

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**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

1. BEVEZETÉS

A sepszis és szeptikus sokk kifejezések infekcióhoz társuló szisztémás gyulladáshoz válaszreakciót takarnak, mely kialakulásáért a szervezet fertőzésre és bakteriális komponensekre adott kóros mértékű és irányú válaszreakciója a felelős. A sepszis incidenciája az orvostudomány fejlődése ellenére folyamatos növekedést mutat, ugyanakkor a mortalitási mutatók javulnak. A kórokozóspektrum is változik, azonban a Gram-negatív baktériumok szerepe még mindig kiemelkedő. A sepszis kezdeti fázisában a Gram-negatív baktériumok külső sejtfalkomponensének, a lipopoliszacharidnak (LPS) hatására veleszületett immunrendszer révén kontrollálatlan proinflammatorikus válaszreakció alakul ki. Az ennek során termelődő proinflammatorikus citokinek, illetve hatásukra felszabaduló toxikus enzimek és oxidatív ágensek által mediálva, endotél- és szövetkárosodás alakul ki. Ennek következménye különböző szervek elégtelen működése, amit többszervi elégtelenségnek vagy többszervi diszfunkciós szindrómának (multiple organ failure-MOF vagy multiple organ dysfunction syndrome-MODS) neveznek. Leggyakrabban a tüdő károsodik, melynek következtében akut tüdőkárosodás (acute lung injury-ALI) vagy manapság már csak akut respirációs distressz szindrómaként (acute respiratory distress syndrome-ARDS) megnevezett kórkép alakul ki. A sepszis által kiváltott indirekt tüdőkárosodás során sérül az alveolo-kapilláris egység, az endotél- és epitélisejtek integritása. Ennek következtében hyalinmembrán, tüdőödéma és sejtes infiltrátum alakul ki, melyek csökkenő tüdőcompliance-hez, romló gázcseréhez, és hipoxiához vezetnek.

Az LPS felismeréséért a mintázat felismerő receptorok (pattern recognition receptor-PRR) közé tartozó Toll-szerű receptor 4 (Toll-like receptor-TLR) a felelős. A TLR4 ligand kötése kétféle jelátviteli útvonalon is (Myd88-függő vagy független) az NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) transzkripciófaktor aktivációjához vezet. A folyamat során a TLR4 jelátvitel különböző résztvevői aktiválják az I κ B-kinázokat (IKK), amik ezután az I κ B-t (inhibitor- κ B) foszforilálják, mely ennek következtében ubiquitinálódik, majd lebomlik. Az így felszabaduló NF- κ B ezután transzlokálódik a nukleuszba és elindítja a célgének expresszióját. Emellett számos intracelluláris protein-kináz, mint az ERK (extracellular signal-regulated kinase), a p38 és a JNK (c-Jun NH₂-terminal kinase) mitogén aktivált protein kinázok (MAPK), valamint az Akt szerin-treonin kináz, a TLR4 jelátviteli útvonallal kölcsönhatásban az NF- κ B regulációjában is részt vesznek. A transzkripciófaktor aktivációja gyulladáshoz mediátorok, enzimek és reaktív oxigén származékok felszabadulásához vezet a beáramló neutrofil granulocitákból és rezidens sejtekből. A leukociták által termelt

reaktív oxigén (ROS) és nitrogén származékok (RNS) elsősorban a kórokozók eliminációját szolgálják. Túlzott mértékű termelésük azonban szövetkárosodáshoz vezet lipidperoxidáció, DNS-károsítás és a fehérjék oldalláncainak módosítása révén. Az LPS hatására képződő ROS-k emellett a redoxérzékeny transzkripciós faktorok, mint az NF- κ B, valamint intracelluláris kinázok, mint a MAPK-k és az Akt aktivitását is fokozhatják.

A reaktív oxigén származékok mind célzottan, mind melléktermékként is keletkezhetnek, jelentős forrásuk a mitokondriális légzési lánc elégtelen működése. A mitokondriális ROS termelést számos kórkép kialakulásáért teszik felelőssé. Képződésüket elősegíti a membránpotenciál összeomlásával járó mitokondriális permeabilitás tranzíció (mPT). Ez egy több komponensű, nem specifikus pórus, az úgynevezett mitokondriális permeabilitás tranzíciós pórus (mPTP) kinyílásának eredménye, mely szabad anyagáramlást enged a mátrix és külvilág között 1,5kDa molekulanagyságig. A pórus kinyílását számos anyag és körülmény indukálja, így a mitokondriális Ca^{2+} koncentráció növekedése, az oxidatív stressz és az anorganikus foszfát. Az mPTP pontos felépítése a mai napig vitatott. A klasszikus modell szerint kialakításában az adenin-nukleotid transzlokáz (ANT) és a feszültség-függő anion csatorna (VDAC) vesznek részt, míg a legfrissebb modellben a F_0F_1 ATP-szintáznak tulajdonítanak pórusalkotó szerepet. A nukleáris *Ppif* gén által kódolt prolin *cisz-transz* izomeráz, a ciklofilinD (CypD) azonban a mai napig tartja a helyét a pórus működéséhez szükséges, elengedhetetlen alkotórészek között. Hiányában csak extrém magas Ca^{2+} koncentráció alkalmazásával lehetett azt indukálni, mely megfelel annak, ami vad típusú mitokondriumok esetén inhibitor, a ciklosporinA (CsA) mellett nyitja a pórust. Bár az mPTP fiziológiás szerepe még nem teljesen tisztázott, számos kórképben igazolták patogenetikai jelentőségét, mint ischemiás/reperfúziós szívkárosodás, neurodegeneratív betegségek, Alzheimer kór, Parkinson kór, és izomdisztrófiák kialakulásában. Mivel a CypD elengedhetetlen regulátoros eleme a mPTP-nek, előszeretettel alkalmaznak olyan kísérletes modelleket egyes kórképek és az mPTP kapcsolatának vizsgálatára, melyekben a CypD-t genetikai úton vagy különféle inhibitorokkal gátolják. 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. A ciklosporinA azonban nem csak a CypD-re, hanem egyéb izoformákra is hat. Immunszuppresszáns hatással rendelkezik, melyet a Ca^{2+} /calmodulin szenzitív foszfatáz, a calcineurin gátlásán keresztül fejt ki, valamint egyéb proinflammatorikus folyamatokban is szerepet játszik.

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 efferktormolekulaként 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. EREDMÉNYEK

3.1 A CypD *knock-out* állatok túlélnek a letális LPS kezelést

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. 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.

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

A 10% paraformaldehidben (pH=7,2) fixált tüdőlebenyekből 5 µm-s metszeteket készítettünk, melyeken hematoxin-eozin (HE) festést végeztünk standard protokollt alkalmazva. Az eredmények kvantifikálása érdekében minden csoportban öt-öt metszeten kettős vak módon szövettani kiértékelés történt az “American Thoracic Society” ajánlása alapján. A tüdőérintettség jellegzetességeként az alveoláris fal kiszélesedését, a vérerek pangását illetve bennük helyenként trombus jelenlétét, valamint perivaszkuláris ödémát, neutrofil granulociták masszív infiltrációját észleltük. 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 fal megvastagodás mértékében mutatkozott meg, melyek irodalmi adatok szerint is az endotoxémia kiváltott károsodás legfőbb jellemzői.

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

Az endotélkárosodás következtében kialakuló fibrin tartalmú exudátum szövetközi megjelenésének igazolására Mallory-féle foszfor-volfrámsavas hematoxin festést alkalmaztunk. Kontroll állatokban a kollagénrostok perivaszkulárisan illetve a bronchovaszkuláris kötegek körül összefüggő, tömör rétegekben helyezkedtek el. Ezzel szemben LPS-sel kezelt kontroll állatokban az ereket körülvevő kötőszövet súlyos fokú ödémáját, felrostozódását észleltük. Az erek közelében, a fellazult kötőszövet közé és egyes alveolusok területére beszűrődő, kék festődést mutató fibrin tartalmú exudátum volt kimutatható. Ezzel szemben a *knock-out* állatokban - enyhe kiszélesedést leszámítva - a perivaszkuláris kötőszöveti állományban sehol sem észleltünk jelentős mennyiségű fibrin tartalmú exudátumot.

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

Az endotoxémia okozta barrier diszfunkció pontosabb vizsgálata céljából transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatot végeztünk tüdőszöveten. Eredményeink megerősítették az endoteliális réteg és az interendoteliális junctionok károsodását. Mind ezek 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 bazálmembán fibrinszálak megtapadását segítette elő. Ezzel szemben ezek a finomszerkezeti eltérések az LPS-sel kezelt CypD KO egerekben hiányoztak vagy csak nagyon minimális mértékben voltak jelen.

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

Az oxidatív stressz kimutatása céljából polimer alapú HRP-detektáló rendszerrel, Dako Autostainer Plus automatizált rendszer segítségével, immunhisztokémiai vizsgálatot végeztünk. Egértüdő vizsgálata során nitrotirozin és 4-hidroxi-2-nonenal Michael addukt 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 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, mint CypD *knock-out* társaikban. Kiemelendő, hogy a CypD^{+/+} állatokban a szekretoros hámsejtek által bélelt légutak is erős jelölődést mutattak anti-4-hidroxi-2-nonenal Michael addukt antitesttel szemben, ellentétben a KO állatokkal.

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

24 órával az intraperitonealis LPS kezelést (40 mg/kg) követően meghatároztuk tüdőszöveti homogenátumból ELISA módszerrel a proinflammatorikus TNF α és IL-1 β , valamint az antiinflammatorikus IL-10 mértékét illetve változását. Ezeknek a citokineknek bronchoalveolaris mosófolyadékából végzett klinikai vizsgálatok szerint is jelentős szerepe van az ARDS kialakulásában. Vizsgálatunk során endotoxémia 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 gyulladáscitokinek mennyisége. Mindkét csoportban szignifikánsan megnőtt az IL-10 szintje a tüdőben endotoxémia hatására, azonban a két csoport között nem találtunk jelentős különbséget, ami arra utal, hogy az antiinflammatorikus hatás hasonló volt.

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

Western blot segítségével meghatároztuk a tüdőhomogenátumban az ERK , p38, SAPK/JNK , MKP-1 és az Akt 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. 24 órával az intraperitonealis LPS kezelés után szignifikánsan fokozódott az ERK, a p38, és a JNK aktivációs foszforilációja vad típusú egerek tüdejében. Ehhez képest jelentősen kisebb mértékű volt az ERK és a p38 foszforiláció mértéke CypD^{-/-} egerek tüdejében, ugyanakkor a JNK foszforilációt vizsgálva nem kaptunk különbséget a két csoport között. 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 génhiányos állatok tüdejében a vad típusú, kezelt egerekhez képest. A TLR4 jelátviteli folyamatokhoz és az NF- κ B aktivitásának fokozásához hozzájáruló Akt-nek is jelentősen fokozódott a foszforilációja a vad típusú egerek tüdejében, míg az szignifikánsan kisebb mértékű volt a CypD^{-/-} állatokban.

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

Western blottal tüdőhomogenátumból meghatároztuk az NF- κ B p65 alegységének és annak aktivációjában szerepet játszó I κ B-nek 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. A szisztémás LPS adás 24 óra elteltével szignifikánsan fokozta a vad típusú állatok tüdőhomogenátumában az NF- κ B vizsgált alegységének foszforilációját a CypD génhiányos állatokkal ellentétében. Hasonlóan szignifikánsan nagyobb mértékű I κ B foszforilációs szintet észleltünk a vad típusú állatok tüdejében összehasonlítva a génhiányos állatokkal, mely tény megerősíti az NF- κ B alegységének vizsgálatakor kapott eredményeket.

3.9 Jelentős különbség az NF- κ B által irányított génexpresszióban a CypD jelenlétének függvényében

Real Time-PCR alkalmazásával megmértük egér tüdőszövetben az NF- κ B által vezérelt gyulladásgéneket, mint CD14, IFN- γ , TNF α , IL-1 α , Cxcl2 és iNOS 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. Ezzel tisztázni szeretnénk

volna, hogy csak molekuláris szinten, a foszforiláció mértékében, vagy ténylegesen, funkcionális szinten is észlelhető a kulcsfontosságú NF- κ B transzkripciós faktor aktivitásában különbség. Az összes, az ARDS patofiziológiájában is részt vevő 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.

4. 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. A mitokondriális diszfunkciónak és a mitokondriumban termelődő ROS-k által okozott sejtkárosodásnak egyre nagyobb szerepet tulajdonítanak az LPS indukálta szepszis és akut tüdőkárosodás patofiziológiájában. Számos inflammatorikus mediátor fokozni képes a mitokondriális ROS-k képződését. Ehhez hozzájárul a belső mitokondriális membránban található mPTP kinyílása. Így kóroki szerepe több olyan betegség esetében is felmerült már, ahol a ROS-k jelentősen hozzájárulnak a szervkárosodáshoz. 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 a pórus elengedhetetlen regulátoros alkotója. A ciklofileinek mindenütt előforduló, prolin cisz-transz izomeráz enzimaktivitással rendelkező fehérjék, melyek sejten belüli elhelyezkedésükben és ciklosporinA kötő képességükben különböznek. A CypD a ciklofileinek eddig ismert egyetlen mitokondriális tagja. A ciklosporinA elsődleges célpontja a calcineurin. A calcineurin számos jelátviteli folyamatban és gyulladásos jelenségben részt vesz, befolyásolja a szepszis kiváltotta tüdőkárosodás során a citokin expressziót az NFATc3 transzkripciós faktoron keresztül. A ciklosporinA a calcineurinra hatva közvetetten gátolni képes az MKP-1-t és ezáltal fokozza a MAPK-k működését. 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 gyulladásos 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, mint endoteliális barrier diszfunkció, diffúz alveoláris károsodás, a neutrofil granulociták felszaporodása, az interstícium és az interalveoláris szeptumok kiszélesedése, hyalinmembrán és mikrotrombusok képződése. Szövetteni vizsgálatunk során ezek az elváltozások az LPS-sel kezelt vad típusú egerek tüdejében jól észlelhetőek voltak szemben a CypD hiányos állatokkal, amit a pontrendszer alapján végzett hisztológiai kiértékelés is megerősített.

A ROS-k indukálta barrier diszfunkció és az érpermeabilitás fokozódása fontos kritériuma az ALI-nak állatmodellen. Az igazolására Mallory-féle foszfor-volfrámsavas festést alkalmaztunk szövettani metszeten, mely a fibrin felszaporodást és a fibrózist is képes kimutatni. A módszert a mai napig alkalmazzák endotoxémia okozta fibrin tartalmú alveoláris és intersticiális folyadék megjelenésének kimutatására. 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. Ultrastrukturális, elektronmikroszkópos vizsgálataink is megerősítették az endoteliális réteg és az interendoteliális junctionok endotoxémia következtében létrejövő károsodását, de ez jóval súlyosabb volt vad típusú egerekben. Ezen eredmények azzal magyarázhatók, hogy az mPTP kinyílásának hiányában LPS kezelést követően feltételezhetően enyhébb oxidatív stressz alakul ki. 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, mennyiségük ingadozó és igen reaktívak, keletkezésük mértékének meghatározásához stabil végtermékek kimutatását tűztük ki célul. Az egyik jelölés a lipidek peroxidációja során többszörösen telítetlen zsírsavakból képződő reaktív aldehid, a 4-hidroxi-2-nonenal (4HNE) származékát mutatta ki. Mind állatmodellen, mind humán vizsgálatok során igazolták, hogy a 4HNE-nak mennyisége jelentősen megnő SIRS-ben, szepszisben és ARDS-ben. Káros hatással van a mikrovaszkulaturára, fokozza a permeabilitást a tüdőben. Azonban nemcsak az oxidatív stressz markere, szerepe van jelátviteli utak módosításában, sőt a mitokondriális diszfunkció létrejöttében. A stabil melléktermék, amit a reaktív nitrogén származékok okozta károsodás mértékének kimutatására használtunk, a nitrotirozin volt. Ez a tirozin oldalláncok peroxinitirittel történő reakciója során létrejövő irreverzibilis módosulása. Vizsgálatunk során mindkét esetben intenzív jelölődést észleltünk LPS kezelés hatására mind a tüdő endotél-, mind az epitelsejtjeiben vad típusú állatok esetén, azonban sokkal gyengébb volt a KO állatokban, (ami egyértelműen csökkent ROS és RNS képződést bizonyít.) Eredményeink arra utalnak, hogy a CypD elvesztése nagymértékben

csökkenti az ROS és RNS termelést az LPS kezelés után, ennek következtében jóval enyhébbek a hisztológiai és szubcelluláris elváltozások, valamint az oxidatív szövetkárosodás az egerek tüdejében. A fokozott ROS termelés hozzájárul az inflammatorikus „fenotípus” kialakulásához, melyben kiemelkedő szerepet játszanak a tüdő sejtjei által szekretált 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. Állatmodellek esetén is kiemelkedően fontos kritérium a proinflammatorikus citokinek kimutatása az ALI igazolására. 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 több munkacsoport is igazolta. Mind egészséges, mind TNF-receptor asszociált periódikus láz szindrómában szenvedő betegek sejtjeiben sikerült megakadályozni a mitokondriális ROS előállítás gátlásával az inflammatorikus citokinek felszabadulását. Mikroglia sejtekben sikerült visszaszorítani az LPS hatásra bekövetkező proinflammatorikus citokin produkciót a mitokondriális ROS felszabadulás kémiai gátlásával. 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, és ezáltal megakadályozza a neutrofil granulociták tüdőbe történő migrációját. Az irodalomban megtalálható eredményekből kitűnik, hogy szemben a proinflammatorikus citokinekkel, 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. Ez az eredmény alátámasztja azt az feltevésünket, miszerint a CypD hiányos állatok tüdejében észlelt enyhébb károsodás és gyulladásos 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 MAPKKK-ként is funkcionálnak. Az irodalmi adatokkal 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. Ez a jelenség magyarázható egyrészt a MAPK-k eltérő ROS érzékenységgel. Az ismert, hogy a ROS-k mindhárom MAPK aktivitását fokozni képesek. Hatásukat kifejtethetik a fehérjék oldalláncainak direkt módosítása révén, de a reguláció elsősorban különböző „upstream” molekulák közvetítése által valósul meg. 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. A p38 és ERK oxidatív szabályozása nem teljesen tisztázott, de szerepe lehet benne a szintén redoxérzékeny IKK-knak is. *Vizsgálatunk alapján a CypD hiánya a ROS-k MAPK-kra gyakorolt hatását p38- és ERK-függő, de JNK-független módon befolyásolja.* A reaktív oxigén származékok a MAPK szignáltranszdukció egyes elemeinek módosításán túl, egy direkt regulátoros fehérjére, a MAPK-kat negatívan szabályozó MKP-1-re is gátló hatást fejtenek ki. A nukleáris lokalizációjú MKP-1 mindhárom MAPK-t képes inaktiválni, hatásának mértéke azonban igen eltérő lehet az egyes sejttípusok tekintetében. Szerepét az inflammatorikus folyamatok negatív szabályozásában számos vizsgálat alátámasztja. Expresszióját mind a JNK, mind az IL10 fokozza. Vizsgálatunk során fokozódott az MKP-1 mennyisége endotoxémiát követően a tüdőben, azonban kísérleteink során a CypD hiányos állatokban 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. A MAPK-k mellett egy másik kináz, az Akt is részt vesz a TLR4 jelátvitelben. Eredményeinkhez hasonlóan korábbi vizsgálatok során is azt találták, hogy az LPS tüdőben fokozza az Akt foszforiláltságát. Az Akt a p38 MAPK-n keresztül gyakorol pozitív hatást az NF- κ B-re. Ezt tükrözi a két kináz általunk észlelt igen hasonló foszforiláltsági mintázata. CypD hiányos állatokban LPS kezelést követően jelentősen alacsonyabb volt az Akt foszforiláltsági szintje a vad típusú egerekhez képest, amit elsősorban a mitokondriális ROS termeléssel és az Akt redoxszenzitív szabályozásával magyarázunk. 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. Az oxidatív stressz a redoxszenzitív kinázok működésén

keresztül kihat a inflammatorikus gének expresszióját irányító NF- κ B kanonikus aktivációjára is. A vad típusú állatokhoz képest a KO egerekben jelentősen alacsonyabb volt az NF- κ B és a regulációjában szerepet játszó I κ B foszforilációja. Az NF- κ B CypD-hiány esetén fellépő funkcionális gátlását az általa regulált inflammatorikus gének, így a CD14, IL-1 α , Cxcl2, IFN- γ , iNOS és TNF α expressziójának meghatározásával is igazoltuk. A fentiekből arra következtettünk, hogy KO állatokban az I κ B α 32. szerinen történő, IKK-komplex által végzett gyengébb foszforilációjaért 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.

Vizsgálatunk eredményei azt támasztják alá, hogy a CypD-hiányból adódó mérsékelt oxidatív környezet hatására a redoxérzékeny jelátviteli résztvevők, a p38, az ERK és az Akt aktivitása mérséklődött. Ezek 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.

5. 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 inaktíváló 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.

6. 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, Fónai 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 poszterek:

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 hármás 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 ciklofillin D szerepe az LPS által indukált gyulladási 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 gyulladási 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 fertőzés 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, Tökés-Füzesi M, Ottóffy G.

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

7. 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 végsőkig 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 támogatott munkám során.

Külön köszönöm közvetlen kollégáimnak és barátaimnak, Dr. Kálmán Nikolettnek, Dr. Antus Csengének, Dr. Tucsek Zsuzsannának, Dr. Jakus Péternek és Dr. Radnai Balásznak 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.