

A hősoikkfehérje 72 szerepe gyulladásoos kórképekben

Doktori értekezés

Dr. Gál Krisztina

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Müller Veronika egyetemi docens, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Dérfalvi Beáta egyetemi docens, Ph.D.
Dr. Antus Balázs osztályvezető főorvos, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke:
Dr. Szabó András egyetemi tanár, MTA doktora

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Novák Zoltán egyetemi docens, Ph.D.
Dr. Szilasi Mária egyetemi tanár, Ph.D.
Dr. Constantin Tamás egyetemi adjunktus, Ph.D.

Budapest
2012

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	2
1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
2. BEVEZETÉS	7
2.1. <i>A hősokkfehérjék</i>	7
2.2. <i>Krónikus obszuktív tüdőbetegség (COPD), mint népbetegség – a dohányzás hatásai</i>	14
2.3 <i>Szteroidok hatásmechanizmusa – a szteroid és HSP72 kapcsolata</i>	18
2.4. <i>A szteroid és dohányfüst kapcsolata</i>	20
2.5. <i>A tüdőrák</i>	22
2.6. <i>A cöliákia - gluténérzékenység</i>	24
3. CÉLKITŰZÉSEINK	26
4. MÓDSZEREK	27
4.1. <i>Tüdő alveoláris sejtek vizsgálata</i>	27
4.1.1 <i>In vitro sejttenyésztés</i>	27
4.1.2 <i>Dohányfüstkivonat készítése</i>	28
4.1.3 <i>Kezelési csoportok</i>	30
4.1.4 <i>Sejtszám meghatározása</i>	31
4.1.5 <i>Az apoptózis és a nekrozis meghatározása áramlási citométerrel</i>	31
4.1.6 <i>Az alveoláris epitelsejtek intracelluláris HSP72 fehérje szintjének FACS vizsgálata</i>	32
4.1.7 <i>Valós idejű (RT)-PCR vizsgálatok</i>	33
4.1.8 <i>HSP72 csendesítő transzfekció</i>	34
4.1.9 <i>Statisztika</i>	35

<i>4.2. SCLC-ben szenvedő betegek HSP72 (HSPA1B A(1267)G) polimorfizmusának vizsgálata</i>	35
<i>4.2.1. Betegek</i>	35
4.2.2. Demográfiai adatok	35
4.2.3. Egészséges alanyok	36
4.2.4. Immunhisztokémia	37
4.2.5. Minták és genotipizálás:	37
4.2.6. Statisztikai analízis	37
<i>4.3. Duodenum biopsziák HSP72 vizsgálata</i>	39
4.3.1 Betegek	39
4.3.2 RT-PCR vizsgálatok	40
4.3.3 Fehérje izolálás és Western blot	42
4.3.4 Immunfluoreszcens festés	43
4.3.5 Statisztikai analízis	43
5. EREDMÉNYEINK	44
<i>5.1. Alveoláris epitélsejtek in vitro vizsgálata</i>	44
5.1.1 Sejtszám	44
5.1.2 Apoptózis	45
5.1.3 HSP72 mRNS és fehérje expresszió	47
5.1. 5 „Csendesítő” transzfekciót követően észlelt HSP72 expresszió, valamint apoptózis	51
<i>5.2. A SCLC-ben szenvedők HSP72 polimorfizmus vizsgálata</i>	54
<i>5.3. A duodenum minták vizsgálata</i>	58
5.2.1 HSP72 mRNS expresszió a duodenum nyálkahártyában	58
5.2.2 HSP72 fehérje expresszió a duodenum nyálkahártyában	59
5.2.3 HSP72 lokalizációja a duodenum nyálkahártyában	60
6. MEGBESZÉLÉS	62
<i>6.1. A dohányfüst és szteroid hatása a tüdő epitélsejtjeire</i>	62

<i>6.2. A tüdő alveoláris epitelsejtjeinek HSP72 szintje a noxák következtében, lehetséges szerepei</i>	63
<i>6.3. A SCLC-ben szenvedők HSP72 polimorfizmus vizsgálata</i>	66
<i>6.4. A cöliákias gyermekek duodenum mintájának HSP72 expressziója</i>	69
<i>6.5. HSP72 és toll-like receptorok (TLR) összefüggése</i>	70
7. KÖVETKEZTETÉSEK	71
8. ÖSSZEFOGLALÁS	73
SUMMARY	74
9. IRODALOMJEGYZÉK	75
10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	85
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	87

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

HSP	hősokkfehérje
HSP70/60/90	70/60/90 kDa molekulásúlyú hősokkfehérje
HSP72	indukálható HSP70
HSE	hősokk elem
HSF	hősokk faktor
ATP	adenozin-trifoszfát
ADP	adenozin-difoszfát
JNK	c-Jun N-terminalis kináz
APC	antigénprezentáló sejt
MHC	major histocompatibility complex
Ag	antigén
TLR	toll-like receptor
TLR-2/4	toll-like receptor-2/4
IBD	gyulladásos bélbetegségek
GR	glukokortikoid receptor
eHSP72	extracelluláris HSP72
IFN- γ	interferon-gamma
IL-2/4/5/10/15	interleukin-2/4/5/10/15
AR	adrenerg receptor
TCR	T-sejt receptor
Th1/2	T-helper sejt 1/2 típus
Tc1/2	citotoxikus T-sejt 1/2 típus
COPD	krónikus obstruktív tüdőbetegség
WHO	Egészségügyi Világszervezet
GOLD	Global Initiative for chronic Obstructive Lung Disease
FEV1	az erőltetett kilégzési vitálkapacitás első másodpercre eső része
FVC	forszírozott vitálkapacitás
DNS	dexoxyribonukleinsav

β2-AR	béta2- adrenerg receptor
HDAC	hiszton-deacetiláz
HAC	hiszton-acetiláz
NF-κB	nukleáris faktor -κB
TNF-α	tumornekrózis faktor alfa
SCLC	kissejtes tüdőrák
NSCLC	nem kissejtes tüdőrák
IEL	intraepiteliális limfocita
DMEM	Dulbecco's módosított Eagle's medium
FBS	fötális borjúszérum
HPLC-MS	nagy nyomású folyadékkromatográfiás tömegspektrométer
mRNS	messenger ribonukleinsav
RT-PCR	real-time (valós idejű) polimeráz láncreakció
FACS	flowcitometric (áramlási citometer)
siRNS	silencing (csendesítő) ribonukleinsav
FSC	forward scatter
SSC	side scatter
DFK	dohányfüstkivonat
DEX	dexametazon
DEX(0.1)	0.1 μM-os dexametazon koncentráció
DEX(1)	1 μM-os dexametazon koncentráció
DEX(10)	10 μM-os dexametazon koncentráció
ZO	zona occludens
BAÖS	tüdő bronchoalveoláris össejt

2. BEVEZETÉS

2.1. A hősokkfehérjék

A hősokkfehérjék minden élő sejt működésében alapvető szerepet játszanak [1]. Olyan konzervatív fehérjék, amelyek az evolúció hosszú évezredei alatt is megőrizték szerkezetüket. A hősokkfehérjék - vagy stresszfehérjék - védőfunkcióik révén alapvető szerepet töltenek be a sejtek túlélésében. Mint molekuláris csaperonok – stresszhatás nélkül is - minden sejtben jelen vannak, expresszálódnak. Fontos szerepük van a sejt egészséges fehérje háztartásában, a sejtciklusban, a differenciációban, a sejtnövekedésben, az embrionális fejlődésben. A fehérjék szerkezetének megóvása által transzport folyamatokban, az apoptózis folyamatában vesznek részt, enzimek (tirozin kinázok), receptorok (glukokortikoid receptor) segítői. A célmolekulához való kötődésükkel aktiválják a fehérjéket, melyek ez által képesek lesznek feladatukat ellátni. Legfőbb védő funkciójuk, hogy felismerik a sérült, összecsapzódott fehérje molekulákat, megpróbálják a helyes konfigurációt visszaállítani. Amennyiben a sérülés visszafordíthatatlan, a protein degradációban segédkeznek. Különböző stresszhatásra (nem csak környezeti stresszhatások, mint a hő, oxidáns anyagok, nehézfémek, hanem patofiziológiai hatások, mint toxinok, bakteriális lipopoliszacharidok, stb.) indukálódnak, mennyiségük, expressziójuk fokozódik.

Először 1962-ben Ritossa tette közzé, hogy *Drosophilakban* stressz hatására megnő egy molekula expressziója. Később, 1974-ben szintén *Drosophilakban* izolálták először a hő hatására indukálódó stresszproteint. Csak az 1980-as évek elején fedezték fel a család több tagját, és dajkafehérje szerepüket.

A hősokkfehérjéket jellegzetes molekulatömegük alapján osztályozzák. Legismertebb képviselői a 110, 90, 70 és 60 kDa molekulásúlyú családok (lásd 1. táblázat). Minden családnak létezik több izoformája, melyek a subcelluláris lokalizációban különböznek. Például a 70 kDa molekulásúlyú hősokkfehérjéknek (HSP70-nek) legalább nyolc különböző tagja ismert a sejtben belüli elhelyezkedés szerint a citoplazmában, sejtmagban, lizoszómában, mitokondriumban, illetve az endoplazmatikus retikulumban.

Az egyes családtagoknak létezik konstitutívan kifejeződő, valamint különböző ingerekre indukálódó formája is.

1. Táblázat A hősokkfehérjék családja [2]

Eukaryota család	A gén jelölése	A gén neve	A gén lokalizációja	HSP lokalizációja
HSP110	HSP105A	110 kDa hősokkfehérje	13q12.3	citoszol/mag
	HSP105B	110 kDa hősokkfehérje	4q28	
	APG-1	ozmotikus stresszfehérje 94		
	APG-2/ HSPA4	70 kDa hősokkfehérje 4	5q31.1-q31.2	
HSP90	HSPCA	90 kDa hősokkfehérje 1, a	14q32.3	citoszol/mag
	HSPCB	90 kDa hősokkfehérje 1, b	6p12 (4q21-q25, 15pter-q21)	
HSP70	TRAP1	hősokkfehérje 75	16p13.3	mitochondrium
	HSPA1A	70 kDa hősokkfehérje 1A	6p21.3	citoszol/mag
	HSPA1B	70 kDa hősokkfehérje 1B	6p21.3	
	HSPA1L	70 kDa hősokkfehérje- szerű 1	6p21.3	citoszol/mag
	HSPA2	70 kDa hősokkfehérje 2	14q24.1	citoszol/mag
	HSPA3	70 kDa hősokkfehérje 3	21	citoszol/mag
	HSPA5	70 kDa hősokkfehérje 5 (glükózregulált fehérje, 78 kDa, grp78, BiP)	9q33-q34.1 -	endoplazmás retikulum
	HSPA6	70 kDa hősokkfehérje 6	1cen-qter	citoszol/mag
	HSPA7	70 kDa hősokkfehérje 7	1q23.1	citoszol/mag
	HSPA8	70 kDa hősokkfehérje (HSP70)	11q23.3-q25	citoszol/mag
	HSPA9A	70 kDa hősokkfehérje 9A (mortalin-1)	?	citoszol/mag
HSPA9B	70 kDa hősokkfehérje 9B (mortalin-2)	5q31.1	citoszol/mag	
HSP60	HSPD1	60 kDa hősokkfehérje (chaperonin)	12q12-13.2	mitochondrium, citoszol?

A HSP-k szintézisét a transzkripció faktorok egy specifikus fajtája, a hősokk faktorok (HSF-ok) szabályozzák. Míg gerinctelen állatokban csak egyféle HSF van, addig a gerincesekben ezidáig négy tagját ismerjük, emberi sejtekben 3 tagját mutatták ki, de csak kettő szerepe tisztázott. A HSF-ok a stresszválasz mellett a normál sejtműködés -

például sejtciklus, embrionális fejlődés, differenciáció - során is szerepet játszanak a HSP gének expressziójának szabályozásában [3]. Az elsődleges, konstitutívan kifejeződő HSF, ami a HSP expresszióját kontrollálja a HSF-1. Ezt a transzkripciósfaktort Hsp90/Hsp70 tartalmú csaperon komplexek tartják monomerként, inaktív formában, a citoplazmában. Stressz hatására, ami lehet akár hő, akár hipoxia, megnő a károsodott fehérjék mennyisége, melyek miatt a dajkafehérjék leválnak a HSF-1-ről, ami ezt követően trimerizálódik és foszforilálódik. Az aktivált HSF-1 ezután a magba vándorol, ahol a stresszválasz gének egy a promoter régiójában levő speciális szakaszához, a hőszokk elemekhez (HSE-hez) kapcsolódik, mely következtében megkezdődik a HSP-k transzkripciója és szintézise [4].

HSF-2 csak a fejlődés specifikus stádiumaiban aktiválódik, szerepét eddig csak erythroleukémia sejtvonalban írták le. A HSF4 szövet-specifikus módon expresszálódik, folyamatos DNS-kötő aktivitással bír, és a stressz-indukálta génexpresszió gátlójaként működik. A HSF-3 csak madarakban kimutatható.

Sun és munkatársai [5] patkány szívizomsejtekben a HSF-1 szelektív aktiválódását írták le dexametazon kezelés hatására, amely a HSP72 emelésével protektívnek bizonyult a hipoxiát követő reoxigenizációval szemben. A vizsgálatban patkány szívizomsejteket dexametazonnal kezeltek, majd mérték a HSF-ek, illetve a különböző HSP-k szintjét. Szteroid hatására csak a HSF-1 aktiválódott, a HSF-2-t nem befolyásolta a kezelés. Ennek hatására a HSP72 expressziója fokozódott, de nem volt hatással a többi HSP – a HSP60, HSP27- expressziójára.

A HSP-k legismertebb, és legtöbbet tanulmányozott képviselője - melyről még mindig intenzív kutatások folynak -, a 70 kDa-os hőszokkfehérje családba tartozó, a citoplazmában konstitutívan jelen levő HSP70, valamint ennek indukálható formája a HSP72. A HSP72 az emlős sejtek legjelentősebb, stresszre termelődő védő molekulája. Mind intra-, mind extracelluláris funkciója egyre ismertebb. A HSP70 minden élő organizmusban megtalálható. Az intracelluláris fehérjehajtogatás, sejthomeosztázis fő dajkamolekulája.

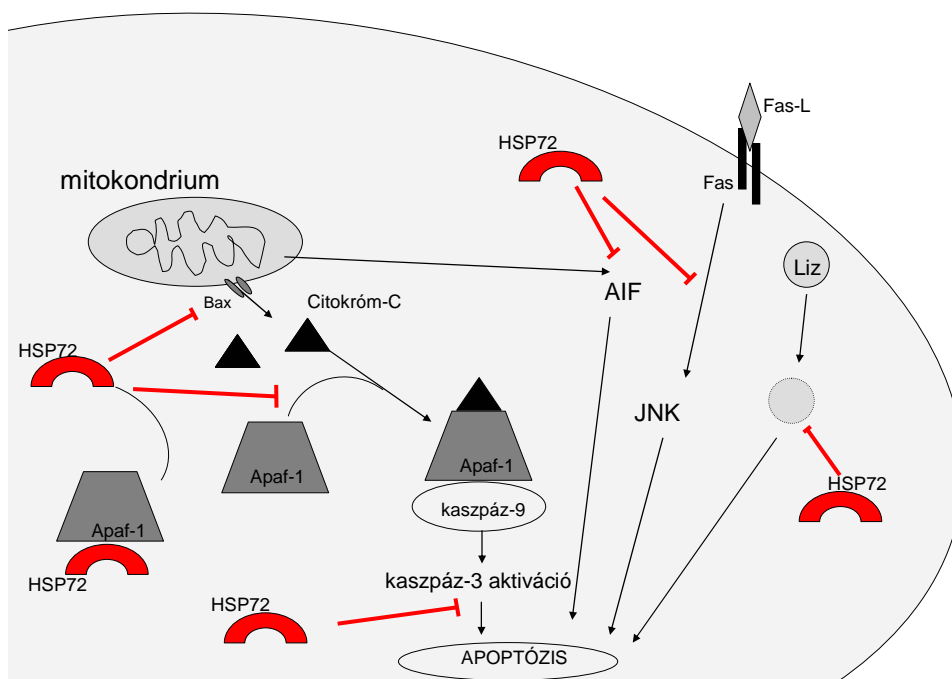
Szerkezete 3 fő részből áll:

1. N-terminális ATP kötő domén: az ATP hidrolízisekor a másik két fő doménban konformáció változás történik.

2. Szubsztrátkötő domén: semleges, hidrofób aminosavakhoz kötődik.
3. C-terminális domén: alfa-helikális szerkezetekben gazdag. A szubsztrátkötő domén „fedőjeként” működik – ha a fehérje ATP-t köt, a fedő nyitva áll, így a fehérjék hozzá tudnak kötődni a HSP70-hez, míg ADP kötés esetén a fedő zár, így a HSP70-hez nem képes fehérje kötődni.

Fő funkciói: [6]

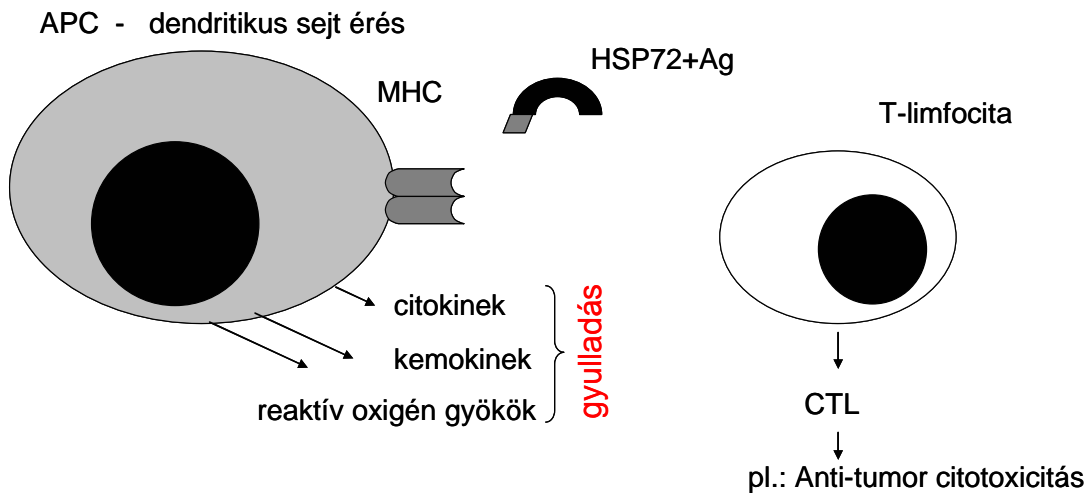
- Az intracelluláris proteinek az alapvető sejtfolymatokban és azok szabályozásában vesznek részt, ATP hasítása révén fejtik ki biokémiai hatásaikat. Megőrzik, ha kell, helyreállítják a fehérjék szerkezetét, illetve a menthetetlenül károsodott fehérjék lebomlását segítik.
- Mérséklék mind az extrinsic, mind az intrinsic apoptotikus utakat. A programozott sejthalál folyamatát több szinten gátolják [7; 8]. Premitokondriális szinten a JNK-1 kötésével a Jun-kináz aktivációját gátolják, valamint megakadályozzák a kaszpáz-8 receptor által történő aktiválódását. Megelőzik a katepszinek és más enzimek felszabadulását a lizoszómákból. Mitokondriális szinten gátolják a mitokondrium membránjának depolarizációját, azáltal, hogy megakadályozzák a Bax fehérje citoszolból a mitokondriumba történő áthelyeződését. Megakadályozzák a proapoptotikus fehérjék (AIF) felszabadulását, gátolják a cytochróm-C kiáramlást a mitokondriumból. Posztmitokondriálisan az Apaf1-hez kötődnek, így megakadályozzák az apoptoszóma kialakulását, ezáltal megelőzve a kaszpáz-aktivációt és az apoptózist (lásd 1. ábra). Human vastagbél Caco-2/bbe (C2) sejteken kimutatták, hogy a kaszpáz-9 aktivációja - ami az apoptózis egy korai kulcslépése -, hamarabb következik be, ha a sejt HSP72 expressziója alacsonyabb [9]. Ez a megfigyelés arra utal, hogy a HSP72 sejtvédő hatása nemcsak a homeosztázis fenntartásával, és a veleszületett immunválasz szabályozásával valósul meg, hanem az apoptózis gátlásán keresztül is érvényesül [10].



1. ábra A HSP72 antiapoptotikus hatása [6; 11]

A HSP72 több szinten gátolja az apoptózis folyamatát. Egyrészt premitokondriális szinten, a JNK-1 kötésével a Jun-kináz aktivációját mérsékli. Megelőzi a katepszinek és más enzimek felszabadulását a lizoszómákból. Mitokondriális szinten gátolja a mitokondrium membránjának depolarizációját, a Bax fehérje gátlásával megakadályozza a proapoptotikus fehérjék felszabadulását, gátolja a cytokróm-C kiáramlást a mitokondriumból. Posztmitokondriálisan megakadályozza az apoptozóma kialakulását, ezáltal megelőzve a kaspáz-aktivációt.

- Mint extracelluláris-, illetve sejt felszíni molekulák szerepet játszanak az immunválasz szabályozásában, részt vesznek a jelátviteli folyamatokban. Ha az intracelluláris HSP72 szint emelkedik, a HSP72 molekula megjelenik a sejtek felszínén, és a keringésben is [12]. A keringő HSP72 az antigén prezentáló sejtekhez (APC) kötődik, és stimulálja a proinflammatorikus citokinin szintézist [13], a kemokin [14] és reaktív oxigén gyökök felszabadulását [15]. Fontos szerepe lehet a tumorból származó antigén tulajdonságú molekulák immunrendszerünk felé történő prezentálásában (2. ábra).



2. ábra HSP72 és az immunitás [A szerzők engedélyével, 13; 14; 15]

A HSP-k részt vesznek a különböző, a szervezet számára idegen anyagok, antigének prezentálásban - pl.: képesek az elhalt sejtek fehérje fragmentjeinek kötésére, így azokat „bemutatják” az immunrendszernek, immunválaszt serkentenek -, ezáltal az immunrendszer működését befolyásolják, citokinek, kemokinek, reakív oxigén gyökök termelődését stimulálják.

- Számos kutatás bizonyítja, hogy a HSP72 a toll-like receptorok (TLR-ok), és egyéb más mintázat felismerő receptorok (PRR-ok) ligandja, melyek jelentős szerepet játszanak a veleszületett immunitás védekező mechanizmusaiban [16]. A HSP72 immunregulátorként működik azáltal, hogy az antigénprezentáló sejtek TLR2 és TLR4 receptoraihoz kötődik, és stimulálja a veleszületett immunválaszt. [9; 17; 18]
- A HSP-k alapvetően fontos jelentőségűek a rosszindulatú daganatok prognózisának, és a gyógyszerekre adott terápiás válasznak meghatározásában, ugyanakkor, mint lehetséges terápiás célpontok régóta a kutatások középpontjában állnak [19]. A tumorképződés folyamatában a HSP72 ellentmondásos szerepet játszik. A magas intracelluláris HSP72 szint rágcsőlkban segíti a daganatok kialakulását. Ezzel összhangban, kísérletes modellekben a HSP72 expressziójának mérséklése erősen csökkentette a tumorképződést. A HSP72 emelkedett expresszióját írták le endometriumrák,

osteosarcoma, vesesejtes rák és leukaemia esetében. A HSP72 nagymértékű expressziója emlő-, endometrium-, és gyomorrákban metasztázisokkal, rossz prognózissal, a kemo-, illetve radioterápiával szembeni rezisztenciával jár együtt. Ugyanakkor - bár a HSP72-szintek jól korrelálnak a daganat kiterjedésével osteosarcomában és vesesejtes rákban -, a fehérje kifejeződése paradox módon mégis jobb prognózishoz társul. Ezt az ellentmondást a sejtfelszíni, illetve a sejtből kikerülő HSP72 immunstimuláló hatása magyarázhatja [20].

Egyre több az adat arra vonatkozóan, hogy a HSP72-nek fontos szerepe lehet a tumor ellenes válaszban [6; 11; 21], kísérletek folynak, hogy a HSP70 molekulát felhasználják a rák elleni kezelésben [11] [22] [23]

- In vivo az extracelluláris HSP72 (eHSP72) élettani körülmények között az immunrendszer működését segíti, kóros esetekben viszont hozzájárulhat a gyulladásos betegségek exacerbációjához (pl. Alzheimer-kór, atherosclerosis, gyulladásos bélbetegségek (IBD)) [24]. Ez utóbbi feltételezés azonban további vizsgálatokat igényel, mivel a körülményektől függően az eHSP72 anti-inflammatorikus citokineket is stimulálhat [25; 26].
- A HSP72 szükséges a glukokortikoidok fehérje expressziót kiváltó hatásához is [27]. Ugyan a főszerep a HSP90-é, de HSP72 nélkül az interakció nem jöhet létre. A glukokortikoid receptor (GR) funkciójához nélkülözhetetlen a HSP90/HSP70 csaperon heterokomplex működése. A kezdeti interakció a GR és a HSP70 között elengedhetetlennek tűnik a HSP90-es heterokomplex későbbi működéséhez, mely során a GR szteroid kötő hasadéka megnyílik [28]

Intenzív kutatások folynak azzal kapcsolatban, hogy hogyan kerülhetnek ki a hőszokkfehérjék a sejtek belsejéből, hogyan kötődhetnek vissza a sejtekhez, és mi lehet ennek a következménye; illetve az extracelluláris HSP-k (eHSP-k) milyen szerepet töltenek be ezen folyamatokban. [29; 30]. Tény, hogy mind a HSP70, mind a HSP60 jelentős mennyiségben kimutathatók a keringésben. Szabályozott szekréción utat még egyik sejt esetében sem sikerült igazolni. Több elképzelés látott napvilágot: egyrészt

lehetséges, hogy egyes exocitózissal aktívan szekretálódó molekulák „dajkáiként” passzívan jutnak az extracelluláris térbe, másrészt felmerült, hogy a sejtek nekrozisa, illetve kisebb mértékben apoptózisa révén, passzívan távoznak a sejtből. Sejtnekrozistól független HSP72-felszabadulást írtak le B-sejtekben és perifériás mononukleáris sejtekben [31]. Egyes citokinek (IFN-gamma és IL-10) a HSP72 aktív ürítését mediálják [32]. A fizikai, kémiai és pszichés stressz szimpatikus aktiváció útján, az α 1-adrenoreceptorokon (α 1-AR) hatva, az intracelluláris kalcium koncentráció növelésével a HSP72-tartalmú exoszómák ürülését válthatja ki, valamint emeli az intracelluláris HSP72-szintet is, így több HSP72 kerül az exoszómákba [33].

Ranford és munkatársai szerint a hőszokkfehérjék, mint intracelluláris stresszjelző molekulák visszanyerik ősi funkcióikat, azaz szövetről-szövetre továbbítják a stressz jelenlétét.

2.2. Krónikus obstruktív tüdőbetegség (COPD), mint népbetegség – a dohányzás hatásai

A krónikus obstruktív tüdőbetegség (COPD) jellemzője, hogy fennálltakor egyidőben van jelen krónikus légúti gyulladás és emfizéma. [34]. Az emelkedő incidencia miatt, az Egészségügyi Világszervezet (WHO) 2001-ben alakította ki először álláspontját a betegséggel kapcsolatban. A Global Initiative for Chronic Obstructive Pulmonary Disease (GOLD) a népbetegség diagnózisának, kialakulásának, besorolásának és kezelésének lehetőségeit összegzi a rendelkezésre álló ismeretek alapján, mely évente frissítésre kerül.

A GOLD definíció szerint a COPD olyan tüdőbetegség, melyet korlátozott légúti áramlás jellemez. Az asthmával ellentétben, ez a légúti szűkület nem reverzibilis, hanem progresszív jellegű, melyet abnormális, krónikus légúti gyulladás okoz. Legfőbb kóroki tényező a gyulladás kialakulásában a dohányzás, a dohányfüstben jelen levő ártalmas részecskék.

A GOLD és a hazai ajánlás a betegség súlyosságát a forszírozott kilégzési térfogat 1. másodperce (FEV1), illetve a forszírozott vitálkapacitás (FVC) arányával és mértékével jellemzik.

COPD-ben egyidőben több, különböző patológiai elváltozást is találhatunk, hiszen a három fő morfológiai forma, a krónikus obstruktív bronchitis, az emfizéma, illetve az obstruktív bronchiolitis, különböző mértékben vesz részt a folyamatban.

COPD kialakulásában a gyulladás kulcsfontosságú faktor, de nem az egyetlen kiváltó ok. Neutrofil- és makrofág-mediálta gyulladásos reakciókat „egészséges” dohányosokban is kimutattak már, ennek ellenére nem minden dohányosban alakul ki a betegség. Ám a beteg, COPD klinikai tüneteit mutató dohányosokban a gyulladásos válasz fokozottabb a nem beteg dohányosokhoz képest. Ez felveti a genetikai faktorok, virális fertőzések és egyéb, még nem ismert okok lehetséges szerepét a betegség kialakulásában.

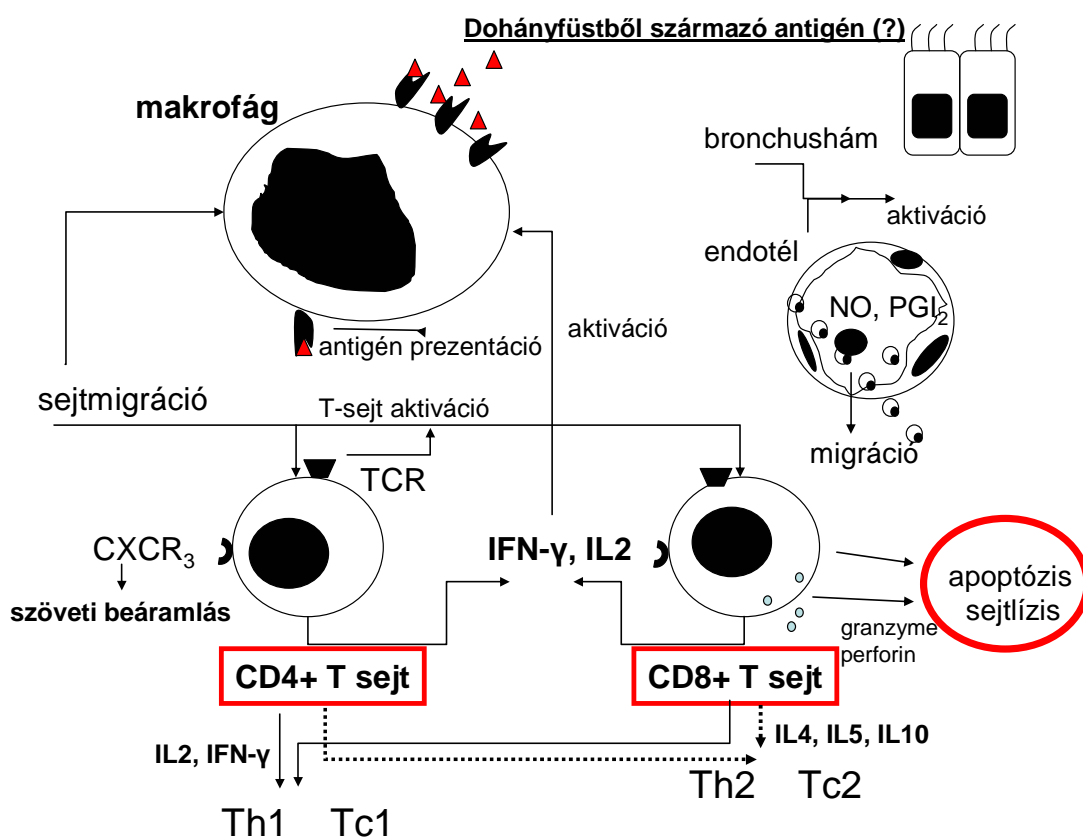
Egyre több bizonyíték szól amellett, hogy az apoptózisnak, azaz a programozott sejthalátnak fontos szerepe lehet a COPD patogenezisében [35]. A betegek tüdőszövetében, illetve légutaiban több apoptotikus sejtet lehet látni az egészséges dohányzó, illetve az egészséges nem dohányzókéhoz képest. Elképzelhető, hogy az alveoláris fal roncsolódás, és az emfizéma kialakulása összefügg a megnövekedett apoptózissal. Ez részben az egyébként jól működő apoptotikus sejt clearance károsodása miatt is lehetséges. A dohányfüst által indukált apoptózis részletesebb tanulmányozásával közelebb kerülhetnénk a COPD patogenezisének megértéséhez is.

Nem teljesen tisztázott még, hogy a dohányfüst, illetve más inhalált részecskék, hogyan károsítják a tüdőt. A legfontosabb ismert folyamatok a következők:

- a dohányfüstben levő szabadgyökök által indukált oxidatív folyamatok károsítják a tüdősejteket,
- a dohányfüst, valamint az oxigén szabadgyökök által a proteáz-antiproteáz egyensúly a proteázok felé tolódik el, így azok károsítják a tüdőszövetet,
- dohányfüst hatására nő a mucosalis permeabilitás, ezzel párhuzamosan krónikus mucus-hiperszekréció alakul ki,
- a dohányfüstben levő idegennek felismert, „antigén” részecskék által fenntartott krónikus gyulladás során fokozott citokin termelés igazolható (lásd 3. ábra!) [36].

COPD-ben a légúti gyulladás legfontosabb effektorai a neutrofil granulociták és a makrofágok. Egyre több adat szól arról, hogy inkább a citotoxikus, CD8+, és kisebb

mértékben a CD4+ helper T-sejtek aktiválódnak dohányfüst hatására. A T-sejtek citokin szintézisben megnyilvánuló – egyéenként változó - irányultsága (Tc1/Tc2 és Th1/Th2) döntő jelentőségű abban, hogy krónikus dohányfüst expozíció hatására a dohányosok közül kiben alakul ki a betegség.



3. ábra A dohányfüst lehetséges hatása a tüdőben aktiválódó makrofágok és T-sejtek kölcsönhatásai [A szerzők engedélyével, 36].

COPD-ben jellegzetesen megnő a bronchusnyálkahártyában a CD8+ T-sejtek és a makrofágok aránya. A dohányfüstből származó, leginkább antigén (Ag) tulajdonságú molekulák, amelyek beindítják az immunfolyamatokat a makrofágok aktivációja által, a CD8+ T-sejteket aktiválva apoptózishoz/nekrózishoz vezetnek. A naiv T-sejtek nem állomásoznak sokáig a tüdőben, ám antigén hatására létrejövő aktivációjukkor az antigént prezentáló sejtben akkumulálódnak. Sejtfelszíni markereik alapján ekkor vagy CD4+, vagy CD8+ T-sejtek lehetnek, melyeknek főleg az általuk termelt fő citokinjeik alapján különíthetők el Tc1/Th1, illetve Tc2/Th2 sejtekre. Dohányfüst hatására főleg a Tc1/Th1 populáció szaporodik el, melyek jellegzetesen IFN- γ -t, IL-2-t termelnek, mely

hatására a makrofág aktiváció fokozódik, ezáltal a folyamat tovább erősödik. A citotoxikus T-sejtek a célsejtek lízisét két módon hozhatják létre: egyrészt pórust létrehozó molekulák (perforin, granzyme) szekréciójával, másrészt az apoptózis indukciójával.

A cigaretta napjaink talán legveszélyesebb és legtöbb halálos áldozatot követelő legális élvezeti szere [37]. A dohányzás leggyakrabban szív- és tüdőbetegségekhez vezet, kóroki szerepe vitathatatlan a COPD, valamint a tüdőrák kialakulásában. Egyre több adat szól amellett, hogy összefüggés van a COPD – főleg az emfizémás forma - és a tüdőrák között, melynek legfőbb oka a közös rizikófaktor, a dohányzás [38; 39; 40].

Jelenleg a világon évente ötmillió - egy Finnországnyi - ember hal meg valamilyen dohányzás okozta megbetegedésben. Magyarország a világ vezető dohányfogyasztói közé tartozik, a világon a harmadik.

A dohányzás mind pszichés, mind farmakológiai függőséget okoz élvezőinél, az egyik legerősebb pszichoaktív szer. Friss statisztikai adatok szerint Magyarországon a felnőtt lakosság 33-34 %-a dohányzik, melyből a férfiak aránya még nagyobb, bár az utóbbi években a nők aránya folyamatosan emelkedik. Évente országunkban 28000 fő halálát lehet összefüggésbe hozni a dohányzással: 19 percenként hal meg egy ember e káros szenvedély következtében. Statisztikai adatok szerint a magyar fiatalok 17,9 éves korban válnak fogyasztóvá. A dohányzás nemcsak az aktív élvezője számára költséges szenvedély, hanem áttételesen az egész gazdaság számára többlet terhet jelent, hisz a betegségből adódóan csökken az aktív, termelő munkaerő, ugyanakkor nőnek az ápolási költségek.

A dohányzás visszaszorítása érdekében a világon, és országosan is több dohányzásellenes program indult az elmúlt évtizedben. Ez egyik ilyen nagyszabású, a WHO által indított kampány a HELP program volt, melyet 27 Európai Unió országban fogadtak el, és csatlakoztak. Eredményeképp 4 év alatt valamelyest sikerült csökkenteni a dohányzó fiatalok számát.

A másik kezdeményezés 2007-ben indult az Európai Parlamentből a „Dohányfüstmentes Európáért” mozgalom, a DENAT program.

Oktatási intézményekben, sőt már óvodákban tartott előadásokkal, játékos vetélkedőkkel, dohányreklámok tiltásával – a reklámtörvény módosításával, különböző ösztönző kampányokkal („Hagyd abba és nyersz!”, „dohányfüst mentes osztályok”), a dohánydobozok elrémisztő címkézéseivel, a nem dohányzók fokozottabb védelme érdekében hozott jogszabály-változtatásokkal (dohányzás tilalma éttermekben, munkahelyen kijelölt dohányzóhelyek, nagyobb tömegeket érintő helyeken, például buszmegállóknál a dohányzás tiltása) igyekeznek mind az aktív, mind a passzív dohányzás mértékét csökkenteni.

Országosan több tüdőgyógyászati szakrendelésen indultak a leszoktatást segítő programok, melyek a szakmai irányelveknek megfelelően segítik a leszokni vágyó dohányfüggő pácienseket.

Magyarországon 2012. január elsején lépett hatályba a nemdohányzók védelméről szóló törvény, mely tiltja a dohányzást a zárt közforgalmú helyeken.

2.3 Szteroidok hatásmechanizmusa – a szteroid és HSP72 kapcsolata

A szteroidok a tüdőbetegségek kezelésében gyakran alkalmazott készítmények ám pontos, a tüdő epitéliumára ható gyulladáscsökkentő mechanizmusuk nem ismert. Tény, hogy amíg a legtöbb asztmás beteg jól reagál a szteroid kezelésre, dohányzó asztmások és a COPD-s betegek többsége szteroid kezelésre általában nem adnak megfelelő terápiás választ. Míg a légúti gyulladás szteroidokra nem reagál megfelelően, addig COPD-ben alkalmazott inhalatív szteroidok protektív hatásúak tüdőrák kialakulásával szemben [41; 42].

Intenzív kutatások folynak jelenleg is, amelyek a szteroidok pontos, molekuláris szintű hatását vizsgálják. A légutakban a glukokortikoidok egyrészt csökkentik nyákszekréciót, másrészt gyulladásgátló hatásúak, mely hatás leginkább a GR által közvetített [43]. A GR a ligand által regulált nukleáris receptor szupercsaládba tartozik, génje az 5. kromoszóma rövid karján található (5q31-32), és 9 exonból áll. A GR receptor gén promotor régiója több kötőhelyet tartalmaz különböző nukleáris faktoroknak (NF), mint például az NF- κ B-nek is. Egy gén termékének alternatív hasítása során keletkezik a két különböző GR alegység: a GR- α és a GR- β . Ez a két fehérje csak a karboxi-terminális régióban különbözik egymástól – és ez az, ami

meghatározza a szteroidhoz való kötődésüket. Az elmúlt években új GR izoformákat fedeztek fel, melyek sejtbeni eloszlásukban különböznek.

A GR- α tulajdonképpen egy hormon szenzitív transzkripciós faktor. Szteroid hiányában, a citoplazmában található csaperonokat is tartalmazó komplexben, ami megakadályozza a magba történő transzlokációját. Amikor azonban szteroidot köt, bejut a magba, és dimereket alkotva a célgének promoter régiójába kötődik. Legjobban tanulmányozott hatása a proinflammatorikus – a gyulladásban szerepet játszó - gének átíródásának gátlása, mely nagyrészt az NF- κ B kötésével jön létre.

A GR- β a GR- α negatív szabályozójaként működik. Főleg gyulladásos sejtekben mutatható ki, de légúti epitelsejtekben is megtalálható.

A GR működéséhez kell a HSP apparátus (a HSP90/HSP72-heterokomplex), amely megnyitja az inaktivált receptor ligand kötő hasadékát, előkészítve így a receptort a szteroid molekula fogadására. Ezt követően történhet meg a dimerizáció, és a komplexum intracellulárisan a DNS molekula megfelelő helyére kötődik, így irányítva a gének átíródását [44; 45]

A GR sejtmagba történő transzlokációját a GR foszforilációja is befolyásolja [46]. A β 2-AR-on keresztül a β 2-agonisták megváltoztathatják GR működését a foszforiláltság módosítása révén. Ugyanakkor a glukokortikoidok is módosítják a β 2-AR-ok működését: egyrészt az expressziójuk növelése révén, másrészt a G-protein- β 2-AR kapcsolat visszaállításnak segítségével, valamint a β 2-AR downregulációjának gátlásával.

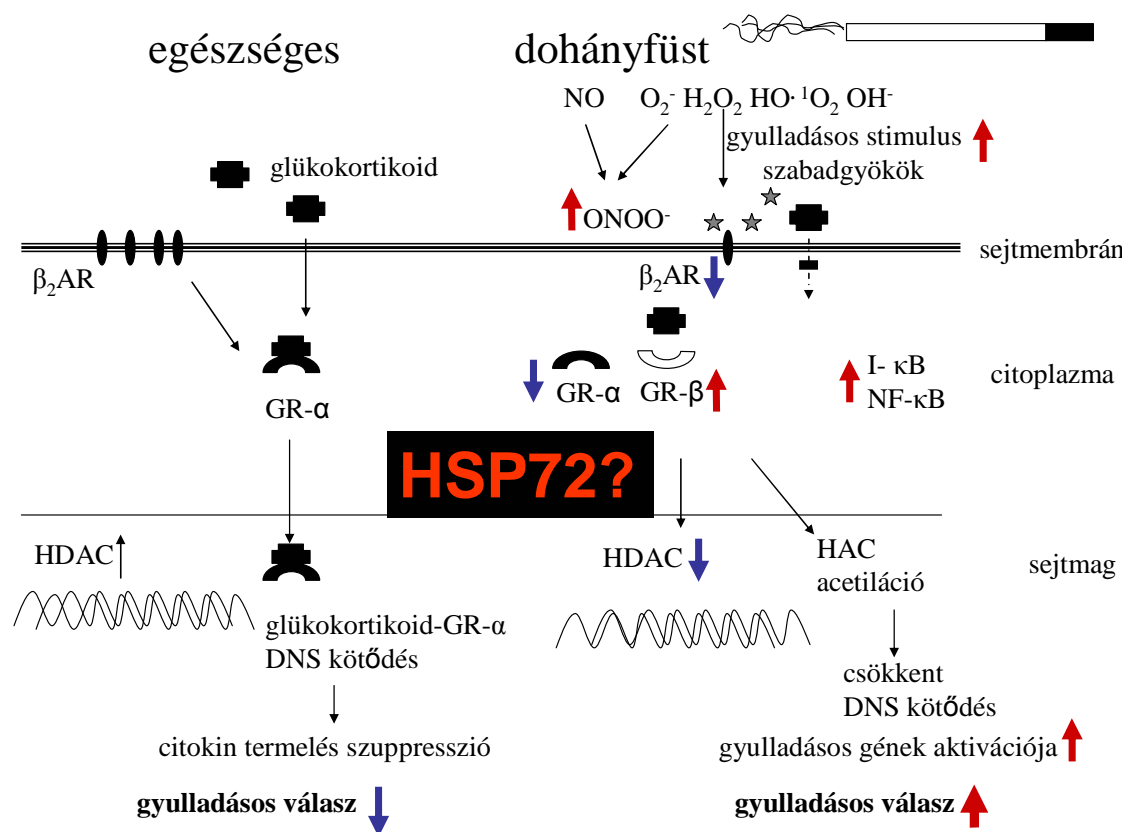
2.4. A szteroid és dohányfüst kapcsolata

Asthmásoknál ismert, hogy dohányzás hatására csökken a beállított kezelés effektivitása. Sok eredmény szerint a dohányzás állhat a COPD-ben jellegzetes szteroid-rezisztencia hátterében is [44; 45]. Cigarettafüst hatására egyrészt nő a mucos szekréciója, ezáltal csökken a szteroid légúti penetrációja. Invernizzi és munkatársai [47] kimutatták, hogy a gyógyszer molekulák, és a dohányfüstben lévő részecskék interakciója folytán megváltozik a szteroidok aerodinamikai tulajdonsága, nő a részecskeméret, ezáltal csökken a tüdődepozíció.

Ismert, hogy egészségesekben a $\beta 2$ agonista hatására az AR-on keresztül nő a GR nukleáris transzlokációja és a gyulladáshoz citokinek transzkripció gátlása. Rider és munkacsoportja tüdő epitelsejteken (A549) és bronchiális sejteken (BEAS-2B) kimutatta, hogy szteroid és hosszú hatású $\beta 2$ -AR agonista kezelés együttes alkalmazása hatásos lehet a COPD-ben ismert szteroid rezisztencia megszüntetésében [46]. A dohányzás hatására aktiválódott citotoxikus CD8+ T-sejtek TGF- β termelődése fokozódik, ezáltal csökken a $\beta 2$ -AR-ok denzitása a limfocitákon.

Részben a fenti folyamatok, valamint a dohányfüstben jelen levő citotoxikus reaktív oxigénradikálok hatására csökken a GR ligandkötő képessége, illetve megnő az inaktív GR aránya. Ugyanakkor csökken a GR ligand iránti affinitása is.

A glukokortikoidok csak megfelelő hiszton-deacetiláz (HDAC) enzimműködés mellett képesek a funkciójuk maximális betöltésére. A dohányzás jelentősen csökkenti a HDAC-2 aktivitását, ami szintén hozzájárulhat a GR csökkent DNS kötődéséhez, az észlelt glukokortikoid rezisztenciához [45].



4. ábra Dohányfüst hatása a tüdő epitélsejtjeiben – a légúti gyulladás – szteroid rezisztencia lehetséges mechanizmusa [44; 45]

Egészséges, nem dohányosok tüdejében a β₂-AR-ok ko-stimuláns hatása révén a GR aktív, α-alegységének aránya magas, ezáltal a GR a magban a megfelelő DNS szakaszhoz kötődik, ami következtében különböző gyulladásos gének átíródása gátlódik, a gyulladásos válasz mérséklődik.

Dohányfüst hatására megnő a szabadgyökök száma, ez csökkenti a tüdő epitélsejtjeiben a β₂-AR-ok szintjét. A GR aktív, alfa alegységének expresszióját csökkenti, míg az inaktív béta alegységét növeli. Egyúttal nő a NF-κB szintje, mely a gyulladásos mediátorok fokozott szintéziséhez vezet. A dohányfüst a hiszton acetilációt fokozza, ami által a GR kötődését is akadályozza DNS-hez. Összességében nő a gyulladásos gének aktivációja és a gyulladásos válasz.

2.5. A tüdőrák

COPD-s betegekben a tüdőrák előfordulási gyakorisága is megnő, egyes irodalmi adatok szerint 4.5-szeresére [48]. A két kórállapot kialakulásában igazoltan a dohányzás a fő közös patogenetikai faktor. A két betegség patomechanizmusában azonban jelentős eltérések igazolhatók, hisz míg a tüdőrák kontrollálatlan sejtszaporodás eredményeként alakul ki, a COPD-ben a gyulladás-mediálta légúti destrukció és sejthalál a jellemző. Mégis kell, hogy legyen összefüggés a két betegség között, hisz a tüdőrákosok szignifikáns hányada COPD-ben is szenved, a COPD pedig a tüdőrák fontos kockázati tényezője. Ueda és munkatársai felvetették, hogy a COPD-re jellemző krónikus gyulladás következtében létrejövő emfizéma, vagy a betegségre szintén jellemző légúti obstrukció az, amivel a tüdőrák rizikója korrelál COPD-s betegekben [39]. Eredményeik alapján az emfizéma (már a legenyhébb is) emeli a tüdőrák kialakulásának kockázatát. Houghton és munkatársai [40] két hipotézist dolgoztak ki ennek az első látásra összeférhetetlen ellentétnek a feloldására. A dohányfüst hatására létrejövő krónikus gyulladás következtében sérülnek a tüdőalveolusok, megbomlik a proteáz-antiproteáz egyensúly. Emellett a gyulladás következtében a tüdőben levő neutrofil granulociták és makrofágok növekedési és egyéb faktorokat is termelnek, ami a rosszindulatú daganatok sejtjeire is jellemző. A gyulladás lehetséges oki szerepét bizonyítja az is, hogy azokban a COPD-sekben, akik inhalatív szteroid kezelésben részesülnek, kisebb a tüdőrák kialakulásának kockázata [42].

A másik lehetséges mechanizmus a szervezet válasza az őt ért sérülés helyreállítására. Ebben az esetben a krónikus gyulladás miatt létrejövő fokozott sejtpusztulást a tüdő bronchoalveoláris őssejtjei igyekeznek helyreállítani. Ezek az őssejtek normál körülmények között felelősek a tüdő integritásának helyreállításában, a károsodott sejtek pótlásában, kontrollált szaporodásuk révén. A fokozott sejtpusztulás miatt szükséges a fokozott helyreállítás is, ami kontrollálatlan sejtszaporodást eredményezhet, melynek következménye lehet a tüdőrák.

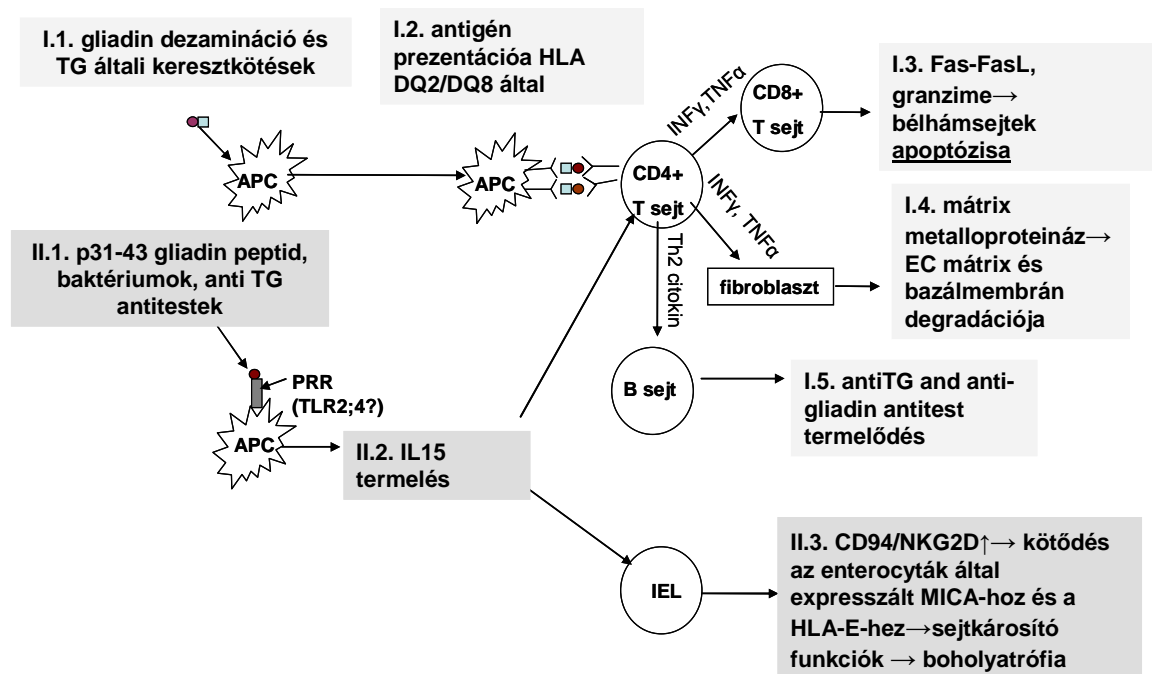
A kissejtes tüdőrák (SCLC) az összes tüdőrák mintegy 15-20 %-át teszi ki, és évente világszerte körülbelül 200.000 ember haláláért felelős. Kemo- és radioszenzitivitása ellenére a túlélés mérsékelt, amely a gyors metasztázisképződésnek, illetve a betegség gyakori ismételt megjelenésének köszönhető. Az átlagos túlélés a kezelés mellett is csak

mindössze 9-20 hónap között van, emiatt érthető, hogy az SCLC esetén is további kutatások szükségesek a jobb terápiás eredmények eléréséhez [49].

A HSP-k fontosságát támasztja alá, hogy több irodalmi adat is megerősíti, hogy a túlélés szempontjából előnyös, ha a nem kissejtes tüdőrák (NSCLC) erősen festődik HSP72-vel [20]. A HSP-k expresszióját a környezeti faktorokon kívül genetikai polimorfizmusok is befolyásolják. Konzervatív szerkezetüknek köszönhetően relatív alacsony fokú a polimorfizmus a HSP72 génekben. A legtöbbet tanulmányozott a HSP72 gén kódoló régiójának HSPA1B A(1267)G helye, mely igazoltan csökkent mRNS képződéssel jár együtt [50].

2.6. A cöliákia - gluténérzékenység

A cöliákia egy immun-mediált vékonybélbetegség, amelyet egy életre szóló glutén érzékenység jellemez [51]. A bélhámsejtek nélkülözhetetlen feladata egy olyan szelektív barrier fenntartása, amelyen keresztül a tápanyagok és az elektrolitok átdiffundálhatnak, miközben a lehetséges veszélyes anyagok nem [52]. Cöliákiában ennek a barriernek a struktúrája sérül, aminek eredményeként a növényi fehérjék felszívódnak a bélepitéliumon keresztül. A búza gliadin aktiválja mind a veleszületett, mind a szerzett immunrendszert [53-55], ami a bélhámsejtek apoptózisához [56] vezet. A gluténérzékenység patomechanizmusát az 5. ábra mutatja be.



5. ábra A cöliákia (gluténérzékenység) patomechanizmusa [53-56]

Cöliákia egy immun-mediált gyulladásszerű betegség, mely a vékonybelet érinti. Élethosszig tartó intolerancia jellemzi a gliadin és egyéb búza, és gabonafélék prolaminjai ellen. Általában genetikailag predisponált emberekben alakul ki. A gastrointesztinális immunrendszer hibás működése jellemzi. Az antigénprezentáló sejtek felszínén a gliadin fehérjék natív- vagy szöveti transzglutamináz által deaminált formája CD4+ T-sejtek felszínén található HLA-DQ2-höz vagy HLA-DQ8-hoz kötődik, amely által CD4+ T-sejtek aktiválódnak. Az aktivált CD4+ T-sejtek CD8+ T-sejteket és fibroblasztokat aktiválnak, fokozzák a bélhámsejtek apoptózisát és elindítják a B-sejtek

differenciációját plazmasejteké. Utóbbiak ezáltal gliadin ellenes és szöveti transzglutamináz elleni antitesteket termelnek.

Más gliadin fehérjék, mint pl. a p31-43 direkt veleszületett immunválaszt indukálnak. Ezeket a fehérjéket az intesztinális makrofágokon és dendritikus sejteken levő TLR-ek és más, PRR-ok felismerik, és interleukin-15 (IL-15)-öt termelnek. Az IL-15 intraepiteliális limfocita migrációt és szaporulatot eredményez (IEL), megvédi a patogén CD4+ T-sejteket a haláltól, és az epitéliumban stressz-indukált molekulák expresszióját serkenti.

3. CÉLKITŰZÉSEINK

1. Első vizsgálatunkban arra kerestünk választ, hogy a dexametazon (DEX), hogyan hat a tüdő alveoláris epitélsejtjeire in vitro körülmények között?
2. A dohányfüstkivonat (DFK) hogyan befolyásolja a tüdő epitélsejtek apoptózisát, valamint, hogy mennyiben változik a DEX kezelés hatása DFK mellett?.
3. A sejtvédelemben központi szerepet játszó HSP72 hogyan változik DEX, DFK illetve kombinált (DEX-DFK) kezelés mellett alveoláris epitél sejtekben?
4. In vivo vizsgálatunkban lokálisan előrehaladott, illetve metasztatizáló SCLC-ban szenvedő páciensekben kutattuk, hogy a HSP72 (HSPA1B A(1267)G) polimorfizmus változik-e egészségesekhez képest és ennek milyen hatása van a daganatos betegség kimenetelére?
5. SCLC páciensek szövettani mintáiban változik-e a HSP72 expresszió a HSP72 (HSPA1B A(1267)G) polimorfizmus függvényében?
6. Hogy változik a HSP72 expressziója, illetve lokalizációja a kezeletlen, illetve a kezelt cöliákiásokban a kontroll, egészségesekhez képest?
7. A gluténmentes diéta hogy változtatja meg a HSP72 expresszióját?

4. MÓDSZEREK

4.1. *Tüdő alveoláris sejtek vizsgálata*

4.1.1 *In vitro* sejtenyésztés

A549 immortalizált II. típusú alveoláris epitelsejtvonalat (ECACC No: 86012804) használtunk, melyet a Sejtkultúrák Európai Gyűjteményéből (Sigma-Aldrich Co., Budapest, Magyarország) rendeltünk. A sejteket letapadó kultúrákban, 25 cm² tenyészfelületű flasksokban (™; Nunc, Dánia), 10 % (v/v) főtális borjúsérumot (FBS; Biochrome AG., Berlin, Németország), 2 mmol/L L-glutamint (Biochrome AG, Berlin, Németország) és 1% antibiotikum/antimikotikum oldatot (AB; Sigma-Aldrich Co., Budapest, Magyarország) tartalmazó DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) médiumban (Gibco, Ausztrália) tartottuk fenn. A sejteket 37°C-on, 5% CO₂ / 95 % levegő tartalmú atmoszférában inkubáltuk, a konfluens tenyészeteket átlagosan 3 naponta passzáltuk. A konfluens tenyészetekben a sejtsűrűség ~1,2 x 10⁵ sejt / ml médium volt.

A kezelésekhez az alveoláris epitelsejteket 6 lyukú plate-en tenyésztettük (Sarstedt, Nümbrecht, Németország) 30 x 10⁴ sejt /ml médium kiindulási sejtsűrűségben. A sejteket 10 % (v/v) főtális borjúsérumot (FBS; Biochrome AG., Berlin, Németország), 2 mmol/L L-glutamint (Biochrome AG, Berlin, Németország) és 1% antibiotikum/antimikotikum oldatot (AB; Sigma-Aldrich Co., Budapest, Magyarország) tartalmazó DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) médiumban (Gibco, Ausztrália) tartottuk fenn, és a kultúrákat 24 órán keresztül 37°C-on, 5% CO₂ /95 % levegő tartalmú atmoszférában inkubáltuk. A kezelési protokoll szerint a kontroll csoportot kezelés nélkül hagytuk, a többi csoportot növekvő dózisú DEX (Dexa-ratiopharm 4mg/ml oldatos injekció, Dexa-ratiopharm, Budapest, Magyarország)(0.1; 1.0; 10 M/l koncentráció a médiumban) kezeltük DFK kezelés mellett, illetve a nélkül. A sejteket vagy azonnal feldolgoztuk, vagy feldolgozásig lecentrifugálva, a felülúszót lepipettázva, -80°C-on tároltuk. A sejtek felülúszóit szintén -80°C-ra helyeztük. Az epitelsejtek DFK +/- DEX kezelése során a kultúrákat 10% FCS tartalmú DMEM médiumban tartottuk fenn 37°C-on, CO₂-os termosztátban. A kezelés előtti utolsó

passzálás után a sejteket 24 órán keresztül inkubáltuk a fenti körülmények között, majd médiumcsere után adtuk a tenyészetekhez a DEX-et (kezeléshez is 10% szérumtartalmú DMEM-et használtunk). DFK kezelés során a frissen elkészített DFK-ot szupplementáltuk 10% borjúszérummal, és ezt tettük a sejtekre. Ezután a megfelelő csoportokhoz hozzáadtuk a DEX-et is. A kiindulási sejtsűrűség 3×10^5 sejt/ml médium volt. A kezelés után 24 óra elteltével RT-PCR és áramlási citometriás (FACS) technikával vizsgáltuk a sejtek apoptózisát, nekrozisát, valamint az intracelluláris HSP72 mennyiségét. Előkísérleteinkben különböző DFK koncentrációkat, illetve kezelési időtartamokat használtunk, ez alapján választottuk ki a legmegfelelőbb kezelési időtartamot és a hígítatlan DFK-ot, amely alkalmazásakor még volt vizsgálható mennyiségű sejt a kísérlet végére.

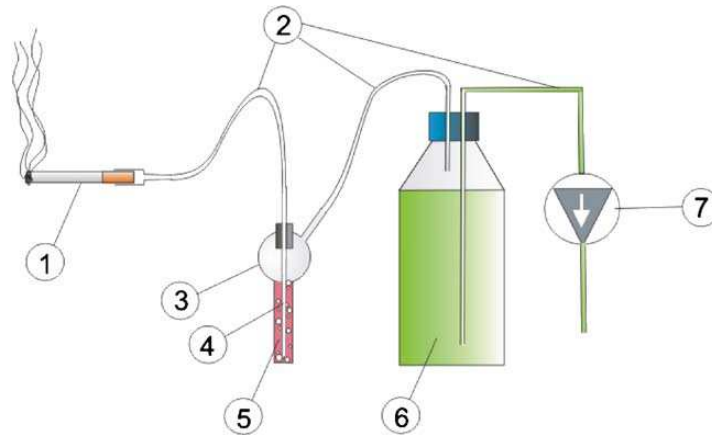
4.1.2 Dohányfüstkivonat készítése

A DFK-ot mindig frissen készítettük, Bernard és munkatársainak [57] metodikáját alapul véve (lásd 1. ábra), egy, a direkt e célból gyártott vákuum-pumpás „dohányzó gép” segítségével (lásd 1. kép). A gyártás után a kivonathoz azonnal főtális borjú szérumot adtunk a megszokott koncentrációban.

Röviden: két kommersz, boltban kapható filteres cigaretta (Marlboro; Philip Morris Products, Magyarország, EU; nicotine 0.8 mg, tar 10 mg) füstjét szívtuk át a pumpa segítségével 16 ml előre 37 °C-ra melegített, szérummentes médiumon keresztül.

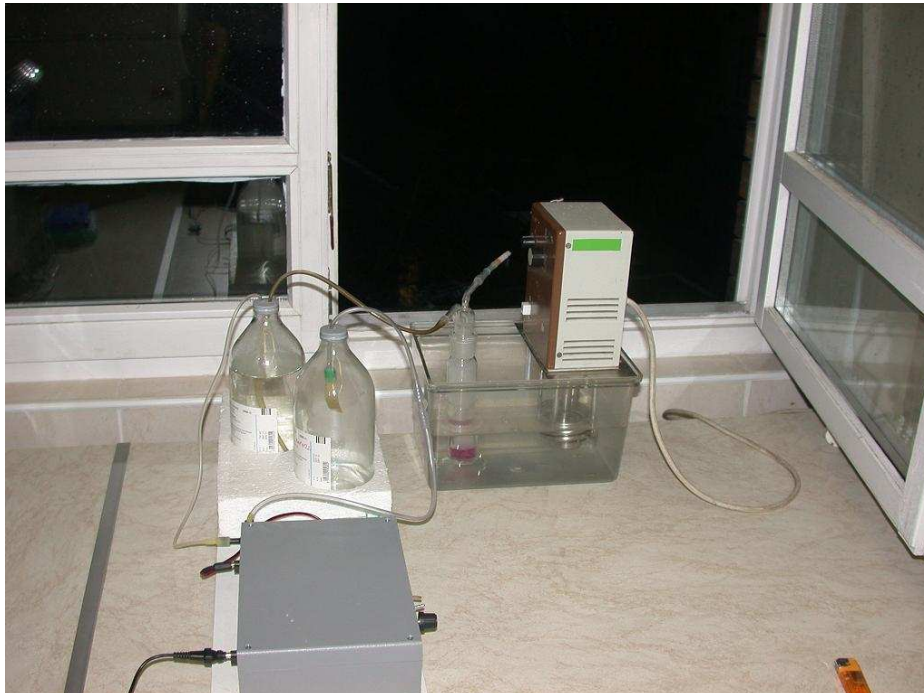
Az így elkészült DFK-ot 30 percen belül mindig felhasználtuk. Ezt a metodikát alkalmazva előzetes kísérleteink bizonyították, hogy a hígítatlan kivonatot használva 24 órás inkubációs idő alatt szignifikánsan csökken az A549 sejtek túlélését.

A médiumot, melyben a kontroll csoportokat tenyésztettük hasonló körülmények között tartottuk, csak cigaretta nem volt a rendszerben. A kapott DFK stabilitását és reprodukálhatóságát folyadékkromatográfiás tömegspektrométerrel ellenőriztük (HPLC-MS/MS). Meghatároztuk a nikotin és kotinin koncentrációkat, melyek az egyes mintákban az átlaghoz képest 10 %-os hibahatáron belül voltak.



6. ábra A DFK készítő gép sematikus rajza [57].

A DFK készítéséhez két kommersz, boltban kapható filteres cigarettát (1) (Marlboro; Philip Morris Products, Hungary, EU; nicotine 0.8 mg, tar 10 mg) használtunk. Mikor az időzítő bekapcsolt (7), a pumpa elindult (7) és a cigaretta füstjét egy kémiaailag inert csövön (2) és Pasteur pipettán (4) át, átszívta a 16 ml előre 37 °C-ra melegített, szérummentes médiumon (5) keresztül, ami egy sterilizált üvegedényben volt (3). Hogy konstans, és mérhető szívóerőt tartsunk fenn, a vízpumpát egy 1 literes vizes palackon (6) keresztül működtettük. A szakaszos dohányzást periodikus vákuum segítségével értük el: azaz a pumpa az 1 literes vizespalackból vizet szívott ki, ami által vákuum keletkezett a médiumos palackban.



1. Kép DFK készítése a gyakorlatban

4.1.3 Kezelési csoportok

A kezelések előtt 24 órával az A549 alveoláris sejteket 3×10^5 sejt/ml koncentrációban 6-lyukú flasksba (Costar, Corning Incorporated; Sigma Aldrich Kft., Budapest, Magyarország) tettük ki, 2 ml médiumba, mely 10% főtális borjúsérumot (FBS; Biochrome AG., Berlin, Németország), 2 mmol/L L-glutamint (Biochrome AG, Berlin, Németország) és 1% antibiotikum/antimikotikum oldatot (AB; Sigma-Aldrich Kft., Budapest, Magyarország) tartalmazott. Így mire a kísérleteket kezdtük 80-90 %-ban konfluens tenyészetet alkottak. A DFK-ba is raktunk 10% főtális borjúsérumot (FBS; Biochrome AG., Berlin, Németország) és 1% antibiotikum/antimikotikum oldatot (AB; Sigma-Aldrich Kft., Budapest, Magyarország), valamint a dexametazont 3 különböző koncentrációban: 0.1, 1, and 10 μ M. A DEX mentes sejtek (0 μ M) szolgálták a szteroid mentes kontroll csoportként (K). A kultúrákat 24 órán keresztül 37°C-on, 5% CO₂ /95 % levegő tartalmú atmoszférában inkubáltuk

A transzfektált sejtekkel a fentiekhez hasonlóan jártunk el.

Előkísérleteink során több időtartamot, és DFK több hígítását használtuk: 24 órás inkubáció és tömény DFK alkalmazásával a sejtszám szignifikánsan csökkent a DEX-mentes (kontroll) csoportokban.

A kezelési csoportokat a 2. táblázatban foglaltuk össze.

2. Táblázat Kezelési csoportok

1. K	DMEM + 10% FBS + 1% AB
2. K + DEX(0.1)	DMEM + 10% FBS + 1% AB + 0.1 μ M dexametazon
3. K + DEX(1)	DMEM + 10% FBS + 1% AB + 1 μ M dexametazon
4. K + DEX(10)	DMEM + 10% FBS + 1% AB + 10 μ M dexametazon
6. DFK	Dohányfüstkivonat + 10% FBS + 1% AB
7. DFK+DEX(0.1)	Dohányfüstkivonat + 10%FBS + 1% AB + 0.1 μ M dexametazon
5. DFK+DEX(1)	Dohányfüstkivonat + 10%FBS + 1% AB + 1 μ M dexametazon
8. DFK+DEX(10)	Dohányfüstkivonat + 10%FBS + 1% AB + 10 μ M dexametazon

9. scr-RNS	DMEM + 10% FBS + 1% AB + „ál csendesítő” RNS-sel transzfektálva (mint negatív transzfekciós kontroll)
10. siRNS	DMEM + 10% FBS + 1% AB + HSP72 “csendesítő” RNS-sel transzfektálva

4.1.4 Sejtszám meghatározása

A 24 órás inkubációs idő végén a sejteket tripszinizálással leválasztottuk a flaskákból, majd centrifugálás után Cell-Dyn 3200 automata (Abbott Laboratories Kft., Budapest, Magyarország) segítségével határoztuk meg a sejtszámot.

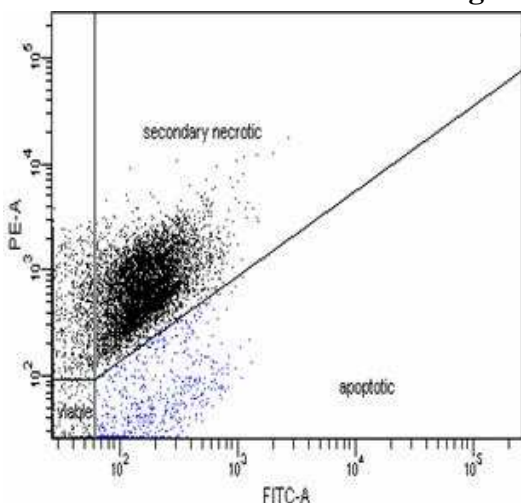
4.1.5 Az apoptózis és a nekrozis meghatározása áramlási citométerrel

Az alveoláris epitelsejteket a fent leírt módon kezeltük, és az apoptotikus, illetve nekrotikus sejtek százalékos arányait az Annexin V-FITC apoptózis detektáló kit (BD Pharmingen, Softflow Hungary Kft., Pécs, Magyarország) protokollja alapján, áramlási citométer segítségével határoztuk meg. Az apoptotizáló sejtek jellemzője, hogy a foszfatidil-szerin (PS), ami élő sejteknél a plazmamembrán belső oldalán lokalizálódik, a külső membránba transzlokálódik. Az ilyen módon felszínre kerülő PS-hez jól kötődik az AnnexinV, amihez fluoreszcensen jelölt festék (leggyakrabban FITC) kapcsolható. A FITC-el konjugált AnnexinV a zöld tartományban ad jelet. A vörös színtartományban detektálható propidium-jodid (PI) az elpusztult sejteket festi, ezért az apoptózis kezdeti fázisában lévő sejtek AnnexinV pozitívak, de PI negatívak. Az elpusztult sejtek AnnexinV-re és PI-re is pozitívak. A kettősen jelölt sejtek áramlási citofluoriméterrel mérhetőek a megfelelő tartományok kijelölésével (lásd 7. ábra).

Mintánként 10^5 sejtet PBS-el mostunk (miután tripszinizáltuk őket), majd 100 μ l térfogatú, 5 μ l FITC–AnnexinV és 10 μ l propidium jodid tartalmú Annexin-kötő pufferben vettünk fel. Ezután a sejteket 15 percig szobahőn inkubáltuk, majd 400 μ l Annexin-kötő pufferrel kiegészítve FACSAria áramlási citométer (Beckton-Dickinson, San Jose, USA) segítségével analizáltuk a mintákat. A vizsgálni kívánt sejtpopulációt

méret (FSC - forward scatter) és granuláltság szerinti (SSC - side scatter) szórás alapján határoltuk be. Minden kezelési csoportból 10000 sejtet számoltunk le. Az eredményeket BD FACSDiva Software -rel (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) értékeltük.

7. ábra Áramlási citométerrel vizsgált sejtek.



A fentiekben részletezett különböző kezeléskben részesített sejteket FITC-szel jelölt AnnexinV-vel, és propidium-jodiddal (PE) festettük. Apotikus sejtek = AnnexinV (FITC-festékekkel jelölve) pozitív, nektrotikus sejtek = AnnexinV (FITC-festékekkel jelölve) pozitív és propidium-jodid (PE-festékekkel jelölve) kettős pozitív, élő sejtek = nem festődő sejtek.

4.1.6 Az alveoláris epitelsejtek intracelluláris HSP72 fehérje szintjének

FACS vizsgálata

A flakában tenyésztett A549 sejteket tripszinizálás után lecentrifugáltuk, PBS-el mostuk, majd megfestettük intracelluláris HSP72-re az alábbi protokoll szerint. A sejteket 0.5 ml permeabilizáló oldattal (FACS™ Permeabilizing Solution2(10x), továbbiakban Perm2; BD Bioscience Co., Soft Flow Hungary Kft., Pécs, Magyarország) kezeltük 10 percig, szobahőmérsékleten, mely segítségével azok átjárhatók váltak a festék számára. Ezt követően a mintákat centrifugáltuk (800 g, 7 perc, 24 °C), majd 2 µl specifikus primer ellenanyaggal - (rabbit Anti-humán HSP72 IgG, amely Dr. L. Lászlótól származik, Eötvös Lóránd Tudományegyetem, Budapest, Magyarország) inkubáltuk őket 30 percig, (24 °C, sötét). Ezután a sejteket 0,5 ml Perm2-vel mostuk és centrifugáltuk (800 g, 5 perc, 24 °C). Másodlagos antitestként Cy5 - konjugált IgG ellenanyagot használtunk (Cy5-conjugated AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat anti-rabbit IgG (H+L) antibody, Jackson ImmunoResearch Laboratories

Inc., Izinta Kft., Budapest, Magyarország). A negatív kontrollokat csak másodlagos antitesttel inkubáltuk. Perm2-vel történő mosás után 500 µl PBS-ben vettük fel a sejteket. A mérést FACS Aria áramlási citométerrel (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) végeztük, 30000 sejtet számoltunk. Az eredményeket BD FACSDiva Software -rel (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) értékeltük.

4.1.7 Valós idejű (RT)-PCR vizsgálatok

RNS izolálás

Az epitélsejteket lecentrifugálva, a felülúszó nélkül, -80°C -on tároltuk az izolálásig. Sejtjeink teljes RNS tartalmát a Qiagen protokollja alapján az RNeasy™ Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Németország) segítségével izoláltuk. A kinyert RNS mennyiségét és minőségét fotometrálassal határoztuk meg. A mintákat felhasználásig -80°C -on tároltuk.

cDNS szintézis

A reverz transzkripció (RT) során 1 µg totál RNS-t konvertáltunk cDNS-é 20 µl reakció végtérfogatban, 200 U SuperScript II™ RNase H⁻ reverz transzkriptáz, 40 U RNaseOUT™ inhibitor és 0,5 µg oligo dT₁₂₋₁₈ primer jelenlétében (Gibco/BRL, Eggenstein, Németország). A reakcióelegyet 20 °C-on 10 percig, majd 42 °C-on 45 percig és végül 99 °C-on 5 percig inkubáltuk, majd 4 °C-ra lehűtöttük és felhasználásig -20 °C-on tároltuk.

RT-PCR

A cDNS-t real-time PCR-el amplifikáltuk. A HSP72 és a glicerin-aldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) mRNS-ek mennyiségét SYBR Green I segítségével határoztuk meg. A PCR reakciókat Light Cycler (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) PCR automatán végeztük el. A HSP72 és a GAPDH mérésekor a PCR-eket 20 µl végtérfogatú [LightCycler Fast-Start SYBR Green I, MgCl₂, sense és antisense primerek] reakcióelegyekben végeztük, 1 µl cDNS felhasználásával. A primerek és a próbák szekvenciáját 3. táblázat tartalmazza.

A PCR-kat a kezdeti 95 °C-on végzett 8 perces denaturáció után 50 cikluson [95 °C, 5 mp (denaturáció), 61/55 °C 5 mp (annealing), 72 °C 20 mp (extenzió)] keresztül végeztük. A PCR-eket pozitív és negatív kontrollok felhasználásával ellenőriztük. A

specifikus primer párokat, a HSP72 és a GAPDH (GenBank: BC 087743) gének amplifikálásához, valamint a próbákat a LightCycler® Probe Design Software 2.0 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) - szoftver segítségével terveztük meg.

A termékek várt hosszait 100 bp DNS marker mix Ready-Load™ (Gibco/BRL, Eggenstein, Németország) felhasználásával kontrolláltuk.

Az eredmények kiértékelését a LightCycler Software 3.5.3. (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) - szoftver segítségével végeztük el.

3. táblázat. A SYBR Green I RT-PCR-ek során használt primerek fontosabb adatai

RT-PCR - SYBR Green I		
Gén		Szekvencia
HSP72	Primer párok (termékhossz: 276 bp)	Sense: 5'-TGC GAG AGG GCC AAG AGG AC-3'
		Antisense: 5'-GTC GCG CCC GTT GAA GAA GT-3'
GAPDH	Primer párok (termékhossz: 265 bp)	Sense: 5' GTC AGT GCC GGC CTC GTC TCA TAG 3'
		Antisense: 5' TCG CGC TCC TGG AAG ATG GTG AT 3'

4.1.8 HSP72 csendesítő transzfekció

Bizonyítani akartuk, hogy eredményeink a HSP72 sejtbeli expressziójának mértékével hozhatók összefüggésbe, ezért „HSP72–csendesítő” transzfekciót (siRNS) is végeztünk siPORT NeoFx transzfekciós szett (Invitrogen, Csertex Kft., Budapest, Magyarország) segítségével. A transzfekció során „hamis” RNS szakaszt jutattunk a sejtbe, mely megakadályozta a HSP72 sejten belüli mRNS-sé történő átíródását, ezáltal a HSP72 expressziót. Hasonló körülmények között mértük a sejtek apoptózisát is.

4.1.9 Statisztika

A statisztikai analízist Statistica 7.0 programot használva, Mann-Whitney U-teszttel végeztük, miután Shapiro-Wilk's teszttel meggyőződünk az adatok normalitásáról. Szignifikánsnak tekintettük az eltérést, ha a $p < 0.05$. Az adatokat mind átlag \pm standard hiba formátumban adtuk meg.

4.2. SCLC-ben szenvedő betegek HSP72 (HSPA1B A(1267)G) polimorfizmusának vizsgálata

4.2.1. Betegek

A Semmelweis Egyetem Pulmonológiai Klinikájának 2003 márciusa és 2004 szeptembere között megjelent beteganyagából kiválogattunk 43 lokálisan előrehaladott, vagy előrehaladott, metasztatikus kissejtes tüdőrákban szenvedő páciens (TNM osztályozás szerint IIIA-IV. stádium). Ebben a periódusban összesen 486 betegnél diagnosztizáltak tüdőrákot, ebből 72 főnél SCLC-t. Ezek közül csak az előrehaladott állapotúakat, és azokat választottuk bele a vizsgálatba, akiknek szövettani mintája elérhető volt. Ez több mint 60 %-a volt az ebben az időszakban diagnosztizált SCLC-s betegeknek.

4.2.2. Demográfiai adatok

Vérmintákat, a diagnózist követően különböző, meghatározott időpontban gyűjtöttünk a betegektől. Összegyűjtöttük a társbetegségeket, dohányzási szokást, mellkas röntgent, az endobronchiális morfológiát, a felfedezéskor megállapított TNM stádiumot, a kemoterápiás és radioterápiás kezelési ciklusokat csakúgy, mint a terápia következményeként fellépő főbb mellékhatásokat, paraneopláziás jelenségeket. A túlélést 60 hónapig vizsgáltuk. A betegek jellemzőit a 4. táblázatban foglaltuk össze. Minden pácienssel aláírtuk a bejegyzési nyilatkozatot a Helsinkai deklarációnak megfelelően.

4. táblázat SCLC betegek demográfiai adatai a HSP72 (HSPA1B A(1267)G) genotípus szerint

HSPA1B A(1267)G	AA	AG	GG	Összes
Betegek száma (fő)	7	28	8	43
Férfi / nő	4/3	18/10	5/3	27/16
Életkor a diagnózis felállításakor (átlag±SD, év)	57.3±3.4	62.8±1.8	58.4±3.0	61.1±1.4
(medián (tartomány), év)	57.5 (41.6-67.7)	64.8 (48.9-80.4)	60.4 (45.7-69.0)	61.1 (41.6-80.4)
III A stadium (fő)	3 (44%)	14 (50%)	2 (25%)	19 (44%)
III B stadium (fő)	2 (28%)	6 (21%)	1 (13%)	9 (21%)
IV stádium(fő)	2 (28%)	8 (29%)	5 (62%)	15 (35%)
BMI (kg/m ²)	21.8±1.5	24.1±0.8	27.3±1.1 *	24.3±0.6
Dohányosok (fő)	6 (86%)	23 (82%)	6 (75%)	35 (81%)
Dohányzás (doboz/év)	26.8±4.3	40.7±5.4	39.5±5.5	37.7±3.7
Magasvérnyomás (fő)	3 (43%)	14 (50%)	4 (50%)	21 (49%)
COPD (fő)	3 (43%)	10 (36%)	2 (25%)	15 (35%)
Iszkémiás szívbetegség (fő)	0 (0%)	5 (18%)	1 (13%)	6 (14%)
Átlagos túlélés (hó, CI 95%)	6.86 (0.03-13.68)	12.98 (6.82-19.15)	8.15 (6.37-9.93)#,&	9.38 (5.08-13.67)
	11.97 (6.83-17.11)			

* $p < 0.05$ vs. AA, # $p < 0.05$ vs. AG, & $p < 0.05$ vs. AA+AG

4.2.3. Egészséges alanyok

A HSP72 (HSPA1B A(1267)G) genotípusának prevalenciájának vizsgálatához egy random, 97 egészséges, önkéntes véradóból álló független populációt vizsgáltunk (átlag életkor > 40 év, férfi/nő arány: 29/68). A populáció minden tagja a kaukázusi etnikumba tartozott.

4.2.4. Immunhisztokémia

Az elsődleges diagnózishoz szükséges tumor mintákból HSP72 immunhisztokémiát készítettünk. A már korábban munkacsoportunk által használt módszer módosított változatát használtuk [58]. Röviden, a szöveteket 5 µm-es szeletekre vágtuk, xylollal és ethanollal kezeltük. PBS-ben történt mosás után metanolos 3 %-os H₂O₂-vel kezeltük 5 percig, majd alapos mosás után 5 percre PBS-ben áztattuk. A szövetdarabokat ezután 2.5%-os ló blokkoló szérummal (Impress Universal reagent, Vector Laboratories, Burlingame, USA) inkubáltuk szobahőn 20 percen keresztül, majd ezt követően a primer HSP72 antitest következett (amit Dr. László Lászlótól kaptuk, Eötvös Loránd Tudományegyetem, Budapest, Magyarország) 1: 40 hígításban, 30 percig, szobahőn. PBS-es mosás után szekunder, peroxidáz-konjugált anti-egér IgG antitesttel (Impress Universal reagent, Vector Laboratories, Burlingame, USA) inkubáltuk a szöveteket 30 percig, szobahőn. A mintákat ezek után vakon elemeztük ki. A tumorsejtek relatív HSP72 expresszióját mértük, egy 0-4 terjedő skálán, és az azonos mintából származó bronchiális epitélsejteken mért (szintén 0-4 skálán) expresszió arányaként fejeztük ki.

4.2.5. Minták és genotipizálás:

A rendszeres rutin vérvizsgálatoknál gyűjtött vérmintákat használtuk a genotipizáláshoz. A korábban leírt módon vontuk ki a DNS-t és végeztük a PCR reakciót [60], specifikus primer párt használtunk: 5'-ACCCTGGAGCCCGTGGAGAA-3'/5'-CACCCGCCCCGCCCCGTAGG-3', illetve a következő szekvenálási profilt: iniciális denaturáció 94°C-on 4 percig, 40 ciklus denaturáció 94°C-on 30 másodpercig, annealing, 61°C-on 30 másodpercig és extenzió, 72°C-on 30 másodpercig, végül egy végső extenzió 72°C-on 10 percig, majd hűtés 4°C-ra. A 189 bázispár hosszú PCR termékeket ezek után 37 °C-on egy éjszakán át specifikus restriktív enzimmel emésztettük (Sigma Aldrich Kft., Budapest, Magyarország), majd a PCR termékeket 3%-os agaróz gélen elektroforetizáltuk, ethidium bromiddal festettük.

4.2.6. Statisztikai analízis

Kiszámoltuk a Hardy-Weinberg ekvilibriumot. Az adatokat átlag±szórás formátumban adtuk meg. Az SCLC-s betegek jellemzőit Cox-regressziós analízis segítségével elemeztük. A nem parametrikus adatokat χ^2 vagy Fisher teszttel dolgoztuk fel. A

túlélési görbét Kaplan-Meier analízis segítségével készítettük el. Szignifikánsnak tekintettük az eltérést, ha a $p < 0.05$.

4.3. Duodenum biopsziák HSP72 vizsgálata

4.3.1 Betegek

16 kezeletlen (6 fiú, 10 lány; átlag életkor: 6.7 év [3.7-13.9]) és 9 kezelt (4 fiú, 5 lány; átlag életkor: 6.7 év [4.9-12.7]) cöliákiás gyermek duodenum biopsziáit vizsgáltuk (5. táblázat). A kezeletlen minták közül 7 kezeletlen cöliákiás gyermek biopsziáját a diagnózis felállításakor, a gluténmentes étrend bevezetése előtt vettük. A másik 9 gyermeknél biopszia történt a kezelés megkezdése előtt (kezeletlen cöliákiás beteg), majd 1.5 (range: 1.1-2.5) évvel a gluténmentes étrend bevezetése után (kezelt cöliákiás). A cöliákia diagnózisa a ESPHGAN kritériumok szerint történt [51]. Minden kezeletlen cöliákiás gyermeknek anti-endomysium IgA pozitivitása és szubtotális bélnyálkahártya boholy atrófiája volt. A kezelt páciensek esetében teljes klinikai remisszió jött létre a gluténmentes étrend mellett, és anti-endomysium antitestet sem tudtunk detektálni náluk. A kontroll csoportba 10 (4 fiú, 6 lány; életkor: 8 év [1.7-13]) olyan gyermek biopsziátuma került, akik vagy fejlődésbeli elmaradás, vagy krónikus hasmenés, vagy felső gasztrointesztinális vérzés miatt estek át felső endoszkópián. Náluk mindannyiuknál ép volt a bélnyálkahártya, és nem volt szignifikáns különbség sem életkorban, sem nemi megoszlásukban a kezelt, illetve kezeletlen cöliákiás gyermekek csoportjához képest ($p=NSZ$). A biopsziákat azonnal lefagyasztottuk, és feldolgozásukig -80°C -on tároltuk. A biopsziák előtt a szülőkkel írásos informált beleegyezőnyilatkozatot írtunk alá, a vizsgálatot az etikai bizottság engedélyezése után indítottuk (TUKEB: 73/2003).

5. táblázat A vizsgálatban szereplő populáció klinikai jellemzői

	Kezeletlen cöliakia	Kezelt cöliakia	Kontroll
Fő	16	9	10
Kor (év) (átlag)	6.7 (3.7-13.9)	6.7 (4.9-12.7)	8 (1.7-13)
Nemi megoszlás (Fiúk/Lányok)	6/10	4/5	4/6
Boholy atrófia			
Nincs	0	9	10
Szubtotális	16	0	0
Teljes	0	0	0
Gluténmentes diéta hossza (év) (átlag)	-	1.5 (1.1-2.5)	-

4.3.2 RT-PCR vizsgálatok

A duodenum bioptátumokat feldolgozásig $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, lízispufferben tároltuk. Szövetmintáink teljes RNS tartalmát a Qiagen protokollja alapján az RNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Németország) segítségével izoláltuk. A kinyert RNS mennyiségét és minőségét fotometrálassal határoztuk meg.

cDNS szintézis

A reverz transzkripció (RT) során $1\text{ }\mu\text{g}$ totál RNS-t konvertáltunk cDNS-é $20\text{ }\mu\text{l}$ reakció végtérfogatban, 200 U SuperScript II RNase H- reverz transzkriptáz, 40 U RNaseOUT inhibitor és $0,5\text{ }\mu\text{g}$ oligo dT12-18 primer jelenlétében (Gibco/BRL, Eggenstein, Németország). A reakcióelegyet $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 10 percig, majd $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 45 percig és végül $99\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 5 percig inkubáltuk, majd $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra lehűtöttük és felhasználásig $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

RT-PCR

A cDNS-t RT-PCR-el amplifikáltuk. A HSP72 és a GAPDH mRNS-ek mennyiségét SYBR Green I vagy fluorescens rezonancia energia transzfer hibridizációs próbák (FRET, GAPDH-t) segítségével határoztuk meg. A PCR reakciókat Light Cycler

(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) PCR automatán végeztük el. A HSP72 és a GAPDH mérésekor a PCR-eket 20 µl végtérfigatú [LightCycler Fast-Start SYBR Green I/ Light-Cycler FastStart DNA Master HybProbe (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), MgCl₂, sense és antisense primerek, hibridizációs próbák] reakcióelegyekben végeztük, 1 µl cDNS felhasználásával. A primerek és a próbák szekvenciáját a 2. táblázat tartalmazza.

A PCR-kat a kezdeti 95 °C-on végzett 8 perces denaturáció után 50 cikluson [95 °C, 5 mp (denaturáció), 61/55 °C 5 mp (annealing), 72 °C 20 mp (extenzió)] keresztül végeztük. A PCR-eket pozitív és negatív kontrollok felhasználásával ellenőriztük. Az eredményeket Light-Cycler software version 3.5.3 (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország) segítségével elemeztük. A HSP72 mRNS expressziót „belső kontrollhoz”, a minták GAPDH mRNS expressziójához viszonyítva adtuk meg.

6. táblázat A HSP72 és GAPDH valós idejű detektálásához használt specifikus primer párok és próbák nukleotid szekvenciái

Real-time PCR - SYBR Green I / FRET próba		
Gén		Szekvencia (primer párok) és próbák
HSP72	Primer párok (termékhossz: 276 bp)	Sense: 5'-TGC GAG AGG GCC AAG AGG AC -3'
		Antisense: 5'-GTC GCG CCC GTT GAA GAA GT -3'
GAPDH	Primer párok (termékhossz: 240 bp)	Sense: 5'-CAC CAC CAT GGA GAA GGC TG-3'
		Antisense: 5'-GTG ATG GCA TGG ACT GTG-3'
	Próbák	próba 1: 5'LCRed460-CCC TGG CCA AGG TCA TCC ATG A-PH 3'
		próba 2: 5'-TCC TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC-FL 3'

4.3.3 Fehérje izolálás és Western blot

A biopszia mintákat lízis pufferban lizáltuk, mely a következőket tartalmazta: leupeptin, aprotinin, Triton X-100, Tris-HCl, Ethylene glycol-bis (2-aminoethylether), N,N,N',N'-tetraacetic-acid, NaF, Phenylmethylsulphonylfluoride and Na-orthovanadate (mindegyik a Sigma-Aldrich Kft-től, Budapest, Magyarország), majd lecentrifugáltuk őket (10000 g, 10 min, 4°C), hogy a magokat és a nagyobb sejtödredékeket leválasszuk. A felülúszók fehérje koncentrációját spektrofotometriás módszerrel, Bradford szerint (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) határoztuk meg. A minták fehérje-koncentrációját 1 mg/ml-re állítottuk be. A mintákat felhasználásig -80°C-on tároltuk.

A 12%-os SDS-poliakrilamid gél zsebeibe denaturált, 20-20 µg összfehérjének megfelelő mennyiséget vittünk fel. Koncentráló gélként 4%-os SDS-poliakrilamidot használtunk. Mintáink mellé molekulásúly markert (BenchMark™, Gibco/BRL, Eggenstein, Németország) és pozitív kontrollt vittünk fel. A mintákhoz kezelő puffert [30% glicerol, 20% merkapto-etanol, 0,7 M SDS, 0,25 M Tris-HCl pH=6,8] adtunk, majd a mintákat 3 perc forralással denaturáltuk. Az elektroforézist 90 percen keresztül 120 V-on 40 mA-rel végeztük, hűtött rendszerben (Penguin™ Dual-Gel Water Cooled Systems, Owl, NH, USA).

A szeparált fehérjéket az SDS-poliakrilamid gélről a nitrocellulóz membránra (Hybond™ ECL™, AP Biotech, Buckinghamshire, UK) blottoltuk át (70 V, 220 mA, 80 perc), TRIS-HCl, glicin és metanol tartalmú standard transzfer pufferben, hűtött rendszerben (MiniTank™ electroblotter, Owl, NH, USA). A fehérjetranszfer sikerességét 1% Ponceau S (Sigma Aldrich Kft., Budapest, Magyarország) és 25% ecetsav (Reanal, Budapest, Magyarország) tartalmú festékekkel ellenőriztük.

A nem specifikus kötőhelyek blokkolása érdekében a blotmembránt szobahőmérsékleten, 2 órán keresztül blokkoló oldatban (5% zsírmentes tejpor, 10% PBS puffer) inkubáltuk. Blokkolás után a membránt további 1 órán keresztül specifikus ellenanyaggal, a nyúl monoklonális HSP72 antitesttel (származás: Dr. L. László, Eötvös L. Tudományegyetem, Budapest [19]) inkubáltuk, mosó oldatban (1% zsírmentes tejpor, 0,1% Tween™20 detergens, 10% PBS puffer), 1 : 10000 hígításban.

Mosások után (3 x 10 perc) a második, peroxidázzal konjugált, nyúl ellenes IgG szekunder antitesttel (Sigma-Aldrich Kft., Budapest, Magyarország) 30 percig

inkubáltuk a blotmembránt, 1: 5000 hígítással, majd további mosásokkal (3 x 20 perc) távolítottuk el az ellenanyag feleslegét.

Az immunoreaktív helyek kemilumineszcens szignálját Amersham Pharmacia protokoll szerint ECLplus reagenssel, Hyperfilm ECL™-en (AP Biotech, Buckinghamshire, UK) detektáltuk. A Western blot-ok eredményeit a Gel-Pro Analyzer 3.1™ szoftverrel (Media Cybernetics, Inc., MD, USA) denzitometráltuk.

4.3.4 Immunfluoreszcens festés

A duodenum bioptátumokat immunfluoreszcens festéshez azonnal lefagyasztottuk, és Shandon cryomatrixba (ThermoElectron Co, Waltham, USA) ágyaztuk, majd 5 µm-es szeletekre vágtuk. A szeleteket szobahőmérsékleten, 1 órán át a Western blotthoz is használt, nyúl anti-HSP72 poliklonális IgG antitesttel inkubáltuk, 1: 1000 hígításban. Mosás után a szeleteket szobahőn 30 percig szekunder antitesttel (Alexa Fluor® 488 F (ab')₂ fragment of goat anti-rabbit IgG (Invitrogen, Carlsbad, California, USA)) inkubáltuk, 1: 100 hígításban. Magfestéshez (10 perc, szobahőn) Hoechst 33342 festéket használtunk (Sigma-Aldrich Kft., Budapest, Magyarország), 1:1000 hígításban. Végül a szeleket Vectashield fluoreszcens médiummal fedtük (Vector Laboratories, Burlingame, USA). Megfelelő kontrollokat hasonlóképpen inkubáltunk, csak a primer antitesttel való inkubálást hagytuk ki, így meggyőződünk a specificitásáról, és kiküszöböltük az autofluoreszcenciát. A festett mintákat Zeiss LSM 510 Meta konfokális pásztázó lézer mikroszkóppal vizsgáltuk (Carl Zeiss, Jena, Germany), 20x Plan Apochromat (NA=0.80) and 63x Plan Apochromat olaj immerziós DIC (NA=1.4) lencse segítségével.

4.3.5 Statisztikai analízis

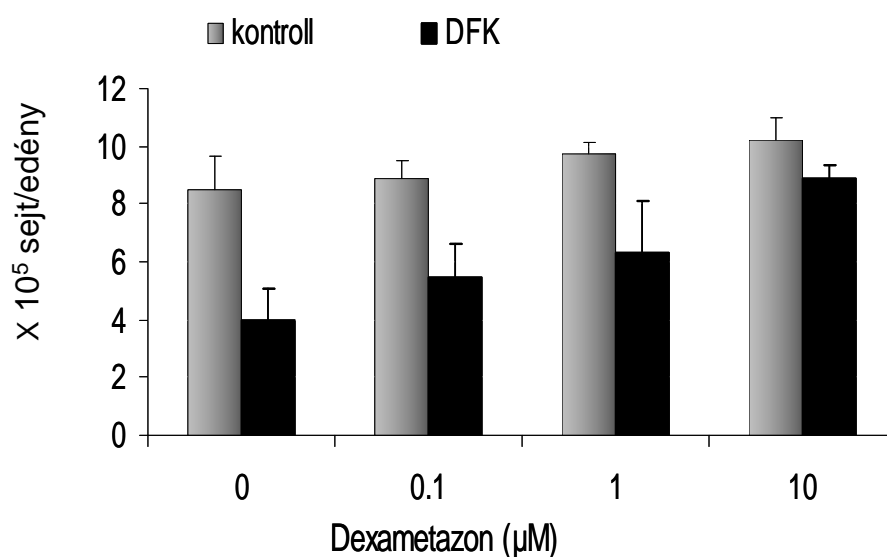
A statisztikai elemzést Statistica 7.0 programot használva (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA), Mann-Whitney U-tesztel végeztük, miután Shapiro-Wilk's tesztel meggyőződünk az adatok normalitásáról. Szignifikánsnak az eltérést p <0.05 esetén neveztük. Az adatokat átlag±standard hiba formátumban adtuk meg.

5. EREDMÉNYEINK

5.1. Alveoláris epitélisejtek *in vitro* vizsgálata

5.1.1 Sejtszám

Kontroll körülmények között, 24 órás inkubációt követően a sejtek proliferáltak, kb. $8.55 \pm 1.1 \times 10^5$ végső sejtszámot elérve. DEX kezelés hatására nem tapasztaltunk szignifikáns sejtszám emelkedést. Ezzel ellentétben a DFK-tal kezelt sejteken a 24 órás inkubálást követő a sejtszám szignifikánsan alacsonyabb volt a kontroll csoportokhoz képest. DFK és DEX kezelés együttes alkalmazása esetén szignifikánsan, és dózis-



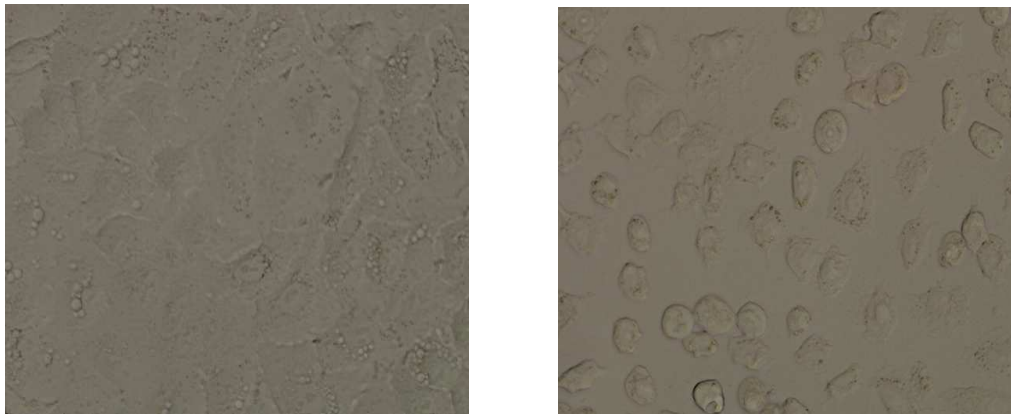
függő módon nőtt a végső sejtszám a csak DFK-tal kezelt csoporthoz képest.

8. ábra Sejtszám

Az alveoláris epitélisejteket növekvő dózisú (0; 0.1; 1; 10 µM) DEX-nal kezeltük, illetve ugyanezeket a szteroid dózisokat használva kezelésünket DFK-tal egészítettük ki. 24 órás inkubálást követően mértük a sejtszámot a tenyésztőedényekben. DEX

dózisfüggően emelte a sejtszámot a DFK-tal kezelt csoportokban. DEX(10) dózisonál a kontroll, illetve a DFK-tal kezelt csoportokban hasonló sejtszámot láttunk.

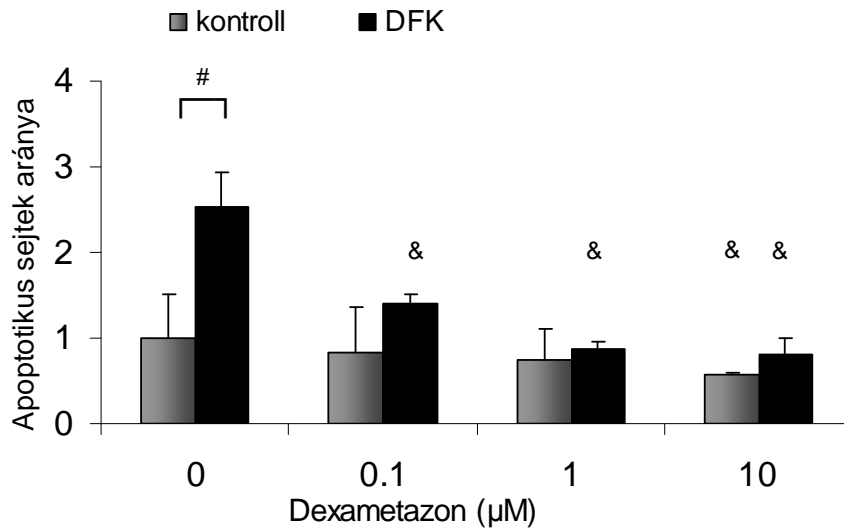
(& p <0.05 vs. 0 μ M DEX, # p <0.05 vs. kontroll)



2. kép A549 sejtek fénymikroszkópos képe kontroll és DFK kezelés mellett (40x nagyítás)

5.1.2 Apoptózis

DEX kezelés gyengén csökkentette az apoptotikus sejtek számát a kontroll csoportokban, de statisztikailag is szignifikáns különbség csak a DEX (10) csoportban jelentkezett. A szteroid-mentes DFK-tal kezelt sejtcsoportokon az apoptózis mértéke megháromszorozódott a szteroid-mentes kontroll csoporthoz képest. DEX kezelés a dohányfüstös csoportokban szignifikánsan mérsékelte az apoptotikus sejtek számát, eltörölve ezzel a különbségeket a DFK-tal kezelt és megfelelő kontroll csoportok között a legnagyobb, DEX (10) dózisonál.



9. ábra Apoptózis

Az alveoláris epitélisejteket növekvő dózisú (0; 0.1; 1; 10 µM) DEX-nal kezeltük, illetve ugyanezeket a szteroid dózisokat használva kezelésünket DFK-tal egészítettük ki. 24 órás inkubálást követően annexin V/ propidium jodid kettős jelölést használva áramlási citometriás mérésekkel határoztuk meg az apoptózist. A magasabb dózisú szteroid kezeléseknél csökkent az apoptózis mértéke kontroll körülmények között. A DFK azonban szignifikánsan növelte a programozott sejthalál mértékét, míg együttes DFK és szteroid kezelés mérsékli az apoptózist dóziszfüggő módon.

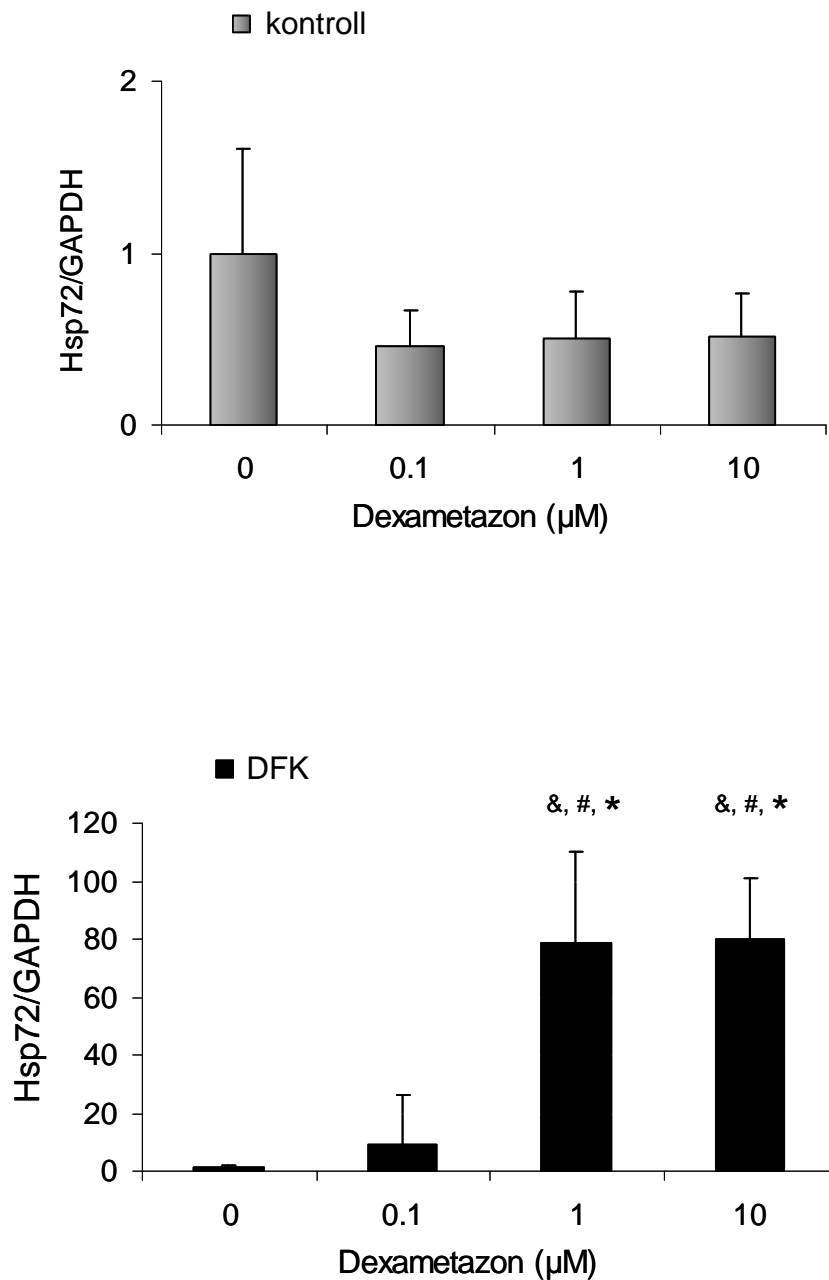
Az ábrán a szteroid-mentes kontroll csoportban mért apoptózist egynek ábrázoltuk, és a többi csoportban mért, ehhez viszonyított, relatív változásokat ábrázoltuk.

(& $p < 0.01$ vs 0 µM DEX, # $p < 0.05$ vs kontroll)

5.1.3 HSP72 mRNS és fehérje expresszió

A HSP72 mRNS expresszió (10. ábra) nem változott a szteroid kezelések során. A DFK alkalmazása önmagában alacsony HSP72 mRNS szinttel járt. Ezzel ellentétben a szteroid kezelés a DFK-tal kezelt csoportokban szignifikánsan, dóziszfüggően emelte a HSP72 mRNS expresszióját.

A szteroid-mentes kontroll csoportban az egyes sejtek HSP72 fehérje expressziója (4. ábra) alacsony volt, csakúgy, mint a HSP72-t expresszáló sejtek aránya. A kontroll csoportokban a DEX kezelés csökkentette mind a pozitív sejtek arányát, mind az egyes sejtek HSP72 tartalmát. Mindegyik DFK-tal kezelt csoportban a HSP72 pozitív sejtek aránya szignifikánsan magasabb volt, mint a megfelelő kontroll csoportokban. Szteroid kezelés jelentősen, és dózis-függően emelte a HSP72-t expresszáló sejtek arányát, a legnagyobb mértékben a DFK+DEX (10) csoportban, ahol a sejtek közel 80%-ában volt kimutatható a fehérje. DFK kezelés a megfelelő kontroll csoportokhoz viszonyítva szignifikánsan növelte a sejtek HSP72 tartalmát mind a szteroid-mentes, mind a szteroiddal kezelt csoportokban. A HSP72 pozitív sejtek átlagos HSP72 intenzitása a DFK kezelés után az emelkedő DEX adagokkal arányosan nőtt. Az emelkedést a DEX(1) és DEX(10) csoportokban találtuk szignifikánsnak a szteroid-mentes csoporthoz képest.



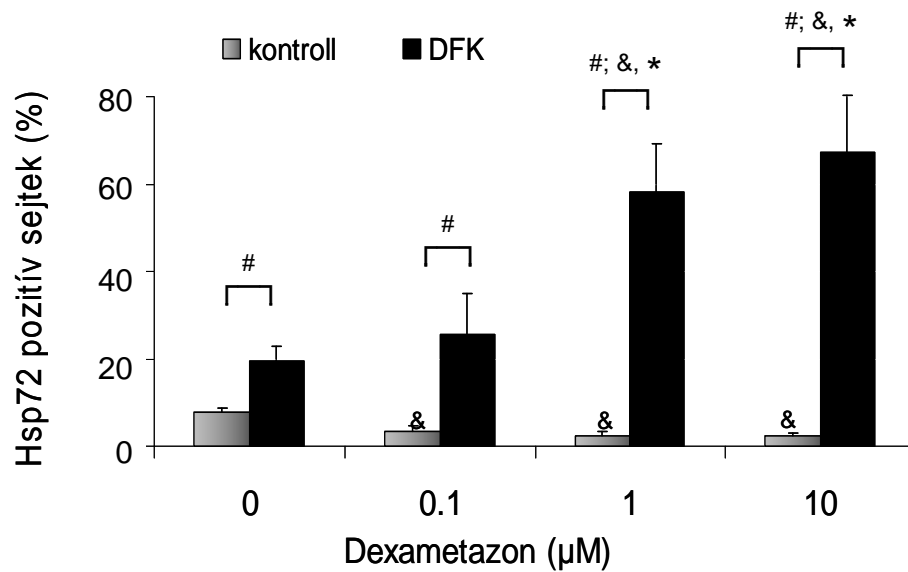
10. ábra HSP72 mRNS expresszió

Az alveoláris epitélsejteket növekvő dózisú (0; 0.1; 1; 10 μM) DEX-nal kezeltük, illetve ugyanezeket a szteroid dózisokat használva kezelésünket DFK-tal egészítettük ki. 24 órás inkubálást követően a HSP72 mRNS mennyiségét valós idejű RT-PCR-ral határoztuk meg. A HSP72 mennyiségét a hasonló körülmények között mért GAPDH mennyiségével korrigáltuk.

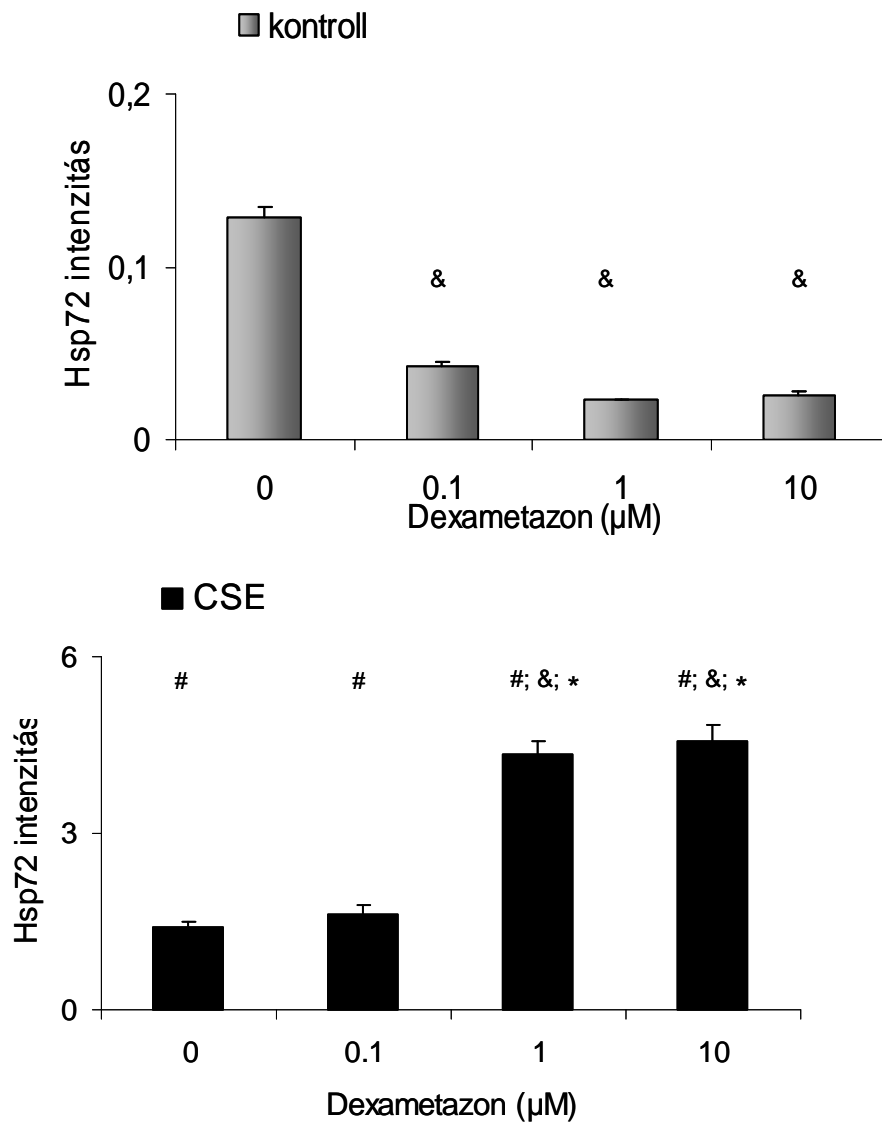
DEX kezelés önmagában nem változtatta meg a HSP72 mennyiségét, míg a kezelést DFK-tal kiegészítve, DEX emelkedő dózisával az mRNA expresszió szignifikánsan emelkedett. Az ábrán a szteroid-mentes kontroll csoportban mért mRNA expressziót ábrázoltuk egynek, és a többi csoportban mért, ehhez viszonyított, relatív változásokat ábrázoltuk.

(& $p < 0.01$ vs $0 \mu\text{M DEX}$, # $p < 0.05$ vs kontroll; * $p < 0.01$ vs $0.1 \mu\text{M DEX}$)

a)



b)



11. ábra HSP72 fehérje expresszió: a HSP72 pozitív sejtek aránya (a) és az intracelluláris HSP72 mennyisége (b)

Az alveoláris epitélsejteket növekvő dózisú (0; 0.1; 1; 10 μM) DEX-nal kezeltük, illetve ugyanezeket a szteroid dózisokat használva kezelésünket DFK-tal egészítettük ki. 24 órás inkubálást követően a HSP72 fehérje expresszióját áramlási citometriás mérésekkel határoztuk meg. Ehhez nyúl anti-humán HSP72 IgG primer és nyúl Cy5-konjugált szekunder antitesteket használtunk. Mértük a HSP72 pozitív sejtek arányát, valamint az egyes sejtek intracelluláris HSP72 intenzitását.

DEX önmagában csökkentette a HSP72 fehérje expresszióját a kontroll csoportokban, míg az együttes DFK és szteroid kezelés emelte a fehérje expresszióját dóziszfüggő

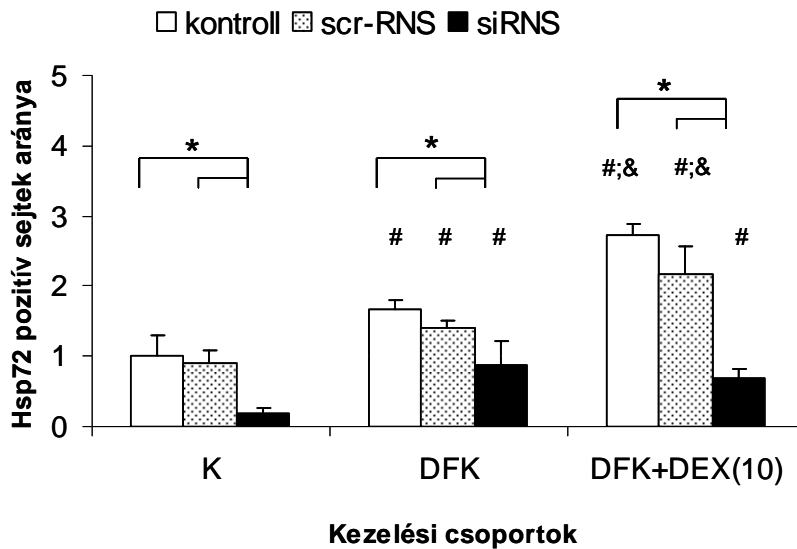
módon. Összehasonlítva a megfelelő csoportokat, minden DFK-tal kezelt csoportban a HSP72 fehérje expressziója szignifikánsan magasabb volt a kontroll csoportokhoz képest. A legnagyobb különbség a 10 μ M-os dexametazon koncentrációnál mértük.

*(& p <0.01 vs 0 μ M DEX; # p <0.01 vs kontroll; * p <0.01 vs 0.1 μ M DEX)*

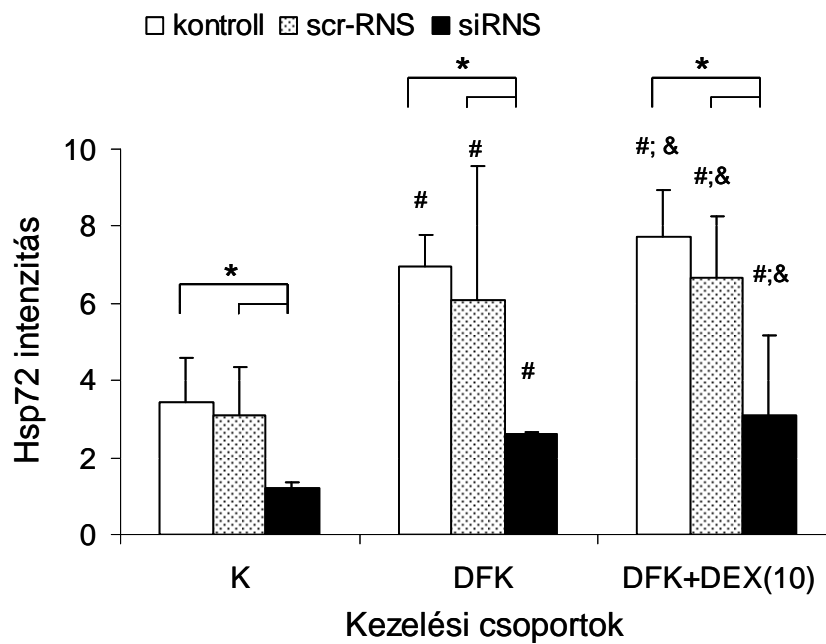
5.1. 5 „Csendesítő” transzfekciót követően észlelt HSP72 expresszió, valamint apoptózis

Transzfekciós kísérleteink sikeresek voltak mind a szteroid-mentes kontroll, mind a DFK-tal kezelt sejteken. Mint már a korábbi kísérleteinkből láthattuk, a legmagasabb HSP72 expressziót a DFK+DEX (10) sejtekben mértük. Így ezt a csoportot választottuk, hogy bizonyítsuk a DFK és a szteroid kezelés együttes hatását a sejtek HSP72 expressziójára. Míg a negatív transzfekciós kontroll (scr-RNS) nem változtatta meg a HSP72 expressziót, a csendesítő RNS-sel történő transzfekció szignifikáns – 60-80%-os - csökkenést eredményezett a fehérjeszintézis mértékében, mind kontroll, mind DFK esetében (12. ábra). Hasonlóképpen alakult a HSP72-t expresszáló sejtek aránya is. A HSP72 fehérje expressziójának csökkenésével párhuzamosan a transzfektált sejtekben az apoptózis minden csoportban szignifikánsan nőtt (13. ábra), bizonyítva ezzel a közvetlen kapcsolatot a celluláris HSP72 és az apoptotikus sejthalál között.

a)



b)



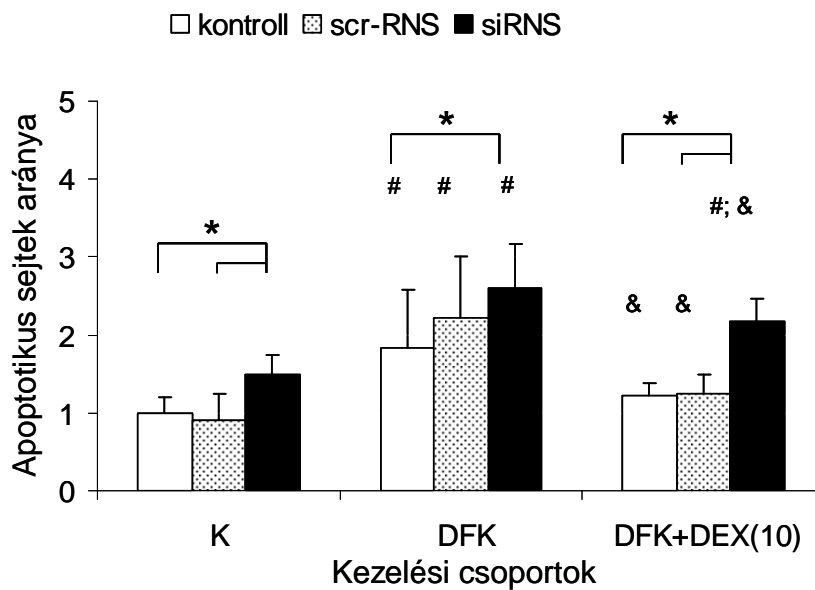
12. ábra HSP72 fehérje expresszió siRNS kezelést követően: a HSP72 pozitív sejtek aránya (a) és az intracelluláris HSP72 mennyisége (b)

A HSP72 "csendesítő" RNS-t (siRNS) a korábbi eredményeink alapján kiválasztott 3 csoportnál használtuk: a kontroll, a DFK-tal kezelt, valamint a DFK-tal és 10 μ M DEX-nal együttesen kezelt csoportnál.

Negatív transzfekeciós kontrollként scrambled (scr)- RNS-t alkalmaztunk. A transzfekeciót követően a HSP72 expressziót áramlási citométerrel mértük. Eredményeik alapján a siRNA minden csoportban hatásosan csökkentette a fehérje kifejeződését.

Az ábra első részén a szteroid-mentes – kontroll csoportokban mért HSP72 fehérje expresszió mértékét 1-nek ábrázoltuk, míg a többi csoportban a kontroll csoporthoz képest mért relatív változásokat ábrázoltuk.

(& $p < 0.01$ vs DFK-tal kezelt csoportok, # $p < 0.05$ vs szteroid-mentes kontroll csoportok, * $p < 0.01$ vs. kontroll és α $p < 0.01$ vs. scr csoportok)



13. ábra Apoptózis HSP72 csendesítő transzfekeció után

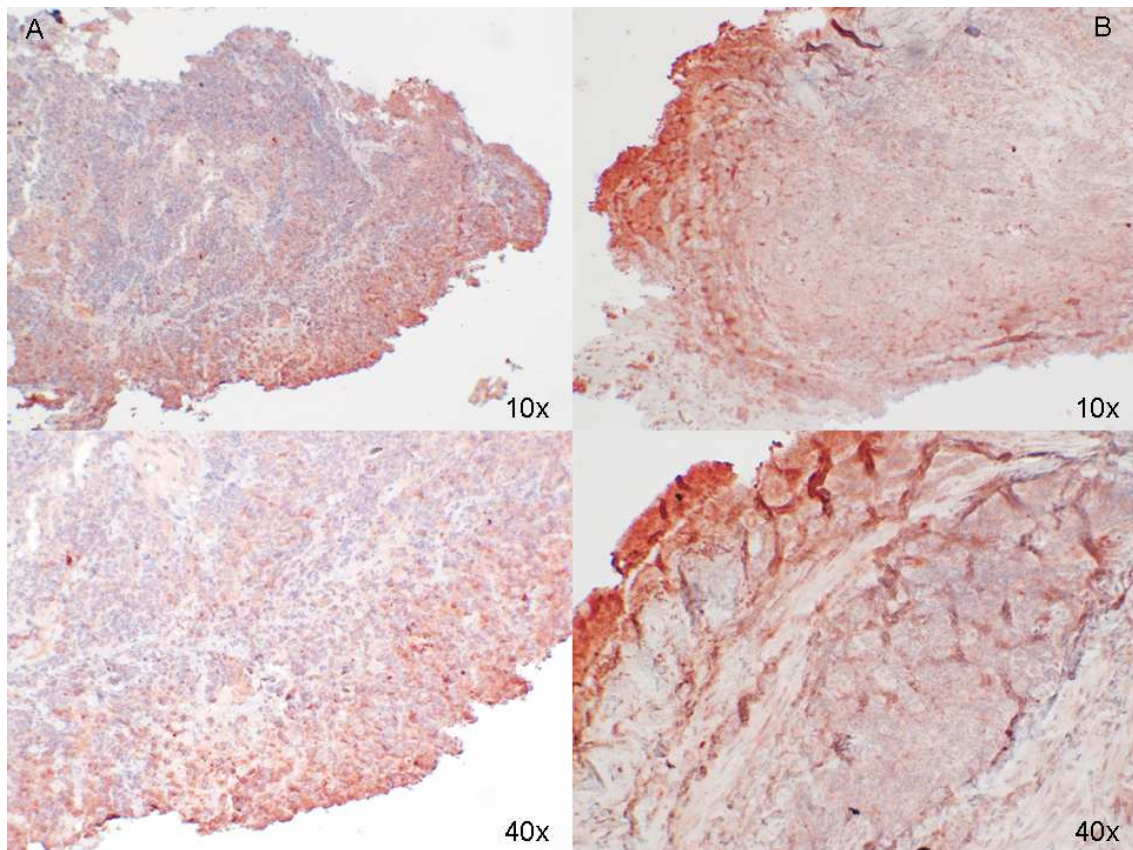
A HSP72 “csendesítő” RNS-t (siRNS) a korábbi eredményeink alapján kiválasztott 3 csoportnál használtuk: a kontroll, a DFK-tal kezelt, valamint a DFK-tal és 10 μ M DEX-nal együttesen kezelt csoportnál. Negatív transzfekeciós kontrollként scrambled (scr)-RNS-t alkalmaztunk. A transzfekeciót követően az apoptózist annexin V/propidium jodid kettős jelölést alkalmazva áramlási citométerrel mértük.

DFK mellett a HSP72 fehérje mennyiségének csökkenésével párhuzamosan nőtt az apoptotikus sejtek száma. A szteroid-mentes – kontroll csoportokban mért apoptózis mértékét 1-nek ábrázoltuk, míg a többi csoportban a kontroll csoporthoz képest mért relatív változásokat ábrázoltuk.

(& $p < 0.01$ vs DFK-tal kezelt csoportok, # $p < 0.05$ vs szteroid-mentes kontroll csoportok, * $p < 0.01$ vs. kontroll, és α $p < 0.01$ vs. scr csoportok)

5.2. A SCLC-ben szenvedők HSP72 polimorfizmus vizsgálata

Minden sejt mutatott HSP72 fehérje expressziót, de a relatív intracelluláris HSP72 expresszió különbözött a tumorsejtek és az egészséges sejtek között (lásd 14. ábra!). A SCLC sejtekben immunhisztokémián látott HSP72 fehérje expressziója, és a HSP72 (HSPA1B A(1267)G) genotípusa közötti összefüggést vizsgálva azt találtuk, hogy a GG genotípusú betegekben a tumorsejtek szignifikánsan alacsonyabb HSP72 festődést, azaz HSP72 fehérje expressziót mutattak a normális sejtekhez képest (relatív festődés 28%). Az AA, illetve AG genotípusú betegek mintájában nem volt különbség a HSP72 festődést illetően (a relatív festődés ezekben a csoportokban 68%, illetve 75% volt).



14. ábra HSP72 festődés SCLC-s betegek tüdőmintáiból készített immunhisztokémiai metszeteken

SCLC-s beteg tüdőmintáit vizsgálva azt kaptuk, hogy a HSP72 vizsgált polimorfizmusa tekintetében a GG genotípusú betegekben a tumorsejtek szignifikánsan alacsonyabb

HSP72 festődést, azaz HSP72 fehérje expressziót mutattak a normális sejtekhez képest (relatív festődés 28%). Az AA, illetve AG genotípusú betegek mintájában nem volt különbség a HSP72 festődést illetően (a relatív festődés ezekben a csoportokban 68%, illetve 75% volt).

A Hardy-Weinberg kritérium a HSP72 polimorfizmusra mind a vizsgált, mind az egészséges kontroll csoportnál fennállt. Az allél frekvencia kismértékű csökkenést mutatott az A allélben a SCLC betegekben a kontrollokhoz képest (OR: 0.88 [95% CI: 0.53-1.46]; p=0.69). Ezzel ellentétben a GG genotípus sokkal gyakoribb volt SCLC csoportban az egészségesekhez képest, de a különbség nem érte el a szignifikancia szintjét (19% vs. 13%, 8. táblázat).

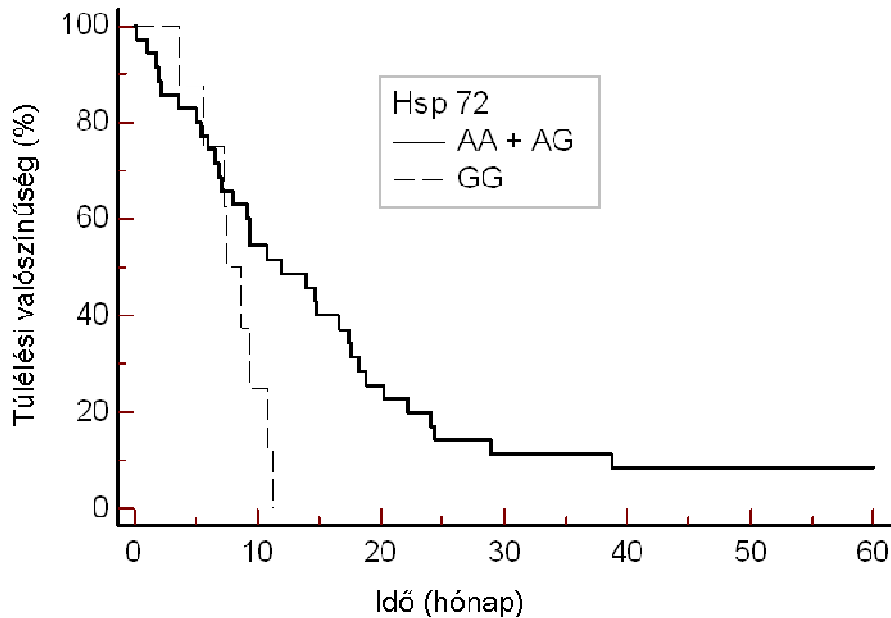
8. táblázat A különböző genotípusok gyakorisága a HSP72 (HSPA1B) A(1267)G lókuszon SCLC-s betegekben, illetve egészséges referencia populációhoz képest

HSPA1B A(1267)G	AA	AG	GG	Össz
SCLC beteg	7 (16%)	28 (65%)	8 (19%)	43
Egészséges kontrollok	17 (17%)	67 (70%)	13 (13%)	97

Az A allélt hordozó betegek átlagos túlélési ideje szignifikánsan magasabb volt a GG csoporthoz képest (AA és AG csoport: 11.97 hónap, konfidencia intervallum (CI) (95%) 6.83-17.11 vs. GG csoport: 8.15 hónap CI (95%) 6.37-9.93, p<0.05). Az átlagos túlélési idő rövidebb volt azokban a betegekben, akik az AA genotípust hordozták, az AG genotípusú betegekhez képest, de ez a különbség nem volt szignifikáns. Ennek hátterében részben az állt, hogy az AA csoportban volt egy beteg, aki a diagnózis felállítása után rövid időn belül (1.86 hó) meghalt. A többi, ebbe a csoportba tartozó, beteg minimum 6 hónapig túlét.

Mivel a tumorsejtek HSP72 szöveti festődése nem különbözött az A allél hordozásakor, így az AA és az AG HSP72 genotípusú betegeket a túlélési görbén egy csoportként

ábrázoltuk. Az túlélés tekintetében, szignifikáns csökkenést láttunk a GG genotípusú SCLC-ben szenvedő betegek esetében AA+AG páciensekhez viszonyítva (15. ábra).



15.ábra Az SCLC-s betegek túlélési görbéje

Az A allélt hordozó betegek átlagos túlélési ideje szignifikánsan magasabb volt a GG csoporthoz képest (AA és AG csoport: 11.97 hónap, CI (95%) 6.83-17.11 vs. GG csoport: 8.15 hónap CI (95%) 6.37-9.93, $p < 0.05$). Az átlagos túlélési idő rövidebb volt azokban a betegekben, akik az AA genotípust hordozták, az AG genotípusú betegekhez képest, de ez a különbség nem volt szignifikáns.

A GG genotípusú betegeknél a tüdőrák előrehaladottabb stádiumban került felfedezésre, hiszen szignifikánsan több páciensnél volt kimutatható távoli metasztázis (M1) a diagnózis felállításakor (62% vs. 29% az AG és 28% az AA csoportban, $p < 0.05$).

A COX-regresszió analízis szignifikáns összefüggést mutatott a túlélés, és a HSP72 GG genotípusa, a dohányzás intenzitása (doboz/év), az életkor, valamint a testtömegindex (BMI) között. A nem nem befolyásolta a végkimenetelt, és a TNM stádiumok emelkedésével (TNM IIIA, IIIB, IV) sem nőtt a betegek halálozási rizikója (9. táblázat).

A BMI szignifikánsan magasabb volt a GG genotípusú betegekben, az AA genotípusúakhoz viszonyítva ($p < 0.05$). Fontos negatív prognosztikai faktornak bizonyult a COPD egyidejű jelenléte ($p = 0.0125$), csak úgy, mint az alkalmazott kemoterápiás ciklusok száma ($p = 0.0007$). Más paraméterek, mint a mellkas röntgenen észlelt eltérések, az endobronchiális morfológia, paraneopláziás szindróma, vagy a kemo-, illetve radioterápia mellékhatásai tekintetében nem volt szignifikáns különbség a különböző HSP72 genotípusú SCLC betegek között.

9. táblázat A túlélést befolyásoló faktorok SCLC páciensekben.

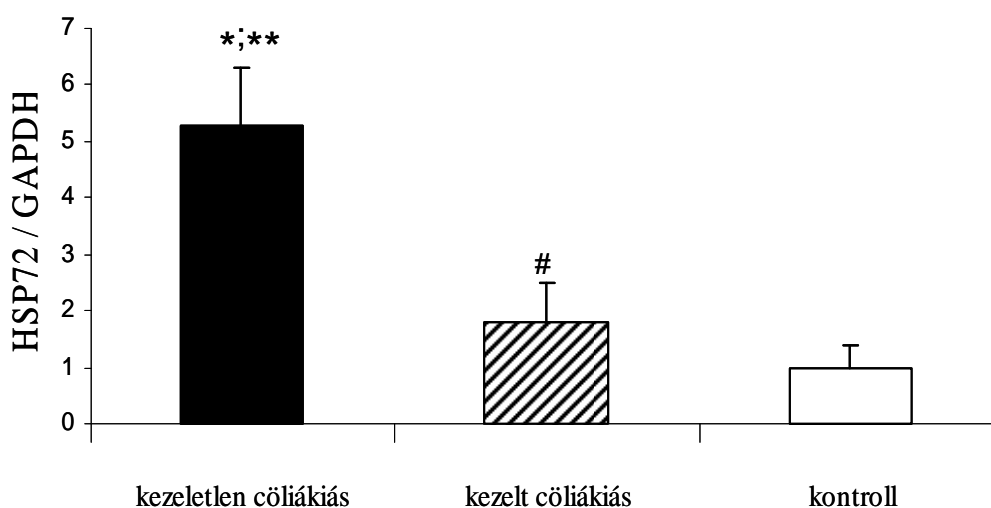
	HR	95 % CI	P
HSPA1B A(1267)G (GG genotípus)	8.432	2.633-26.996	0.0004
Dohányzás (doboz év)	1.029	1.011-1.048	0.0016
Életkor (év)	1.081	1.031-1.134	0.0014
BMI (kg/m²)	0.862	0.768-0.967	0.011
Nem (nő)	0.469	0.212-1.041	0.064
TNM (emelkedő stadium)	0.806	0.513-1.264	0.350

A Cox regressziót végezve igazoltuk azokat a rizikófaktorokat, amik emelik a SCLC betegek halálási valószínűségét.

5.3. A duodenum minták vizsgálata

5.2.1 HSP72 mRNS expresszió a duodenum nyálkahártyában

A 16. ábrán látható a HSP72 mRNS expresszió változása. A HSP72 mRNS expresszió szignifikánsan emelkedett a kezeletlen cöliákiás gyermekek duodenum nyálkahártyájában, mind a kezelt, mind a kontroll csoporthoz viszonyítva ($p=0.0002$ és $p=0.023$). A kezelt csoportban a duodenalis nyálkahártya HSP72 mRNS szintje szignifikánsan csökkent a kezeletlen csoporthoz képest ($p=0.003$).

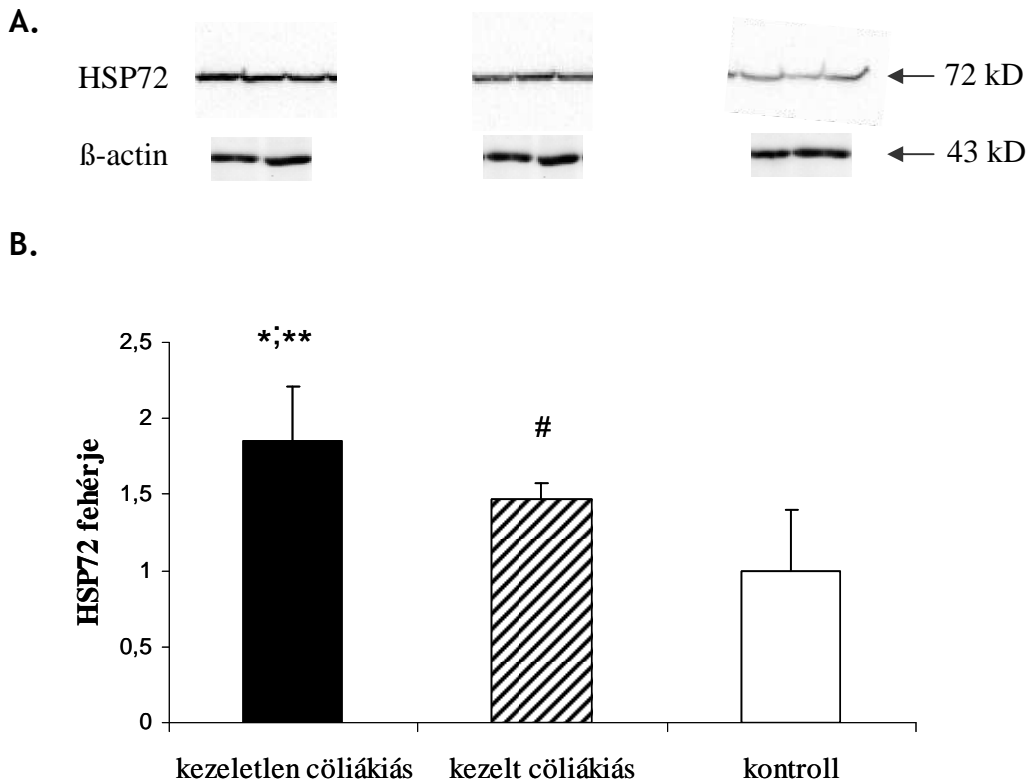


16. ábra Kontroll - egészséges, valamint kezelt és nem kezelt cöliákiás gyermekek duodenum biopsziáiban mért HSP72 mRNS expresszió

Valós idejű RT-PCR-rel vizsgáltuk a duodenum minták HSP72 mRNS tartalmát. A HSP72 mRNS expresszió szignifikánsan emelkedett a kezeletlen cöliákiás gyermekek csoportjában, mind a kezelt, mind a kontroll csoporthoz viszonyítva ($p=0.0002$ és $p=0.023$). A kezelt csoportban a HSP72 mRNS szintje szignifikánsan csökkent a kezeletlen csoporthoz képest (* $p = 0.003$ vs. kezelt cöliákiás, ** $p = 0.0002$ vs. kontroll, # $p = 0.023$ vs. kontroll.)

5.2.2 HSP72 fehérje expresszió a duodenum nyálkahártyában

Szignifikánsan magasabb HSP72 fehérje szintet láttunk mind a kezelt, mind a kezeletlen cöliákiás betegeknél a kontrollhoz viszonyítva ($p=0.0001$ és $p=0.003$). Cöliákiás betegeknél a kezelés hatására a HSP72 fehérje szint szignifikánsan csökkent a kezeletlen gyermekekhez képest ($p=0.002$) (17. ábra).



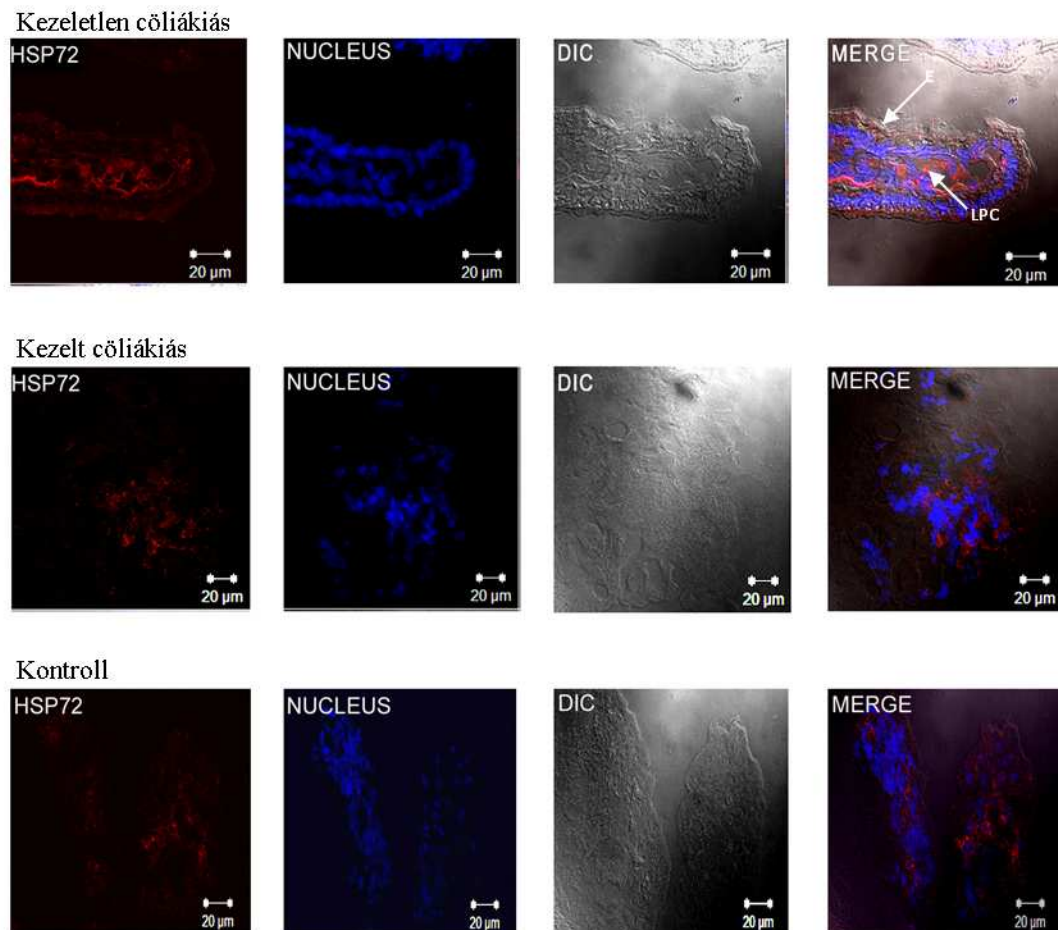
17. ábra Kontroll-egészséges, valamint kezelt és nem kezelt cöliákiás gyermekek duodenum biopsziáiban mért HSP72 fehérje szint

A lizált duodenum minták Western blot analíziséhez anti-HSP72 nyúl poliklonális antitesttel kezeltük, melynek eredményeképpen 1 különálló sávot kaptunk 72 kD-nál (A).

(* $p = 0.002$ vs. Kezelt cöliákiás, ** $p = 0.0001$ vs. kontroll, # $p = 0.003$ vs. kontroll.)

5.2.3 HSP72 lokalizációja a duodenum nyálkahártyában

A HSP72 sejtbeli elhelyezkedését immunfluoreszcens festéssel vizsgáltuk. A kezetlen gyermekek duodenum bolyhaiban erős HSP72 festődést láttunk az enterocytákban és a lamina propria immunsejtjeiben, a kontrollhoz viszonyítva. Míg a kezelt cöliákiások duodenum bolyhaiban gyengébb HSP72 festődést láttunk az enterocytákban és a lamina propria immunsejtjeiben a kezetlenekhez viszonyítva. A normál duodenumban (kontroll) nagyon gyenge immunreakciót találtunk. A magban nem tudtuk HSP72-t detektálni (18. ábra).



18. ábra A HSP72 lokalizációja kontroll-egészséges, valamint kezelt és nem kezelt cöliákiás gyermekek duodenum biopsziáiban

Fagyasztott duodenum bolyhokat fixáltunk, és immunfluoreszcens technikával festettünk nyúl poliklonális anti-HSP72 (piros) antitestet használva. A nyilak a HSP72 pozitív

bélgámsejteket (E) és a lamina propria immunsejtjeit (LPC) jelölik. Erős HSP72 festődést láttunk a nem kezelt gyermekek boholy bélgámsejtjeiben és a lamina propria gyulladáisos sejtjeiben. Az immunfluoreszcens festés alapján a kezelt cöliákiás betegek lamina propria immunsejtjeiben a HSP72 pozitivitás csökkent, míg a boholy bélgámsejtekben nem detektáltunk fluorescens jelet. Gyenge HSP72 pozitivitást találtunk a kontrollok mintájának lamina propria immunsejtjeiben. DIC képek hosszanti (kezeletlen és kontroll gyermek) vagy vízszintes (kezelt cöliákiás gyermek) metszetét mutatják a duodenum bolyhainak. Konfokális lézer mikroszkópot használtunk (Zeiss Axiovert LSM510, 63x /1.40 Oil DIC).

6. MEGBESZÉLÉS

6.1. A dohányfüst és szteroid hatása a tüdő epitelsejtjeire

A dohányfüst szignifikánsan csökkentette az alveoláris epitelsejtek túlélését és proliferációját. Eredményeink szerint a DFK súlyos sejtsérülést okoz, mely a sejtek megnövekedett apoptózisához vezet. Kaushik és munkatársainak korábbi adatai alapján, a DFK magas koncentrációban megnöveli a reaktív oxigénradikálok képződését a sejtekben, valamint az apoptózist, ezáltal pusztítva a tüdősejteket [60]. A mérgezés által indukált sejtpusztítás mellett, a DFK a sejtproliferációt is gátolja [61]. Liu és munkatársai bebizonyították, hogy a dohányfüst részben úgy csökkenti a sejtproliferációt, hogy gyulladáscitokinek termelődését serkenti, mely gyulladás ezt követően alveoláris sejtkárosodáshoz vezet [62]. Ezekkel ellentétes megfigyelés, hogy a DFK alacsony koncentrációban sejtproliferációt és DNS szintézist indukál a p38 mitogén aktivált kináz segítségével [60].

Kísérleteinkben immortalizált alveoláris epitelsejteket használtunk, mely a legfőbb sejt típus az alveolusokban. Az A549 humán sejt vonalat általában akkor használják, ha az ATII-es típusú sejtek fiziológiás szerepét akarják vizsgálni [63]. Ez a sejt típus alkotja az alveoláris epitelsejtek kb. 60 %-át, és a tüdőparenchyma sejtjeinek kb. 15 %-át, egy felnőtt ember tüdejének körülbelül 5%-át borítva. Többfunkciós szerepet játszanak az alveoláris egyensúly fenntartásában azáltal, hogy alveoláris védőgátat formálnak, felületaktív anyagokat termelnek, szaporodnak és AT I típusú sejtekké differenciálódnak a javító folyamatok során. A dohányfüst azáltal, hogy károsítja a tüdő epitelsejteket, fontos szerepet játszik az emfizéma kialakulásában [64].

Ugyanakkor fontos kiemelni, hogy az A549 sejt vonal immortalizált sejtekből áll, melyek a rákos sejtek karakterisztikáját is magukon viselik. Több vizsgálat bebizonyította a COPD és a tüdőrák kockázatának kapcsolatát [38; 39]. COPD-re jellemző a gyulladás és az alveoláris szeptumok pusztulása, míg a tüdőrák a sejtek kontrollálatlan szaporodásának következménye. Houghton és munkatársai - előnyben részesítve a parenchyma pusztulás fontosságát - bemutatta, hogy már akár kezdeti emfizéma is jelentősen növelheti a rák kialakulásának lehetőségét [40].

Kontroll körülmények között a szteroid kezelés nem befolyásolta sem az alveoláris epitélisejtek apoptózist, sem a celluláris HSP72 expressziót. Ezzel ellentétben, amikor DFK-ban tenyésztjük őket, a DEX kezelés szignifikánsan emelte a sejtek túlélését és szaporodását, dózisfüggő módon mérsékelte az apoptózist. Dohányfüst expozíció után a programozott sejthalál vezethet a tüdősejtek elvesztéséhez és szöveti sérüléshez, bár szerepe a COPD patogenezisében még tisztázatlan [65]. COPD-s betegek tüdőszövetében több apoptotikus sejtet találtak mind a nem dohányzó, mind a dohányzó, de egészséges emberek tüdejéhez viszonyítva [66]. A legtöbb COPD-s beteg dohányzott vagy jelenleg is dohányzik. Egyre több bizonyíték utal arra, hogy a dohányzás okozta tüdőbetegségekre való hajlam, vagy az azzal szembeni rezisztencia genetikusan meghatározott [67].

Klinikailag, a COPD-s emberek általában (szemben az asthmásokkal) nem reagálnak olyan jól a szteroid kezelésre, bár a betegség súlyosabb formáiban és gyakori exacerbációk esetén a szteroid adása javasolt a protokollok szerint [68]. A kölcsönhatást a szteroidok és a dohányfüst között még nem teljesen értjük. A terápiás válasz elmaradását okozhatja a szer csökkent kötődése a sejten belüli receptorához, a csökkent receptor expresszió, a gyulladáshoz fokozott aktivizálódása, vagy a ko-represszor aktivitás hiánya. Ezeket a történéseket befolyásolhatja az oxidatív stressz, a CD8+ limfociták, neutrofilek és a gyulladáshoz mediátorok magas szintje, mind-mind a klinikailag rosszabb kimenetelt elősegítve [43; 46].

Ellentmondásosak az adatok arra vonatkozóan, hogy a szteroid miként hat az emberi sejtekre. A glukokortikoidok serkentik az apoptózist a gyulladáshoz sejtekben, ugyanakkor az epiteliális sejtekben apoptózist gátló hatásuk feltételezett [69; 70]. Dorscheid és munkatársai kimutatták, hogy légúti hám tenyészetben a kortikoszteroidok apoptózist indukálnak [71], míg más kutatások adatai szerint a szteroidok meggátolják a programozott sejthalált az epitélisejtekben azáltal, hogy Fas-t kötnek [72].

6.2. A tüdő alveoláris epitélisejtjeinek HSP72 szintje a noxák következtében, lehetséges szerepei

Adataink bizonyítják, hogy a DFK-tal kezelt sejtekben a HSP72 szintje emelkedik. Míg az mRNA szintben nem láttunk különbséget, addig a sejtek HSP72 fehérje tartalma és a

HSP72 pozitív sejtek aránya szignifikánsan nőtt DFK kezelés mellett. Egy lehetséges magyarázat lehet az adatokra az, hogy a DFK kezelés hatására aktiválódtak a sejtek védelmi folyamatai: nevezetesen csökken a HSP72 degradációja. A hőszokkfehérjék apoptózist gátló, sejtvédő szerepe intenzíven kutatott terület. A HSP72 óvja a sejteket mind az apoptózistól, mind a nekrozistól [58; 73]. Az irodalomban sok adat található arról, hogy különböző ártalmak, mint például a dimetilarzénsav emelik az intracelluláris HSP72 szintet, megváltoztatják a molekula sejtbeli lokalizációját, csökkentve ezzel az emberi epitelsejtben a programozott sejthalál mértékét [74]. Szívizomsejteken végzett korábbi tanulmányokban kimutatták, hogy a DEX dóziszfüggő módon képes emelni a HSP72 szintet, melyet a HSF aktiválásán keresztül ér el [5].

A DEX kezelés elősegítette az epitelsejtek túlélését DFK kezelés mellett. Amikor a sejteket HSP72 „csendesítő” RNS-sel transzfektáltuk, a sejtekben a kezelések hatására nem emelkedett sem az mRNS, sem a fehérje szint, mindezzel párhuzamosan nőtt az apoptózis mértéke, kevesebb sejt élt túl. Ezek az eredményeink rámutatnak a HSP72 sejtvédelemben játszott kulcsfontosságú szerepére DFK kezelés esetén.

Az emelkedett HSP szint stresszválaszként működik. Különböző stressz hatására a HSF-1 trimerizálódik és a sejtmagba kerül, kötődik a DNS HSE-éhez, ezáltal megkezdődik a HSP gének átíródása. A sejtbeli HSP szint emelkedése sejtvédő, indukálja a sejt apoptózis ellenes folyamatait, csökkenti a gének expresszióját, megváltoztatja a sejtciklust, és gyulladáscsökkentő hatása is ismert [13; 14; 15]. Másrészt az intracelluláris HSP szekretálódhat a sejten kívüli térbe, ahol stressz állapotokban az immunrendszer vészjelző molekulájaként fontos szerepet játszhat. A sejten kívüli HSP gyulladáscsökkentő citokinek szintézisét serkenti, és a tumor ellenes védelmet is támogatja [13; 18].

A HSP72 felszíni expresszióját mindeddig csak tumor sejteken írták le. A veleszületett immunitás sejtjei: a makrofágok, dendritikus sejtek, NK-sejtek szerepet játszanak a tumor ellenes „őrzésben”. Munkájukat segíti, hogy a HSP72 specifikus C-terminális részét felismerve azonosítani tudják az abnormális sejteket [75]. Ezek alapján úgy tűnik, hogy a HSP72 kifejeződése a sejt felszínen, valamint a keringésbe történő szekréciója fontos lehet az immunrendszer aktivitásának növelésében, a dohányfüst hatására létrejövő tüdőkárosodásban. További állatkísérletek és pácienseken végzett megfigyelések kellenek azonban ennek a kérdésnek a tisztázásához.

Eredményeink alapján a szteroid csak egyidejű DFK kezelés mellett növelte az epitélsejtek túlélését és proliferációját. Csak kevés irodalmi adat áll rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy a hosszú távú inhalációs kortikoszteroid kezelés hatásos-e dohányzó COPD-s vagy tüdőrákos betegekben. Shaker és munkatársai bizonyították, hogy a hosszú távú inhalációs budesonid kezelés csökkentette az emfizéma progresszióját dohányzó COPD-s betegekben [42]. Az a tény, hogy azok az inhalációs szteroiddal kezelt COPD-s betegek, akik abbahagyják a dohányzást, kisebb eséllyel betegszenek és halnak meg tüdőrákban is azt sugallja, hogy az alveoláris sejtek apoptózisának és azt követő gyulladásnak a gátlásával csökkenthető a tumor kialakulásának esélye [41].

A GR funkciójához nélkülözhetetlen a HSP90/HSP70 csaperon heterokomplex működése. A kezdeti interakció a GR és a HSP70 között elengedhetetlennek tűnik a HSP90-es heterokomplex későbbi működéséhez, mely során a GR szteroid kötő hasadéka megnyílik [28]. Kísérleteink alapján DFK expozíció után az indukálható forma, a HSP72 jelenléte nélkülözhetetlen a DEX hatás létrejöttében, bár további tanulmányok szükségesek annak meghatározására, hogy a dohányfüst hogyan hat a GR szintjére és működésére.

6.3. A SCLC-ben szenvedők HSP72 polimorfizmus vizsgálata

Eredményeink elsőként bizonyították, hogy a SCLC-ben szenvedők esetében a betegség kimenetele összefüggésbe hozható a tumorsejtek HSP72 expressziójával. A rákos sejtek csökkent HSP72 expressziója függött - legalábbis részben -, a HSP72 (HSPA1B A(1267)G) gén polimorfizmusától, vagyis a GG genotípusú SCLC pácienseknél a HSP72 fehérje expresszióját alacsonyabbnak láttuk. Míg az A allél hordozása esetén semmilyen különbséget nem találtunk, az A allél hiánya a páciensek túlélésének szignifikáns csökkenését eredményezte vizsgálatunkban.

Korábbi tanulmányok már kimutatták, hogy a különböző gén polimorfizmusok befolyásolhatják a tüdőrák kialakulását [76; 77; 78]. A HSP72 polimorfizmus jelentőségét különböző rosszindulatú daganatokban már vizsgálták; ám SCLC-ben fontossága ezidáig még ismeretlen volt. Wang és munkatársainak tanulmányában a HSPA1B A(1267)G polimorfizmus nem befolyásolta a rosszindulatú daganatok iránti érzékenységet, de ők ebben a kutatásban nem vizsgálták a SCLC-t [79]. Mi elemeztük először az összefüggést a HSP72 (HSPA1B A(1267)G) gén polimorfizmusa és a SCLC páciensek túlélése között. A két G allélt hordozóknál szignifikánsan rövidebb volt a betegek túlélése a diagnózis felállításától az A allélt hordozókhoz képest. Immunhisztokémiát használva adataink megerősítették, hogy a GG genotípusú betegekben a tumorsejtek HSP72 expressziója csökkent az ugyanazon betegek mintáiban látható nem malignus sejtekhez viszonyítva.

HSP72 (HSPA1B A(1267)G) gén GG genotípusát korábban csökkent HSP72 mRNS expresszióval kötötték össze. Következésképpen alacsonyabb lehet a sejtekben mérhető HSP72 fehérje szintje is. Az intracelluláris HSP72 csökkenése fogékonyabbá teheti a sejteket különböző stressz következtében fellépő károsodások iránt, ami karcinogenezishez vezet. [50]. Másrészt a tumorsejtekből felszabaduló HSP72 serkenti a gazdaszervezet immunrendszerét, ezáltal fokozott tumor ellenes immunitást eredményez [25]. Feltételezhető, hogy a HSP72 (HSPA1B A(1267)G) génen GG genotípusú SCLC-ben szenvedők alacsony HSP72 szintje emeli a rák kialakulásának kockázatát, és/vagy hozzájárul a sokkal gyorsabb tumor progresszióhoz.

Korábbi kísérletekben a HSP-k fokozott expressziója (in vitro transzfekcióval, vagy in vivo transzgenomikus állatokat használva) a sejtek tumoros átalakuláshoz, tumor kialakulásához vezetett [80]. Máig intenzíven kutatott kérdés, hogy az emelkedett

intracelluláris HSP szint, hogyan befolyásolja a sejtek működését, hogyan vezethet fokozott malignus átalakuláshoz. Ismert a p53 tumorszuppresszor génre gyakorolt hatása [81;82;83]. Sherman és munkatársai kimutatták, hogy a HSP72 mérsékli a Ras indukálta öregedési folyamatot, ezáltal sejt növekedést serkent [84]. Ismert, hogy a magas HSP72 szint megvédte a sejteket a TNF- α and TNF- β indukált programozott sejthaláltól [85]. Immortalizált epiteliális sejt vonalon (A549) végzett in vitro kísérleteinkben a DFK szintén emelte a sejtek HSP72 expresszióját, ezáltal biztosítva a sejtek túlélését.

Az in vitro adatok birtokában szükségesnek láttuk, hogy összevessük a daganatos egyén HSP72 genotípusát, és a tumorsejtek HSP72 expresszióját, ezáltal az első adatokat szolgáltatva a lehetséges kapcsolatról. Míg az emelkedett intracelluláris HSP72 szint növeli a túlélést és megvédi az egyedi tumorsejteket, celluláris stresszt követően a HSP72-fehérje komplexek az extracelluláris térbe jutva serkentik a gazdaszervezet immunrendszerét, tumor ellenes immunválaszt kiváltva. Adataink szerint SCLC-ben a daganatsejtek HSP72 általi védelme kisebb jelentőségűnek tűnik, mint az extracelluláris HSP72 által kiváltott tumor ellenes immunválasz, hisz a GG genotípusú betegekben észlelt alacsonyabb HSP72 szint gyorsabb daganatprogresszióval, valamint rövidebb túlélési idővel volt összefüggésben.

Az irodalomban ismert, hogy NSCLC-ben szenvedőknél a tumorsejtekben fokozott a HSP72 expresszió, de sem a túlélési idő, sem a daganat kiterjedése nem állt összefüggésben a HSP72 szintekkel [86]. Hasonlóképpen a SCLC sejt vonalban tapasztalt kemoszenzitivitást sem befolyásolta a HSP72 szint [87]. Ezek a vizsgálatok azonban genetikai vizsgálat nem történt, így ismeretlen a megváltozott HSP72 szint háttere, elképzelhető, hogy emögött is a HSP72 (HSPA1B A(1267)G) GG genotípusa állhatott.

Eredményeink alapján a HSP72 (HSPA1B A(1267)G) GG genotípusú betegekben tapasztalt csökkent HSP72 expresszió a SCLC betegek túlélésének egy szignifikáns negatív prediktora. Fontos megjegyeznünk, hogy az A allél hordozása nem jelentett szignifikáns különbséget a HSP72 szintekben, így a betegek túlélésében sem. A HSP72 mérése a betegek mintáinak immunhisztokémiai vizsgálatával időigényes és csak szemikvantitatív. Ugyanakkor a HSP72 gén polimorfizmusa befolyásolja a fehérje

expresszióját, így ez egy lehetséges eszköz lehetne a HSP72 fehérje szint becslésére, valamint a SCLC betegek várható túlélésének előrejelzésére.

A HSP72 (HSPA1B A(1267)G) GG genotípusú SCLC-ben szenvedők esetén a tüdőrák gyorsabb progressziója mellett, szignifikánsan nőtt a távoli metasztázisok száma is. Hasonló eredményeket írtak le mellrákos betegek esetében, ahol a HSP72 (HSPA1B A(1267)G) G allél hordozása hasonlóképpen sokkal gyorsabb tumornövekedéssel volt összefüggésbe hozható [88].

A testtömegindexet vizsgálva azt találtuk, hogy a HSP72 (HSPA1B A(1267)G) GG genotípusú egyéneknél magasabb volt a BMI, ami megegyezik korábban publikált adatokkal, mely szerint ez a genotípus összefüggésben áll a kövérségre és a cukorbetegségre való nagyobb hajlammal [89]. Georgiadis és munkatársai korábban kimutatták, hogy SCLC-ben szenvedő egyének obezitása nem hozható összefüggésbe a kezelés toxicitásával, sem a rövidebb túlélési arányokkal [90]. Ugyanakkor a mi pácienseinkben a GG genotípus összefüggést mutatott a magasabb BMI értékkel, és negatívan befolyásolta a betegek túlélését. A rizikófaktorokat illetően, a dohányzás mértéke negatívan korrelált a SCLC betegek túlélésével, amint azt már korábban is kimutatták [91]. Ugyanakkor a dohányzási szokások és a HSP72 (HSPA1B A(1267)G) polimorfizmus között nem tudtunk összefüggést kimutatni.

6.4. A cöliákiás gyermekek duodenum mintájának HSP72 expressziója

Vizsgálatunkban először mutattuk ki a cöliákiás gyermekek duodenum nyálkahártyájának emelkedett HSP72 expresszióját.

Cöliákia egy komplex bélrendellenesség, mely a társadalom 1 %-át érinti, és glutén intoleranciát okoz [92]. A szabályozatlan immunválasz és az epitélium zavart barrier funkciója a lamina propria gyulladásához vezet [93; 56]. A bélnyálkahártya HSP72 expresszióját eddig alig vizsgálták. Csak néhány adat szól a HSP72 IBD-ben betöltött fontos szerepéről. Cuzzocrea és munkatársai kimutatták, hogy dinitrobenzen szulfosavval indukált colitises patkánymodellben az intraperitoneálisan adott cyclopentenon prostaglandin [15-deoxy-delta (12,14)-PGJ(2)] stimulálja a gyulladt vastagbélben a HSP72 aktivációt, ezáltal csökkenti a gyulladt vastagbél sérülésének mértékét [94].

Jelen vizsgálatunkban megmutattuk, hogy a kezeletlen cöliákiás gyermekek boholy bélhámsejtjeiben, illetve a lamina propria immunsejtjeiben a HSP72 expressziója szignifikánsan emelkedett. A gluténmentes étrendet folytató cöliákiás gyermekek duodenum nyálkahártyában a HSP72 expresszió jelentősen csökkent a kezeletlen betegekhez képest, ugyanakkor még mindig magasabb a HSP72 szintje az egészséges, nem cöliákiás, kontrollokhoz viszonyítva.

A HSP72 számtalan mechanizmussal védheti a duodenum nyálkahártya integritását [6]. Tao és munkatársai azt találták, hogy ha a bélepitéliumot a probiotikus *Lactobacillus GG*-vel (LGG-CM) kezelték, a HSP72 expresszió emelkedett, ami a citoszkeletális integritás megóvásával hozzájárult a probiotikum jótékony klinikai hatásához [95]. A HSP72 hozzákötődik a citoszkeleton kulcsfontosságú fehérjéihez, úgy, mint az α -actininhez, vagy a tight junction-asszociált fehérjékhez, például a zonula occludenshez (ZO), ezáltal stabilizálja őket [96]. A többi probiotikumnak hasonló hatása van. A Caco-2 sejtek *Bifidobacterium lactis* kezelése megvédte a tight junction-öket a gliadin toxikus hatásától, amit a ZO-1 expresszió mintázata tanúsított [97].

A vizsgált fehérje egy másik lehetséges hatása a mitokondrium funkciójának megóvása; a HSP72 stabilizálja a mitokondrium membránját, valamint a sejtek integritásához, funkciójához szükséges fehérjéket. Továbbá humán vastagbél sejteken- Caco-2/bbe (C2)- kimutatták, hogy alacsony HSP72 szint mellett a kaszpáz-9 aktivációja korábban megtörténik [10], ami arra utal, hogy a HSP72 antiapoptotikus hatása révén is véd [6].

6.5. HSP72 és toll-like receptorok (TLR) összefüggése

Egyes gliadin fehérjék képesek veleszületett immunválaszt kiváltani TLR-k és más PRR-ok segítségével [98-99]. Korábban kutatócsoportunk kimutatta, hogy a cöliákiás gyermekek duodenum nyálkahártyájában a TLR2 és TLR4 expressziója emelkedett [100]. Ismert, hogy a 70 kDa molekulásúlyú HSP-k a TLR-ok ligandjai [16]. A HSP72 képes mind a TLR2, mind a TLR4 molekulát specifikusan aktiválni [9]. Korábbi közleményekben bebizonyították, hogy a TLR2 és TLR4 mind a boholy bélhámsejtekben, mind a lamina propria immunsejtjeiben kimutathatók [100; 101]. Jelen publikációnkban mi a HSP72 hasonló lokalizációját mutattuk ki cöliákiásokban. Összegezve az adatok arra utalnak, hogy a HSP72-TLR2/TLR4 szignál képes megváltoztatni az bélhámsejtek integritását és a glutén toxicitás elleni immunreakciót is. Cario és munkatársai kimutatták, hogy a TLR2 és TLR4 saját ligandjaikkal történő serkentése képes megőrizni az intesztinális epitélium barrier ZO-1 asszociált integritását [101; 102]. Emellett Galloway és társai azt találták, hogy a veleszületett immunrendszer sejtjeiben (pl.: monocitákban) a HSP72 TLR2-n és TLR4-en keresztül indukálta a proinflammatorikus citokin szintézist [18; 103], ami alátámasztja a protein potenciális szerepét, mint endogén jelzőmolekula [104; 105], ami immunválaszt serkent és elősegíti a házigazda védekezését.

7. KÖVETKEZTETÉSEK

1. Alveoláris epitelsejteket in vitro vizsgálva kontroll körülmények között a szteroid kezelés (DEX) nem befolyásolta sem az alveoláris epitelsejtek apoptózisát, sem a celluláris HSP72-expressziót.
2. A DFK szignifikánsan csökkentette az alveoláris epitelsejtek túlélését és proliferációját. A DFK súlyos sejsérülést okozott, mely a sejtek megnövekedett apoptózisához vezetett. DFK mellett DEX-t is alkalmazva, a kezelés szignifikánsan emelte a sejtek túlélését és szaporodását, dóziszfüggően mérsékelte az apoptózist. A legmagasabb, 10 μ M-os DEX kezelésnél azt kaptuk, hogy a DFK-tal kezelt csoportban az apoptózis a „kiindulási”, azaz a kontroll, szteroidmentes csoportban mért sejthalállal azonos szintre regrediált.
3. Kontroll körülmények között a szteroid kezelés nem befolyásolta szignifikánsan az alveoláris epitelsejtek HSP72-expresszióját. DFK kezelés hatására, míg az mRNS-szintben nem láttunk különbséget, addig a sejt HSP72-fehérje-tartalma és a HSP72-pozitív sejtek aránya is szignifikánsan nőtt. Az együttes DFK és szteroid kezelés dóziszfüggően tovább emelte a HSP72 fehérje expresszióját. Összehasonlítva a megfelelő csoportokat, minden DFK-tal kezelt csoportban a HSP72 fehérje expressziója szignifikánsan magasabb volt a kontroll csoportokhoz képest. A legnagyobb különbséget a 10 μ M-os dexametazon koncentrációnál mértük. HSP72 csendesítő mRNS használatával igazoltuk, hogy a DEX sejtvédő hatása DFK-tal kezelt sejteken jelentős mértékben a HSP72 által létrehozott sejtvédő mechanizmus eredménye.
4. A HSP72 (HSPA1B A(1267)G) polimorfizmusát vizsgálva SCLC-s és kontroll, egészséges emberek mintájában azt találtuk, hogy az allél frekvencia kismértékű csökkenést mutatott az A allélben a SCLC betegekben a kontrollokhoz képest. Ezzel ellentétben a GG genotípus sokkal gyakoribb volt SCLC csoportban az egészségesekhez képest, de a különbség nem érte el a szignifikancia szintjét. A

túlélést vizsgálva kimutattuk, hogy az A allélt hordozó betegek (AA és AG csoport) átlagos túlélési ideje szignifikánsan magasabb volt a GG csoporthoz képest. Az túlélés tekintetében tehát, szignifikáns csökkenést láttunk a GG genotípusú SCLC-ben szenvedő betegek esetében AA+AG páciensekhez viszonyítva. GG genotípusú betegeknél a tüdőrák előrehaladottabb stádiumban került felfedezésre, hiszen szignifikánsan több páciensnél volt kimutatható távoli metasztázis a diagnózis felállításakor.

Eredményeink szerint a HSP72 (HSPA1B A(1267)G) polimorfizmusa fontos, szignifikáns prognosztikai faktor SCLC-s betegeknél mind a tumorprogressziót, mind a túlélést vizsgálva.

5. A SCLC sejtekben immunhisztokémián látott HSP72 fehérje expressziója, és a HSP72 (HSPA1B A(1267)G) genotípusa közötti összefüggést vizsgálva eredményeink szerint a GG genotípusú betegeknél a tumorsejtek szignifikánsan alacsonyabb HSP72 fehérje expressziót mutattak a nem daganatos sejtekhez képest. Az AA, illetve AG genotípusú betegek mintájában nem volt különbség a HSP72 festődést illetően.
6. A duodenum biopsziákat vizsgálva szignifikánsan magasabb HSP72 mRNA és fehérje szintet láttunk mind a kezelt, mind a kezeletlen cöliákias betegeknél a kontrollhoz viszonyítva. Cöliákias betegeknél a kezelés hatására a HSP72 mRNA és fehérje szint szignifikánsan csökkent a kezeletlen gyermekekhez képest.
A kezeletlen gyermekek duodenum bolyhaiban erős HSP72 festődést láttunk mind a bélhámsejtekben, mind a lamina propria immunsejtjeiben, a kontrollhoz viszonyítva. Míg a kezelt cöliákiasok mintájában gyengébb HSP72 festődést észleltünk a kezeletlenekhez viszonyítva. A normál duodenumban (kontroll) nagyon gyenge immunreakciót találtunk.
7. A gluténmentes diéta szignifikánsan csökkenti az HSP72 expressziót mind a bélhámsejtekben, mind a lamina propria immunsejtjeiben.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

Eredményeink megerősítették, hogy a DFK apoptózist indukál az alveoláris epitelsejtekben. DEX csökkenti az apoptózist, ezáltal mérsékli a DFK indukálta sejtkárosodást. Kísérleteinkben bizonyítottuk a HSP72 kulcsfontosságú szerepét az epitelsejtek túlélésében DEX - DFK együttes kezelés esetén. A transzfekciós kísérleteink igazolták, hogy a dohányfüst expozíció után látott szteroid sejtvédő hatásában az emelkedett HSP72 szint elengedhetetlen. A HSP72 lehet az egyik új kulcsfontosságú molekula és potenciális terápiás célpont a dohányfüstnek kitétt tüdősejtekben. Mivel dohányosok milliói részesülnek szteroid kezelésben, további adatok szükségesek a cigarettafüst és a glukokortikoidok kölcsönhatásáról. További vizsgálatok segíthetnek annak eldöntésére, hogy mi a szerepe a HSP72-nek a dohányos, illetve a nem dohányos COPD-s betegekben, különösen, ami az alveolusfal pusztulását, emfizéma kialakulását illeti.

In vivo vizsgálatunk eredményei a HSP72 (HSPA1B A(1267)G polimorfizmusának szignifikáns prognosztikai szerepét mutatták SCLC-s betegekben. SCLC-ben a HSP72 (HSPA1B A(1267)G) GG variánsa a tumorsejtekben csökkent HSP72 fehérje expresszióval társult. A csökkent sejtvédő funkciók és gyengült tumorelles immunitás hozzájárulhat a rosszindulatú daganat gyorsabb progressziójához, azaz a metsztázisok képződéséhez és a rövidebb túléléshez.

A cöliákias gyermekek duodenum nyálkahártyájában emelkedett HSP72 szintet mértünk, mely a molekula lehetséges védő szerepét mutatja a gliadin toxicitás ellen. Antiapoptotikus hatása miatt elősegítheti az epiteliális sejtek túlélését, és segít visszaállítani az integritásukat, az intesztinális barrier funkcióit, ezáltal csökkentve a boholy atrófiát, ami a betegség fő tünete. A HSP72 TLR-2 és TLR-4-en keresztül a veleszületett immunrendszer sejtjei számára vészjelzőként működhet, mely által felerősíti hatásukat a sérülés ellen. További vizsgálatok szükségesek annak tisztázására, hogy mi a pontos szerepe a HSP72-nek cöliákiában. A HSP72 protektív szerepe miatt későbbiekben potenciális terápiás célpont lehet a gasztrointesztinális betegség kezelésében.

SUMMARY

In conclusion, our data confirmed that CSE induces apoptosis and necrosis in alveolar epithelial cells. DEX reduces CSE-induced cellular damage, by decreasing apoptosis. This is the first evidence of DEX-CSE interaction showing a key role of Hsp72 in alveolar epithelial cell survival. Our siRNA experiments confirmed that elevated Hsp72 is essential in the observed anti-apoptotic and protective effects of DEX following CSE exposure. Hsp72 might represent a new key molecule and a potential therapeutic target in smoke exposed lung cells. As millions of smokers are treated with glucocorticoids new data on cigarette smoke and glucocorticoid interaction are needed. Future experiments are necessary to evaluate the role of Hsp72 in smoker and non-smoker COPD patients, especially assessing the effects on alveolar destruction.

Our results demonstrated that HSP72 (HSPA1B A(1267)G) polymorphism is a significant prognostic factor of SCLC outcome. The HSP72 (HSPA1B A(1267)G) GG variant in SCLC patients was associated with decreased HSP72 protein expression in tumor cells. Impaired cytoprotective functions and decreased anti-tumor immunity of HSP72 might be a contributing factor to more rapid tumor progression as noted in these patients by metastasis formation and shorter survival – as we could see it in our patients, even if the sample size was small. This supports the assumption that altered expression of HSP72 might influence protection against stress factors and thereby decrease anti-tumor immunity.

The elevated level of HSP72 in the duodenal mucosa of children with CD found in our study indicates that this molecule may have a role in defense against the gliadinmediated cytotoxicity. Because of its antiapoptotic effects it may foster surveillance of the epithelial cells and helps to retain their integrity, potentially diminishing villous atrophy, which is a major symptom of the disease. HSP72 as a cellular chaperone activated due to stressors may serve as a “danger signal” for the cells of the innate immune system to promote their protection against injury. Additional studies are needed to clarify the precise role of HSP72 in CD. Furthermore, due to the protective effects of HSP72 it could be regarded as a potential therapeutic target to treat this gastrointestinal disease.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Hartl FU. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*. 1996 Jun 13; 381(6583):571-9. Review
2. Kocsis Judit, Füst György, Prohászka Zoltán. A 70 kDa-os hőszokkfehérje molekuláris biológiája és egyes immunológiai folyamatokban játszott szerepe. *Magyar Immunol/Hun Immunol* 2003; 2 (2): 5-15.
3. Morimoto RI. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev* 1998;12:3788–96.
4. McMillan DR, Xiao X, Shao L, Graves K, Benjamin IJ. Targeted disruption of heat shock transcription factor 1 abolishes thermotolerance and protection against heat-inducible apoptosis. *J Biol Chem*. 1998; 273(13):7523-8.
5. Sun L, Chang J, Kirchhoff SR, Knowlton AA. Activation of HSF and selective increase in heat-shock proteins by acute dexamethasone treatment. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000 Apr; 278(4):H1091-7.
6. Kováts Zsuzsanna dr., Gál Krisztina dr., Tamási Lilla dr., Müller Veronika dr. A 72 kDa súlyú indukálható hőszokkfehérje (HSP72) szerepe és lehetséges terápiás felhasználhatósága pulmonológiai kórképekben. *Med Thor* 2010; 63: 258-263.
7. Xanthoudakis S, Nicholson DW. Heat-shock proteins as death determinants. *Nat Cell Biol*. 2000 Sep;2(9):E163-5. Review.
8. Powers MV, Clarke PA, Workman P. Death by chaperone: HSP90, HSP70 or both? *Cell Cycle*. 2009 Feb 15;8(4):518-26.
9. Wheeler DS, Chase MA, Senft AP, Poynter SE, Wong HR, Page K. Extracellular HSP72, an endogenous DAMP, is released by virally infected airway epithelial cells and activates neutrophils via Toll-like receptor (TLR)-4. *Respir Res*. 2009;10(1):31.
10. Liu TS, Musch MW, Sugi K, Walsh-Reitz MM, Ropeleski MJ, Hendrickson BA, Pothoulakis C, Lamont JT, Chang EB. Protective role of HSP72 against *Clostridium difficile* toxin A-induced intestinal epithelial cell dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003;284(4):C1073-82.
11. Schmitt E, Gehrman M, Brunet M, Multhoff G, Garrido C. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *J Leukoc Biol*. 2007 Jan;81(1):15-27. Review

12. Asea A, Jean-Pierre C, Kaur P, Rao P, Linhares IM, Skupski D, Witkin SS. Heat shock protein-containing exosomes in mid-trimester amniotic fluids. *J Reprod Immunol.* 2008;79(1):12-7.
13. Asea A. Stress proteins and initiation of immune response: chaperone activity of HSP72. *Exerc Immunol Rev.* 2005;11:34-45.
14. Lehner T, Bergmeier LA, Wang Y, Tao L, Sing M, Spallek R, van der Zee R. Heat shock proteins generate beta-chemokines which function as innate adjuvants enhancing adaptive immunity. *Eur J Immunol.* 2000;30(2):594-603.
15. Panjwani NN, Popova L, Srivastava PK. Heat shock proteins gp96 and HSP70 activate the release of nitric oxide by APCs. *J Immunol.* 2002;168(6):2997-3003.
16. Asea A. Heat shock proteins and toll-like receptors. *Handb Exp Pharmacol.* 2008;183:111-27.
17. Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, Ghose S, Kirschning CJ, Issels R, Wagner H. HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J Biol Chem* 2002;277:15107-12.
18. Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, Auron PE, Stevenson MA, Calderwood SK. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem* 2002;277:15028–15034.
19. Almeida MB, do Nascimento JL, Herculano AM, Crespo-López ME. Molecular chaperones: toward new therapeutic tools. *Biomed Pharmacother.* 2011 Jul;65(4):239-43. Review.
20. Malusecka E, Krzyzowska-Gruca S, Gawrychowski J, Fiszer-Kierzkowska A, Kolosza Z, Krawczyk Z. Stress proteins HSP27 and HSP70 predict survival in non-small cell lung carcinoma. *Anticancer Res.* 2008 Jan-Feb;28(1B):501-6.
21. Michils A, Redivo M, Zegers de Beyl V, de Maertelaer V, Jacobovitz D, Rocmans P, Duchateau J. Increased expression of high but not low molecular weight heat shock proteins in resectable lung carcinoma. *Lung Cancer.* 2001 Jul;33(1):59-67.
22. Massa C, Melani C, Colombo MP. Chaperone and adjuvant activity of hsp70: different natural killer requirement for cross-priming of chaperoned and bystander antigens. *Cancer Res.* 2005; 65: 7942–9.
23. Wu Y, Wan T, Zhou X, Wang B, Yang F, Li N, Chen G, Dai S, Liu S, Zhang M, Cao X. Hsp70-like protein 1 fusion protein enhances induction of carcinoembryonic

- antigen-specific CD8⁺ CTL response by dendritic cell vaccine. *Cancer Res* 2005; 65: 4947–54.
24. Pockley AG. Heat shock proteins, inflammation, and cardiovascular disease. *Circulation* 2002; 105: 1012-1017.
25. Pockley AG. Heat shock proteins as regulators of the immune response. *Lancet* 2003; 362: 469-476.
26. Van Eden W, van der Zee R, Prakken B. Heat-shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 318-330.
27. Pratt WB, Morishima Y, Murphy M, Harrell M. Chaperoning of glucocorticoid receptors. *Handb Exp Pharmacol* 2006; 172: 111-138.
28. Pratt WB, Toft DO. Regulation of signaling protein function and trafficking by the HSP90/HSP70-based chaperone machinery. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2003 Feb;228(2):111-33.
29. Whitham M, Fortes MB. Heat shock protein 72: release and biological significance during exercise. *Front Biosci*. 2008;13:1328-39.
30. Odashima M, Otaka M, Jin M, Konishi N, Sato T, Kato S, Matsushashi T, Nakamura C, Watanabe S. Induction of a 72-kDa heat-shock protein in cultured rat gastric mucosal cells and rat gastric mucosa by zinc L-carnosine. *Dig Dis Sci*. 2002;47(12):2799-804.
31. Hunter-Lavin C, Davies EL, Bacelar MM, Marshall MJ, Andrew SM, Williams JH. HSP70 release from peripheral blood mononuclear cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 324: 511-517.
32. Bausero MA, Gastpar R, Multhoff G, Asea A. Alternative mechanism by which IFN- γ enhances tumour recognition: active release of heat shock protein 72. *J Immunol* 2005; 175: 2900-2912.
33. Johnson JD, Fleshner M. Releasing signals, secretory pathways, and immune function of endogenous extracellular heat shock protein 72. *J Leukoc Biol* 2006; 79: 425-434.
34. Szilasi M., Dolinay T., Nemes Z., Strausz J.: Pathology of chronic obstructive pulmonary disease, *Pathol Oncol Res*, Vol 12, Nr 1, 52-60, 2006
35. Park JW, Ryter SW, Choi AM. Functional significance of apoptosis in chronic obstructive pulmonary disease. *COPD*. 2007 Dec;4(4):347-53. Review.

36. Müller Veronika, Kováts Zsuzsanna, Tamási Lilla. A dohányfüst hatásai az immunrendszerre. *Med Thor* 2007. 60: 27-33.
37. www.who.int/en (www.wpro.who.int/media_centre/fact_sheets/fs_20060530.htm)
38. Punturieri A, Szabo E, Croxton TL, Shapiro SD, Dubinett SM. Lung cancer and chronic obstructive pulmonary disease: needs and opportunities for integrated research. *J Natl Cancer Inst.* 2009 Apr 15;101(8):554-9.
39. Ueda K, Jinbo M, Li TS, Yagi T, Suga K, Hamano K. Computed tomography-diagnosed emphysema, not airway obstruction, is associated with the prognostic outcome of early-stage lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2006 Nov 15;12(22):6730-6.
40. Houghton AM, Mouded M, Shapiro SD. Common origins of lung cancer and COPD. *Nat Med.* 2008 Oct;14(10):1023-4.
41. Kiri VA, Fabbri LM, Davis KJ, Soriano JB. Inhaled corticosteroids and risk of lung cancer among COPD patients who quit smoking. *Respir Med.* 2009 Jan;103(1):85-90.
42. Shaker SB, Dirksen A, Ulrik CS, Hestad M, Stavngaard T, Laursen LC, Maltbaek N, Clementsen P és mtsai. The effect of inhaled corticosteroids on the development of emphysema in smokers assessed by annual computed tomography. *COPD.* 2009 Apr;6(2):104-11.
43. Pujolsa L, Mullol J, Picado C. Glucocorticoid receptor in human respiratory epithelial cells. *Neuroimmunomodulation.* 2009;16(5):290-9. Epub 2009 Jun 29. Review
44. Adcock IM, Barnes PJ. Molecular mechanisms of corticosteroid resistance. *Chest.* 2008 Aug;134(2):394-401. Review.
45. Barnes PJ. Mechanism and resistance in glucocorticoid control of inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010;120(2–3):76–85
46. Rider CF, King EM, Holden NS, Giembycz MA, Newton R. Inflammatory stimuli inhibit glucocorticoid-dependent transactivation in human pulmonary epithelial cells: rescue by long-acting beta2-adrenoceptor agonists. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011 Sep;338(3):860-9. Epub 2011 May 27
47. Invernizzi G, Ruprecht A, De Marco C, Mazza R, Nicolini G, Boffi R. Inhaled steroid/tobacco smoke particle interactions: a new light on steroid resistance. *Respir Res.* 2009 Jun 11;10:48.

48. Rooney C, Sethi T. The epithelial cell and lung cancer: the link between chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer. *Respiration*. 2011;81(2):89-104. Epub 2011 Feb 10. Review.
49. Tiseo, M.; Ardizzoni, A. Current status of second-line treatment and novel therapies for small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2007, 2, 764-772.
50. Pociot F, Roningen KS, Nerup J: Polymorphic analysis of the human MHC-linked heat shock protein 70 (HSP70-2) and HSP70-Hom genes in insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Scand J Immunol* (1994) 38:491-495
51. Polanco I. Celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2008;47 Suppl 1:S3-6.
52. Anderson, JM, Van Itallie CM. Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 1995;269:G467-G475
53. Stepniak D, Koning F. Celiac disease--sandwiched between innate and adaptive immunity. *Hum Immunol*. 2006;67(6):460-8.
54. Maiuri L, Ciacci C, Ricciardelli I, Vacca L, Raia V, Auricchio S, Picard J, Osman M, Quarantino S, Londei M. Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease. *Lancet*. 2003;362(9377):30-7.
55. Koning F. Celiac disease: caught between a rock and a hard place. *Gastroenterology*. 2005;129(4):1294-301.
56. Giovannini C, Matarrese P, Scazzocchio B, Varí R, D'Archivio M, Straface E, Masella R, Malorni W, De Vincenzi M. Wheat gliadin induces apoptosis of intestinal cells via an autocrine mechanism involving Fas-Fas ligand pathway. *FEBS Lett*. 2003;540(1-3):117-24.
57. Bernhard D, Huck CW, Jakschitz T, Pfister G, Henderson B, Bonn GK, Wick G.: Development and evaluation of an in vitro model for the analysis of cigarette smoke effects on cultured cells and tissues. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2004; 50(1):45–51
58. Fekete, A.; Vannay, A.; Vér, A.; Rusai, K.; Müller, V.; Reusz, G.; Tulassay, T.; Szabó, A.J. Sex differences in heat shock protein 72 expression and localization in rats following renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006, 291, F806-811.

59. Fekete A, Treszl A, Toth-Hejn P, Vannay A, Tordai A, Tulassay T, Vasarhelyi B. Association between heat shock protein 72 gene polymorphism and acute renal failure in premature neonates. *Pediatr Res* 2003;54:452–455.
60. Kaushik G, Kaushik T, Khanduja S, Pathak CM, Khanduja KL. Cigarette smoke condensate promotes cell proliferation through disturbance in cellular redox homeostasis of transformed lung epithelial type-II cells. *Cancer Lett.* 2008 Oct 18;270(1):120-31.
61. Jiao ZX, Ao QL, Xiong M. Cigarette smoke extract inhibits the proliferation of alveolar epithelial cells and induces apoptosis. *Sheng Li Xue Bao.* 2006 Jun 25;58(3):244-54. PubMed PMID: 16786109.
62. Liu Y, Gao W, Zhang D. Effects of cigarette smoke extract on A549 cells and human lung fibroblasts treated with transforming growth factor-beta1 in a coculture system. *Clin Exp Med.* 2009 Nov 19
63. Forbes B, Ehrhardt C. Human respiratory epithelial cell culture for drug delivery applications. *Eur J Pharm Biopharm.* 2005 Jul; 60(2):193-205.
64. Demedts IK, Demoor T, Bracke KR, Joos GF, Brusselle GG. Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema. *Respir Res.* 2006 Mar 30;7:53.
65. Henson PM, Vandivier RW, Douglas IS. Cell death, remodeling, and repair in chronic obstructive pulmonary disease? *Proc Am Thorac Soc.* 2006 Nov;3(8):713-7. Review.
66. Yokohori N, Aoshiba K, Nagai A; Respiratory Failure Research Group in Japan. Increased levels of cell death and proliferation in alveolar wall cells in patients with pulmonary emphysema. *Chest.* 2004 Feb;125(2):626-32..
- 67 Ammous Z, Hackett NR, Butler MW, Raman T, Dolgalev I, O'Connor TP, Harvey BG, Crystal RG. Variability in small airway epithelial gene expression among normal smokers. *Chest.* 2008 Jun;133(6):1344-53.].
68. www.copdgold.com, megtekintve 2011. december 11-én
69. Melis M, Siena L, Pace E, Gjomarkaj M, Profita M, Pirazzoli A, Todaro M, Stassi G, Bonsignore G, Vignola AM. Fluticasone induces apoptosis in peripheral T-lymphocytes: a comparison between asthmatic and normal subjects. *Eur Respir J.* 2002 Feb;19(2):257-66.

70. Feng Z, Marti A, Jehn B, Altermatt HJ, Chicaiza G, Jaggi R. Glucocorticoid and progesterone inhibit involution and programmed cell death in the mouse mammary gland. *J Cell Biol.* 1995 Nov;131(4):1095-103.
71. Dorscheid DR, Patchell BJ, Estrada O, Marroquin B, Tse R, White SR. Effects of corticosteroid-induced apoptosis on airway epithelial wound closure in vitro. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006 Oct;291(4):L794-801
72. Wen LP, Madani K, Fahrni JA, Duncan SR, Rosen GD. Dexamethasone inhibits lung epithelial cell apoptosis induced by IFN-gamma and Fas. *Am J Physiol.* 1997 Nov;273(5 Pt 1):L921-9.
73. McConkey DJ. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. *Toxicol Lett.* 1998 Nov 12;99(3):157-68. Review.
74. Kato K, Yamanaka K, Nakano M, Hasegawa A, Okada S. 72-kDa stress protein (HSP72) induced by administration of dimethylarsinic acid to mice accumulates in alveolar flat cells of lung, a target organ for arsenic carcinogenesis. *Biol Pharm Bull.* 2000 Oct;23(10):1212-5.
75. Tani F, Ohno M, Furukawa Y, Sakamoto M, Masuda S, Kitabatake N. Surface expression of a C-terminal alpha-helix region in heat shock protein 72 on murine LL/2 lung carcinoma can be recognized by innate immune sentinels. *Mol Immunol.* 2009 Apr;46(7):1326-39.
76. Lewis, S.J.; Cherry, N.M.; Niven, R.M.; Barber, P.V.; Povey, A.C. Polymorphisms in the NAD(P)H: quinone oxidoreductase gene and small cell lung cancer risk in a UK population. *Lung Cancer* 2001, 34, 177-183.
77. Boldrini, L.; Ursino, S.; Gisfredi, S.; Faviana, P.; Donati, V.; Camacci, T.; Lucchi, M.; Mussi, A.; Basolo, F.; Pingitore, R.; Fontanini, G. Expression and mutational status of c-kit in small-cell lung cancer: prognostic relevance. *Clin Cancer Res* 2004, 10, 4101-4108.
78. Dally, H.; Edler, L.; Jager, B.; Schmezer, P.; Spiegelhalder, B.; Dienemann, H.; Drings, P.; Schulz, V.; Kayser, K.; Bartsch, H.; Risch, A. The CYP3A4*1B allele increases risk for small cell lung cancer: effect of gender and smoking dose. *Pharmacogenetics* 2003, 13, 607-618.

79. Wang, Y.; Zhou, F.; Wu, Y.; Xu, D.; Li, W.; Liang, S. The relationship between three heat shock protein 70 gene polymorphisms and susceptibility to lung cancer. *Clin Chem Lab Med* 2010, 48, 1657-1663.
80. Kingston, R.E.; Baldwin, A.S.; Sharp, P.A. Regulation of heat shock protein 70 gene expression by c-myc. *Nature (London)* 1984, 312, 280-282.
81. Caroline Jolly, Richard I. Morimoto. Role of the Heat Shock Response and Molecular Chaperones in Oncogenesis and Cell Death. *J Natl Cancer Inst.* 2000 Oct 4;92(19):1564-72. Review.
82. Finlay, C.A.; Hinds, P.W.; Tan, T.H.; Eliyahu, D.; Oren, M.; Levine, A.J. Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life. *Mol Cell Biol* 1988, 8, 531-539.
83. Agoff, S.N.; Hou, J.; Linzer, D.I.; Wu, B. Regulation of the human hsp70 promoter by p53. *Science* 1993, 259, 84-87.
84. Sherman, M. Major heat shock protein Hsp72 controls oncogene-induced senescence. *Ann N Y Acad Sci* 2010, 1197, 152-157.
85. Jaattela, M.; Wissing, D. Heat-shock proteins protect cells from monocyte cytotoxicity: possible mechanism of self-protection. *J Exp Med* 1993, 177, 231-236.
86. Michils, A.; Redivo, M.; Zegers de Beyl, V.; de Maertelaer, V.; Jacobovitz, D.; Rocmans, P.; Duchateau, J. Increased expression of high but not low molecular weight heat shock proteins in resectable lung carcinoma. *Lung Cancer* 2001, 33, 59-67.
87. Hettinga, J.V.; Lemstra, W.; Meijer, C.; Los, G.; de Vries, E.G.; Konings, A.W.; Kampinga, H.H. Heat-shock protein expression in cisplatin-sensitive and -resistant human tumor cells. *Int J Cancer* 1996, 67, 800-807.
88. Mestiri, S.; Bouaouina, N.; Ahmed, S.B.; Khedhaier, A.; Jrad, B.B.; Remadi, S.; Chouchane, L. Genetic variation in the tumor necrosis factor-alpha promoter region and in the stress protein hsp70-2: susceptibility and prognostic implications in breast carcinoma. *Cancer* 2001, 91, 672-678.
89. Zouari Bouassida, K.; Chouchane, L.; Jellouli, K.; Cherif, S.; Haddad, S.; Gabbouj, S.; Danguir, J. Polymorphism of stress protein HSP70-2 gene in Tunisians: susceptibility implications in type 2 diabetes and obesity. *Diabetes Metab* 2004, 30, 175-180.

90. Georgiadis, M.S.; Steinberg, S.M.; Hankins, L.A.; Ihde, D.C.; Johnson, B.E. Obesity and therapy-related toxicity in patients treated for small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1995, 87, 361-366.
91. De Stefani, E.; Boffetta, P.; Ronco, A.L.; Brennan, P.; Correa, P.; Deneo-Pellegrini, H.; Gutierrez, L.P.; Mendilaharsu M. Squamous and small cell carcinomas of the lung: similarities and differences concerning the role of tobacco smoking. *Lung Cancer* 2005,47,1-8.
92. Leeds JS, Hopper AD, Sanders DS. Coeliac disease. *Br Med Bull.* 2008;88(1):157-70.
93. Gianfrani C, Auricchio S, Troncone R. Adaptive and innate immune responses in celiac disease. *Immunol Lett.* 2005;99(2):141-5.
94. Cuzzocrea S, Ianaro A, Wayman NS, Mazzon E, Pisano B, Dugo L, Serraino I, Di Paola R, Chatterjee PK, Di Rosa M, Caputi AP, Thiernemann C. The cyclopentenone prostaglandin 15-deoxy-delta(12,14)- PGJ2 attenuates the development of colon injury caused by dinitrobenzene sulphonic acid in the rat. *Br J Pharmacol.* 2003;138(4):678-88.
95. Tao Y, Drabik KA, Waypa TS, Musch MW, Alverdy JC, Schneewind O, Chang EB, Petrof EO. Soluble factors from *Lactobacillus GG* activate MAPKs and induce cytoprotective heat shock proteins in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006;290(4):C1018-30.
96. Musch MW, Sugi K, Straus D, Chang EB. Heat-shock protein 72 protects against oxidant-induced injury of barrier function of human colonic epithelial Caco2/bbe cells. *Gastroenterology.* 1999;117(1):115-22.
97. Lindfors K, Blomqvist T, Juuti-Uusitalo K, Stenman S, Venäläinen J, Mäki M, Kaukinen K. Live probiotic *Bifidobacterium lactis* bacteria inhibit the toxic effects induced by wheat gliadin in epithelial cell culture. *Clin Exp Immunol.* 2008;152(3):552-8.
98. Maiuri L, Ciacci C, Ricciardelli I, Vacca L, Raia V, Auricchio S, Picard J, Osman M, Quarantino S, Londei M. Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease. *Lancet.* 2003;362(9377):30-7.
99. Schuppan D, Esslinger B, Dieterich W. Innate immunity and coeliac disease. *Lancet.* 2003;362(9377):3-4.

100. Szebeni B, Veres G, Dezsofi A, Rusai K, Vannay A, Bokodi G, Vásárhelyi B, Korponay-Szabó IR, Tulassay T, Arató A. Increased mucosal expression of Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2007;45(2):187-93.
101. Cario E, Podolsky DK. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun.* 2000;68(12):7010-7.
102. Cario E, Gerken G, Podolsky DK. Toll-like receptor 2 controls mucosal inflammation by regulating epithelial barrier function. *Gastroenterology.* 2007;132(4):1359-74.
103. Galloway E, Shin T, Huber N, Eismann T, Kuboki S, Schuster R, Blanchard J, Wong HR, Lentsch AB. Activation of hepatocytes by extracellular heat shock protein 72. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 295:C514–20.
104. Chase MA, Wheeler DS, Lierl KM, Hughes VS, Wong HR, Page K. Hsp72 induces inflammation and regulates cytokine production in airway epithelium through a TLR4- and NF-kappaB-dependent mechanism. *J Immunol.* 2007;179(9):6318-24.
105. Karoly E, Fekete A, Banki NF, Szebeni B, Vannay A, Szabo AJ, Tulassay T, Reusz GS. Heat shock protein 72 (HSPA1B) gene polymorphism and Toll-like receptor (TLR) 4 mutation are associated with increased risk of urinary tract infection in children. *Pediatr Res.* 2007; 61(3):371-4.

10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Disszertációhoz kapcsolódó közlemények:

Gál K, Cseh A, Szalay B, Rusai K, Vannay A, Lukácsovits J, Heemann U, Szabó AJ, Losonczy G, Tamási L, Müller V. Effect of cigarette smoke and dexamethasone on HSP72 system of alveolar epithelial cells. *CELL STRESS & CHAPERONES* 16:(4) pp. 369-378. (2011) IF: 3.013.

Klara Szondy, Krisztina Rusai, Attila J. Szabo, Andrea Nagy, **Gál K**, Andrea Fekete, Zsuzsanna Kovats, Gyorgy Losonczy, Jozsef Lukacsovits, and Veronika Muller. Tumor Cell Expression of Heat Shock Protein (HSP) 72 is Influenced by HSP72 [HSPA1B A(1267)G] Polymorphism and Predicts Survival in Small Cell Lung Cancer (SCLC) Patients. *CANCER INVESTIGATION* 30:(4) pp. 317-322. (2012) IF: 2.390**.

Sziksz E, Veres G, Vannay A, Prókai A, **Gál K**, Onody A, Korponay-Szabó IR, Reusz G, Szabó A, Tulassay T, Arató A, Szebeni B. Increased heat shock protein 72 expression in celiac disease. *JOURNAL OF PEDIATRIC GASTROENTEROLOGY AND NUTRITION* 51:(5) pp. 573-578. (2010) IF: 2.180.

Gál K, Cseh Áron Dr., Szalay Balázs Dr., Rusai Krisztina Dr., Vannay Ádám Dr., Lukácsovits József Dr., Uwe Heemann Dr., Szabó J. Attila Dr., Losonczy György Dr., Tamási Lilla Dr., Kováts Zsuzsanna Dr., Müller Veronika Dr.: Dohányfüst és szteroid hatása tüdő-epithelsejtek hőszokkfehérje (HSP) 72-rendszerére. *Medicina Thoracalis* • LXIV. 3, 2011 Jún.

Kováts Zsuzsanna Dr., **Gál K**, Tamási Lilla Dr., Müller Veronika Dr.: A 72 kDa súlyú indukálható hőszokkfehérje (HSP72) szerepe és lehetséges terápiás felhasználhatósága pulmonológiai kórképekben. *Medicina Thoracalis* • LXIII. 4, 2010. Aug.

Disszertációtól független közlemények:

Fekete Andrea, Rusai Krisztina, Müller Veronika, Prókai Ágnes, Vannay Ádám, Vér Ágota, Bánki Nóra, **Gál K**, Tulassay Tivadar, Reusz György, Szabó J Attila
Iszkémia/reperfúziós vesekárosodás patomechanizmusának experimentális vizsgálata
GYERMEKGYÓGYÁSZAT 60:(1) pp. 14-20. (2009)

Kádár Krisztina Dr., Nagy Erzsébet Dr., **Gál K** OH., Oprea Valéria Dr., Hartyánszky István Dr., Gyarmati Georgina Dr., Tóth Attila Dr. és Sikos Zita Dr.: B-natriuretikus peptid meghatározás jelentősége gyermekkori szívbetegségekben, Orvosi Hetilap, 2007 148(6); 265-70.

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretném köszönetemet kifejezni **Dr. Losonczy György Professzor Úrnak**, hogy az általa vezetett PhD program résztvevője lehettem. Hálás vagyok a szakmai és az anyagi háttér biztosításáért, mely folyamatosan lehetővé tette, hogy PhD munkám éveit egy nemzetközi szinten is elismert laboratóriumban tölthessem, az I. Sz. Gyermekklinika kutatólaboratóriumában.

Hálával tartozom témavezetőimnek, **Dr. Müller Veronikának és Prof. Magyar Pálnak**, hogy tudományos pályámon elindítottak. Köszönöm nekik, hogy munkám során támogatásukra bármikor számíthattam, és hogy a kutatómunka szakmai és technikai feltételeit megteremtették számomra. Külön köszönettel tartozom Dr. Szabó Attilának a munkatervem kidolgozásában nyújtott segítségért, és hogy megteremtette számomra annak lehetőségét is, hogy számos szakmai konferencián részt vehessek.

Köszönöm **Dr. Vannay Ádámnak** a munkatervem kidolgozásában és a kutatómunkám során nyújtott folyamatos metodikai segítségért, **Dr. Szebeni Beának**, és **Dr. Rusai Krisztinának**, hogy megtanítottak a kutatómunka lépéseire a molekuláris biológiai metodikák alkalmazásától egészen az eredmények publikálásáig.

Köszönettel tartozom **Dr. Szabó Attilának**, a biztató szavakért, az önzetlen szakmai és emberi segítségéért.

Köszönöm **Dr. Takács Zoltánnak, Dr. Szalay Balázsnak, Dr. Cseh Áronnak és Dr. Sziksz Ernának**, hogy a tudományos kísérletek elvégzésében, valamint a közlemények publikálásában segítségemre voltak.

Köszönöm az I. Sz. Gyermekklinika kutatóinak, **Dr. Prókai Ágnesnek, Dr. Kis Évának, Dr. Szalay Balázsnak, Dr. Cseh Áronnak, Dr. Sziksz Ernának és Dr. Cseprekál Orsolyának**, hogy baráti, segítő társaságukban, mindenkor jó hangulatban végezhettem PhD munkámat.

Köszönöm **Bernáth Máriának** a kitűnő technikai asszisztenciát és hogy önzetlen segítségére mindig számíthattam.

Végezetül nagyon nagy hálával tartozom szeretett szüleim és párom felé a mindenkor megértésükért és türelmükért, és hogy segítségükre mindig számíthattam.