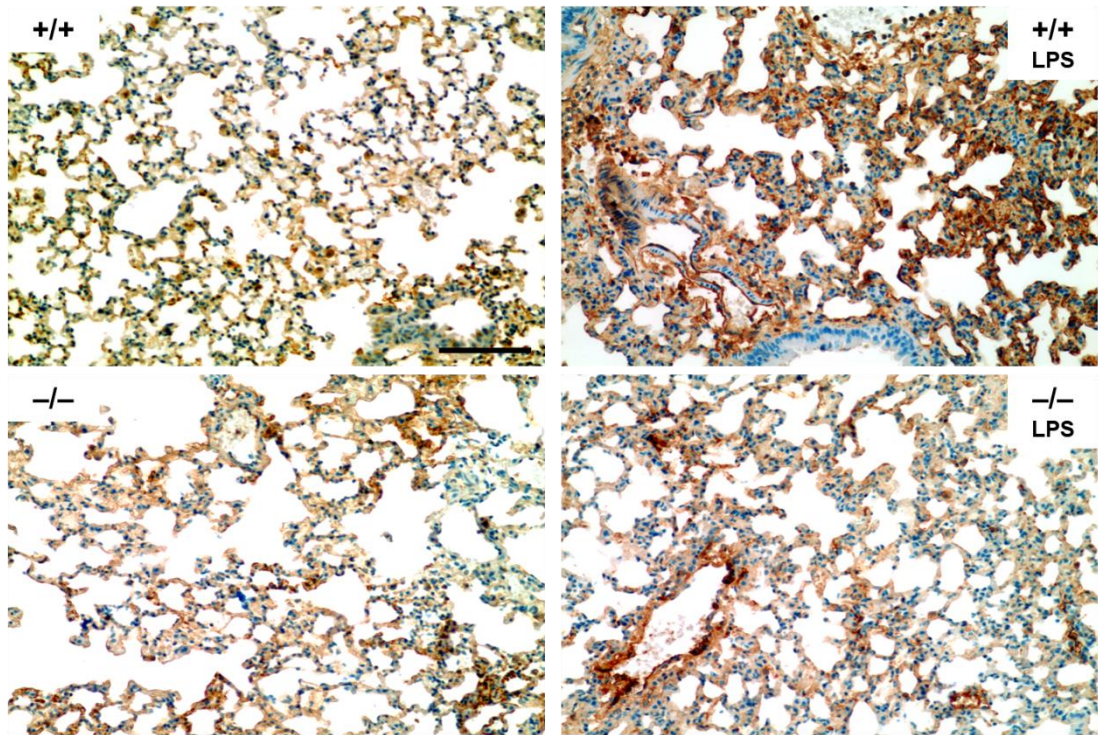
(A) Kezeletlen, vad típusú egerek tüdejében a vérerek endotélsejtjei (ec) szorosan kapcsolódnak az alapjukul szolgáló, ép bazális membránhoz (bm). Az interszeptális fal alapját tömör szerkezetű fibroelasztikus membrán képezi (nyíl). er: eritrocita, cl: kollagén rostok (B) A kezeletlen *CypD*^{-/-} egerekben is ép bazális membrán (bm) és endotélsejtek (ec) találhatóak. Kifejezett/ Feltűnő fibroelasztikus réteg húzódik a bazális membrán alatt. (C, D) LPS kezelés következtében az endotélsejtek vad típusú egerekben súlyosan károsodnak, citoplazmájukban nagy vakuolumok jelennek meg (nyilak, C) és bazális membránjuk (bm) is

elvékonyodik. A pinocitotikus vezikulumok száma jelentősen megnő (csillag) és megduzzad a citoplazma. Kiszélesedő sejt-közötti kapcsolódások (inter-endothelial junction) (kör) találhatóak. Az endotélsejtek egyes részei helyenként elválnak a bazális membrántól (nyílak, D). Ezek a csupasz foltok felszint szolgáltatnak az exsudatumban található fibrinszálak (fb) megtapadásához. A vérerekben pangás látható trombocitákkal (pl). (E, F) CypD knock-out egerekben LPS kezelés ellenére a vérerek szerkezete a kontroll állatokhoz hasonló. Megtartott az endotélsejt (ec), a bazális membrán (bm) és a fibroelasztikus membrán (nyíl, E) épsége is. Kollagén rostok (cl) diffúz megjelenése is megfigyelhető. Néhány esetben az ép szerkezetű endotélsejtek (ec) fokálisan elváltak (nyíl, F) a bazális membrántól (bm), azonban citoplazmatikus duzzadás nem alakul ki. (G, H) Finomszerkezeti különbség nincs a vad típusú és CypD^{-/-} állatok vérereinek felépítésében. (I, J) Súlyos fokú citoplazmatikus degeneráció látható (nyíl, I) LPS-kezelt vad típusú egerek endotéljében szemben az ugyancsak kezelésen átesett knock-out állatokéval. (K, L) Az érfalak interendothelialis kapcsolatait alkotó elektronenz membránrészletek (nyílak), mind a vad típusú, mind a CypD knock-out kontroll állatokban épek. (M, N) A nyílak LPS-kezelt vad típusú állatokban az érfalban található kiszélesedett, míg ugyancsak kezelt, de CypD knock-out állatokban a sértetlen szoros kapcsolóstruktúrát (tight junction) mutatják. A lépték 500 nm-nek felel meg.

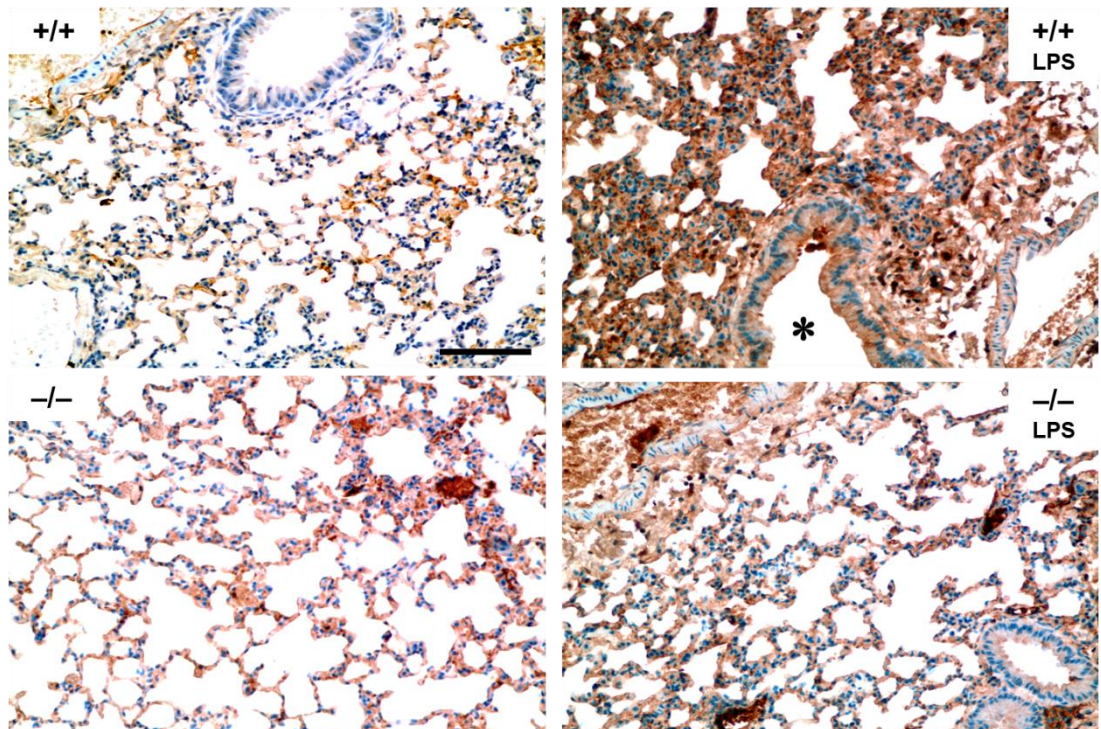
4.5 Védő hatás CypD-hiány esetén LPS kezelést követő oxidatív szövetkárosodással szemben

Egértüdő immunhisztokémiai vizsgálata során nitrotirozin (8. ábra A) és 4-hidroxi-2-nonenal Michael addukt (8. ábra B) ellenes jelölést használtunk. A nitrotirozin az *in vivo* kialakuló nitrozatív stressz markere, mely során a létrejövő peroxinitrit módosítja, nitrálja a fehérjék tirozin oldalláncait. Lipidperoxidáció során keletkező 4-hidroxi-2-nonenal szintén módosítja a proteinek oldalláncait, stabil végterméket létrehozva, mely jól jelzi az oxidatív károsodás mértékét. Az általunk vizsgált vad típusú mintákban LPS hatására markánsan megnőtt mind az endotél-, mind pedig a tüdő epitélsejtjeinek nitrotirozin illetve 4-hidroxi-2-nonenal jelölődése. Ezzel szemben ez a fokozódás alig volt észlelhető a CypD hiányos állatokban, mivel itt a tüdőepitélsejtek a kontroll mintákban található sejtekkel hasonló intenzitású jelölődést mutattak mindkét marker tekintetében, és az endotélsejtek is sokkal kisebb mértékben váltak pozitívvá endotoxémiát követően. Kiemelendő, hogy a vad típusú állatokban a szekretoros kehelysejtek és csillós hámsejtek LPS hatására csak a 4-hidroxi-2-nonenal Michael addukt ellenes jelölés esetében váltak markánsan pozitívvá, nitrotirozin jelölődésük nem volt intenzív. Ezen sejttípusok oxidatív károsodása CypD knock-out állatokban azonban nem volt megfigyelhető LPS kezelés hatására.

A



B



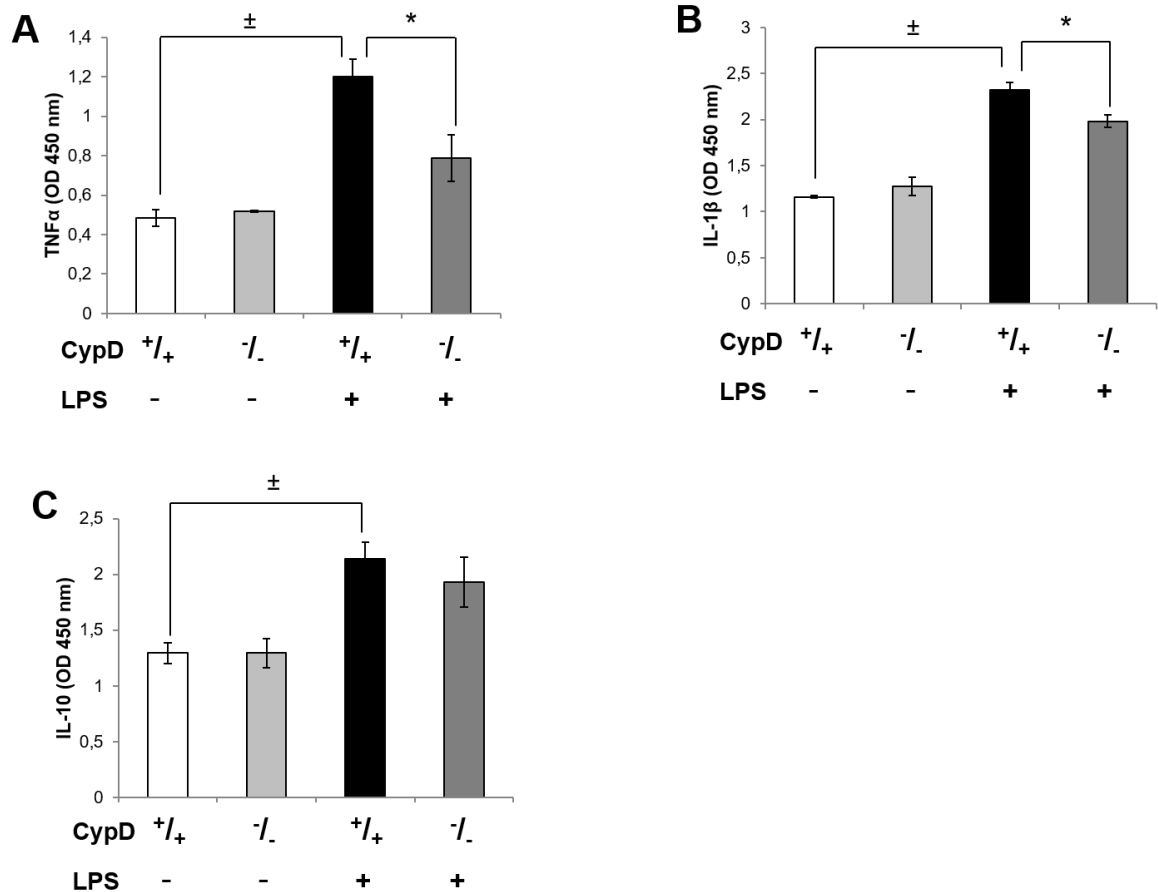
8. ábra Oxidatív szövetkárosodás vizsgálata immunhisztokémiával

Egértüdő immunhisztokémiai vizsgálata nitrotirozin (A) és 4-hidroxi-2-nonenal Michael addukt (B) jelölést használva hematoxilin magfestés mellett. Az ábrák reprezentatív metszeteket mutatnak mind a négy csoportból mindkét jelölés esetén. Ellentétben a CypD knock-out állatokkal, az LPS-sel kezelt vad típusú

állatokban a tüdő epitelsejtek fokozott intenzitást mutattak mindkét jelölés tekintetében. Hasonlóképp az endotelsejtek pozitivitása is nagyobb mértékű volt a kezelt vad típusú állatokban. A csillagok az anti-4-hidroxi-2-nonanal Michael addukt antitesttel szemben erős jelölődést mutató szekretoros hámsejtek által bélelt légutakat jelzik. Az összes kép 10x nagyítású és a lépték 100 µm-nek felel meg.

4.6 Endotoxémiában a CypD-hiány csökkenti a proinflammatorikus citokintermelést, de nem hat az antiinflammatorikus citokinek mennyiségére a tüdőben

Az akut tüdőkárosodás korai fázisában termelődő citokinek a helyi sejtek kemokintermelését serkentik, melyek hatására a neurofil granulociták infiltrálják a tüdőszövetet. Klinikai vizsgálatok is alátámasztották ezeknek a faktoroknak a jelentőségét, mivel ARDS-ben szenvedő betegek bronchoalveoláris mosófolyadékában a proinflammatorikus citokinek koncentrációja jól korrelált a kórállapot későbbi negatív kimenetelével (Matute-Bello és mtsai, 2011; Meduri és mtsai, 1995). Vizsgálatunk során intraperitonealis LPS kezelés hatására jelentősen megnőtt a két korai proinflammatorikus citokin, a TNF α és az IL-1 β szintje a tüdőszövetben. Ugyanakkor a CypD^{-/-} egerek tüdőszöveti homogenátumában LPS kezelést követően szignifikánsan alacsonyabb volt ezen gyulladáshoz köthető citokinek mennyisége (9. ábra/A, B). Az IL-10 antiinflammatorikus citokinként a gyulladáshoz köthető folyamatok visszafogásáért felelős. Vizsgálatok szerint ezen funkciója révén képes csökkenteni a LPS indukálta tüdőkárosodás mértékét, és klinikai vizsgálatok is igazolták, hogy a citokin magas szintje az ARDS-ben szenvedő betegek bronchoalveoláris mosófolyadékában arányos volt a betegség pozitív kimenetelével (Wu és mtsai a, 2009; Donnelly és mtsai, 1996). Vizsgálatunk során mindkét csoportban szignifikánsan megnőtt a citokin szintje a tüdőben endotoxémia hatására. A vad típusú és a génihiányos egerek tüdőhomogenátumában azonban nem észleltünk jelentős különbséget az IL-10 koncentrációjában 24 órával az LPS adását követően, tehát az antiinflammatorikus hatás hasonló volt (9. ábra/C).

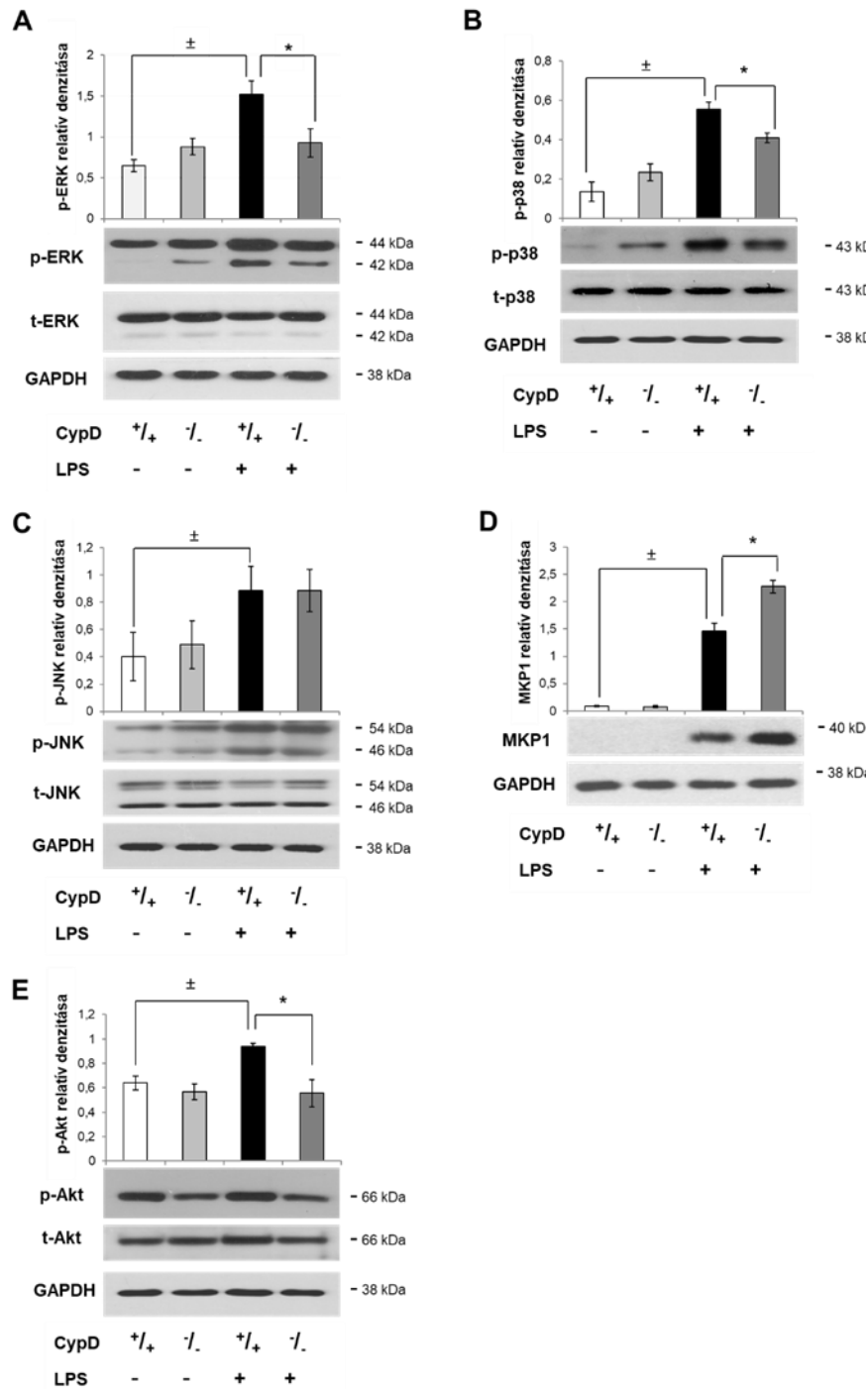


9. ábra LPS hatására a tüdőben bekövetkező citokinprodukcó vizsgálata

24 órával az LPS kezelést (40 mg/kg) követően meghatároztuk tüdőszöveti homogenátumból ELISA módszerrel a proinflammatorikus TNF α (A) és IL-1 β (B), valamint az antiinflammatorikus IL-10 (C) mértékét illetve változását. Az oszlopok a 450 nm-en mért optikai denzitást mutatják: átlag \pm SEM, n = 4. \pm : szignifikáns különbséget jelöl kontroll és LPS-sel kezelt vad típusú egerek értékei között ($p < 0.05$), * : szignifikáns különbség az LPS-sel kezelt vad és CypD knock-out állatok értékei között ($P < 0.05$).

4.7 LPS kezelést követően CypD hiányában mérséklődik az Akt és MKP-1-n keresztül a MAPK-k aktivitása

LPS hatására bekövetkező akut tüdőkárosodás kialakulásában bizonyítottan fontos szerepet játszik a MAPK-k foszforilációja és következményes aktivációja (Bozinovski és mtsai, 2002; Kim és mtsai, 2006). Vizsgálatunk során 24 órával az intraperitonealis LPS kezelés után szignifikánsan fokozódott az extracelluláris signal-regulated kinase (ERK), a p38, és a c-Jun N-terminal kinase (JNK) aktivációs foszforilációja vad típusú egerek tüdejében.



10. ábra A MAPK-k, az MKP-1 és Akt aktivitása LPS kezelést követően tüdőben.

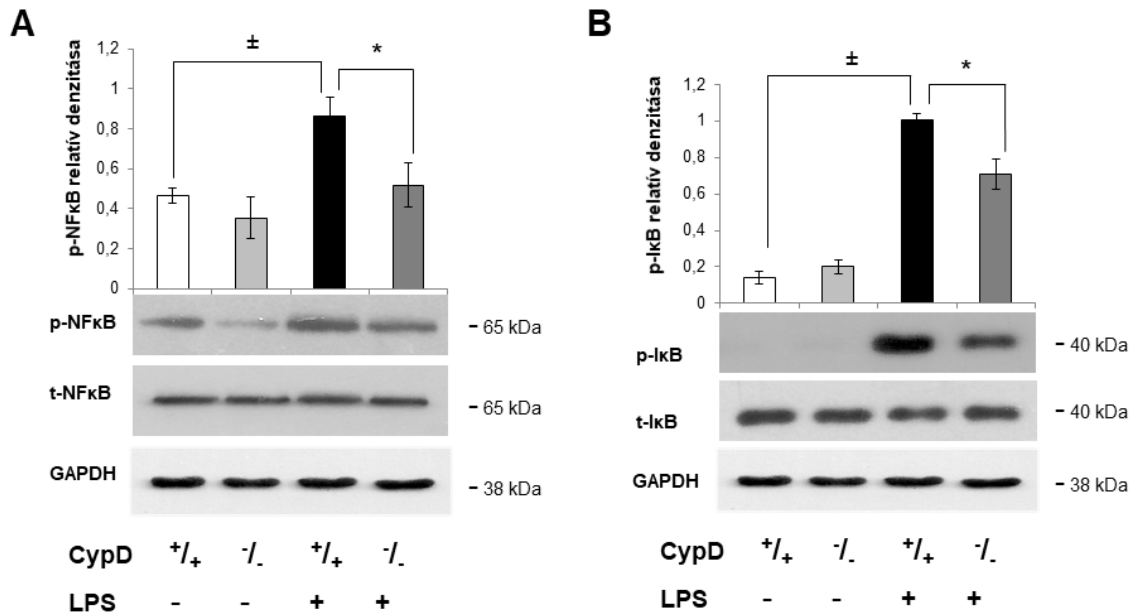
Western blot segítségével meghatároztuk a tüdőhomogenátumban az ERK (A), p38 (B), SAPK/JNK (C), MKP-1 (D) és az Akt (E) fehérjék aktivitását 24 órával az LPS kezelést követően. Az aktivitást foszfospecifikus primer antitestekkel vizsgáltuk, a relatív denzitást a teljes protein illetve a GAPDH denzitását figyelembe véve normalizáltuk. Az ábra egy reprezentatív blot képét, valamint a kiértékelt Western blotok denzitása alapján létrehozott oszlopdiagramot jeleníti meg. Az oszlopok a GAPDH-ra korrigált relatív denzitást mutatják: $\text{átlag} \pm \text{SEM}$, $n = 4$. \pm : szignifikáns különbséget jelöl kontroll és LPS-sel kezelt vad típusú egerek értékei között ($p < 0.05$), * : szignifikáns különbség az LPS-sel kezelt vad és CypD knock-out állatok értékei között ($P < 0.05$).

Ehhez képest jelentősen kisebb mértékű volt az ERK és a p38 foszforiláció mértéke CypD^{-/-} egerek tüdejében (10. ábra/A, B), ugyanakkor a JNK foszforilációt vizsgálva nem kaptunk különbséget a két csoport között LPS kezelést követően (10. ábra/C). A MAPK-k az MKP-1 közvetlen negatív regulációja alatt állnak, mely defoszforiláció útján történik. Ennek a fehérjének a mennyisége szignifikánsan magasabb volt LPS hatást követően a CypD génhíányos állatok tüdejében a vad típusú, kezelt egerekhez képest (10. ábra/D).

A MAPK-k mellett az Akt is befolyásolja a TLR4 jelátviteli folyamatokat hozzájárulva az NF- κ B aktivitásának fokozásához, ezáltal elősegítve a gyulladós történéseket a tüdőben (Yum és mtsai, 2001). Kísérletünk során 24 órával az LPS adását követően jelentősen fokozódott az Akt foszforilációja a vad típusú egerek tüdejében, míg a foszforiláció szignifikánsan kisebb mértékű volt a CypD^{-/-} állatokban, gyakorlatilag a kontrollhoz hasonló aktivitást eredményezve (10. ábra/E).

4.8 CypD *knock-out* állatok tüdejében elmarad a kifejezett NF- κ B aktiváció LPS kezelést követően

A különböző inflammatorikus szignáltranszdukciós útvonalak és a TLR4 jelátviteli kaszkád az NF- κ B transzkripció faktor aktivációját eredményezi. Vizsgálatunk során meghatároztuk az NF- κ B p65 alegységének és annak aktivációjában szerepet játszó I κ B foszforilációjának mértékét. A szisztémás LPS adás 24 óra elteltével szignifikánsan fokozta a vad típusú állatok tüdőhomogenátumában az NF- κ B vizsgált alegységének foszforilációját a CypD génhíányos állatokkal ellentétében (11. ábra/A). Hasonlóan szignifikánsan nagyobb mértékű I κ B foszforilációs szintet észleltünk a vad típusú állatok tüdejében összehasonlítva a génhíányos állatokkal, mely tény megerősíti az NF- κ B alegységének vizsgálatokor kapott eredményeket (11. ábra/B).

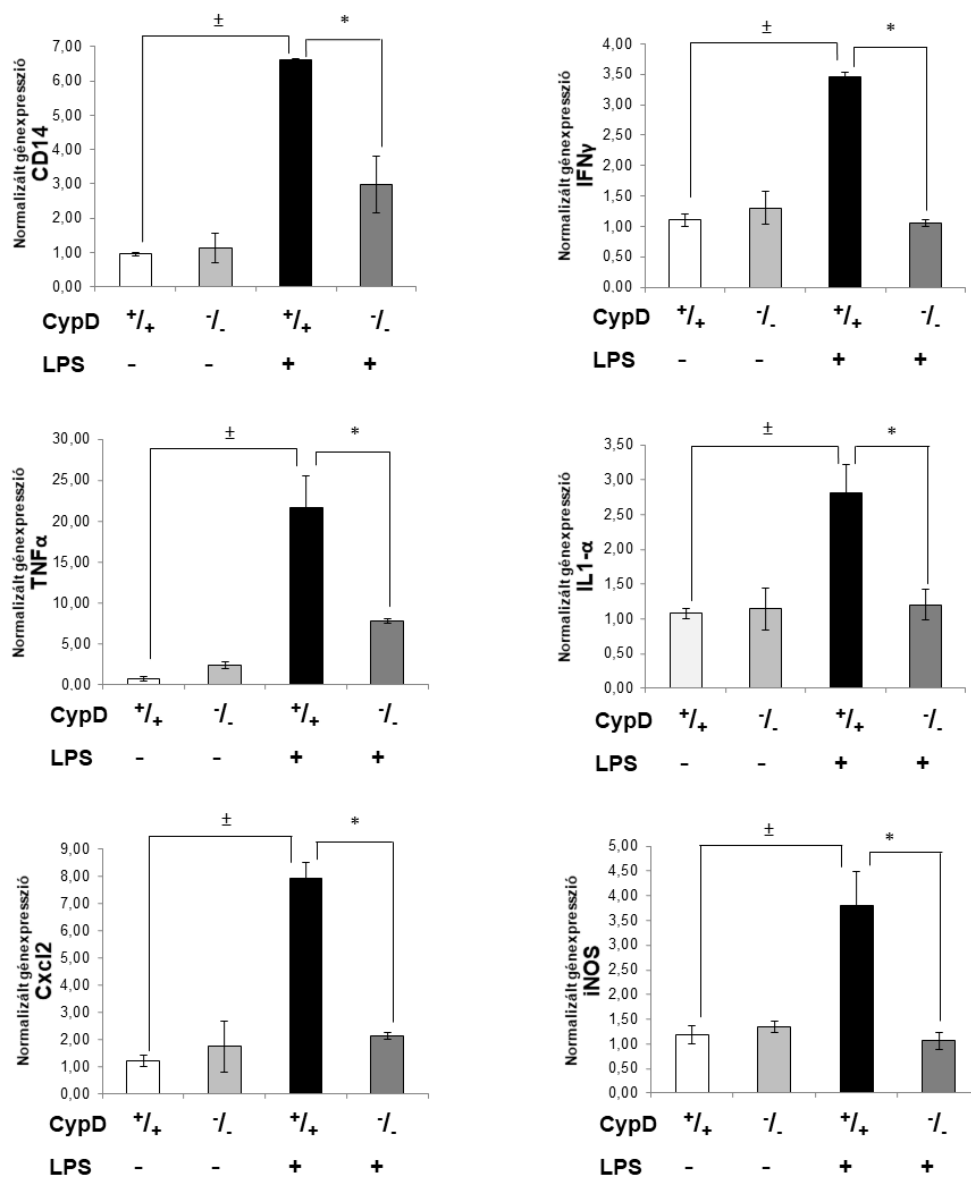


11. ábra LPS-indukálta NF-κB aktiváció a tüdőben

Western blottal tüdőhomogenátumból meghatároztuk az NF-κB (A) és az IκB (B) foszforilációját 24 órával az LPS kezelést követően. Az aktivitást foszfospecifikus primér antitestekkel vizsgáltuk, a relatív denzitást a teljes protein illetve a GAPDH denzitását figyelembe véve normalizáltuk. Az ábra egy reprezentatív blot képét, valamint a kiértékelt Western blotok denzitása alapján létrehozott oszlopdiaagramot jeleníti meg. Az oszlopok a GAPDH-ra korrigált relatív denzitást mutatják: átlag± SEM, n = 4. ± : szignifikáns különbséget jelöl kontroll és LPS-sel kezelt vad típusú egerek értékei között ($p < 0.001$), * : szignifikáns különbség az LPS-sel kezelt vad és CypD knock-out állatok értékei között ($P < 0.05$).

4.9 Jelentős különbség az NF-κB által irányított génexpresszióban a CypD jelenlétének függvényében

Vizsgálatunk során tisztázni szeretnénk volna, hogy csak molekuláris szinten, a foszforiláció mértékében, vagy ténylegesen, funkcionális szinten is észlelhető a kulcsfontosságú NF-κB transzkripciós faktor aktivitásában különbség. Ennek érdekében meghatároztuk több, a gyulladásos folyamatok különböző területén és az akut tüdőkárosodás patofiziológiájában részt vevő, NF-κB által irányított mediátor génexpresszióját Real Time-PCR segítségével. A vizsgált gének között volt a CD14, a TLR4 koreceptora, mely elengedhetetlen az LPS indukálta gyulladás kiváltásához, amit igazol, hogy hiányában az egerekben hatástalan az LPS (Haziót és mtsai, 1996). A TNFα és IL-1α korai citokinek expressziójára is kíváncsiak voltunk, melyek számos proinflammatorikus mediátor, kemokinek, adhézis molekulák megjelenéséért felelősek (Grommes és Soehnlein, 2011).



12. ábra NF- κ B-mediált gének expressziójának változása tüdőben LPS hatására.

Real Time-PCR alkalmazásával megmértük egér tüdőszövetben az NF- κ B által vezérelt gyulladásgéneket, mint CD14 (A), IFN- γ (B), TNF α (C), IL-1 α (D), Cxcl2 (E) és iNOS (F) expresszióját 24 órával az LPS kezelést követően. Referenciaként az aktin gént használtuk a Δ Ct-érték meghatározásánál. Az eredményeket a kezeletlen kontrollok Δ Ct-értékeire normalizáltuk. Az oszlopok a relatív expressziót mutatják: átlag \pm SEM, $n = 4$. \pm : szignifikáns különbséget jelöl kontroll és LPS-sel kezelt vad típusú egerek értékei között ($p < 0.001$), * : szignifikáns különbség az LPS-sel kezelt vad és CypD knock-out állatok értékei között ($P < 0.05$).

Meghatároztuk a Cxcl2 (chemokine (C-X-C motif) ligand 2), vagy másnéven MIP2- α kifejeződését is, mely a neutrofil granulociták tüdőbe történő toborzásában tölt be fontos szerepet (Gupta és mtsai, 1996). Utóbbiban részt vesz az IFN γ is, ami fokozza egy másik vizsgált gén, az iNOS expresszióját. Az iNOS felelős az akut tüdőkárosodás patogenezisében szerepet játszó túlzott NO termelésért és következményes peroxinitrit képződésért (Kristof és mtsai, 1998). Az összes vizsgált gén expressziója fokozott volt endotoxémiát követően a vad típusú állatok tüdejében, míg jelentősen kisebb mértékű volt az expresszió LPS hatására bekövetkező növekedése a *knock-out* állatokban (12. ábra).

5. DISZKUSSZIÓ

Vizsgálatunk során sikerült igazolnunk, hogy az mPTP regulátoros alkotójának, a CypD-nek hiánya enyhíti az endotoxémia következtében kialakuló akut tüdőkárosodás súlyosságát. Ez a jelenség mind szöveti, mind molekuláris szinten kimutatható volt, továbbá nagymértékben csökkent az LPS hatására bekövetkező mortalitás a KO állatokban.

Fiziológiás körülmények között a veleszületett immunválasz a kórokozók eltakarításáért és a szervezet megvédéséért felelős, melyhez számos sejt és az általuk termelt közvetítő molekulák, mint pro- és antiinflammatorikus citokinek, kemokinek szigorúan szabályozott összjátékára van szükség. Ennek eredményeként olyan enzimek és molekulák szabadulnak fel, melyek a kórokozók, idegen anyagok elpusztításáért, eliminálásáért felelősek (Wiersinga és mtsai, 2014; László és mtsai, 2015). A Gram-negatív kórokozók sejtfallkomponense, az LPS által indukált szepszis során a veleszületett immunválasz jól koordinált védekező mechanizmusai fékezhetetlen, kontrollálatlan folyamatok destruktív összességébe torkollanak. Olyan mértéktelen gyulladási válaszreakció jön létre, mely során felborul az egyensúly a reaktív oxigén és nitrogén származékok termelése és az azokat megfékezni képes antioxidáns mechanizmusok között és kialakul az oxidatív stressz. Ez felelős a makromolekulák, lipidek, fehérjék és DNS módosításáért, ami végül a sejtek és szövetek károsodását eredményezi (Victor és mtsai, 2004; Chow és mtsai, 2003; Lang és mtsai, 2002).

A mitokondriális diszfunkciónak és a mitokondriumban termelődő ROS-k által okozott sejtkárosodásnak egyre nagyobb szerepet tulajdonítanak az LPS indukálta gyulladási folyamatok és akut tüdőkárosodás patofiziológiájában. A mitokondriális reaktív oxigén származékok elsősorban a légzési lánc egyes komplexein képződnek az oxigén inkomplett redukciója által, mely reakciót az inflammatorikus folyamatokban részt vevő számos mediátor képes fokozni (Park és mtsai, 2015; Zapelini és mtsai, 2008; Bulua és mtsai, 2011; Ramsey és Wu, 2014; Liu és Chen, 2017; Liu és mtsai, 2018; Zorov és mtsai, 2014). A reaktív oxigén származékok képződéséhez nagymértékben hozzájárul a belső mitokondriális membránban található mPTP kinyílása, melynek következtében összeomlik a mitokondriális membránpotenciál, ami elősegíti a légzési lánc komplexein a további ROS-k képződését. (Camara és mtsai, 2010; Prauchner, 2017; Zorov és mtsai, 2014). Emiatt számos olyan betegség hátterében felmerült az mPTP kóroki szerepe, mint az ischemia/reperfúzió vagy akár a szepszis, ahol a ROS-k jelentősen hozzájárulnak a

szervkárosodáshoz (Crouser és mtsai 2002; Halestrap és Richardson, 2015). A vizsgálatot nehezíti, hogy a több komponensű membráncsatorna pontos összetétele még mindig tudományos vita tárgya. Az azonban biztos, hogy a mitokondriális mátrix fehérje, a CypD elengedhetetlen regulátoros alkotója (Baines és mtsai, 2005; Basso és mtsai, 2005; Halestrap és Richardson, 2015). Ezen információk ismeretében célunk volt annak vizsgálata, hogy a CypD hiánya, milyen változást idéz elő az endotoxémia indukálta akut tüdőkárosodás patogenezisében.

A CypD a mindenütt előforduló, prolin cisz-transz izomeráz enzimaktivitással rendelkező fehérjék, a ciklofilinek eddig ismert egyetlen mitokondriális tagja. A ciklosporinA egy jól ismert immunszuppresszáns, mely gátolni képes a CypD-t és ezt a hatását a pórusalkotó szerepének felderítése céljából előszeretettel ki is használják, így inflammatorikus folyamatok vizsgálata során is (Crouser és mtsai, 2002; Crouser és mtsai, 2004; Joshi és mtsai, 2006; Zhuge és Cederbaum, 2009; Hu és mtsai, 2011). Egyes vizsgálatok során kimutatták, hogy a ciklosporinA a CypD-t a prolin cisz-transz izomeráz aktivitáson keresztül gátolja. Ugyanakkor jól ismert az a tény is, hogy a ciklosporinA elsődleges célpontja a calcineurin. A calcineurin számos jelátviteli folyamatban és gyulladási jelenségben részt vesz. Kihatással van az LPS indukálta károsodás mértékére *in vitro* és *in vivo* vizsgálatok szerint, így például befolyásolja a szepszis kiváltotta tüdőkárosodás során a citokin expressziót az NFATc3 transzkripciós faktoron keresztül (Satonaka és mtsai, 2004; Fiedler és Wollert, 2004; Jennings és mtsai, 2009; Karpurapu és mtsai, 2018). A ciklosporinA a calcineurinra hatva közvetetten gátolni képes az MKP-1-t és ezáltal fokozza a MAPK-k működését (Lim és mtsai, 2001). Ismerve a MAPK-k NF- κ B aktivációban betöltött fontos szerepét, a calcineurin inflammatorikus folyamatokra gyakorolt hatását, a ciklosporinA nem alkalmazható megbízhatóan az mPTP gátlás és az LPS indukálta gyulladási folyamatok közötti összefüggés vizsgálatában. Ennek a problémának elkerülése céljából választottuk a CypD^{-/-} állatmodellt az endotoxémia kiváltotta akut tüdőkárosodás és a mPTP / CypD-hiány közötti kapcsolat felderítésére.

A mitokondriális ROS termelés mellett a tüdő epiteliális sejtjei, az ott rezidens makrofágok, valamint az oda vándorló neutrofil granulociták által termelt nagy mennyiségű ROS hozza létre az akut tüdőkárosodásra jellemző elváltozásokat (Grommes és Soehnlein, 2011; Lang és mtsai, 2002). Függetlenül a kiváltó tényező jellegétől, a kialakuló direkt vagy indirekt akut tüdőkárosodás emberben igen hasonló hisztológiai elváltozásokkal jellemezhető, úgy mint a diffúz alveoláris károsodás, a polimorfonukleáris sejtek vaszkuláris, intersticiális és alveoláris felszaporodása, az alveoláris szeptumok

megvastagodása, interstícium kiszélesedése, a hyalinmembrán és mikrotrombusok képződése (Matute-Bello és mtsai, 2011). Ezeket a jelenségeket a proliferatív fázisban epiteliális hiperplázia és intersticiális fibrózis követi (Perl és mtsai, 2011). Az American Thoracic Society javaslata alapján egy állatmodell akkor tükrözi megfelelően az ALI kialakulását, ha 24 órán belül megjelennek a fő eltérések. Kiemelendő azonban, hogy (ALI illetve ARDS vizsgálatára szolgáló) állatmodellekben az elváltozások olykor a humántól eltérőek lehetnek, az egyes állatfajok különböző anatómiai és szövettani jellegzeteségeiből adódóan nem minden eleme található meg az emberre jellemző elváltozásoknak. Egyes rágcsáló modellek esetében hiányozhat a hyalinmembrán képződés, ami esetünkben sem volt kifejezett (Matute-Bello és mtsai, 2011). Ennek ellenére vizsgálatunkban teljesült, hogy 24 órával az inzultust követően az LPS-sel kezelt vad típusú egerek tüdejében jól észlelhető volt a neutrofil granulociták felszaporodása, valamint jelentősen megvastagodott az interstícium, kiszélesedtek az interalveoláris szeptumok az endoteliális barrier diszfunkció, a fokozódó permeabilitás és ödéma következtében. Endotoxémiát követően a KO állatokban csak enyhe hisztológiai eltérések mutatkoztak, melyet a szintén az American Thoracic Society által összeállított objektív pontrendszer alapján elvégzett elemzés eredményei is megerősítettek.

Az indirekt tüdőkárosodás és az arra jellemző szövettani elváltozások kialakulásában nagy szerepe van az endotélnek, melyet közvetlenül érnek a keringő citokinek, az LPS, a különféle ROS-k és a vándorló immunsejtek. Az endotélsejteken (a proinflammatorikus citokinek mellett) a ROS-k képesek fokozni az adhézións molekulák működését illetve megjelenését részben a membránkomponensek direkt oxidációja által, részben szintézisük fokozása révén (Chow és mtsai, 2003). Több vizsgálat is alátámasztotta, hogy a reaktív oxigén származékok jelátviteli utakra és transzkripciós faktorokra hatást gyakorolva elősegítik az endoteliális sejtadhézións molekulák megjelenését és szükségesek a neutrofil granulociták transzmigrációjához (Griendling és mtsai, 2000; Orfanos és mtsai, 2004; Marui és mtsai, 1993; Wang és mtsai, 2008). Igazolták azt is, hogy tüdőben a mitokondriális reaktív szabadgyök termelés jelentősen hozzájárul a TNF α hatásra bekövetkező P-selectin termeléshez (Parthasarathi és mtsai, 2002). A fent vázolt jelenségek fényében érthető, hogy a KO állatokban, ahol alacsonyabb szintű a ROS-terhelés, kisebb mértékű volt a neutrofil akkumuláció. Bizonyított továbbá, hogy a ROS-k az apoptózis gátlásán keresztül megnövelik a neutrofil granulociták élettartamát, ezáltal is fokozódik az általuk okozott károsodás mértéke (Grommes és Soehnlein, 2011).

A ROS-k oxidálják, károsítják az endotélsejtek közötti intercelluláris sejtkapcsoló struktúrákat, megnövelve az endotélréteg permeabilitását. A barrier funkció elvesztésének következtében egyrészt fokozódik a lokálisan felszabaduló citokinek és kemokinek véráramba jutása, másfelől nagymennyiségű fehérje tartalmú exsudatum kerül az interstíciumba illetve az alveolusokba, ahol ödémaképződést és a hyalinmembrán kialakulását eredményezi (Chow és mtsai, 2003; Matute-Bello és mtsai, 2011). A permeabilitás fokozódása fontos kritériuma az ALI-nak állatmodellen. A kimutatására Mallory-féle foszfor-volfrámsavas festést alkalmaztunk szövettani metszeten, mely a fibrin felszaporodást és a fibrózist is képes kimutatni (Mallory, 1900). Vad típusú állatok esetén endotoxémiát követően a nagymértékben kiszélesedett és felrostozódott perivaszkuláris régióban nagy mennyiségű kéken festődő fibrin depozitum ábrázolódott illetve helyenként az alveolusokban is megfigyelhető volt a fibrin halványkékes festődése, de a masszív hyalinmembrán képződés modellünkre nem volt jellemző. Ezzel szemben a KO állatoknál az erek menti kötőszöveti réteg enyhe kiszélesedésén kívül fibrindepozíció nem volt észlelhető. A Mallory-féle foszfor-volfrámsavas festést a mai napig alkalmazzák endotoxémia okozta fibrintartalmú alveoláris és intersticiális folyadék megjelenésének kimutatására (Keshari és mtsai, 2014). Más vizsgálatokban is használtak már hasonló módszert xylazin kiváltotta tüdőödéma illetve májszövetben LPS indukálta fibrintartalmú exsudatum kialakulásának igazolására (Amouzadeh és mtsai, 1993; Seto és mtsai, 1998). Ultrastrukturális vizsgálataink is megerősítették az endoteliális réteg és az interendoteliális junkciók károsodását. Mindezek mellett endotoxémiát követően a CypD^{+/+} egerek tüdejében az endotélsejtek citoplazmájában pinocitotikus vezikulák és nagy vakuolumok jelentek meg. A sejtek károsodása következtében több helyen szabaddá váló bazálmembrán fibrinszálak megtapadását segítette elő. Ezzel szemben ezek a finomszerkezeti eltérések az LPS-el kezelt CypD KO egerekben hiányoztak vagy csak nagyon minimális mértékben voltak jelen. Az elektronmikroszkópos felvételeken látható elváltozásokat korábban már ARDS-ben szenvedő, szeptikus betegek és endotoxémián átesett állatok tüdejében is kimutatták részben a barrier diszfunkció igazolására (Bachofen és Weibel, 1977; Tomashefski, 2000; Keshari és mtsai, 2014).

A ROS és RNS képződés mértékének igazolására immunhisztokémiát használtunk, mely ugyan csak szemikvantitatív módszer, de így az érintett struktúrák is kimutathatók voltak. Mivel ezeknek a kis molekuláknak a féléletideje igen rövid és mennyiségük az egyes kórállapotok lefolyása során ingadozó lehet, illetve a sejten belül tovább alakulnak, a

keletkezésük mértékének meghatározásához stabil végtermékek kimutatását tűztük ki célul, úgymint módosított proteinek és lipidek. A lipidek peroxidációja során a többszörösen telítetlen zsírsavakból reaktív aldehidek képződnek, mint a 4-hidroxi-nonenal (4HNE). Ez fehérjék thiol- és aminocsoportjaival stabil Michael adduktot képez, mely befolyásolja a fehérje szerkezetét és működését (Yadav és Ramana, 2013; Usatyuk és Natarajan, 2012; Sonowal és Ramana, 2019). Más indirekt ALI modellhez hasonló festődési mintázatot észleltünk vizsgálatunk során, mivel esetünkben a LPS-kezelt vad típusú állatok tüdejében intenzív 4HNE-jelölést mutatott szinte minden típusú sejt szemben a KO állatokkal (Ge és mtsai, 2017). Mind állatmodellen, mind humán vizsgálatok során igazolták, hogy a 4HNE-nak és hozzá hasonló lipidperoxidációs termékeknek a mennyisége jelentősen megnő SIRS-ben, szepszisben és ARDS-ben (Carbonell és mtsai, 2000; Richard és mtsai, 1990; Goode és mtsai, 1995; Alonso de Vega, 2002). A 4HNE káros hatással van a mikrovaszkulaturára, a sejtközi junciók működésére és a hozzájuk kapcsolódó citoszkeleton rendszerre, így fokozza a permeabilitást a tüdőben, ami ödémához vezet (Usatyuk és Natarajan, 2012). Kiemelendő továbbá, hogy a 4HNE nemcsak az oxidatív stressz mértékét tükrözi. A hidroxialdehideknek a jelátviteli utak módosításában, így a MAPK és NF- κ B szignáltranszdukcióban, sőt a mitokondriális diszfunkció létrejöttében is fontos szerepe van (Roede és Jones, 2010; Usatyuk és Natarajan, 2012; Ebenezer és mtsai, 2017; Sonowal és Ramana, 2019).

A reaktív nitrogén származékok szintén bizonyítottan szerepet játszanak a szepszis és ALI patogenezisében, fokozzák az endoteliális barrier diszfunkciót és hozzájárulnak proinflammatorikus citokinek termeléséhez (Prauchner, 2017; Kristof és mtsai, 1998; Wu és mtsai b, 2009). A stabil melléktermék, amit a reaktív nitrogén származékok okozta károsodás mértékének kimutatására használtunk, a nitrotirozin volt. Vizsgálatunk során intenzív jelölődést észleltünk LPS kezelés hatására mind a tüdő endotél-, mind az epitelsejtjeiben. Ugyanakkor a reaktív nitrogén származékok jelenlétét igazoló festődés sokkal gyengébb volt a KO állatok esetén, ami egyértelműen csökkent ROS és RNS képződést bizonyít. A nitrotirozin a tirozin oldalláncok peroxinitirrittel történő reakciója során létrejövő irreverzibilis módosulás. Utóbbi szuperoxidanion és NO reakciója során képződik, melynek mértékét nemcsak a szuperoxidtermelés befolyásolja. Kimutatták, hogy mitokondriumokban a szuperoxid gyorsabban lép a jelenlévő NO-val reakcióba, mint a hatástalanításáért felelős MnSOD-dal. A helyzetet súlyosbítja, hogy az így keletkező

peroxinitrit a dizmutáz enzim gátlásával tovább fokozza a reaktív nitrogén származékok keletkezését (Camara és mtsai, 2010). Az NO-nak alacsony koncentrációban protektív hatásai vannak, míg nagy mennyiségű termelése már káros lehet a fokozott peroxinitrit képződés miatt. Egérmodellel igazolták, hogy a parenchimas szervek, így a tüdő, jelentős forrása a szepszis alatt felszabaduló szisztémás NO-nak. A nagy mennyiségű termelésért az LPS, inflammatorikus citokinek és nem utolsósorban ROS-k hatására expresszálandó és az NF- κ B regulációja alatt álló iNOS felelős. Mivel a transzkripciós faktor regulációjában a ROS-k is részt vesznek, ezek is képesek fokozni az iNOS expressziót egy örökösi kört létrehozva (Numata és mtsai, 1998; Bian és Murad, 2001; Prauchner, 2017). A fokozott NO és peroxinitrit képződésnek igazoltan káros következményei vannak a mitokondriumra nézve is. Az NO és a peroxinitrit gátolja a légzési lánc egyes komplexeit, valamint az mPTP kinyílását is elősegíti. Ezeknek a történéseknek eredményeképpen pedig tovább fokozódik a reaktív ágensek termelődése a mitokondriumban (Camara és mtsai, 2010; Zorov és mtsai, 2014). Mint az már korábban is kifejtésre került, a mitokondriális eredetű ROS-nak számos inflammatorikus folyamatban, így a MAPK-k és az NF- κ B aktiválásában és a proinflammatorikus citokinek expressziójában is igazolták szerepüket (Bulua és mtsai, 2011; Park és mtsai, 2015). Ezeket a jelenségeket jól összegezi azon vizsgálatnak az eredménye, ahol szeptikus betegek monocitáit vizsgálták. Ezekben a sejtekben magasabb volt az NO és lipidperoxidációs termékek szintje, amit a mitokondriális komplexek csökkent aktivitása, adhézions molekulák emelkedett expressziója és fokozott NF- κ B aktivitás kísért (Prauchner, 2017). Így esetünkben sem meglepő, hogy elmaradt az LPS hatásra bekövetkező markáns nitrotirozin jelölődés a CypD hiányos állatokban szemben vad típusú társaikkal.

Az inflammatorikus „fenotípus” kialakulásában és a fokozott ROS termelésben szerepet játszanak a tüdő sejtei által megnövekedett mennyiségben termelt proinflammatorikus citokinek. Klinikai vizsgálatok is igazolják, hogy a proinflammatorikus citokinek és kemokinek, mint TNF α , IL-1 β és IL-8 megemelkedett szintje meghatározó az akut tüdőkárosodás kialakulása során. Ezeknek a faktoroknak a mennyisége az érintettek bronchoalveoláris mosófolyadékában jól korrelált az ARDS súlyosságával (Perl és mtsai, 2011; Orfanos és mtsai, 2004; Meduri és mtsai, 1995). Állatmodellek esetén is kiemelkedően fontos kritérium a proinflammatorikus citokinek kimutatása az ALI igazolására (Matute-Bello és mtsai, 2011). Vizsgálatunk során mind a szepszisben, mind az ARDS-ben elsőként megjelenő citokinek, a TNF α és az IL-1 β változását határoztuk

meg (Goodman és mtsai, 2003; Grommes és Soehnlein, 2011). Akut tüdőkárosodás során, így az endotoxémia okozta indirekt ALI-ban elsősorban alveoláris makrofágok termelik ezeket a citokineket. Ezek a kis proteinek fokozzák a kemokinek szekrécióját, elősegítik az adhéziónak megjelenését az endotélsejteken és ezáltal a neutrofil granulociták transzmigrációját, valamint hozzájárulnak az epiteliális illetve endoteliális barrier diszfunkció létrejöttéhez. Mindezen hatásokhoz szükséges a korábban említett ROS folyamatos és nagymértékű termelése (Commins és mtsai, 2010; Marui és mtsai, 1993; Griendling és mtsai, 2000; Lee és Yang, 2012). Vizsgálatunk során a vad típusú állatokkal összehasonlítva, a CypD *knock-out* egerekben jelentősen alacsonyabb volt a tüdőben termelődő proinflammatorikus TNF α és IL-1 β mennyisége. Ez a tény arra utal, hogy a CypD a citokintermelésre is hatással van, feltehetőleg a hiányában létrejövő csökkent mitokondriális ROS felszabadulás révén. Ezt a szoros kapcsolatot a mitokondriális ROS és a proinflammatorikus citokinek produkciója között már Bulua és munkatársai is igazolták. Mind egészséges, mind TNF-receptor asszociált periódikus láz szindrómában szenvedő betegek sejtjeiben sikerült megakadályozni a mitokondriális ROS előállítását gátlásával az inflammatorikus citokinek felszabadulását (Bulua és mtsai, 2011). Park és csoportja ugyanakkor mikroglia sejtekben tudták visszaszorítani az LPS hatásra bekövetkező proinflammatorikus citokin produkciót a mitokondriális ROS felszabadulás kémiai gátlásával (Park és mtsai, 2015).

A veleszületett immunválasz ellensúlyozásaként antiinflammatorikus citokinek termelődnek, mint az IL-10, melyek a gyulladásos válasz mérsékléséért felelősek. Egyik kulcsfontosságú feladatuk a makrofágok és dendritikus sejtek patogén általi aktivációjának szabályozása. Az IL-10 képes gátolni a makrofágokban a kemokinek, gyulladásban szerepet játszó enzimek és proinflammatorikus citokinek expresszióját. (Bogdan és mtsai, 1991; Saraiva, 2020) Ennek következtében az IL-10 megakadályozza a neutrofil granulociták tüdőbe történő migrációját (Perl és mtsai, 2011). Az IL-10 jelentőségét ALI-ban alátámasztja az a klinikai vizsgálat is, mely során ARDS-ben szenvedő betegek bronchoalveoláris mosófolyadékában az IL-10 koncentrációja egyenesen arányos volt a kedvező kimenetellel és túléléssel (Donnelly és mtsai, 1996). Patkánymodellben az IL-10 kezelés sikeresen kivédte az intratrachealis LPS stimuláció káros következményeit tüdőben (Wu és mtsai, 2009). Mind szisztémás, mind lokális LPS kezelés hatására az antiinflammatorikus IL-10 mennyiségének megemelkedése észlelhető az állatok tüdejében illetve szérumában. Az LPS-hatás különböző típusú mérséklése számos állatkísérletben, a

hisztológiai és patológiai jellemzők enyhülése mellett, általában az IL-10 koncentráció fokozódását idézi elő (Soromou és mtsai, 2012; Wang és mtsai, 2018; Zhao és mtsai 2019). Habár más vizsgálatokban szisztémás LPS stimulus hatására megnő az IL-10 mennyisége, a protektív kezelés nem okoz változást vagy az éppen ellenkező irányú. Ji és munkatársai egy szépszis és ALI modellben (coecum ligatúra és punkció után 24 órával), egyforma IL-10 koncentrációt mértek mind a kontroll, mind a protektív kezelésen átesett állatok tüdejében (Ji és mtsai, 2012). Behjani és munkacsoportja vizsgálatában 24 órával az intraperitonealis LPS adást követően azonban csökkent az IL-10 szérumszintje az umbilicalis őssejtekkel kezelt állatokban, míg ugyanezen csoportban enyhült az akut tüdőkárosodás súlyossága (Behjani és mtsai, 2019). Az irodalomban megtalálható eredményekből kitűnik, hogy szemben a proinflammatorikus citokinekkal, az IL-10 szintjének változása LPS hatására nagymértékben függ a stimulus helyétől és a mérés időpontjától. Vizsgálatunk során az LPS kezelést követően mindkét csoportban megnőtt az antiinflammatorikus IL-10 koncentrációja, de különbség nem volt észlelhető. Az eredmény alátámasztja azt az feltevésünket, miszerint a CypD hiányos állatok tüdejében észlelt enyhébb károsodás és gyulladási reakció nem fokozott antiinflammatorikus mechanizmusok útján, hanem a csökkent ROS termelés és ennek hatásai következtében valósul meg.

A reaktív oxigén származékok fontos kémiai regulátorok, melyek intracelluláris szignáltranszdukciós útvonalak szabályozásában vesznek részt, mint például a különböző MAPK rendszerek. Az LPS indukálta folyamatok hatására is megnő a MAPK-k aktivitása, mivel a jelátvitel egyes komponensei, mint a TAK1 MAPKKK-ként is funkcionál (Wang és mtsai, 2001). Humán alveoláris makrofág sejtvonalon elvégzett vizsgálatok alapján LPS hatásra kialakuló gyulladási folyamatokban korábban az ERK és p38 MAPK szerepét tartották meghatározónak (Carter és mtsai, 1999). Később egy Thorley és munkatársai által tüdő eredetű sejtvonalakon végzett kísérlet igazolta, hogy sejtípustól függően, eltérő dominanciával, de mindhárom MAPK fontos a gyulladási mediátorok, citokinek és kemokinek termelése szempontjából LPS stimulust követően (Thorley és mtsai, 2011). *In vivo* vizsgálatok során is megfigyelték mindhárom MAPK foszforilációjának fokozódását LPS adás után (Soromou és mtsai, 2012; Joh és mtsai, 2012). Ezekkel az eredményekkel összhangban, kísérleteink során is emelkedett MAPK foszforilációs szinteket találtunk a tüdőben LPS intraperitonealis adását követően. Ugyanakkor a redoxszenzitív p38 és ERK foszforilációjának mértéke jelentősen alacsonyabb volt a CypD *knock-out* állatokban, míg

a JNK aktiváció változatlanul fokozott maradt esetükben. Hasonló eredményt Zhang és munkacsoportja is leírt, miszerint farmakológiai hatásra az ERK aktivitásának csökkenését észlelték, de a JNK foszforilációja endotoxémiát követően változatlan maradt a tüdőben (Zhang és mtsai, 2015). Ez az általunk is észlelt jelenség magyarázható egyrészt a MAPK-k eltérő ROS érzékenységeivel. Az ismert, hogy a ROS-k mindhárom MAPK aktivitását fokozni képesek (Genestra, 2007; Son és mtsai, 2013). Hatásukat kifejthetik a fehérjék oldalláncainak direkt módosítása révén, például a ciszteinsavmolekulák oxidációján keresztül, ugyanakkor a reguláció feltételezhetően elsősorban különböző „upstream” molekulák közvetítése által valósul meg (Son és mtsai, 2013; Moldogazieva és mtsai, 2018). ROS-k érzékelésében a MAPK útvonalon belül fontos szerepet töltenek be a MAPKK-kinázok. A redoxérzékeny ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1), mely különböző MAPKK-t foszforilál, képes aktiválni mind a p38-t, mind a JNK-t ROS-k hatására. Ezt támasztja alá, hogy ASK1 hiányos egerekben ROS stimulációt követően elmaradt a p38 és JNK foszforiláció/aktiváció (Nakagawa és mtsai, 2008). Ez a tény azonban ellentmond a mi megfigyelésünknek, mivel ha csak az ASK1 lenne felelős a JNK és p38 redoxérzékenységeért, hasonló változást kellett volna észlelnünk a két MAPK foszforiláltsági státuszában. Eredményeinket magyarázza az a korábbi vizsgálat, miszerint a H₂O₂ a JNK-t az ERK-től és p38-tól függetlenül képes stimulálni egy Src kináz mediált jelátviteli útvonalon keresztül. Yoshizumi és munkatársai a JNK H₂O₂ általi regulációjában a Cas és Src kinázok szerepét igazolták (Yoshizumi és mtsai, 2000). A ROS-k ERK-re kifejtett hatásának pontos mechanizmusa nem teljesen ismert, egyes feltételezések szerint a ROS-k aktiváló hatásukat „upstream”, a növekedési faktorok tirozin kináz aktivitással rendelkező receptorain keresztül fejtik ki az ERK-re (Son és mtsai, 2013). A p38 és ERK oxidatív regulációjában szerepe lehet a szintén redoxérzékeny IKK-knak is. Több vizsgálat alátámasztotta, hogy egyes sejttípusokban ROS hatására megnő az IKK α vagy IKK β foszforilációja/aktivációja (Kamata és mtsai, 2002; Nakajima és Kitamura, 2013). Ismert, hogy az IKK-k képesek az ERK és p38 aktivitását fokozni. Az ERK Tpl2 általi stimulációjához a gátló p105 alegység IKK mediált degradációjára van szükség. Madrid és munkatársai által végzett vizsgálat során az IKK-k a p38 foszforilációját indirekt módon serkentették IL-1 β hatására (Madrid és mtsai, 2001; Beinke és mtsai, 2004; Gantke és mtsai, 2011). Így esetünkben elképzelhető, hogy a csökkent ROS hatásból adódóan alacsonyabb volt a CypD *knock-out* állatokban az IKK és ezáltal az ERK és p38 aktivitás is. A reaktív oxigén származékok a MAPK-k szerkezetére gyakorolt direkt oxidatív hatás és a jelátviteli útvonalak egyes elemeinek módosításán túl, egy direkt regulátoros fehérjére,

a MAPK-kat negatívan szabályozó MKP-1-re is gátló hatást fejtenek ki. Ez egy másik lehetséges módja a MAPK-aktivitás befolyásolásának. Az MKP-1 mindhárom MAPK-ra specifikus, hatásának mértéke azonban igen eltérő lehet az egyes sejttípusok tekintetében (Slack és mtsai, 2001; Wang és Liu, 2007).

Számos, a MAPK-k expresszióját illetve aktivitását fokozó stimulus egyidőben megnöveli az MKP-1 expresszióját is, így az LPS. Egyes vizsgálatok szerint ehhez a hatáshoz a JNK aktivitására is szükség van (Owens és Keyse, 2007; Sánchez-Tilló és mtsai, 2007; Zhang és mtsai, 2012). A JNK mellett más effektormolekula is képes az MKP-1 expressziójának fokozására. Hammer és munkatársai makrofágokon végzett vizsgálataik során azt találták, hogy LPS stimulust követően az IL-10 megnöveli az MKP-1 expresszióját (Hammer és mtsai, 2005). Vizsgálatunk során is fokozódott az MKP-1 mennyisége endotoxémiát követően a tüdőben, azonban kísérleteink során a CypD hiányos állapotokban jóval nagyobb mennyiségű MKP-1-t sikerült kimutatnunk. Ugyanakkor az IL-10 mennyiségében és a JNK foszforiláltsági állapotában nem találtunk különbséget a két csoport között. Ezen eredmények arra utalnak, hogy esetünkben nem az expresszió megváltozása, hanem más mechanizmus, feltételezhetően a vad típusú állatokban jelenlévő fokozott oxidatív hatás vezetett az MKP-1 degradációjához. Az ismert, hogy az oxidatív stressz többféle módon befolyásolhatja negatív irányba az MKP-1 működését. Egyrésztől direkt hatásként a ROS-k oxidálják annak cisztein oldalláncait, aminek következtében katalitikus aktivitása elvész, valamint módosult fehérje aggregátumokat hoznak létre, melyek proteaszómálisan könnyen degradálódnak (Kamata és mtsai, 2005; Kim és mtsai, 2012). Más vizsgálatok indirekt mechanizmust is alátámasztottak. Az MKP-1-hez kötődő peroxiredoxin, mely egy potens peroxidáz és a cisztein csoportok védelmében van szerepe, magas ROS koncentráció esetén maga is oxidálódik, ennek következtében leválik az MKP-1-ről, ami ezt követően könnyen lebomlik (Latimer és Veal, 2016).

Vizsgálatunk alapján a CypD hiánya csak az ERK és p38 ROS általi aktivációjára gyakorolt hatást, de nem befolyásolja a JNK foszforilációt. Ez lehet részben eltérő redoxérzékenység és upstream reguláció következménye, illetve hozzájárulhat az ugyancsak redoxérzékeny MKP-1 megnövekedett jelenléte a CypD^{-/-} állatokban.

A MAPK-k mellett egy másik kináz, az Akt is részt vesz a TLR4 jelátvitelben. Lee és munkatársai RAW makrofágokon végzett kísérleteik segítségével igazolták, hogy LPS hatására MyD88-tól függő módon megnő az Akt aktivitása, ami elengedhetetlen az NF- κ B

transzaktivációjához (Lee és mtsai, 2003). Eredményeinkhez hasonlóan korábbi vizsgálatok során azt találták, hogy az LPS tüdőben is fokozza az Akt foszforiláltságát, valamint számos tüdő eredetű sejtvonalon is megnőtt az aktivitása endotoxin stimulust követően (Bozinowski 2002, Meng és mtsai, 2018; He és mtsai, 2012; Yum és mtsai, 2001). Madrid és munkatársai szerint az Akt a p38 MAPK-n keresztül gyakorol pozitív hatást az NF- κ B-re (Madrid és mtsai, 2001). Ezt tükrözi a két kináz általunk észlelt igen hasonló foszforiláltsági mintázata. Ozes vizsgálatai alapján az Akt az IKK-k foszforilálásán keresztül járul hozzá az NF- κ B aktivációjához (Ozes és mtsai, 1999). Az Akt működésére a PIP3-t előállító PI3K serkentőleg hat, míg a PTEN, mely a PIP3 3' hidroxilcsoportjáról lehasítja a foszfátcsoportot, negatív irányba befolyásolja foszforiláltságát és ezáltal aktivitását. CypD hiányos állatokban LPS kezelést követően jelentősen alacsonyabb volt az Akt foszforiláltsági szintje a vad típusú egerekhez képest. Ezt a CypD-hiány következtében kialakuló kisebb mértékű, elsősorban mitokondriális ROS termeléssel és az Akt redoxszenzitív szabályozásával magyarázzuk. Az Akt indirekt redox regulációja egyrészt a PI3K-n keresztül valósul meg, aminek működése még nem teljesen tisztázott módon fokozódik H₂O₂ kezelés hatására. Másrészt az inhibitoros funkcióval bíró PTEN aktivitása ROS-k hatására mérséklődik. Utóbbi reverzibilis gátlás, mely a molekulán belül reaktív oxigén származékok hatására kialakuló diszulfidhidak következménye (Kim és mtsai, 2009; Lee és mtsai, 2002). A mitokondriális ROS jelentőségét az PI3K/Akt jelátvitelben több vizsgálat is alátámasztja. A mitokondriális ROS felszabadulás gátlásával csökkenthető volt a PTEN inaktivációja és az Akt foszforilációja izomsejtekben. Humán amniális sejtvonalon végzett kísérletek alapján az mPTP kinyílásából adódó mitokondriális ROS felszabadulás megelőző és szükséges eleme az Akt aktivációjának (Kim és mtsai, 2018; Feng és mtsai, 2016).

A gyulladási folyamatok különböző jelátviteli résztvevői az NF- κ B transzkripciós faktor szintjén konvergálnak, amely faktor a proinflammatorikus mediátorok és enzimek expressziójáért felelős (Vermeulen és mtsai, 2002; Roy és mtsai, 2016). Az LPS indukálta TLR4 jelátvitel végeredménye is ennek a transzkripciós faktornak az aktiválódása, valamint az akut tüdőkárosodás kialakulásában is jelentős szerepe van (Fan és mtsai, 2001). Humán vizsgálatok is alátámasztják az NF- κ B jelentőségét, miszerint az ARDS-ben szenvedő betegek alveoláris makrofágjaiban megnőtt annak aktivitása más okból lélegeztetett, kontroll betegekhez képest (Schwartz és mtsai, 1996). Kísérleteink során az NF- κ B jelátviteli útvonal működését három oldalról vizsgáltuk meg. Vizsgáltuk az I κ B α

regulátoros gátló fehérijét, annak foszforiláltsági állapotát a 32. szerin oldalláncon. A TLR4 jelátvitel által indukált kanonikus NF- κ B aktiváció egyik fontos lépése az I κ B α 32. és 36. szerinen történő IKK-komplex általi foszforilációja. Ezen lépés révén lehetővé válik annak ubikvitinációja és proteaszómális lebomlása, valamint ennek köszönhetően felszabadul a p65 alegység és transzlokálódik a nukleuszba (Morgan és Liu, 2011; Viatour és mtsai, 2005; Vermeulen és mtsai, 2002). Megvizsgáltuk továbbá a p65 alegységnek a megfelelő transzaktivációs potenciál kialakulásához szükséges foszforiláltsági státuszát is az 536. szerinen, melyet többek között az IKK α és IKK β foszforilál (Viatour és mtsai, 2005; Sakurai és mtsai, 2003; Madrid és mtsai, 2001). Ezek a kísérletek indirekt módon nyújtottak betekintést az IKK-komplex egyes elemeinek működésébe és általuk a komponensek aktivitása jól nyomon követhető volt. Az NF- κ B működésének fokozódását végül az általa regulált inflammatorikus gének, így a CD14, IL-1 α , Cxcl2, IFN- γ , iNOS és TNF α expressziójának meghatározásával is igazoltuk. Vizsgálatunk során tüdőben endotoxémia hatására mind az I κ B α foszforilációs szintje, mind az NF- κ B foszforiláltsága nagymértékben megnőtt és minden vizsgált génnek az expressziója is jelentős fokozódást mutatott. A CypD^{-/-} állatokban azonban mindhárom jelenség csökkent intenzitással volt megfigyelhető. A KO állatokban a vizsgált gének kontrollhoz közeli expressziója jól tükrözte az NF- κ B transzaktivációs potenciáljához hozzájáruló, 536. szerinen történő alacsony foszforiláltsági állapotát.

A gyulladási folyamatok során az NF- κ B aktivitásának csökkentésében szerepet játszanak az anti-inflammatorikus citokinek, így az IL-10. Schottelius és munkatársai igazolták, hogy az IL-10 az IKK-k kináz funkcióját és az NF- κ B DNS-kötő kapacitását is gátolja (Schottelius és mtsai, 1999). Mivel esetünkben az IL-10 mennyisége mind a vad, mind a CypD hiányos állatok tüdejében egyforma mértékben nőtt meg, nem a fokozott anti-inflammatorikus hatás járult hozzá az általunk észlelt különbséghez az NF- κ B jelátvitel működésében. A jelenséget a CypD hiányában fennálló csökkent oxidatív stresszel és az NF- κ B jelátvitel redoxérzékenységgel hoztuk összefüggésbe.

Véleményünk szerint a mPTP kinyílásának elmaradása és ennek következtében az alacsonyabb szintű ROS és RNS képződés vezetett a KO állatokban észlelhető különbséghez. Az NF- κ B szignáltranszdukciós útvonal szabályozásában jelentős szerepet tölt be a redox reguláció. A jelátvitel több ponton befolyásolható redox módon, ugyanakkor a hatás ellentétes irányú is lehet a jelátvitel különböző komponensei szintjén és azok lokalizációjától függően (Morgan és Liu, 2011). Az egyes reaktív oxigén

származékok tekintetében kísérleti körülménytől, sejttípustól és expozíciós időtől függően mind serkentő, mind gátló hatást kimutattak már. Összességében azonban úgy tűnik, hogy az oxidatív stressz fokozza az NF- κ B jelátviteli útvonal működését, így az általa regulált faktorok transzkripcióját és szintézisét (Nakajima és Kitamura, 2013). A reaktív oxigén származékok több módon befolyásolhatják a jelátviteli résztvevők működését. Az IKK β 179. cisztein oldallancának direkt H₂O₂ általi oxidációja vagy NO általi módosítása a molekula aktivitásának csökkenését idézi elő (Korn és mtsai, 2001; Reynaert és mtsai, 2004). Mások ugyanakkor azt találták, hogy a H₂O₂ elősegíti az IKK α és az IKK β aktivációjához szükséges szerin-oldallancok foszforilációját (Kamata és mtsai, 2002). Ezenfelül a ROS-k, különösen a H₂O₂, fokozzák a NEMO dimerizációját annak 54. és 347. ciszteinmolekulája közötti diszulfidhíd kialakításával, ami elősegíti az IKK-komplex kialakulását (Herscovitch és mtsai, 2008; Israél, 2010). A ROS-k emellett több, az IKK-k foszforilációjáért felelős kináz működését is képesek serkenteni. Storz vizsgálata szerint H₂O₂ hatására foszforilálódik a PKD, ami foszforilálja az IKK β -t, ezáltal eredményezve az NF- κ B aktivációját (Storz és Toker, 2003). A szintén redoxérzékeny Akt képes mind az IKK α -t, mind az IKK β -t aktiválni, és így hozzájárul az IKK-komplex és ezáltal az NF- κ B szignáltranszdukció indukálásához (Madrid és mtsai, 2001; Kamata és mtsai, 2002; Morgan és Liu, 2011). A fent leírtak alapján arra következtettünk, hogy KO állatokban az I κ B α 32. szerinen történő, IKK-komplex által végzett gyengébb foszforilációjáért a CypD hiányában kialakuló csökkent oxidatív stressz, és az ebből fakadó mérsékelt kinázaktivitás tehető felelőssé. Hozzájárulhat még a fenti jelenséghez, hogy az IKK-komplex tagjainak defoszforilálásában és így inaktiválásában részt vevő foszfatázokat erősen gátolják a reaktív oxigén származékok. Loukili és munkatársai TNF α hatására elnyújtott NF- κ B aktivációt észleltek oxidatív stressz esetén, ami a PP2A-függő IKK-defoszforiláció elmaradásának volt következménye. A ciszteinben gazdag PP2A (protein foszfatáz 2A) ROS általi gátlása nemcsak az IKK, hanem a p65 foszforilációját is elősegíti (Loukili és mtsai, 2010; Sakurai és mtsai, 2003). A p65 alegység több szerin oldalláncon foszforilálódik, ami előfeltétele a megfelelő transzaktivációs potenciál kialakulásának és több ezek közül a redox egyensúly megváltozásával befolyásolható. A 276. szerinen történő foszforilációt a PKA (protein kinase A) és az MSK1 (mitogen- and stress-activated kinase 1) végzik, utóbbi intranukleárisan. Az általunk vizsgált 536. szerinen történő foszforilációért pedig többek között az IKK α és az Akt felelősek (Viatour és mtsai, 2005). Jamaluddin vizsgálata során az antioxidáns kezelés a TNF α indukált NF- κ B aktiváció lépései közül csak a PKA általi, 276. szerinen történő foszforilációt csökkentette

embrionális fibroblasztokban. Az MSK1 aktivitására illetve az 536. szerin foszforilációjára nem volt hatással (Jamaluddin, és mtsai, 2007). Egy másik munkacsoport az oxidatív hatás mérséklésének eredményeként az MSK1, az 536. szerinen történő, illetve az IKK- és az I κ B-foszforilációt is enyhébbnek találta patkány vesében (Kim és mtsai, 2011). Kiemelendő továbbá és a fent leírt jelenségekhez hozzájárulhat, hogy az MSK1 két korábban bemutatott, szintén redoxszenzitív MAPK, a p38 és az ERK irányítása alatt áll (Vermeulen és mtsai, 2002). Mindezen eredmények jól magyarázzák, hogy esetünkben a CypD-hiány a p65 536. szerinen történő foszforilációját enyhíteni tudta. Ehhez hozzájárult az indirekten vizsgált csökkent IKK és közvetlenül igazolt alacsonyabb Akt, ERK és p38 aktivitás. A transzaktivációs hatás elmaradását jól tükrözte, hogy az általunk vizsgált NF- κ B regulált gének transzkripciója is jelentősen elmaradt a KO állatok tüdejében LPS kezelés ellenére.

Összességében vizsgálatunk során a CypD^{-/-} állatok tüdejében az endotoxémia kiváltotta tüdőkárosodás szembevetően enyhébb volt. Eredményeink szerint a regulátoros alegység hiányában elmaradó/kisebb mértékben lejátszódó mitokondriális permeabilitás tranzíció csökkentette az oxidatív stressz mértékét. Ezt jól szemléltetik a stabil végtermékek, mint a nitrotirozin és a 4HNE immunhisztokémiai vizsgálatának eredményei. A mérsékelt oxidatív környezet hatására a redoxérzékeny jelátviteli résztvevők, a p38, az ERK és az Akt aktivitása is mérséklődött, melyek az NF- κ B szignáltranszdukció szintén oxidatív stresszre reagáló komponenseivel együttesen csökkent p65 foszforilációhoz és génexpresszióhoz vezettek. Ennek eredményeként a KO állatokban alacsonyabb volt a proinflammatorikus citokinek mennyisége és jóval enyhébbek voltak az akut tüdőkárosodásra jellemző elváltozások, ami elősegítette az állatok életben maradását is.

Eredményeink alapján jogosan merül fel az igény az mPTP inflammatorikus folyamatokban betöltött szerepének további vizsgálatára. Ezenkívül az mPTP kiváló célpont lehet számos olyan kórkép esetében, melyek patomechanizmusában kulcsfontosságú szerepet játszik a mitokondriális membrán integritás károsodása és a fokozott mitokondriális ROS termelés. Az mPTP megfelelő gátlása céljából szükség lenne szelektív CypD-inhibitorok kifejlesztésére. A CypD farmakológiai gátlásával kutatásunk alapján potenciálisan csökkenthető lenne a szepszis során kialakuló proinflammatorikus válaszreakció, a vele járó oxidatív stressz és a következményes szervkárosodás, az ARDS. Munkánknak érdekes, ugyanakkor sajnálatos aktualitást ad a jelenleg zajló COVID-19 világjárvány, ahol a vírus által kiváltott súlyos tüdőkárosodásért az általunk is vizsgált

folyamatok tehető felelőssé. Ennek kezelésében, részben eredményeink által is alátámasztva, felmerül a ciklosporinA használata, azonban ez további megerősítést igényel még a jövőben (Cour és mtsai, 2020).

6. EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

Vizsgálatunk során elsőként sikerült igazolnunk, hogy az mPTP elengedhetetlen regulátoros alegységének, ciklofilinD-nek a hiánya szöveti, ultrastrukturális és molekuláris szinten is enyhíti az endotoxémia indukálta akut tüdőkárosodást. Eredményeink az alábbi megállapításokkal foglalhatók össze:

1. A CypD-hiány nagymértékben elősegítette az egerek túlélését intraperitonealis LPS kezelést követően.
2. CypD *knock-out* állatokban jelentősen enyhébbnek bizonyultak az akut tüdőkárosodásra jellemző hisztológiai elváltozások, amit egy objektív pontrendszer segítségével is megerősítettünk.
3. A CypD^{-/-} egerek tüdejében alacsonyabb a proinflammatorikus citokinek szintje, míg az antiinflammatorikus IL-10 mennyiségében nem volt különbség szisztémás LPS hatására. Ezen eredményünket a proinflammatorikus citokinek expressziójára ható alacsonyabb ROS szinttel magyarázzuk.
4. Mind a fibrin-specifikus festési eljárás, mind az ultrastrukturális elektronmikroszkópos vizsgálat csökkent endoteliális barrier diszfunkciót mutatott ki a génhányos állatok tüdejében endotoxémiát követően.
5. A reaktív oxigén és nitrogén származékok által okozott károsodás, melyet a 4-hidroxi-2-nonenal Michael addukt lipidperoxidációs végtermék és a nitrotirozin ellenes jelölésekkel mutattunk ki, CypD KO állatok esetében jóval enyhébbnek bizonyult i.p. LPS után.
6. LPS kezelés esetén a CypD-hiány kihatással van a TLR4 jelátvitellel szorosan kapcsolódó ERK, p38 MAPK-k és az Akt aktivitására, csökkenti azt, ugyanakkor nem befolyásolja a JNK foszforilációját tüdőben. Az előbbiekhöz hozzájárulhat, hogy a KO állatokban a MAPK-kat inaktiváló MKP-1 szintje magasabb volt.
7. CypD *knock-out* állatokban LPS hatást követően csökkent mértékű a TLR4 jelátvitellel összefüggő kanonikus NF- κ B-aktiváció. Ez mind az I κ B, mind az NF- κ B p65 alegységének csökkent foszforilációjában észlelhető volt. Ez a hatás funkcionálisan, számos inflammatorikus mediátor génexpressziós profiljában is megmutatkozott.

7. IRODALOMJEGYZÉK

Aggarwal S, Dimitropoulou C, Lu Q, Black SM, Sharma S. (2012) *Glutathione supplementation attenuates lipopolysaccharide-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis in a mouse model of acute lung injury*. Front Physiol. 3:161.

Alavian KN, Beutner G, Lazrove E, Sacchetti S, Park HA, Licznerski P, Li H, Nabili P, Hockensmith K, Graham M, Porter GA Jr, Jonas EA. (2014) *An uncoupling channel within the c-subunit ring of the F1FO ATP synthase is the mitochondrial permeability transition pore*. Proc Natl Acad Sci USA. 111(29):10580-5.

Allam R, Kumar SV, Darisipudi MN, Anders HJ. (2014) *Extracellular histones in tissue injury and inflammation*. J Mol Med (Berl). 92(5):465-72.

Alonso de Vega JM, Díaz J, Serrano E, Carbonell LF. (2002) *Oxidative stress in critically ill patients with systemic inflammatory response syndrome*. Crit Care Med. 30(8):1782-6.

Amato MB, Barbas CS, Medeiros DM, Magaldi RB, Schettino GP, Lorenzi-Filho G, Kairalla RA, Deheinzelin D, Munoz C, Oliveira R, Takagaki TY, Carvalho CR. (1998) *Effect of a protective-ventilation strategy on mortality in the acute respiratory distress syndrome*. N Engl J Med. 338(6):347-54.

Amouzadeh HR, Qualls CW Jr, Wyckoff JH 3rd, Dzata GK, Sangiah S, Mauromoustakos A, Stein LE. (1993) *Biochemical and morphological alterations in xylazine-induced pulmonary edema*. Toxicol Pathol. 21(6):562-71.

Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. (2001) *Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care*. Crit Care Med. 29(7):1303-10.

Anrather J, Racchumi G, Iadecola C. (2006) *NF-kappaB regulates phagocytic NADPH oxidase by inducing the expression of gp91phox*. J Biol Chem. 281(9):5657-67.

Arakawa T, Nakamura M, Yoshimoto T, Yamamoto S. (1995) *The transcriptional regulation of human arachidonate 12-lipoxygenase gene by NF kappa B/Rel*. FEBS Lett. 363(1-2):105-10.

Azarashvili TS, Tyynela J, Odinkova IV, Grigorjev PA, Baumann M, Evtodienko YV, Saris NE. (2002) *Phosphorylation of a peptide related to subunit c of the F0F1-ATPase/ATP synthase and relationship to permeability transition pore opening in mitochondria*. J Bioenerg Biomembr. 34:279-84.

- Babior BM. (1999) *NADPH oxidase: an update*. Blood. 93(5):1464-76.
- Bachofen M, Weibel ER. (1977) *Alterations of the gas exchange apparatus in adult respiratory insufficiency associated with septicemia*. Am Rev Respir Dis. 116(4):589-615.
- Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, Hambleton MA, Brunskill EW, Sayen MR, Gottlieb RA, Dorn GW, Robbins J, Molkenin JD. (2005) *Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death*. Nature 434:658-662.
- Baines CP, Kaiser RA, Sheiko T, Craigen WJ, Molkenin JD. (2007) *Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death*. Nat Cell Biol. 9:550-5.
- Balk RA. (2014) *Systemic inflammatory response syndrome (SIRS): where did it come from and is it still relevant today?* Virulence. 5(1):20-6.
- Bandow K, Kusuyama J, Shamoto M, Kakimoto K, Ohnishi T, Matsuguchi T. (2012) *LPS-induced chemokine expression in both MyD88-dependent and -independent manners is regulated by Cot/Tpl2-ERK axis in macrophages*. FEBS Lett. 586(10):1540-6.
- Basso E, Fante L, Fowlkes J, Petronilli V, Forte MA, Bernardi P. (2005) *Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D*. J Biol Chem. 280:18558-61.
- Behjani ZZ, Ai J, Soleimani M, Atashi A, Taheri B, Ebrahimi-Barough S, Siavashi V, Shirian S, Hamidieh AA. (2019) *Human unrestricted somatic stem cells ameliorate sepsis-related acute lung injury in mice*. J Cell Physiol. 234(8):13942-50.
- Beinke S, Robinson MJ, Hugunin M, Ley SC. (2004) *Lipopolysaccharide activation of the TPL-2/MEK/extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase cascade is regulated by IkappaB kinase-induced proteolysis of NF-kappaB1 p105*. Mol Cell Biol. (21):9658-67.
- Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, Lamy M, Legall JR, Morris A, Spragg R. (1994) *The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination*. Am J Respir Crit Care Med. 149:818-24.

- Bernardi P, Bonaldo P. (2008) *Dysfunction of mitochondria and sarcoplasmic reticulum in the pathogenesis of collagen VI muscular dystrophies*. Ann N Y Acad Sci. 1147:303-11.
- Bernardi P, Vassanelli S, Veronese P, Colonna R, Szabó I, Zoratti M. (1992) *Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. Effect of protons and divalent cations*. J Biol Chem. 267(5):2934-9.
- Bernardi P, von Stockum S. (2012) *The permeability transition pore as a Ca(2+) release channel: new answers to an old question*. Cell Calcium. 52(1):22-7.
- Beveridge TJ. (1999) *Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles*. J Bacteriol. 181(16):4725-33.
- Bian K, Murad F. (2001) *Diversity of endotoxin-induced nitrotyrosine formation in macrophage-endothelium-rich organs*. Free Radic Biol Med. 31(4):421-9.
- Biasutto L, Azzolini M, Szabó I, Zoratti M. (2016) *The mitochondrial permeability transition pore in AD 2016: An update*. Biochim Biophys Acta. 1863(10):2515-30.
- Bilevicius E, Dragosavac D, Dragosavac S, Araújo S, Falcão AL, Terzi RG. (2001) *Multiple organ failure in septic patients*. Braz J Infect Dis. 5(3):103-10.
- Binkowska AM, Michalak G, Słotwiński R. (2015) *Current views on the mechanisms of immune responses to trauma and infection*. Cent Eur J Immunol. 40(2): 206-16.
- Boczkowski J, Lisdero CL, Lanone S, Samb A, Carreras MC, Boveris A, Aubier M, Poderoso JJ. (1999) *Endogenous peroxynitrite mediates mitochondrial dysfunction in rat diaphragm during endotoxemia*. FASEB J. 13(12):1637-46.
- Bogdan C, Vodovotz Y, Nathan C. (1991) *Macrophage deactivation by interleukin 10*. J Exp Med. 174:1549-55.
- Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. (1992) *Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine*. Chest. 101(6):1644-55
- Bone RC, Fisher CJ Jr, Clemmer TP, Slotman GJ, Metz CA, Balk RA. (1989) *Sepsis syndrome: a valid clinical entity. Methylprednisolone Severe Sepsis Study Group*. Crit Care Med. 17(5):389-93.

- Bone RC. (1996) *Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome: What we do and do not know about cytokine regulation.* Critical Care Medicine. 24(1):163-72.
- Bonora M, Pinton P. (2014) *The mitochondrial permeability transition pore and cancer: molecular mechanisms involved in cell death.* Front Oncol. 4:302.
- Boomer JS, Green JM, Hotchkiss RS. (2014) *The changing immune system in sepsis: is individualized immuno-modulatory therapy the answer?* Virulence. 5(1):45-56.
- Bozinovski S, Jones JE, Vlahos R, Hamilton JA, Anderson GP. (2002) *Granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor (GM-CSF) regulates lung innate immunity to lipopolysaccharide through Akt/Erk activation of NFkappa B and AP-1 in vivo.* J Biol Chem. 277:42808-14.
- Brondello JM, Pouysségur J, McKenzie FR. (1999) *Reduced MAP kinase phosphatase-1 degradation after p42/p44MAPK-dependent phosphorylation.* Science. 286(5449):2514-7.
- Brown KA, Brain SD, Pearson JD, Edgeworth JD, Lewis SM, Treacher DF. (2006) *Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis.* Lancet. 368(9530):157-69.
- Brun-Buisson C, Meshaka P, Pinton P, Vallet B. (2004) *EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units.* Intensive Care Med. 30:580-8.
- Bulua AC, Simon A, Maddipati R, Pelletier M, Park H, Kim KY, Sack MN, Kastner DL, Siegel RM. (2011) *Mitochondrial reactive oxygen species promote production of proinflammatory cytokines and are elevated in TNFR1-associated periodic syndrome (TRAPS).* J Exp Med. 208:519-33.
- Camara AK, Lesnefsky EJ, Stowe DF. (2010) *Potential therapeutic benefits of strategies directed to mitochondria.* Antioxid Redox Signal. 13(3):279-347.
- Carbonell LF, Nadal JA, Llanos MC, Hernández I, Nava E, Díaz J. (2000) *Depletion of liver glutathione potentiates the oxidative stress and decreases nitric oxide synthesis in a rat endotoxin shock model.* Crit Care Med. 28(6):2002-6.
- Carter AB, Monick MM, Hunninghake GW. (1999) *Both Erk and p38 kinases are necessary for cytokine gene transcription.* Am J Resp Cell Mol Biol. 20:751-8.

- Centers for Disease Control. (1990) *Increase in national hospital discharge survey rates for septicemia-United States, 1979–1987*. JAMA. 263:937-8.
- Chan JK, Roth J, Oppenheim JJ, Tracey KJ, Vogl T, Feldmann M, Horwood N, Nanchahal J. (2012) *Alarmins: awaiting a clinical response*. J Clin Invest. 122:2711-9.
- Chi H, Flavell RA. (2008) *Acetylation of MKP-1 and the control of inflammation*. Sci Signal. 1(41):pe44.
- Cho KJ, Seo JM, Kim JH. (2011) *Bioactive lipoxigenase metabolites stimulation of NADPH oxidases and reactive oxygen species*. Mol Cells. 32(1):1-5.
- Chow CW, Herrera Abreu MT, Suzuki T, Downey GP. (2003) *Oxidative stress and acute lung injury*. Am J Respir Cell Mol Biol. 29(4):427-31.
- Clarke SJ, McStay GP, Halestrap AP. (2002) *Sanglifehrin A acts as a potent inhibitor of the mitochondrial permeability transition and reperfusion injury of the heart by binding to cyclophilin-D at a different site from cyclosporin A*. J Biol Chem. 277(38):34793-9.
- Commins SP, Borish L, Steinke JW. (2010) *Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines*. J Allergy Clin Immunol. 125(2 Suppl 2):S53-72.
- Connern CP, Halestrap AP. (1992) *Purification and N-terminal sequencing of peptidyl-prolyl cis-trans-isomerase from rat liver mitochondrial matrix reveals the existence of a distinct mitochondrial cyclophilin*. Biochem J. 284(Pt 2):381-5.
- Cour M, Ovize M, Argaud L. (2020) *Cyclosporine A: a valid candidate to treat COVID-19 patients with acute respiratory failure?* Crit Care. 24(1):276.
- Crompton M, Costi A. (1988) *Kinetic evidence for a heart mitochondrial pore activated by Ca²⁺, inorganic phosphate and oxidative stress. A potential mechanism for mitochondrial dysfunction during cellular Ca²⁺ overload*. Eur J Biochem. 178(2):489-501.
- Crompton M, Virji S, Ward JM. (1998) *Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore*. Eur J Biochem. 258:729-35.
- Crompton M. (1999) *The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death*. Biochem J. 341: 233-49.

- Crouser ED, Julian MW, Huff JE, Joshi MS, Bauer JA, Gadd ME, Wewers MD, Pfeiffer DR. (2004) *Abnormal permeability of inner and outer mitochondrial membranes contributes independently to mitochondrial dysfunction in the liver during acute endotoxemia*. Crit Care Med. 32(2):478-88.
- Crouser ED, Julian MW, Joshi MS, Bauer JA, Wewers MD, Hart JM, Pfeiffer DR. (2002) *Cyclosporin A ameliorates mitochondrial ultrastructural injury in the ileum during acute endotoxemia*. Crit Care Med. 30(12):2722-8.
- Cummings CJ, Martin TR, Frevert CW, Quan JM, Wong VA, Mongovin SM, Hagen TR, Steinberg KP, Goodman RB. (1999) *Expression and function of the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 in sepsis*. J Immunol. 162(4):2341-6.
- Da Cruz S, Parone PA, Martinou JC. (2005) *Building the mitochondrial proteome*. Expert Rev Proteomics. 2(4):541-51.
- Davis TL, Walker JR, Campagna-Slater V, Finerty PJ, Paramanathan R, Bernstein G, MacKenzie F, Tempel W, Ouyang H, Lee WH, Eisenmesser EZ, Dhe-Paganon S. (2010) *Structural and biochemical characterization of the human cyclophilin family of peptidyl-prolyl isomerases*. PLoS Biol. 8(7):e1000439.
- Donnelly SC, Strieter RM, Reid PT, Kunkel SL, Burdick MD, Armstrong I, Mackenzie A, Haslett C. (1996) *The association between mortality rates and decreased concentrations of interleukin-10 and interleukin-1 receptor antagonist in the lung fluids of patients with the adult respiratory distress syndrome*. Ann Intern Med. 125:191-6.
- Dröge W. (2002) *Free radicals in the physiological control of cell function*. Physiol Rev. 82(1):47-95.
- Du H, Guo L, Fang F, Chen D, Sosunov AA, McKhann GM, Yan Y, Wang C, Zhang H, Molkentin JD, Gunn-Moore FJ, Vonsattel JP, Arancio O, Chen JX, Yan SD. (2008) *Cyclophilin D deficiency attenuates mitochondrial and neuronal perturbation and ameliorates learning and memory in Alzheimer's disease*. Nat Med. 14(10):1097-105.
- Ebenezer DL, Fu P, Suryadevara V, Zhao Y, Natarajan V. (2017) *Epigenetic regulation of pro-inflammatory cytokine secretion by sphingosine 1-phosphate (S1P) in acute lung injury: Role of S1P lyase*. Adv Biol Regul. 63:156-66.

- Erdei A, Sármay G, Prechl J. (2012) *A sejtmembrán és a receptorok általános szerkezete, az immunsejtek sejt felszíni molekulái*. Immunológia 4. fejezet: László Glória, Matkó János, Prechl József, Sármay Gabriella. Medicina Könyvkiadó Zrt.
- Erridge C, Bennett-Guerrero E, Poxton IR. (2002) *Structure and function of lipopolysaccharides*. Microbes Infect. 4(8):837-51.
- Fan J, Ye RD, Malik AB. (2001) *Transcriptional mechanisms of acute lung injury*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 281(5):1037-50.
- Feng B, Ye C, Qiu L, Chen L, Fu Y, Sun W. (2016) *Mitochondrial ROS Release and Subsequent Akt Activation Potentially Mediated the Anti-Apoptotic Effect of a 50-Hz Magnetic Field on FL Cells*. Cell Physiol Biochem. 38(6):2489-99.
- Fiedler B, Wollert KC. (2004) *Interference of antihypertrophic molecules and signaling pathways with the Ca²⁺-calcineurin-NFAT cascade in cardiac myocytes*. Cardiovasc Res. 63:450-7.
- Finfer S, Bellomo R, Lipman J, French C, Dobb G, Myburgh J. (2004) *Adult-population incidence of severe sepsis in Australian and New Zealand intensive care units*. Intensive Care Med. 30(4):589-96.
- Fitzgerald KA, Palsson-McDermott EM, Bowie AG, Jefferies CA, Mansell AS, Brady G, Brint E, Dunne A, Gray P, Harte MT, McMurray D, Smith DE, Sims JE, Bird TA, O'Neill LA. (2001) *Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction*. Nature. 413(6851):78-83.
- Fitzgerald KA, Rowe DC, Barnes BJ, Caffrey DR, Visintin A, Latz E, Monks B, Pitha PM, Golenbock DT. (2003) *LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adaptors TRAM and TRIF*. J Exp Med. 198(7):1043-55.
- Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NK, Hartog CS, Tsaganos T, Schlattmann P, Angus DC, Reinhart K; International Forum of Acute Care Trialists. (2016) *Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis. Current estimates and limitations*. Am J Respir Crit Care Med. 193(3):259-72.
- Fridovich I. (1989) *Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas*. J Biol Chem. 264(14):7761-4.
- Gantke T, Sriskantharajah S, Ley SC. (2011) *Regulation and function of TPL-2, an IκB kinase-regulated MAP kinase kinase kinase*. Cell Res. 21(1):131-45.

- Gao XP, Standiford TJ, Rahman A, Newstead M, Holland SM, Dinauer MC, Liu QH, Malik AB. (2002) *Role of NADPH oxidase in the mechanism of lung neutrophil sequestration and microvessel injury induced by Gram-negative sepsis: studies in p47phox^{-/-} and gp91phox^{-/-} mice.* J Immunol. 168(8):3974-82.
- Ge M, Chen C, Yao W, Zhou S, Huang F, Cai J, Hei Z. (2017) *Overexpression of Brg1 alleviates hepatic ischemia/reperfusion-induced acute lung injury through antioxidative stress effects.* Oxid Med Cell Longev. 2017:8787392.
- Genestra M. (2007) *Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants.* Cell Signal. 19(9):1807-19.
- Giorgio V, Bisetto E, Soriano ME, Dabbeni-Sala F, Basso E, Petronilli V, Forte MA, Bernardi P, Lippe G. (2009) *Cyclophilin D modulates mitochondrial F₀F₁-ATP synthase by interacting with the lateral stalk of the complex.* J Biol Chem. 284(49):33982-8.
- Giorgio V, von Stockum S, Antoniel M, Fabbro A, Fogolari F, Forte M, Glick GD, Petronilli V, Zoratti M, Szabó I, Lippe G, Bernardi P. (2013) *Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore.* Proc Natl Acad Sci USA 110: 5887-92.
- Glas GJ, Van Der Sluijs KF, Schultz MJ, Hofstra JJ, Van Der Poll T, Levi M. (2013) *Bronchoalveolar hemostasis in lung injury and acute respiratory distress syndrome.* J Thromb Haemost. 11(1):17-25.
- Goode HF, Cowley HC, Walker BE, Howdl PD, Webster NR. (1995) *Decreased antioxidant status and increased lipid peroxidation in patients with septic shock and secondary organ dysfunction.* Crit Care Med. 23(4):646-51.
- Goodman RB, Pugin J, Lee JS, Matthay MA. (2003) *Cytokine-mediated inflammation in acute lung injury.* Cytokine Growth Factor Rev. 14(6):523-35.
- Griendling KK, Sorescu D, Lassègue B, Ushio-Fukai M. (2000) *Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology.* Arterioscler Thromb Vasc Biol. 20(10):2175-83.
- Griffiths EJ, Halestrap AP. (1991) *Further evidence that cyclosporin A protects mitochondria from calcium overload by inhibiting a matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase. Implications for the immunosuppressive and toxic effects of cyclosporin.* Biochem J. 274(Pt 2):611-4.

- Grommes J, Soehnlein O. (2011) *Contribution of neutrophils to acute lung injury*. Mol Med. 17(3-4):293-307.
- Guha M, Mackman N. (2001) *LPS induction of gene expression in human monocytes*. Cell Signal. 13(2):85-94.
- Gupta S, Feng L, Yoshimura T, Redick J, Fu SM, Rose CE Jr. (1996) *Intra-alveolar macrophage-inflammatory peptide 2 induces rapid neutrophil localization in the lung*. Am J Respir Cell Mol Biol. 15(5):656-63.
- Gutiérrez-Aguilar M, Baines CP. (2015) *Structural mechanisms of cyclophilin D-dependent control of the mitochondrial permeability transition pore*. Biochim Biophys Acta. 1850(10):2041-7.
- Gutiérrez-Aguilar M, Douglas DL, Gibson AK, Domeier TL, Molckentin JD, Baines CP. (2014) *Genetic manipulation of the cardiac mitochondrial phosphate carrier does not affect permeability transition*. J Mol Cell Cardiol. 72:316-25.
- Haddad JJ, Land SC. (2002) *Redox/ROS regulation of lipopolysaccharide-induced mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation and MAPK-mediated TNF-alpha biosynthesis*. Br J Pharmacol. 135(2):520-36.
- Halestrap AP, Davidson AM. (1990) *Inhibition of Ca²⁺(+)-induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase*. Biochem J. 268(1):153-60.
- Halestrap AP, Richardson AP. (2015) *The mitochondrial permeability transition: a current perspective on its identity and role in ischaemia/reperfusion injury*. J Mol Cell Cardiol. 78:129-41.
- Halliwell B, Gutteridge JM. (1992) *Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update*. FEBS Lett. 307(1):108-12.
- Hammer M, Mages J, Dietrich H, Schmitz F, Striebel F, Murray PJ, Wagner H, Lang R. (2005) *Control of dual-specificity phosphatase-1 expression in activated macrophages by IL-10*. Eur J Immunol. 35(10):2991-3001.
- Hammer M, Mages J, Dietrich H, Servatius A, Howells N, Cato AC, Lang R. (2006) *Dual specificity phosphatase 1 (DUSP1) regulates a subset of LPS-induced genes and protects mice from lethal endotoxin shock*. J Exp Med. 203(1):15-20.

- Han S, Mallampalli RK. (2015) *The acute respiratory distress syndrome: from mechanism to translation*. J Immunol. 194(3):855-60.
- Hashimoto S, Kobayashi A, Kooguchi K, Kitamura Y, Onodera H, Nakajima H. (2000) *Upregulation of two death pathways of perforin/granzyme and FasL/Fas in septic acute respiratory distress syndrome*. Am J Respir Crit Care Med. 161(1):237-43.
- Hazeki K, Nigorikawa K, Hazeki O. (2007) *Role of phosphoinositide 3-kinase in innate immunity*. Biol Pharm Bull. 30(9):1617-23.
- Haziot A, Ferrero E, Köntgen F, Hijiya N, Yamamoto S, Silver J, Stewart CL, Goyert SM. (1996) *Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of gram-negative bacteria in CD14-deficient mice*. Immunity. 4(4):407-14.
- He Z, Gao Y, Deng Y, Li W, Chen Y, Xing S, Zhao X, Ding J, Wang X. (2012) *Lipopolysaccharide induces lung fibroblast proliferation through Toll-like receptor 4 signaling and the phosphoinositide3-kinase-Akt pathway*. PLoS One. 7(4):e35926.
- Herscovitch M, Comb W, Ennis T, Coleman K, Yong S, Armstead B, Kalaitzidis D, Chandani S, Gilmore TD. (2008) *Intermolecular disulfide bond formation in the NEMO dimer requires Cys54 and Cys347*. Biochem Biophys Res Commun. 367:103-108.
- Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S. (1999) *Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product*. J Immunol. 162(7):3749-52.
- Hu JF, Xia XM, Li DM, Zhang Y, Chen YQ. (2011) *The effect of cyclosporine A on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice*. Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi. 27(1):120-3.
- Huang YS, Yang ZC, Liu XS, Chen FM, He BB, Li A, Crowther RS. (1998) *Serial experimental and clinical studies on the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome (MODS) in severe burns*. Burns. 24(8):706-16.
- Huo Y, Rangarajan P, Ling EA, Dheen ST. (2011) *Dexamethasone inhibits the Nox-dependent ROS production via suppression of MKP-1-dependent MAPK pathways in activated microglia*. BMC Neurosci. 12:49.

- Iscimen R, Cartin-Ceba R, Yilmaz M, Khan H, Hubmayr RD, Afessa B, Gajic O. (2008) *Risk factors for the development of acute lung injury in patients with septic shock: an observational cohort study*. Crit Care Med. 36(5):1518-22.
- Israël A. (2010) *The IKK complex, a central regulator of NF-kappaB activation*. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2(3):a000158.
- Jakus PB, Kalman N, Antus C, Radnai B, Tucsek Z, Gallyas F Jr, Sumegi B, Veres B. (2013) *TRAF6 is functional in inhibition of TLR4-mediated NF-kB activation by resveratrol*. J Nutr Biochem. 24(5):819-23.
- Janssens S, Beyaert R. (2003) *Functional diversity and regulation of different interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family members*. Mol Cell. 11(2):293-302.
- Jarrar D, Kuebler JF, Rue LW 3rd, Matalon S, Wang P, Bland KI, Chaudry IH. (2002) *Alveolar macrophage activation after trauma-hemorrhage and sepsis is dependent on NF-kappaB and MAPK/ERK mechanisms*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 283(4):799-805.
- Jennings C, Kusler B, Jones PP. (2009) *Calcineurin inactivation leads to decreased responsiveness to LPS in macrophages and dendritic cells and protects against LPS-induced toxicity in vivo*. Innate Immun. 15(2):109-20.
- Jeong K, Kim H, Kim K, Kim SJ, Hahn BS, Jahng GH, Yoon KS, Kim SS, Ha J, Kang I, Choe W. (2014) *Cyclophilin B is involved in p300-mediated degradation of CHOP in tumor cell adaptation to hypoxia*. Cell Death Differ. 21:438-50.
- Ji MH, Zhu XL, Liu FF, Li GM, Tian M, Wu J, Fan YX, Li N, Yang JJ. (2012) *Alpha 2A-adrenoreceptor blockade improves sepsis-induced acute lung injury accompanied with depressed high mobility group box-1 levels in rats*. Cytokine. 60(3):639-45.
- Joh EH, Gu W, Kim DH. (2012) *Echinocystic acid ameliorates lung inflammation in mice and alveolar macrophages by inhibiting the binding of LPS to TLR4 in NF-kB and MAPK pathways*. Biochem Pharmacol. 84(3):331-40.
- Johnston RB Jr, Godzik CA, Cohn ZA. (1978) *Increased superoxide anion production by immunologically activated and chemically elicited macrophages*. J Exp Med. 148(1):115-27.

- Joshi MS, Julian MW, Huff JE, Bauer JA, Xia Y, Crouser ED. (2006) *Calcineurin regulates myocardial function during acute endotoxemia*. Am J Respir Crit Care Med. 173(9):999-1007.
- Kamata H, Honda S, Maeda S, Chang L, Hirata H, Karin M. (2005) *Reactive oxygen species promote TNF α -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases*. Cell. 120(5):649-61.
- Kamata H, Manabe T, Oka S, Kamata K, Hirata H. (2002) *Hydrogen peroxide activates I κ B kinases through phosphorylation of serine residues in the activation loops*. FEBS Lett. 519:231-7.
- Kaplan MJ, Radic M. (2012) *Neutrophil extracellular traps (NETs): Double-edged swords of innate immunity*. J Immunol. 189(6):2689-95.
- Karpurapu M, Lee YG, Qian Z, Wen J, Ballinger MN, Rusu L, Chung S, Deng J, Qian F, Reader BF, Nirujogi TS, Park GY, Pei D, Christman JW. (2018) *Inhibition of nuclear factor of activated T cells (NFAT) c3 activation attenuates acute lung injury and pulmonary edema in murine models of sepsis*. Oncotarget. 9(12):10606-20.
- Kato Y. (2016) *Neutrophil myeloperoxidase and its substrates: formation of specific markers and reactive compounds during inflammation*. J Clin Biochem Nutr. 58(2):99-104.
- Kaukonen KM, Bailey M, Suzuki S, Pilcher D, Bellomo R. (2014) *Mortality related to severe sepsis and septic shock among critically ill patients in Australia and New Zealand, 2000-2012*. JAMA. 311:1308-16.
- Keränen T, Moilanen E, Korhonen R. (2017) *Suppression of cytokine production by glucocorticoids is mediated by MKP-1 in human lung epithelial cells*. Inflamm Res. 66(5):441-9.
- Keshari RS, Silasi-Mansat R, Zhu H, Popescu NI, Peer G, Chaaban H, Lambris JD, Polf H, Lupu C, Kinasewitz G, Lupu F. (2014) *Acute lung injury and fibrosis in a baboon model of Escherichia coli sepsis*. Am J Respir Cell Mol Biol. 50(2):439-50.
- Kim EK, Choi EJ. (2010) *Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases*. Biochim Biophys Acta. 1802(4):396-405.

- Kim HJ, Kim SR, Park JK, Kim DI, Jeong JS, Lee YC. (2012) *PI3K γ activation is required for LPS-induced reactive oxygen species generation in respiratory epithelial cells.* Inflamm Res. 61(11):1265-72.
- Kim HJ, Lee HS, Chong YH, Kang JL. (2006) *p38 Mitogen-activated protein kinase up-regulates LPS-induced NF-kappaB activation in the development of lung injury and RAW 264.7 macrophages.* Toxicology. 225(1):36-47.
- Kim HS, Ullevig SL, Zamora D, Lee CF, Asmis R. (2012) *Redox regulation of MAPK phosphatase 1 controls monocyte migration and macrophage recruitment.* Proc Natl Acad Sci USA. 109:E2803-2812.
- Kim JH, Choi TG, Park S, Yun HR, Nguyen NNY, Jo YH, Jang M, Kim J, Kim J, Kang I, Ha J, Murphy MP, Tang DG, Kim SS. (2018) *Mitochondrial ROS-derived PTEN oxidation activates PI3K pathway for mTOR-induced myogenic autophagy.* Cell Death Differ. 25(11):1921-1937.
- Kim JH, Lee G, Cho YL, Kim CK, Han S, Lee H, Choi JS, Choe J, Won MH, Kwon YG, Ha KS, Kim YM. (2009) *Desmethylanhydroicaritin inhibits NF-kappaB-regulated inflammatory gene expression by modulating the redox-sensitive PI3K/PTEN/Akt pathway.* Eur J Pharmacol. 602(2-3):422-31.
- Kim JM, Heo HS, Choi YJ, Ye BH, Mi Ha Y, Seo AY, Yu BP, Leeuwenburgh C, Chung HY, Carter CS. (2011) *Inhibition of NF- κ B-induced inflammatory responses by angiotensin II antagonists in aged rat kidney.* Exp Gerontol. 46(7):542-8.
- Kokoszka JE, Waymire KG, Levy SE, Sligh JE, Cai J, Jones DP, MacGregor GR, Wallace DC. (2004) *The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore.* Nature. 427(6973):461-5.
- Korn SH, Wouters EF, Vos N, Janssen-Heininger YM. (2001) *Cytokine-induced activation of nuclear factor-kappa B is inhibited by hydrogen peroxide through oxidative inactivation of IkappaB kinase.* J Biol Chem. 276(38):35693-700.
- Kotake Y, Sang H, Miyajima T, Wallis GL. (1998) *Inhibition of NF-kappaB, iNOS mRNA, COX2 mRNA, and COX catalytic activity by phenyl-N-tert-butyl nitron (PBN).* Biochim Biophys Acta. 1448(1):77-84.

- Kristof AS, Goldberg P, Laubach V, Hussain SN. (1998) *Role of inducible nitric oxide synthase in endotoxin-induced acute lung injury*. Am J Respir Crit Care Med. 158(6):1883-9.
- Krysko DV, Agostinis P, Krysko O, Garg AD, Bachert C, Lambrecht BN, Vandenabeele P. (2011) *Emerging role of damage-associated molecular patterns derived from mitochondria in inflammation*. Trends Immunol. 32(4):157-64.
- Lang JD, McArdle PJ, O'Reilly PJ, Matalon S. (2002) *Oxidant-antioxidant balance in acute lung injury*. Chest. 122(6 Suppl):314S-20S.
- László I, Trásy D, Molnár Z, Fazakas J. (2015) *Sepsis: From Pathophysiology to Individualized Patient Care*. J Immunol Res. 2015:510436.
- Latimer HR, Veal EA. (2016) *Peroxiredoxins in Regulation of MAPK Signalling Pathways; Sensors and Barriers to Signal Transduction*. Mol Cells. 39(1):40-5.
- Lee IT, Yang CM. (2012) *Role of NADPH oxidase/ROS in pro-inflammatory mediators-induced airway and pulmonary diseases*. Biochem Pharmacol. 84(5):581-90.
- Lee JY, Ye J, Gao Z, Youn HS, Lee WH, Zhao L, Sizemore N, Hwang DH. (2003) *Reciprocal modulation of Toll-like receptor-4 signaling pathways involving MyD88 and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT by saturated and polyunsaturated fatty acids*. J Biol Chem. 278(39):37041-51.
- Lee SR, Yang KS, Kwon J, Lee C, Jeong W, Rhee SG. (2002) *Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H₂O₂*. J Biol Chem. 277:20336-42.
- Leung AW, Varanyuwatana P, Halestrap AP. (2008) *The mitochondrial phosphate carrier interacts with cyclophilin D and may play a key role in the permeability transition*. J Biol Chem. 283(39):26312-23.
- Levy MM, Dellinger RP, Townsend SR, Linde-Zwirble WT, Marshall JC, Bion J, Schorr C, Artigas A, Ramsay G, Beale R, Parker MM, Gerlach H, Reinhart K, Silva E, Harvey M, Regan S, Angus DC. (2010) *The Surviving Sepsis Campaign: results of an international guideline-based performance improvement program targeting severe sepsis*. Intensive Care Med. 36:222-31.

- Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G; SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS. (2003) 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. Crit Care Med. 31(4):1250-6.
- Lim HW, New L, Han J, Molkentin JD. (2001) Calcineurin enhances MAPK phosphatase-1 expression and p38 MAPK inactivation in cardiac myocytes. J Biol Chem. 276(19):15913-9.
- Lin SC, Lo YC, Wu H. (2010) Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. Nature. 465(7300):885-90.
- Liu X, Chen Z. (2017) The pathophysiological role of mitochondrial oxidative stress in lung diseases. J Transl Med. 15(1):207.
- Liu XY, Xu HX, Li JK, Zhang D, Ma XH, Huang LN, Lü JH, Wang XZ. (2018) Neferine protects endothelial glycocalyx via mitochondrial ROS in lipopolysaccharide-induced acute respiratory distress syndrome. Front Physiol. 9:102.
- Loukili N, Rosenblatt-Velin N, Rolli J, Levrant S, Feihl F, Waeber B, Pacher P, Liaudet L. (2010) Oxidants positively or negatively regulate nuclear factor kappaB in a context-dependent manner. J Biol Chem. 285(21):15746-52.
- Maia L, Vala A, Mira L. (2005) NADH oxidase activity of rat liver xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase-contribution for damage mechanisms. Free Radic Res. 39(9):979-86.
- Mallory FB. (1900) A contribution to staining methods : I. A differential stain for connective-tissue fibrillae and reticulum. II. Chloride of iron haematoxylin for nuclei and fibrin. III. Phosphotungstic acid haematoxylin for neuroglia fibres. J Exp Med. 5(1):15-20.
- Manicone AM. (2009) Role of the pulmonary epithelium and inflammatory signals in acute lung injury. Expert Rev Clin Immunol. 5(1):63-75.
- Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. (2003) The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. N Engl J Med. 348(16):1546-54.
- Marui N, Offermann MK, Swerlick R, Kunsch C, Rosen CA, Ahmad M, Alexander RW, Medford RM. (1993) Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. J Clin Invest. 92(4):1866-74.

- Matute-Bello G, Downey G, Moore BB, Groshong SD, Matthay MA, Slutsky AS, Kuebler WM; Acute Lung Injury in Animals Study Group. (2011) *An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals*. Am J Respir Cell Mol Biol. 44:725-38.
- Matute-Bello G, Liles WC, Steinberg KP, Kiener PA, Mongovin S, Chi EY, Jonas M, Martin TR. (1999) *Soluble Fas ligand induces epithelial cell apoptosis in humans with acute lung injury (ARDS)*. J Immunol. 163(4):2217-25.
- Mazgaeen L, Gurung P. (2020) *Recent Advances in Lipopolysaccharide Recognition Systems*. Int J Mol Sci. 21(2):379.
- McStay GP, Clarke SJ, Halestrap AP. (2002) *Role of critical thiol groups on the matrix surface of the adenine nucleotide translocase in the mechanism of the mitochondrial permeability transition pore*. Biochem J. 367(Pt 2):541-8.
- Meduri GU, Kohler G, Headley S, Tolley E, Stentz F, Postlethwaite A. (1995) *Inflammatory cytokines in the BAL of patients with ARDS. Persistent elevation over time predicts poor outcome*. Chest 108:1303-14.
- Mello Filho AC, Meneghini R. (1984) *In vivo formation of single-strand breaks in DNA by hydrogen peroxide is mediated by the Haber-Weiss reaction*. Biochim Biophys Acta. 781(1-2):56-63.
- Meng L, Li L, Lu S, Li K, Su Z, Wang Y, Fan X, Li X, Zhao G. (2018) *The protective effect of dexmedetomidine on LPS-induced acute lung injury through the HMGB1-mediated TLR4/NF- κ B and PI3K/Akt/mTOR pathways*. Mol Immunol. 94:7-17.
- Meyer M, Schreck R, Baeuerle PA. (1993) *H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF κ B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-response factor*. EMBO J. 12:2005-15.
- Millay DP, Sargent MA, Osinska H, Baines CP, Barton ER, Vuagniaux G, Sweeney HL, Robbins J, Molkenkin JD. (2008) *Genetic and pharmacologic inhibition of mitochondrial-dependent necrosis attenuates muscular dystrophy*. Nat Med. 14(4):442-7.
- Mofidi R, Duff MD, Wigmore SJ, Madhavan KK, Garden OJ, Parks RW. (2006) *Association between early systemic inflammatory response, severity of multiorgan dysfunction and death in acute pancreatitis*. Br J Surg. 93(6):738-44.

- Moldogazieva NT, Mokhosoev IM, Feldman NB, Lutsenko SV. (2018) *ROS and RNS signalling: adaptive redox switches through oxidative/nitrosative protein modifications*. Free Radic Res. 52(5):507-43.
- Moncada S, Higgs EA. (1991) *Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance*. Eur J Clin Invest. 21(4):361-74.
- Morgan MJ, Liu ZG. (2011) *Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling*. Cell Res. 21(1):103-15.
- Nakagawa H, Maeda S, Hikiba Y, Ohmae T, Shibata W, Yanai A, Sakamoto K, Ogura K, Noguchi T, Karin M, Ichijo H, Omata M. (2008) *Deletion of apoptosis signal-regulating kinase 1 attenuates acetaminophen-induced liver injury by inhibiting c-Jun N-terminal kinase activation*. Gastroenterology. 135(4):1311-21.
- Nakajima S, Kitamura M. (2013) *Bidirectional regulation of NF- κ B by reactive oxygen species: a role of unfolded protein response*. Free Radic Biol Med. 65:162-74.
- Naoumov NV. (2014) *Cyclophilin inhibition as potential therapy for liver diseases*. J Hepatol 61:1166-74.
- Nicholson KM, Anderson NG. (2002) *The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy*. Cell Signal. 14(5):381-95.
- Nigro P, Pompilio G, Capogrossi MC. (2013) *Cyclophilin A: a key player for human disease*. Cell Death Dis. 4:e888.
- Norman KG, Canter JA, Shi M, Milne GL, Morrow JD, Sligh JE. (2010) *Cyclosporine A suppresses keratinocyte cell death through MPTP inhibition in a model for skin cancer in organ transplant recipients*. Mitochondrion. 10(2):94-101.
- Novgorodov SA, Gudz TI, Jung DW, Brierley GP. (1991) *The nonspecific inner membrane pore of liver mitochondria: modulation of cyclosporin sensitivity by ADP at carboxyatractyloside-sensitive and insensitive sites*. Biochem Biophys Res Commun. 180(1):33-8.
- Numata M, Suzuki S, Miyazawa N, Miyashita A, Nagashima Y, Inoue S, Kaneko T, Okubo T. (1998) *Inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents LPS-induced acute lung injury in dogs*. J Immunol. 160(6):3031-7.
- O'Neill LA. (2008) *The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress*. Immunol Rev. 226:10-8.

- O'Neill LA, Bowie AG. (2007) *The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling*. Nat Rev Immunol. 7:353-64.
- Odagiri K, Katoh H, Kawashima H, Tanaka T, Ohtani H, Saotome M, Urushida T, Satoh H, Hayashi H. (2009) *Local control of mitochondrial membrane potential, permeability transition pore and reactive oxygen species by calcium and calmodulin in rat ventricular myocytes*. J Mol Cell Cardiol. 46(6):989-97.
- O'Neill LA. (2008) *The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress*. Immunol Rev. 226:10-8.
- Orfanos SE, Mavrommati I, Korovesi I, Roussos C. (2004) *Pulmonary endothelium in acute lung injury: from basic science to the critically ill*. Intensive Care Med. 30(9):1702-14.
- Owens DM, Keyse SM. (2007) *Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases*. Oncogene. 26(22):3203-13.
- Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM, Donner DB. (1999) *NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase*. Nature. 401(6748):82-5.
- Park BS, Lee JO. (2013) *Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes*. Exp Mol Med. 45:e66.
- Park J, Min JS, Kim B, Chae UB, Yun JW, Choi MS, Kong IK, Chang KT, Lee DS. (2015) *Mitochondrial ROS govern the LPS-induced pro-inflammatory response in microglia cells by regulating MAPK and NF- κ B pathways*. Neurosci Lett. 584:191-6.
- Parthasarathi K, Ichimura H, Quadri S, Issekutz A, Bhattacharya J. (2002) *Mitochondrial reactive oxygen species regulate spatial profile of proinflammatory responses in lung venular capillaries*. J Immunol. 169(12):7078-86.
- Patterson KI, Brummer T, O'Brien PM, Daly RJ. (2009) *Dual-specificity phosphatases: critical regulators with diverse cellular targets*. Biochem J. 418(3):475-89.
- Pebay-Peyroula E, Dahout-Gonzalez C, Kahn R, Trézéguet V, Lauquin GJ, Brandolin G. (2003) *Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside*. Nature. 426(6962):39-44.
- Perl M, Lomas-Neira J, Venet F, Chung CS, Ayala A. (2011) *Pathogenesis of indirect (secondary) acute lung injury*. Expert Rev Respir Med. 5(1):115-26.

- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. (1998) *Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene*. Science. 282(5396):2085-8.
- Prauchner CA. (2017) *Oxidative stress in sepsis: Pathophysiological implications justifying antioxidant co-therapy*. Burns. 43(3):471-85.
- Rahighi S, Ikeda F, Kawasaki M, Akutsu M, Suzuki N, Kato R, Kensche T, Uejima T, Bloor S, Komander D, Randow F, Wakatsuki S, Dikic I. (2009) *Specific recognition of linear ubiquitin chains by NEMO is important for NF-kappaB activation*. Cell. 136(6):1098-109.
- Ramachandran A, Lebofsky M, Baines CP, Lemasters JJ, Jaeschke H. (2011) *Cyclophilin D deficiency protects against acetaminophen-induced oxidant stress and liver injury*. Free Radic Res. 45(2):156-64.
- Ramsey H, Wu MX. (2014) *Mitochondrial anti-oxidant protects IEX-1 deficient mice from organ damage during endotoxemia*. Int Immunopharmacol. 23(2):658-63.
- Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, Fan E, Camporota L, Slutsky AS. (2012) *Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition*. JAMA. 307(23):2526-33.
- Rao KM. (2001) *MAP kinase activation in macrophages*. J Leukoc Biol. 69(1):3-10.
- Rao VK, Carlson EA, Yan SS. (2014) *Mitochondrial permeability transition pore is a potential drug target for neurodegeneration*. Biochim Biophys Acta. 1842(8):1267-72.
- Reddy RC, Standiford TJ. (2010) *Effects of sepsis on neutrophil chemotaxis*. Curr Opin Hematol. 1:18-24.
- Reynaert NL, Ckless K, Korn SH, Vos N, Guala AS, Wouters EF, van der Vliet A, Janssen-Heininger YM. (2004) *Nitric oxide represses inhibitory kappaB kinase through S-nitrosylation*. Proc Natl Acad Sci USA. 101(24):8945-50.
- Rezoagli E, Fumagalli R, Bellani G. (2017) *Definition and epidemiology of acute respiratory distress syndrome*. Ann Transl Med. 5(14):282.
- Richard C, Lemonnier F, Thibault M, Couturier M, Auzepy P. (1990) *Vitamin E deficiency and lipoperoxidation during adult respiratory distress syndrome*. Crit Care Med. 18(1):4-9.

- Richter C, Gogvadze V, Laffranchi R, Schlapbach R, Schweizer M, Suter M, Walter P, Yaffee M. (1995) *Oxidants in mitochondria: from physiology to diseases*. Biochim Biophys Acta. 1271: 67-74.
- Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H, Ulmer AJ, Zähringer U, Seydel U, Di Padova F, Schreier M, Brade H. (1994) *Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function*. FASEB J. 8(2):217-25.
- Roede JR, Jones DP. (2010) *Reactive species and mitochondrial dysfunction: mechanistic significance of 4-hydroxynonenal*. Environ Mol Mutagen. 51(5):380-90.
- Rubinfeld GD, Caldwell E, Peabody E, Weaver J, Martin DP, Neff M, Stern EJ, Hudson LD. (2005) *Incidence and outcomes of acute lung injury*. N Engl J Med. 353(16):1685-93.
- Sakurai H, Suzuki S, Kawasaki N, Nakano H, Okazaki T, Chino A, Doi T, Saiki I. (2003) *Tumor necrosis factor-alpha-induced IKK phosphorylation of NF-kappaB p65 on serine 536 is mediated through the TRAF2, TRAF5, and TAK1 signaling pathway*. J Biol Chem. 278(38):36916-23.
- Sánchez-Tilló E, Comalada M, Xaus J, Farrera C, Valledor AF, Caelles C, Lloberas J, Celada A. (2007) *JNK1 is required for the induction of Mkp1 expression in macrophages during proliferation and lipopolysaccharide-dependent activation*. J Biol Chem. 282(17):12566-73.
- Saraiva M, Vieira P, O'Garra A. (2020) *Biology and therapeutic potential of interleukin-10*. J Exp Med. 217(1):e20190418.
- Satonaka H, Suzuki E, Nishimatsu H, Oba S, Takeda R, Goto A, Omata M, Fujita T, Nagai R, Hirata Y. (2004) *Calcineurin promotes the expression of monocyte chemoattractant protein-1 in vascular myocytes and mediates vascular inflammation*. Circ Res. 94(5):693-700.
- Schnyder-Candrian S, Quesniaux VF, Di Padova F, Maillet I, Noulin N, Couillin I, Moser R, Erard F, Vargaftig BB, Ryffel B, Schnyder B. (2005) *Dual effects of p38 MAPK on TNF-dependent bronchoconstriction and TNF-independent neutrophil recruitment in lipopolysaccharide-induced acute respiratory distress syndrome*. J Immunol. 175(1):262-9.

- Schwartz MD, Moore EE, Moore FA, Shenkar R, Moine P, Haenel JB, Abraham E. (1996) *Nuclear factor-kappa B is activated in alveolar macrophages from patients with acute respiratory distress syndrome*. Crit Care Med. 24(8):1285-92.
- Seto Si, Kaido T, Yamaoka S, Yoshikawa A, Arii S, Nakamura T, Niwano M, Imamura M. (1998) *Hepatocyte growth factor prevents lipopolysaccharide-induced hepatic sinusoidal endothelial cell injury and intrasinusoidal fibrin deposition in rats*. J Surg Res. 80(2):194-9.
- Shalbuyeva N, Brustovetsky T, Bolshakov A, Brustovetsky N. (2006) *Calcium-dependent spontaneously reversible remodeling of brain mitochondria*. J Biol Chem. 281:37547-58.
- Shankar-Hari M, Phillips GS, Levy ML, Seymour CW, Liu VX, Deutschman CS, Angus DC, Rubenfeld GD, Singer M; Sepsis Definitions Task Force. (2016) *Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)*. JAMA. 315(8):775-87.
- Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent JL, Angus DC. (2016) *The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)*. JAMA. 315(8):801-10.
- Singh A, Singh V, Tiwari RL, Chandra T, Kumar A, Dikshit M, Barthwal MK. (2016) *The IRAK-ERK-p67phox-Nox-2 axis mediates TLR4, 2-induced ROS production for IL-1 β transcription and processing in monocytes*. Cell Mol Immunol. 13(6):745-63.
- Slack DN, Seternes OM, Gabrielsen M, Keyse SM. (2001) *Distinct binding determinants for ERK2/p38alpha and JNK map kinases mediate catalytic activation and substrate selectivity of map kinase phosphatase-1*. J Biol Chem. 276(19):16491-500.
- Son Y, Kim S, Chung HT, Pae HO. (2013) *Reactive oxygen species in the activation of MAP kinases*. Methods Enzymol. 528:27-48.
- Sonowal H, Ramana KV. (2019) *4-Hydroxy-Trans-2-Nonenal in the Regulation of Anti-Oxidative and Pro-Inflammatory Signaling Pathways*. Oxid Med Cell Longev. 2019:5937326.

- Soromou LW, Chu X, Jiang L, Wei M, Huo M, Chen N, Guan S, Yang X, Chen C, Feng H, Deng X. (2012) *In vitro and in vivo protection provided by pinocembrin against lipopolysaccharide-induced inflammatory responses*. Int Immunopharmacol. 14(1):66-74.
- Sriskandan S, Altmann DM. (2008) *The immunology of sepsis*. J Pathol. 214(2):211-26.
- Storz P, Toker A. (2003) *Protein kinase D mediates a stress-induced NF-kappaB activation and survival pathway*. EMBO J. 22(1):109-20.
- Suarez De La Rica A, Gilsanz F, Maseda E. (2016) *Epidemiologic trends of sepsis in western countries*. Ann Transl Med. 4(17):325.
- Sun Y, Zhang Y, Yan M, Wu Y, Zheng X. (2009) *B-type natriuretic peptide-induced cardioprotection against reperfusion is associated with attenuation of mitochondrial permeability transition*. Biol Pharm Bull. 32(9):1545-51.
- Takaesu G, Kishida S, Hiyama A, Yamaguchi K, Shibuya H, Irie K, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K. (2000) *TAB2, a novel adaptor protein, mediates activation of TAK1 MAPKKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway*. Mol Cell. 5(4):649-58.
- Tamura DY, Moore EE, Johnson JL, Zallen G, Aiboshi J, Silliman CC. (1998) *p38 mitogen-activated protein kinase inhibition attenuates intercellular adhesion molecule-1 up-regulation on human pulmonary microvascular endothelial cells*. Surgery. 124(2):403-8.
- Thorley AJ, Grandolfo D, Lim E, Goldstraw P, Young A, Tetley TD. (2011) *Innate immune responses to bacterial ligands in the peripheral human lung--role of alveolar epithelial TLR expression and signalling*. PLoS One. 6(7):e21827.
- Tomashefski JF Jr. (2000) *Pulmonary pathology of acute respiratory distress syndrome*. Clin Chest Med. 21(3):435-66.
- Usatyuk PV, Natarajan V. (2012) *Hydroxyalkenals and oxidized phospholipids modulation of endothelial cytoskeleton, focal adhesion and adherens junction proteins in regulating endothelial barrier function*. Microvasc Res. 83(1):45-55.
- Victor VM, Rocha M, De la Fuente M. (2004) *Immune cells: free radicals and antioxidants in sepsis*. Int Immunopharmacol. 4(3):327-47.

- Vincent JL, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD, Moreno R, Lipman J, Gomersall C, Sakr Y, Reinhart K. (2009) *International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units*. JAMA. 302: 2323-9.
- Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J, Chen ZJ. (2001) *TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK*. Nature. 412(6844):346-51.
- Wang X, Liu Y. (2007) *Regulation of innate immune response by MAP kinase phosphatase-1*. Cell Signal. 19(7):1372-82.
- Wang Y, Wang X, Zhang L, Zhang R. (2018) *Alleviation of Acute Lung Injury in Rats with Sepsis by Resveratrol via the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Nuclear Factor-Erythroid 2 Related Factor 2/Heme Oxygenase-1 (PI3K/Nrf2/HO-1) Pathway*. Med Sci Monit. 24:3604-11.
- Wang Z, Rui T, Yang M, Valiyeva F, Kvietys PR. (2008) *Alveolar macrophages from septic mice promote polymorphonuclear leukocyte transendothelial migration via an endothelial cell Src kinase/NADPH oxidase pathway*. J Immunol. 181(12):8735-44.
- Ware LB. (2006) *Pathophysiology of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome*. Semin Respir Crit Care Med. 27(4):337-49.
- Whitlock RP, Devereaux PJ, Teoh KH, Lamy A, Vincent J, Pogue J, Paparella D, Sessler DI, Karthikeyan G, Villar JC, Zuo Y, Avezum Á, Quantz M, Tagarakis GI, Shah PJ, Abbasi SH, Zheng H, Pettit S, Chrolavicius S, Yusuf S; SIRS Investigators. (2015) *Methylprednisolone in patients undergoing cardiopulmonary bypass (SIRS): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial*. Lancet. 386(10000):1243-53.
- Wiersinga WJ, Leopold SJ, Cranendonk DR, van der Poll T. (2014) *Host innate immune responses to sepsis*. Virulence. 5(1):36-44.
- Williams CR, Gooch JL. (2012) *Calcineurin inhibitors and immunosuppression - a tale of two isoforms*. Expert Rev Mol Med. 14:e14.
- Winterbourn CC. (2013) *The biological chemistry of hydrogen peroxide*. Methods Enzymol. 528:3-25.
- Wu CL, Lin LY, Yang JS, Chan MC, Hsueh CM. (2009) *Attenuation of lipopolysaccharide-induced acute lung injury by treatment with IL-10*. Respirology. 14(4):511-21.

- Wu F, Han M, Wilson JX. (2009) *Tripterine prevents endothelial barrier dysfunction by inhibiting endogenous peroxynitrite formation*. *Br J Pharmacol*. 157(6):1014-23.
- Yadav N, Chandra H. (2017) *Suppression of inflammatory and infection responses in lung macrophages by eucalyptus oil and its constituent 1,8-cineole: Role of pattern recognition receptors TREM-1 and NLRP3, the MAP kinase regulator MKP-1, and NF κ B*. *PLoS One*. 12(11):e0188232.
- Yadav UC, Ramana KV. (2013) *Regulation of NF- κ B-induced inflammatory signaling by lipid peroxidation-derived aldehydes*. *Oxid Med Cell Longev*. 2013:690545.
- Yamamoto M, Takeda K. (2010) *Current views of toll-like receptor signaling pathways*. *Gastroenterol Res Pract*. 2010:240365.
- Yoshizumi M, Abe J, Haendeler J, Huang Q, Berk BC. (2000) *Src and Cas mediate JNK activation but not ERK1/2 and p38 kinases by reactive oxygen species*. *J Biol Chem*. 275:11706-12.
- Yu DK, Lee B, Kwon M, Yoon N, Shin T, Kim NG, Choi JS, Kim HR. (2015) *Phlorofucofuroeckol B suppresses inflammatory responses by down-regulating nuclear factor κ B activation via Akt, ERK, and JNK in LPS-stimulated microglial cells*. *Int Immunopharmacol*. 28(2):1068.
- Yum HK, Arcaroli J, Kupfner J, Shenkar R, Penninger JM, Sasaki T, Yang KY, Park JS, Abraham E. (2001) *Involvement of phosphoinositide 3-kinases in neutrophil activation and the development of acute lung injury*. *J Immunol*. 167(11):6601-8.
- Zalewski J, Claus P, Bogaert J, Driessche NV, Driesen RB, Galan DT, Sipido KR, Buszman P, Milewski K, Van de Werf F. (2015) *Cyclosporine A reduces microvascular obstruction and preserves left ventricular function deterioration following myocardial ischemia and reperfusion*. *Basic Res Cardiol*. 110(2):18.
- Zapelini PH, Rezin GT, Cardoso MR, Ritter C, Klamt F, Moreira JC, Streck EL, Dal-Pizzol F. (2008) *Antioxidant treatment reverses mitochondrial dysfunction in a sepsis animal model*. *Mitochondrion*. 8(3):211-8.
- Zarbock A, Ley K. (2009) *The role of platelets in acute lung injury (ALI)*. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 14:150-8.

- Zhang T, Lu X, Arnold P, Liu Y, Baliga R, Huang H, Bauer JA, Liu Y, Feng Q. (2012) *Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 inhibits myocardial TNF- α expression and improves cardiac function during endotoxemia*. *Cardiovasc Res*. 93(3):471-9.
- Zhang X, Li J, Li C, Li Y, Zhu W, Zhou H, Ding Z, Liu L. (2015) *HSPA12B attenuates acute lung injury during endotoxemia in mice*. *Int Immunopharmacol*. 29(2):599-606.
- Zhao H, Chen H, Xiaoyin M, Yang G, Hu Y, Xie K, Yu Y. (2019) *Autophagy activation improves lung injury and inflammation in sepsis*. *Inflammation*. 42(2):426-39.
- Zhao M, Zhou A, Xu L, Zhang X. (2014) *The role of TLR4-mediated PTEN/PI3K/AKT/NF- κ B signaling pathway in neuroinflammation in hippocampal neurons*. *Neuroscience*. 269:93-101.
- Zhao Q, Wang X, Nelin LD, Yao Y, Matta R, Manson ME, Baliga RS, Meng X, Smith CV, Bauer JA, Chang CH, Liu Y. (2006) *MAP kinase phosphatase 1 controls innate immune responses and suppresses endotoxic shock*. *J Exp Med*. 203(1):131-40.
- Zhuge J, Cederbaum AI. (2009) *Inhibition of the mitochondrial permeability transition by cyclosporin A prevents pyrazole plus lipopolysaccharide-induced liver injury in mice*. *Free Radic Biol Med*. 46(3):406-13.
- Zorov DB, Filburn CR, Klotz LO, Zweier JL, Sollott SJ. (2000) *Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes*. *J Exp Med* 192:1001-14.
- Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. (2014) *Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release*. *Physiol Rev*. 94(3):909-50.
- Zweier JL, Broderick R, Kuppusamy P, Thompson-Gorman S, Lutty GA. (1994) *Determination of the mechanism of free radical generation in human aortic endothelial cells exposed to anoxia and reoxygenation*. *J Biol Chem*. 269(39):24156-62.

8. A Ph.D értekezés alapjául szolgáló és egyéb közlemények, poszterek, előadások

A Ph.D értekezés alapjául szolgáló közlemény

Fonai F, Priber JK, Jakus PB, Kalman N, Antus C, Pollak E, Karsai G, Tretter L, Sumegi B, Veres B. (2015) *Lack of cyclophilin D protects against the development of acute lung injury in endotoxemia*. Biochim Biophys Acta. 1852(12):2563-73.

IF: 5,158

További közlemények:

Veres B, Eros K, Antus C, Kalman N, Fonai F, Jakus PB, Boros E, Hegedus Z, Nagy I, Tretter L, Gallyas F Jr, Sumegi B. (2021) *Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition amplifies inflammatory reprogramming in endotoxemia*. FEBS Open Bio. 11(3):684-704.

IF: 2,231 (2019)

Priber J, Fonai F, Jakus PB, Racz B, Chinopoulos C, Tretter L, Gallyas F Jr, Sumegi B, Veres B. (2015) *Cyclophilin D disruption attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory response in primary mouse macrophages*. Biochem Cell Biol. 93(3):241-50.

IF: 1,527

Antus C, Radnai B, Dombovari P, Fonai F, Avar P, Matyus P, Racz B, Sumegi B, Veres B. (2015) *Anti-inflammatory effects of a triple-bond resveratrol analog: structure and function relationship*. Eur J Pharmacol. 748:61-7.

IF: 2,73

Gerlinger I, Fittler A, Fónai F, Patzkó A, Mayer A, Botz L. (2009) *Postoperative application of amphotericin B nasal spray in chronic rhinosinusitis with nasal polyposis, with a review of the antifungal therapy*. Eur Arch Otorhinolaryngol. 266(6):847-55.

IF: 1,167

Gerlinger I, Fittler A, Mayer A, Patzkó A, Fónai F, Pytel J, Botz L. (2008) *Postoperative application of amphotericin B nasal spray in chronic rhinosinusitis with nasal polyposis. Can recidive polyposis be prevented?* Orv Hetil. 149(37):1737-46.

IF: -

Gerlinger I, Fittler A, Mayer A, Patzkó Á, Fónai F, Pytel J, Botz L. (2008) *Amphotericin B tartalmú orrspray posztoperatív alkalmazása orrpolyposissal járó krónikus rhinosinusitis eseteiben – megelőzhető-e a recidíva?* Fül-, Orr-, Gégegyógyászat 53(4), 150-159, 2008.

IF: -

Fittler A, Mayer A, Kocsis B, Gerlinger I, Fónai F, Botz L. (2007) *Stability testing of amphotericin B nasal spray solutions with chemical and biological analysis.* Acta Pharm Hung. 77(3):159-64.

IF: -

Turai R, Schandl MF, Dergez T, Vass RA, Kvárik T, Horányi E, Balika D, Mammel B, Gyarmati J, Fónai F, Vida G, Funke S, Gaál V, Reglődi D, Ertl T. (2019) *Early and late complications of hyperglycemic extremely low birth-weight infants.* Orv Hetil. 160(32):1270-1278.

IF: 0,497

Posztterek és előadások

A disszertáció alapjául szolgáló posztterek:

Crucial role of cyclophilin D in the pathogenesis of LPS induced acutelung injury.

Fónai F, Pribér JK, Kálmán N, Jakus PB, Antus C, Sümegi B, Veres B.

FEBS3+ Meeting, 2015. szeptember 16-19., Portorož, Szlovénia

A ciklofillin D hiányának hatása a lipopoliszacharid indukálta tüdőkárosodásra egérben

Fónai F, Pribér JK, Kálmán N, Jakus PB, Antus C, Radnai B, Sümegi B, Veres B.

Magyar Biokémiai Egyesület Jelátviteli Szakosztályának III. Konferenciája, 2012. október 4-6., Esztergom

A disszertációval összefüggő egyéb posztterek:

Absence of cyclophilin D enhances the cholesterol and fat anabolism in mouse liver

Jakus PB, Fónai F, Takatsy A, Antus C, Kálmán N, Erős K, Bognár Z, Veres B.

FEBS3+ Meeting, 2015. szeptember 16-19., Portorož, Szlovénia

Egy hármas kötéses rezveratrol analóg antiinflammatorikus hatása

Antus C, Radnai B, Hisatome K, Fónai F, Sümegi B, Veres B.

45. Membrán-transzport Konferencia, 2015.május 19-22., Sümeg

Cyclophilin D dependent mPT amplifies inflammatory response in septic shock.

Veres B, Fónai F, Pribér JK, Kálmán N, Jakus PB, Antus C, Sümegi B.

14th ISANH Congress on Oxidative Stress Reduction, Redox Homeostasis and Antioxidants, 2014.június 12-13., Párizs, Franciaország.

A ciklofilin D szerepe az LPS által indukált gyulladós folyamatok génexpressziójának változásában.

Veres B, Fónai F, Pribér JK, Kálmán N, Jakus PB, Antus C, Sümegi B.

44. Membrán-Transzport Konferencia, 2014.május 20-23., Sümeg.

A TRAF6 funkcionális gátlása rezveratrollal a TLR4-NF- κ B útvonalon

Kálmán N, Antus C, Pribér JK, Jakus PB, Tucsek Zs, Fónai F, Sümegi B, Veres B.

Magyar Biokémiai Egyesület Jelátviteli Szakosztályának III. Konferenciája, 2012. október 4-6., Esztergom

Paramágneses rezveratrol analógok anti-inflammatorikus, citotoxikus és anti-proliferatív hatásának vizsgálata

Antus C, Kálai T, Borza E, Fónai F, Kálmán N, Jakus PB, Veres B, Hideg K, Sümegi B, Radnai B.

Magyar Biokémiai Egyesület Jelátviteli Szakosztályának III. Konferenciája, 2012. október 4-6., Esztergom

Inhibition of TLR4-TRAF6-NF- κ B pathway with resveratrol in murine macrophages

Nagy-Miklós B, Antus C, Kálmán N, Pribér JK, Jakus PB, Fónai F, Tucsek Z, Radnai B, Veres B.

41. Membrán-transzport Konferencia, 2011.május 17-20., Sümeg

Mitokondriális permeabilitás tranzíció szerepe az LPS-indukálta gyulladós folyamatokban

Pribér JK, Nagy-Miklós B, Fónai F, Radnai B, Tucsek Zs, Kálmán N, Jakus PB, Sümegi B, Veres B.

41. Membrán-transzport Konferencia, 2011.május 17-20., Sümeg

Egyéb témájú poszterek, előadások:

Knowledge of mothers on their own and their newborn baby's oral health

Sandor B, Fónai F, Sudar F, Szanto I, Nagy A.

The 26th Congress of the International Association of Paediatric Dentistry, 2017.október 4-7., Santiago, Chile.

Újszülöttek retrospektív összehasonlító vizsgálata, különös tekintettel a perinatális infekció kialakulására

Fónai F, Ruml DA, Funke S.

Fiatal Neonatológusok II.Találkozója, 2017.június 8-10., Kecskemét

Koraszülöttek fogászati státuszának felmérése - kísérleti tanulmány

Fónai F, Puskár K, Szántó I, Nagy Á, Funke S, Ertl T, Sándor B.

Fiatal Neonatológusok I.Találkozója, 2016.június 3-4., Kecskemét

Pilot Study: The effect of preterm delivery on the oral health status of six-year-old children in Pecs, Hungary.

Sandor B, Fónai F, Puskar K, Nagy A, Szanto I.

13th Congress of the European Academy of Paediatric Dentistry, 2016.június 3-5., Belgrád, Szerbia

Exome sequencing identifies TMEM70 deficiency in a Hungarian Roma family with severe congenital lactic acidosis.

Komlósi K, Hadzsiev K, Haack T, Pöstyéni E, Bene J, Szabó A, Czakó M, Fónai F, Meitinger T, Melegh B.

European Human Genetics Conference, 2015. június 6-9., Glasgow, Skócia, UK

Ritka ok intermittáló makroszkópos hematuria hátterében

Fónai F; Fariborz B; Székely J; Tornóczky T; Hartmann Á; Györke Zs.

Fiatal Gyermekgyógyászok IX. Konferenciája, Balatonvilágos, 2010. február 12-14.; Magyar Gyermekorvosok Társasága 54. Nagygyűlése, Esztergom 2010. szeptember.

Hyponatraemias-hypertensiv syndroma ritka esete

Zima J, Hartmann Á, Fónai F, Vajda P, Degrell P, Tornóczky T, Györke Zs.

Fiatal Gyermekgyógyászok IX. Konferenciája, Balatonvilágos, 2010. február 12-14.

Microcytaer anaemia nyolc hónapos csecsemőben

Fónai F, Tárnok A, Fazekas F, Tőkés-Füzesi M, Ottóffy G.

Fiatal Gyermekgyógyászok VIII. Konferenciája, Kőszeg, 2009. április 3-5.; Magyar Gyermekorvosok Társasága 53. Nagygyűlése, 2009. június 19., Eger

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom mindenkinek, aki segített munkám és az értekezés elkészülése során. Ezúton szeretném hálámat és köszönetemet kifejezni témavezetőmnek, Dr. Veres Balázs egyetemi docensnek, az éveken át tartó sok segítségért és támogatásért, és hogy a végsőkhig hitt az értekezés megszületésében. Köszönöm Dr. Gallyas Ferenc professzor úrnak, hogy az általa vezetett intézetben Ph.D hallgatóként tevékenykedhettem. Örök hálával tartozom, és sajnos személyesen már nem mondhatom ezt el Dr. Sümegi Balázs professzor úrnak, aki mindvégig támogató munkám során.

Külön köszönöm közvetlen kollégáimnak és barátaimnak, Dr. Kálmán Nikolettnek, Dr. Antus Csengének, Dr. Tucsek Zsuzsannának, Dr. Jakus Péternek és Dr. Radnai Balázsnak a rengeteg segítséget és az együtt töltött éveket. Ugyanígy köszönettel tartozom a Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet minden dolgozójának a technikai és elméleti segítségért, különösképpen Pásztor Annának, Halász Helénának, Horváth Bertalannak és Girán Lászlónak. Itt szeretném kiemelni és legmélyebb hálámat kifejezni a Pathologia Intézetben dolgozó Szilágyi Imréné Juditnak, akinek a hisztológiai és immunhisztokémiai vizsgálatok sikerét köszönhetem.

Köszönettel tartozom továbbá a Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika Neonatológiai Tanszékén dolgozó kollégáimnak támogatásukért.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm családomnak, férjemnek és gyermekeimnek a rengeteg türelmet és biztatást, amivel mindvégig mellettem álltak.



Lack of cyclophilin D protects against the development of acute lung injury in endotoxemia



Fruzsina Fonai^a, Janos K. Priber^a, Peter B. Jakus^a, Nikoletta Kalman^a, Csenge Antus^a, Edit Pollak^b, Gergely Karsai^b, Laszlo Tretter^c, Balazs Sumegi^{a,d,e}, Balazs Veres^{a,*}

^a Department of Biochemistry and Medical Chemistry, Medical Faculty, University of Pecs, Pecs, Hungary

^b Department of Comparative Anatomy and Developmental Biology, Faculty of Sciences, University of Pecs, Pecs, Hungary

^c Department of Medical Biochemistry, Semmelweis University, Budapest, Hungary

^d Szentagothai Research Center, University of Pecs, Pecs, Hungary

^e MTA-PTE Nuclear and Mitochondrial Interactions Research Group, Pecs, Hungary

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 June 2015

Received in revised form 4 September 2015

Accepted 12 September 2015

Available online 15 September 2015

Keywords:

Acute lung injury

Lipopolysaccharide

Cyclophilin D

Reactive oxygen species

NF-κB

ABSTRACT

Sepsis caused by LPS is characterized by an intense systemic inflammatory response affecting the lungs, causing acute lung injury (ALI). Dysfunction of mitochondria and the role of reactive oxygen (ROS) and nitrogen species produced by mitochondria have already been proposed in the pathogenesis of sepsis; however, the exact molecular mechanism is poorly understood. Oxidative stress induces cyclophilin D (CypD)-dependent mitochondrial permeability transition (mPT), leading to organ failure in sepsis. In previous studies mPT was inhibited by cyclosporine A which, beside CypD, inhibits cyclophilin A, B, C and calcineurin, regulating cell death and inflammatory pathways. The immunomodulatory side effects of cyclosporine A make it unfavorable in inflammatory model systems. To avoid these uncertainties in the molecular mechanism, we studied endotoxemia-induced ALI in CypD^{-/-} mice providing unambiguous data for the pathological role of CypD-dependent mPT in ALI. Our key finding is that the loss of this essential protein improves survival rate and it can intensely ameliorate endotoxin-induced lung injury through attenuated proinflammatory cytokine release, down-regulation of redox sensitive cellular pathways such as MAPKs, Akt, and NF-κB and reducing the production of ROS. Functional inhibition of NF-κB was confirmed by decreased expression of NF-κB-mediated proinflammatory genes. We demonstrated that impaired mPT due to the lack of CypD reduces the severity of endotoxemia-induced lung injury suggesting that CypD specific inhibitors might have a great therapeutic potential in sepsis-induced organ failure. Our data highlight a previously unknown regulatory function of mitochondria during inflammatory response.

© 2015 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Sepsis is a severe systemic inflammatory process caused by bacterial agents, such as lipopolysaccharide (LPS). LPS plays a crucial role in the induction of inflammatory responses and acute lung injury (ALI), leading to acute respiratory distress syndrome (ARDS) [1,2]. The binding of LPS to toll-like receptor (TLR) 4 initiates signaling pathways, culminating in the activation of mitogen-activated protein kinases (MAPK) and NF-κB [3,4]. As a consequence of NF-κB activation, the expression of cytokines and chemokines is up-regulated, causing neutrophil infiltration into the lung [5,6,7]. Leukocytes produce reactive oxygen species (ROS) and nitrogen monoxide (NO), in order to eliminate pathogens.

However, the excessive production of these reactive agents can damage cellular components and lead to epithelial and endothelial cell death and tissue damage. LPS-induced ROS can further enhance the activity of redox-sensitive inflammatory transcription factors and signaling kinases such as MAPKs and Akt [8–11].

Cytosolic Ca²⁺ overload or ROS can trigger the opening of mitochondrial permeability transition (mPT) pore leading to the collapse of ATP production, release of proapoptotic molecules and initiating further ROS production. Cyclophilin D (CypD), a matrix peptidyl-prolyl cis-trans-isomerase, encoded by the nuclear Ppif gene, is a modulator of mPT although the exact molecular composition of the pore is still under debate [12,13]. Studies with mitochondria lacking CypD demonstrated very low Ca²⁺-sensitivity and delayed mPT pore opening, clearly favoring an indispensable modulatory role of CypD [14,15,13]. The generally used inhibitor of mPT is cyclosporine A (CsA) [16] which inhibits, not only CypD, but also cyclophilin A, B, C and calcineurin, therefore has a wide range of signaling effects – including inflammatory

* Corresponding author at: Department of Biochemistry and Medical Chemistry, University of Pecs Medical School, 12 Szigeti str., H-7624 Pecs, Hungary.
E-mail address: balazs.veres@aok.pte.hu (B. Veres).

signaling — unrelated to CypD [17–20]. Thus, immunomodulatory effects of CsA make it unfavorable for investigating the role of mPT under inflammatory conditions. The role of mPT has been implicated in many pathological conditions accompanied by oxidative damage; however, there are only a few studies regarding the role of mPT in inflammatory processes, and no experiment has been conducted to date to evaluate its participation in ALI. Here, we give the first specific evidence for the role of CypD-dependent mPT in ALI using CypD knock-out mice.

2. Materials and methods

2.1. Ethics statement

Animal experiments were performed according to Hungarian Governmental Regulation 40/2013. (II. 14.) in accordance to the Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes. The license was approved by the County Governmental Office (No. BA02/2000–20/2011) lasting for five years (2013–2017).

2.2. Animals

Male C57BL/6 mice were from Charles River Hungary Breeding and genetically engineered homozygous male *Ppif*^{-/-} cyclophilin D knock-out mice with C57BL/6 background were supplied by Prof. László Tretter (Semmelweis University, Budapest, Hungary). The mice were kept under standard conditions.

2.3. Materials

LPS from *Escherichia coli* 0127:B8 and all materials that are not specified elsewhere were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Anti-phospho-p44/42, anti-p44/42, anti-phospho-Akt, anti-Akt, anti-phospho-p38, anti-p38, anti-phospho-JNK, anti-JNK, anti-phospho-NF- κ B p65, anti-NF- κ B p65, anti-phospho-I κ B α and anti-I κ B α primary antibodies for immunoblotting were from Cell Signaling Technology (Danvers, MA), anti-MKP-1, anti-4-hydroxy-2-noneal Michael adducts, anti-nitrotyrosine and anti-GAPDH antibodies were from Millipore (Billerica, MA).

2.4. ALI model and survival study

To induce murine endotoxemia, intraperitoneal LPS (40 mg/kg, dissolved in PBS) was given, control groups received PBS (10 μ l/g). Primarily survival study was performed with age-matched wild type ($n = 8$) and CypD knock-out mice. Mice were monitored for clinical signs of endotoxemia and lethality every hour for 96 h, after that they were monitored 3 times a day till the end of the first week. No late deaths were observed in any of the experimental groups. Alternatively, 24 h after treatment the mice were anesthetized with isoflurane (Isopharma). Lungs were removed, and processed as follows: the right upper lobe was fixed in 10% paraformaldehyde, except for a piece which was put into primary fixative (2% paraformaldehyde/2% glutaraldehyde) for electronmicroscopy; the right lower lobes were snap frozen in liquid N₂; the left upper lobe was put into RNAlater RNA stabilization reagent (Qiagen, Hilden, Germany); the left lower lobe lung homogenate was prepared as described later.

2.5. Western blot analysis

10 mg of frozen tissue was homogenized (50 mM TRIS, 50 mM EDTA, 50 mM sodium metavanadate, 0.5% protease inhibitor cocktail, 0.5% phosphatase inhibitor cocktail, pH = 7.4) and the protein concentration was determined with a DC™ Protein Assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA). Western blotting was performed as described previously [9].

Peroxidase labeling was visualized with the Pierce ECL Western blotting Substrate (Thermo Scientific, Waltham, MA) detection system. Quantification of band intensities of the blots was performed by ImageJ software.

2.6. Cytokine determination by ELISA from lung homogenate

After removal of the left lower lobe, the tissue was rinsed in ice-cold PBS and homogenized. Protein concentration was determined with DC™ Protein Assay kit (Bio-Rad). TNF α , IL-1 β and IL-10 concentrations were measured with ELISA Ready-SET-Go! (eBioscience, San Diego, CA): 200 μ g protein/well was used, the cytokine-amount was expressed in optical density at 450 nm.

2.7. mRNA isolation from lung tissue and quantitative RT-PCR

RNA was isolated from tissue samples kept in RNAlater (Qiagen) solution using TRIzol reagent (Invitrogen, Grand Island, NY). Total RNA concentration was determined using spectrophotometric method (IMPLEN NanoPhotometer™, München, Germany) and reverse-transcribed into cDNA with MMLV RT/RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Burlington, Canada). RT-PCR was performed with 1 μ l of cDNA in MiniOpticon Real-Time PCR System (Bio-Rad) using SYBR Green Supermix kit (Bio-Rad). Specific primers against CD14, IL-1 α , Cxcl2, IFN- γ , iNOS, TNF α and actin were used. The relative gene expression was calculated with $\Delta\Delta$ Ct method using BIO-RAD CFX Manager software.

2.8. Pulmonary histopathology

The paraformaldehyde fixed superior lobe of the right lung was embedded in paraffin and cut into 5 μ m sections. Hematoxylin-eosin staining was performed using standard protocol. Slides were scored in a double blinded manner by an independent expert using the scoring system described previously [21]. Five slides in each group were assessed under high power field and evaluated for intra-alveolar and interstitial neutrophil accumulation, presence of proteinaceous debris and hyaline membrane, and also alveolar wall thickening.

2.9. Immunohistochemistry

The lung tissue sections were probed with antibodies against 4-hydroxy-2-noneal Michael adducts and nitrotyrosine. Formalin-fixed, paraffin-embedded 5 μ m tissue sections were deparaffinized

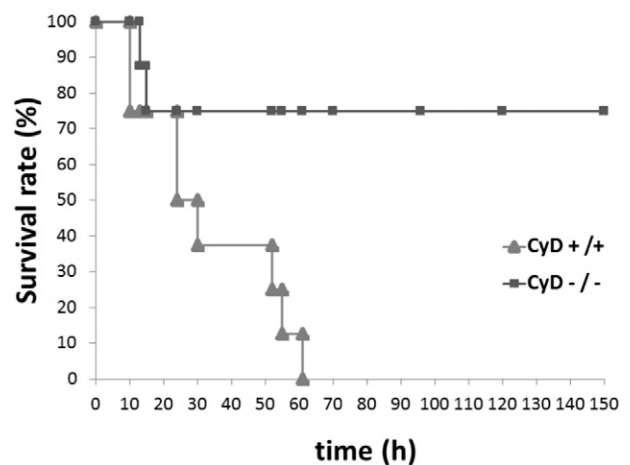


Fig. 1. Mice lacking CypD survive lethal endotoxemia. Survival study was carried out with age-matched wild-type ($n = 8$) and CypD knock-out mice ($n = 8$). Survival was monitored for 7 days, after 40 mg/kg intraperitoneal LPS administration.

and rehydrated followed by heat-induced epitope retrieval using 97 °C heat exposure for 20 min. Sections were incubated in primary antibody over-night. Blocking and staining procedures were performed with Dako EnVision™ FLEX detection system with Dako Autostainer Plus instruments (Glostrup, Denmark). All sections were counterstained with hematoxylin.

2.10. Electron microscopy

Tissue samples were rinsed in 0.1 M phosphate buffer then fixed in 2% glutaraldehyde/2% paraformaldehyde for 3 h. After a post-fixation step (osmium tetroxide 1% in 0.1 M phosphate buffer) samples were dehydrated and embedded into Durcupan

epoxy resin. Serial ultrathin sections were cut and collected on copper grids, then passed onto drops of uranyl acetate, later on lead citrate. Following the routine counterstaining samples were rinsed in distilled water and dried. Samples were observed and documented with JEOL 1200 (Tokyo, Japan) transmission electron microscope.

2.11. Statistical analysis

Comparisons between experimental groups were made by one-way ANOVA and post-hoc test. Data represent mean ± SEM. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

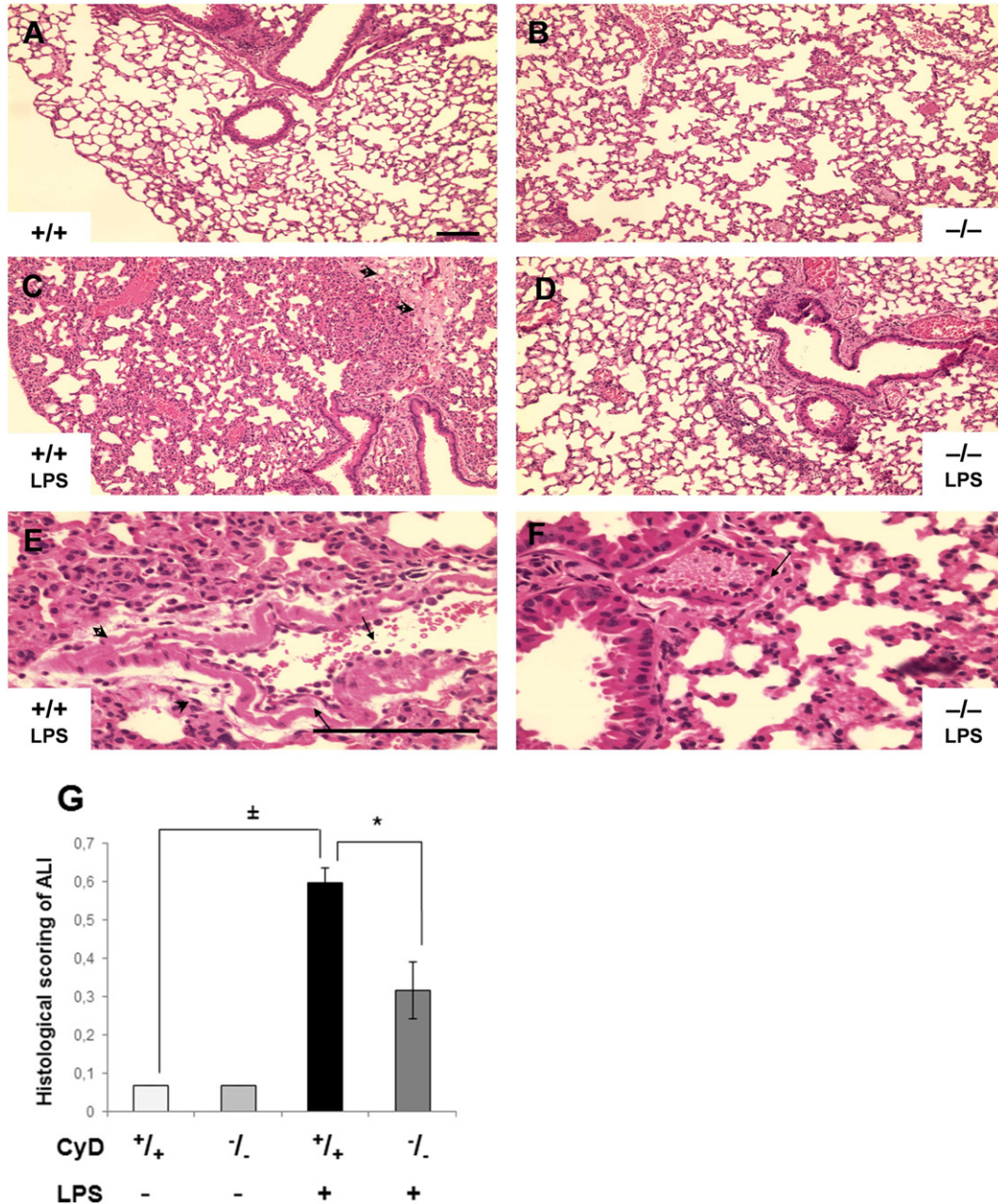


Fig. 2. Deletion of CypD prevents lung vascular permeability, edema, and inflammation induced by LPS. Representative pathological and histological analysis of lungs from untreated (A) and LPS-treated (C) wild type mice, as well as from untreated (B) and LPS-treated (D) CypD knock-out mice. Enlarged light microscopic images highlight differences of vascular events in LPS-treated wild type (E) and knock-out mice (F). Arrows pointing on marginating and transmigrating leukocytes, arrowheads indicate severe endothelial leakage with consequent perivascular edema. Original magnification was 10× (A,B,C,D) and 40× (E,F). Scale bars represent 100 μm. Histological scoring was also performed in double blinded manner according to the recommendations of the American Thoracic Society (G). Results are presented as mean ± SEM, n = 5. Significant difference between control and LPS-treated wild type animals is indicated by ± ($p < 0.001$), significant difference between LPS-treated wild type and CypD knock-out animals is indicated by * ($P < 0.05$).

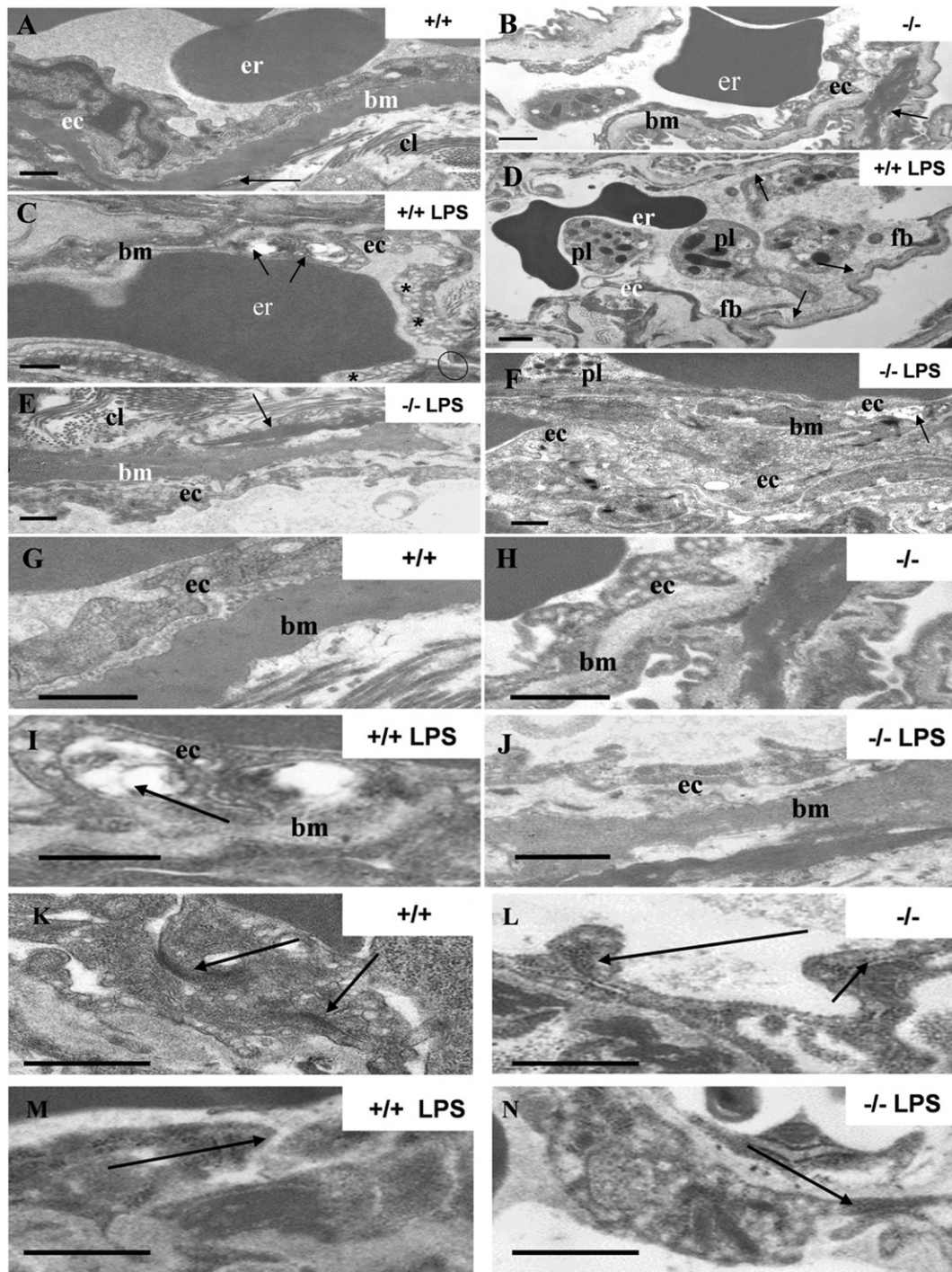


Fig. 3. Lack of CypD prevents the fine structural anatomy of lung tissue damaged by LPS. (A) In untreated wild type mice blood vessel endothelial cells (ec) attach intact basement membrane (bm). Dense layer of fibro elastic membrane supports interseptal wall (arrow). er: erythrocyte, cl: collagen fibers. (B) In CypD knock-out mice intact basement membrane (bm) and endothelial cell (ec) are visible. Prominent fibro elastic layer (arrow) lying beneath basement membrane. (C, D) LPS-treated wild type mice show seriously degenerating portion of an endothelial cell (ec) with large vacuoles appearing in cytoplasm (arrows, C) and thinner basement membrane (bm). Number and size of pinocytotic vesicles (stars) are increased, cytoplasm is swollen. Widened inter endothelial junction (circle) is also shown. Portions of endothelial cells are focally detached from basal membrane (arrows, D). Denuded patches serve potential surfaces to fine fibrin branches (fb) to attach. Blood vessel lumen is congested with platelets (pl). (E, F) In CypD knock-out LPS-treated mice the structure of blood vessel walls is almost identical with that of control animals. Intact endothelial cell (ec) basement membrane (bm) and fibro elastic membrane (arrow, E) are shown. Diffuse appearance of collagen fibers (cl) could also be observed. In some cases intact endothelial cell (ec) portions were seen focally detached (arrow, F) from basement membrane (bm). Cytoplasmic swelling could not be seen. (G, H) Fine structure of endothelial cells show no morphological changes between CypD^{+/+} vs CypD^{-/-}. (I, J) Serious endothelial cytoplasmic degeneration is visible (arrow, I) in LPS-treated wild type compared to knock-out mice. (K, L) Dense membrane sections of inter endothelial junctions (arrows) in blood vessel walls are intact both in wild type and CypD knock-out control animals. (M, N) Arrows show widened and intact thigh junctions in blood vessel wall of LPS-treated wild type and CypD knock-out animals, respectively. Scale bars: 500 nm.

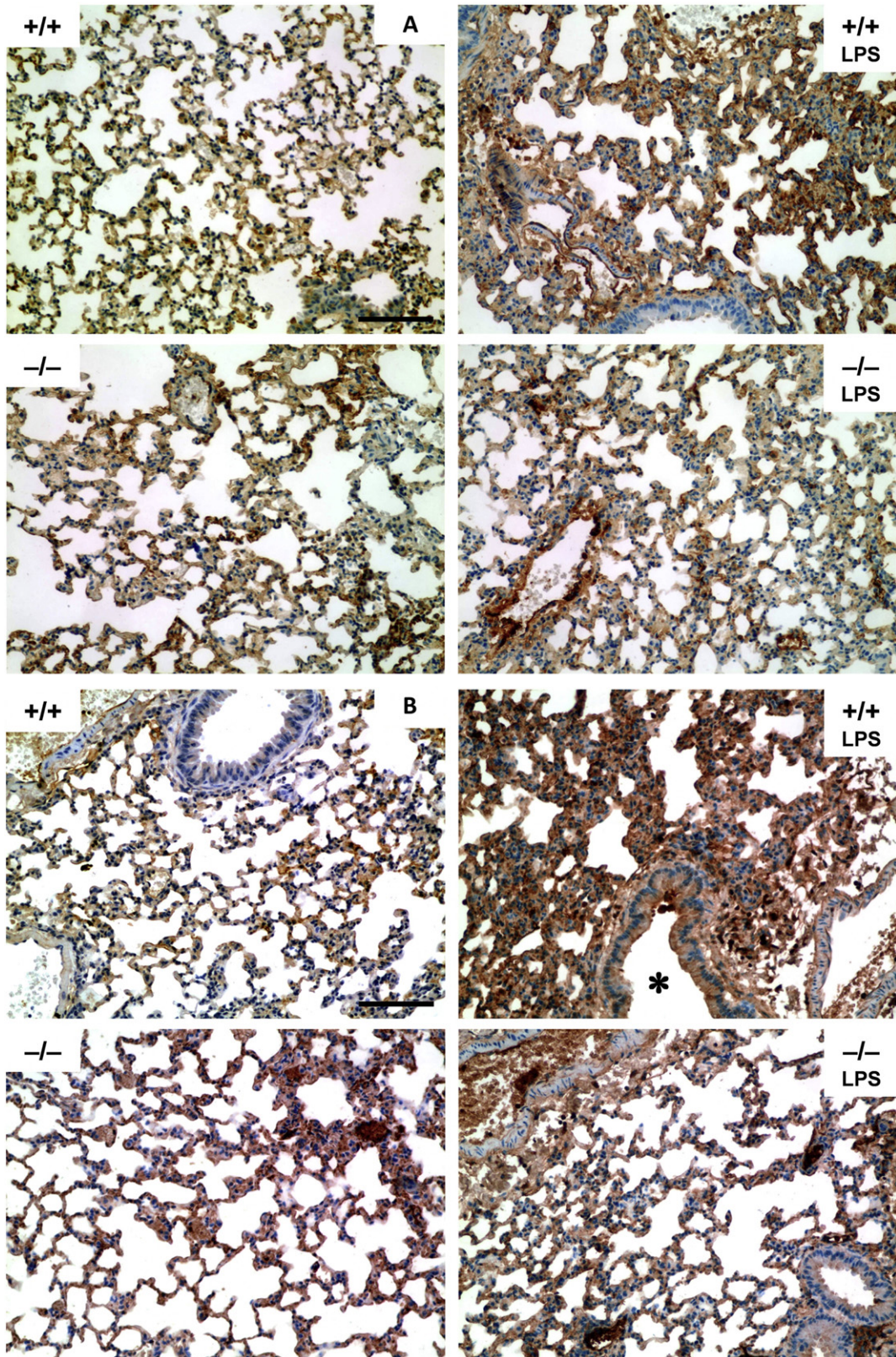


Fig. 4. Loss of CypD protects the lung epithelial cells against oxidative damage. Immunohistochemical staining of mouse lungs for nitrotyrosine (A) and for 4-hydroxy-2-noneal Michael adducts (B) in lung tissue counterstained with hematoxylin. Endothelia of lung vessels in LPS-treated wild type mice were intensively stained compared to CypD knock-out mice. Epithelial cells showed prominent positivity in wild type, but not in knock-out LPS-treated animals. Star indicates airway lumen with strong positivity of bronchial cells and secretory product. Scale bar represents 100 μ m.

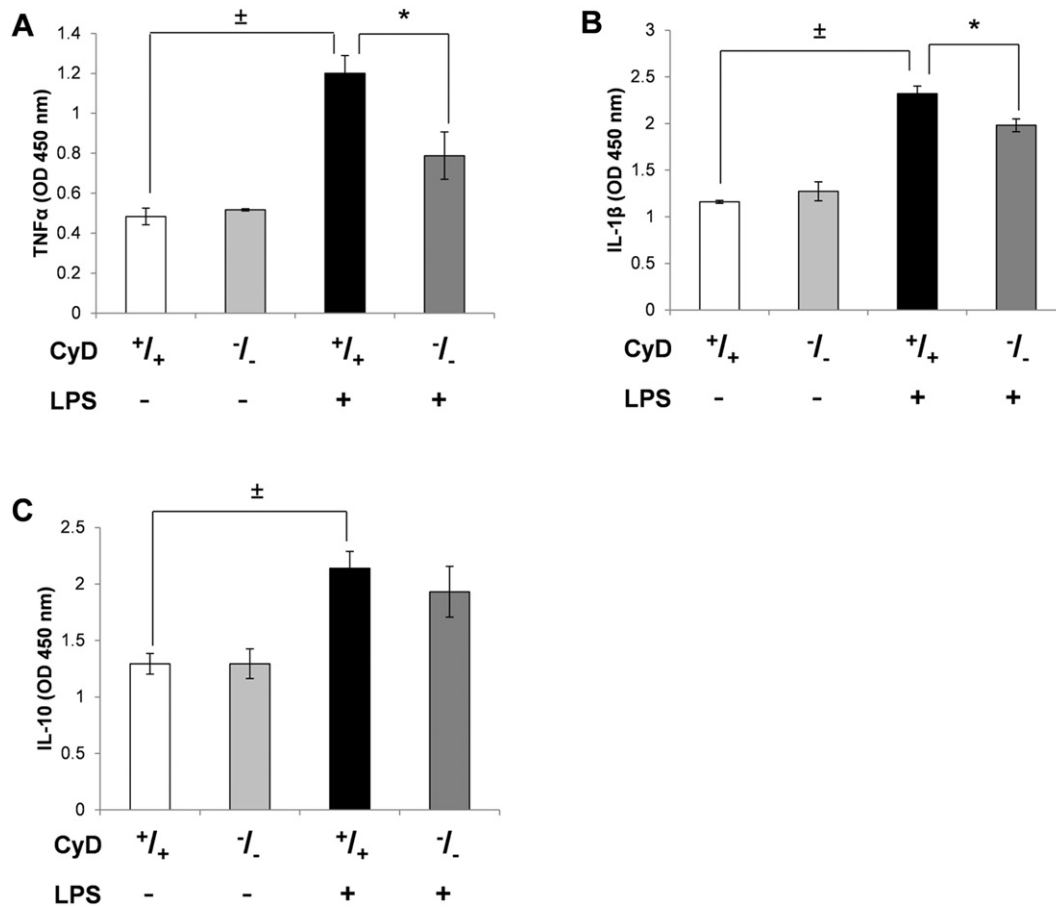


Fig. 5. Effect of LPS on cytokine production of wild type and *CypD*^{-/-} mice. Determination of proinflammatory cytokines TNF α (A) and IL-1 β (B), and anti-inflammatory cytokine IL-10 (C) 24 h after LPS-treatment from total lung homogenates by ELISA. Bars represent mean \pm SEM of optical densities, n = 4. Significant difference between control and LPS-treated wild type animals is indicated by \pm ($p < 0.05$), significant difference between LPS-treated wild type and *CypD* knock-out animals is indicated by * ($P < 0.05$).

3. Results

3.1. Mice lacking *CypD* survive lethal endotoxemia

CypD knock-out animals exhibited improved survival rate after intraperitoneal high dose LPS treatment compared to wild type mice. Out of the 8 *CypD*^{-/-} mice two (25%) died within the first 30 h but after that no deaths occurred. However all of the 8 wild type mice died within 60 h (Fig. 1). These results show that the loss of *CypD* massively reduces mortality.

3.2. *CypD* knock-out mice are protected against LPS-induced histopathological changes

Histological examination revealed severe lung injury in LPS-treated wild type animals. On hematoxylin-eosin stained sections, alveolar wall thickening, blood vessel congestion and perivascular exudation were seen, which are suggestive of impaired tissue architecture and function, while robust interstitial neutrophil infiltration indicated ongoing immune response (Fig. 2C). Interstitial accumulation of neutrophils was markedly decreased in LPS-treated *CypD*^{-/-} mice (Fig. 2E, 2F). Other pathological changes like alveolar widening and perivascular edema were also significantly milder in *CypD*^{-/-} lungs and no thrombotic event could be observed despite moderate congestion (Fig. 2D). Lungs of control animals in both groups had normal tissue architecture with thin alveolar walls, occasional intra-alveolar macrophages and few

neutrophils (Fig. 2A, 2B). For making histological examination quantitative a scoring was performed as described earlier (Fig. 2G). Scores were significantly higher in the LPS-treated wild type mice compared to *CypD* knock-outs mainly resulting from marked differences in interstitial neutrophil accumulation and alveolar thickening.

3.3. Lack of *CypD* prevents the fine structural anatomy of lung tissue damaged by LPS

LPS treatment induced serious lesions in the lung tissue of wild type mice. Endothelial cells were swollen loaded with cytoplasmic vacuoles and the number of pinocytotic vesicles was increased (Fig. 3C, 3I). Inter-endothelial connections of endothelial cells were damaged or dilated (Fig. 3M). An impaired, leaky endothelial layer of blood vessels allowed extravasation of intravascular fluid resulting in tissue edema. Another sign of impaired blood vessel functioning was a detached basal membrane with an unsettled fibroelastic layer in the alveolar septa (Fig. 3D). These denuded surfaces are potential targets of fibrin attachment and hyaline membrane formation. The proinflammatory activity of fibrin fragments and massive liberation of immune cell molecules may explain the appearance of a considerable amount of cell debris. Obvious thickening of the alveolar septa by accumulated connective tissue indicates strong fibrosis (Fig. 3D). Tissue organization of *CypD*^{-/-} mice with or without LPS treatment was almost identical to that of wild type untreated animals (Fig. 3A, 3B, 3G–L). The level of septal thickening was not comparable to that in wild type LPS-treated

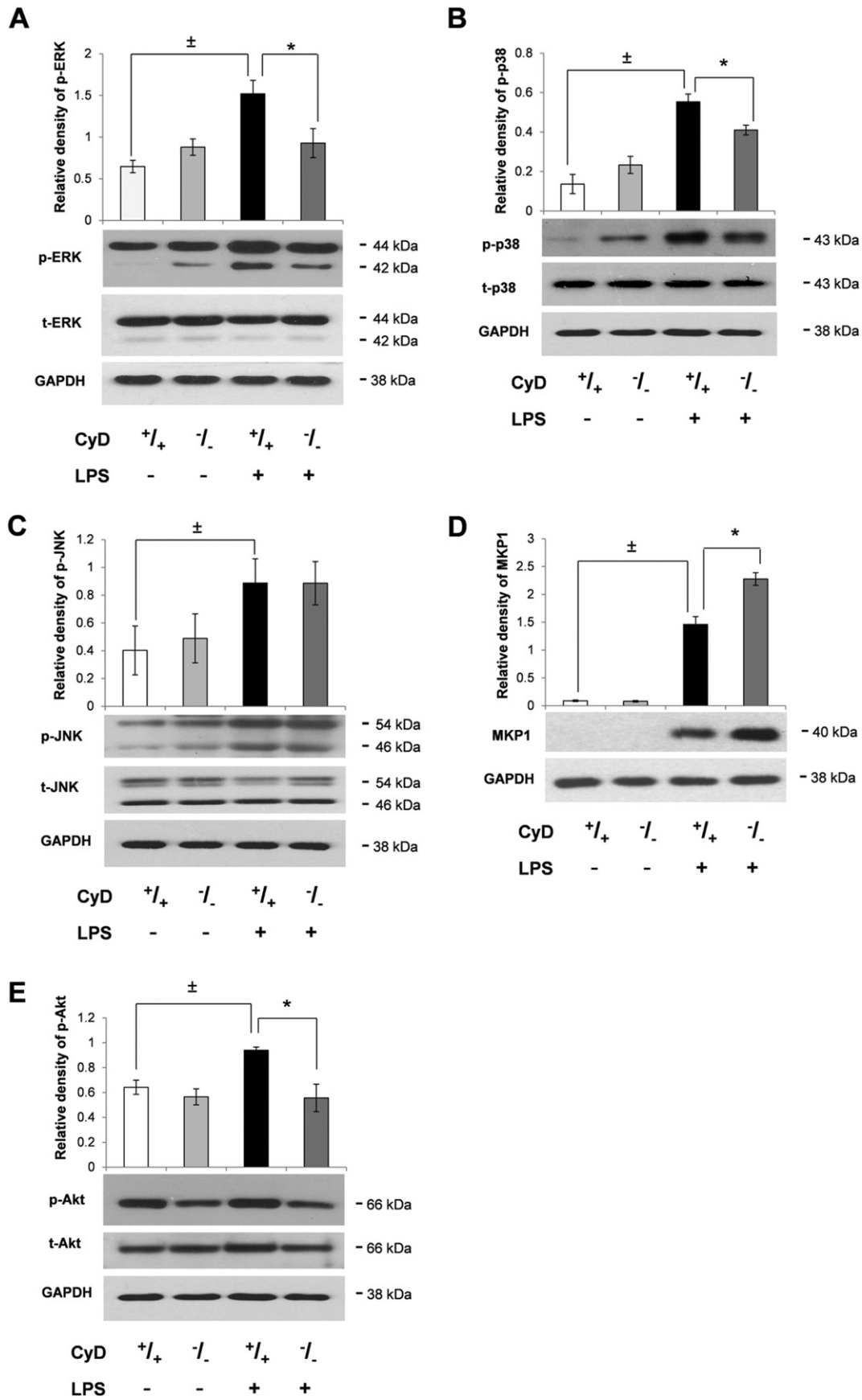


Fig. 6. Deficiency of CypD affects MAPKs, MKP-1 and Akt in mouse lungs after LPS treatment. Activation of ERK (A), p38 (B), SAPK/JNK (C), MKP-1 (D) and Akt (E) in lung total homogenates was determined 24 h after LPS treatment by immunoblotting utilizing phosphorylation specific and total primary antibodies. Total proteins (non-phosphorylated) and GAPDH were used as loading controls. A representative blot as well as a bar diagram of the quantified blots are presented. Bars represent mean \pm SEM of pixel densities, $n = 4$. Significant difference between control and LPS-treated wild type animals is indicated by \pm ($p < 0.05$), significant difference between LPS-treated wild type and CypD knock-out animals is indicated by * ($p < 0.05$).

animals (Fig. 3D, 3E). This observation indicates the quicker resolution of acute lung tissue lesions or much milder tissue injury.

3.4. Loss of CypD protects lung epithelial cells against oxidative damage

Lung tissue sections were examined with immunohistochemistry using antibodies against nitrotyrosine, and 4-hydroxy-2-noneal Michael adducts. LPS treatment markedly enhanced immunohistochemical staining in endothelial and lung epithelial cells of wild type animals. Endothelial and epithelial cells of CypD^{-/-} mice showed less intense staining (Fig. 4A). The extensive lipid-peroxidation damage after LPS treatment in wild type animals was also visible regarding bronchial mucinosis cells. In contrast, endotoxemic CypD^{-/-} mice exhibited a markedly reduced staining of endothelial tissue, while the intensity of epithelial positivity was almost the same as in wild type and knock-out animals without LPS treatment (Fig. 4B).

3.5. Absence of CypD impairs proinflammatory, but does not affect anti-inflammatory cytokine production

During ALI, early phase cytokines promote the production of chemokines by resident cells to enhance neutrophil sequestration into the lung. Clinical studies have proven the importance of these factors, since the outcome of patients with ARDS significantly correlates with the concentration of these cytokines in bronchoalveolar lavage fluid [7,21,22]. In our experiments, LPS treatment resulted in elevated TNF α and IL-1 β levels, measured in lung homogenates, while the amount of these cytokines was markedly decreased in LPS-treated CypD^{-/-} mice (Fig. 5A, 5B). IL-10, responsible for limiting inflammatory processes, ameliorates endotoxemia-induced ALI and high levels in the lungs of patients suffering from ARDS correlated with better outcome [23,24]. In our study, there was no difference in the amount of anti-inflammatory IL-10 in total lung homogenates between wild type and knock-out animals 24 h after LPS administration (Fig. 5C), as both increased significantly.

3.6. Deficiency of CypD affects the activation of MAPKs through MKP-1 and Akt in mouse lungs after LPS treatment

Phosphorylation and activation of MAPKs was shown to play an important role in the development of ALI following LPS exposure [25,26].

In our experiments, phosphorylation levels of extracellular signal-regulated kinase (ERK), p38, and c-Jun N-terminal kinase (JNK) were significantly elevated 24 h after LPS treatment in wild type animals, while the activation of ERK and p38 was lower in the lungs of LPS-treated CypD^{-/-} mice (Fig. 6A, B). No difference could be observed in JNK phosphorylation between knock-out and wild type animals after LPS challenge (Fig. 6C).

MAP kinases are under the direct negative regulation through dephosphatase activity of MAPK-phosphatase-1 (MKP1). The level of MKP1 was up-regulated in CypD^{-/-} mice compared to wild type animals after LPS treatment (Fig. 6D).

Beside MAP kinases Akt contributes to the TLR4 signaling cascade leading to NF- κ B activation and promoting inflammatory processes in the lung. In our experiment, LPS treatment significantly enhanced the phosphorylation of Akt in the lungs of wild type animals, while this effect was strongly reduced in CypD^{-/-} animals, resulting in a phosphorylation level that was comparable to that seen in control animals (Fig. 6E).

3.7. CypD knock-out mice do not exhibit prominent NF- κ B activation after LPS treatment

We determined the phosphorylation level of the p65 subunit of NF- κ B and inhibitory- κ B (I κ B). LPS caused a significant activation of NF- κ B in wild type mice compared to CypD^{-/-} animals (Fig. 7A). Similarly, robust I κ B phosphorylation was found in wild type animals after LPS treatment; however, CypD^{-/-} mice showed decreased phosphorylation, which seems to confirm our data regarding NF- κ B activation (Fig. 7B).

3.8. Marked differences between wild type and CypD knock-out animals regarding NF- κ B-mediated gene expression

To gain further insight into the functional inhibition of NF- κ B, we determined the gene expression of NF- κ B-regulated inflammatory mediators that are crucial in the pathophysiology of LPS-induced ALI using qRT-PCR. Expression of CD14, CXCL2, IFN γ , TNF α , IL-1 and inducible NO synthase (iNOS) was elevated in LPS-treated wild type animals; this LPS-induced overexpression was strongly reduced in every case in the knock-out mice. Our data show that NF- κ B regulation in CypD^{-/-} animals is not limited to the level of phosphorylation

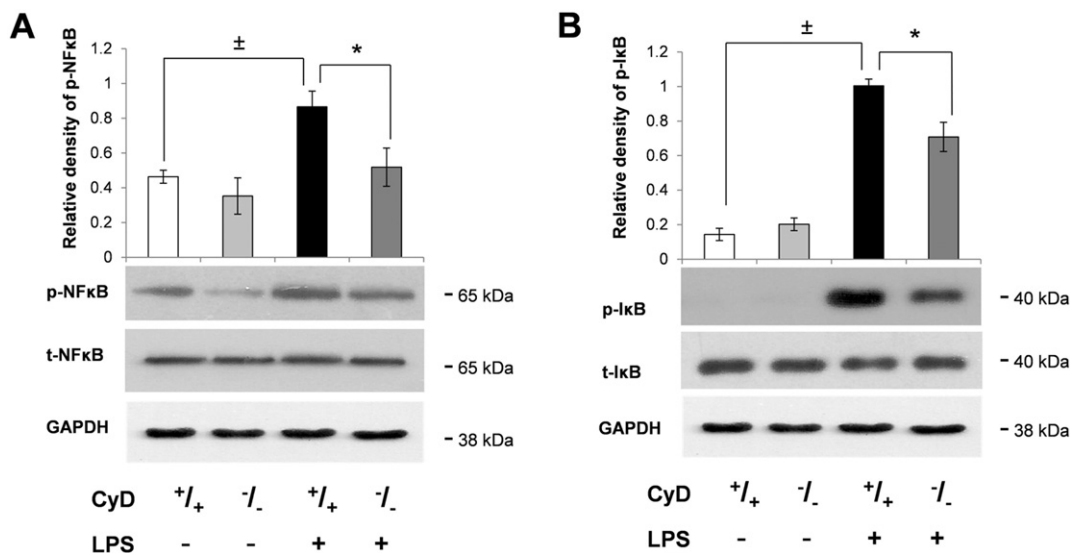


Fig. 7. CypD is required for LPS-induced NF- κ B activation. Phosphorylation of NF- κ B (A) and I κ B (B) in lung total homogenates was determined 24 h after LPS treatment by immunoblotting, utilizing phosphorylation specific primary antibodies. Total proteins (non-phosphorylated) and GAPDH were used as loading controls. A representative blot as well as a bar diagram of the quantified blots are presented. Bars represent mean \pm SEM of pixel densities, n = 4. Significant difference between control and LPS-treated wild type animals is indicated by \pm ($p < 0.001$), significant difference between LPS-treated wild type and CypD knock-out animals is indicated by * ($P < 0.05$).

of key signaling enzymes, but it affects the transcription of the related genes as well (Fig. 8).

4. Discussion

In the present study, we demonstrated that a deficiency of CypD ameliorates pathological consequences of endotoxemia-induced ALI, both at the tissue and molecular levels, and massively reduces mortality

rate. Cyclophilins are ubiquitous proteins differing in their subcellular localization and binding affinity to CsA. CsA inhibits calcineurin thereby suppresses MKP-1 expression resulting in increased MAPK activation [27]. Therefore, considering the importance of MAPKs in NF- κ B activation, CsA is obviously unsuitable for studying the effect of mPT impairment on LPS-induced inflammatory response. To resolve this problem and to focus on the role of CypD and mPT on LPS-induced inflammation, we used a CypD^{-/-} model.

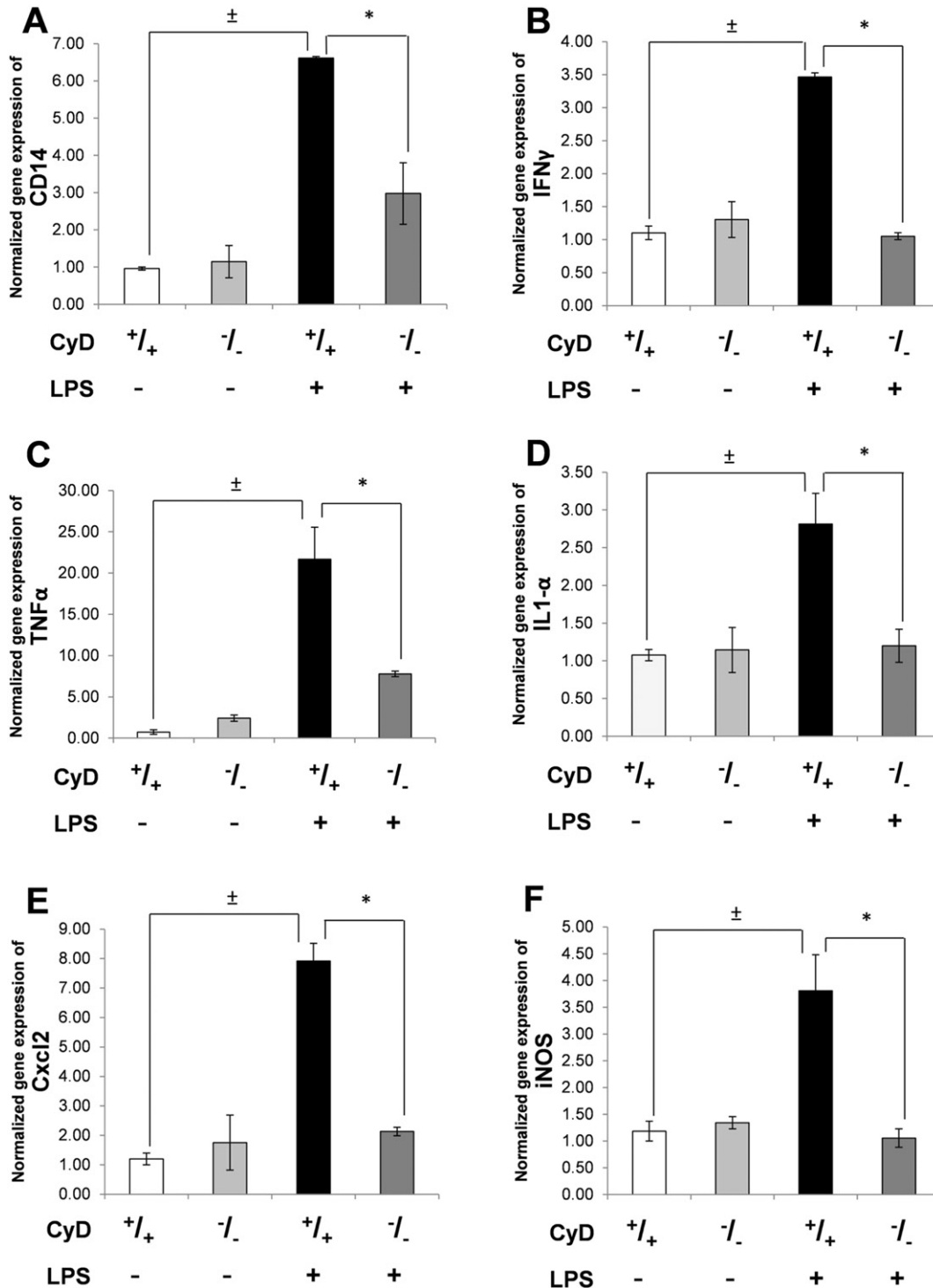


Fig. 8. CypD regulates LPS-induced NF- κ B-mediated gene expression. The expression of NF- κ B-mediated inflammatory genes, CD14 (A), IFN- γ (B), TNF α (C), IL-1 α (D), Cxcl2 (E) and iNOS (F) was determined 24 h after LPS treatment in lung tissue by RT-PCR. Actin was used as a housekeeping gene to generate the Δ Ct values. Data were normalized to Δ Ct values of untreated controls. Results are presented as mean \pm SEM, n = 4. Significant difference between control and LPS-treated wild type animals is indicated by \pm (p < 0.001), significant difference between LPS-treated wild type and CypD knock-out animals is indicated by * (p < 0.05).

LPS is known to cause excessive inflammatory response with oxidant-antioxidant imbalance in many organs, severely affecting the lungs. Lung epithelial cells and macrophages, as well as sequestered neutrophils produce excessive amounts of ROS, amplifying oxidant events. Mitochondrial ROS production-induced cellular damage has been implicated in the pathophysiology of LPS-induced inflammation and ALI [28] characterized by endothelial barrier dysfunction, interstitial edema and thickening, epithelial damage, and the accumulation of neutrophils. Our histological results showed the same characteristics in the lungs of LPS-challenged wild type mice, but animals lacking CypD showed only mild tissue injury. Histological scores supported these findings. The deleterious effect of ROS on endothelial and epithelial morphology and barrier function has been demonstrated at the sub-cellular fine structural level using electron microscopy; however, a definitive protective effect was found in CypD-deficient mice. Our results suggest that the loss of CypD greatly diminishes ROS and RNS production after LPS treatment with the consequent attenuation of microscopic and subcellular pathological changes and oxidative tissue damage in the lungs of mice.

ROS contribute to the inflammatory phenotype, with the increased production of proinflammatory cytokines in lung cells. Elevated concentrations of proinflammatory chemokines and cytokines, including IL-8, IL-1 β , and TNF α , in the lungs are critical regulators of the outcome of ALI. Compared to wild type animals, in CypD-deficient mice, the level of TNF α and IL-1 β produced by resident cells was decreased, indicating that the lack of CypD could severely interfere with cytokine generation, possibly due to reduced mitochondrial ROS production. This strong correlation between mitochondrial ROS and proinflammatory cytokine production was also reported by Bulua and his coworkers, pointing to the fact that the blockade of mitochondrial ROS generation efficiently reduces inflammatory cytokine production after treatment in cells from patients with TNF receptor-associated periodic syndrome and from healthy individuals [29].

As a counterbalance, IL-10 is a key anti-inflammatory cytokine in the down-regulation of inflammatory response. One of its key functions is regulation of the pathogen-mediated activation of macrophages and dendritic cells, consequentially inhibiting the expression of chemokines, inflammatory enzymes, and potent proinflammatory cytokines. Elevated levels of IL-10 after LPS exposure did not differ in the two LPS-treated groups, indicating that the ameliorated inflammatory processes in CypD-deficient animals are not a consequence of anti-inflammatory mechanisms but of attenuated ROS production.

ROS are important chemical mediators that regulate signal transduction pathways, including members of the MAP kinases. In line with previous studies, [25,26] we found the increased phosphorylation of MAPKs in the lungs after LPS treatment. Phosphorylation of redox-sensitive p38 and ERK was markedly decreased in CypD-deficient mice; however, JNK activation was unaltered in our experiments. Although ROS could activate all three MAPKs, this regulation is conducted by different upstream regulators independently of each other. It was previously reported that H₂O₂ stimulates JNK but not p38 and ERK via a pathway that is dependent on Src; however, the exact mechanisms for ROS-mediated p38 and ERK activation remain unknown [30]. Based on our results the depletion of CypD exerts its effect on ROS-induced MAPK activation in p38- and ERK-dependent and JNK-independent ways. Besides the regulation of upstream mediators of MAPKs, direct control mechanisms could act also through MKP-1 activity. MKP-1 is a central redox sensitive regulator of ERK and p38 during endotoxemia, ameliorating monocyte activation and consequential lung injury [31,11]. Up-regulation of MKP-1 in CypD knock-out mice upon LPS exposure represents a strong protective pathway due to the attenuated activation of ERK and p38. Previous studies have shown that p38 is regulated by Akt as well, positively influencing NF- κ B activation [32]. Indeed, the phosphorylation pattern of p38 followed that of Akt in our experiments. Since Akt could be activated by ROS [33] and IL-1 β [32], a lack of CypD could down-regulate the Akt-p38-NF- κ B

pathway through these inflammatory mediators. In accordance with these findings, NF- κ B and I κ B phosphorylation increased dramatically after LPS treatment in the lungs of wild type but not CypD-deficient animals. Moreover, we proved the functional inhibition of NF- κ B activity in the absence of CypD, analyzing NF- κ B-related genes at the mRNA and protein levels. In CypD-deficient mice, the expression of important participants of TLR4 signaling (CD14, iNOS) and mediators of ALI, like chemokines and cytokines (Cxcl2, IFN γ , TNF α , IL-1 α), showed a significant decrease compared to wild type animals. Our gene expression data suggest that the downregulation of NF- κ B and the related genes by the lack of CypD may be essential to prevent or treat inflammatory diseases.

In summary, we demonstrate that the loss of essential mPT modulatory protein CypD can intensely ameliorate endotoxemia-induced lung injury in mice through down-regulation of the NF- κ B pathway, inflammatory mediators and reducing the production of ROS. Our data highlight a previously unknown regulatory function of mitochondria due to the mediation of mPT during inflammatory responses. This finding offers a valuable therapeutic target in conditions of acute inflammation including ALI.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

This research was supported by the European Union and the State of Hungary, co-financed by the European Social Fund in the framework of TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001 'National Excellence Program'. This work was also supported by PTE ÁOK-KA-2013/31 and by OTKA K104220.

References

- [1] K.L. Brigham, B. Meyrick, Endotoxin and lung injury, *Am. Rev. Respir. Dis.* 133 (1986) 913–927.
- [2] O. Takeuchi, K. Hoshino, T. Kawai, H. Sanjo, H. Takada, et al., Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of Gram-negative and Gram-positive bacterial cell wall components, *Immunity* 11 (1999) 443–451.
- [3] Y.C. Lu, W.C. Yeh, P.S. Ohashi, LPS/TLR4 signal transduction pathway, *Cytokine* 42 (2008) 145–151.
- [4] D. Togbe, S. Schnyder-Candrian, B. Schnyder, E. Doz, N. Noulin, et al., Toll-like receptor and tumour necrosis factor dependent endotoxin-induced acute lung injury, *Int. J. Exp. Pathol.* 88 (2007) 387–391.
- [5] T.S. Blackwell, E.P. Holden, T.R. Blackwell, J.E. DeLarco, J.W. Christman, Cytokine-induced neutrophil chemoattractant mediates neutrophilic alveolitis in rats: association with nuclear factor kappa B activation, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 11 (1994) 464–472.
- [6] T.S. Blackwell, J.W. Christman, The role of nuclear factor-kappa B in cytokine gene regulation, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 17 (1997) 3–9.
- [7] J. Grommes, O. Soehnlein, Contribution of neutrophils to acute lung injury, *Mol. Med.* 17 (2011) 293–307.
- [8] B. Veres, F. Gallyas Jr., G. Varbiro, Z. Berente, E. Osz, et al., Decrease of the inflammatory response and induction of the Akt/protein kinase B pathway by poly-(ADP-ribose) polymerase 1 inhibitor in endotoxin-induced septic shock, *Biochem. Pharmacol.* 65 (2003) 1373–1382.
- [9] B. Veres, B. Radnai, F. Gallyas Jr., G. Varbiro, Z. Berente, et al., Regulation of kinase cascades and transcription factors by a poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor, 4-hydroxyquinazoline, in lipopolysaccharide-induced inflammation in mice, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 310 (2004) 247–255.
- [10] P.B. Jakus, N. Kalman, C. Antus, B. Radnai, Z. Tucsek, et al., TRAF6 is functional in inhibition of TLR4-mediated NF- κ B activation by resveratrol, *J. Nutr. Biochem.* 24 (2013) 819–823.
- [11] Z. Tucsek, B. Radnai, B. Racz, B. Debreceni, J.K. Priber, et al., Suppressing LPS-induced early signal transduction in macrophages by a polyphenol degradation product: a critical role of MKP-1, *J. Leukoc. Biol.* 89 (2011) 105–111.
- [12] M. Crompton, The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death, *Biochem. J.* 341 (1999) 233–249.
- [13] V. Giorgio, S. von Stockum, M. Antoniel, A. Fabbro, F. Fogolari, et al., Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2013) 5887–5892.
- [14] C.P. Baines, R.A. Kaiser, N.H. Purcell, N.S. Blair, H. Osinska, et al., Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death, *Nature* 434 (2005) 658–662.

- [15] E. Basso, L. Fante, J. Fowlkes, V. Petronilli, M.A. Forte, et al., Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of cyclophilin D, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 18558–18561.
- [16] A.K. Camara, E.J. Lesnefsky, D.F. Stowe, Potential therapeutic benefits of strategies directed to mitochondria, *Antioxid. Redox Signal.* 13 (2010) 279–347.
- [17] N.V. Naoumov, Cyclophilin inhibition as potential therapy for liver diseases, *J. Hepatol.* 61 (2014) 1166–1174.
- [18] P. Nigro, G. Pompilio, M.C. Capogrossi, Cyclophilin a: a key player for human disease, *Cell. Death Dis.* 4 (2013), e888.
- [19] K. Jeong, H. Kim, K. Kim, S.J. Kim, B.S. Hahn, et al., Cyclophilin B is involved in p300-mediated degradation of CHOP in tumor cell adaptation to hypoxia, *Cell Death Differ.* 21 (2014) 438–450.
- [20] B. Fiedler, K.C. Wollert, Interference of antihypertrophic molecules and signaling pathways with the Ca^{2+} -calcineurin-NFAT cascade in cardiac myocytes, *Cardiovasc. Res.* 63 (2004) 450–457.
- [21] G. Matute-Bello, G. Downey, B.B. Moore, S.D. Groshong, M.A. Matthay, et al., An official American thoracic society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 44 (2011) 725–738.
- [22] G.U. Meduri, G. Kohler, S. Headley, E. Tolley, F. Stentz, et al., Inflammatory cytokines in the BAL of patients with ARDS Persistent elevation over time predicts poor outcome, *Chest* 108 (1995) 1303–1314.
- [23] S.C. Donnelly, R.M. Strieter, P.T. Reid, S.L. Kunkel, M.D. Burdick, et al., The association between mortality rates and decreased concentrations of interleukin-10 and interleukin-1 receptor antagonist in the lung fluids of patients with the adult respiratory distress syndrome, *Ann. Intern. Med.* 125 (1996) 191–196.
- [24] C.L. Wu, L.Y. Lin, J.S. Yang, M.C. Chan, C.M. Hsueh, Attenuation of lipopolysaccharide-induced acute lung injury by treatment with IL-10, *Respirology* 14 (2009) 511–521.
- [25] S. Bozinovski, J.E. Jones, R. Vlahos, J.A. Hamilton, G.P. Anderson, Granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor (GM-CSF) regulates lung innate immunity to lipopolysaccharide through Akt/Erk activation of NF-kappa B and AP-1 in vivo, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 42808–42814.
- [26] H.J. Kim, H.S. Lee, Y.H. Chong, J.L. Kang, p38 mitogen-activated protein kinase up-regulates LPS-induced NF-kappaB activation in the development of lung injury and RAW 264.7 macrophages, *Toxicology* 225 (2006) 36–47.
- [27] H.W. Lim, L. New, J. Han, J.D. Molkentin, Calcineurin enhances MAPK phosphatase-1 expression and p38 MAPK inactivation in cardiac myocytes, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 15913–15919.
- [28] C. Richter, V. Gogvadze, R. Laffranchi, R. Schlapbach, M. Schweizer, et al., Oxidants in mitochondria: from physiology to diseases, *Biochim. Biophys. Acta* 1271 (1995) 67–74.
- [29] A.C. Bulua, A. Simon, R. Maddipati, M. Pelletier, H. Park, et al., Mitochondrial reactive oxygen species promote production of proinflammatory cytokines and are elevated in TNFR1-associated periodic syndrome (TRAPS), *J. Exp. Med.* 208 (2011) 519–533.
- [30] M. Yoshizumi, J. Abe, J. Haendeler, Q. Huang, B.C. Berk, Src and Cas mediate JNK activation but not ERK1/2 and p38 kinases by reactive oxygen species, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 11706–11712.
- [31] H.S. Kim, S.L. Ullevig, D. Zamora, C.F. Lee, R. Asmis, Redox regulation of MAPK phosphatase 1 controls monocyte migration and macrophage recruitment, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) E2803–E2812.
- [32] L.V. Madrid, M.W. Mayo, J.Y. Reuther, A.S. Baldwin Jr., Akt stimulates the transactivation potential of the RelA/p65 subunit of NF-kappa B through utilization of the ikappa B kinase and activation of the mitogen-activated protein kinase p38, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 18934–18940.
- [33] S.R. Lee, K.S. Yang, J. Kwon, C. Lee, W. Jeong, et al., Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H2O2, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 20336–20342.